



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Doctorado en Ciencias con mención en Química

DIAZABICICLOOCTANONAS COMO INHIBIDORES DE
OXA-24: UN ANÁLISIS QUÍMICO COMPUTACIONAL

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de
Concepción para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en
Química.

POR: Ignacio Esteban Lizana Bastías
Profesor Guía: Eduardo José Leonardo Delgado Ramírez
Profesora Co-guía: Elena Amparo Uribe Pérez

Septiembre 2022
Concepción, Chile.

Derecho de autor

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.



AGRADECIMIENTOS

Esta memoria de tesis va dedicada a todas aquellas personas que me han apoyado en el transcurso de mis estudios, especialmente a mi familia por su amor incondicional, a mi profesor por todo lo que me ha enseñado, su preocupación y apoyo en momentos difíciles, a mis amigos del doctorado y externos al programa, como también a las secretarías Karin Garcés y Francia Paris que con su vocación y cariño siempre quedarán en mi memoria. Agradezco también a ANID por el financiamiento de mis estudios, mediante adjudicación de la beca de Doctorado Nacional con folio 21180377.



Tabla de Contenido

Derecho de autor.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
Índice de tablas.....	vii
Índice de ilustraciones.....	viii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Enzimas β-lactamasas.....	1
1.1.1. Clasificación.....	2
1.1.2. Ciclo catalítico.....	3
1.1.3. Enzimas β -lactamasas de clase D.....	5
1.2. Inhibidores de β-lactamasa.....	7
1.2.1. Inhibidores β -lactámicos.....	7
1.2.2. Inhibidores no β -lactámicos.....	11
1.2.2.1. Inhibidores basados en boronatos cíclicos.....	12
1.2.2.2. Inhibidores basados en diazabiciclooctanonas (DBOs).....	14
2. HIPOTESIS.....	20
3. METODOLOGÍA.....	22
3.1. Dinámica Molecular.....	22
3.1.1. Construcción del sistema enzima inhibidor.....	22
3.1.2. Simulaciones de dinámica molecular.....	24
3.2. Análisis de clúster.....	26
3.3. Cálculos QM/MM (Quantum Mechanics/Molecular Mechanics).....	28

4. DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	34
4.1. Sistema OXA-24/avibactam.....	34
4.1.1. Objetivo 1: Acilación de OXA-24 por avibactam.....	34
4.1.1.1. Dinámica Molecular.....	34
4.1.1.2. Análisis de clúster.....	35
4.1.1.3. Mecanismo de acilación.....	37
4.1.1.3.1. Primera etapa, formación del intermediario tetraédrico.....	37
4.1.1.3.2. Segunda etapa, formación del intermediario acil-enzima.....	41
4.1.2. Objetivo 2: Desacilación de OXA-24 por avibactam.....	46
4.1.2.1. Dinámica molecular.....	46
4.1.2.2. Análisis de clúster.....	46
4.1.2.3. Mecanismo de desacilación.....	49
4.1.2.3.1. Etapas 1 y 2: Formación de intermediario dianiónico e intermediario tetraédrico.....	49
4.1.2.3.2. Etapa 3: Regeneración del inhibidor y la enzima.....	54
4.2. Sistema OXA-24/ETX2514.....	60
4.2.1. Objetivo 3: Acilación de OXA-24 por ETX2514.....	60
4.2.1.1. Dinámica molecular.....	60
4.2.1.2. Análisis de clúster.....	61
4.2.1.3. Mecanismo de acilación.....	64
4.2.1.3.1. Primera etapa, formación del intermediario tetraédrico.....	64
4.2.1.3.2. Segunda etapa, formación del intermediario acil-enzima.....	68
4.2.2. Objetivo 4: Desacilación de OXA-24 por ETX2514.....	73
4.2.2.1. Dinámica molecular.....	73

4.2.2.2. Análisis de clúster.....	73
4.2.2.3. Mecanismo de desacilación.....	76
4.2.2.3.1. Etapas 1 y 2: Formación de intermediario dianiónico e intermediario tetraédrico.....	76
4.2.2.3.2. Etapa 3: Regeneración del inhibidor y la enzima.....	81
5. CONCLUSIONES.....	90
ANEXO.....	92
BIBLIOGRAFÍA.....	108



Índice de Tablas

Tabla 1. Barreras de energía potencial calculadas y barreras de energía de activación experimentales.....	88
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------	----



Índice de ilustraciones

Figura 1. Mecanismo general de hidrólisis de penicilinas mediante una enzima serina β -lactamasa.....	4
Figura 2. Inhibidores de enzimas β -lactamasas con anillo β -lactámico.....	8
Figura 3. Mecanismo de inhibición de enzimas β -lactamasas por ácido clavulánico.....	10
Figura 4. Inhibidores no β -lactámicos de enzimas β -lactamasas.....	12
Figura 5. Mecanismo de inhibición de enzimas β -lactamasas por vaborbactam.....	13
Figura 6. Inhibidores no β -lactámicos tipo boronatos cíclicos.....	13
Figura 7. Diagrama esquemático correspondiente al mecanismo de inhibición de enzimas β -lactamasas por diazabiciclooctanonas.....	15
Figura 8. Estructura química de avibactam y ETX2514.....	17
Figura 9. Mecanismo de inhibición de enzimas OXAs por avibactam postulado por Lahiri et al.....	19
Figura 10. Estructura 3D de la caja cubica de solvatación como sistema de partida para las simulaciones de dinámica molecular.....	24
Figura 11. Ángulos diedros α , β y γ utilizados en el análisis de clúster, tanto para los sistemas a) inhibidor + enzima y b) intermediario acil-enzima.....	27
Figura 12. Estructura 3D de esfera de 30 Å obtenida a partir de la estructura representativa.....	29
Figura 13. Esquema reducido de la zona QM en complejo OXA-24/Avibactam-acilado.....	30
Figura 14. Esquema de coordenadas de reacción utilizadas para estudiar el mecanismo de a) acilación (R1, R2 y R3) y b) desacilación (R4, R5, R6 y R7).....	32
Figura 15. Análisis de clúster para los ángulos γ v/s α (a); γ v/s β (b).	36

Figura 16. Estructura representativa obtenida a 44 ns de la dinámica molecular.....	36
Figura 17. Esquema de la primera etapa del mecanismo de acilación de OXA-24 por parte de avibactam.....	38
Figura 18. Superficie de energía potencial 2D para primera etapa en el mecanismo de acilación de OXA-24 por parte de avibactam.....	39
Figura 19. Estructuras 3D correspondiente al intermediario tetraédrico IT.....	40
Figura 20. Perfil de energía potencial relativa para primera etapa en el mecanismo de acilación de OXA-24 por parte de avibactam.....	41
Figura 21. Esquema de la segunda etapa del mecanismo de acilación de OXA-24 por parte de avibactam.....	43
Figura 22. Perfil de energía relativa para segunda etapa en el mecanismo de acilación de OXA-24 por parte de avibactam.....	44
Figura 23. Estructura 3D correspondiente al intermediario acil-enzima.....	45
Figura 24. Análisis de clúster para ángulos γ v/s α (a); γ v/s β (b).....	48
Figura 25. Estructura representativa obtenida a 44 ns de la dinámica molecular.....	48
Figura 26. Esquema de la primera y segunda etapa del mecanismo de desacilación de avibactam en OXA-24.....	51
Figura 27. Superficie de energía potencial 2D que incluye la primera y segunda etapa del mecanismo de desacilación.....	52
Figura 28. Estructura 3D correspondiente al a) intermediario dianiónico ID e b) intermediario tetraédrico IT.....	53
Figura 29. Perfil de energía relativa para primera y segunda etapa en el mecanismo de desacilación de OXA-24 por avibactam.....	54
Figura 30. Esquema de la tercera etapa y final del mecanismo de desacilación de OXA-24 por avibactam.....	56
Figura 31. Superficie de energía potencial 2D que involucra la tercera etapa del mecanismo de desacilación.....	57
Figura 32. Estructura 3D correspondiente al producto P.....	58
Figura 33. Perfil de energía relativa para la tercera etapa en el mecanismo de desacilación de OXA-24 por avibactam.....	59

Figura 34. Análisis de clúster para a) ángulos γ v/s α y b) γ v/s β	62
Figura 35. Estructura representativa obtenida a 86 ns de la dinámica molecular.....	63
Figura 36. Esquema de la primera etapa del mecanismo de acilación de OXA-24 por parte de ETX2514.....	65
Figura 37. Superficie de energía potencial 2D para primera etapa en el mecanismo de acilación de OXA-24 por parte de ETX2514.....	66
Figura 38. Estructuras 3D correspondiente al intermediario tetraédrico IT	67
Figura 39. Perfil de energía relativa para primera etapa en el mecanismo de acilación de OXA-24 por parte de ETX2514.....	68
Figura 40. Esquema de la segunda etapa del mecanismo de acilación de OXA-24 por parte de ETX2514.....	70
Figura 41. Perfil de energía relativa para segunda etapa en el mecanismo de acilación de OXA-24 por parte de ETX2514.....	71
Figura 42. Estructura 3D correspondiente al intermediario acil-enzima (AE).....	72
Figura 43. Análisis de clúster para a) ángulos γ v/s α y b) γ v/s β	75
Figura 44. Estructura representativa obtenida a 23 ns de la dinámica molecular.....	75
Figura 45. Esquema de la primera y segunda etapa del mecanismo de desacilación de OXA-24 por parte de ETX2514.....	78
Figura 46. Superficie de energía potencial 2D que involucra primera y segunda etapa del mecanismo de desacilación.....	79
Figura 47. Estructura 3D correspondiente al a) intermediario dianiónico ID e b) Intermediario tetraédrico IT.....	80
Figura 48. Perfil de energía relativa para primera y segunda etapa en el mecanismo de desacilación de OXA-24 por ETX2514.....	81
Figura 49. Esquema de la tercera etapa y final del mecanismo de desacilación de OXA-24 por parte de ETX2514.....	83

Figura 50. Superficie de energía potencial 2D que involucra la tercera etapa del mecanismo de desacilación.....	84
Figura 51. Estructura 3D correspondiente al intermediario acil-enzima (P).....	85
Figura 52. Perfil de energía relativa para la tercera etapa en el mecanismo de desacilación de OXA-24 por ETX2514.....	86
Figura 53. Esquema del ciclo catalítico del mecanismo de inhibición, acilación y desacilación, postulado para la inhibición de OXA-24 por avibactam y ETX2514.....	89
Anexo 1. Resultados de RMSD para la proteína (a), RMSF para residuos de la proteína (b), RMSF para residuos relevantes del sitio activo (c).....	92
Anexo 2. Estructura 3D correspondiente al complejo de Michaelis CM-1.....	93
Anexo 3. Estructura 3D correspondiente al estado de transición ET-1.....	93
Anexo 4. Estructura 3D correspondiente al complejo de Michaelis CM-2.....	94
Anexo 5. Estructura 3D correspondiente al estado de transición ET-2.....	94
Anexo 6. Resultados de a) RMSD para la proteína en función del tiempo de simulación, b) RMSF para residuos de la proteína y c) RMSF para residuos relevantes del sitio activo.....	95
Anexo 7. Estructura 3D correspondiente al complejo de Michaelis CM-3.....	95
Anexo 8. Estructura 3D correspondiente al estado de transición ET-3.....	96
Anexo 9. Estructura 3D correspondiente al estado de transición ET-4.....	96
Anexo 10. Estructura 3D correspondiente al complejo de Michaelis CM-4.....	97
Anexo 11. Estructura 3D correspondiente al estado de transición ET-5.....	97
Anexo 12. Estructura 3D correspondiente al estado de transición ET-6.....	98
Anexo 13. Estructura 3D correspondiente al complejo de Michaelis CM-5.....	98
Anexo 14. Estructura 3D correspondiente al estado de transición ET-7.....	99
Anexo 15. Estructura 3D correspondiente al estado de transición ET-8.....	99
Anexo 16. Resultados de RMSD para la proteína (a), RMSF para residuos de la proteína (b), RMSF para residuos claves del sitio activo (c).....	100
Anexo 17. Estructura 3D correspondiente al complejo de Michaelis CM-6.....	100
Anexo 18. Estructura 3D correspondiente al estado de transición ET-9.....	101
Anexo 19. Estructura 3D correspondiente al complejo de Michaelis CM-7.....	101

Anexo 20. Estructura 3D correspondiente al estado de transición ET-10.....	102
Anexo 21. Resultados de RMSD para la proteína (a), RMSF para residuos de la proteína (b), RMSF para residuos claves del sitio activo (c).....	102
Anexo 22. Estructura 3D correspondiente al complejo de Michaelis CM-8.....	103
Anexo 23. Estructura 3D correspondiente al estado de transición ET-11.....	103
Anexo 24. Estructura 3D correspondiente al estado de transición ET-12.....	104
Anexo 25. Estructura 3D correspondiente al complejo de Michaelis CM-9.....	104
Anexo 26. Estructura 3D correspondiente al estado de transición ET-13.....	105
Anexo 27. Estructura 3D correspondiente al estado de transición ET-14.....	105
Anexo 28. Estructura 3D correspondiente al complejo de Michaelis CM-10.....	106
Anexo 29. Estructura 3D correspondiente al estado de transición ET-15.....	106
Anexo 30. Estructura 3D correspondiente al estado de transición ET-16.....	107



RESUMEN

Inhibidores basados en diazabicyclooctanonas (DBO) tales como ETX2514 y avibactam han probado ser eficientes drogas para combatir la resistencia a los antibióticos desarrollada por patógenos. Sin embargo, avibactam es inefectivo contra infecciones causadas por *Acinetobacter baumannii*; mientras que ETX2514 muestra tener un amplio y potente rango de inhibición de β -lactamasas. Sin embargo, las bases moleculares para explicar esta diferencia no han sido abordadas desde un punto de vista teórico lo que limita la obtención de información relevante del mecanismo acerca de los intermediarios, etapas limitantes y barreras de activación. En esta tesis, tanto la etapa de acilación como la de desacilación involucradas en la inhibición de OXA-24 por ETX2514 y avibactam son analizadas teóricamente mediante un estudio combinado de Dinámica Molecular y cálculos híbridos QM/MM. Los resultados muestran que las etapas limitantes de la velocidad son aquellas involucradas en la apertura del anillo del inhibidor y su subsecuente cierre de anillo. La etapa de acilación es más rápida para ETX2514 comparada con avibactam, mientras que en la etapa de desacilación no se observan diferencias importantes; lo cual significa que OXA-24 es inactivada más eficientemente por ETX2514, en concordancia con la evidencia empírica.

ABSTRACT

Diazabicyclooctanone (DBO) inhibitors such as ETX2514 and avibactam have shown enhanced inhibitory performance to fight the antibiotic resistance developed by pathogens. However, avibactam is ineffective against *Acinetobacter baumannii* infections; while ETX2514 shows the broadest potent spectrum of β -lactamase inhibition. However, the molecular basis to explain this difference has not been tackled from a mechanistic point of view, precluding in this way to know relevant information of the mechanism such as intermediates, rate limiting step, and activation barriers. In this thesis, the acylation and deacylation stages involved in the inhibition of OXA-24 by ETX2514 and avibactam are analyzed theoretically by means of a combined study of Molecular Dynamics and hybrid QM/MM/MM calculations. The results show that the rate limiting steps are those involved in both the ring opening of the inhibitor and its subsequent ring closure. The acylation stage is faster for ETX2514 compared to avibactam, while in deacylation stage there is no important differences are observed; this means that OXA-24 is inactivated more efficiently by ETX2514, in agreement with the empirical evidence.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Enzimas β -lactamasas

El descubrimiento de la penicilina en el año 1929 (Fleming, 1929) y la síntesis de sus derivados denominados antibióticos β -lactámicos, es sin duda uno de los grandes avances de la medicina moderna, aumentando significativamente la esperanza de vida tanto en humanos como en animales (Aminov, 2010; Karen Bush, 2010). Estos antibióticos actúan mediante su anclaje a las proteínas denominadas “penicillin-binding protein” (PBP), las cuales se encuentran en la membrana celular bacteriana, impidiendo la formación de peptidoglican y con ello produciendo eventualmente la lisis celular (Demain & Elander, 1999). Sin embargo, las bacterias han desarrollado mecanismos de resistencia (Drawz & Bonomo, 2010; Munita & Arias, 2016), frente a estos fármacos, que incluyen la producción de las enzimas β -lactamasas por parte de bacterias Gram-negativas (Fisher, Meroueh, & Mobashery, 2005). Estas enzimas hidrolizan el anillo β -lactámico de los antibióticos tales como penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos, inactivándolos de forma irreversible y con ello haciéndolos

ineficientes para la muerte bacterial (Higgins, Dammhayn, Hackel, & Seifert, 2009; Pratt & McLeish, 2010; Wright, 2005).

1.1.1. Clasificación

Existen varias formas de clasificar las enzimas β -lactamasas (Karen Bush & Jacoby, 2010), siendo la más común la clasificación de Ambler (Ambler, Baddiley, & Abraham, 1980; Hall & Barlow, 2005), la cual establece que existen 4 clases de enzimas β -lactamasas, clases A, B, C y D; basadas en la similitud de sus secuencias de aminoácidos y especificidad frente a algún determinado tipo de sustrato. Las enzimas de clase A, C y D, denominadas serina β -lactamasas (Ghuysen, 1991), usan un residuo de serina en la catálisis que actúa como nucleófilo frente al carbonilo β -lactámico, mientras que en las enzimas de clase B, denominadas metalo- β -lactamasas (Crowder, Spencer, & Vila, 2006), requieren de iones Zinc ($2+$), los cuales activan una molécula de agua en el sitio activo para el ataque nucleofílico e hidrólisis.

1.1.2. Ciclo catalítico

De acuerdo a la literatura (Drawz & Bonomo, 2010; Hermann, Hensen, Ridder, Mulholland, & Höltje, 2005; Hermann, Ridder, Mulholland, & Höltje, 2003; Meroueh, Fisher, Schlegel, & Mobashery, 2005), en las serina- β -lactamasas el mecanismo enzimático incluye etapas de acilación y desacilación, ambas incluyen una transferencia protónica facilitada por una catálisis ácido-base general. En la etapa de acilación, el residuo aminoacídico serina, responsable del anclaje covalente, se activa mediante abstracción del hidrógeno hidroxílico por parte de un grupo con características ácido-base (B^-), con el subsecuente ataque al grupo carbonílico del anillo β -lactámico, formando el primer intermediario tetraédrico, en el cual el átomo de nitrógeno del antibiótico es protonado a través de un grupo con características ácido-base (BH), formando el intermediario acil-enzima. Posteriormente, en la etapa de desacilación o hidrólisis, una molécula de agua es activada mediante desprotonación por parte de un residuo aminoacídico con características ácido-base (B^-), y que luego ataca de forma nucleofílica al grupo carbonílico del anillo β -lactámico del intermediario acil-enzima, formando un segundo intermediario tetraédrico, en el cual el oxígeno hidroxílico del residuo aminoacídico serina es protonado a través de un grupo con características ácido-base (BH), liberando el antibiótico hidrolizado y regenerando la enzima, Figura 1.

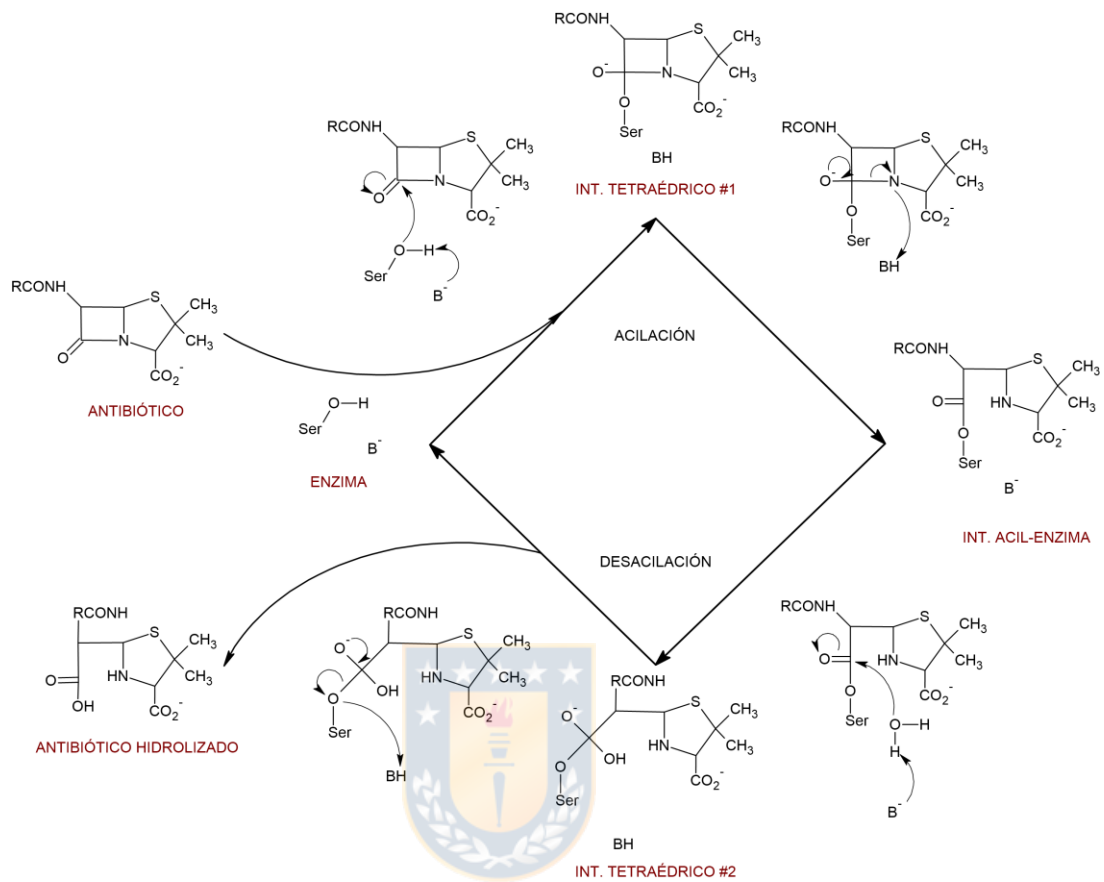


Figura 1. Mecanismo general de hidrólisis de penicilinas mediante una enzima serina β -lactamasa.

1.1.3. Enzimas β -lactamasas de clase D

Actualmente, alrededor de 1000 enzimas β -lactamasas han sido documentadas comprendiendo variadas clases estructurales y un amplio rango de sustratos y eficiencia catalítica (Karen Bush, 2013). Entre las enzimas serina β -lactamasas, las enzimas de clase D (Antunes & Fisher, 2014; Evans & Amyes, 2014; Leonard, Bonomo, & Powers, 2013), también denominadas OXAs (Oxacilinasas), han mostrado un aumento considerable de nuevas variantes en el último tiempo (Karen Bush & Fisher, 2011). Su nombre se debe al hecho de que las primeras enzimas OXAs descritas tenían una tasa de hidrólisis 50% más alta para el antibiótico oxacilina que para la bencilpenicilina (K. Bush, Jacoby, & Medeiros, 1995), aunque esta generalización ya no es válida (Walther-Rasmussen & Høiby, 2006) se sigue usando. Las OXAs son frecuentemente encontradas en microorganismos tales como *Acinetobacter baumannii* (Gordon & Wareham, 2010) y *Pseudomonas aeruginosa* (Poirel, Naas, & Nordmann, 2010), los cuales representan dos de los patógenos más difíciles de tratar, debido a que a menudo presentan multi-resistencia a los antibióticos (Zavascki, Carvalhaes, Picão, & Gales, 2010), tales como cefalosporinas de amplio espectro y carbapenémicos; siendo estos la última línea de defensa frente a esta clase de microorganismos, amenazando significativamente la salud humana. A pesar de la gran diversidad

encontrada en esta clase de enzimas (más de 400 especies encontradas hasta la fecha) (Evans & Amyes, 2014), existen 2 características principales que las distinguen frente a las otras enzimas serina β -lactamasas (Clase A y C). Entre las características distintivas de la OXAS se pueden mencionar las siguientes:

a) Hidrofobicidad: De acuerdo a análisis estructurales y de secuencia, se ha encontrado una alta frecuencia de aminoácidos alifáticos y aromáticos alrededor del sitio activo (Leonard et al., 2013), confiriéndole mayor hidrofobicidad en comparación con las otras clases de enzimas serina β -lactamasas (Maveyraud et al., 2000; Paetzel et al., 2000). Además, un gran número de enzimas OXAs de importancia clínica (OXA-23, OXA-24, OXA-51 y OXA-58) poseen un “puente hidrofóbico” que se extiende alrededor del sitio activo, permitiendo que el sustrato β -lactámico permanezca para su posterior hidrólisis (Santillana, Beceiro, Bou, & Romero, 2007).

b) Lisina carboxilada: A diferencia de las enzimas β -lactamasas de clase A y C, las enzimas de clase D carecen del residuo Glu166 y en su lugar existe un residuo de lisina carboxilada. Se postula que la hidrofobicidad anteriormente señalada promueve la formación de esta inusual modificación post-traducciona, es decir, carboxilación del grupo amino del residuo aminoacídico Lys84 (Maveyraud et al., 2000). Esta reacción química se lleva a cabo entre el grupo amino del residuo de

Lys84 en su forma neutra y dióxido de carbono (J. Li et al., 2005). A diferencia de otras enzimas en las cuales esta modificación tiene un rol meramente estructural (Benning, Kuo, Raushel, & Holden, 1995; Jabri, Carr, Hausinger, & Karplus, 1995), en las enzimas β -lactamasas de clase D, se considera que tiene un rol catalítico, puesto que mutaciones sobre este residuo aminoacídico afectan seriamente su actividad enzimática (Che et al., 2012; Golemi, Maveyraud, Vakulenko, Samama, & Mobashery, 2001; Schneider et al., 2009).



1.2. Inhibidores de β -lactamasas

1.2.1. Inhibidores β -lactámicos

Una estrategia probada para superar el mecanismo de resistencia a los antibióticos es combinar un antibiótico β -lactámico con un inhibidor de la enzima β -lactamasa, es así como al final de la década de los 70 e inicio de los 80, tres inhibidores β -lactámicos fueron llevados a uso clínico: ácido clavulánico,

sulbactam y tazobactam, todos ellos contienen un anillo β -lactámico (Bebrone et al., 2010; Biondi, Long, Panunzio, & L. Qin, 2011; Nichols et al., 2012), Figura 2.

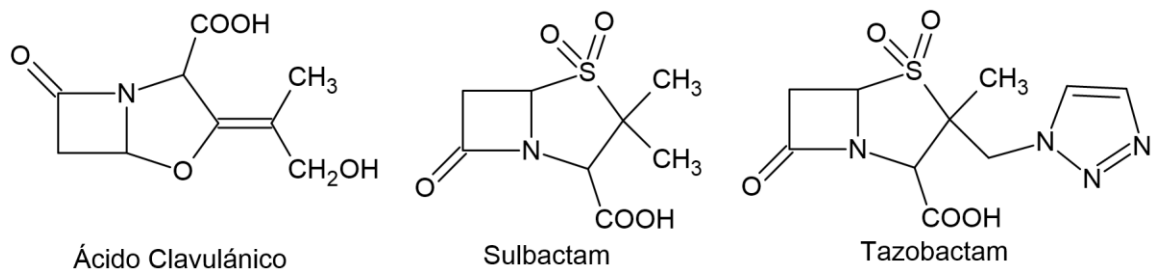


Figura 2. Inhibidores de enzimas β -lactamasas con anillo β -lactámico.

Estudios experimentales sugieren que estos inhibidores siguen caminos de reacción análogos a los antibióticos β -lactámicos, comenzando con la formación de un intermediario acil-enzima en una primera etapa. Sin embargo, luego de la acilación ocurre una etapa de apertura del anillo β -lactámico, lo cual conduce a la formación de un intermediario de imina. Este intermediario es un punto de partida en común que conduce a la inhibición transitoria de la enzima, ya sea mediante formación de cis-enamina o trans-enamina. Finalmente, en la etapa de

desacilación del intermediario de enamina se produce la descarboxilación y posterior hidrolisis del enlace Ser(O)-C, inactivando irreversiblemente el inhibidor y regenerando la enzima β -lactamasa, aunque muy lentamente (Drawz & Bonomo, 2010), Figura 3.



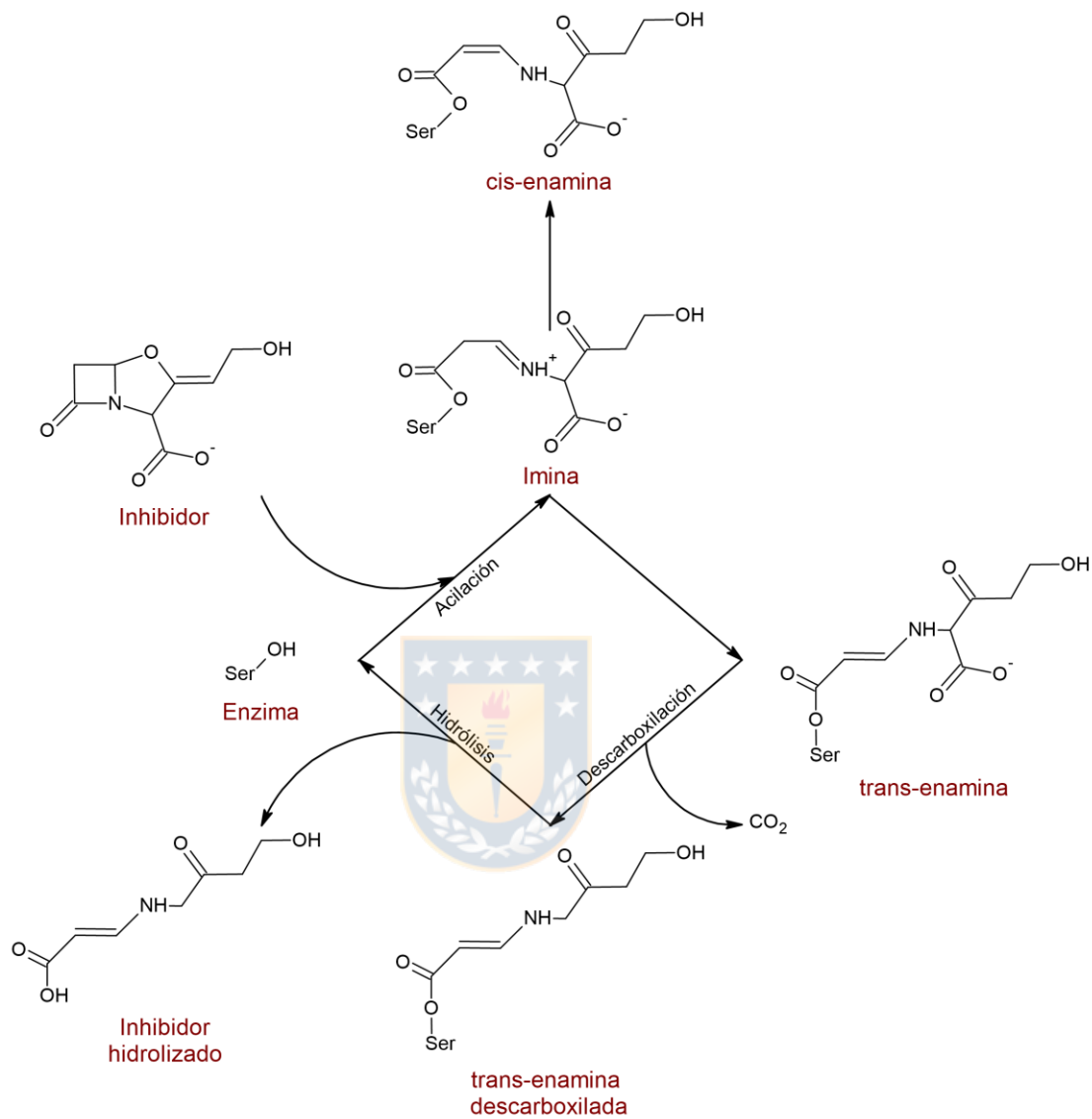
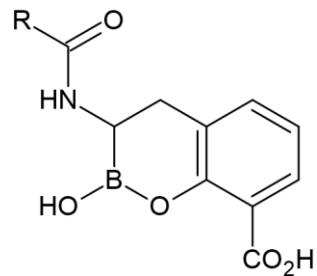


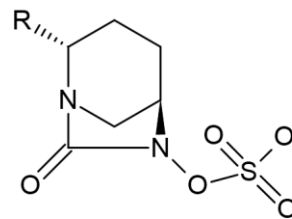
Figura 3. Mecanismo de inhibición de enzimas β -lactamasas por ácido clavulánico.

1.2.2. Inhibidores no β -lactámicos

En general, las enzimas β -lactamasas de clase D no son inhibidas por inhibidores β -lactámicos, tales como: ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam (Payne, Cramp, Winstanley, & Knowles, 1994), lo que motivó el desarrollo de nuevos inhibidores. En este contexto se han creado nuevas familias de inhibidores no β -lactámicos de β -lactamasas (Drawz, Papp-Wallace, & Bonomo, 2014) tales como: boronatos cíclicos (Cahill et al., 2017) y diazabiciclooctanonas (DBOs) (Coleman, 2011), Figura 2, los cuales no contienen un anillo β -lactámico dentro de su estructura química.



Boronatos cíclicos



Diazabicyclooctanonas (DBOs)

Figura 4. Inhibidores no β -lactámicos de enzimas β -lactamasas.



1.2.2.1. Inhibidores basados en boronatos cíclicos

Son considerados inhibidores de amplio espectro, ya que algunos de ellos pueden inhibir tanto serina- β -lactamasas como metalo- β -lactamasas, mediante un mecanismo que involucra un análogo del intermediario tetraédrico que se forma comúnmente en estas enzimas en la etapa de acilación, debido a que el átomo de boro presente en su estructura actúa como electrófilo frente al ataque nucleofílico del residuo de serina catalítica, formando un enlace covalente (Brem et al., 2016; Cahill et al., 2017), Figura 5. Entre estos inhibidores destacan vaborbactam (Hecker et al., 2015), taniborbactam (Hamrick et al., 2020), y

xeruborbactam (Hecker et al., 2020), Figura 6. Sin embargo, estos inhibidores generalmente no muestran el mismo grado de efectividad contra enzimas de clase D, en comparación con los inhibidores de tipo DBO.

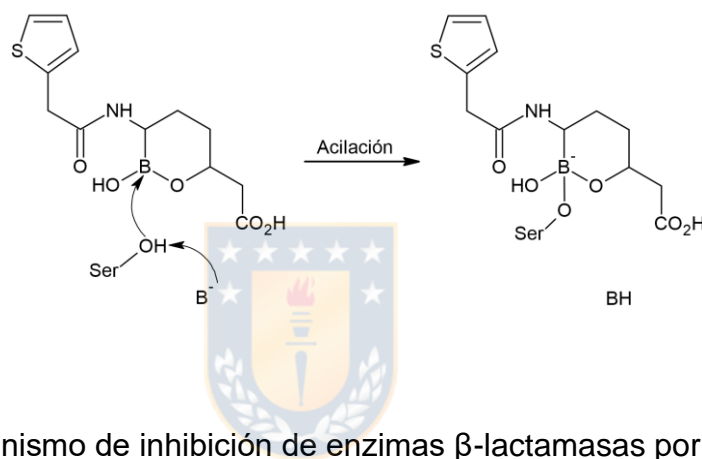


Figura 5. Mecanismo de inhibición de enzimas β -lactamasas por vaborbactam.

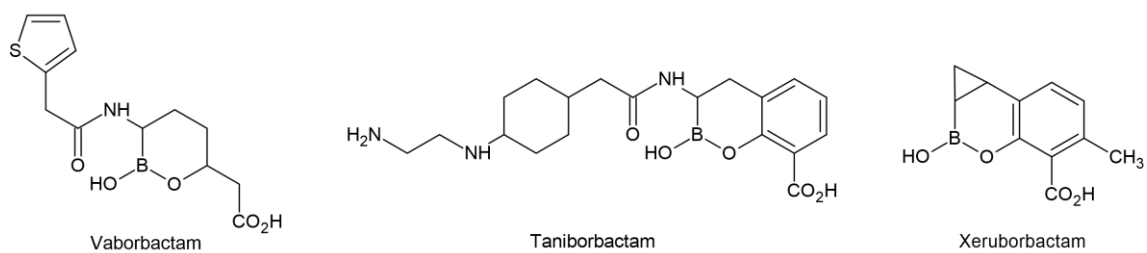


Figura 6. Inhibidores no β -lactámicos tipo boronatos cíclicos.

1.2.2.2. Inhibidores basados en diazabicyclooctanonas (DBOs).

A diferencia de los inhibidores β -lactámicos, los compuestos de tipo DBO presentan un mecanismo inusual de inhibición (King, King, Lal, Wright, & Strynadka, 2015; Krishnan, Nguyen, Papp-Wallace, Bonomo, & van den Akker, 2015; Lahiri et al., 2013; Shapiro et al., 2017), Figura 3. Mientras la etapa de acilación procede de un modo similar vía anclaje covalente entre un residuo de serina al carbono carbonílico del anillo, la reacción es reversible, por lo cual la desacilación resulta en la regeneración tanto del inhibidor como de la enzima. Esta diferencia mecanística hace que aumente la efectividad en la protección del antibiótico β -lactámico contra la hidrólisis provocada por enzimas β -lactamasas.

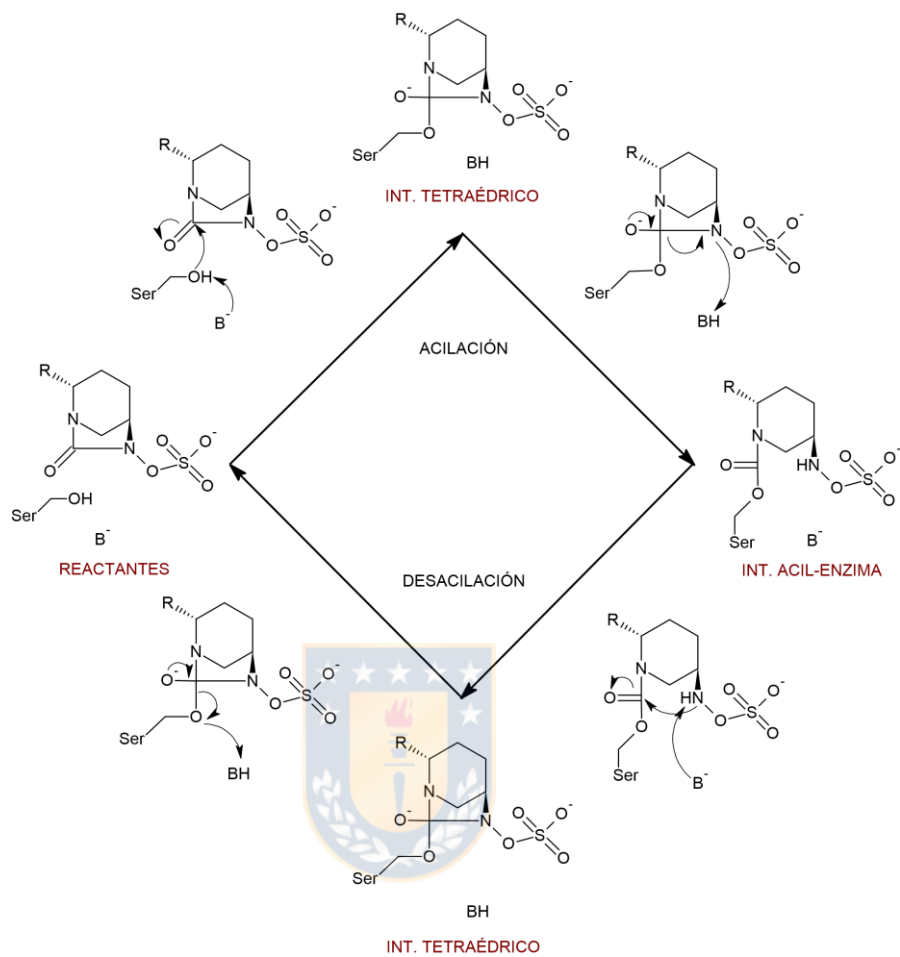


Figura 7. Diagrama esquemático correspondiente al mecanismo de inhibición de enzimas β -lactamasas por diazabiciclooctanonas.

Entre los compuestos tipo DBO más relevantes en cuanto a su amplio espectro de acción frente a enzimas serina β -lactamasas destacan avibactam (Coleman,

2011) y ETX2514 (Durand-Réville et al., 2017), Figura 8. Avibactam fue el primer inhibidor DBO sintetizado (Coleman, 2011) con capacidad de inhibir enzimas de clases A, C y algunas de clase D (Drawz et al., 2014; Ehmann et al., 2012). El año 2015 el compuesto avibactam fue aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA), en combinación con ceftazidima, para el tratamiento de infecciones intra-abdominales complicadas e infecciones del tracto urinario (Winkler, Papp-Wallace, Taracila, & Bonomo, 2015). Sin embargo, avibactam presenta una menor eficacia contra infecciones causadas por el microorganismo multi-resistente *Acinetobacter baumannii* (Lahiri et al., 2015; Poirel et al., 2010) el cual produce enzimas β -lactamasas del tipo OXA-24 como mecanismo de resistencia (Bou, Oliver, & Martínez-Beltrán, 2000). Otro inhibidor DBO, ETX2514 (Durand-Réville et al., 2017), fue desarrollado por laboratorios Zai Lab y Entasis therapeutic, es un derivado directo de avibactam y presenta dos diferencias estructurales: un doble enlace carbono-carbono endocíclico en la posición 3-4 y un grupo metilo sustituyente en la posición 3. En literatura (Durand-Réville et al., 2017), se postula que la presencia del doble enlace carbono-carbono aumentaría la reactividad del átomo de nitrógeno N6, debido a una mayor tensión anular, además el grupo metilo adicional permitiría una mayor afinidad de la enzima por este inhibidor, debido a un mayor carácter hidrofóbico. Actualmente, ETX2514 se encuentra en etapa III de estudios clínicos, los cuales han mostrado resultados positivos frente a la acción sobre el microorganismo *Acinetobacter baumannii* (Durand-Réville et al., 2017).

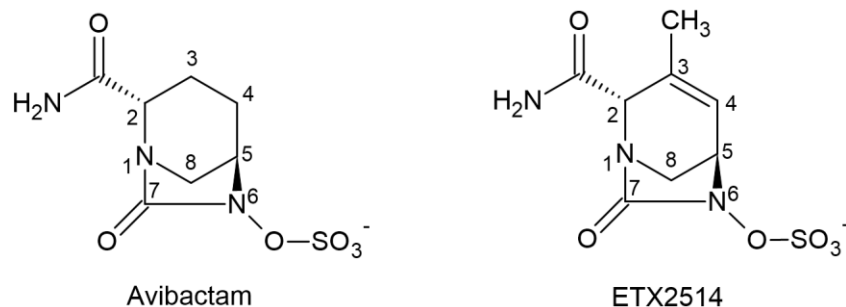


Figura 8. Estructura química de avibactam (Coleman, 2011) y ETX2514 (Durand-Réville et al., 2017).



A pesar de la cantidad de artículos sobre el mecanismo de inhibición de las enzimas β -lactamasas por parte de inhibidores β -lactámicos (R. Li, Liao, Gu, Wang, & Chen, 2011) y no β -lactámicos (Lizana & Delgado, 2018, 2019; Sgrignani, Grazioso, De Amici, & Colombo, 2014), no existen estudios químico computacionales sobre el mecanismo de inhibición sobre enzimas β -lactamasas de tipo OXA-24 por inhibidores no β -lactámicos de tipo DBO, tales como avibactam y ETX2514. Por lo tanto, un estudio químico teórico computacional, debería mejorar la comprensión de las bases moleculares responsables de las diferentes eficiencias de estos compuestos en la inhibición de enzimas β -lactamasas de tipo OXA-24. Esta información es trascendental para el desarrollo de nuevos antibióticos e inhibidores.

En esta tesis, se investiga el mecanismo de inhibición (acilación y desacilación) de la enzima β -lactamasa de clase D, OXA-24, por parte de avibactam y ETX2514, mediante el uso de métodos químico-computacionales. El estudio incluye simulaciones de dinámica molecular, análisis de clúster, para posteriormente llevar a cabo la exploración de la superficie de energía potencial (SEP), mediante cálculos híbridos QM/MM (Quantum Mechanics/Molecular Mechanics). El mecanismo considera que los estados de protonación de los residuos más relevantes se presentan en su forma iónica en la etapa de acilación, mientras que para la etapa de desacilación los residuos están en su forma neutra, de acuerdo a lo reportado por Lahiri et al (Lahiri et al., 2015), Figura 9.



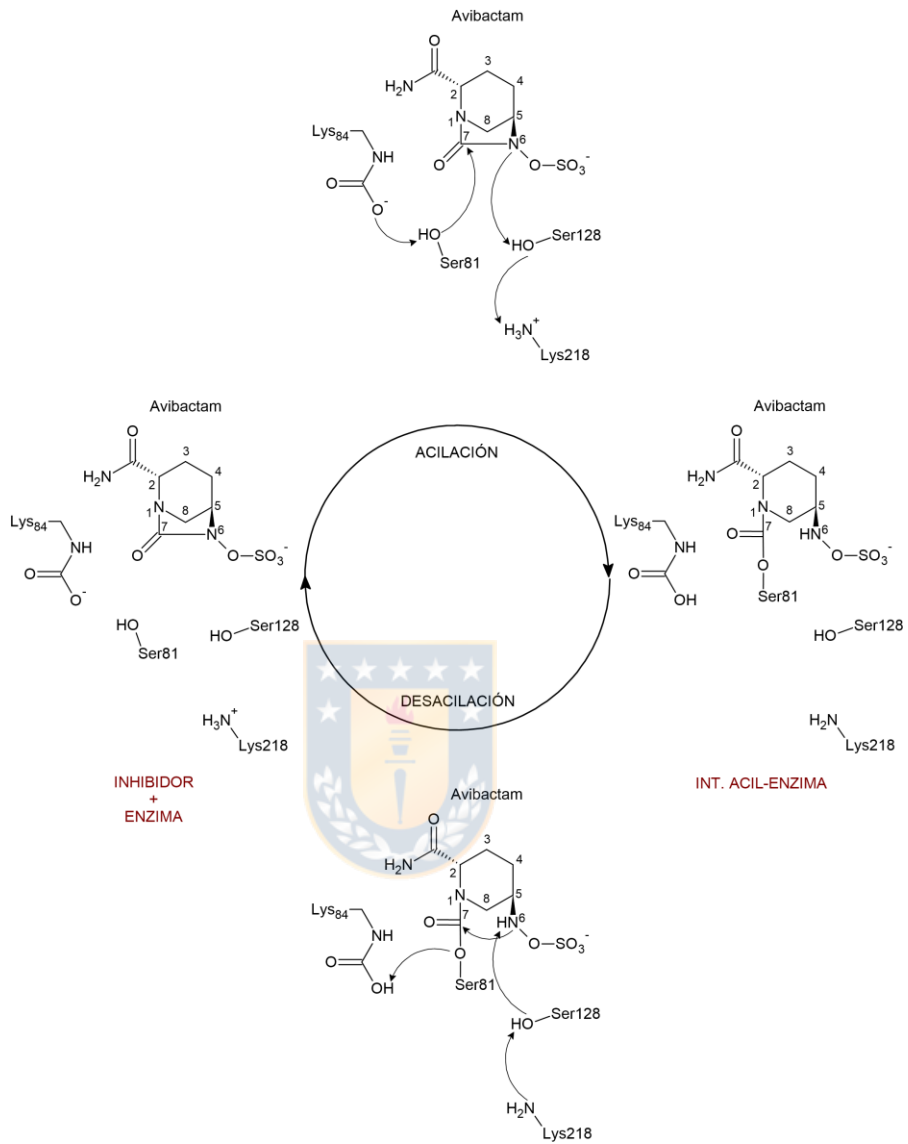


Figura 9. Mecanismo de inhibición de enzimas OXAs por avibactam postulado por Lahiri et al.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

En la presente tesis se postula la siguiente hipótesis:

- El mecanismo de inhibición comprende las etapas de acilación y desacilación de los inhibidores, las cuales son gatilladas por los cambios coordinados de los estados de protonación de Lys218 y Lys84 carboxilada en una secuencia on/off (desprotonada/protonada) permitiendo la óptima transferencia protónicas entre los residuos y los inhibidores.



Objetivo general: Estudiar mediante los métodos de la Química Computacional el mecanismo de inhibición de la enzima OXA-24 por avibactam y ETX2514.

Objetivos específicos:

1. Investigar el mecanismo de reacción postulado para la etapa de acilación de OXA-24 por avibactam, e identificar intermediarios, estados de transición, y calcular las barreras de activación de las diferentes etapas.
2. Investigar el mecanismo de reacción postulado para la etapa de desacilación de OXA-24 por avibactam, e identificar intermediarios,

estados de transición, y calcular las barreras de activación de las diferentes etapas.

3. Investigar el mecanismo de reacción postulado para la etapa de acilación de OXA-24 por ETX2514, e identificar intermediarios, estados de transición, y calcular las barreras de activación de las diferentes etapas.
4. Investigar el mecanismo de reacción postulado para la etapa de desacilación de OXA-24 por ETX2514, e identificar intermediarios, estados de transición, y calcular las barreras de activación de las diferentes etapas.



3. METODOLOGÍA.

3.1. Dinámica Molecular

3.1.1. Construcción del sistema enzima inhibidor



Para la construcción del sistema enzima-inhibidor se llevaron a cabo 4 simulaciones de dinámica molecular, dos para cada sistema OXA-24/Inhibidor (enzima acilada y desacilada). El primer sistema corresponde al complejo OXA-24/avibactam, en el cual se tomó como estructura de partida la estructura cristalina con código PDB 4WM9 (Lahiri et al., 2015), la cual fue determinada a 2.4 Å de resolución y cristalizada a pH 6.0. El segundo sistema corresponde al complejo OXA-24/ETX2514, en el cual se tomó como estructura de partida la estructura cristalina con código PDB 6MPQ (Barnes et al., 2019), la cual fue determinada a 1.93 Å de resolución y cristalizada a pH 6.0. La enzima OXA-24 consta de 245 residuos aminoacídicos.

Los estados de protonación de los residuos Lys84 y Lys128 fueron considerados en forma iónica para la acilación y neutra para la desacilación, de acuerdo al mecanismo postulado; mientras que los residuos ionizables restantes de la proteína fueron establecidos a pH 7.0 con el software PROPKA 3.0 (Olsson, Søndergaard, Rostkowski, & Jensen, 2011), el cual predice los valores de pKa de acuerdo a la posición y naturaleza química de los grupos cercanos.

La carga total del sistema para los 4 sistemas fue de +3, por lo que se neutralizó con 3 iones de Cl⁻, a una distancia de 5 Å de los átomos periféricos de la enzima.



La estructura final fue solvatada con una caja cúbica de moléculas de agua centrada en el centro geométrico del complejo enzima-inhibidor, Figura 10. Las dimensiones de la caja son lo suficientemente amplias para que todos los átomos periféricos de la proteína estén alejados a lo menos 15 Å de los límites de la caja. Como resultado, el sistema final se compone de 46632 átomos en total, de los cuales 42912 corresponden a átomos de moléculas de agua y el resto a la enzima más el inhibidor.

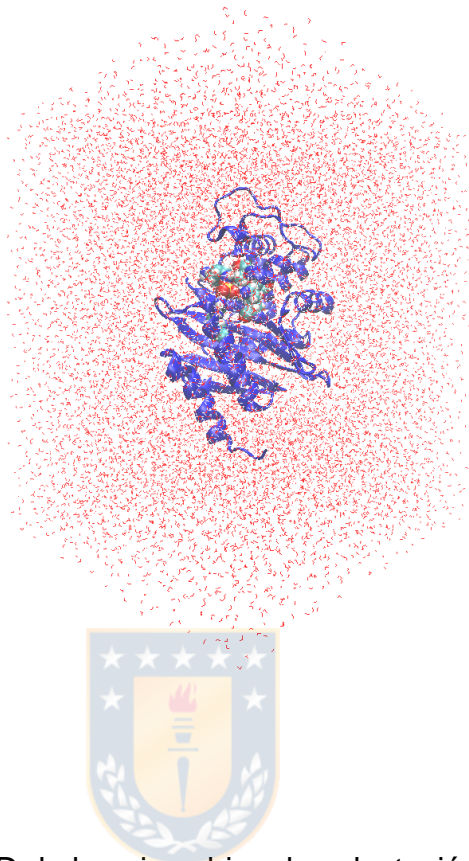


Figura 10. Estructura 3D de la caja cubica de solvatación como sistema para las simulaciones de dinámica molecular.

3.1.2. Simulaciones de dinámica molecular

Todas las simulaciones de dinámica molecular fueron realizadas con el programa NAMD (Phillips et al., 2005) utilizando el campo de fuerza CHARMM36 (Best et

al., 2012) para la proteína, CHARMM General Force Field (CGenFF) (Vanommeslaeghe et al., 2010) para el inhibidor y el modelo de agua TIP3P (Jorgensen, Chandrasekhar, Madura, Impey, & Klein, 1983). Las condiciones periódicas de contorno fueron impuestas usando el colectivo isobárico-isotérmico (NPT). La temperatura y presión se mantuvieron constante usando la implementación NAMD Nosé-Hoover (Nosé, 1984). Las interacciones electrostáticas fueron calculadas directamente dentro de un radio de corte de 12 Å, mientras que los efectos electrostáticos de largo alcance, fueron tomados en cuenta por el método Particle MeshEwald (PME) (Darden, York, & Pedersen, 1993). Las interacciones de Van der Waals fueron consideradas con el uso de una función “switch”, la cual suaviza el corte abrupto de estas interacciones a 12 Å, de esta forma a partir de 10 Å estas interacciones disminuyen gradualmente hasta 12 Å.

Para eliminar contactos cercanos entre residuos e interacciones altamente repulsivas producto del sistema inicial proteína-solvente y corregir las geometrías, se llevó a cabo una etapa de minimización de energía y luego 500 pasos de equilibrio a 310 K con paso de integración de 1 fs. Finalmente, se llevó a cabo una dinámica de producción de 100 ns con paso de integración de 2 fs a 310 K. Durante las simulaciones, todos los movimientos intramoleculares asociados a los átomos de hidrógeno fueron restringidos usando el algoritmo

SHAKE (Ryckaert, Ciccotti, & Berendsen, 1977) con una tolerancia de 10^{-8} . En este proceso se obtuvo 1 estructura cada 20ps, totalizando una cantidad de 5000 estructuras. El análisis de las trayectorias tanto de la minimización, equilibrio y dinámica molecular se realizó con el software VMD (Humphrey, Dalke, & Schulten, 1996), luego se eligieron las estructuras de equilibrio a partir de un análisis de clúster de conformaciones (Peng, Wang, Yu, Gu, & Huang, 2018), las cuales fueron usadas posteriormente para los cálculos híbridos QM/MM (Warshel & Levitt, 1976).

3.2. Análisis de clúster



Para obtener una estructura representativa de la dinámica molecular, se utilizó el método estadístico de análisis de clúster, el cual ordena los datos en grupos basados en características comparables. Los elementos de cada grupo tienen más propiedades en común entre ellos que con otros, logrando separarlos y con ello identificarlos. El elemento que minimiza las diferencias entre los integrantes del mismo grupo se denomina centroide, el cual corresponde a la estructura representativa del sistema. Las variables consideradas en este estudio corresponden a los ángulos diedros α , β y γ , Figura 11. Para la etapa de acilación,

estos ángulos dan cuenta de la orientación de los grupos Ser81(OH), Ser128(OH) y Lys218(NH₃⁺); en cambio, para la etapa de desacilación, estos ángulos dan cuenta de la orientación del grupo N6-H. Esta elección de variables fue hecha tomando en cuenta el mecanismo postulado por Lahiri et al. Este análisis fue llevado a cabo a partir de códigos escritos en Python 3, utilizando las librerías MDTraj 1.9.8 (McGibbon et al., 2015) y MSMBuilder 3.8.0 (Harrigan et al., 2017).

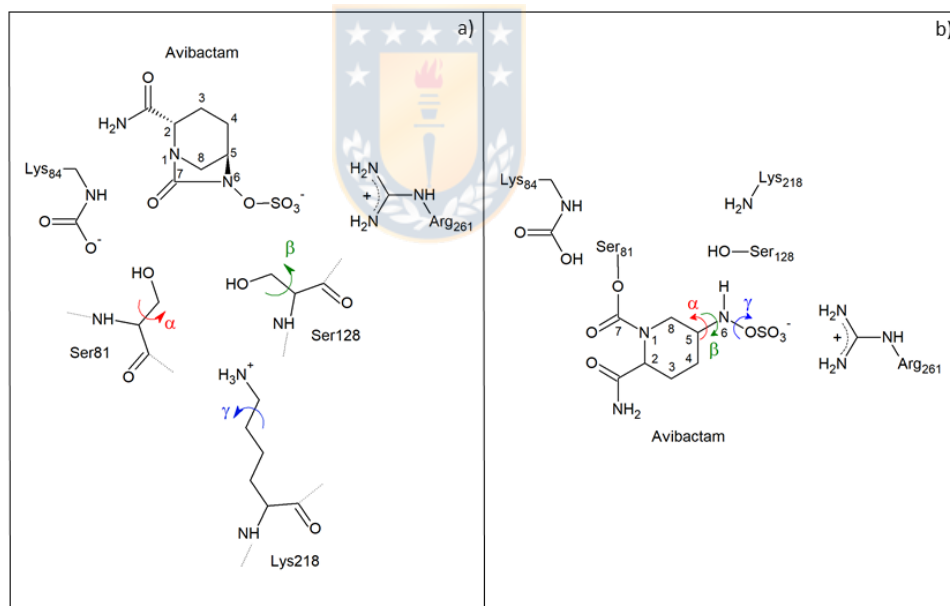


Figura 11. Ángulos diedros α , β y γ utilizados en el análisis de clúster, tanto para los sistemas a) inhibidor + enzima y b) intermediario acil-enzima.

3.3. Cálculos QM/MM (Quantum Mechanics/Molecular Mechanics)

Luego del análisis de clúster, se construyó una esfera de 30 Å, Figura 12, centrada en el carbono carbonílico del inhibidor (centro de reacción) a partir de la estructura representativa, donde el sistema se dividió en tres regiones, región interior, región de buffer y reservorio. Estas regiones tienen movilidad diferente, ya que con esto se consigue ahorrar tiempo computacional, dejando la primera región en completa libertad de movimiento de los residuos, en la segunda región se imponen constantes de fricción y por último en la región reservorio quedan fijas las posiciones de todos los residuos aminoacídicos. La región interior, consiste de una esfera de 25 Å de radio a partir del centro del sistema; la segunda región de buffer, está comprendida desde 25 Å hasta 27 Å; por último, la zona de reservorio está comprendida entre un radio de 27 Å a 30 Å.

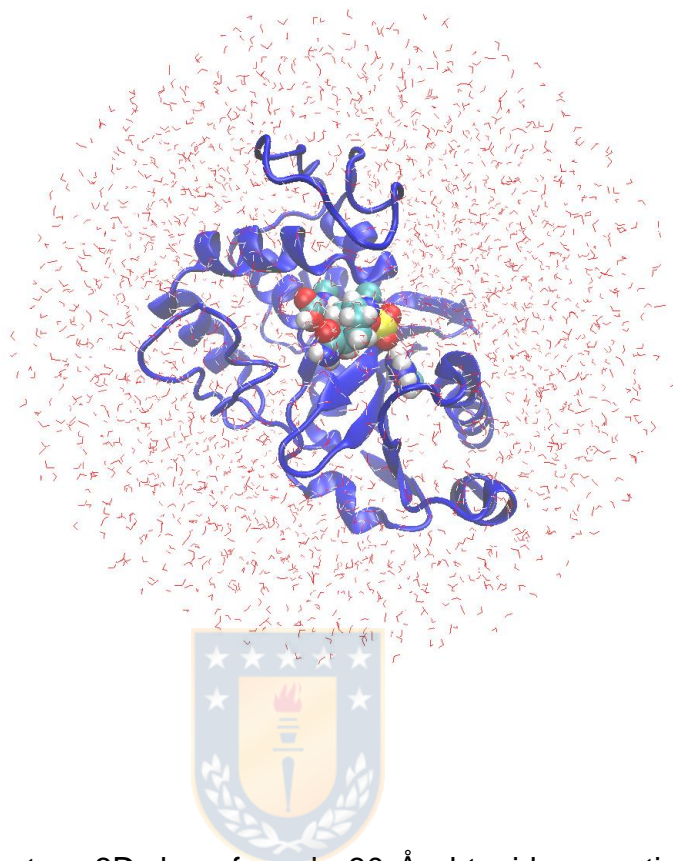


Figura 12. Estructura 3D de esfera de 30 Å obtenida a partir de la estructura representativa.

A partir de la esfera obtenida, se exploró la superficie de energía potencial (SEP) mediante cálculos híbridos QM/MM (Quantum Mechanics/Molecular Mechanics) a nivel AM1/CHARMM36 para las etapas de acilación y desacilación con ambos inhibidores, utilizando software CHARMM (Brooks et al., 2009). La zona QM, descrita con los métodos de la química cuántica, está conformada por los residuos aminoacídicos Ser81, Lys84, Ser128, Lys218, Arg216 y el inhibidor,

Figura 13; mientras que la zona MM, descrita mediante el uso de la mecánica molecular, comprende todo el resto de la enzima incluyendo además las moléculas de agua. Para los átomos ubicados en la frontera QM/MM se aplicó el método de “link atom”, el cual agrega átomos de hidrógeno al carbono fronterizo para completar su valencia.

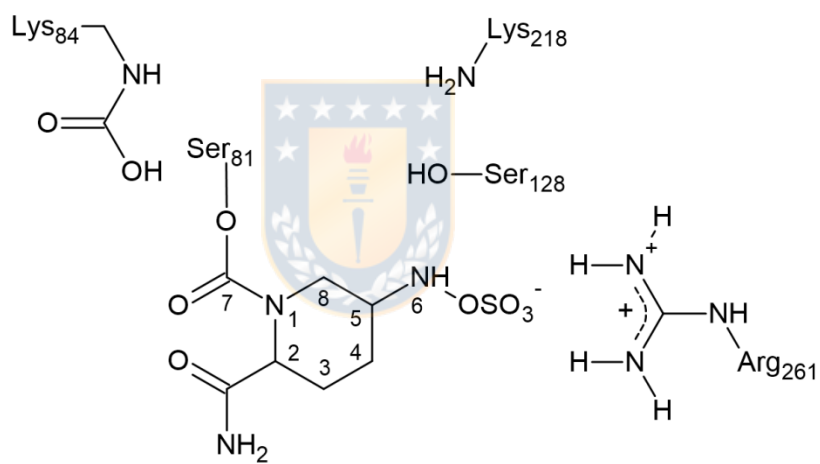


Figura 13. Esquema reducido de la zona QM en complejo OXA-24/Avibactam- acilado.

Las SEPs fueron exploradas en términos de las coordenadas simétricas de reacción R1, R2 y R3 para la etapa de acilación y R4, R5, R6 y R7 para la etapa de desacilación, Figura 14. La coordenada R1, definida como la distancia entre el átomo de hidrógeno hidroxílico del residuo Ser81 y el átomo de oxígeno carboxílico del grupo carbámico del residuo Lys84, da cuenta de la etapa de activación del residuo Ser81; mientras que la coordenada R2, definida como la distancia entre el oxígeno hidroxílico del residuo Ser81 y el átomo de carbono C7 del inhibidor, da cuenta del ataque nucleofílico del átomo de oxígeno hidroxílico del residuo Ser81 al átomo de carbono C7. La coordenada R3, definida como la distancia entre el átomo de hidrógeno hidroxílico del residuo Ser128 y el átomo de nitrógeno N6 del inhibidor, da cuenta de la transferencia protónica desde el átomo de hidrógeno hidroxílico del residuo Ser128 al átomo de nitrógeno N6. La coordenada R4, definida como la distancia entre el átomo de hidrógeno hidroxílico del residuo Ser128 y el átomo de nitrógeno del residuo Lys218, da cuenta de la transferencia protónica desde el átomo de hidrógeno hidroxílico del residuo Ser128 al átomo de nitrógeno del residuo Lys218; mientras que la coordenada R5, definida como la distancia entre los átomos C7 y N6 del inhibidor, da cuenta del ataque nucleofílico del átomo de nitrógeno N6 al átomo de carbono C7. Finalmente, la coordenada R6, definida como la distancia entre el átomo de carbono C7 del inhibidor y el átomo de oxígeno hidroxílico del residuo Ser81, da cuenta de la ruptura del enlace C-O; mientras que la coordenada R7, definida como la distancia entre el átomo de hidrógeno hidroxílico del grupo carboxílico

del residuo Lys84 y el átomo de oxígeno hidroxílico del residuo Ser81, da cuenta de la transferencia protónica del átomo de hidrógeno hidroxílico del grupo carboxílico del residuo Lys84 al átomo de oxígeno hidroxílico del residuo Ser81.

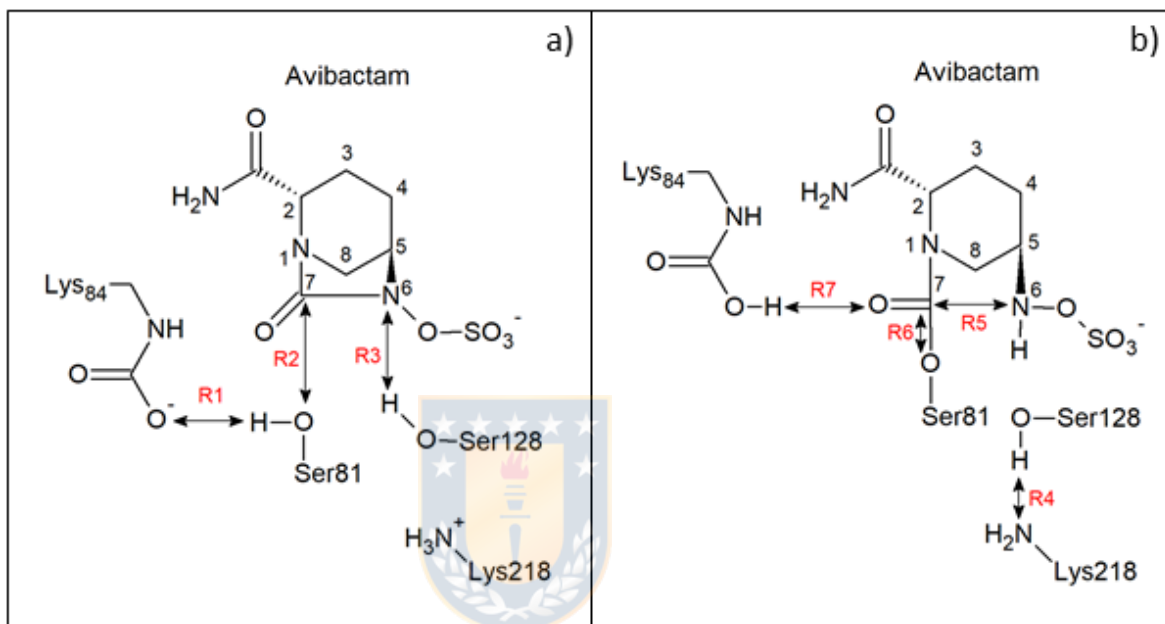


Figura 14. Esquema de coordenadas de reacción utilizadas para estudiar el mecanismo de a) acilación (R1, R2 y R3) y b) desacilación (R4, R5, R6 y R7).

Los resultado de los cálculos QM/MM fueron refinados mediante cálculos de tipo single-point a nivel DFT/MM (M062X-D3(6-31+G(d,p))/CHARMM36), para lo cual se utilizó la interfaz Q-Chem/CHARMM (Shao et al., 2015). Con esto se obtuvo

una nueva superficie de energía potencial a mayor nivel de teoría, permitiendo obtener importante información acerca de las barreras de activación de cada etapa, el rol de los residuos, el camino de menor energía y el tipo de mecanismo.



4. DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

4.1. Sistema OXA-24/avibactam

4.1.1. Objetivo 1: Acilación de OXA-24 por avibactam



4.1.1.1. Dinámica Molecular

Los resultados de la dinámica molecular de 100 ns muestran un comportamiento estable a lo largo de la simulación, lo cual se puede observar en los análisis de RMSD, Anexo 1a, y RMSF, Anexo 1b y 1c, obteniéndose valores inferiores a 0.7 Å de RMSF para los residuos más relevantes del sitio activo.

4.1.1.2. Análisis de clúster

A continuación, se llevó a cabo un análisis de clúster, en términos de los ángulos diedros α , β y γ definidos en la sección metodología con la finalidad de obtener una estructura representativa para la exploración de la superficie de energía potencial (SEP), Figuras 15a y 15b. Se observa 2 grupos de conformaciones para cada uno de estos tres ángulos diedros, los cuales dan cuenta de la orientación de los grupos funcionales relevantes de los residuos Ser81, Ser128 y Lys218, respectivamente. A valores negativos del ángulo α , el grupo hidroxílico del residuo Ser81 apunta hacia el grupo carboxilato del residuo de Lys84, formando una interacción de enlace de hidrógeno favoreciendo la transferencia protónica necesaria para la etapa de acilación; mientras que a valores positivos este grupo apunta en dirección opuesta imposibilitando tal interacción y por ende se trata de una conformación inactiva. Por otra parte, sólo a valores positivos de los ángulos β y γ , los grupos Ser128(OH) y Lys218(NH₃⁺), tienen la orientación adecuada para permitir la transferencia protónica del protón desde el grupo amonio del residuo Lys218 hacia el átomo N6 del inhibidor vía el residuo Ser128. El centroide que satisface las condiciones antes señaladas, es decir, valores negativos del ángulo alfa y valores positivos de los ángulos β y γ , fue obtenido a un tiempo de

simulación de 44 ns, Figura 16. El cluster asociado al centroide corresponde a una fracción de 0.14 del total.

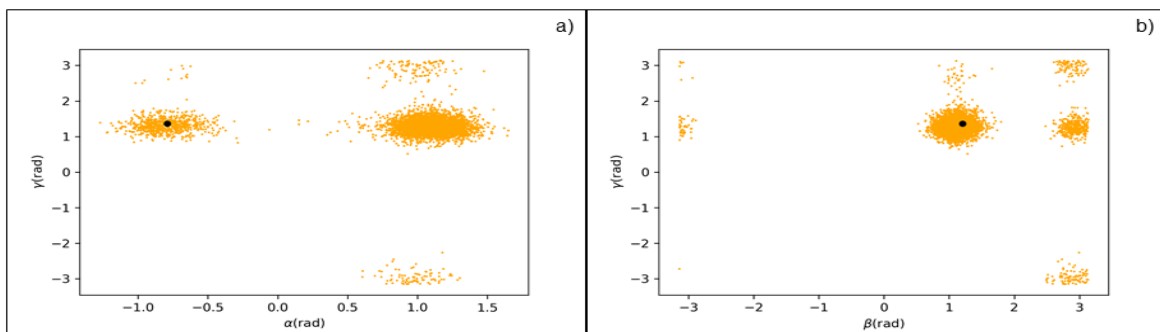


Figura 15. Análisis de clúster para los ángulos γ v/s α (a); γ v/s β (b). El centroide está representado por el punto de color negro, correspondiente a la estructura a 44 ns.

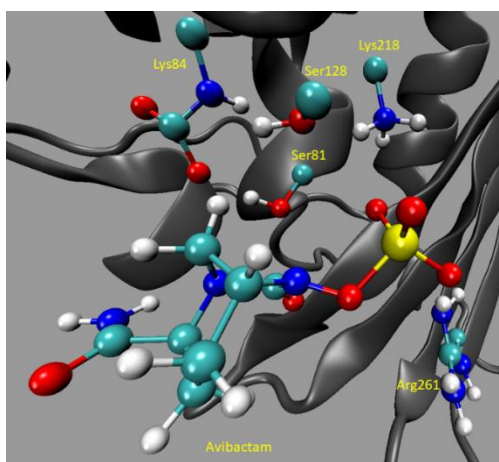


Figura 16. Estructura representativa obtenida a 44 ns de la dinámica molecular.

4.1.1.3. Mecanismo de acilación

4.1.1.3.1. Primera etapa, formación del intermediario tetraédrico

La primera etapa del mecanismo de acilación de OXA-24 para avibactam, se inicia con la formación de un intermediario tetraédrico, Figura 17, fue estudiada mediante la exploración de la SEP en términos de las coordenadas R1 y R2, definidas previamente en la sección metodología. La SEP obtenida, Figura 18, muestra 3 puntos críticos, los cuales corresponden a la formación del complejo de Michaelis CM-1, Anexo 2; formación del estado de transición ET-1, Anexo 3; y formación del intermediario tetraédrico IT, Figura 19. La topología de la SEP sugiere que la formación del IT ocurre mediante un mecanismo concertado que comienza con la abstracción del hidrógeno hidroxílico del residuo Ser81 por parte de Lys84, y con el ataque nucleofílico concomitante del oxígeno hidroxílico del residuo Ser81 sobre el átomo de carbono carbonílico C7 del inhibidor. Los ángulos de enlace del átomo de carbono C7, 107.3° y 107.8°, dan cuenta de un cambio de hibridación desde sp^2 a sp^3 , Figura 17. La barrera de activación observada es de 8 kcal/mol, lo cual sugiere una rápida formación del IT, Figura

18. Además, se observa que el IT se encuentra estabilizado en 25 kcal/mol con respecto al complejo de Michaelis CM-1, por lo cual corresponde a un proceso exotérmico, Figura 20. Esta etapa que involucra la neutralización de la carga negativa del grupo carboxilato del residuo Lys84, debido a la transferencia protónica desde el residuo Ser81, se ve favorecida por el ambiente hidrófobo del sitio activo.

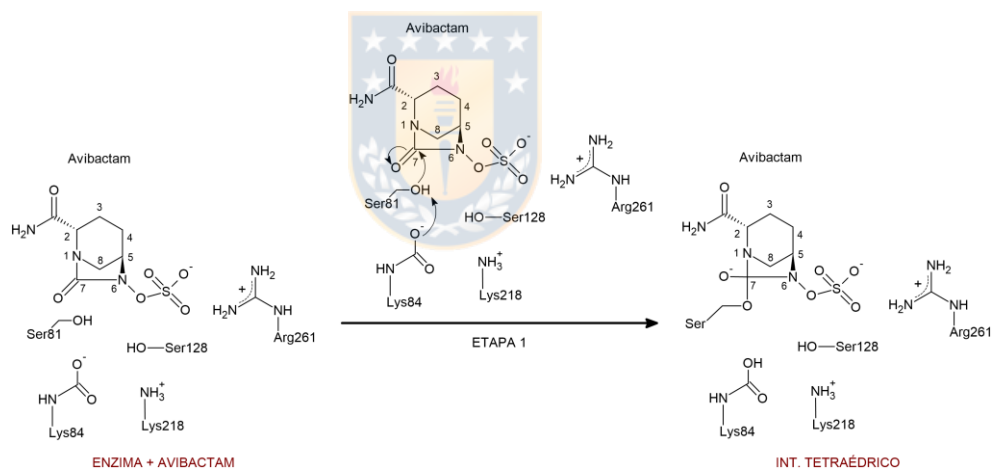


Figura 17. Esquema de la primera etapa del mecanismo de acilación de OXA-24 por parte de avibactam.

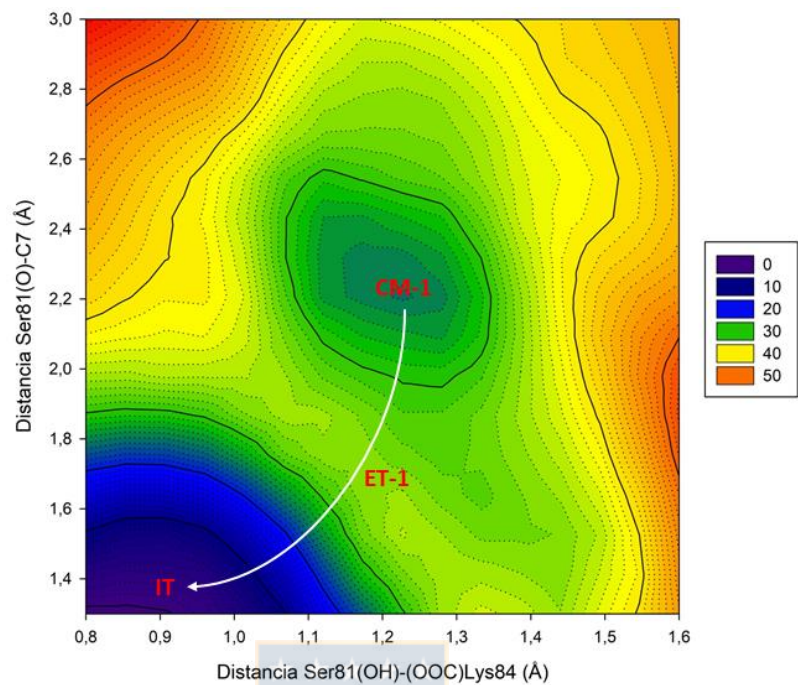


Figura 18. Superficie de energía potencial 2D para primera etapa en el mecanismo de acilación de OXA-24 por parte de avibactam. Energías relativas al costado derecho en kcal/mol.

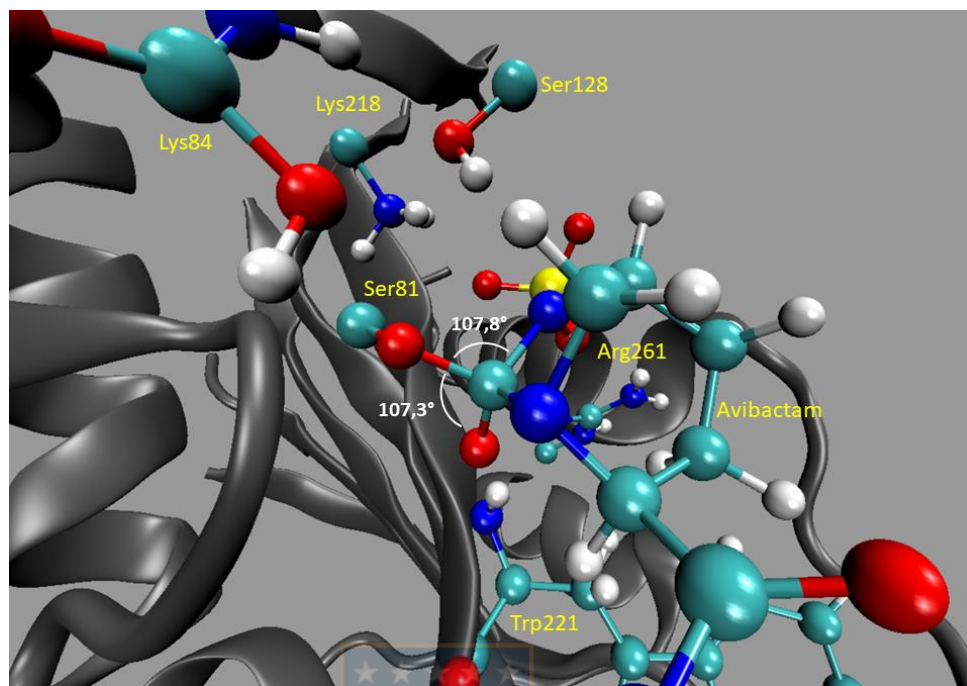


Figura 19. Estructuras 3D correspondiente al intermediario tetraédrico IT, (los ángulos del carbono C7 en color blanco).

El perfil de energía para esta etapa se muestra en la Figura 20.

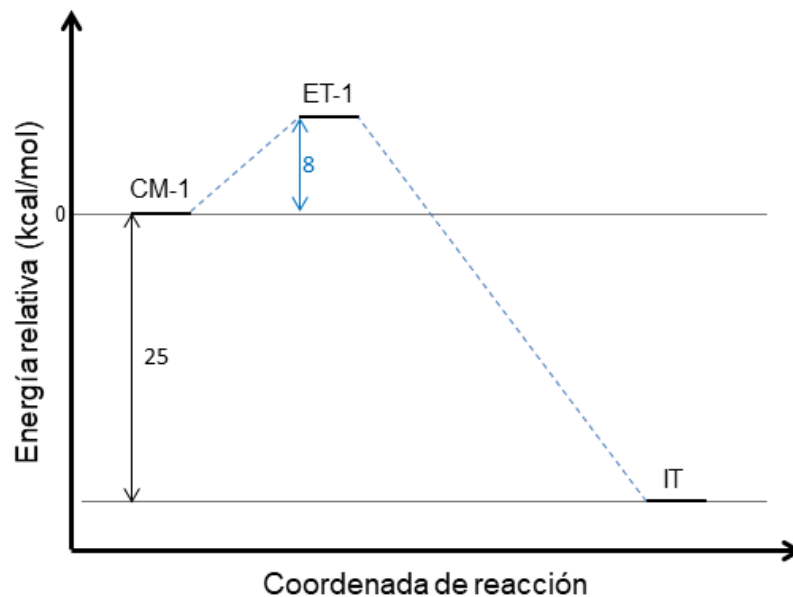


Figura 20. Perfil de energía potencial relativa para primera etapa en el mecanismo de acilación de OXA-24 por parte de avibactam.

4.1.1.3.2. Segunda etapa, formación del intermediario acil-enzima

La segunda etapa, formación del intermediario acil-enzima (AE), Figura 21, fue explorada en términos de la coordenada R3 definida en la sección metodología, mediante un perfil de energía potencial, Figura 22. A partir de la formación del

intermediario IT, la reacción continúa con la formación del complejo CM-2, Anexo 4, en el cual se observa un enlace de hidrógeno entre el grupo amino del residuo Lys281 y el grupo hidroxílico de Ser128, estabilizando el sistema en 5 kcal/mol. Luego de esto, el átomo N6 abstrae el hidrógeno hidroxílico del residuo Ser128, en forma simultánea con la protonación del oxígeno hidroxílico por parte de Lys218, a través de un estado de transición ET-2, Anexo 5. La barrera de energía de activación para esta etapa es de 17 kcal/mol, siendo esta etapa la etapa limitante del proceso. Esta alta barrera se asocia a la abstracción del hidrógeno hidroxílico del residuo Ser128 debido al alto valor de pKa de ese grupo, además de la desestabilización de la interacción entre el grupo amino del residuo Lys218 y el grupo sulfato de avibactam, debido al cambio de carga total (iónico a neutro) de Lys218. Este evento conduce finalmente a la apertura del anillo del inhibidor y a la inactivación de la enzima. El producto de esta etapa, intermediario acil-enzima, se muestra en la figura 23.

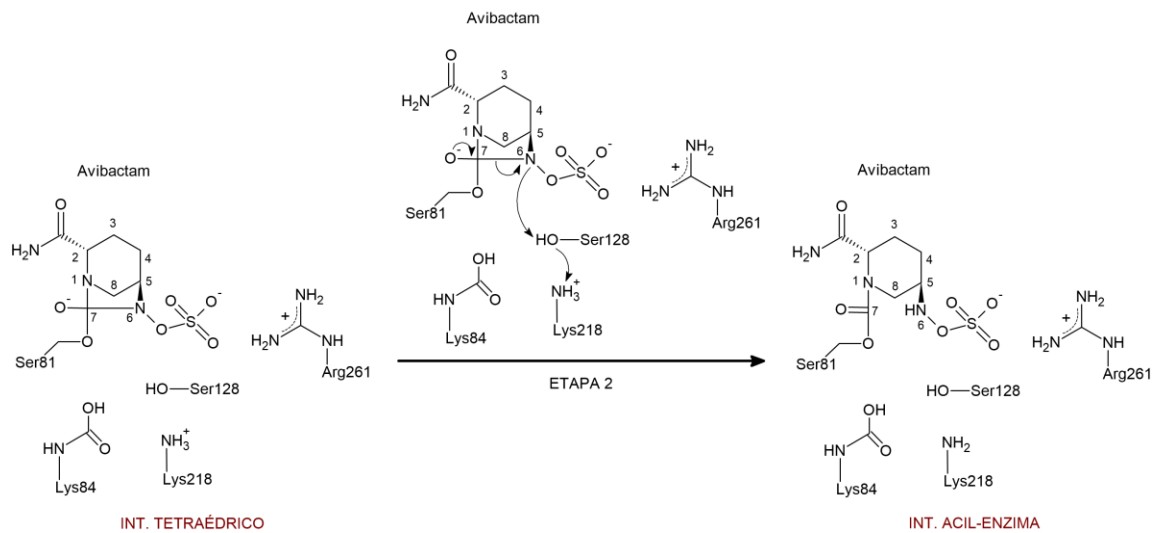


Figura 21. Esquema de la segunda etapa del mecanismo de acilación de OXA-24 por parte de avibactam.



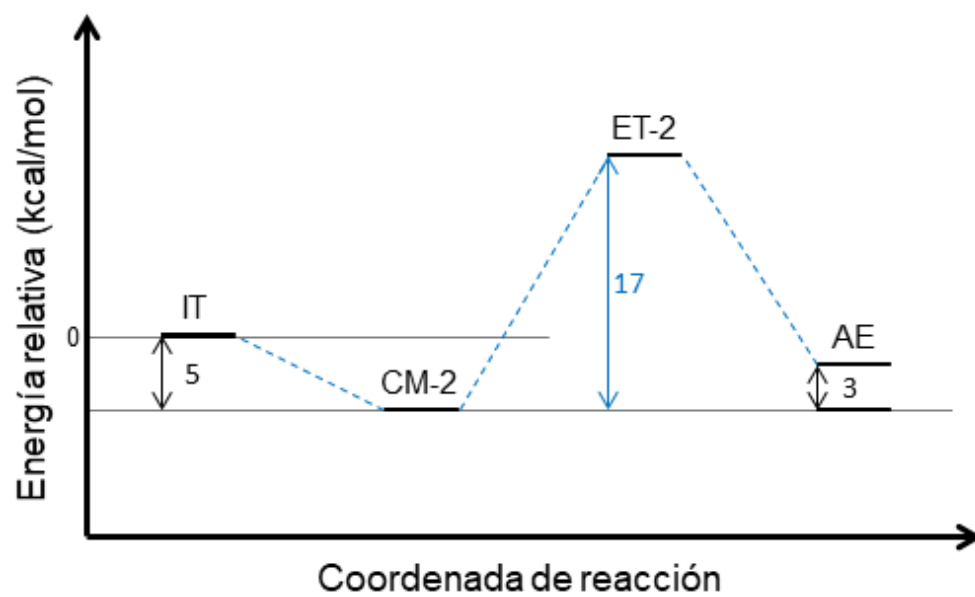


Figura 22. Perfil de energía relativa para segunda etapa en el mecanismo de acilación de OXA-24 por parte de avibactam.

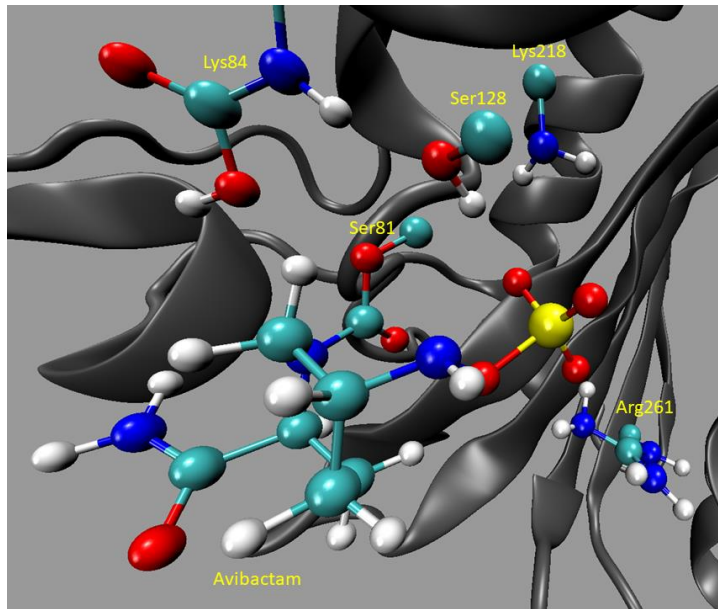


Figura 23. Estructura 3D correspondiente al intermediario acil-enzima (AE).

4.1.2. Objetivo 2: Desacilación de OXA-24 por avibactam

4.1.2.1. Dinámica molecular

Los resultados del análisis de RMSD, Anexo 6a, y RMSF, Anexo 6b y 6c, de la dinámica molecular de 100 ns, muestran un comportamiento estable a lo largo de la simulación, observándose valores inferiores a 0.7 Å de RMSF para los residuos claves del sitio activo.



4.1.2.2. Análisis de clúster

Luego de la simulación de dinámica molecular, se llevó a cabo un análisis de clúster, Figura 24a y 24b, sobre los diedros α , β y γ definidos en la sección metodología. Estos ángulos describen la orientación del grupo N6-H, la cual es relevante para que ocurra la deprotonación del átomo N6 por parte del residuo Lys218 a través de Ser128. Se observan dos grupos de conformaciones para los

ángulos α y β , y sólo un tipo para el ángulo γ . A valores positivos inferiores de 1.57 radianes de ángulo α , el grupo N6-H del inhibidor apunta hacia el grupo hidroxílico del residuo Ser128, promoviendo la transferencia protónica necesaria para la etapa de desacilación, siendo esta una conformación activa; mientras que a valores superiores este grupo apunta en dirección contraria desfavoreciendo dicho proceso y por lo tanto es una conformación inactiva. Con respecto al ángulo β , la conformación activa corresponde a valores inferiores a -2.35 radianes, ya que de lo contrario la disposición de este grupo no es la adecuada para promover la transferencia protónica. Por otro lado, los valores de ángulo γ varían entre -2 y +2 radianes mostrando un solo tipo de conformación, debido a la fuerte interacción electrostática entre el grupo sulfato del inhibidor y el grupo guanidinio del residuo Arg261. En base a lo anterior, el centroide obtenido corresponde a un tiempo de simulación de 44 ns, Figura 25, considerando valores inferiores a 1.57 rad para alfa e inferiores a -2.35 rad para β . El cluster asociado al centroide seleccionado corresponde a una fracción de 0.44 del total.

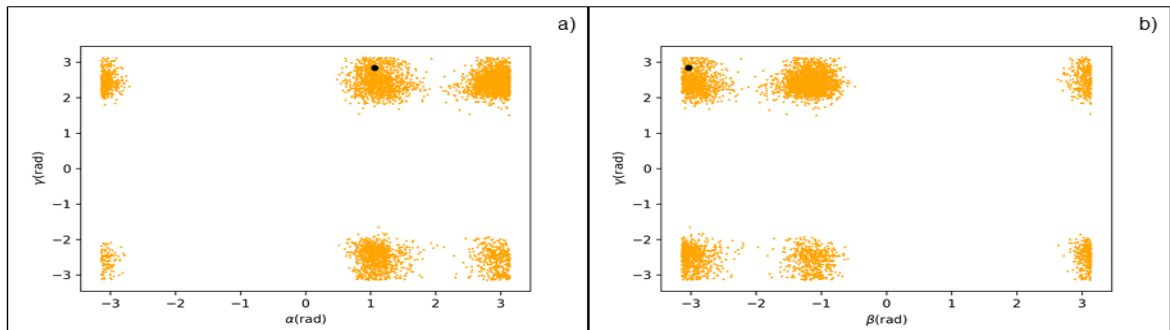


Figura 24. Análisis de clúster para ángulos γ v/s α (a); γ v/s β (b). El centroide a 44 ns está representado por el punto de color negro.

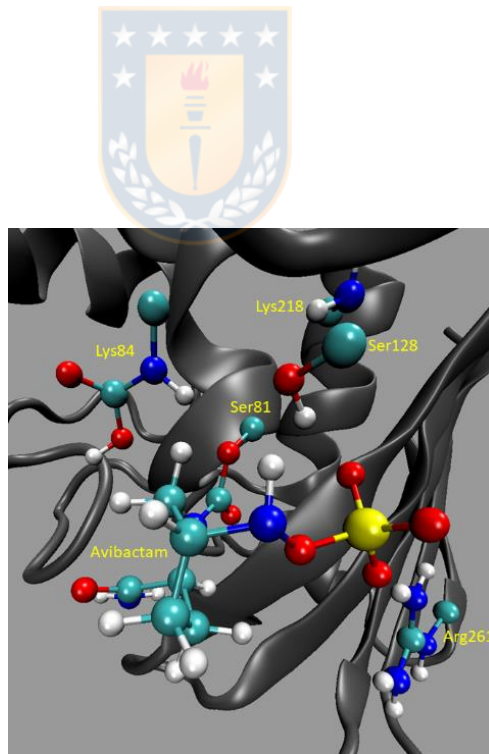


Figura 25. Estructura representativa obtenida a 44 ns de la dinámica molecular.

4.1.2.3. Mecanismo de desacilación

4.1.2.3.1. Etapas 1 y 2: Formación de intermediario dianiónico e intermediario tetraédrico

Las dos primeras etapas del mecanismo de desacilación considera la formación de un intermediario dianiónico ID y un intermediario tetraédrico IT, Figura 26. La SEP, fue explorada en términos de las coordenadas R4 y R5 definidas en la sección metodología. La topología de la SEP, Figura 27, sugiere que la reacción puede seguir dos caminos a partir del complejo de Michaelis CM-3, Anexo 7. El camino de menor energía corresponde en un primer paso a la formación del ID, Figura 28a, a través de un estado de transición ET-3, Anexo 8, con una barrera de energía de activación de 11 kcal/mol, en la cual ocurre la transferencia protónica desde el átomo N6 del inhibidor hacia el átomo de nitrógeno del residuo Lys218 vía Ser128. Este paso se ve favorecido por la estabilización de la carga negativa del átomo N6 y del grupo sulfato del avibactam mediante interacción electrostática con los grupos Lys218(NH₃⁺) y el grupo guanidinio de Arg261, además de la interacción por enlace de hidrogeno entre el grupo hidroxílico de

residuo Ser128 y el átomo de nitrógeno N6 del inhibidor. Luego en un segundo paso, ocurre la formación del IT, Figura 28b, a través de un estado de transición ET-4, Anexo 9, mediante ataque nucleofílico del átomo N6 hacia el átomo de carbono C7 del inhibidor y con ello la reciclación del anillo, con una barrera de energía de activación de 11 kcal/mol. Producto de este último paso, ocurre un cambio en la hibridación del átomo C7 del inhibidor desde sp^2 a sp^3 , Figuras 28a y 28b. En cambio, el camino de mayor energía corresponde en un primer paso a la formación del complejo de Michaelis CM-4, Anexo 10, a través de un estado de transición ET-5, Anexo 11, mediante una inversión conformacional de la estructura piramidal del átomo de nitrógeno N6, con una barrera de energía de activación de 4 kcal/mol. Luego en un segundo paso, se lleva a cabo la formación del IT, a través de un estado de transición ET-6, Anexo 12, mediante un mecanismo concertado que involucra tanto la transferencia protónica desde el átomo N6 hacia el átomo de nitrógeno del residuo Lys218 a través de Ser128, simultáneamente con el ataque nucleofílico del átomo N6 sobre el átomo C7, con una barrera de energía de activación de 15 kcal/mol, Figura 29.

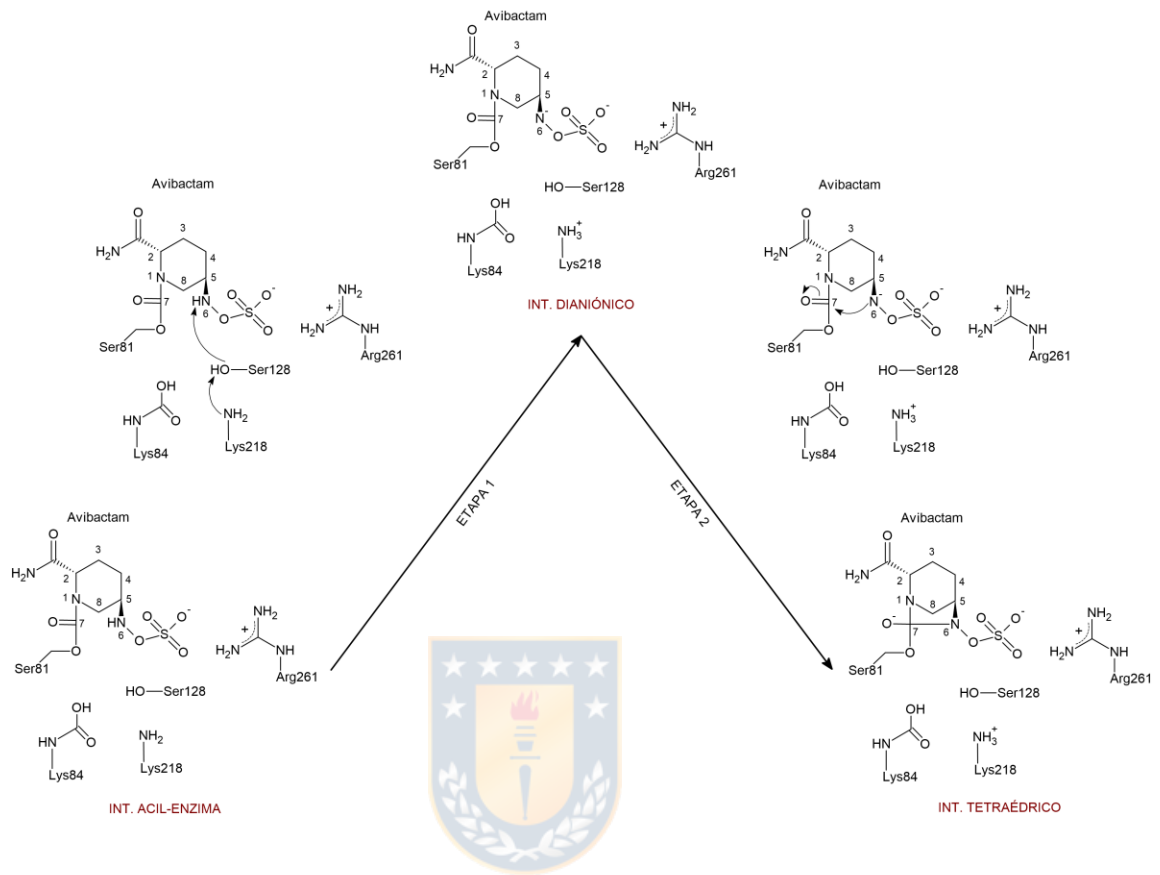


Figura 26. Esquema de la primera y segunda etapa del mecanismo de desacilación de avibactam en OXA-24.

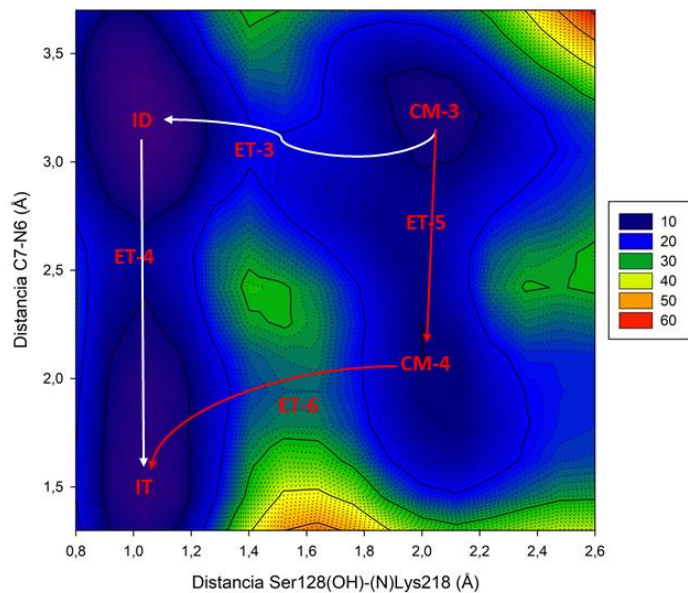


Figura 27. Superficie de energía potencial 2D que incluye la primera y segunda etapa del mecanismo de desacilación, donde el camino de mayor energía se representa con color rojo. Energías relativas al costado derecho en kcal/mol.

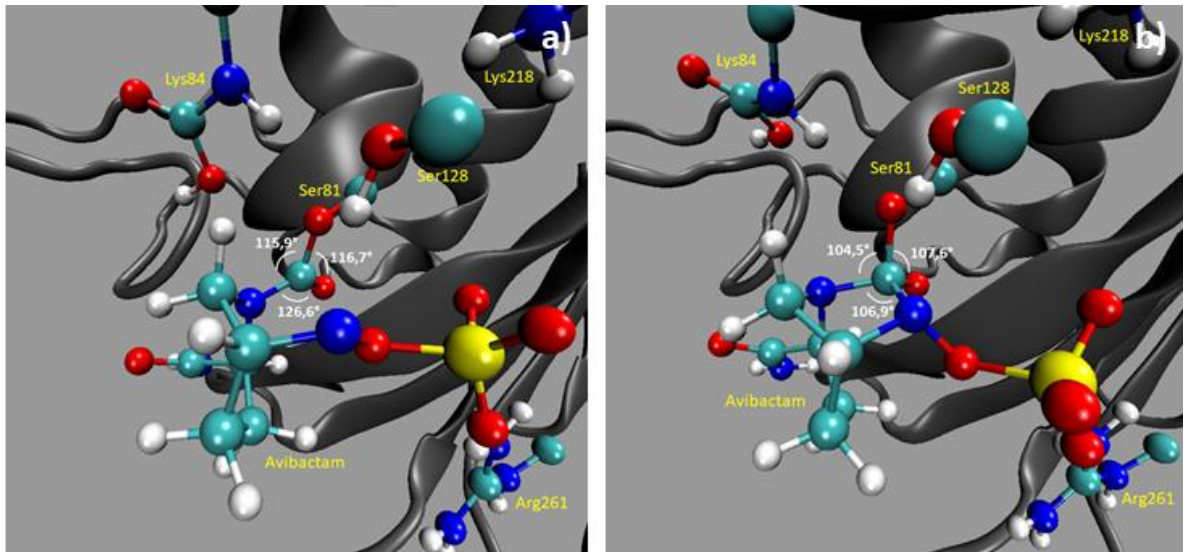


Figura 28. Estructura 3D correspondiente al a) intermediario dianiónico ID e b) intermediario tetraédrico IT, donde los ángulos alrededor del átomo de carbono C7 central se muestran en color blanco.

El perfil de energía para estas etapas se muestra en la figura 29.

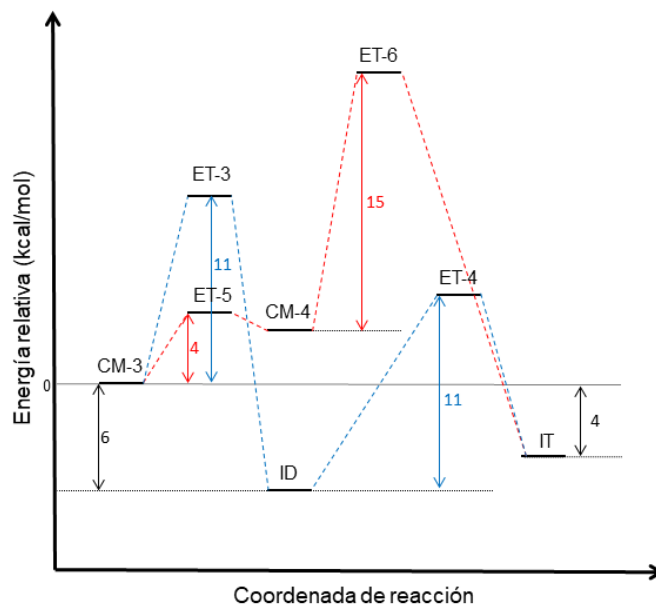


Figura 29. Perfil de energía relativa para primera y segunda etapa en el mecanismo de desacilación de OXA-24 por avibactam, donde el camino de mayor energía está representado con color rojo.

4.1.2.3.2. Etapa 3: Regeneración del inhibidor y la enzima

A partir del IT, se exploró la tercera etapa y final en el mecanismo de desacilación, Figura 30, mediante una SEP en términos de las coordenadas R5 y R6 definidas

en la sección metodología. La topología de la SEP, Figura 31, sugiere que la última etapa está constituida por dos pasos. El primer paso consiste en la formación del complejo de Michaelis CM-5, Anexo 13, con una barrera de energía de activación de 22.0 kcal/mol, a través de un estado de transición ET-7, Anexo 14. En este paso se establece una interacción de enlace de hidrógeno entre el grupo carboxílico del residuo Lys218 y el oxígeno hidroxílico de Ser81. Luego en un segundo paso, ocurre de forma concertada la transferencia protónica por parte del grupo carboxilato del residuo Lys218 hacia el átomo de oxígeno de Ser81 y la ruptura del enlace Ser81(O)-C7, con una barrera de energía de activación de 8 kcal/mol, a través del estado de transición ET-8, Anexo 15. Por lo tanto, en esta última etapa se regenera tanto la enzima como el inhibidor, Figura 32, siendo el primer paso la etapa limitante del proceso. El correspondiente perfil de energía se muestra en la Figura 33.

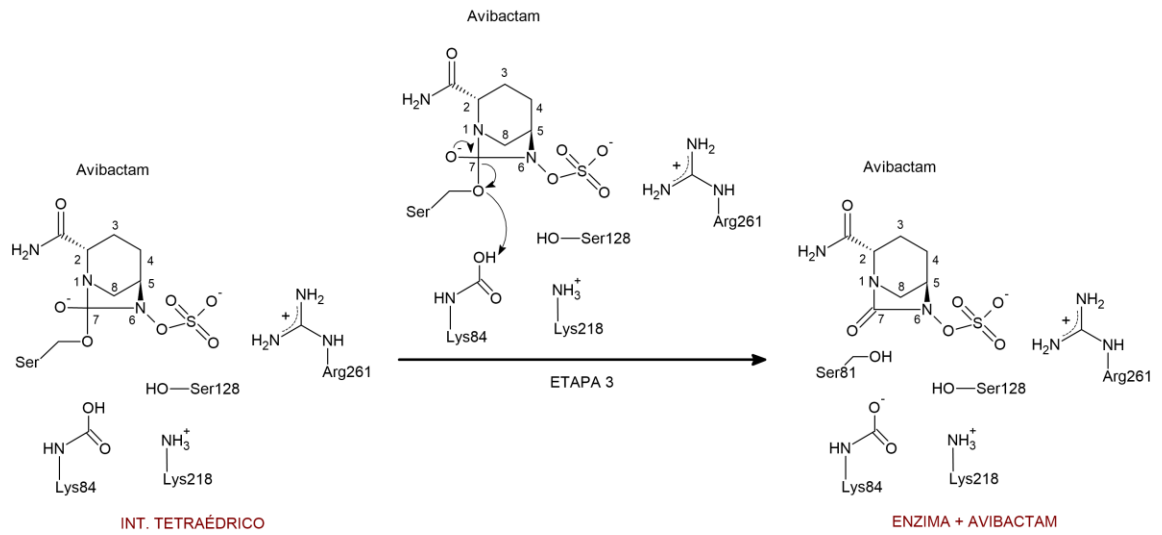


Figura 30. Esquema de la tercera etapa y final del mecanismo de desacilación de OXA-24 por avibactam.



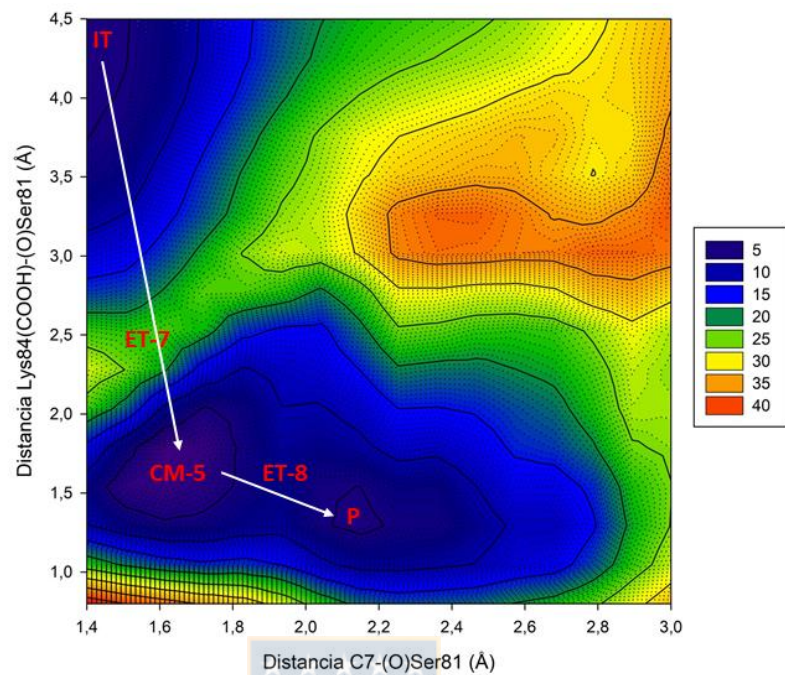


Figura 31. Superficie de energía potencial 2D que involucra la tercera etapa del mecanismo de desacilación. Energías relativas al costado derecho en kcal/mol.

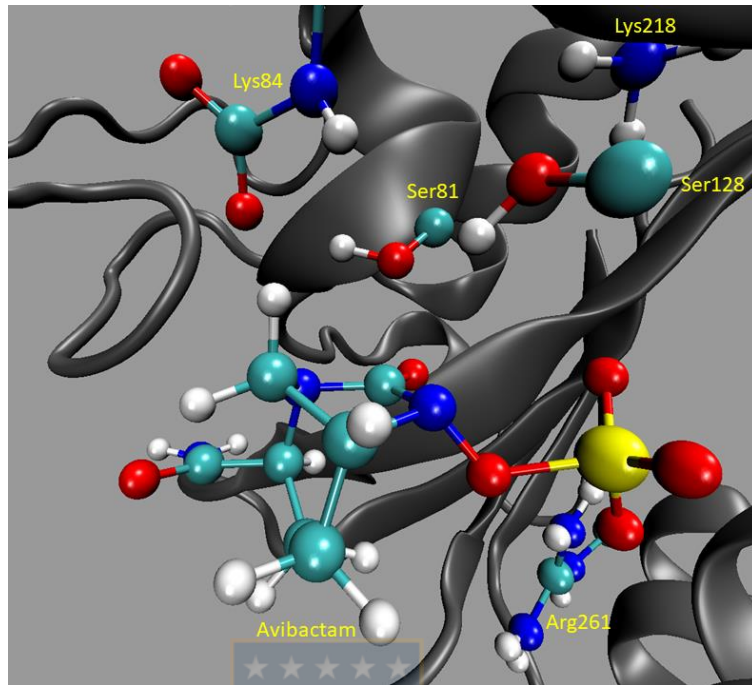


Figura 32. Estructura 3D correspondiente al producto P.

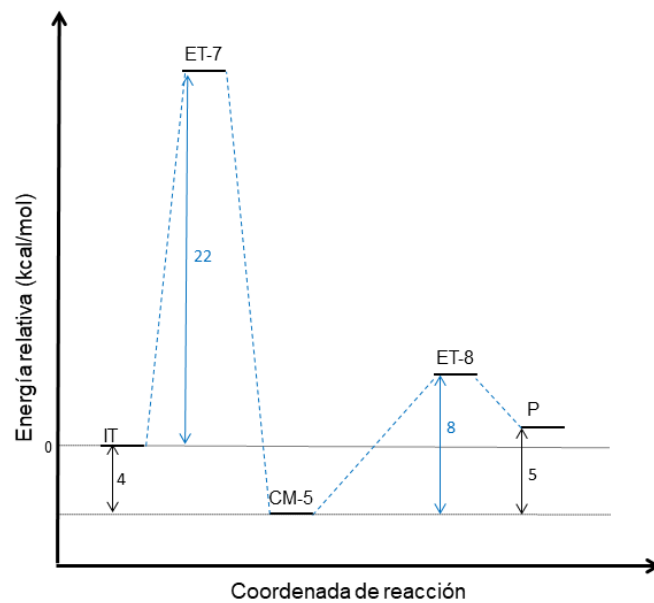


Figura 33. Perfil de energía relativa para la tercera etapa en el mecanismo de desacilación de OXA-24 por avibactam.

4.2. Sistema OXA-24/ETX2514

4.2.1. Objetivo 3: Acilación de OXA-24 por ETX2514

4.2.1.1. Dinámica molecular



Los resultados de RMSD, Anexo16a, y RMSF, Anexo 16b y 16c, obtenidos a partir de la dinámica molecular de 100 ns muestran un comportamiento estable a lo largo de la simulación, observándose valores inferiores a 0.9 Å de RMSF para los residuos más relevantes del sitio activo.

4.2.1.2. Análisis de clúster

A continuación de la simulación de dinámica molecular, se llevó a cabo un análisis de clúster, Figuras 34a y 34b, sobre los diedros α , β y γ definidos en la sección metodología. Se observan dos grupos de conformaciones para los ángulos β y γ , y solo un grupo de conformaciones para el ángulo α . Estos ángulos dan cuenta de la orientación de los grupos funcionales de los residuos Ser128, Lys218 y Ser81 respectivamente. A valores positivos de los ángulos β y γ , los grupos funcionales tienen la orientación adecuada para que ocurra la transferencia protónica del átomo N6 del inhibidor por parte del residuo Lys218 a través del residuo Ser128; mientras que a valores negativos se desfavorece dicho proceso por la orientación desfavorable de los grupos funcionales. Por otra parte, sólo a valores negativos de ángulo α , el grupo hidroxílico del residuo Ser81 apunta hacia el grupo carboxilato del residuo Lys84, formando la interacción de enlace de hidrógeno necesaria para que ocurra la transferencia protónica. En cambio, a valores positivos este grupo apunta en dirección contraria imposibilitando tal transferencia. A diferencia de lo encontrado con avibactam, esta interacción es más estable a lo largo de la simulación con el inhibidor ETX2514, observándose una frecuencia del 99.98% v/s 14.06%, debido a un adecuado posicionamiento

del inhibidor dentro del sitio activo. El centroide que corresponde a valores negativos del ángulo α y valores positivos para los ángulos β y γ , fue obtenido a un tiempo de simulación de 86 ns, Figura 35. El cluster asociado al centroide corresponde a una fracción de 0.55 del total, lo que significa que la frecuencia probabilística de la conformación activa en ETX2514 es mayor que en avibactam.

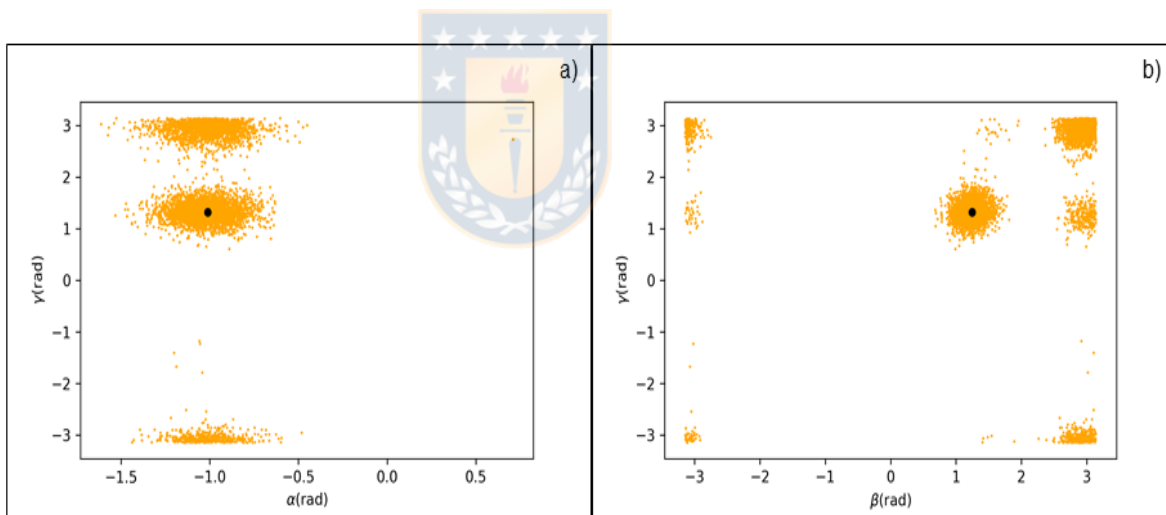


Figura 34. Análisis de clúster para a) ángulos γ v/s α y b) γ v/s β . El centroide a 86 ns está representado por el punto de color negro.

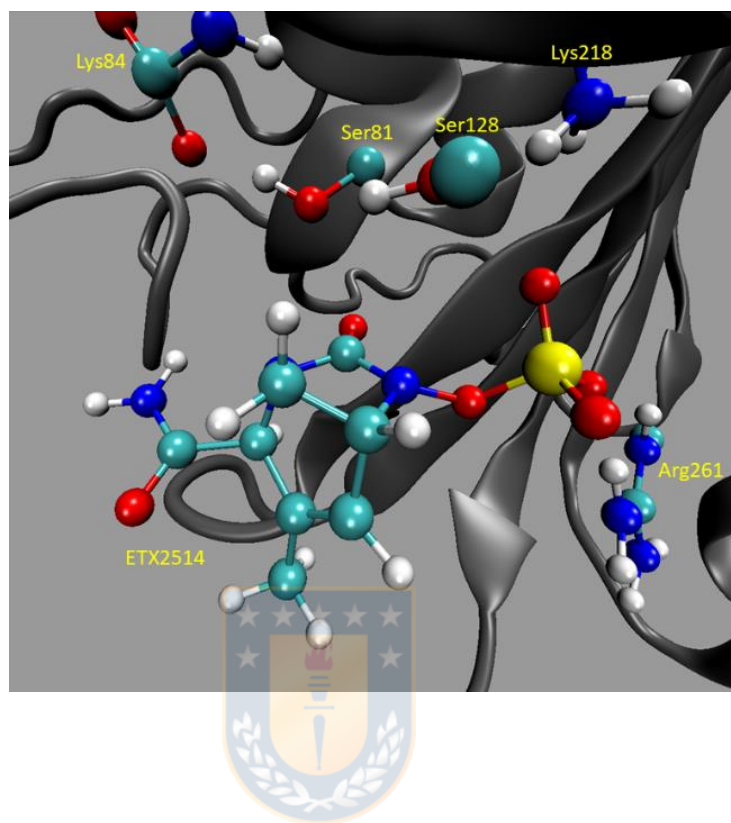


Figura 35. Estructura representativa obtenida a 86 ns de la dinámica molecular.

4.2.1.3. Mecanismo de acilación

4.2.1.3.1. Primera etapa, formación del intermediario tetraédrico

La primera etapa del mecanismo de acilación de OXA-24 por parte de ETX2514, formación del intermediario tetraédrico, Figura 36, fue explorada mediante una SEP en términos de las coordenadas R1 y R2, definidas previamente en la sección metodología. La SEP obtenida, Figura 37, muestra tres puntos críticos, los cuales corresponden al complejo de Michaelis CM-6, Anexo 17, estado de transición ET-9, Anexo 18, e intermediario tetraédrico IT, Figura 38. De acuerdo a la topología observada en la SEP, la formación del IT ocurre mediante un mecanismo concertado, en el cual la reacción comienza con la abstracción del hidrógeno hidroxílico del residuo Ser81 por parte del grupo carbámico del residuo Lys84, junto con el ataque nucleofílico concomitante del oxígeno hidroxílico del residuo Ser81 sobre el átomo de carbono carbonílico C7 del inhibidor. Los ángulos que consideran al átomo al carbono C7 como átomo central, 108.0° y 105.3° , dan cuenta de una hibridación sp^3 , tal como se muestra en la figura 38.

La barrera de activación observada es de 5 kcal/mol, el IT está estabilizado en 25 kcal/mol con respecto al complejo de Michaelis CM-6, por lo cual corresponde a un proceso exotérmico. El perfil de energía para esta etapa se muestra en la Figura 39.

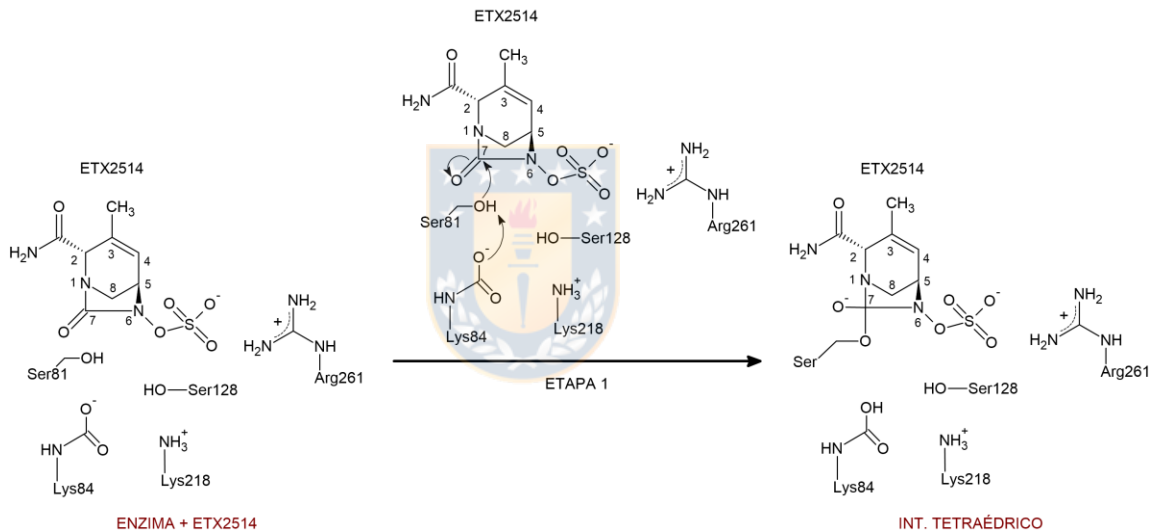


Figura 36. Esquema de la primera etapa del mecanismo de acilación de OXA-24 por parte de ETX2514.

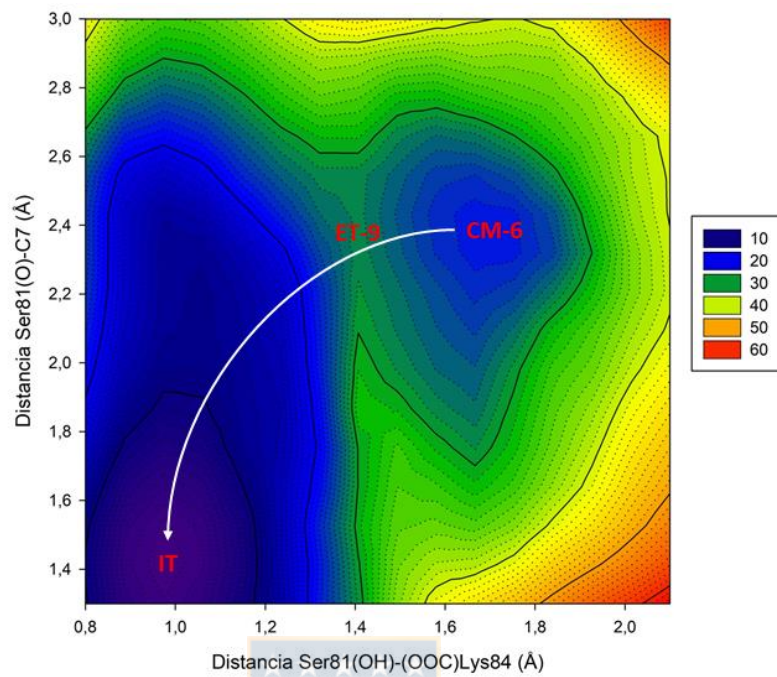


Figura 37. Superficie de energía potencial 2D para primera etapa en el mecanismo de acilación de OXA-24 por parte de ETX2514. Energías relativas al costado derecho en kcal/mol.

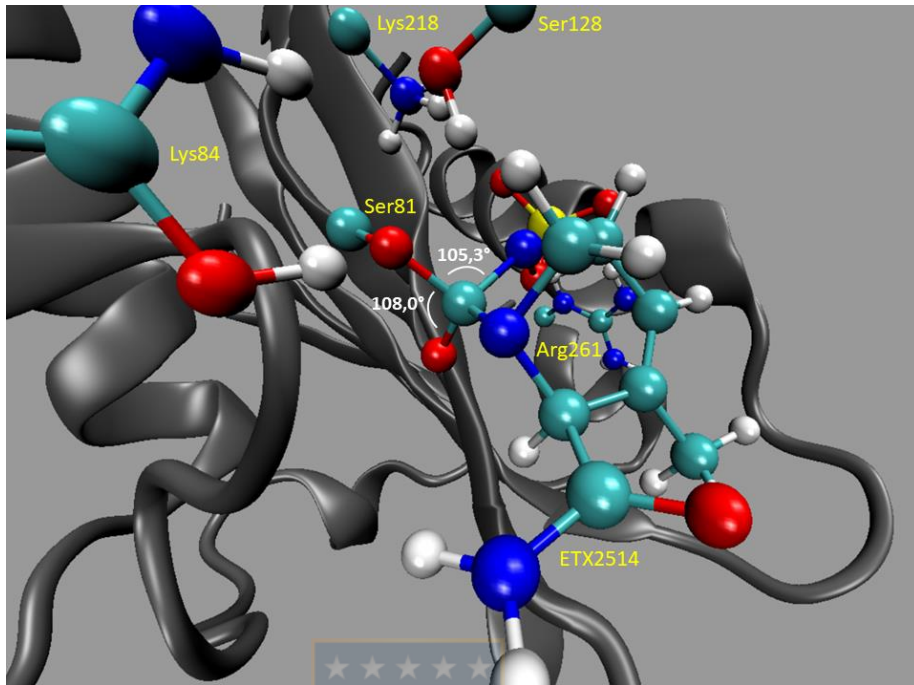


Figura 38. Estructuras 3D correspondiente al intermediario tetraédrico IT, donde dos ángulos que consideran al átomo de carbono C7 como átomo central se representan en color blanco.

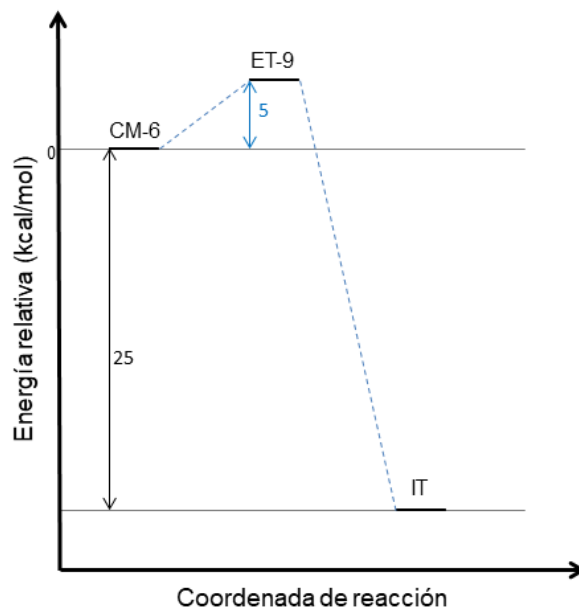
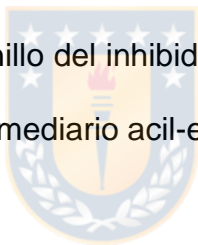


Figura 39. Perfil de energía relativa para primera etapa en el mecanismo de acilación de OXA-24 por parte de ETX2514.

4.2.1.3.2. Segunda etapa, formación del intermediario acil-enzima

La formación del intermediario acil-enzima (AE), Figura 40, fue explorada en términos de la coordenada R3 definida en la sección metodología, mediante un perfil de energía potencial, Figura 41. A partir de la formación del intermediario

IT, la reacción continua con la formación del complejo CM-7, Anexo 19, en el cual se establece una interacción de enlace de hidrógeno entre el grupo amino del residuo Lys281 y el grupo hidroxílico de Ser128, estabilizando el sistema en 4 kcal/mol, respecto al IT. Luego, ocurre la transferencia protónica hacia átomo N6 por parte del residuo Lys218 a través del residuo Ser128, mediante un estado de transición ET-10, Anexo 20. La barrera de energía de activación observada para esta etapa es de 14 kcal/mol, siendo esta etapa la etapa limitante de la reacción. El producto acil-enzima se encuentra desestabilizado en 5 kcal/mol con respecto al IT, por lo cual corresponde a un proceso endotérmico. Esta etapa conduce finalmente a la ruptura del anillo del inhibidor y a la inactivación de la enzima. El producto de esta etapa, intermediario acil-enzima, se muestra en la figura 42.



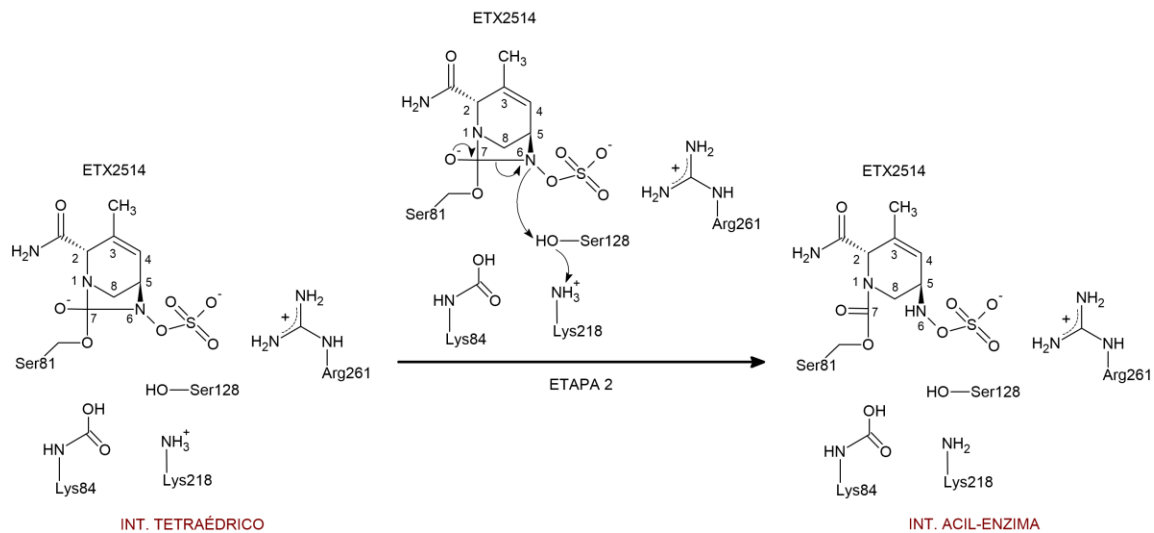


Figura 40. Esquema de la segunda etapa del mecanismo de acilación de OXA-24 por parte de ETX2514.

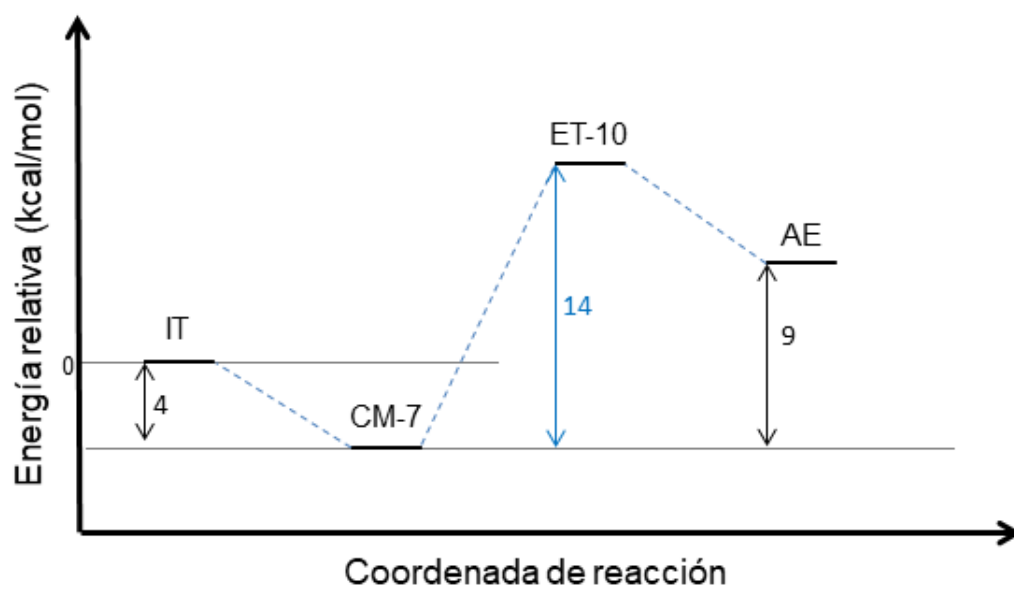


Figura 41. Perfil de energía relativa para segunda etapa en el mecanismo de acilación de OXA-24 por parte de ETX2514.

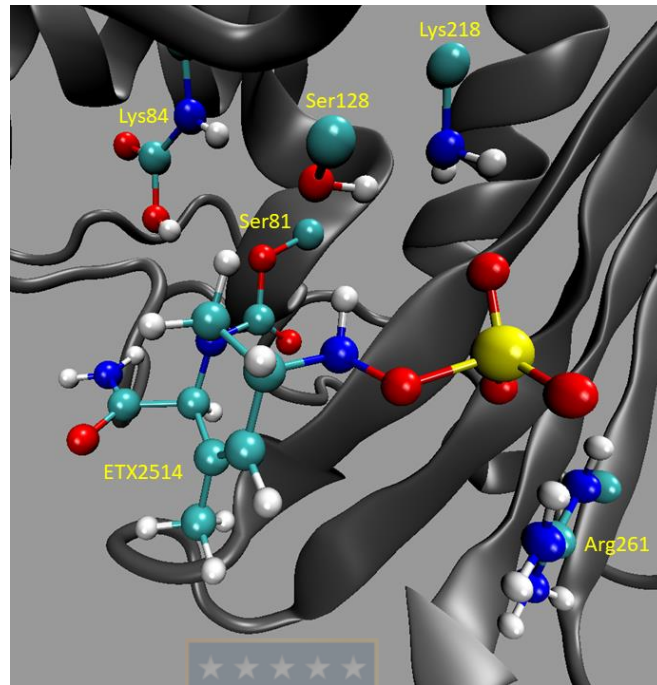


Figura 42. Estructura 3D correspondiente al intermediario acil-enzima (AE).

4.2.2. Objetivo 4: Desacilación de OXA-24 por ETX2514

4.2.2.1. Dinámica molecular

Los resultados de RMSD, Anexo 21a, y RMSF, Anexo 21b y 21c, obtenidos a partir de la dinámica molecular de 100 ns muestran un comportamiento estable a lo largo de la simulación, observándose valores inferiores a 0.7 Å de RMSF para los residuos más relevantes del sitio activo.

4.2.2.2. Análisis de clúster

Los resultados del análisis de clúster sobre los diedros α , β y γ definidos en la sección metodología se muestran en las Figuras 43a y 43b. Estos ángulos dan cuenta de la orientación del grupo N6-H, la cual es imprescindible para que ocurra la transferencia protónica del átomo de nitrógeno del residuo Lys218 por parte

del grupo N6-H, a través del residuo Ser128. De forma similar a lo encontrado en el caso de avibactam, se observan dos grupos de conformaciones para los ángulos α y β y un grupo para el ángulo γ . A valores positivos inferiores a 1.57 radianes de ángulo α , el grupo N6-H apunta hacia el grupo hidroxílico del residuo Ser128, favoreciendo la transferencia protónica necesaria para la etapa de desacilación; mientras que tanto a valores positivos superiores como valores negativos este grupo apunta en dirección contraria impidiendo dicho proceso. Por otro lado, sólo a valores inferiores a -2.35 radianes de β se promueve la transferencia protónica debido a una adecuada orientación del grupo N6-H. Finalmente, los valores de ángulo γ varían entre +2 y -2 radianes observándose un solo tipo de conformación, debido a la interacción electrostática presente entre el grupo sulfato del inhibidor y el grupo guanidinio del residuo Arg261, otorgándole rigidez al grupo sulfato. El centroide obtenido corresponde a un tiempo de simulación de 23 ns, Figura 44, teniendo en cuenta valores positivos inferiores a 1.57 rad para el ángulo α e inferiores a -2.35 rad para el ángulo β . El cluster asociado al centroide seleccionado corresponde a una fracción de 0.26 del total. En este caso, la frecuencia probabilística de la conformación activa para la desacilación es menor en ETX2514 que el valor correspondiente para avibactam.

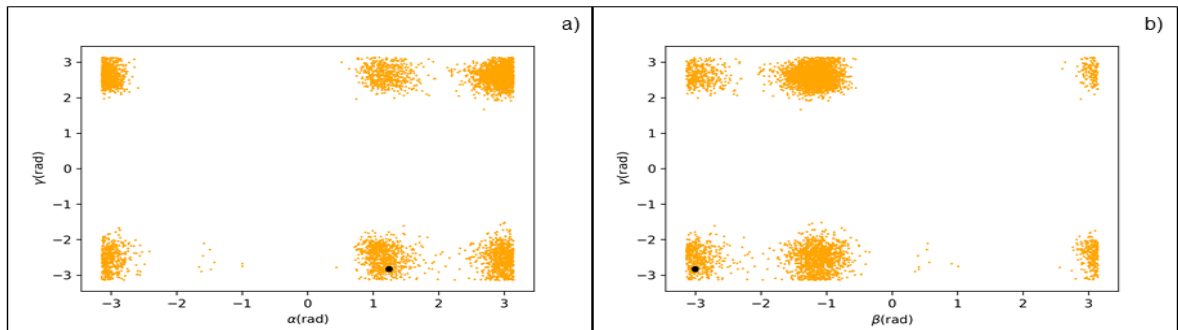


Figura 43. Análisis de clúster para a) ángulos γ v/s α y b) γ v/s β . El centroide a 23 ns está representado por un punto de color negro.

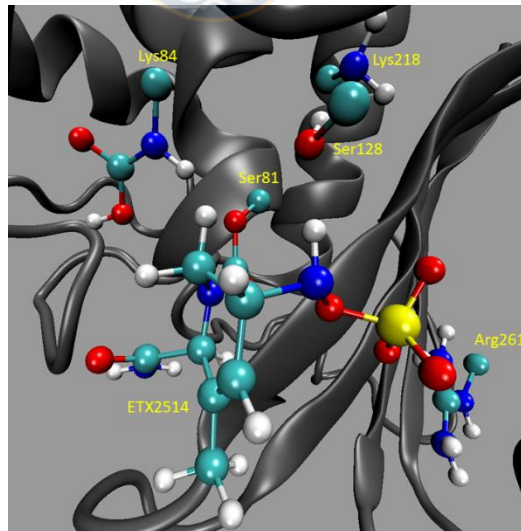


Figura 44. Estructura representativa obtenida a 23 ns de la dinámica molecular.

4.2.2.3. Mecanismo de desacilación

4.2.2.3.1. Etapas 1 y 2: Formación de intermediario dianiónico e intermediario tetraédrico

Los dos primeros pasos del mecanismo de desacilación correspondiente a la formación del intermediario dianiónico ID y la formación del intermediario tetraédrico IT, Figura 45, fueron explorados mediante una SEP en términos de las coordenadas R4 y R5 definidas en la sección metodología. De manera similar a lo encontrado con avibactam en la sección, la topología de la SEP, Figura 46, sugiere que la reacción puede seguir dos caminos a partir del complejo de Michaelis CM-8, Anexo 22. El camino de menor energía corresponde en un primer paso a la formación del ID, Figura 47a, a través de un estado de transición ET-11, Anexo 23, con una barrera de energía de activación de 5 kcal/mol; en el cual ocurre la transferencia protónica desde el átomo N6 del inhibidor hacia el átomo del grupo de amino del residuo Lys218 a través de Ser128. Esto sugiere una rápida formación del ID, debido a la estabilización de la carga negativa tanto del átomo N6, como la del grupo sulfato del inhibidor mediante interacción

electrostática con los residuos Lys218 y Arg261, además de la estabilización por interacción de enlace de hidrogeno entre el grupo hidroxílico del residuo Ser128 y el átomo de nitrógeno N6 del inhibidor. En un segundo paso, ocurre la formación del IT, Figura 47b, mediante ataque nucleofílico del átomo aniónico N6 sobre el átomo C7 del inhibidor, a través de un estado de transición ET-12, Anexo 24, con una barrera de energía de activación de 7 kcal/mol. Este último paso conduce finalmente a la reciclación del anillo, y por lo tanto la recuperación de la enzima y el inhibidor intacto. En esta etapa es también posible observar el cambio de hibridación del carbono C6 desde sp^2 a sp^3 , como es corroborado por el cambio de geometría, desde una geometría plana hacia una tetraédrica, observándose ángulos de 116.4°, 113.0° y 129.8° para ID, mientras que para el inhibidor los ángulos del carbono C6 son 107.0°, 102.7° y 107.3°; Figuras 47a y 47b. Por otro lado, el camino de mayor de energía implica en un primer paso a la formación del complejo de Michaelis CM-9, Anexo 25, mediante una inversión conformacional de la estructura piramidal del átomo de nitrógeno N6, a través de un estado de transición ET-13, Anexo 26, con una barrera de energía de activación de 2 kcal/mol. Posteriormente, se lleva a cabo la formación del IT, mediante un mecanismo concertado que involucra por un lado la transferencia protónica desde el átomo N6 hacia el átomo de nitrógeno del residuo Lys218 a través de Ser128, y por otro lado el ataque nucleofílico del átomo N6 sobre el átomo C7, a través de un estado de transición ET-14, Anexo 27, con una barrera de energía

de activación de 15 kcal/mol. El perfil de energía para esta etapa se muestra en la figura 48.

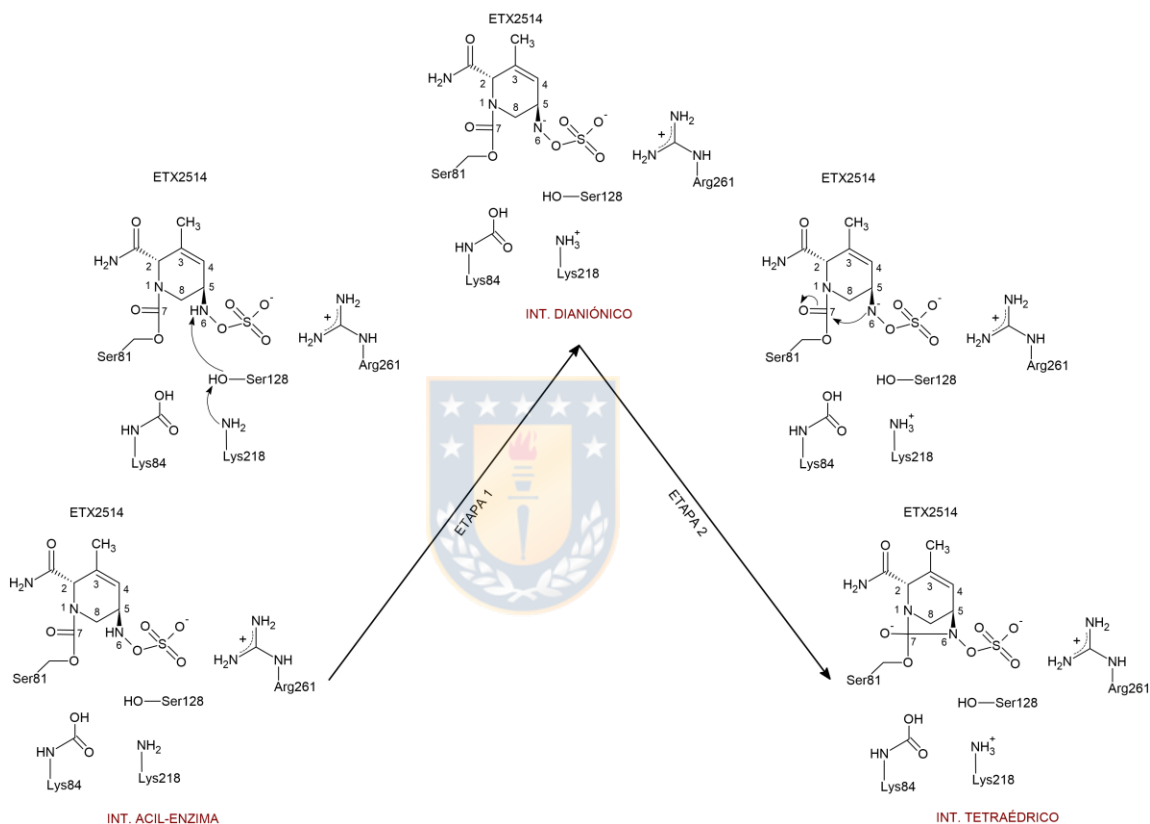


Figura 45. Esquema de la primera y segunda etapa del mecanismo de desacilación de OXA-24 por parte de ETX2514.

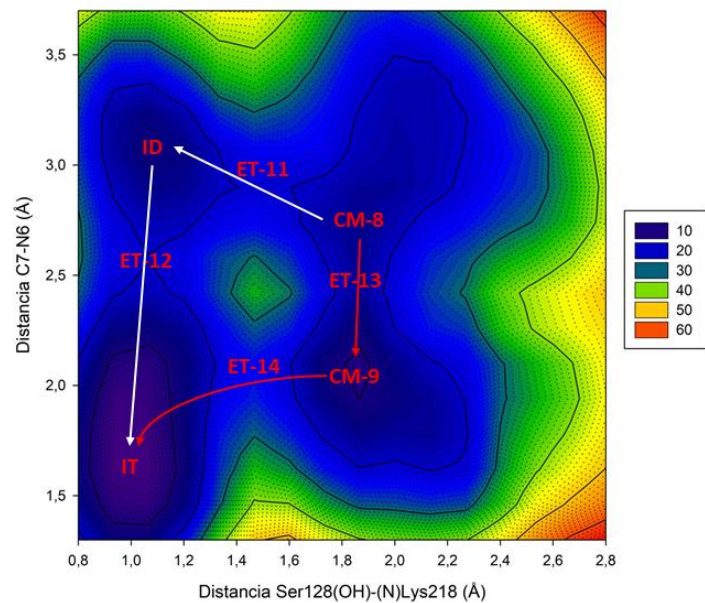


Figura 46. Superficie de energía potencial 2D que involucra primera y segunda etapa del mecanismo de desacilación, donde el camino de mayor energía está representado con color rojo. Energías relativas al costado derecho en kcal/mol.

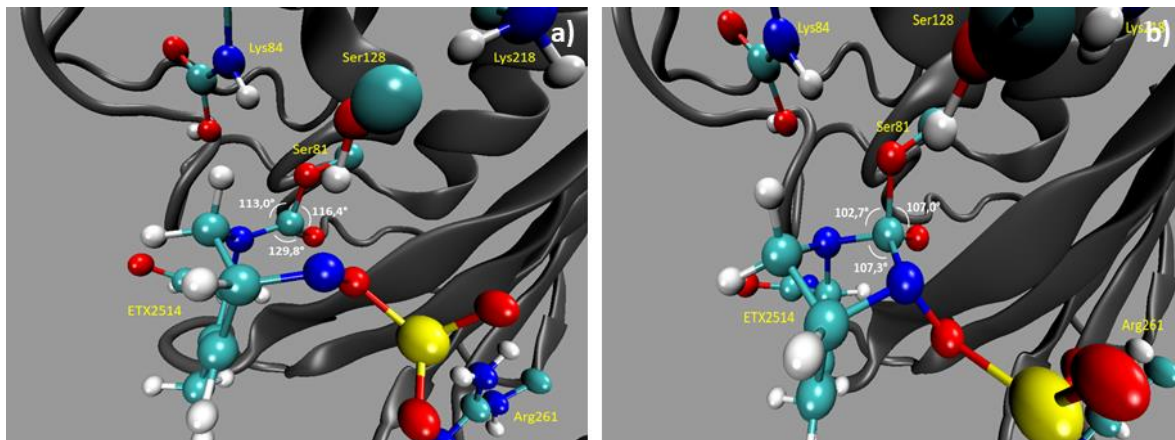


Figura 47. Estructura 3D correspondiente al a) intermediario dianiónico ID e b) Intermediario tetraédrico IT, donde los ángulos que comprenden al átomo de carbono C7 como átomo central se representan en color blanco.

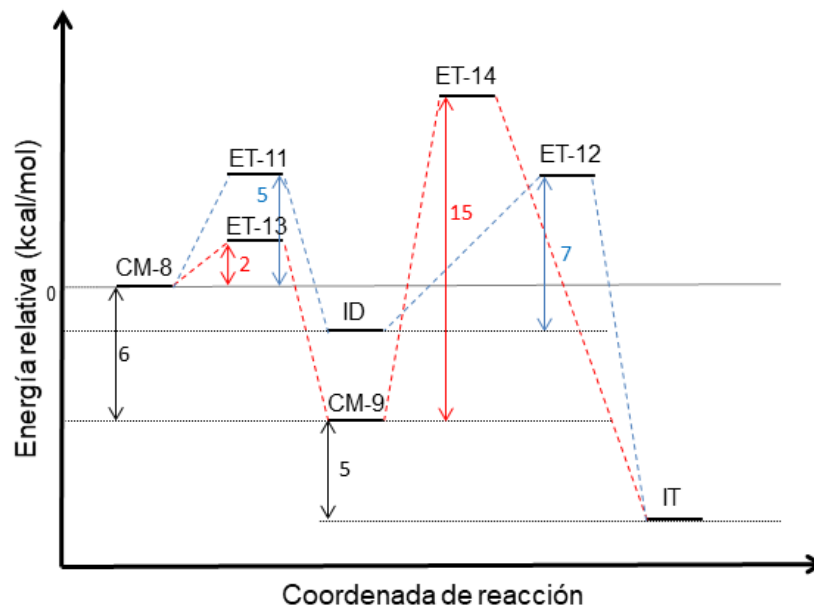


Figura 48. Perfil de energía relativa para primera y segunda etapa en el mecanismo de desacilación de OXA-24 por ETX2514, donde el camino de mayor energía está representado con color rojo.

4.2.2.3.2. Etapa 3: Regeneración del inhibidor y la enzima

Tras la formación del IT, se exploró la tercera etapa y final en el mecanismo de desacilación, regeneración del inhibidor y la enzima, Figura 49, mediante una

SEP en términos de las coordenadas R5 y R6 definidas en la sección metodología. De forma similar a lo observado con avibactam, la SEP consta de dos pasos, Figura 50. El primer paso consiste en la formación del complejo de Michaelis CM-10, Anexo 28, través de un estado de transición ET-15, Anexo 29, con una barrera de energía de activación de 3 kcal/mol. Este paso involucra la rotación del grupo hidroxílico del residuo Lys84, promoviendo una interacción de enlace de hidrogeno entre este grupo y el átomo de oxígeno hidroxílico del residuo Ser81, estabilizando el complejo CM-10 en 22 kcal/mol con respecto al IT. Finalmente, en un segundo paso concertado ocurre la ruptura del enlace C7-(O)Ser81 y la transferencia protónica desde el grupo carboxílico del residuo Lys218 hacia el átomo de oxígeno hidroxílico del residuo Ser81, a través de un estado de transición ET-16, Anexo 30, regenerando tanto la enzima como el inhibidor, Figura 51. La barrera de activación observada es de 23 kcal/mol, resultando ser la etapa limitante. El correspondiente perfil de energía se muestra en la Figura 52.

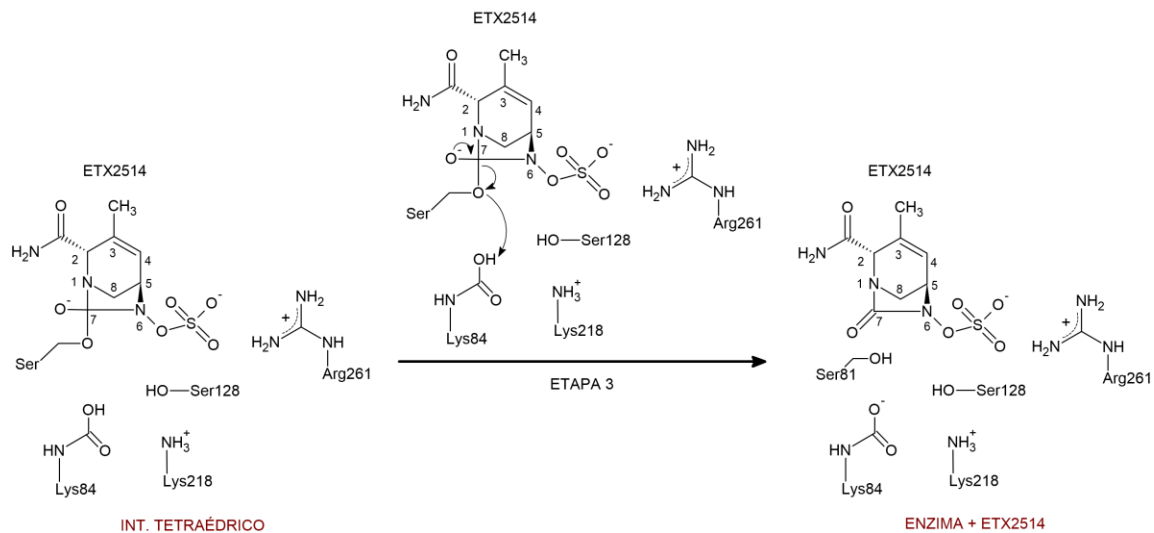
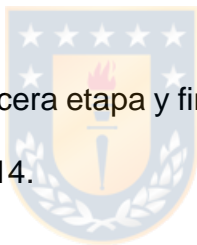


Figura 49. Esquema de la tercera etapa y final del mecanismo de desacilación de OXA-24 por parte de ETX2514.



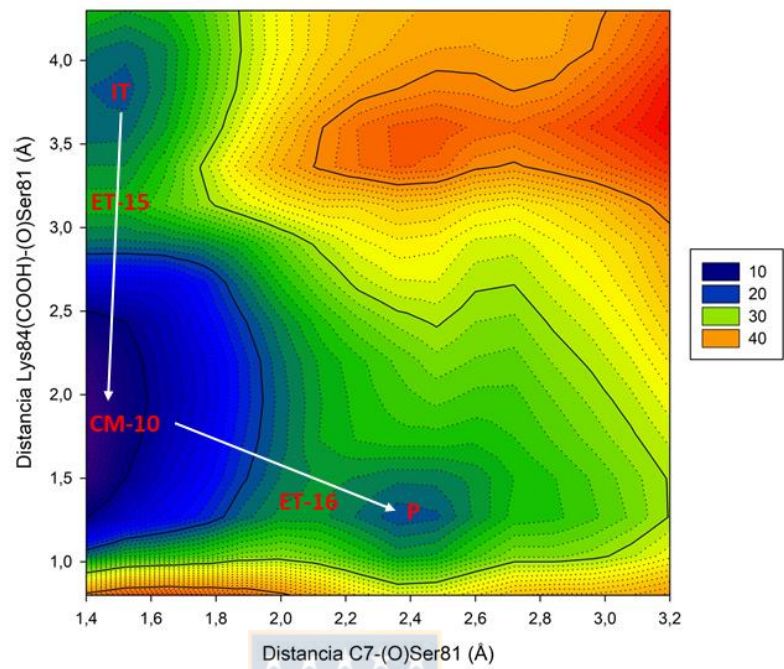


Figura 50. Superficie de energía potencial 2D que involucra la tercera etapa del mecanismo de desacilación. P corresponde al inhibidor ETX2514 más la enzima. Energías relativas al costado derecho en kcal/mol.

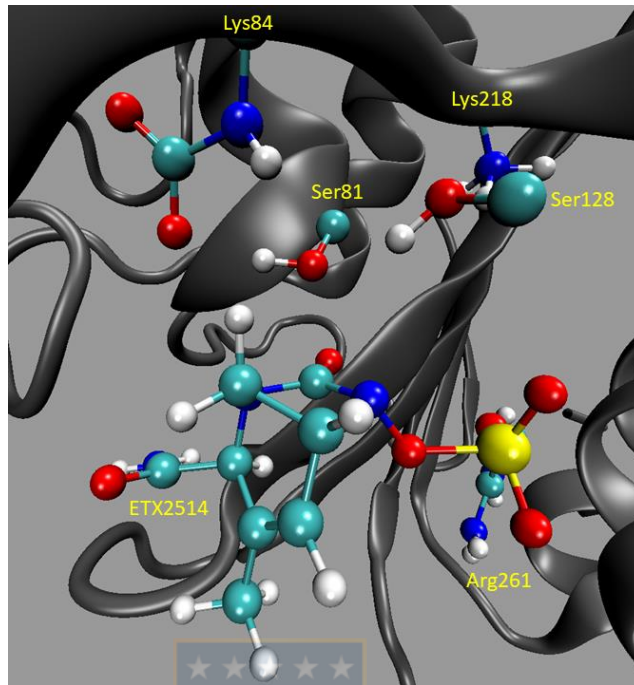


Figura 51. Estructura 3D correspondiente al intermediario acil-enzima (P).

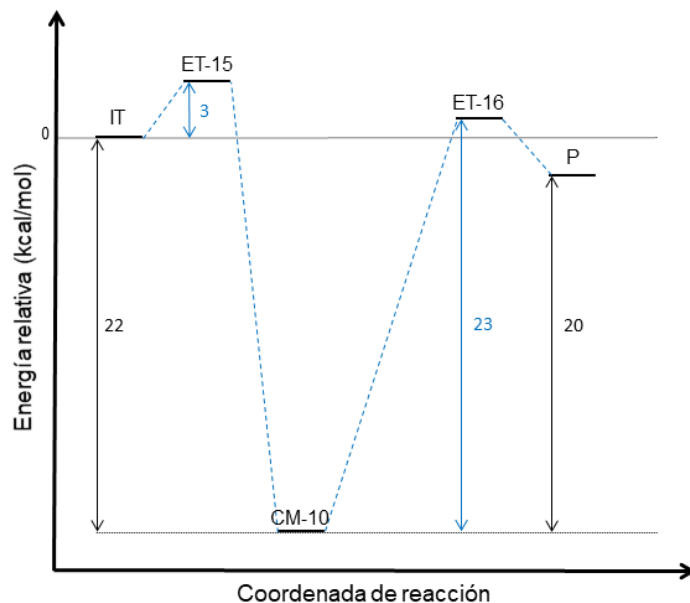


Figura 52. Perfil de energía relativa para la tercera etapa en el mecanismo de desacilación de OXA-24 por ETX2514.

El esquema del ciclo catalítico completo del mecanismo de inhibición (acilación y desacilación) postulado para la inhibición de OXA-24 por avibactam y ETX2514 se muestra en la figura 53. El mecanismo de acilación está compuesto por dos etapas, formación del intermediario tetraédrico (etapa 1) y formación del intermediario acil-enzima (etapa 2), siendo la etapa 2, la etapa limitante del proceso con barreras de energía de activación de 17 y 14 kcal/mol para avibactam y ETX2514 respectivamente; mientras que la etapa rápida

corresponde a la etapa 1 con barreras de 8 y 5 kcal/mol. Estos resultados indican que la reacción de acilación esta favorecida cinéticamente en 3 kcal/mol para ETX2514 en comparación con avibactam. Por otra parte, el mecanismo de desacilación consta de 3 etapas, formación del intermediario dianiónico (etapa 1), formación de intermediario tetraédrico (etapa 2) y finalmente regeneración tanto de la enzima como del inhibidor (etapa 3), siendo la etapa 3, la etapa limitante del proceso con barreras de energía de activación de 22.0 y 23.0 kcal/mol para avibactam y ETX2514 respectivamente, En resumen, el inhibidor ETX2514 presenta una ventaja por sobre el inhibidor avibactam, debido a que por una parte la etapa de acilación se encuentra favorecida y por otra la etapa de desacilación se ve desfavorecida prácticamente de igual manera para ambos frente a la etapa de acilación, desplazando el equilibrio hacia una inhibición más duradera de la enzima, lo cual está de acuerdo con la evidencia empírica (Durand-Réville et al., 2017; Lahiri et al., 2015). Los valores de las barreras de energía potencial calculadas y barreras de energía de activación experimentales se muestran en la Tabla 1. A pesar de que estas barreras de energía no son directamente comparables debido a la no consideración de efectos entrópicos, estos valores dan cuenta de una buena concordancia entre los valores calculados y experimentales reportados en literatura (Durand-Réville et al., 2017; Lahiri et al., 2015), soportando de esta forma el mecanismo postulado y mostrando además que la inhibición de la enzima por estos compuestos es prácticamente irreversible.

Inhibidor	Barrera de energía (kcal/mol)	
	Acilación	Desacilación
Avibactam	15.8*	25.5*
	17.0	22.0
ETX2514	12.6*	24.9*
	14.0	23.0

Tabla 1. Barreras de energía potencial calculadas y barreras de energía de activación experimentales (* valores experimentales fueron obtenidos mediante la ecuación de Eyring, usando datos reportados por Lahiri y Durand-Réville et al).

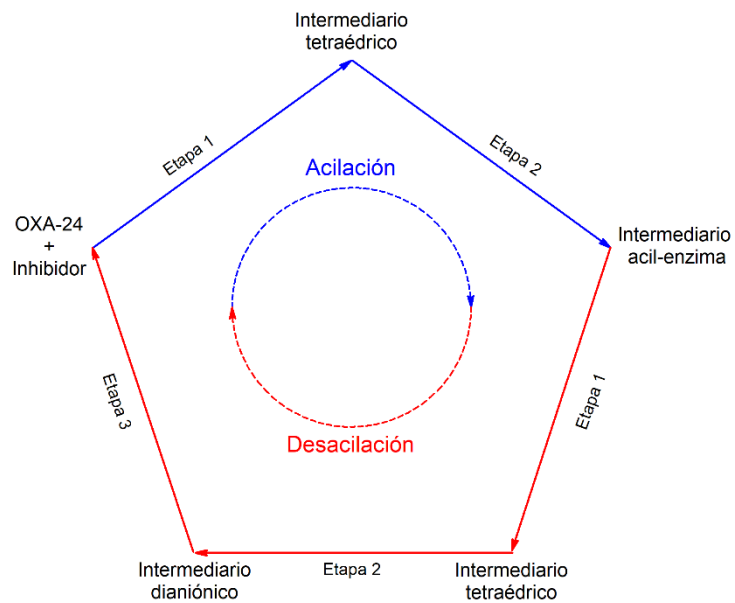


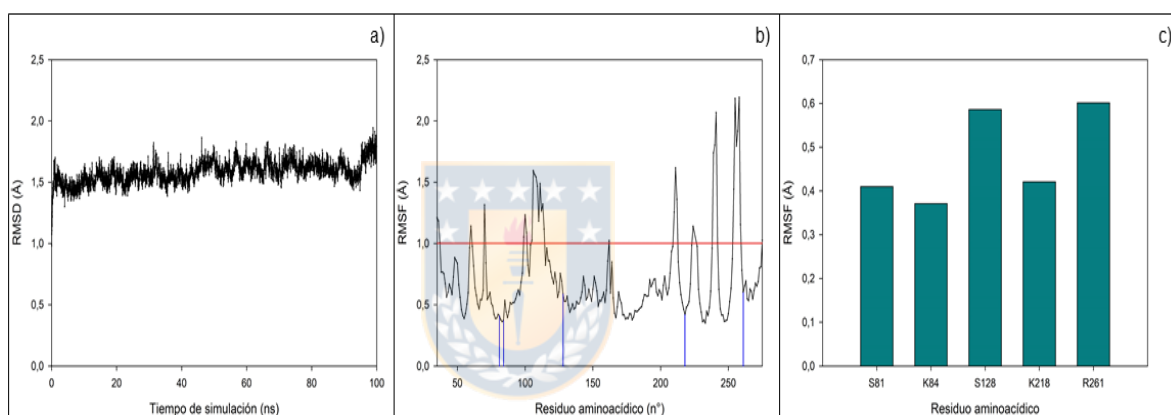
Figura 53. Esquema del ciclo catalítico del mecanismo de inhibición, acilación y desacilación, postulado para la inhibición de OXA-24 por avibactam y ETX2514.

5. CONCLUSIONES.

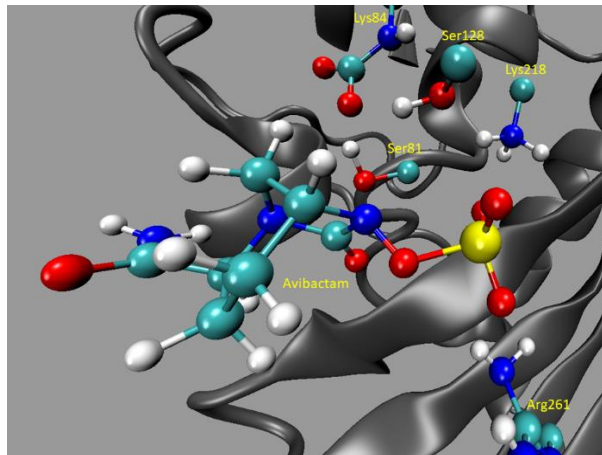
Los fármacos ETX2514 y avibactam pertenecen a la misma familia de inhibidores conocida como diazabiciclooctanonas (DBO). Ambos inhiben β -lactamasas por medio de mecanismos reversibles análogos. Los mecanismos consisten de una etapa de acilación y una etapa de desacilación. La etapa de acilación conduce a la inhibición de la enzima, mientras que la etapa de desacilación conduce a la recuperación de la enzima y el inhibidor. Por lo tanto, la evaluación de la eficiencia de inhibición resulta ser un compromiso entre el costo energético de ambas etapas. La etapa de acilación consiste de dos pasos, la formación de un intermediario tetraédrico y la subsecuente apertura del anillo del inhibidor. La etapa limitante de velocidad corresponde al segundo paso, que corresponde a la abstracción del protón hidroxílico de Ser128 por parte del átomo N6 conduciendo a la apertura del anillo. Los valores de las barreras de activación para este paso son 14.0 (kcal/mol) y 17.0 (kcal/mol) para ETX2514 y avibactam, respectivamente. Los altos valores de energía se explican por el alto valor de pKa para este residuo y el ambiente hidrófobo del sitio activo. Los valores permiten concluir que la acilación ocurre más fácilmente con ETX2514 que con avibactam. Una diferencia de 3 kcal/mol en la barrera de activación conduce a diferencias importantes en los valores de las constantes de velocidad. Por otro lado, la etapa

de desacilación consiste de tres pasos, formación de un intermediario dianiónico, formación de un intermediario tetraédrico, y finalmente la reciclación del inhibidor. Los primeros dos pasos tienen barreras de activación de 5.0 (kcal/mol) y 7.0 (kcal/mol) para ETX2514; mientras que para avibactam ambas etapas tienen valor de 11.0 (kcal/mol). El último paso, reciclación del inhibidor, resulta ser el paso limitante de velocidad con barreras de activación de 23.0 (kcal/mol) y 22.0 (kcal/mol), para ETX2514 y avibactam, respectivamente. Concluyendo, sólo la etapa de acilación determina la diferencia en la habilidad inhibitoria de ETX2514 y avibactam, ya que en la etapa de desacilación no se observan diferencias de energía importantes, tal como se reporta en literatura. Los altos valores de las barreras están de acuerdo con la evidencia empírica que señala que la inhibición de la enzima es prácticamente irreversible. En ambas etapas, el par Lys218 y Lys84 carboxilada juegan un rol crucial mediante la coordinación de sus estados de protonación en una forma “on/off” (protonado/desprotonado), optimizando las transferencias protónicas entre los residuos y los inhibidores. Esta característica marca la diferencia entre las enzimas clase D y las otras clases de β -lactamasas. Los resultados aquí presentados pueden ser de interés para el desarrollo de nuevos inhibidores de enzimas de clase D.

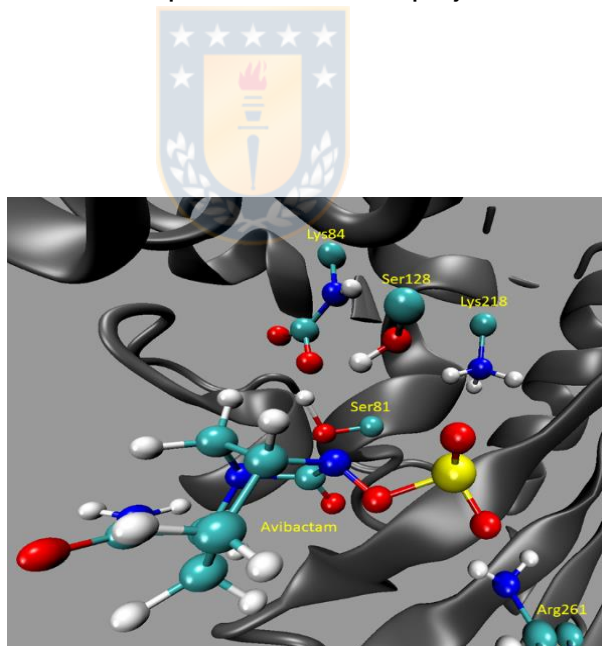
ANEXO



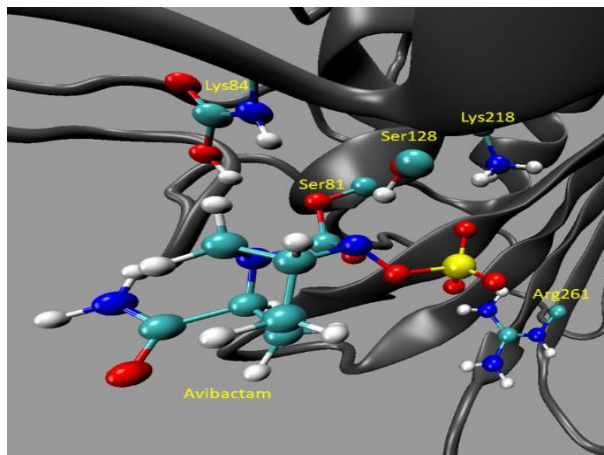
Anexo 1. Resultados de RMSD para la proteína (a), RMSF para residuos de la proteína (b), RMSF para residuos relevantes del sitio activo (c).



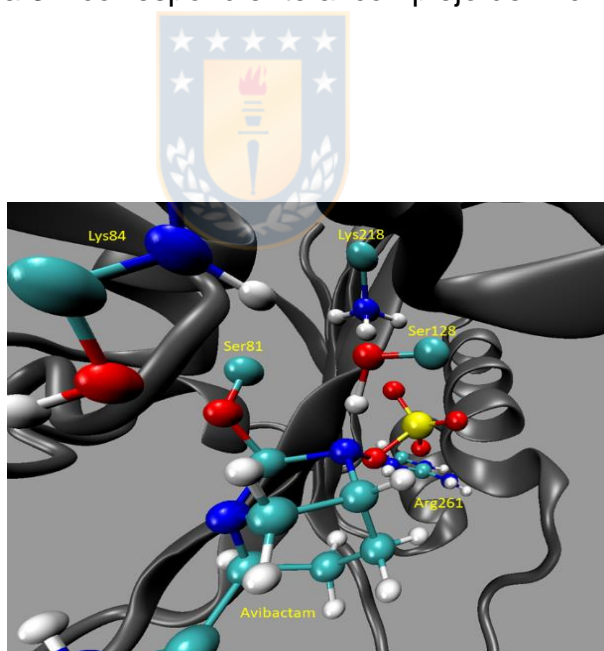
Anexo 2. Estructura 3D correspondiente al complejo de Michaelis CM-1.



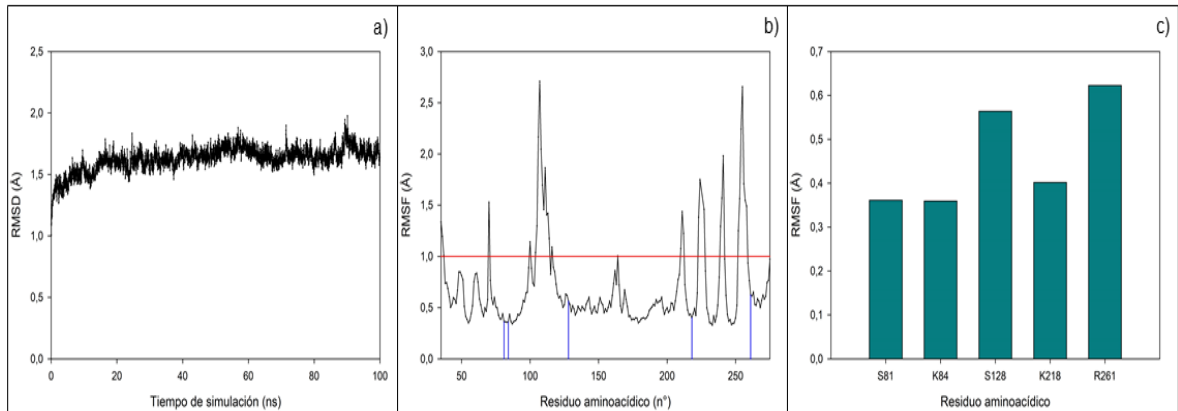
Anexo 3. Estructura 3D correspondiente al estado de transición ET-1.



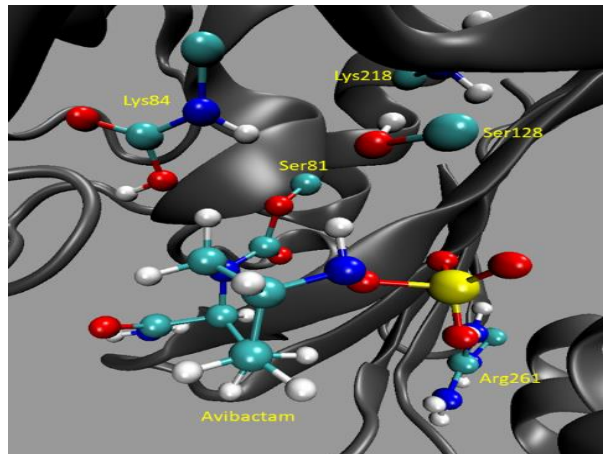
Anexo 4. Estructura 3D correspondiente al complejo de Michaelis CM-2.



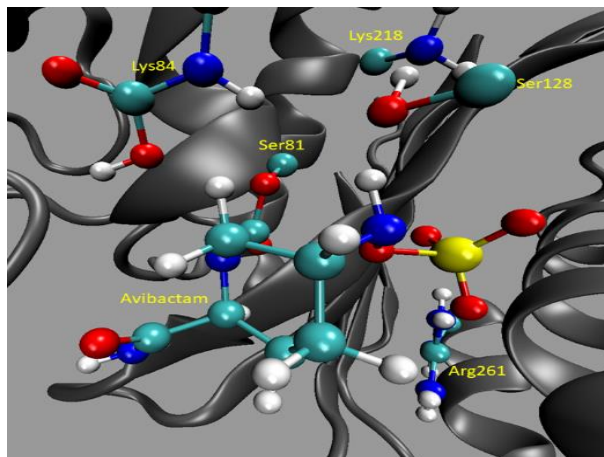
Anexo 5. Estructura 3D correspondiente al estado de transición ET-2.



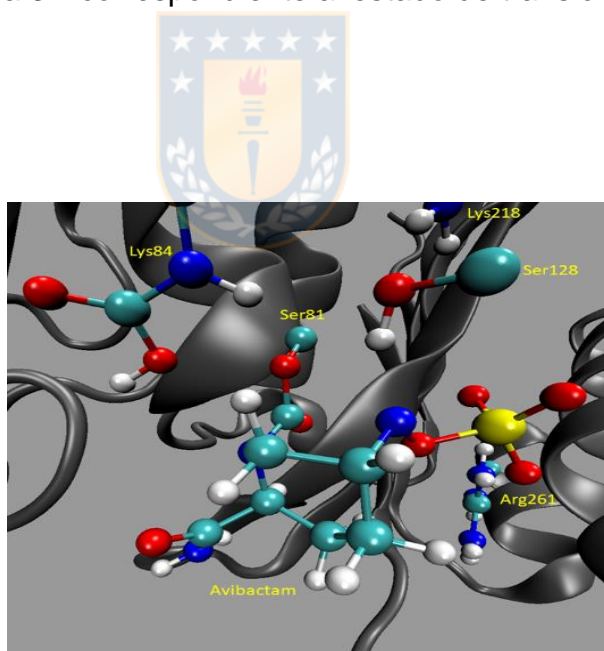
Anexo 6. Resultados de a) RMSD para la proteína en función del tiempo de simulación, b) RMSF para residuos de la proteína y c) RMSF para residuos relevantes del sitio activo.



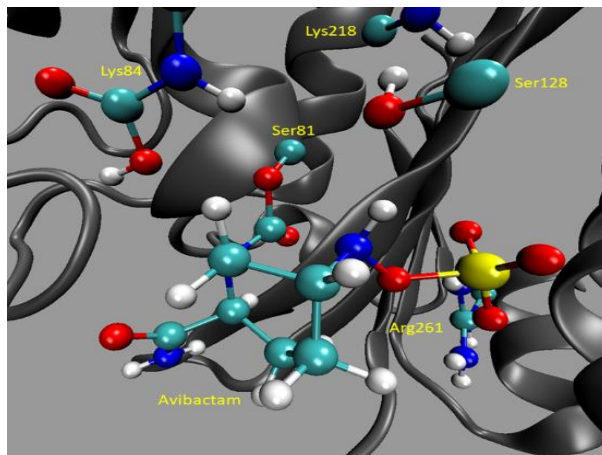
Anexo 7. Estructura 3D correspondiente al complejo de Michaelis CM-3.



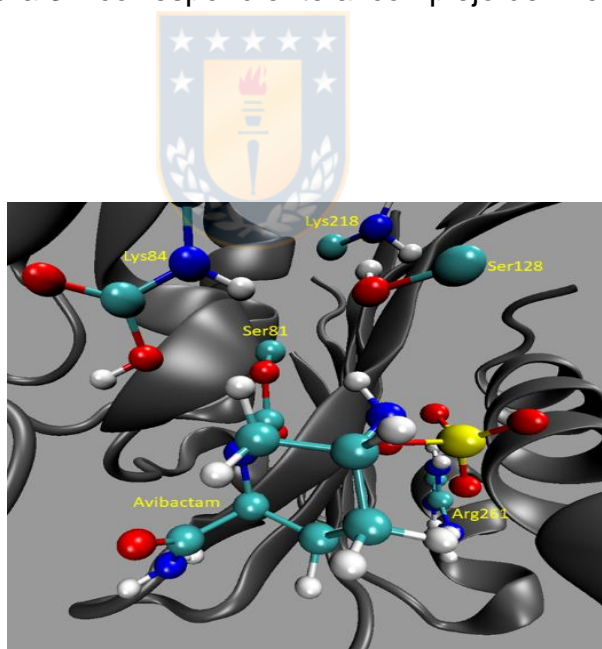
Anexo 8. Estructura 3D correspondiente al estado de transición ET-3.



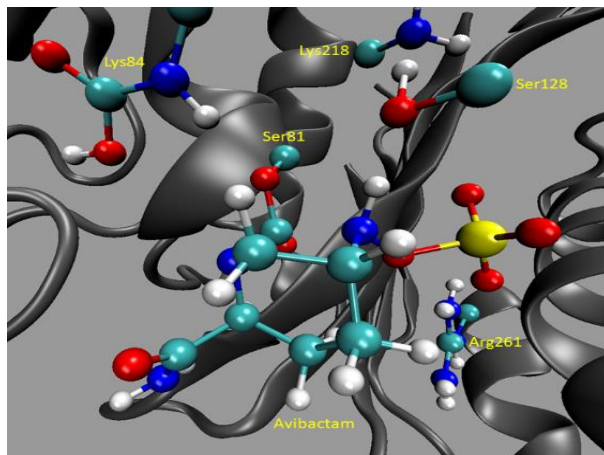
Anexo 9. Estructura 3D correspondiente al estado de transición ET-4.



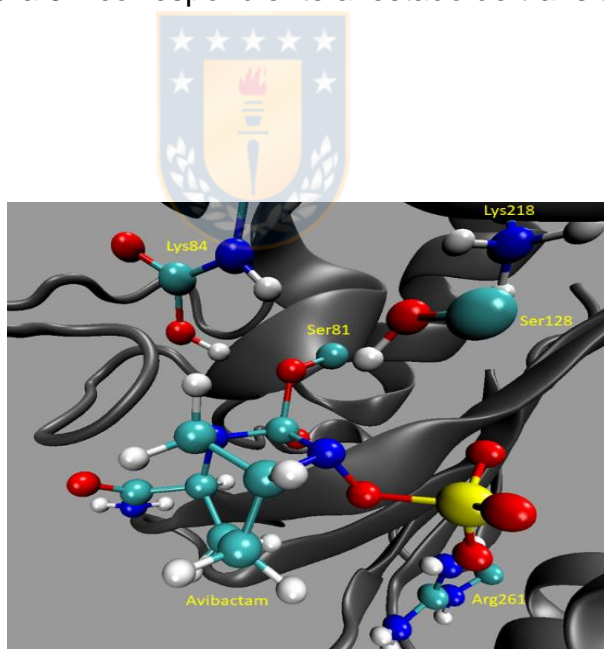
Anexo 10. Estructura 3D correspondiente al complejo de Michaelis CM-4.



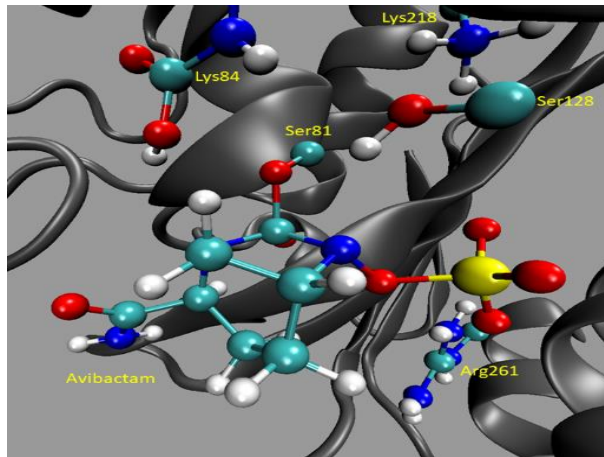
Anexo 11. Estructura 3D correspondiente al estado de transición ET-5.



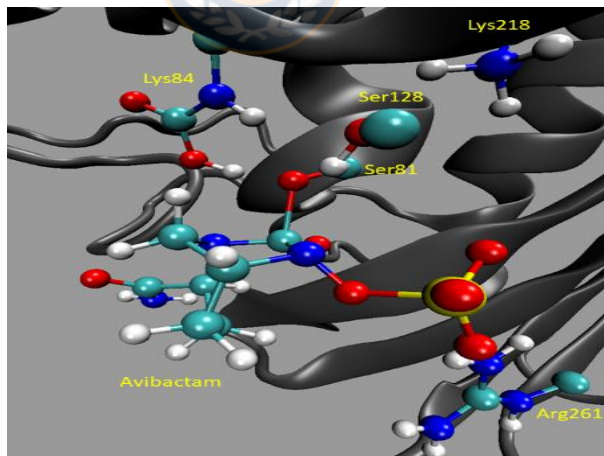
Anexo 12. Estructura 3D correspondiente al estado de transición ET-6.



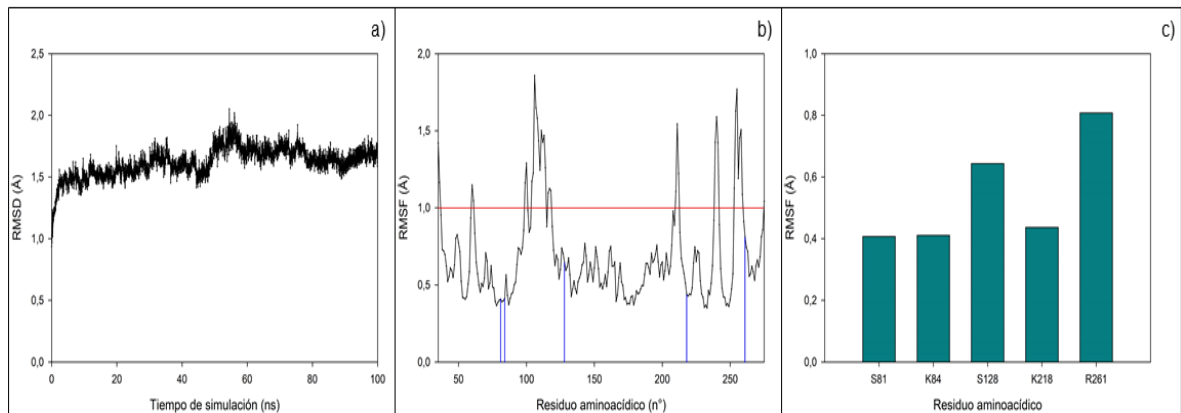
Anexo 13. Estructura 3D correspondiente al complejo de Michaelis CM-5.



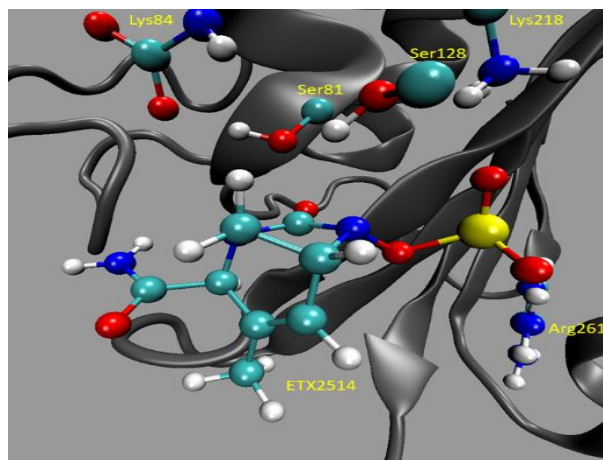
Anexo 14. Estructura 3D correspondiente al estado de transición ET-7.



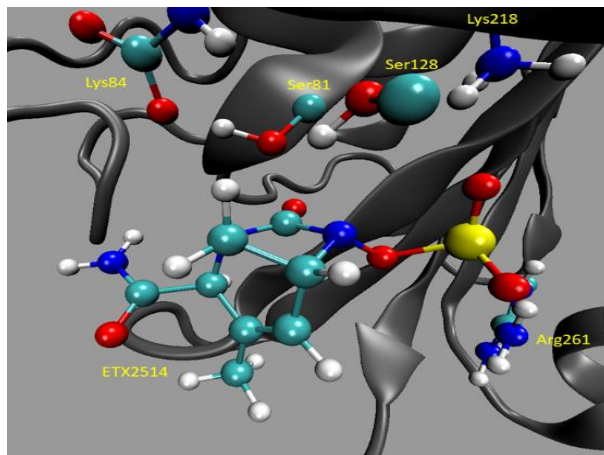
Anexo 15. Estructura 3D correspondiente al estado de transición ET-8.



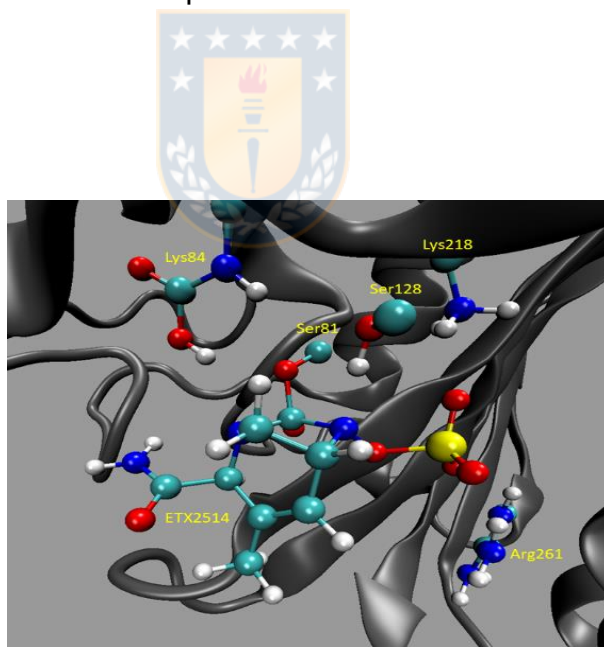
Anexo 16. Resultados de RMSD para la proteína (a), RMSF para residuos de la proteína (b), RMSF para residuos claves del sitio activo (c).



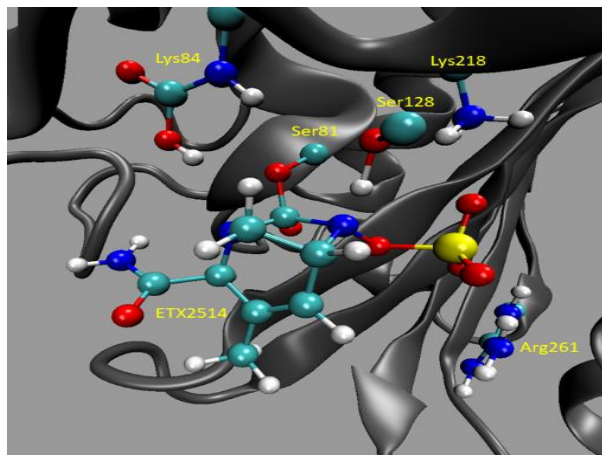
Anexo 17. Estructura 3D correspondiente al complejo de Michaelis CM-6.



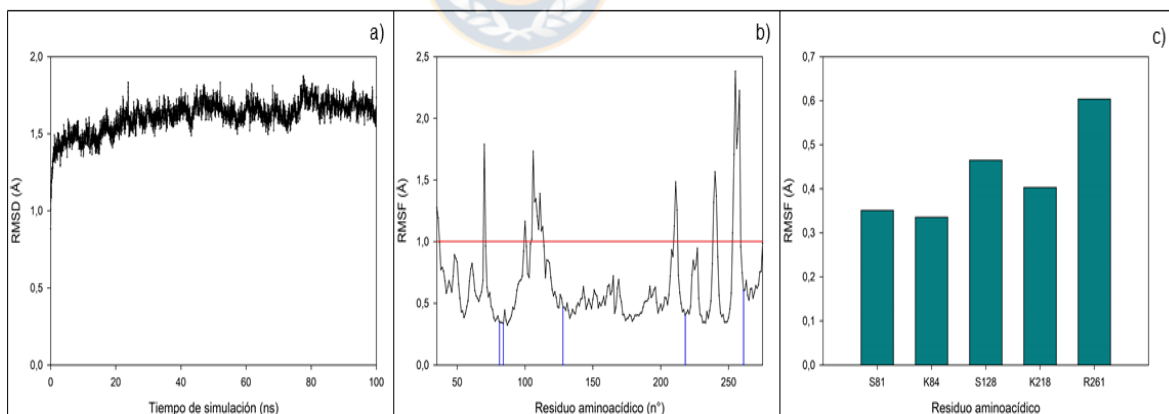
Anexo 18. Estructura 3D correspondiente al estado de transición ET-9.



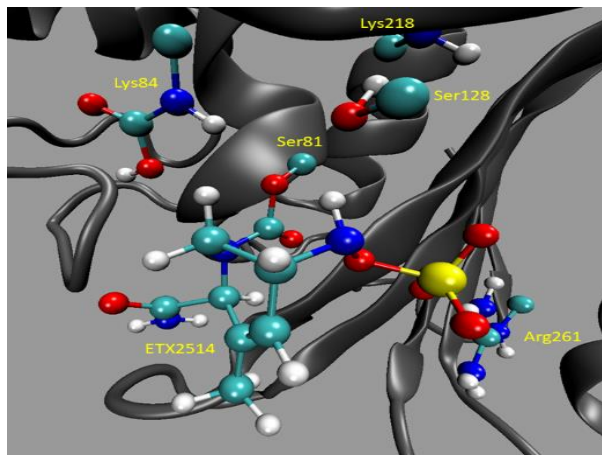
Anexo 19. Estructura 3D correspondiente al complejo de Michaelis CM-7.



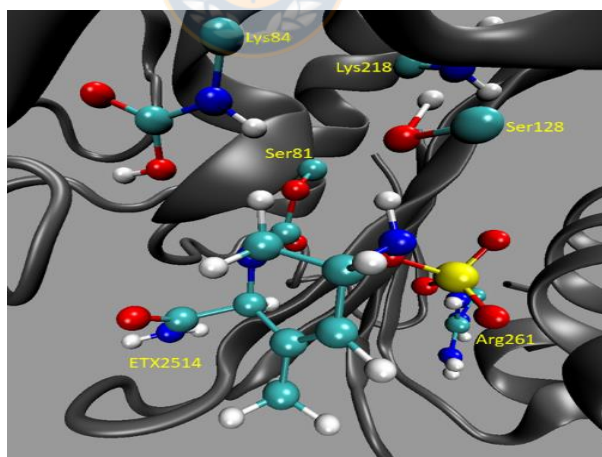
Anexo 20. Estructura 3D correspondiente al estado de transición ET-10.



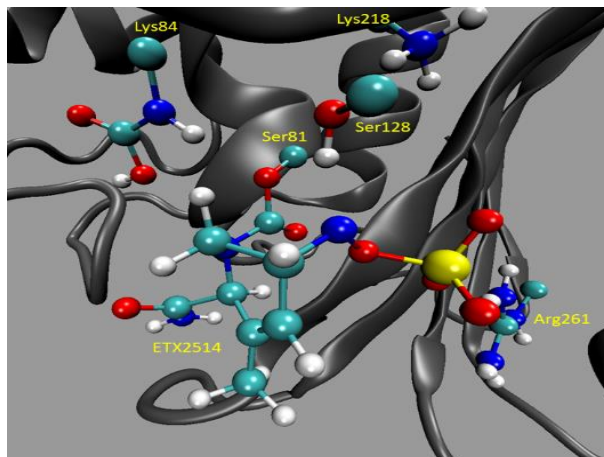
Anexo 21. Resultados de RMSD para la proteína (a), RMSF para residuos de la proteína (b), RMSF para residuos claves del sitio activo (c).



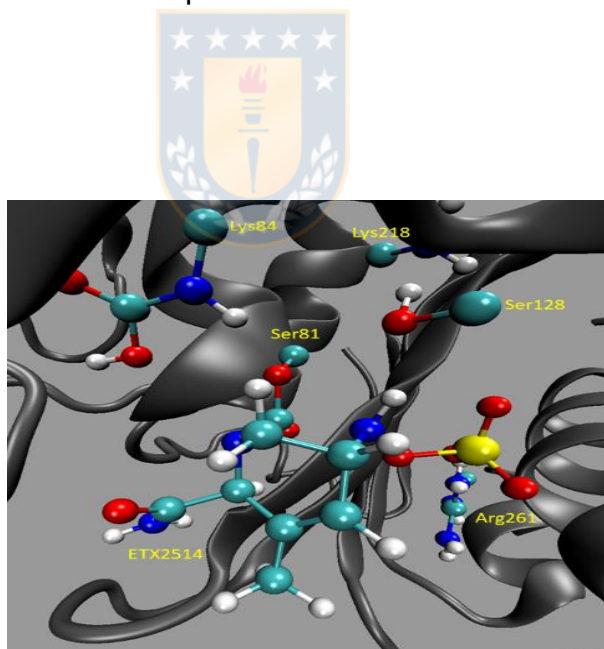
Anexo 22. Estructura 3D correspondiente al complejo de Michaelis CM-8.



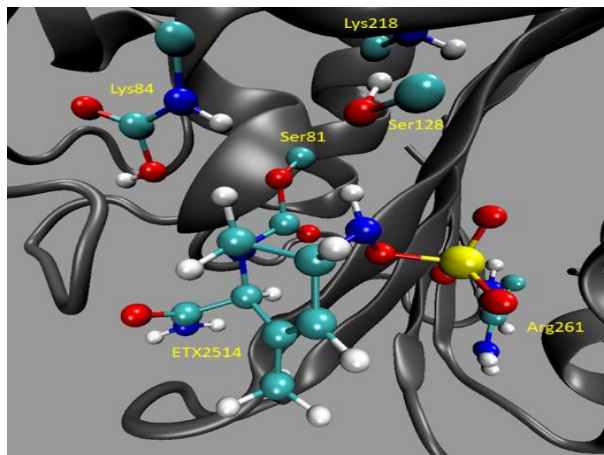
Anexo 23. Estructura 3D correspondiente al estado de transición ET-11.



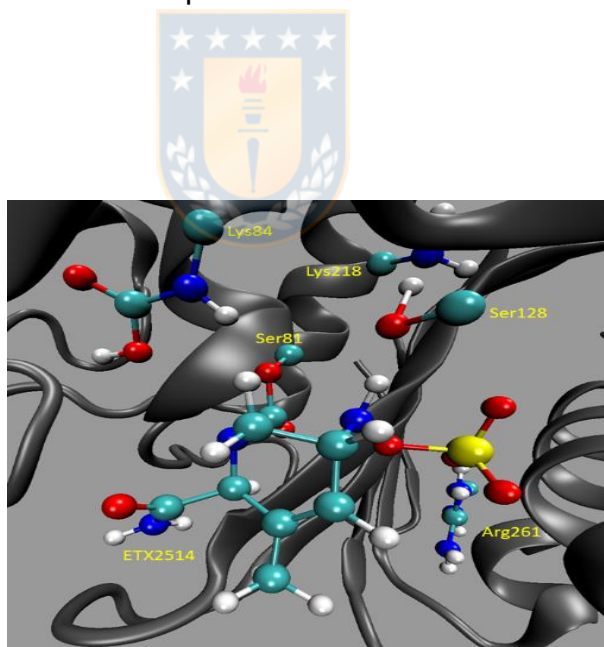
Anexo 24. Estructura 3D correspondiente al estado de transición ET-12.



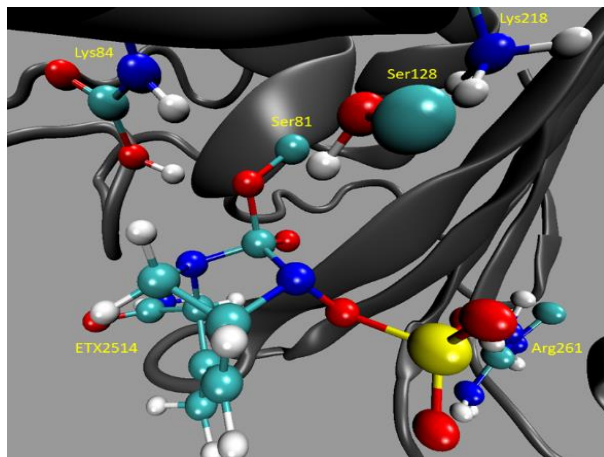
Anexo 25. Estructura 3D correspondiente al complejo de Michaelis CM-9.



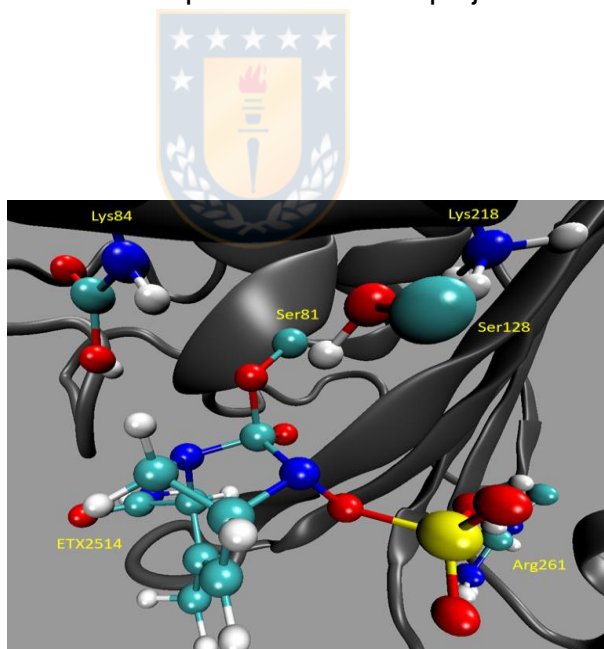
Anexo 26. Estructura 3D correspondiente al estado de transición ET-13.



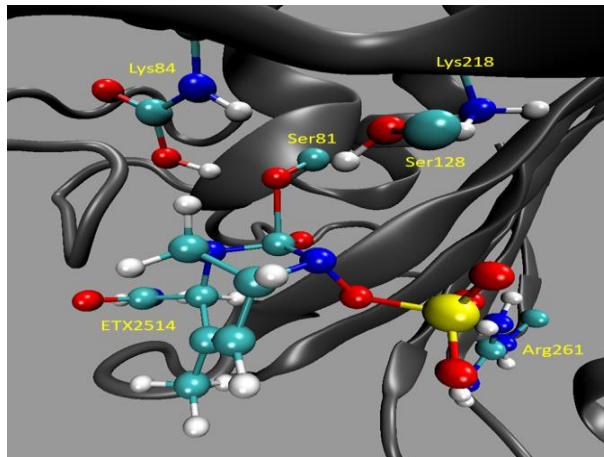
Anexo 27. Estructura 3D correspondiente al estado de transición ET-14.



Anexo 28. Estructura 3D correspondiente al complejo de Michaelis CM-10.



Anexo 29. Estructura 3D correspondiente al estado de transición ET-15.



Anexo 30. Estructura 3D correspondiente al estado de transición ET-16.



BIBLIOGRAFÍA

- Ambler, R. P., Baddiley, J., & Abraham, E. P. (1980). The structure of β -lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 289(1036), 321-331. doi:doi:10.1098/rstb.1980.0049
- Aminov, R. I. (2010). A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology*, 1. doi:Artn 134
- Antunes, N. T., & Fisher, J. F. (2014). Acquired Class D β -Lactamases. *Antibiotics*, 3(3), 398-434. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2079-6382/3/3/398>
- Barnes, M. D., Kumar, V., Bethel, C. R., Moussa, S. H., O'Donnell, J., Rutter, J. D., . . . Wright, G. D. (2019). Targeting Multidrug-Resistant *Acinetobacter* spp.: Sulbactam and the Diazabicyclooctenone β -Lactamase Inhibitor ETX2514 as a Novel Therapeutic Agent. *mBio*, 10(2), e00159-00119. doi:doi:10.1128/mBio.00159-19
- Bebrone, C., Lassaux, P., Vercheval, L., Sohier, J.-S., Jehaes, A., Sauvage, E., & Galleni, M. (2010). Current Challenges in Antimicrobial Chemotherapy. *Drugs*, 70(6), 651-679. doi:10.2165/11318430-000000000-00000
- Benning, M. M., Kuo, J. M., Raushel, F. M., & Holden, H. M. (1995). Three-dimensional structure of the binuclear metal center of phosphotriesterase. *Biochemistry*, 34(25), 7973-7978. doi:10.1021/bi00025a002
- Best, R. B., Zhu, X., Shim, J., Lopes, P. E. M., Mittal, J., Feig, M., & MacKerell, A. D. (2012). Optimization of the Additive CHARMM All-Atom Protein Force Field Targeting Improved Sampling of the Backbone ϕ , ψ and Side-Chain χ_1 and χ_2 Dihedral Angles. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 8(9), 3257-3273. doi:10.1021/ct300400x
- Biondi, S., Long, S., Panunzio, M., & L. Qin, W. (2011). Current Trends in β -Lactam Based β -Lactamases Inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, 18(27), 4223-4236. doi:http://dx.doi.org/10.2174/092986711797189655
- Bou, G., Oliver, A., & Martínez-Beltrán, J. (2000). OXA-24, a Novel Class D β -Lactamase with Carbapenemase Activity in an *Acinetobacter baumannii* Clinical Strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(6), 1556. doi:10.1128/AAC.44.6.1556-1561.2000

- Brem, J., Cain, R., Cahill, S., McDonough, M. A., Clifton, I. J., Jiménez-Castellanos, J.-C., . . . Schofield, C. J. (2016). Structural basis of metallo- β -lactamase, serine- β -lactamase and penicillin-binding protein inhibition by cyclic boronates. *Nature Communications*, 7(1), 12406. doi:10.1038/ncomms12406
- Brooks, B. R., Brooks, C. L., 3rd, Mackerell, A. D., Jr., Nilsson, L., Petrella, R. J., Roux, B., . . . Karplus, M. (2009). CHARMM: the biomolecular simulation program. *Journal of Computational Chemistry*, 30(10), 1545-1614. doi:10.1002/jcc.21287
- Bush, K. (2010). The coming of age of antibiotics: discovery and therapeutic value. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1213(1), 1-4. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05872.
- Bush, K. (2013). Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1277(1), 84-90. doi:10.1111/nyas.12023
- Bush, K., & Fisher, J. F. (2011). Epidemiological Expansion, Structural Studies, and Clinical Challenges of New β -Lactamases from Gram-Negative Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 65(1), 455-478. doi:10.1146/annurev-micro-090110-102911
- Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969. doi:10.1128/AAC.01009-09
- Bush, K., Jacoby, G. A., & Medeiros, A. A. (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(6), 1211. doi:10.1128/AAC.39.6.1211
- Cahill, S. T., Cain, R., Wang, D. Y., Lohans, C. T., Wareham, D. W., Oswin, H. P., . . . Brem, J. (2017). Cyclic Boronates Inhibit All Classes of β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(4), e02260-02216. doi:10.1128/AAC.02260-16
- Che, T., Bonomo, R. A., Shanmugam, S., Bethel, C. R., Pusztai-Carey, M., Buynak, J. D., & Carey, P. R. (2012). Carboxylation and Decarboxylation of Active Site Lys 84 Controls the Activity of OXA-24 β -Lactamase of *Acinetobacter baumannii*: Raman Crystallographic and Solution Evidence. *Journal of the American Chemical Society*, 134(27), 11206-11215. doi:10.1021/ja303168
- Coleman, K. (2011). Diazabicyclooctanes (DBOs): a potent new class of non- β -lactam β -lactamase inhibitors. *Current Opinion in Microbiology*, 14(5), 550-555. doi:https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.07.026
- Crowder, M. W., Spencer, J., & Vila, A. J. (2006). Metallo- β -lactamases: Novel Weaponry for Antibiotic Resistance in Bacteria. *Accounts of Chemical Research*, 39(10), 721-728. doi:10.1021/ar0400241

- Darden, T., York, D., & Pedersen, L. (1993). Particle mesh Ewald: An N·log(N) method for Ewald sums in large systems. *The Journal of Chemical Physics*, *98*(12), 10089-10092. doi:10.1063/1.464397
- Demain, A. L., & Elander, R. P. (1999). The β -lactam antibiotics: past, present, and future. *Antonie van Leeuwenhoek*, *75*(1), 5-19. doi:10.1023/A:1001738823146
- Drawz, S. M., & Bonomo, R. A. (2010). Three Decades of β -Lactamase Inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*, *23*(1), 160-201. doi:10.1128/cmr.00037-09
- Drawz, S. M., Papp-Wallace, K. M., & Bonomo, R. A. (2014). New β -Lactamase Inhibitors: a Therapeutic Renaissance in an MDR World. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *58*(4), 1835. doi:10.1128/AAC.00826-1
- Durand-Réville, T. F., Guler, S., Comita-Prevoir, J., Chen, B., Bifulco, N., Huynh, H., . . . Miller, A. A. (2017). ETX2514 is a broad-spectrum β -lactamase inhibitor for the treatment of drug-resistant Gram-negative bacteria including *Acinetobacter baumannii*. *Nature Microbiology*, *2*, 17104. doi:10.1038/nmicrobiol.2017.104
- Ehmann, D. E., Jahić, H., Ross, P. L., Gu, R.-F., Hu, J., Kern, G., . . . Fisher, S. L. (2012). Avibactam is a covalent, reversible, non- β -lactam β -lactamase inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(29), 11663. doi:10.1073/pnas.1205073109
- Evans, B. A., & Amyes, S. G. B. (2014). OXA β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, *27*(2), 241-263. doi:10.1128/CMR.00117-13
- Fisher, J. F., Meroueh, S. O., & Mobashery, S. (2005). Bacterial Resistance to β -Lactam Antibiotics: Compelling Opportunism, Compelling Opportunity. *Chemical Reviews*, *105*(2), 395-424. doi:10.1021/cr030102i
- Fleming, A. (1929). On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *British journal of experimental pathology*, *10*(3), 226-236. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2048009/>
- Ghuysen, J.-M. (1991). SERINE β -LACTAMASES AND PENICILLIN-BINDING PROTEINS. *Annual Review of Microbiology*, *45*(1), 37-67. doi:10.1146/annurev.mi.45.100191.000345
- Golemi, D., Maveyraud, L., Vakulenko, S., Samama, J.-P., & Mobashery, S. (2001). Critical involvement of a carbamylated lysine in catalytic function of class D β -lactamases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(25), 14280. doi:10.1073/pnas.241442898
- Gordon, N. C., & Wareham, D. W. (2010). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *35*(3), 219-226. doi:https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.10.024

- Hall, B. G., & Barlow, M. (2005). Revised Ambler classification of β -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *55*(6), 1050-1051. doi:10.1093/jac/dki130
- Hamrick, J. C., Docquier, J.-D., Uehara, T., Myers, C. L., Six, D. A., Chatwin, C. L., . . . Daigle, D. M. (2020). VNRX-5133 (Taniborbactam), a Broad-Spectrum Inhibitor of Serine- and Metallo- β -Lactamases, Restores Activity of Cefepime in Enterobacterales and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *64*(3), e01963-01919. doi:10.1128/AAC.01963-19
- Harrigan, M. P., Sultan, M. M., Hernández, C. X., Husic, B. E., Eastman, P., Schwantes, C. R., . . . Pande, V. S. (2017). MSMBuilder: Statistical Models for Biomolecular Dynamics. *Biophysical Journal*, *112*(1), 10-15. doi:https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.10.042
- Hecker, S. J., Reddy, K. R., Lomovskaya, O., Griffith, D. C., Rubio-Aparicio, D., Nelson, K., . . . Dudley, M. N. (2020). Discovery of Cyclic Boronic Acid QPX7728, an Ultrabroad-Spectrum Inhibitor of Serine and Metallo- β -lactamases. *Journal of Medicinal Chemistry*, *63*(14), 7491-7507. doi:10.1021/acs.jmedchem.9b01976
- Hecker, S. J., Reddy, K. R., Totrov, M., Hirst, G. C., Lomovskaya, O., Griffith, D. C., . . . Dudley, M. N. (2015). Discovery of a Cyclic Boronic Acid β -Lactamase Inhibitor (RPX7009) with Utility vs Class A Serine Carbapenemases. *Journal of Medicinal Chemistry*, *58*(9), 3682-3692. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b00127
- Hermann, J. C., Hensen, C., Ridder, L., Mulholland, A. J., & Höltje, H.-D. (2005). Mechanisms of Antibiotic Resistance: QM/MM Modeling of the Acylation Reaction of a Class A β -Lactamase with Benzylpenicillin. *Journal of the American Chemical Society*, *127*(12), 4454-4465. doi:10.1021/ja044210d
- Hermann, J. C., Ridder, L., Mulholland, A. J., & Höltje, H.-D. (2003). Identification of Glu166 as the General Base in the Acylation Reaction of Class A β -Lactamases through QM/MM Modeling. *Journal of the American Chemical Society*, *125*(32), 9590-9591. doi:10.1021/ja034434g
- Higgins, P. G., Dammhayn, C., Hackel, M., & Seifert, H. (2009). Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *65*(2), 233-238. doi:10.1093/jac/dkp428
- Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, *14*(1), 33-38. doi:https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-
- Jabri, E., Carr, M. B., Hausinger, R. P., & Karplus, P. A. (1995). The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes*. *Science*, *268*(5213), 998. doi:10.1126/science.775439
- Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., & Klein, M. L. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics*, *79*(2), 926-935. doi:10.1063/1.445869

- King, D. T., King, A. M., Lal, S. M., Wright, G. D., & Strynadka, N. C. J. (2015). Molecular Mechanism of Avibactam-Mediated β -Lactamase Inhibition. *ACS Infectious Diseases*, 1(4), 175-184. doi:10.1021/acsinfectdis.5b00007
- Krishnan, N. P., Nguyen, N. Q., Papp-Wallace, K. M., Bonomo, R. A., & van den Akker, F. (2015). Inhibition of Klebsiella β -Lactamases (SHV-1 and KPC-2) by Avibactam: A Structural Study. *Plos One*, 10(9), e0136813. doi:10.1371/journal.pone.013681
- Lahiri, S. D., Mangani, S., Durand-Reville, T., Benvenuti, M., De Luca, F., Sanyal, G., & Docquier, J.-D. (2013). Structural Insight into Potent Broad-Spectrum Inhibition with Reversible Recyclization Mechanism: Avibactam in Complex with CTX-M-15 and Pseudomonas aeruginosa AmpC β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(6), 2496-2505. doi:10.1128/aac.02247-12
- Lahiri, S. D., Mangani, S., Jahić, H., Benvenuti, M., Durand-Reville, T. F., De Luca, F., . . . Docquier, J.-D. (2015). Molecular Basis of Selective Inhibition and Slow Reversibility of Avibactam against Class D Carbapenemases: A Structure-Guided Study of OXA-24 and OXA-48. *ACS Chemical Biology*, 10(2), 591-600. doi:10.1021/cb500703p
- Leonard, D. A., Bonomo, R. A., & Powers, R. A. (2013). Class D β -Lactamases: A Reappraisal after Five Decades. *Accounts of Chemical Research*, 46(11), 2407-2415. doi:10.1021/ar300327a
- Li, J., Cross, J. B., Vreven, T., Meroueh, S. O., Mobashery, S., & Schlegel, H. B. (2005). Lysine carboxylation in proteins: OXA-10 β -lactamase. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 61(2), 246-257. doi:10.1002/prot.20596
- Li, R., Liao, J.-M., Gu, C.-R., Wang, Y.-T., & Chen, C.-L. (2011). Theoretical Investigation on Reaction of Sulbactam with Wild-Type SHV-1 β -Lactamase: Acylation, Tautomerization, and Deacylation. *The Journal of Physical Chemistry B*, 115(34), 10298-10310. doi:10.1021/jp111572v
- Lizana, I., & Delgado, E. J. (2018). Theoretical insights on the inhibition mechanism of a class A Serine Hydrolase by avibactam. *Journal of Computational Chemistry*, 39(24), 1943-1948. doi:10.1002/jcc.25340
- Lizana, I., & Delgado, E. J. (2019). Molecular Insights on the Release of Avibactam from the Acyl-Enzyme Complex. *Biophysical Journal*, 116(9), 1650-1657. doi:10.1016/j.bpj.2019.03.027
- Maveyraud, L., Golemi, D., Kotra, L. P., Tranier, S., Vakulenko, S., Mobashery, S., & Samama, J.-P. (2000). Insights into Class D β -Lactamases Are Revealed by the Crystal Structure of the OXA10 Enzyme from *Pseudomonas aeruginosa*. *Structure*, 8(12), 1289-1298. doi:10.1016/S0969-2126(00)00534-7
- McGibbon, R. T., Beauchamp, K. A., Harrigan, M. P., Klein, C., Swails, J. M., Hernández, C. X., . . . Pande, V. S. (2015). MDTraj: A Modern Open Library for the Analysis of Molecular

- Dynamics Trajectories. *Biophysical Journal*, 109(8), 1528-1532. doi:10.1016/j.bpj.2015.08.015
- Meroueh, S. O., Fisher, J. F., Schlegel, H. B., & Mobashery, S. (2005). Ab Initio QM/MM Study of Class A β -Lactamase Acylation: Dual Participation of Glu166 and Lys73 in a Concerted Base Promotion of Ser70. *Journal of the American Chemical Society*, 127(44), 15397-15407. doi:10.1021/ja051592u
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum*, 4(2), 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015. doi:10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015
- Nichols, D. A., Jaishankar, P., Larson, W., Smith, E., Liu, G., Beyrouthy, R., . . . Chen, Y. (2012). Structure-Based Design of Potent and Ligand-Efficient Inhibitors of CTX-M Class A beta-Lactamase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(5), 2163 - 2172. doi:10.1021/jm2014138
- Nosé, S. (1984). A unified formulation of the constant temperature molecular dynamics methods. *The Journal of Chemical Physics*, 81(1), 511-519. doi:10.1063/1.447334
- Olsson, M. H. M., Søndergaard, C. R., Rostkowski, M., & Jensen, J. H. (2011). PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa Predictions. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 7(2), 525-537. doi:10.1021/ct100578z
- Paetzel, M., Danel, F., de Castro, L., Mosimann, S. C., Page, M. G. P., & Strynadka, N. C. J. (2000). Crystal structure of the class D β -lactamase OXA-10. *Nature Structural Biology*, 7(10), 918-925. doi:10.1038/79688
- Payne, D. J., Cramp, R., Winstanley, D. J., & Knowles, D. J. (1994). Comparative activities of clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam against clinically important beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(4), 767-772. doi:10.1128/aac.38.4.76
- Peng, J.-h., Wang, W., Yu, Y.-q., Gu, H.-l., & Huang, X. (2018). Clustering algorithms to analyze molecular dynamics simulation trajectories for complex chemical and biological systems. *Chinese Journal of Chemical Physics*, 31(4), 404-420. doi:10.1063/1674-0068/31/cjcp1806147
- Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., . . . Schulten, K. (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16), 1781-1802. doi:10.1002/jcc.20289
- Poirel, L., Naas, T., & Nordmann, P. (2010). Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(1), 24. doi:10.1128/AAC.01512-08

- Pratt, R. F., & McLeish, M. J. (2010). Structural Relationship between the Active Sites of β -Lactam-Recognizing and Amidase Signature Enzymes: Convergent Evolution? *Biochemistry*, *49*(45), 9688-9697. doi:10.1021/bi1012222
- Ryckaert, J.-P., Ciccotti, G., & Berendsen, H. J. C. (1977). Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *Journal of Computational Physics*, *23*(3), 327-341. doi:https://doi.org/10.1016/0021-9991(77)90098-5
- Santillana, E., Beceiro, A., Bou, G., & Romero, A. (2007). Crystal structure of the carbapenemase OXA-24 reveals insights into the mechanism of carbapenem hydrolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(13), 5354. doi:10.1073/pnas.0607557104
- Schneider, K. D., Bethel, C. R., Distler, A. M., Hujer, A. M., Bonomo, R. A., & Leonard, D. A. (2009). Mutation of the Active Site Carboxy-Lysine (K70) of OXA-1 β -Lactamase Results in a Deacylation-Deficient Enzyme. *Biochemistry*, *48*(26), 6136-6145. doi:10.1021/bi900448u
- Sgrignani, J., Grazioso, G., De Amici, M., & Colombo, G. (2014). Inactivation of TEM-1 by Avibactam (NXL-104): Insights from Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Metadynamics Simulations. *Biochemistry*, *53*(31), 5174-5185. doi:10.1021/bi500589x
- Shao, Y., Gan, Z., Epifanovsky, E., Gilbert, A. T. B., Wormit, M., Kussmann, J., . . . Head-Gordon, M. (2015). Advances in molecular quantum chemistry contained in the Q-Chem 4 program package. *Molecular Physics*, *113*(2), 184-215. doi:10.1080/00268976.2014.952696
- Shapiro, A. B., Gao, N., Jahić, H., Carter, N. M., Chen, A., & Miller, A. A. (2017). Reversibility of Covalent, Broad-Spectrum Serine β -Lactamase Inhibition by the Diazabicyclooctenone ETX2514. *ACS Infectious Diseases*, *3*(11), 833-844. doi:10.1021/acsinfectdis.7b00113
- Vanommeslaeghe, K., Hatcher, E., Acharya, C., Kundu, S., Zhong, S., Shim, J., . . . Mackerell, A. D., Jr. (2010). CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *Journal of Computational Chemistry*, *31*(4), 671-690. doi:10.1002/jcc.21367
- Walther-Rasmussen, J., & Høiby, N. (2006). OXA-type carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *57*(3), 373-383. doi:10.1093/jac/dki482
- Warshel, A., & Levitt, M. (1976). Theoretical studies of enzymic reactions: Dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme. *Journal of molecular biology*, *103*(2), 227-249. doi:https://doi.org/10.1016/0022-2836(76)90311-9

- Winkler, M. L., Papp-Wallace, K. M., Taracila, M. A., & Bonomo, R. A. (2015). Avibactam and Inhibitor-Resistant SHV β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(7), 3700. doi:10.1128/AAC.04405-14
- Wright, G. D. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(10), 1451-1470. doi:10.1016/j.addr.2005.04.002
- Zavascki, A. P., Carvalhaes, C. G., Picão, R. C., & Gales, A. C. (2010). Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 8(1), 71-93. doi:10.1586/eri.09.108

