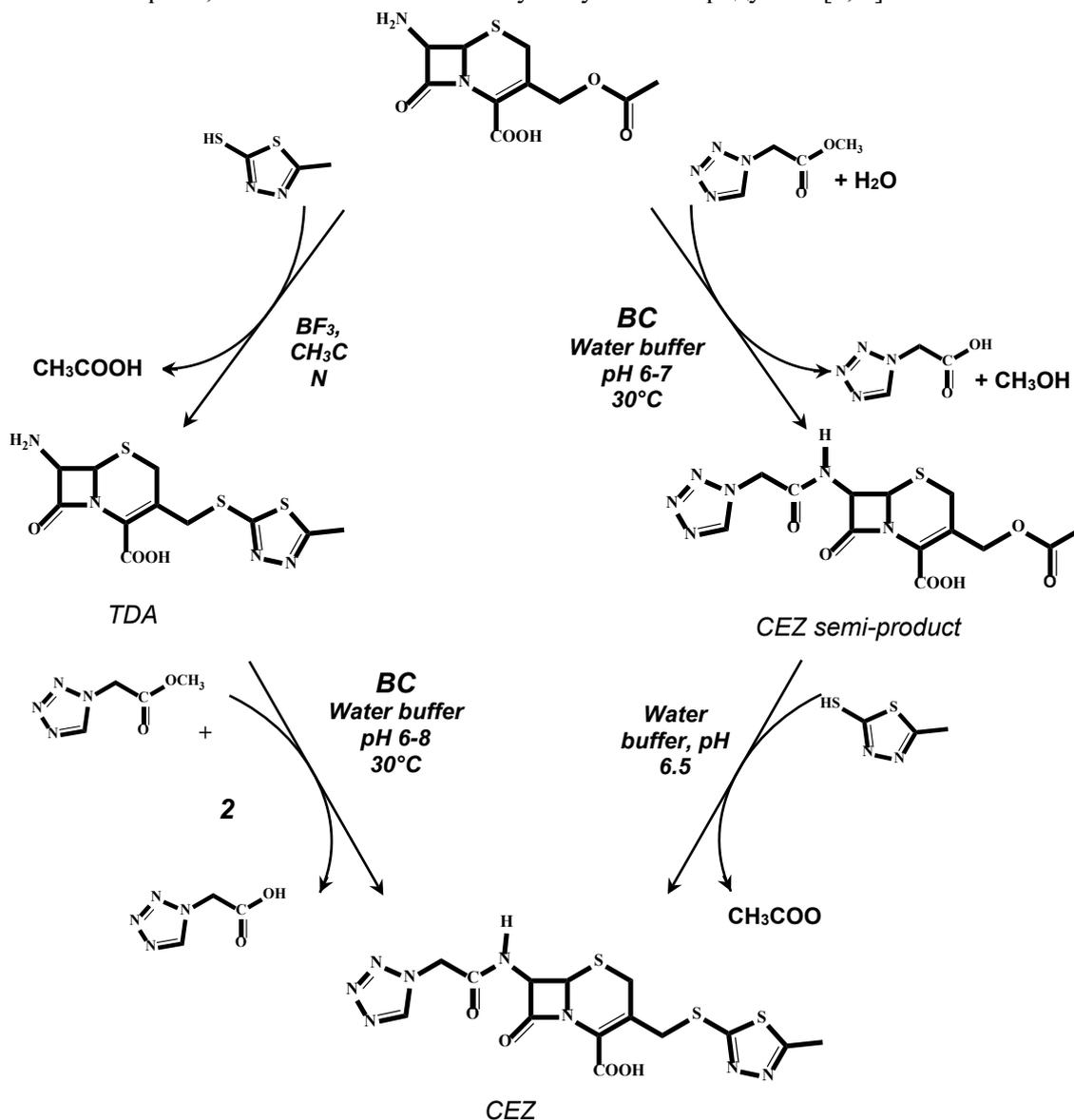


ВЫБОР ХИМИКО-БИОКАТАЛИТИЧЕСКОГО ПУТИ СИНТЕЗА ЦЕФАЛОСПОРИНОВОГО АНТИБИОТИКА

А.В. Склярченко, И.А. Грошкова, С.В. Яроцкий

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

Современной альтернативой традиционному химическому синтезу β-лактамовых антибиотиков, в том числе относящихся к классу цефалоспоринов, являются технологии, включающие трансформации, катализируемые ферментами в форме гетерогенных биокатализаторов (BC). Это позволяет существенно уменьшить экологическую нагрузку на окружающую среду, сократить энергетические затраты, а также повысить чистоту получаемых продуктов [1, 2].



Цефалоспориновые антибиотики – производные 7-аминоцефалоспороновой кислоты (7-АСА), могут быть синтезированы двумя путями, показанными на рис. 1 на примере синтеза цефазолина (CEZ). В первом случае сначала химическими методами вводят необходимый заместитель в С7-положение 7-АСА (рис. 1, трансформация 1), а затем осуществляют биокаталитическое ацилирование аминогруппы полученного производного (ТДА) с образованием целевого антибиотика (рис. 1, трансформация 2).

Альтернативным путем является использование биокатализа для ацилирования аминогруппы в С3-положении 7-АСА (рис. 1, трансформация 3) с последующим химическим превращением получаемого полупродукта (S-p CEZ) в целевой антибиотик (рис. 1, трансформация 4) [3, 4]. Оценка эффективности каждого из этих путей была задачей данного исследования.

Для сравнительного изучения процессов биокаталитического ацилирования TDA [5] и 7-АСА [4] с образованием CEZ и S-p CEZ, соответственно, в качестве биокатализатора использовали синтетазу цефалоспоринов-кислот (CASA) из рекомбинантного штамма *E. coli* ВКПМ В-12316, иммобилизованную путем ковалентного связывания с эпокси-активированным макропористым носителем (IECASA) [5] с синтетазной активностью 400–420 МЕ/г. Биокаталитические трансформации осуществляли методом кинетически-контролируемого синтеза (синтеза с ацильным переносом) [6], где TDA или 7-АСА выступали в качестве исходного β -лактама – ключевой аминокислоты (КА). При этом ацилирующим агентом (AA) служил метиловый эфир тетразолилуксусной кислоты (METzAA). Синтез осуществляли в 0.3 М фосфатно-натриевом буфере при 30 °С и содержании активного фермента в реакционной смеси 10–12 МЕ/мл. Для контроля процессов использовали метод Высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

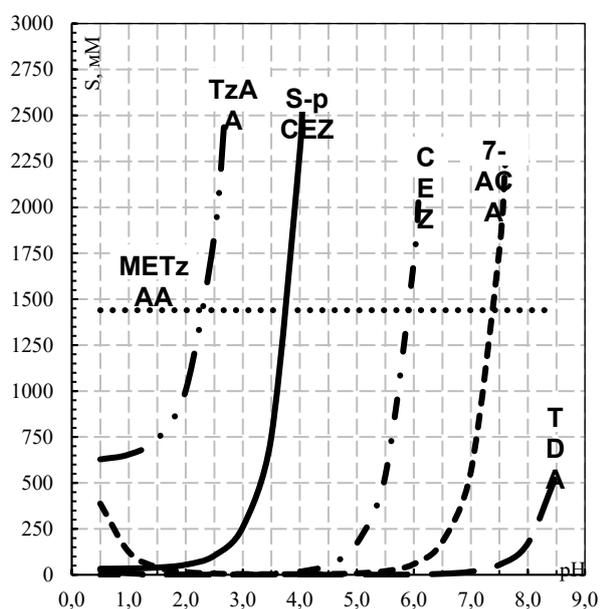


Рис. 2. Зависимость от pH растворимости соединений, вовлеченных в процессы биокаталитического синтеза CEZ

В рабочем диапазоне pH 6–8, оптимальном для функционирования CASA, являлась осложняющим фактором для осуществления эффективного процесса синтеза CEZ. Для решения проблемы был применен ступенчатый градиент pH, предотвращающий выпадение осадка КА в ходе трансформации с использованием исходной концентрации TDA ($C_{КА}^o = 150–200$ мМ), многократно превосходящей ее растворимость при нейтральных pH. В диапазоне pH 6–8 растворимость 7-АСА примерно в 32 раза превосходит растворимость TDA (рис. 1), что позволило осуществлять синтез S-p CEZ в простом спонтанно устанавливаемом градиенте pH даже при высокой исходной концентрации 7-АСА вплоть до $C_{КА}^o = 320$ мМ.

Было проведено исследование влияния исходной концентрации КА ($C_{КА}^o$, мМ) и избытка AA над КА (X^o , М/М) на эффективность процессов кинетически-контролируемого синтеза CEZ и S-p CEZ, оцениваемую по достигаемому максимальному выходу β -лактамного продукта (η^{max} , %). Результаты представлены на рис. 3 и 4, соответственно.

В реакционной смеси, получаемой при биокаталитическом синтезе β -лактамного антибиотика методом ацильного переноса, присутствуют четыре компонента: целевой продукт (CEZ или S-p CEZ), ключевая аминокислота (TDA или 7-АСА), ацилирующий агент (METzAA) и побочный продукт тетразолилуксусная кислота (TzAA) (рис. 1). Учет их растворимости является важным инструментом оптимизации процессов биокаталитической трансформации и последующего выделения целевого продукта [7]. На рис. 2 представлены теоретические кривые, описывающие зависимость от pH растворимости соединений, вовлеченных в изучаемые биокаталитические процессы. Кривые были рассчитаны с использованием значений характеристической растворимости и констант ионизации электролитов, экспериментально определенных нами методом насыщения в условиях протекания биокаталитических процессов (30 °С, 0.3 М фосфатно-натриевый буфер) [4, 5]. Низкая растворимость TDA (рис. 2)

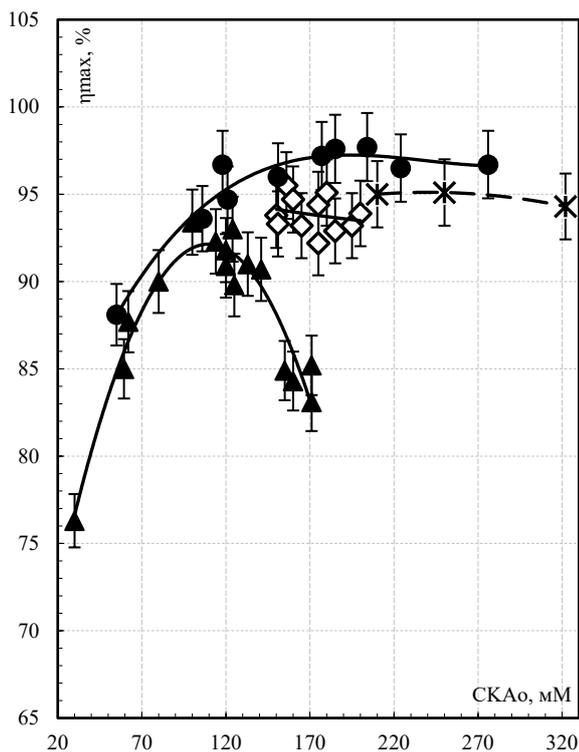


Рис. 3. Зависимость максимального выхода β-лактамого продукта от исходной концентрации КА при синтезе с ацильным переносом, катализируемом IECASA: ✱ – синтез S-р CEZ из 7-АСА и METzAA; спонтанный градиент рН в диапазоне от 7.0±0.2 до 6.0, далее поддержание рН 6.0±0.1; $X^o = 2.9\text{--}3.1$ М/М; ● – то же при $X^o = 2.5$ М/М. ▲ – синтез CEZ из TDA и METzAA при $X^o = 3.1\text{--}3.5$ М/М, ступенчатый градиент рН от 8.2–8.3 с поддержанием рН 6.8±0.1 и рН 6.0±0.1; ◇ – синтез CEZ из TDA и METzAA при $X^o = 3.1\text{--}3.5$ М/М, спонтанный градиент рН от 8.2–8.3 до 6.0, далее поддержание рН 6.0±0.1

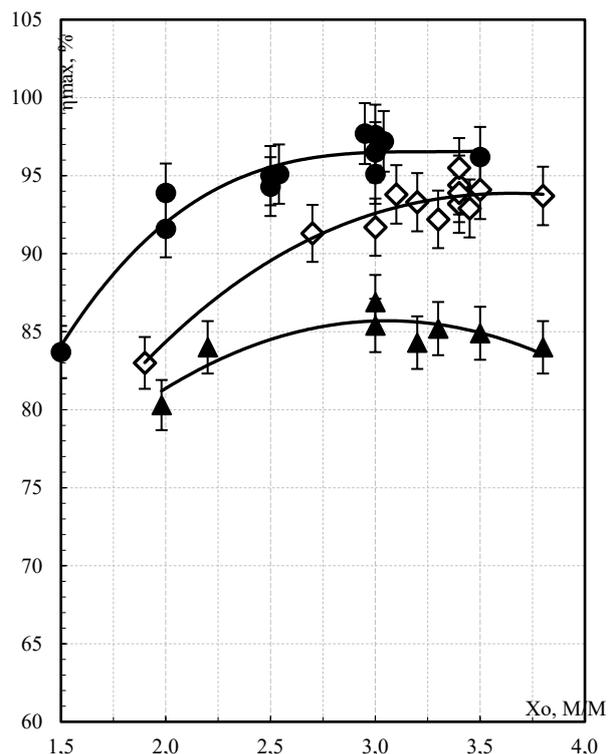


Рис. 4. Зависимость максимального выхода β-лактамого продукта от исходного мольного избытка АА над КА при синтезе с ацильным переносом, катализируемом IECASA: ● – синтез S-р CEZ из 7-АСА и METzAA при $C_{KA}^o = 180\text{--}330$ мМ; спонтанный градиент рН в диапазоне от 7.0±0.2 до 6.0, далее поддержание рН 6.0±0.1; ◇ – синтез CEZ из TDA и METzAA; $C_{KA}^o = 150\text{--}200$ мМ; ступенчатый градиент рН от 8.2–8.3 до 6.0 с поддержанием уровней рН 6.8±0.1 и рН 6.0±0.1; ▲ – то же при $C_{KA}^o = 145\text{--}170$ мМ; спонтанный градиент рН от 8.2–8.3 до 6.0, далее поддержание рН 6.0±0.1

На основе полученных данных выбраны оптимальные условия проведения синтеза CEZ (ступенчатый градиент рН, $C_{KA}^o = 150\text{--}200$ мМ, $X^o = 3.1\text{--}3.5$ М/М) и синтеза S-р CEZ (спонтанный градиент рН, $C_{KA}^o = 200\text{--}330$ мМ, $X^o = 2.5\text{--}3.0$ М/М). При этом для синтеза CEZ $\eta^{max} = (93.5 \pm 1.5)\%$, а для синтеза S-р CEZ $\eta^{max} = (96.5 \pm 1.5)\%$.

Сопоставление биокаталитического синтеза CEZ, исходя из TDA, и S-р CEZ, исходя из 7-АСА, (рис. 1, трансформации 2 и 3) свидетельствует о ряде важных преимуществ второго процесса: более высокий выход целевого β-лактама в случае синтеза S-р CEZ, достигаемый при более высокой C_{KA}^o и меньшем X^o ; осуществление процесса синтеза S-р CEZ в простом спонтанном градиенте рН 7.0–6.0, благоприятном для активности и стабильности фермента, вместо ступенчатого градиента рН от 8.3 до 6.0, используемого при синтезе CEZ; повышение концентрации целевого β-лактама в конечной реакционной смеси в 1.3–1.5 раза; возможность использования продукта биокаталитического

ацилирования 7-АСА метиловым эфиром TzAA в качестве полупродукта для получения не только CEZ, но и цефалоспоринового антибиотика цефтезола.

Получение CEZ через трансформации 3 и 4 (рис. 1) может быть осуществлено как единый процесс без выделения S-р CEZ из реакционной смеси. Следует отметить также, что процесс химической трансформации S-р CEZ в CEZ (рис. 1, трансформация 4), протекающий при 30 °С в водной среде, с экологической точки зрения предпочтителен процессу получения TDA из 7-АСА (рис. 1, трансформация 1), осуществляемому при низкой температуре (-40 °С) в среде токсичных реагентов (BF₃, CH₃ CN).

Можно заключить, что химико-биокаталитический синтез CEZ по пути прямого биокаталитического ацилирования 7-АСА представляется перспективной заменой традиционного пути, использующего биокаталитическое ацилирование TDA.

ЛИТЕРАТУРА

- Rodriguez-Herrera R., Puc L.E.C., Sobrevilla J.M.V., Luque D., Cardona-Felix C.S., Aguilar-González C.N., Flores-Gallegos A.C. Enzymes in the Pharmaceutical Industry for β -Lactam Antibiotic Production / Ed. M. Kuddus: Acad. Press, 2019. Ch. 36. P. 627–643.
- Sklyarenko A.V., Eldarov M.A., Kurochkina V.B., Yarotsky S.V. Enzymatic synthesis of β -lactam acids (review) // Appl. Biochem. Microbiol. 2015. V. 51. № 6. P. 627–640.
- Barber MS., Giesecke UE, Reichert A, Minas W. Industrial enzymatic production of cephalosporin-based β -lactams // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2004. V. 88. P. 179–215.
- Склярёнок А.В., Грошкова И.А., Сидоренко А.И., Яроцкий С.В. Альтернативный синтез цефазолина с использованием синтетазы цефалоспоринов-кислот // Прикладная биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. № 5. С. 1–13.
- Wang Lu, Sklyarenko A.V., Li Duanhua, Sidorenko A.I., Zhao Chen, Li Jinjun, Yarotsky S.V. Enzymatic synthesis of cefazolin using immobilized recombinant cephalosporin-acid synthetase as the biocatalyst // Bioprocess Biosyst. Eng. 2018. V. 41. № 12. P. 1851–1867.
- Kurochkina V.B., Sklyarenko A.V. // Enzymatic Synthesis of beta-Lactam Antibiotics / Ed. G.E. Zaikov. New-York: Nova Science Publishers, 2008. Ch. 20. P. 175–204.
- Kurochkina V.B., Sklyarenko A.V., Satarova D.E., Yarotsky S.V. Ionization constants and solubility of compounds involved in enzymatic synthesis of aminopenicillins and aminocephalosporins // Bioprocess Biosyst. Eng. 2011. V. 34. № 9. P. 1103–1117.