

УДК 577.151.45; 577.152.343

Изучение возможностей использования 2-галоген-замещенных ацетамидов в качестве ацильных доноров в реакциях, катализируемых пенициллинацилазами

Н. В. Панин¹, М. В. Никулин^{1,2}, Е. С. Тюрин², В. В. Дробот^{1,2}, И. А. Морозова^{1,2}, В. К. Швядас^{1*}¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

*E-mail: vytas@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 23.03.2018

Принята к печати 26.04.2018

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-2-77-81

РЕФЕРАТ Исследованы возможности использования амидов галоген-замещенных уксусных кислот в качестве ацильных доноров в реакциях, катализируемых пенициллинацилазами. Обнаружена способность соединений этой группы инактивировать ферменты в ходе каталитического превращения. Наиболее сильное инактивирующее действие проявляли йодацетамид и бромацетамид, однако негативное влияние этой побочной активности можно минимизировать при понижении температуры, когда каталитическая активность пенициллинацилаз по отношению к этим ацильным донорам остается достаточно высокой, а вклад инактивации фермента в ходе реакции становится менее значительным. Каталитическая активность пенициллинацилазы из *Alcaligenes faecalis* по отношению к 2-галогенацетамидам существенно (в 5–8 раз) превышала активность пенициллинацилазы из *Escherichia coli*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА 2-галогенацетамиды, инактивация в ходе реакции, пенициллинацилазы, субстратная специфичность.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; NIPAB – *m*-карбоксит-нитроанилид фенилуксусной кислоты; ФУЖ – фенилуксусная кислота.

ВВЕДЕНИЕ

Бета-лактамы являются наиболее широко используемыми антибактериальными препаратами, к преимуществам которых можно отнести высокую клиническую эффективность и низкую токсичность. Важное значение имеет также доступность антибиотиков этого класса, что обусловлено, в частности, масштабным использованием биокаталитических технологий для их получения. Однако проблемы, связанные с развитием резистентности патогенов, ограничивают срок использования разработанных препаратов и делают необходимым поиск новых производных. Одно из ключевых направлений создания более эффективных, так называемых полусинтетических аналогов, – введение различных N-ацильных заместителей, ковалентно связанных с бета-лактамым ядром. Успешность этого процесса прямо связана с до-

ступностью, эффективностью и легкостью включения нового N-ацильного радикала в структуру целевого соединения. Важную роль в решении этого вопроса сыграла способность пенициллинацилаз катализировать эффективный перенос ацильных групп, в первую очередь, остатков D-фенилглицина и *n*-окси-D-фенилглицина, от их амидов и сложных эфиров на ядра пенициллинов и цефалоспоринов. Детальное исследование весьма сложной кинетики реакций ферментативного ацильного переноса в водной среде на добавленные нуклеофилы позволило выявить основные факторы, от которых зависит эффективность процесса [1–3], и разработать методы биокаталитического синтеза ампициллина, амоксициллина, цефалексина, цефаклора, цефоницида, цефпрозила в водной среде без применения экологически опасных органических растворителей [4–11]. Дальнейшее

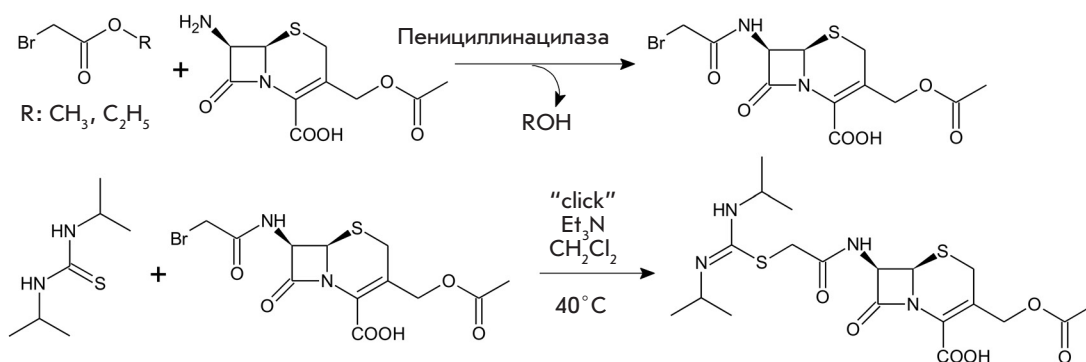


Рис. 1. Синтез антибиотика цефатамида через активированное N-бромацетильное производное 7-аминоцефалоспоровой кислоты

развитие биокаталитических методов в значительной степени зависит от субстратной специфичности ферментов, способных катализировать перенос других ацильных групп на ядра бета-лактамовых соединений. В этой связи представляет интерес сочетание возможностей биокатализа и методов клик-химии, когда на первой стадии при помощи фермента синтезируется бета-лактамовое соединение с N-ацильным радикалом, содержащим активированную группу, которая затем может служить основой для получения разнообразных новых производных. В качестве примера для иллюстрации подобного подхода можно привести синтез цефатамида – антибиотика, популярного на китайском фармацевтическом рынке. В данном случае активированная N-ацильная группа представляет собой остаток бромуксусной кислоты, после введения которой и последующего взаимодействия с N,N'-диизопропилтиомочевинной получается целевой антибиотик (рис. 1) [12, 13].

Варьируя структуру вводимого бокового радикала к ядру антибиотика, природу активированных групп и структуру химического соединения на завершающей стадии, можно разработать достаточно универсальный путь получения широкого спектра потенциальных антибактериальных препаратов. Весьма вероятной проблемой при разработке такого подхода могут быть следующие осложняющие факторы: модификация (инактивация) фермента при взаимодействии с активированными группами исходных субстратов и получаемых продуктов, спонтанное разрушение активированных групп в условиях проведения биокаталитической стадии, поиск подходящих ферментов, обладающих необходимой каталитической активностью в отношении синтетических неприродных субстратов.

Цель данной работы состояла в изучении возможностей использования производных галоген-замещенных уксусных кислот в качестве потенциальных ацильных доноров в реакциях, катализируемых пенициллинацилазами из *Escherichia coli* и *Alcaligenes faecalis*, характеристике их реакционной способности

как субстратов в зависимости от природы активирующей группы, так и при инактивации ферментов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Определение активности фермента по отношению к 2-галогенацетидам

Типичный эксперимент проводили следующим образом: 2-галогенацетамид (200 мкмоль) растворяли в 0.05 М фосфатном буфере, термостатировали при нужной температуре, доводили pH до 7.5 и начинали реакцию добавлением аликвоты исходного концентрированного раствора фермента, создавая концентрацию активных центров пенициллинацилазы в реакционной смеси 25 мкМ. Общий объем реакционной смеси составлял 800 мкл, концентрация субстрата 0.25 М. Реакцию проводили в термостатируемой ячейке, поддерживая постоянные значения температуры и pH. Через определенные промежутки времени отбирали пробы объемом 20 мкл и смешивали их с 980 мкл смеси ацетонитрила с дистиллированной водой (соотношение 2 : 1). Пробы центрифугировали в течение 5 мин при 13000 об/мин для удаления осадка белка и анализировали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Условия анализа: скорость потока 0.7 мл/мин, элюент – ацетонитрил/вода (25 об.% ацетонитрила, 0.005 М фосфатный буфер pH 3), детектирование 210 нм, колонка Kromasil Eternity 5-C18 4.6×250 мм, объем наносимой пробы 20 мкл. Степень разделения R_s соответствующих амида и кислоты во всех случаях превышала 1.5. Времена удержания компонентов составляли: хлорацетамид 4.16 мин, хлоруксусная кислота 4.34 мин, бромацетамид 4.27 мин, бромуксусная кислота 4.73 мин, йодацетамид 4.31 мин, йодуксусная кислота 5.92 мин.

Исследование зависимости скорости превращения хромогенного субстрата от концентрации 2-хлорацетамида

Ингибирующее влияние хлорацетамида на каталитическую активность пенициллинацилазы изучали

с использованием высокопроизводительного микропланшетного ридера CLARIOstar (BMG LABTECH). Типичный эксперимент выглядел следующим образом: в 96-луночном планшете в ячейки по вертикальным столбцам добавляли аликвоты 1 мМ раствора хромогенного субстрата NIPAB (семь столбцов различных концентраций NIPAB в диапазоне от 0.01 до 0.3 мМ; концентрация в рядах идентична), в ячейки по горизонтальным рядам – аликвоты 700 мМ раствора ингибитора (восемь рядов различных концентраций хлорацетамида в диапазоне от 0 до 400 мМ; концентрация в столбцах идентична), объем реакционной смеси доводили до 216 мкл, добавляя необходимый объем 0.1 М калий-фосфатного буфера pH 7.5. В этом же буфере были приготовлены растворы всех реагентов. Реакцию начинали добавлением 20 мкл раствора фермента при помощи мультисканального дозатора, создавая концентрацию активных центров пенициллинацилазы в каждой ячейке 10 нМ. Значение температуры поддерживали на уровне 25 °С. Активность определяли по накоплению хромофора – *n*-нитро-*m*-карбоксиванилина ($\lambda_{\max} = 400$ нм) в режиме работы прибора Absorbance/PlateMode при повышенной точности (количество вспышек на ячейку 30, время цикла 6 с, количество циклов 74) с периодическим перемешиванием (500 об/мин). Во избежание случайных ошибок, вызванных образованием локальных пузырьков воздуха, измерение оптической плотности проводили в режиме статистического усреднения (функция well scan, усреднение по спирали). Поточковую регрессионную обработку данных проводили в программе MARS Data Analysis Software. Начальные скорости определяли по усредненному значению производной в пределах 10% конверсии NIPAB. Для определения константы ингибирования экспериментальные результаты анализировали в координатах Диксона.

Изучение инактивации пенициллинацилазы под действием 2-галогенацетамидов

Кинетику инактивации пенициллинацилазы изучали с использованием высокопроизводительного микропланшетного ридера CLARIOstar (BMG LABTECH). Типичный эксперимент выглядел следующим образом: в 96-луночном планшете в ячейки по горизонтальным рядам добавляли аликвоты 1 М раствора галогенацетамида (восемь рядов различных концентраций в диапазоне от 0 до 470 мМ; концентрация во всех 12 столбцах идентичная). Левую половину планшета использовали для изучения инактивации фермента под действием галогенацетамида, правую – для изучения влияния на процесс инактивации фенолуксусной кислоты (ФУК) – высокоспецифичного ингибитора пенициллинацилазы;

концентрация ФУК во всех ячейках правой половины планшета составляла 0.1 мМ. Объем реакционной смеси в каждой ячейке доводили до 196 мкл, добавляя необходимый объем 0.1 М калий-фосфатного буфера pH 7.5. При этом создавали по шесть идентичных по составу столбцов слева (без ФУК) и справа (с ФУК). Реакцию инактивации начинали одновременно в первом и седьмом столбцах добавлением 20 мкл исходного раствора фермента, чтобы концентрация активных центров пенициллинацилазы в каждой ячейке составляла 10 нМ. Порции исходного раствора фермента последовательно добавляли в каждый следующий столбец многоканальным дозатором через каждые 10 мин инкубирования. Значение температуры поддерживали на уровне 25 °С. Для определения остаточной активности фермента через 50 мин после начала первой инкубации во все ячейки одновременно добавляли 24 мкл 1 мМ раствора NIPAB, чтобы концентрация хромогенного субстрата в каждой ячейке составляла 0.1 мМ. Таким образом, время инкубации фермента с ингибитором в 1-м и 7-м столбцах составило 50 мин, в 6-м и 12-м столбцах – 1 мин. Остаточную активность сканировали как описано выше. Инактивация фермента протекала в соответствии с кинетикой реакции первого порядка, при анализе экспериментальных данных определяли константу инактивации фермента.

Кинетику инактивации пенициллинацилазы при взаимодействии с 2-галогенацетамидами изучали также с использованием другой методики при разных температурах (4, 15 и 25 °С) путем инкубирования раствора фермента (концентрация 3 нМ) в присутствии 100 мМ 2-галогенацетамида в 10 мМ калий-фосфатном буфере pH 7.5, содержащем 0.1 М KCl. Аликвоты реакционной смеси отбирали в определенные моменты времени и добавляли в термостатируемую кювету (25 °С) с раствором NIPAB (концентрация хромогенного субстрата 0.1 мМ в 10 мМ калий-фосфатном буфере pH 7.5, содержащем 0.1 М KCl). Остаточную активность измеряли на спектрофотометре Shimadzu UV 1800 при 400 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор производных галоген-замещенных уксусных кислот в качестве потенциальных субстратов для исследования

При выборе субстрата для ферментативной реакции следует учитывать такие его свойства, как стабильность, растворимость и удобство применения, что особенно важно при препаративном использовании ацильных доноров. Решающими факторами при выборе амидов галоген-замещенных уксусных кислот для исследования в качестве потенциальных

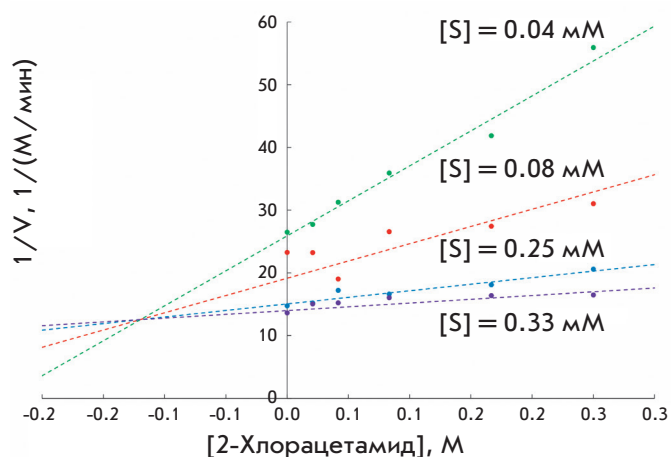


Рис. 2. Зависимость начальных скоростей гидролиза NIPAB под действием пенициллинацилазы из *E. coli* от концентрации хромогенного субстрата в присутствии различных концентраций 2-хлорацетамида. Данные представлены в координатах Диксона. Условия проведения эксперимента: 25°C, 0.1 М калий-фосфатный буфер pH 7.5

субстратов пенициллинацилаз были: более высокая растворимость и стабильность амидов по сравнению со сложными эфирами и, самое главное, лакриматорное действие сложных эфиров. Так, например, пары этилового эфира бромуксусной кислоты чрезвычайно раздражающе действуют на слизистую оболочку глаз; препарат необходимо хранить в герметично закрытых сосудах и применять в открытой посуде только в хорошем вытяжном шкафу [14].

Изучение способности амида 2-галогенуксусной кислоты связываться в активном центре пенициллинацилаз

Возможности потенциальных субстратов связываться в активном центре пенициллинацилазы изучали по их способности ингибировать активность фермента по отношению к удобному хромогенному субстрату. Типичный пример по влиянию 2-хлорацетамида на каталитическую активность пенициллинацилазы из *E. coli* показан на рис. 2. При исследовании зависимости скорости превращения хромогенного субстрата NIPAB от концентрации ингибитора (2-хлорацетамида) было обнаружено конкурентное ингибирование и определено значение константы ингибирования 0.12 ± 0.02 М (рис. 2). Показано, что амиды 2-галогензамещенных уксусных кислот обладают значительно более низким (примерно на 4 порядка) сродством к активному центру пенициллинацилаз по сравне-

нию со специфическими субстратами этого фермента. Тем не менее, благодаря хорошей растворимости этих субстратов можно использовать их высококонцентрированные растворы и рассчитывать на проведение реакции в условиях максимальной скорости ферментативной реакции.

Изучение реакционной способности потенциальных ацильных доноров

При исследовании взаимодействия амидов галоген-замещенных уксусных кислот с пенициллинацилазами было обнаружено, что гидролиз этих субстратов сопровождается инактивацией ферментов, наиболее ярко выраженной в случае йодацетамида и бромацетамида. Инактивация обоих ферментов была обусловлена связыванием галоген-замещенных ацетамидов в активном центре пенициллинацилаз и сопряжена с каталитической активностью, поскольку добавление фенилуксусной кислоты – известного конкурентного ингибитора пенициллинацилаз, связывающегося в активном центре, подавляло инактивацию. Подобную инактивацию пенициллинацилазы из *E. coli* в ходе реакции ранее наблюдали при препаративном ферментативном синтезе пептидов D-фенилглицина [15]. Потеря активности фермента в ходе превращения амидов галоген-замещенных уксусных кислот протекала согласно кинетике реакции первого порядка, значения соответствующих констант скоростей инактивации представлены в табл. 1.

Инактивация фермента под действием йодацетамида в условиях pH-оптимума действия пенициллинацилазы из *E. coli* при 25°C протекала настолько быстро, что гидролиз субстрата успевал пройти всего на несколько процентов. В случае бромацетамида инактивация была медленнее, однако также делала практически невозможным использование такого ацильного донора в препаративном синтезе в этих условиях. Снизить скорость инактивации фермента и негативное влияние этого процесса на катали-

Таблица 1. Значения констант скоростей инактивации пенициллинацилазы из *Escherichia coli* при взаимодействии с 2-галогенацетамидами

Субстрат	$k_{in} \cdot 10^4, \text{мин}^{-1}$
Хлорацетамид	1.1 ± 0.1
Бромацетамид	47 ± 2
Йодацетамид	364 ± 34

Примечание. Условия проведения эксперимента: 25°C, 0.1 М калий-фосфатный буфер pH 7.5, 0.1 М 2-галогенацетамида.

Таблица 2. Специфичность пенициллинацилаз в реакциях гидролиза 2-галогенацетамидов

Субстрат	Фермент	Пенициллин-ацилаза из <i>E. coli</i>	Пенициллин-ацилаза из <i>A. faecalis</i>
	V, мкМ/с		
Хлорацетамид (25°C)		7.5±1	63±5
Бромацетамид (4°C)		10.0±1.3	58±3
Йодацетамид (4°C)		9.3±1.3	45±2

Примечание. Условия проведения эксперимента: 0.05 М фосфатный буфер pH 7.5, с хлорацетамидом при 25°C, с бром- и йодацетамидом – при 4°C, концентрация пенициллинацилазы 25 мкМ.

тическое превращение ацильных доноров под действием пенициллинацилаз удалось при понижении температуры (рис. 3). Так, при 4°C потеря активности фермента при превращении бромацетамида снижается более чем на порядок, что позволяет использовать это соединение в качестве ацильного донора в реакциях, катализируемых пенициллинацилазами. При этом следует отметить, что каталитическая активность пенициллинацилазы из *A. faecalis* по отношению к этой группе субстратов была существенно выше, чем у пенициллинацилазы из *E. coli* (см. табл. 2).

ВЫВОДЫ

Изучение возможностей использования амидов 2-галоген-замещенных уксусных кислот в качестве ацильных доноров в реакциях, катализируемых пенициллинацилазами, выявило способность соединений этой группы инактивировать фермент в ходе каталитического превращения. Наиболее эффективное инактивирующее действие проявляли йодацетамид

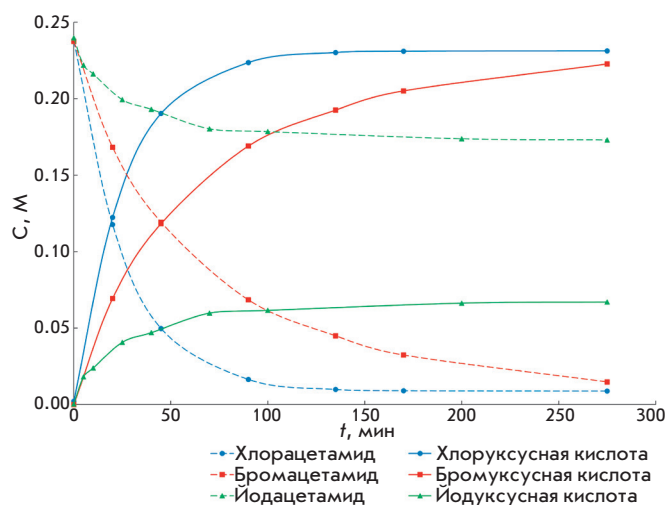


Рис. 3. Кинетика накопления продуктов реакции (сплошные кривые) и расходования исходных субстратов (пунктирные кривые) при гидролизе 2-галогенацетамидов под действием пенициллинацилазы из *Alcaligenes faecalis*. Реакцию с хлорацетамидом проводили при 25°C, с бром- и йодацетамидом – при 4°C. Условия проведения экспериментов указаны в подписи к табл. 2

и бромацетамид, однако негативное влияние побочной активности можно минимизировать при понижении температуры, когда каталитическая активность пенициллинацилаз к этим ацильным донорам остается достаточно высокой, а вклад инактивации фермента в ходе реакции становится незначительным. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке
Российского научного фонда
(грант № 17-74-10255).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Svedas V.K., Margolin A.L., Borisov I.L., Berezin I.V. // Enzyme. Microb. Technol. 1980. V. 2. P. 313–317.
- Gololobov M.Y., Borisov I.L., Svedas V.K. // J. Theor. Biol. 1989. V. 140. P. 193–104.
- Юшко М.И., Швядас В.К. // Биохимия. 2000. Т. 65. № 12. С. 1624–1633.
- Gonçalves L.R.B., Sousa R.Jr., Fernandez-Lafuente R., Guisan J.M., Giordano R.L.C., Giordano R.C. // Biotechnol. Bioeng. 2002. V. 80. № 6. P. 622–631.
- Youshko M.I., Švedas V.K. // Adv. Synth. Catal. 2002. V. 344. № 8. P. 894–898.
- Youshko M.I., van Langen L.M., De Vroom E., van Rantwijk F., Sheldon R.A., Svedas V.K. // Biotechnol. Bioeng. 2002. V. 78. № 5. P. 589–593.
- Youshko M.I., Moody H.M., Bukhanov A.L., Boosten W.H.J., Svedas V.K. // Biotechnol. Bioeng. 2004. V. 85. № 3. P. 323–329.
- Zhang Y.-W., Wei D.-Z. // Preparative Biochem. Biotechnol. 2008. V. 38. P. 129–138.
- Terreni M., Tchamkam J.G., Sarnataro U., Rocchietti S., Fernandez-Lafuente R., Joser M., Guisan J.M. // Adv. Synth. Catal. 2005. V. 347. P. 121–128.
- Feng S.-X., Liang S.-Z., Lou W.-Y. // Biocatal. Biotransform. 2008. V. 26. № 4. P. 321–332.
- Bernardino S.M., Fernandes P., Fonseca L.P. // Biotechnol. Bioeng. 2010. V. 107. № 5. P. 753–762.
- Wang H.L., Li L.W. // Chin. J. Mod. Appl. Pharm. 2010. V. 27. № 2. P. 126–127.
- Zhang X.-L., Zong M.-H., Li N. // Bioresour. Bioprocess. 2016. V. 3. № 49. P. 1–8.
- Справочник химика. Т. 2. Л.-М.: Химия, 1964. С. 1024–1025.
- Shcherbakova T.A., Korennykh A.V., van Langen L.M., Sheldon R.A., Švedas V.K. // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2004. V. 31. P. 63–65.