

УДК 577.151.35: 577.151.45

# Специфичность пенициллинацилаз в реакции снятия защитной группы в N-бензилоксикарбонильных производных аминокислот

И. А. Морозова<sup>1</sup>, Д. Ф. Гуранда<sup>1</sup>, Н. В. Панин<sup>1,2</sup>, В. К. Швядас<sup>1,2,3\*</sup><sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Москва, 119991 Россия<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский вычислительный центр, Москва, 119991 Россия<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, 119991 Россия

\*E-mail: vyfas@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 02.02.2023

Принята в печать 20.02.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.13703

**РЕФЕРАТ** Изменение структуры N-ацильной группы в производных аминокислот существенным образом влияет как на узнавание, так и на активность пенициллинацилаз в этом ряду субстратов. Тем не менее, как пенициллинацилаза из *Alcaligenes faecalis*, так и пенициллинацилаза из *Escherichia coli* способны снимать N-бензилоксикарбонильную защитную группу с производных аминокислот в мягких условиях без использования токсичных реагентов и могут быть использованы в органическом синтезе.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** специфичность пенициллинацилаз, ферментативное снятие защитных групп, N-бензилоксикарбонильные производные аминокислот.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ПА – пенициллинацилаза; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; PMSF – фенилметилсульфонилфторид; NIPAB – 6-нитро-3-фенилацетамидобензойная кислота; о-ФА – о-фталевый альдегид; НАС – N-ацетил-L-цистеин; Z – N-бензилоксикарбонильная группа.

## ВВЕДЕНИЕ

Маскировка функциональных групп является важной частью органического синтеза [1, 2]. Использование ферментов для введения и снятия защитных групп существенно расширяет возможности в этой области, вплоть до применения новых реагентов и изменения условий проведения этих стадий. Так, в химическом пептидном синтезе, проводимом преимущественно в органических растворителях, используется один набор реагентов, а при использовании ферментов, например, для маскировки аминогрупп, возможно применение фенилацетильных [3], фталильных [4], ацетильных [5] защитных групп. Использование биокатализа в органическом синтезе, особенно при получении лекарственных препаратов, направлено также на поиск ферментов, способных катализировать традиционные химические реакции и сделать их более привлекательными с экологической и экономической точки зрения. В качестве примера можно привести отщепление бензилоксикарбонильной за-

щитной группы в аминокислотах, традиционно проводимое каталитическим гидрированием, восстановлением натрием в жидком аммиаке, а также ацидолизом с помощью бромоводорода в уксусной кислоте [1, 2]. Среди ограничений и недостатков этих методов можно выделить следующие: активно используемый метод гидрирования на палладиевом катализаторе нельзя применить, если в структуре соединения есть органические сульфиды, в том числе остатки цистеина или метионина [6]. Можно проводить деблокирование в присутствии циклогексилламина или эфира трифтористого бора [7], однако метод не селективен при наличии восстанавливаемых функциональных групп, таких, как C=C, C=O, CN, NO<sub>2</sub>, формильной, карбамоильной и др. [8]. Следует также принимать во внимание токсичность палладия и отсутствие методов надежного удаления его следов из конечного продукта, что чрезвычайно важно при синтезе лекарственных препаратов [9]. При восстановительном расщеплении натрием в жидком аммиаке [10] одновременно с бензилок-

сикарбонильным остатком отщепляются другие защитные группы, сложные эфиры, хотя бы частично, превращаются в амиды, разрушаются остатки треонина, частично деметируются остатки метионина, происходит расщепление некоторых пептидных связей. При ацидолитическом расщеплении идут побочные реакции переэтерификации, ацетилирования остатков треонина и серина, разрушаются остатки триптофана, нитроаргинина, бензиловые эфиры и амидные группы [11]. Наряду с оптимизацией условий проведения этих реакций с целью снижения вклада побочных процессов интерес представляет разработка биокаталитических методов снятия N-бензилоксикарбонильной защиты аминокислот. При развитии этого направления были обнаружены новые ферменты: уретангидролазы [12, 13], снимающие бензилоксикарбонильную защиту ферменты в *Sphingomonas paucimobilis*, *Burkholderia phenazinium* и *Arthrobacter sp.* [14–16], показана способность пенициллинацилазы из *Escherichia coli* расщеплять N-бензилоксикарбонильные производные аминокислот [17]. Целью данной работы было изучить как меняется специфичность пенициллинацилазы из *Alcaligenes faecalis* и *E. coli* при изменении структуры N-ацильной группы (замене фенолацетильного остатка на бензилоксикарбонильный) в структуре субстрата и сравнить способности двух ферментов снимать защитную группу.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Реагенты

В работе использовали фенолацетилхлорид (Sigma, США); фенолметилсульфонилфторид (Merck, ФРГ); ацетонитрил («Криохром», Россия); N-фенолацетильные производные  $\alpha$ -аминокислот синтезировали как описано ранее [18]. Препарат пенициллинацилазы из *E. coli* выделяли как описано ранее [19], препарат пенициллинацилазы из *A. faecalis* предоставлен компанией ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», концентрацию активных центров пенициллинацилаз определяли титрованием фенолметилсульфонилфторидом (PMSF) как описано ранее [20, 21].

### Определение $k_{\text{кат}}$ и $K_M$ гидролиза N-ацильных производных аминокислот под действием пенициллинацилаз

Кинетические эксперименты проводили в термостатируемой ячейке спектрофотометра Shimadzu UV-1601 при 400 нм и 25°C в 0.01 М фосфатном буфере pH 7.5 в присутствии 0.1 М KCl. Значения константы Михаэлиса ( $K_M$ ) для гидролиза N-фенолацетильных и N-бензил-

оксикарбонильных производных аминокислот определяли как константы конкурентного ингибирования гидролиза цветного субстрата NIPAB этими соединениями при анализе зависимости наблюдаемой константы Михаэлиса гидролиза NIPAB от концентрации N-фенолацетильного или N-бензилоксикарбонильного производного аминокислоты. Определение каталитических констант ферментативного гидролиза N-фенолацетильных и N-бензилоксикарбонильных производных аминокислот проводили при насыщающей концентрации субстрата (численно равной 10 и 20  $K_M$ ) для определения максимальной скорости ферментативной реакции. За протеканием реакции следили при помощи отбора проб и спектрофотометрической регистрации образующихся аминокислот после модификации о-фталевым альдегидом. В типичном эксперименте раствор N-ацильного производного аминокислоты в 0.01 М фосфатном буфере pH 7.5, содержащем 0.1 М KCl, помещали в термостатируемую ячейку при 25°C и при перемешивании добавляли необходимое количество фермента. Через определенное время отбирали пробы (15–30 мкл) реакционной смеси, смешивали их с 50 мкл 10 мМ раствора PMSF в изопропанол для остановки реакции, разбавляли до нужной концентрации и анализировали при помощи ВЭЖХ. Для определения начальных скоростей ферментативного гидролиза обычно отбирали 8–10 проб, степень превращения субстрата при этом не превышала 10%.

### ВЭЖХ-анализ с предколоночной модификацией аминокислот о-фталевым альдегидом

Модификацию первичных аминокислот проводили следующим образом: к 900 мкл 0.5 мМ раствора аминокислоты в 0.4 М боратном буфере pH 9.6 при 25°C добавляли 50 мкл метанольного раствора, содержащего NAC (40 мМ) и о-ФА (20 мМ). Смесь перемешивали, через 15 мин разбавляли элюентом для хроматографии, центрифугировали в течение 3 мин при 12000 об/мин и анализировали. Хроматографическая система состояла из модуля подачи элюента Waters M6000, инжектора типа Reodyne 7 125 с петлей объемом 50 мкл, колонки для обращенно-фазовой хроматографии Nucleosil C1-8 Chrompack Varian (250×4 мм, 5 мкм) и детектора Waters M481 LC. Хроматограммы регистрировали на программно-аппаратном комплексе для сбора и обработки хроматографических данных Мультихром («Амперсенд», Россия). Скорость потока 1 мл/мин. Образующиеся изоиндолы анализировали при 340 нм с использованием в качестве подвижной фазы 6 мМ фосфатного буфера pH 6.8, содержащего ацетонитрил (10–40% по объему).

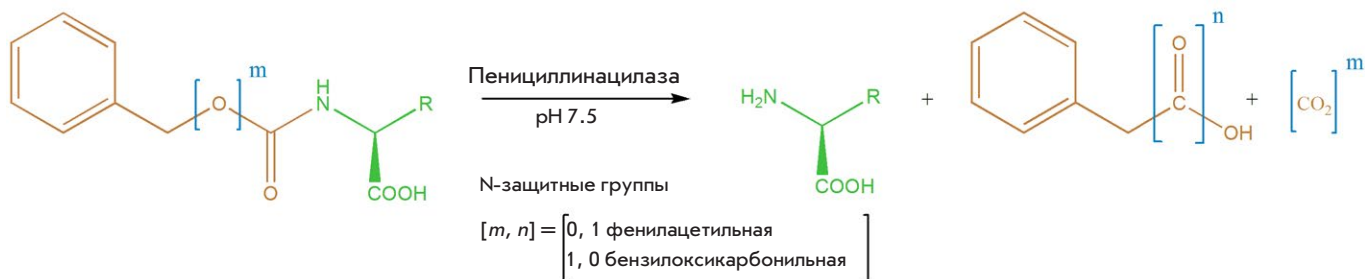


Рис. 1. Реакции снятия фенилацетильной и бензилоксикарбонильной защитных групп, катализируемые пенициллинацилазами

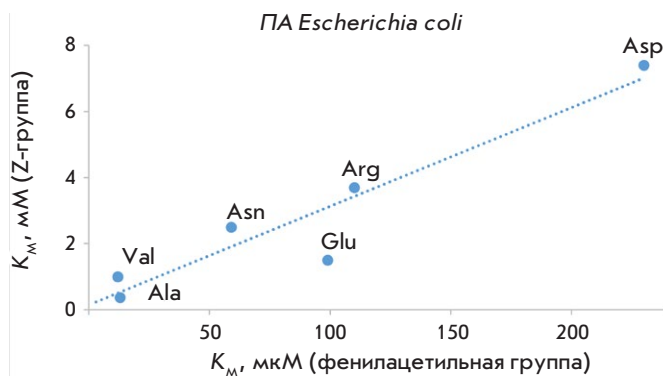


Рис. 2. Корреляция между значениями констант Михаэлиса ( $K_M$ ) в реакциях гидролиза N-фенилацетильных (ось абсцисс) и N-бензилоксикарбонильных (ось ординат) производных аминокислот, катализируемых пенициллинацилазой из *E. coli*

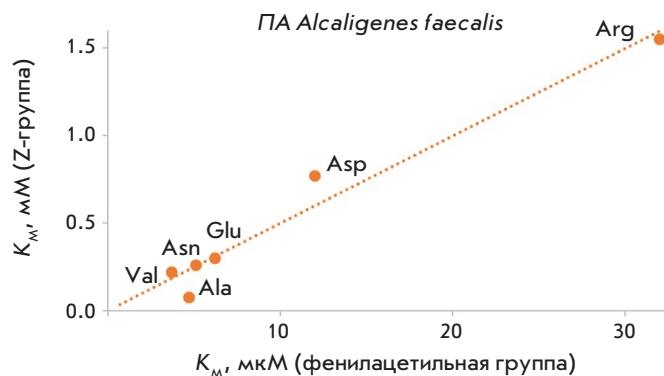


Рис. 3. Корреляция между значениями констант Михаэлиса ( $K_M$ ) в реакциях гидролиза N-фенилацетильных (ось абсцисс) и N-бензилоксикарбонильных (ось ординат) производных аминокислот, катализируемых пенициллинацилазой из *A. faecalis*

### Прямой ВЭЖХ-анализ компонентов реакционной смеси

ВЭЖХ-анализ компонентов реакционной смеси без предколоночной модификации образующихся аминогрупп проводили при помощи хроматографической системы Waters, колонки Kromasil Eternity-5-C18 column (Eka Chemicals, Швеция) с использованием 6 мМ фосфатного буфера pH 3.0, содержащего ацетонитрил (30% по объему) и 0.1 г/л додецилсульфата натрия, при 210 нм и скорости потока 1 мл/мин.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Схема ферментативного гидролиза N-фенилацетильных и N-бензилоксикарбонильных производных аминокислот представлена на рис. 1. Необходимо отметить отличие продуктов в этих двух реакциях: при снятии N-фенилацетильной защиты и выделении аминокислоты со свободной аминогруппой образуется фенилуксусная кислота, в то время как при снятии N-бензилоксикарбонильной защиты наряду с аминокислотой накапливается бензиловый спирт и выделяется  $\text{CO}_2$ .

Отличие ацильных групп на один атом кислорода приводит к существенному изменению в эффек-

тивности связывания субстратов в активном центре пенициллинацилаз, это характерно как для пенициллинацилазы из *A. faecalis*, так и для пенициллинацилазы из *E. coli*. Изменение в структуре N-ацильной группы не меняет специфичность ферментов к боковому радикалу аминокислоты, о чем свидетельствуют корреляции между значениями константы Михаэлиса в реакциях снятия N-фенилацетильной и N-бензилоксикарбонильной защиты, катализируемых обеими пенициллинацилазами. В то же время оба фермента отличаются по своей специфичности к этому структурному фрагменту: если наименее эффективно связывающимися субстратами пенициллинацилазы из *E. coli* являются производные аспарагиновой кислоты (рис. 2), то для пенициллинацилазы из *A. faecalis* это производные аргинина (рис. 3).

При замене фенилацетильного остатка на бензилоксикарбонильный сродство обоих ферментов к субстрату снижается более чем на порядок, при этом пенициллинацилаза из *A. faecalis* проявляет более высокое сродство к новым субстратам (значения  $K_M$  в интервале 0.08–1.6 мМ).

В то время как сродство обоих ферментов к субстратам зависит от природы боковой цепи аминокис-

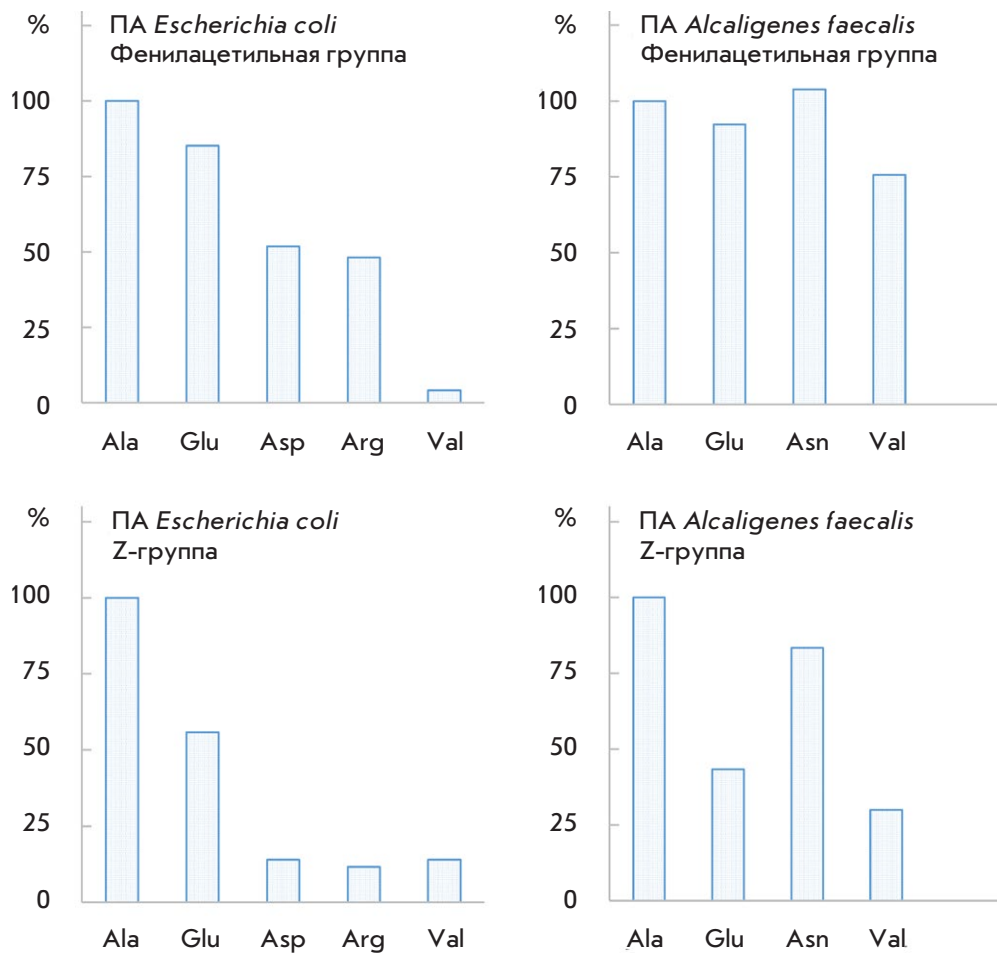


Рис. 4. Каталитическая активность пенициллинацилаз из *E. coli* (левые рисунки) и *A. faecalis* (правые рисунки) в реакциях гидролиза N-фенилацетильных и N-бензилоксикарбонильных производных аминокислот, выраженная как значение каталитических констант по отношению к производным аланина (в процентах): верхние рисунки показывают активность ферментов по отношению к N-фенилацетильным производным аминокислот, нижние – к N-бензилоксикарбонильным производным аминокислот

кислоты, этот структурный фрагмент по-разному влияет на реакцию способность пенициллинацилаз (рис. 4). Природа боковой цепи аминокислоты в ряду N-фенилацетильных производных аминокислот слабо влияет на каталитическую активность пенициллинацилазы из *A. faecalis* (верхний правый рисунок), в то время как реакция способность пенициллинацилазы из *E. coli* сильно зависит от этого структурного фрагмента и падает в ряду N-Phac-Ala, Glu, Asp, Arg, Val более чем в 20 раз (верхний левый рисунок). При замене фенилацетильного остатка на бензилоксикарбонильный снижается реакция способность ферментов. Так, активность пенициллинацилазы из *E. coli* падает в 10–49 раз в зависимости от структуры бокового радикала аминокислотного остатка, а пенициллинацилаза из *A. faecalis* еще более чувствительна к такому структурному изменению: активность фермента уменьшается на два порядка. Тем не менее, обе пенициллинацилазы способны снимать защитные N-бензилоксикарбонильные группы в производных аминокислот (рис. 5), а введением мутаций в структуру ферментов можно увеличить каталитическую

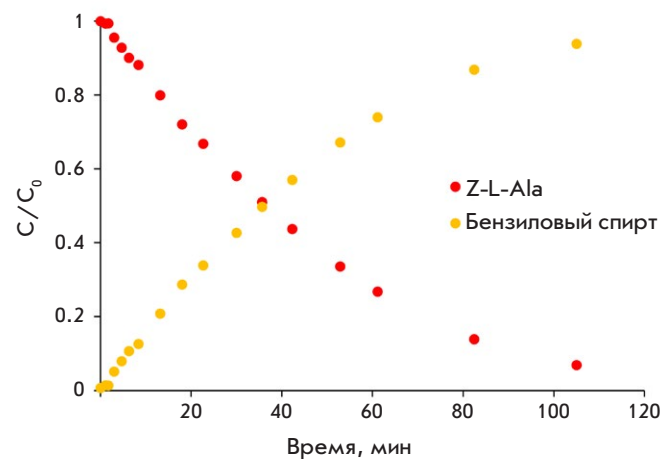


Рис. 5. Снятие N-бензилоксикарбонильной защитной группы, катализируемое пенициллинацилазой из *A. faecalis*. Красными точками представлено изменение концентрации субстрата (N-бензилоксикарбонил-L-Ala), желтыми – накопление продукта превращения (бензилового спирта). Условия реакции: pH 7.5, 25°C, концентрация субстрата 1 мМ, концентрация фермента 6 мкМ

активность к неспецифическим субстратам. Опыт изучения пенициллинацилазы из *E. coli* показывает, что методами белковой инженерии удастся повысить как каталитическую активность, так и сродство фермента к субстратам [22].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что изменение структуры N-ацильной группы в производных аминокислот существенным образом влияет как на узнавание, так и на активность пенициллинацилаз в этом ряду субстратов. Тем не менее, как пенициллинацилаза из *A. faecalis*, так и пе-

нициллинацилаза из *E. coli* способны снимать N-бензилоксикарбонильную защитную группу в производных аминокислот в мягких условиях без использования токсичных реагентов и могут быть использованы в органическом синтезе. Эффективность такого биокаталитического снятия защитной группы может быть улучшена при использовании современных методов рационального дизайна ферментов. ●

*Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-71-30003).*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kadereit D., Waldmann H. // Chem. Rev. 2001. V. 101. № 11. P. 3367–3396.
- Sartori G., Maggi R. // Chem. Rev. 2010. V. 113. P. 1–54.
- Didziapetris R.J., Drabnig B., Schellenberger V., Jakubke H.-D., Svedas V.K. // FEBS Lett. 1991. V. 287. P. 31–33.
- Costello C.A., Kreuzman A.J., Zmijewski M.J. // Tetrahedron Lett. 1996. V. 37. № 42. P. 7469–7472.
- Simons C., van Leeuwen J.G.E., Stemmer R., Arends I.W.C.E., Maschmeyer T., Sheldon R.A., Hanefeld U. // J. Mol. Catal. B Enzym. 2008. V. 54. № 3–4. P. 67–71.
- Sewald N., Jakubke H.-D. Peptides: Chemistry and Biology. 2<sup>nd</sup> ed. Weinheim: Wiley, 2009. 594 p.
- Yajima H. // Chem. Pharm. Bull. Japan. 1968. V. 16. P. 1342.
- Medzihradzky K., Medzihradzky-Schweiger H. // Acta Chem. Acad. Sci. Hung. 1965. V. 44. P. 15–18.
- Ojha N.K., Zyryanov G.V., Majee A., Charushin V.N., Chupakhin O.N., Santra S. // Coordination Chem. Rev. 2017. V. 353. P. 1–57.
- Sifferd R.H., Vigneaud V. // J. Biol. Chem. 1935. V. 108. P. 753.
- Wunsch E., Drees F. // Chem. Ber. 1966. V. 99. P. 110.
- Matsumura E., Shin T., Muraio S., Sakaguchi M., Kawano T. // Agric. Biol. Chem. 1985. V. 49. № 12. P. 3643–3645.
- Matsumura E., Yamamoto E., Kawano T., Shin T.H., Muraio S. // Agric. Biol. Chem. 1986. V. 50. № 6. P. 1563–1571.
- Patel R.N., Nanduri V., Brzozowski D., McNamee C., Banerjee A. // Adv. Synth. Catal. 2003. V. 345. P. 830–834.
- Chu L.N., Nanduri V.B., Patel R.N., Goswami A. // J. Mol. Catal. B Enzym. 2013. V. 85–86. P. 56–60.
- Maurs M., Acher F., Azerad R. // J. Mol. Catal. B Enzym. 2012. V. 84. P. 22–26.
- Alvaro G., Feliu J.A., Caminal G., Lopez-Santin J., Clapes P. // Biocatal. Biotransformation. 2000. V. 18. № 3. P. 253–258.
- Guranda D.T., van Langen L.M., van Rantwijk F., Sheldon R.A., Svedas V.K. // Tetrahedron: Asymmetry. 2001. V. 12. P. 1645–1650.
- Ясная А.С., Ямскова О.В., Гуранда Д.Ф., Щербакова Т.А., Тишков В.И., Швядас В.К. // Вестник МГУ. Серия 2. Химия. 2008. Т. 49. С. 127–133.
- Швядас В.К., Марголин А.Л., Шерстюк С.Ф., Клесов А.А., Березин И.В. // Биоорганическая химия. 1977. Т. 3. С. 546–554.
- Švedas V., Guranda D., van Langen L., van Rantwijk F., Sheldon R. // FEBS Lett. 1997. V. 417. P. 414–418.
- Shapovalova I.V., Alkema W.B.L., Jamskova O.V., de Vries E., Guranda D.T., Janssen D.B., Švedas V.K. // Acta Naturae. 2009. V. 1. P. 94–98.