

УДК 577.151.4, 543.632.542

НОВЫЙ ХРОМОГЕННЫЙ СУБСТРАТ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БЕТА-ЛАКТАМАЗ НА ОСНОВЕ ЦЕФАЛОСПОРИНА, МОДИФИЦИРОВАННОГО ЭПОКСИ-ГРУППОЙ

Г.В. Лебедев*, В.Г. Григоренко, Р.Л. Антипин, М.Ю. Рубцова, А.М. Егоров

(кафедра химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова; *e.mail: lebedev.george12@gmail.com)

Бета-лактамазы представляют собой ключевые ферменты, участвующие в формировании резистентности к бета-лактамам антибиотикам у бактерий – возбудителей инфекционных заболеваний. Поиск новых ингибиторов и изучение механизмов резистентности обуславливают необходимость получения хромогенных субстратов бета-лактамаз. Синтезировано новое производное цефалоспорина с эпоксидной функциональной группой, получившее название СМРD1. Показано, что это субстрат бета-лактамаз ТЕМ-типа, гидролизующийся с образованием окрашенного продукта. Продукт гидролиза характеризуется максимумом оптического поглощения на длине волны 450 нм. Различие в максимумах поглощения субстрата и продукта составляет 95 нм, и по этому параметру СМРD1 превосходит описанные ранее субстраты. Установлено, что соединение СМРD1 гидролизуется только бета-лактамазами ТЕМ-типа, не имеющими мутаций в активном центре, что может быть использовано для изучения механизмов каталитического действия бета-лактамаз.

Ключевые слова: бета-лактамазы, хромогенный субстрат, цефалоспорин, эпоксидная группа, антибиотикорезистентность.

В настоящее время антибиотикорезистентность бактерий к бета-лактамам антибиотикам – одна из ключевых проблем в клинической медицине и фармакологической индустрии [1]. Известны несколько механизмов данного типа устойчивости. Для грамотрицательных микроорганизмов наиболее распространенным является гидролиз амидной связи в бета-лактамном кольце антибиотика, катализируемый бактериальными ферментами бета-лактамазами [2]. Бета-лактамазы отличаются значительным структурным разнообразием, среди них встречаются как сериновые гидролазы, так и металло-ферменты [3]. На основании гомологии первичной последовательности и строения активного центра бета-лактамазы можно разделить на четыре молекулярных класса. Для преодоления резистентности, вызванной продукцией данных ферментов, используются ингибиторы. В клинической практике применяется ограниченное количество ингибиторов, которые блокируют действие только бета-лактамаз молекулярного класса А (сульбактам, тазобактам, клавулановая кислота) [4, 5]. Данные ингибиторы неактивны в отношении карбапенемаз, в том числе металло-бета-лактамаз, а также ряда бета-лактамаз расширенного спектра. Поскольку в последние годы наблюдается экспоненциальный рост продуцентов

именно этих бета-лактамаз, активно ведется поиск новых ингибиторов данных ферментов [6, 7]. В этих целях используются различные методы моделирования *in silico*, например подход hit-lead [8].

Для изучения молекулярных механизмов резистентности и скрининговых исследований активности потенциальных ингибиторов *in vitro* необходим высокопроизводительный метод определения ферментативной активности бета-лактамаз. Предложены несколько субстратных систем, базирующихся на различных свойствах образующихся продуктов гидролиза, в том числе хромогенности (субстраты Nitrocefin [9], CENTA [10]) и резонансного переноса энергии Форстера (субстрат CCF4-AM [11]). Хромогенные субстраты обладают преимуществами для скрининга. К недостаткам существующих коммерчески доступных соединений относятся перекрытие спектров поглощения субстрата и продуктов гидролиза, низкая растворимость в водных растворах и высокая стоимость. Цель данного исследования – поиск и синтез нового хромогенного субстрата бета-лактамаз на основе антибиотика цефалоспоринового ряда.

Экспериментальная часть

В работе использовали реагенты компаний «Sigma-Aldrich», «TCI Chemicals», «Химмед».

Синтез субстрата бета-лактамаз CMPD1.

В круглодонную колбу (500 мл) с мешалкой вносили 0,98 г (2 ммоль) 4-метоксибензил-3-(хлорметил)-8-оксо-7-[(фенилацетил)амино]-5-тио-1-азабицикло[4.2.0]окт-2-ене-2-карбоксилата (GCLE) в смеси из 50 мл ацетона и 10 мл метилена хлорида. Затем в эту же колбу вносили 1,3 г (8 ммоль) йодида калия и 0,8 г (3 ммоль) трифенилфосфина. Раствор перемешивали 6 ч в темноте при комнатной температуре, фильтровали через фильтр Шотта для удаления осадка йодида и хлорида калия, затем удаляли растворители на вакуумном роторе. Полученное вещество растворяли в смеси 30 мл ТГФ и 10 мл хлорида метилена, охлаждали до 0 °С и вносили 0,26 г (2 ммоль) триметилсиланоата калия. После перемешивания в течение 20 мин при охлаждении льдом в реакционную смесь добавляли 0,3 г (2 ммоль) *n*-нитробензальдегида. Через 4 ч смесь фильтровали через фильтр Шотта, на который был нанесен тонкий слой (~2–3 мм) силикагеля (Macherey-Nagel) с использованием 10-кратного количества смеси ТГФ:метиленхлорид в соотношении 3:1 (суммарно 400 мл). Затем растворители отгоняли на вакуумном роторе. Далее вещество растворяли в 50 мл метиленхлорида, в колбу вносили 1,2 г (6,8 ммоль) *m*-хлорнадбензойной кислоты и оставляли на 180 ч при комнатной температуре при постоянном перемешивании. По завершении реакции смесь фильтровали и удаляли защитную РМВ-группу растворением полученного соединения в смеси из 5 мл перфторуксусной кислоты и 10 мл анизола. Реакционную смесь оставляли на 30 мин, перемешивая при комнатной температуре, после чего остатки кислоты отгоняли на роторе с помощью вакуум-водоструйного насоса. Смесь оставляли на ночь при +4 °С. Охлажденный остаточный анизол отгоняли под давлением в 10 мбар. Полученное вещество обрабатывали последовательно диэтиловым и петролейным эфирами. После 40 мин отгонки растворителей под вакуум-водоструйным насосом полученное соединение оставляли на одну ночь при +4 °С, затем в течение 40 мин отгоняли остатки растворителя под давлением в 10 мбар.

Создание номенклатурного наименования соединения и расчет растворимости. Теоретический расчет констант растворимости и генерацию наименования ИЮПАК проводили с помощью программного комплекса Chemicalize (ChemAxon, <http://www.chemaxon.com>).

Оценку энергии взаимодействия соединения CMPD1 с активным центром бета-лактамазы методом докинга проводили с

помощью веб-сервиса SwissDock (<http://www.swissdock.ch/docking>). Предварительно подготовленный в ACD\ChemSketch.mol файл, содержащий формулу вещества, конвертировали в sdf-файл с помощью программы OpenBabel. В качестве модельной бета-лактамазы использовали структуру бета-лактамазы TEM-1 (PDB 1BTL).

Экспрессию и очистку рекомбинантной бета-лактамазы TEM-типа проводили по методике, детально описанной нами ранее [12]. Периплазматическую фракцию бактерий *E. coli* BL21 (DE3), трансформированных плазмидным вектором *pET-bla* с геном, кодирующим бета-лактамазу, выделяли методом осмотического шока, далее проводили очистку фермента анионообменной хроматографией и гель-фильтрацией.

Изучение гидролиза соединения CMPD1 бета-лактамазами TEM-типа проводили в 10 мМ фосфатном буфере с pH 7,4. Сток-раствор CMPD1 (2 мМ) готовили в ДМСО. В кювету вносили 990 мкл фосфатного буфера и 10 мкл сток-раствора. Измерение оптической плотности в UV-Vis-диапазоне проводили на спектрофотометре «UV-1602» («Shimadzu»).

Результаты и обсуждение

Выбор структуры хромогенного субстрата бета-лактамаз. В существующих стратегиях поиска субстратов с заданными свойствами [8] отсутствует универсальный метод теоретического предсказания и расчета хромогенности химических соединений. Известны правила Вудварда для батохромного сдвига, описывающие смещение пика поглощения для π -связанных систем [13], однако для ряда функциональных групп отсутствует четкое математическое описание расчета хромогенности. На хромогенность может также влиять сольватохромизм [14], что невозможно рассчитать математически. На основании вышесказанного был предложен полуэмпирический подход к выбору формулы нового соединения – потенциального хромогенного субстрата бета-лактамаз. В патентной литературе описан цефалоспорин, модифицированный эпокси-группой [15], однако эпоксидный функционал находится в молекуле со стороны четырехчленного кольца. Мы решили изменить предложенную ранее схему модификации соединения GCLE, содержащего цефалоспориновое ядро [16], и добавить в нее стадию введения эпокси-функциональной группы в необходимый радикал. Выбор эпокси-группы обоснован тем, что она обладает плоской геометрией, сходной с геометрией двойной связи, при этом из-за напряжения в цикле ее реакционная способность может

оказаться более высокой. В дальнейшем это может привести к более интенсивному окрашиванию продукта гидролиза данного соединения. Согласно литературным данным по гидролизу субстрата CLS405 [17], наличие в соединении сульфоксидной группы, представляющей собой побочный продукт окисления *m*-хлорнадбензойной кислотой, существенно увеличивает скорость гидролиза цефалоспоринов. Это упрощает синтез, так как отсутствует необходимость дополнительной защиты атома серы в шестичленном кольце цефалоспорины и его последующего восстановления. Таким образом, в качестве потенциального хромогенного субстрата было предложено соединение (3-[3-(4-нитрофенил)оксиран-2-ил]-5,5,8-триоксо-7-(2-фенилацетида)-5-тио-1-азабицикло[4.2.0]окт-2-ен-2-карбоновая кислота, названное сокращенно CMPD1. Оно имеет цефалоспориновое ядро, модифицированное окислением атома серы до сульфона, и (4-нитрофенил)-оксиран-функциональную группу в радикале при шестич-

ленном кольце. Способность предложенного соединения CMPD1 связываться в активном центре бета-лактамазы TEM-1 была подтверждена методом молекулярного докинга. Его проводили с использованием структуры бета-лактамазы TEM-1. Рассчитанное значение энергии Гиббса для самой низкоэнергетической конформации соединения составило $-9,4$ ккал/моль.

Синтез соединения CMPD1. Схема синтеза представлена на рис. 1. Синтез был проведен в четыре стадии. На первой стадии атом хлора в радикале у шестичленного кольца замещался на трифенил-фосфинидную группу. На второй стадии проводилась реакция Виттига с участием данной группы. Затем проводили реакцию пероксилирования полученного соединения с использованием *m*-пероксихлорнадбензойной кислоты. Пероксилирование шло по двум сайтам: по двойной связи вне цефалоспоринового ядра до образования эпоксидного кольца и по атому серы до образования сульфона. На последней стадии

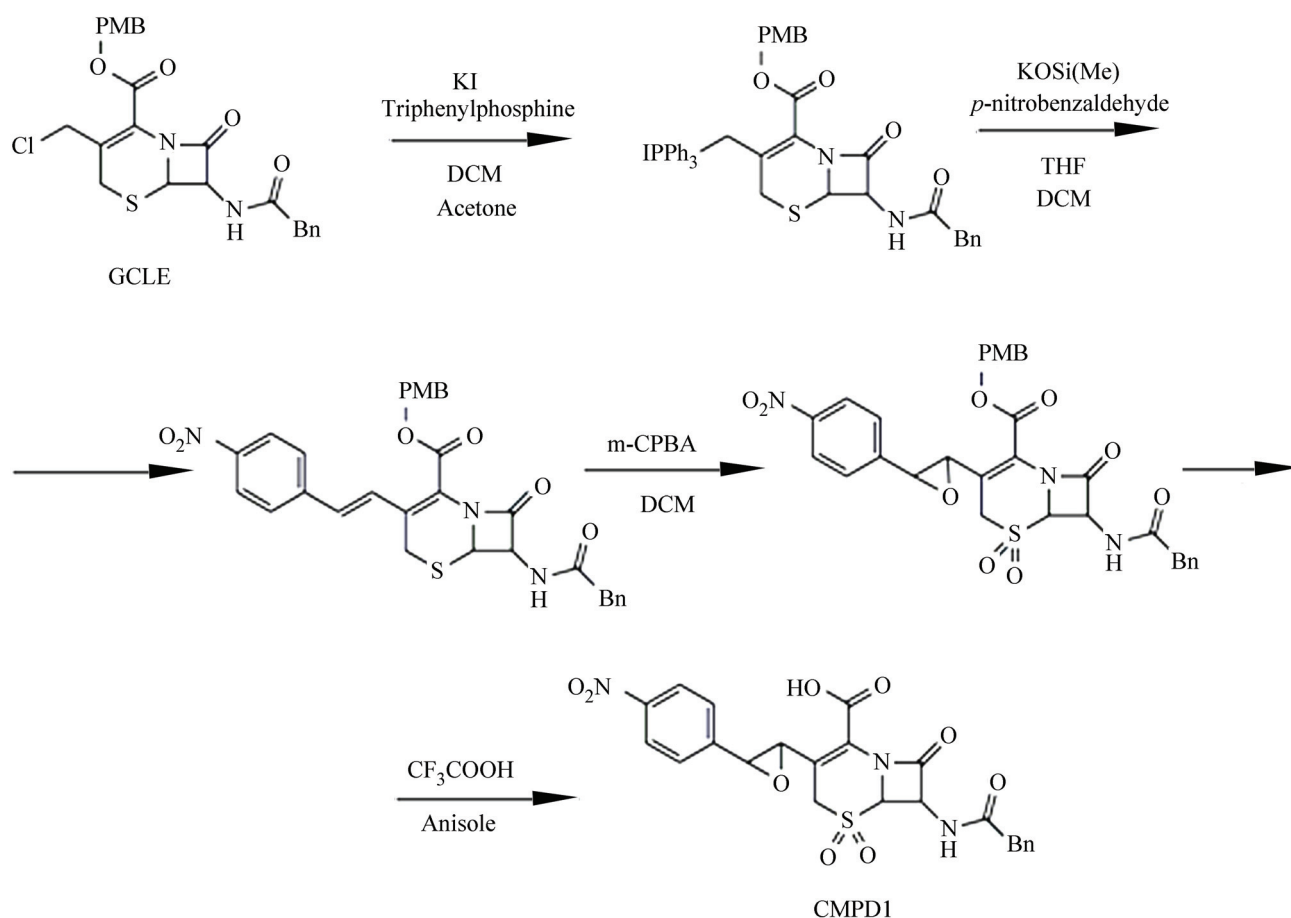


Рис. 1. Схема синтеза соединения CMPD1

снимали защитную группу при карбоксильной группе в цефалоспориновом кольце. Аккуратное внесение перфторуксусной кислоты в анизол в полученное соединение позволило частично избежать ацидолиза оксианового кольца. Выход составил 0,22 г (21% от теоретического). Полученное соединение было охарактеризовано методом ^1H -ЯМР-спектроскопии.

Соединение SMPD1 представляло собой вязкое смолоподобное темно-оранжевое вещество. Оно хорошо растворялось в ДМСО, при этом наблюдался предсказанный сольватохромный сдвиг и раствор приобретал слабо-желтый оттенок. При добавлении воды дальнейшего сольватохромного сдвига не происходило. Растворимость соединения в буферном растворе с pH 7,4 была низкой и не соответствовала расчетному значению $\log S = -5,0$. Поэтому для дальнейшей работы готовили сток-раствор соединения в ДМСО, который затем добавляли в буферный раствор. При этом выпадения соединения в осадок не наблюдали. На рис. 2 представлен спектр поглощения соединения SMPD1 в буферном растворе. Максимум поглощения наблюдался на длине волны 355 нм. Коэффициент экстинкции ϵ_{355} составил $12\,250\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Изучение свойств SMPD1 как субстрата бета-лактамаз. При добавлении соединения SMPD1 в буферный раствор, содержащий бета-лактамазу TEM-1, происходило визуальное изменение цвета раствора со слабо-желтого на красноватый. Таким образом, было показано, что полученное соединение является субстратом бета-

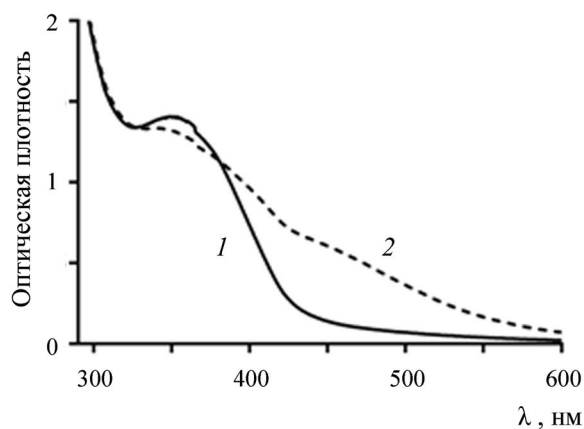


Рис. 2. Спектры поглощения соединения SMPD1 и продукта его гидролиза бета-лактамазой TEM-1 (1 – субстрат, 2 – продукт). Условия реакции: 10 мМ фосфатный буфер (pH 7,4) с 2,5% ДМСО; концентрация субстрата 100 мкМ, концентрация фермента 20 нМ. Измерение спектра проведено через 2,5 мин после начала реакции

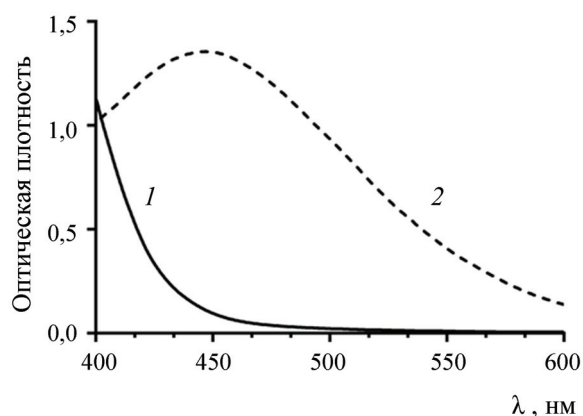


Рис. 3. Спектры поглощения SMPD1 и продукта его гидролиза бета-лактамазой TEM-1 в видимой области (1 – субстрат, 2 – продукт). Условия реакции: 10 мМ фосфатный буфер (pH 7,4) с 5% ДМСО; концентрация субстрата 100 мкМ, концентрация фермента 20 нМ

лактамазы TEM-1 и гидролизует с образованием окрашенного продукта. При протекании реакции гидролиза в реакционной смеси с низким содержанием ДМСО (2,5%) наблюдали постепенное исчезновение окраски и выпадение осадка. Спектр продукта реакции, полученного в этих условиях до выпадения осадка, приведен на рис. 2. Можно предположить, что окрашенный продукт не является конечным продуктом гидролиза. При увеличении концентрации ДМСО в реакционной смеси стабильность окрашенного продукта гидролиза повышалась. Спектр поглощения продукта реакции, полученного при увеличении концентрации ДМСО в реакционной смеси до 5%, представлен на рис. 3. Максимум пика поглощения продукта реакции наблюдался на длине волны $\lambda = 450$ нм. Таким образом, полученное соединение является субстратом бета-лактамазы TEM-1 и гидролизует с образованием окрашенного продукта. Максимумы поглощения продукта и субстрата различаются на 95 нм. По этому параметру новое соединение превосходит ранее описанные хромогенные субстраты бета-лактамаз Chromacef и CENTA [16].

На рис. 4 представлены кинетические кривые гидролиза субстрата SMPD1 при двух различных концентрациях бета-лактамазы TEM-1. Видно, что при гидролизе протекают как минимум две последовательные реакции, в процессе которых сначала образуется промежуточный окрашенный продукт, превращающийся затем во вторичный продукт, окрашенный более слабо или неокрашенный.

Мы изучили способность мутантных форм бета-лактамазы TEM-1 гидролизовать новый субстрат. На рис. 5 представлены начальные участки

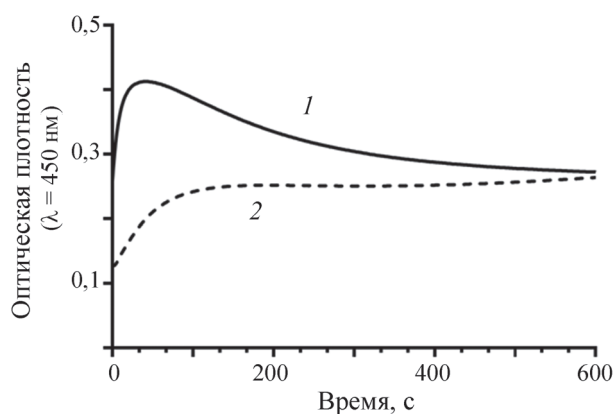


Рис. 4. Зависимость оптической плотности на длине волны 450 нм от времени при гидролизе соединения CMPD1 бета-лактамазой TEM-1. Условия реакции: 10 мМ фосфатный буфер (pH 7,4) с 5% ДМСО; концентрация субстрата 50 мкМ (1 – концентрация фермента 20 нМ, 2 – концентрация фермента 2 нМ)

кинетических кривых гидролиза, катализируемого тремя бета-лактамазами: TEM-1 (дикий тип), TEM-1 с мутацией E104K и TEM-1 с мутацией M69V. Полученные результаты показывают, что соединение CMPD1 гидролизуется только ферментами TEM-1 и TEM-1 с мутацией остатка 104. Гидролиза соединения с участием бета-лактамазы TEM-1 с мутацией остатка 69 не наблюдали. Остаток 69 расположен в области активного центра рядом с каталитически важным S70. Мутация данного остатка приводит к устойчивости ферментов к ингибиторам бета-лактаманной структуры. Остаток 104 расположен на удалении от активного центра. Его мутации приводят к расширению профиля субстратной специфичности. Таким образом, было установлено, что новое соединение избирательно гидролизуется бета-лактамазами TEM типа, не имеющих мутаций в активном центре.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ-ЕМБЛ № 15-54-74007.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. MacGowan A. & Macnaughton E. // *Medicine*. 2017. Vol. 45. P. 622.
2. S.S. Tang A. Apisarnthanarak, Hsu L.Y. // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2014. Vol. 78. P. 3.
3. Ambler R.P. // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biol. Sciences*. 1980. Vol. 289. P. 321.
4. Totir M.A., Helfand M.S., Carey M.P., Sheri A., Buynak J.D., Bonomo R.A., Carey P.R. // *Biochemistry*. 2007. Vol. 46. P. 8980.
5. Oliver W.D., Heil E.L., Gonzales J.P., Mehrotra S., Robnett K., Saleeb P., Nicolau D.P. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015. Vol. 60. P. 1899.
6. Davido B., Senard O., de Truchis P., Salomon J., Dinh A. // *Int. J. Infec. Dis.* 2017. Vol. 62. P. 124.
7. Shakil S., Azhar E.I., Tabrez S., Kamal M.A., Jabir N.R., Abuzenadah A.M., Damanhouri G.A., Alam Q. // *J. Chemother.* 2011. Vol. 23. P. 263.
8. Dahlin J.L., Walters M.A. // *Future Med. Chem.* 2014. Vol. 6. P. 1265.
9. O'Callaghan C.H., Morris A., Kirby S.M., Shingler A.H. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1972. Vol. 1. P. 283.
10. Bebrone C., Moali C., Mahy F., Rival S., Docquier J. D., Rossolini G. M., Fastrez J., Pratt R.F., Frere J.-M., Galeni M. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001. Vol. 45. P. 1868.

В результате выполненной работы синтезирован новый, не описанный ранее в литературе субстрат бета-лактамаз, который имеет в своей структуре цефалоспориновое ядро и (4-нитрофенил)-оксиран-функциональную группу. Полученное соединение гидролизуется бета-лактамазой TEM-1 с образованием окрашенного продукта, при этом наблюдается существенное различие между длинами волн поглощения субстрата и продукта, что важно для использования его в скрининговых исследованиях. Установленная избирательность гидролиза нового субстрата только ферментами, не имеющими мутаций в активном центре, может быть использована при изучении механизмов катализа бета-лактамазами TEM-типа. Дальнейшие исследования будут направлены на установление механизма и состава продуктов гидролиза, а также стабилизацию окрашенного продукта в растворе.

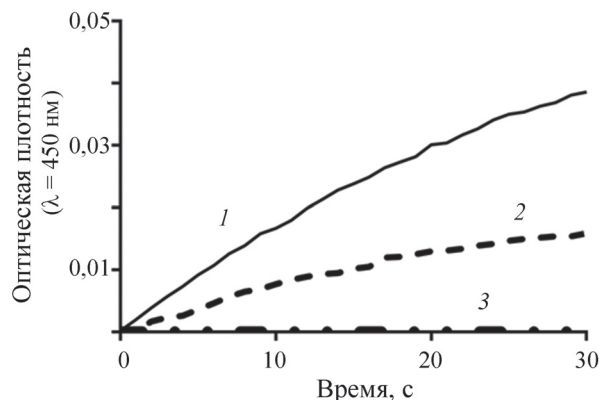


Рис. 5. Гидролиз соединения CMPD1, катализируемый различными бета-лактамазами. Условия реакции: 10 мМ фосфатный буфер (pH 7,4) с 5% ДМСО; концентрация субстрата 50 мкМ (1 – 2 нМ бета-лактамазы TEM-1, 2 – 2 нМ TEM-1 с мутацией E104K, 3 – 2 нМ TEM-1 с мутацией M69V)

11. Keller C., Mellouk N., Danckaert A., Simeone R., Brosch R., Enninga J., Bobard A. // *J. Vis Exp.* 2013. Vol. 76. P. 50116.
12. Grigorenko V.G., Andreeva I.P., Rubtsova M.Yu., Deyge, I.M., Antipin R.L., Majouga A.G., Egorov A.M., Beshnova D.A., Kallio J., Hackenberg C., Lamzin V.S. // *Biochimie.* 2017. Vol. 132. P. 45.
13. Glagovich N. // Woodward rules <http://www.chemistry.ccsu.edu/glagovich/teaching/316/uvvis/conjugated.html>
14. Reichardt C., Welton T. // *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry.* 4th Ed. Wiley. P. 329.
15. Ross B.C., Shroot B. // US Patent 4137312 A.
16. Yu S., Vosbeek A., Corbella K., Severson J., Schesser J., Sutton L. D. // *Anal. Biochem.* 2012. Vol. 428. P. 96.
17. Makena A., van Berkel S.S., Lejeune C., Owens R.J., Verma A., Salimraj R., Spencer J., Brem J., Schofield C.J. // *Chem. Med. Chem.* 2013. Vol. 8. P.1923.

Поступила в редакцию 23.11.17

NOVEL CHROMOGENIC SUBSTRATE FOR BACTERIAL BETA-LACTAMASES BASED ON CEPHALOSPORIN FUNCTIONALIZED WITH EPOXY GROUP

G.V. Lebedev*, V.G. Grigorenko, R.L Antipin., M.Yu. Rubtsova, A.M. Egorov

(Division of enzymology, Chemistry Department, M.V. Lomonosov Moscow State University; *e-mail: lebedev.george12@gmail.com)

Beta-lactamases are the key enzymes involved in resistance towards beta-lactam antibiotics in pathogenic bacteria. Beta-lactamase inhibitor discovery process and study of resistance mechanisms force the search for new chromogenic substrates of beta-lactamases. For these purposes, a novel cephalosporin derivative with an epoxy functional group, called CMPD1, has been proposed and synthesized. This compound was shown to be hydrolyzed by TEM type beta-lactamases with a formation of a colored product with a maximum absorption at 450 nm. The difference in the maximum absorption of substrate and the product is 95 nm, which exceeds the value for the substrates previously described. It was found that the CMPD1 compound is hydrolyzed only by TEM type beta-lactamases which do not have mutations in the active site, which can be used to study the mechanisms of catalytic action of beta-lactamases.

Key words: beta-lactamases, chromogenic substrate, cephalosporin, epoxy group, antibiotic resistance.

Сведения об авторах: Лебедев Георгий Владиславович – студент химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (lebedev.george12@gmail.com); Григоренко Виталий Георгиевич – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (vitaly.grigorenko@gmail.com); Рубцова Майя Юрьевна – вед. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (mrubtsova@gmail.com); Антипин Роман Львович – науч. сотр. кафедры органической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, доцент, канд. хим. наук (roman.antipin@gmail.com); Егоров Алексей Михайлович – глав. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, академик РАН (alex.m.egorov@gmail.com).