

DOI: 10.7868/S3034574X26050078

Оригинальная статья

УДК 577.151;579.66

БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ЦЕФАКЛОРА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ГИДРОЛАЗЫ ЭФИРОВ α -АМИНОКИСЛОТ

И.А. Грошкова^{1,*}, Н.А. Горбунов¹, А.В. Складенко¹, С.В. Яроцкий¹

¹ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»
(НИЦ – «Курчатовский институт»), Москва, Российская Федерация

*E-mail: ingagrosh@mail.ru

Аннотация. Оптимизирован процесс биокаталитического синтеза цефаклора, осуществляемый путем ацилирования 7-амино-3-хлорцефалоспоровановой кислоты (7-АССА) метиловым эфиром D-фенилглицина (MEPG) с использованием иммобилизованной гидролазы эфиров α -аминокислот (IEAEN). В оптимизированных условиях в водно-органической среде, содержащей 43 об.% этиленгликоля, при 30°C в спонтанно устанавливаемом градиенте pH в диапазоне 6.3–5.7 проведено сравнительное изучение и оптимизация процессов биокаталитического ацилирования 7-АССА с образованием цефаклора (CFC) и ацилирования 7-аминоцефалоспоровановой кислоты (7-АСА) с образованием структурного аналога цефаклора по функциональной группе в С-7 положении – цефалоглицина (CFG). Как при ацилировании 7-АССА, так и при ацилировании 7-АСА в концентрациях 60–70 мМ достигнуты одинаковые выходы биокаталитической трансформации (84.9 ± 1.5).¹

Ключевые слова: цефаклор, биокаталитический синтез, гидролаза эфиров α -аминокислот, синтез с ацильным переносом, 7-аминоцефалоспоровановая кислота

Финансирование. Работа выполнена в рамках выполнения государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

Соблюдение этических стандартов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов.

Конфликт интересов. Авторы данной работы заявляют, что у них отсутствует конфликт интересов.

© И.А. Грошкова, Н.А. Горбунов, А.В. Складенко, С.В. Яроцкий, 2026

Сокращения: 7-АССА – 7-амино-3-хлорцефалоспоровановая кислота; 7-АСА – 7-аминоцефалоспоровановая кислота; 7-АДСА – 7-аминодесазетоксицефалоспоровановая кислота; TDA – 7-амино-3-[2-метил-1,3,4-тиадиазол-5-ил]-тиометил-3-цефем-4-карбоновая кислота; 7-ТМСА – 1-метил-5-меркапто-1,2,3,4-тетразолил-7-аминоцефалоспоровановая кислота; АЕН – гидролаза эфиров α -аминокислот (α -amino acid ester hydrolase); IEAEN – иммобилизованная гидролаза эфиров α -аминокислот; CASA – синтетаза цефалоспоринов-кислот (Cephalosporin-acid synthetase); CFC – цефаклор; CFG – цефалоглицин; CEZ – цефазолин; CFM – цефамандол; DMF – диметилформамид; S-p CEZ – полупродукт цефазолина; S-p CFM – полупродукт цефамандола; MEPG – метиловый эфир D-фенилглицина; METzAA – метиловый эфир 1(H)-тетразолилуксусной кислоты; MEMA – метиловый эфир D-манделовой кислоты; PG – D-фенилглицин; AA – ацилирующий агент; БК – биокатализатор; КА – ключевая аминокислота; ПА – пенициллинацилаза; ФБ – фосфатный буфер; ЭГ – этиленгликоль.

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи.

Ссылка для цитирования: Грошкова И.А., Горбунов Н.А., Скляренко А.В., Яроцкий С.В. Биокаталитический синтез цефаклора с использованием иммобилизованной гидролазы эфиров α -аминокислот. *Прикладная биохимия и микробиология / Applied biochemistry and microbiology*. 2026. Т. 62. № 5. С. 755–771. <https://doi.org/10.7868/S3034574X26050078>

DOI: 10.7868/S3034574X26050078

Original Article

BIOCATALYTIC SYNTHESIS OF CEFACLOR USING IMMOBILIZED HYDROLASE OF α -AMINO ACID ESTERS

I. A. Groshkova^{1,*}, N.A. Gorbunov¹, A.V. Sklyarenko¹, S.V. Yarotsky¹

¹ National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russian Federation

*E-mail: ingagrosh@mail.ru

Abstract. The process of biocatalytic synthesis of cefaclor, carried out by acylation of 7-amino-3-chlorocephalosporanic acid (7-ACCA) using immobilized hydrolase of α -amino acid esters (IEAEH), has been optimized. Under optimized conditions, in an aqueous organic medium containing 43 vol.% ethylene glycol at 30°C in a spontaneously setting pH gradient in the range 6.3–5.7, a comparative study and optimization of the processes of biocatalytic acylation of 7-ACCA to form cefaclor (CFC) and acylation of 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA) to form structural analog by functional group in the C-7 position of cefaclor – cefaloglycine (CFG). Both the acylation of 7-ACCA and the acylation of 7-ACA at concentrations of 60–70 mM achieved the same yields of biocatalytic transformation (84.9 ± 1.5).

Keywords: cefaclor, biocatalytic synthesis, hydrolase of α -amino acid esters, acyl transfer synthesis, 7-aminocephalosporanic acid.

Funding. The work was carried out as part of implementation of the State Assignment for the Research Center “Kurchatov Institute”.

Ethics declarations. This work does not contain any studies involving human and animal subjects.

Conflict of interest. The authors of this work declare that they have no conflicts of interest.

For citation: Groshkova I.A., Gorbunov N.A., Sklyarenko A.V., Yarotsky S.V. Biocatalytic Synthesis of Cefaclor Using Immobilized Hydrolase of α -Amino Acid Esters. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya / Applied biochemistry and microbiology*. 2026;62(5):755–771. (In Russ.) <https://doi.org/10.7868/S3034574X26050078>

ВВЕДЕНИЕ

Цефаклор (CFC) — цефалоспориновый антибиотик второго поколения широкого спектра действия, оказывающий бактерицидное действие за счет ингибирования синтеза клеточной стенки бактерий. Существенным достоинством цефаклора является пероральный способ применения, что упрощает использование данного антибиотика при амбулаторном лечении. Он является эффективным препаратом для лечения бактериальных инфекций кожи, среднего отита, инфекций мочевыводящих путей, синусита и других заболеваний [6, 16].

Биокаталитический синтез β -лактамов — перспективное направление в области органического синтеза, которое позволяет избежать использования токсичных реагентов, больших объемов органических растворителей, низких температур реакций, а также очистки промежуточных продуктов при многоступенчатом процессе химического синтеза. Применение биокаталитической трансформации для получения β -лактамовых антибиотиков безусловно может снизить нагрузку на окружающую среду и уменьшить затраты на производство [11, 14, 17].

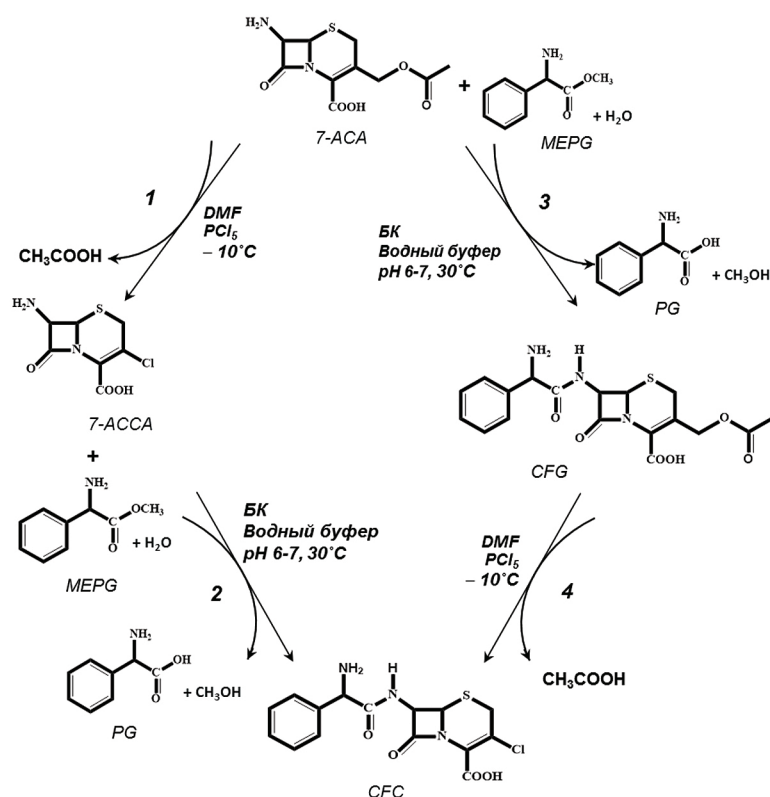


Рис. 1. Пути химико-биокаталитического синтеза CFC: 1 — химический синтез 7-ACCA из 7-ACA; 2 — биокаталитический синтез CFC из 7-ACCA; 3 — биокаталитический синтез CFG из 7-ACA; 4 — химический синтез CFC из CFG
Fig. 1. Ways of chemical-biocatalytic synthesis of CFC: 1 — chemical synthesis of 7-ACCA from 7-ACA; 2 — biocatalytic synthesis of CFC from 7-ACCA; 3 — biocatalytic synthesis of CFG from 7-ACA; 4 — chemical synthesis of CFC from CFG

На рис. 1 на примере синтеза цефаклора продемонстрировано два химико-биокаталитических пути синтеза цефалоспоринового антибиотика. Традиционный химико-биокаталитический подход к синтезу CFC основан на введении химическими методами в С3-положение 7-аминоцефалоспориновой кислоты (7-ACA) необходимого заместителя (рис. 1, трансформация 1) [2] для последующего

биокаталитического ацилирования аминогруппы полученного производного 7-амино-3-хлорцефалоспориновой кислоты (7-ACCA) приводящего к получению CFC (рис. 1, трансформация 2). Альтернативным подходом является биокаталитическое ацилирование аминогруппы в С7-положении 7-ACA (рис. 1, трансформация 3) с получением цефалоглицина (CFG), являющегося цефалоспо-

риновым антибиотиком I поколения, который в настоящее время не применяется в медицине из-за высокой нефротоксичности [3]. Цефалоглицин может рассматриваться как полупродукт CFC, из-за возможности его последующего химического превращения в целевой антибиотик цефаклор (рис. 1, трансформация 4) [22].

Ранее была сопоставлена эффективность ключевых биокаталитических стадий различных химико-биокаталитических путей синтеза двух антибиотиков, относящихся к классу цефалоспоринов-кислот: цефазолина (CEZ) [20] и цефамандола (CFM) [21]. В качестве биокатализатора использовали иммобилизованную рекомбинантную синтетазу цефалоспоринов-кислот (CASA, КФ 3.5.1.11) – фермент, относящийся к классу N-концевых гидролаз [9]. Были изучены и оптимизированы процессы биокаталитического синтеза CEZ, CFM и соответствующих полупродуктов (S-р CEZ и S-р CFM). Путем биокаталитического ацилирования метиловым эфиром 1(Н)-тетразолилуксусной кислоты (METzAA) 7-амино-3-[2-метил-(1,3,4-тиадиазол-5-ил)-тиометил]-3-цефем-4-карбоновой кислоты (TDA) и 7-ACA были получены CEZ и S-р CEZ, соответственно [20]. CFM и S-р CFM получали биокаталитическим ацилированием метиловым эфиром манделовой кислоты (МЕМА) 1-метил-5-меркапто-1,2,3,4-тетразолил-7-амино-цефалоспориновой кислоты (7-TMCA) и 7-ACA, соответственно [21]. В обеих работах выход процесса синтеза полупродукта (S-р CEZ или S-р CFM) путем биокаталитического ацилирования 7-ACA и последующая химическая трансформация полупродукта в соответствующий цефалоспорин (CEZ или CFM) был значительно выше, чем выход процесса прямого биокаталитического синтеза цефалоспорина (CEZ или CFM) путем биокаталитического ацилирования соответствующей ключевой аминокислоты (TDA и 7-TMCA). На основании полученных результатов были сделаны выводы о предпочтительности использования биокаталитического ацилирования 7-ACA для разработки химико-биокаталитической технологии получения цефазолина и цефамандола, а также, предположительно, и других цефалоспоринов.

Настоящая работа посвящена сопоставлению ключевых биокаталитических стадий двух возможных химико-биокаталитических путей синтеза β -лактамного антибиотика цефаклора, относящегося к классу аминоцефалоспоринов.

В качестве биокатализатора (БК) использовали иммобилизованную гидролазу эфиров α -аминокислот (α -amino acid ester hydrolase, АЕН, КФ 3.1.1.43) из *Xanthomonas rubrilineans*, продуцируемую рекомбинантным штаммом *Escherichia coli* ВКПМ В-11271, [1]. АЕН обладает субстратной специфичностью к эфирам α -аминокислот, содержащих

аминогруппу в α -положении к карбоксильной [12, 18, 23].

Цель работы – сравнительное изучение процессов биокаталитического ацилирования 7-АССА и 7-АССА с образованием CFC и соответствующего ему полупродукта (CFG), с использованием в качестве биокатализатора иммобилизованной АЕН (IEAЕН).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В работе использованы коммерческие образцы 7-ADCA, 7-ACCA и МЕРГ·HCl производства «Shandong Sihuan Pharmaceutical Co. Ltd.» (Китай), 7-ACA «Aaron Chemicals» (США), PG, цефалексин, CFC – производства «Sigma-Aldrich» (США), Флокатор ППС-400 «Волжский Оргсинтез» (Россия), ЭГ – «РеаХимЛаб» (Россия), макропористый акрилатный эпокси-активированный носитель Seplife® EMC7014 «Sunresin New Materials» (Китай). Характеристики носителя Seplife® EMC7014: размер частиц – 150-350 мкм, средний диаметр пор – 50 нм, удельная площадь поверхности – ≥ 100 м²/г, влажность – 58-68%.

Определение синтетазной активности АЕН. Синтетазную активность образцов АЕН определяли по начальной скорости реакции синтеза цефалексина из 7-аминодезацетоксицефалоспориновой кислоты (7-ADCA) и метилового эфира D-фенилглицина (МЕРГ) с контролем содержания продукта в реакционной смеси методом ВЭЖХ [20].

За 1 международную единицу (МЕ) синтетазной активности образца АЕН в реакции синтеза цефалексина принимали такое количество фермента, которое катализирует образование 1 мкмоль цефалексина в минуту в растворе, содержащем 40 мМ 7-ADCA и 80 мМ МЕРГ при температуре 40°C и начальном значении pH 6.0.

Анализ проб методом ВЭЖХ. Анализ реакционных смесей, получаемых при изучении биокаталитического синтеза CFC и CFG, определении ферментативной активности АЕН, также растворов, получаемых при изучении растворимости субстратов, проводили методом ВЭЖХ в изократическом режиме на хроматографе фирмы «Gilson» (США). Использовали хроматографическую колонку «Spherisorb ODS», 250 × 4 мм с размером частиц 7.5 мкм. В качестве мобильной фазы использовали смесь, состоящую из 0.05 М фосфатно-аммонийного буфера, pH 2.1 и метанола. Скорость потока мобильной фазы – 1.0 мл/мин. Детектирование пиков анализируемых веществ осуществляли при длине волны 228 нм.

Биомассу клеток получали путем культивирования штамма-продуцента АЕН *E. coli* ВКПМ В-11271 в условиях, описанных в патенте [2], и определяли величину синтетазной активности АЕН [20]. Содержание белка в биомассе клеток и ферментных

препаратах АЕН, получаемых при выделении и очистке фермента, определяли стандартным методом Бредфорд.

Содержание сухих веществ (в %) в биомассе клеток, ферментных препаратах АЕН, получаемых при очистке фермента, и образцах иммобилизованного фермента определяли весовым методом после высушивания при $105 \pm 1^\circ\text{C}$ до постоянной массы точной аликвоты влажного образца.

Получение биокатализатора IEAEN. Для получения гетерогенного биокатализатора выбран метод ковалентной иммобилизации фермента АЕН на макропористом акрилатном носителе Seplife® EMC7014, содержащем активные эпоксидные группы и организованный в виде макропористых шариков, полученных методом суспензионной полимеризации. Этот метод иммобилизации обеспечивает необратимое связывание фермента за счет ковалентных связей с носителем, обладающим высокой химической и механической устойчивостью, высокой пористостью и развитой внутренней поверхностью [7].

Для получения биокатализатора IEAEN фермент АЕН выделяли из биомассы клеток рекомбинантного штамма *E. coli* ВКПМ В-11271. В 0.1 М фосфатно-натриевом буфере (ФБ), pH 7.5 готовили суспензию биомассы клеток с концентрацией 0.05 г сух./мл. и разрушали методом гомогенизации высокого давления при 1000 бар с использованием гомогенизатора «SPX APV-2000» (США). Разрушенные клетки осаждали флокулянт Флокотон ППС-400, а затем отделяли центрифугированием при 30000 g. Из полученного бесклеточного экстракта осаждали фермент полиэтиленгликолем с молекулярной массой 6000 Да, используя осадитель в количестве 0.25 г/мл бесклеточного экстракта. Ферментный препарат АЕН в виде влажной ферментной пасты отделяли центрифугированием при 20000 g. Активность полученного ферментного препарата АЕН — 46000 МЕ/г, удельная активность 180 МЕ/мг белка.

Предварительно, перед наработкой биокатализатора IEAEN, проводилась оптимизация иммобилизации при различной нагрузке по ферменту на носитель (МЕ/г сухого носителя) и связанной с ней нагрузке по белку (мг/г сухого носителя). Иммобилизацию проводили путем инкубации носителя Seplife EMC7014 в растворе АЕН в 2.5 М ацетатно-натриевом буфере (активность АЕН — 1500 МЕ/мл раствора), pH 7.0, при 12°C на круговой качалке при 170 об./мин. Нагрузка по синтетазной активности — 4200 МЕ/г сухого носителя; по белку — 26.0 мг/г сухого носителя. Через 167 ч в реакционную смесь добавляли 25 % водного раствора глутарового альдегида для создания концентрации сшивающего агента в растворе 0.1 об. %. Реакционную смесь инкубировали на качалке в тех же условиях еще 1 ч. Полученный биокатализатор отделяли

вакуумной фильтрацией и промывали на фильтре дистиллированной водой.

Для данной работы получен образец IEAEN с синтетазной активностью 510 МЕ/г влажного БК, 1840 МЕ/г сухого БК при выходе активности процесса иммобилизации 44 %.

*Определение синтетазной, эстеразной
и амидазной активности IEAEN
в процессах синтеза CFC*

Синтетазную (по синтезу CFC), амидазную (по гидролизу CFC) и эстеразную (по гидролизу MERG) активность IEAEN определяли по начальным скоростям соответствующих процессов в фосфатно-натриевом буфере, pH 7.0, с концентрацией этиленгликоля (ЭГ) 0–43 об. %. Варьировали pH реакционной смеси, температуру процесса и концентрацию ЭГ в реакционной смеси. Начальные концентрации субстратов: $C_{7\text{-ACCA}} = 40$ мМ и $C_{\text{MERG}} = 80$ мМ при определении синтетазной активности; $C_{\text{CFC}} = 20$ мМ при определении амидазной активности; $C_{\text{MERG}} = 80$ мМ при определении эстеразной активности. В конечных реакционных смесях методом ВЭЖХ определяли концентрации продуктов: C_{CFC} , $C_{7\text{-ACCA}}$ и C_{PG} для определения синтетазной, амидазной и эстеразной активности, соответственно. Величину C_{PG} при определении эстеразной активности корректировали с учетом концентрации PG, образующегося при спонтанном гидролизе MERG, ставя «холостой» опыт.

За 1 международную единицу (МЕ) ферментативной (синтетазной, амидазной или эстеразной) активности образца АЕН принимали такое количество препарата, которое катализирует образование 1 мкмоль конечного продукта в минуту в заданных условиях.

Массу анализируемого образца БК и время его инкубации в растворе субстратов выбирали таким образом, чтобы в конце процесса степень трансформации определенного субстрата в соответствующий продукт не превышала 10 %.

*Проведение процессов биокаталитического
синтеза CFC и CFG*

Биокаталитический синтез CFC и CFG проводили методом ацильного переноса (кинетически-контролируемого синтеза) [11, 19, 20], используя 7-ACCA и 7-ACA в качестве КА и MERG в качестве АА. Синтез проводили в стеклянном реакторе объемом 15 мл, снабженном магнитной мешалкой и системами контроля и поддержания температуры и pH. Раствор субстратов в 0.3 М ФБ, содержащем ЭГ, готовили в реакторе при заданной температуре и контроле pH. Сначала полностью растворяли КА при необходимости порционно добавляя 2 М раствор NaOH. При этом pH не превышал значение 7.4. Затем в реактор добавляли MERG·HCl и после его полного растворения и установления pH 6.2–6.4

вносили IEAEN, тем самым начиная процесс биокаталитического синтеза.

Для изучения динамики процесса синтеза каждые 5–10 мин отбирали пробу реакционной смеси и методом ВЭЖХ контролировали содержание четырех компонентов: КА (7-АССА или 7-АСА), ацилирующего агента МЕРГ, целевого продукта (СFC или СFG) и побочного продукта фенилглицина (PG). Синтез проводили до достижения стабильного плато на зависимости относительной концентрации целевого продукта от времени (плато максимальной концентрации продукта $C_{\text{макс прод}}^o$). Относительную концентрацию целевого продукта в текущий момент времени рассчитывали по отношению к начальному содержанию КА в реакционной смеси ($C_{\text{КА}}^o$, мМ). Максимальный выход целевого продукта, $\eta_{\text{макс}}$, (%) рассчитывали по формуле:

$$\eta_{\text{макс}} = \frac{C_{\text{макс прод}}^o}{C_{\text{КА}}^o} \cdot 100$$

(средние данные на плато).

Изучение растворимости соединений, вовлеченных в биокаталитический синтез CFC

Растворимость 7-АССА, МЕРГ·HCl, CFC и PG, являющихся электролитами, изучали методом насыщения [13] в условиях проведения биокаталитических процессов. Исследования проводили в стеклянном реакторе с перемешиванием и постоянном контроле pH. Аликвоту исследуемого сое-

динения суспендировали в 0.3 М ФБ, содержащем 43 об.% ЭГ. Перемешивали суспензию до достижения равновесия между растворимой и нерастворимой фазами, регистрировали значение pH, отбирали пробу суспензии и центрифугировали ее. В надосадочной жидкости методом ВЭЖХ определяли концентрацию анализируемого соединения. Затем pH суспензии в реакторе доводили до нового значения добавлением раствора щелочи или кислоты.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор оптимальных условий использования IEAEN при биокаталитическом синтезе CFC

В процессе биокаталитического синтеза аминоцефалоспоринов, в частности CFC, фермент АЕН катализирует три конкурирующие реакции: целевой синтез антибиотика (рис. 2, реакция 1), проявляя при этом синтетазную активность, и два побочных гидролитических процесса: гидролиз сложноэфирной связи ацилирующего агента с образованием PG (рис. 2, реакция 2), проявляя эстеразную активность, а также гидролиз ациламидной связи антибиотика с образованием 7-АССА и PG (рис. 2, реакция 3), проявляя амидазную активность. Выход целевого продукта определяется соотношением скоростей синтетазной и двух гидролитических реакций. На эффективность кинетически-контролируемого синтеза CFC влияют pH, температура и состав реакционной среды (присутствие в ней органических растворителей) за счет изменения соотношения скоростей синтетазной и гидролитических реакций [8, 11, 12, 15, 24].

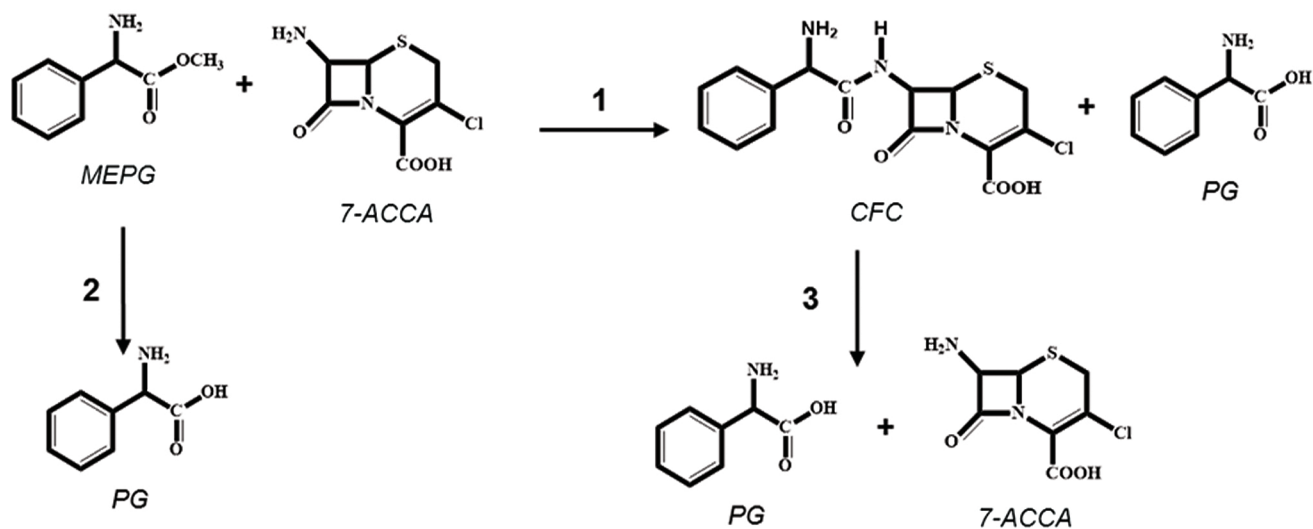


Рис. 2. Схема кинетически-контролируемого синтеза CFC, катализируемого IEAEN: 1 – реакция синтеза CFC; 2 – реакция гидролиза АА; 3 – реакция гидролиза CFC

Fig. 2. Scheme of kinetically controlled CFC synthesis catalyzed by IEAEN: 1 – CFC synthesis reaction; 2 – AA hydrolysis reaction; 3 – CFC hydrolysis reaction

С целью выбора оптимальных условий использования IEAEN в процессах биокаталитического синтеза CFC было изучено влияние pH, температуры и концентрации ЭГ в реакционной среде на синтетазную, эстеразную и амидазную активности IEAEN.

pH-зависимость синтетазной, эстеразной и амидазной активности IEAEN

Было изучено влияние pH на синтетазную (по синтезу CFC), эстеразную (по гидролизу MERPG) и амидазную (по гидролизу CFC) активность БК. Полученные результаты представлены на рис. 3 в виде зависимостей от pH относительной активности БК ($A_{БК}$, в % от величины в pH-оптимуме). В табл. 1. приведены максимальные (достигаемые в pH-оптимуме) величины каждой активности ($A_{опт}$), а также сопоставлены абсолютные значения активности при pH 6.0 ($A_{pH\ 6.0}$).

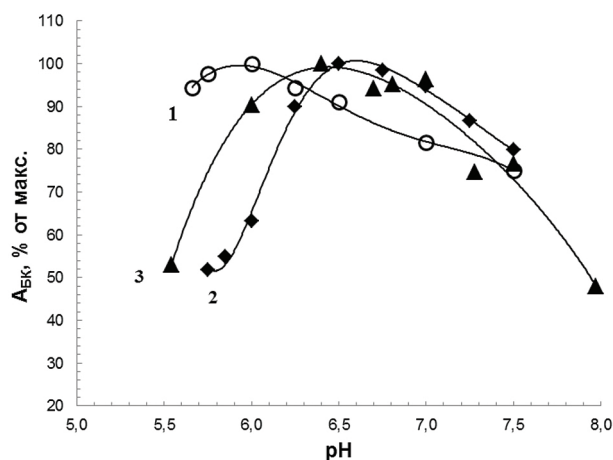


Рис. 3. Зависимость синтетазной, эстеразной и амидазной активности IEAEN (30°C, 0.1 М ФБ) от pH: 1 – синтетазная активность (по синтезу CFC); 2 – эстеразная активность (по гидролизу MERPG); 3 – амидазная активность (по гидролизу CFC)

Fig. 3. pH-dependence of synthetase, esterase and amidase activities of IEAEN (30°C, 0.1 M FB): 1 – synthetase activity (for CFC synthesis); 2 – esterase activity (for MERPG hydrolysis); 3 – amidase activity (for CFC hydrolysis)

Оптимальное значение pH реакции синтеза CFC ($pH_{опт}=6.0$) на 0.5 ед. pH смещено в кислую область по сравнению с практически совпадающими между собой pH-оптимумами обеих гидролитических реакций. При оптимальном для синтеза pH 6.0 скорость гидролиза аминоцефалоспорины меньше скорости его синтеза в 2.9 раза, а эстеразная активность превосходит синтетазную в 2.5 раза (табл. 1), что оказывает значительное влияние на выход целевого продукта. Отношение синтетазной активности БК ($A_{синт}$) к суммарной гидролазной

активности (эстеразной и амидазной, $A_{гидр}^{сумм}$) в зависимости от pH продемонстрировано на рис. 4.

Таблица 1. Сопоставление различных видов активности, проявляемой IEAEN, при синтезе CFC

Table 1. Comparison of the different activities exhibited by IEAEN in the synthesis of CFC

Проявляемая активность	pH-оптимум	Активность, МЕ/г сух.	
		$A_{опт}$	$A_{pH\ 6.0}$
Синтетазная (по синтезу CFC)	6.0	690	690
Эстеразная (по гидролизу MERPG)	6.5	2770	1750
Амидазная (по гидролизу CFC)	6.4	260	240

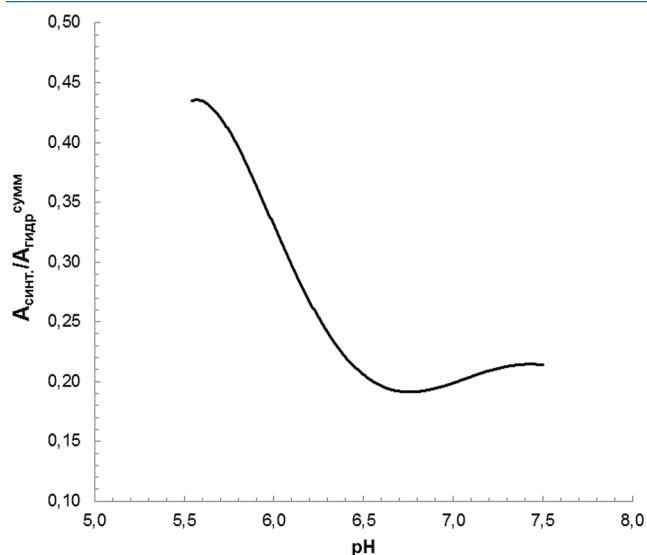


Рис. 4. Зависимость соотношения синтетазной и суммарной гидролазной (эстеразной и амидазной) активности IEAEN в процессах синтеза CFC от pH

Fig. 4. pH-dependence of the ratio of synthetase and total hydrolase (esterase and amidase) activity of IEAEN in the processes of CFC synthesis

Полученные результаты свидетельствуют о предпочтительности проведения процесса биокаталитического синтеза CFC в слабокислой среде ($pH\ 6.0\pm 0.3$), а также о необходимости замедления гидролитических процессов (в первую очередь эстеразного) с использованием других возможных подходов, в частности, изменения температуры и состава реакционной среды.

Зависимость от температуры синтетазной, эстеразной и амидазной активностей БК IEAEN

При pH 6.0, предпочтительном для синтетазного процесса, изучено влияние температуры на синтетазную, эстеразную и амидазную активность IEAEN. На рис. 5 полученные результаты представлены в координатах Аррениуса ($\ln A_{БК}$ vs. $1/T$) [4].

Из данных, приведенных на рис. 5 следует, что оба гидролитических процесса в большей степени зависят от температуры, чем целевой процесс синтеза CFC.

Отношение синтетазной активности БК к суммарной гидролазной (эстеразной и амидазной) в зависимости от температуры показано на рис 6.

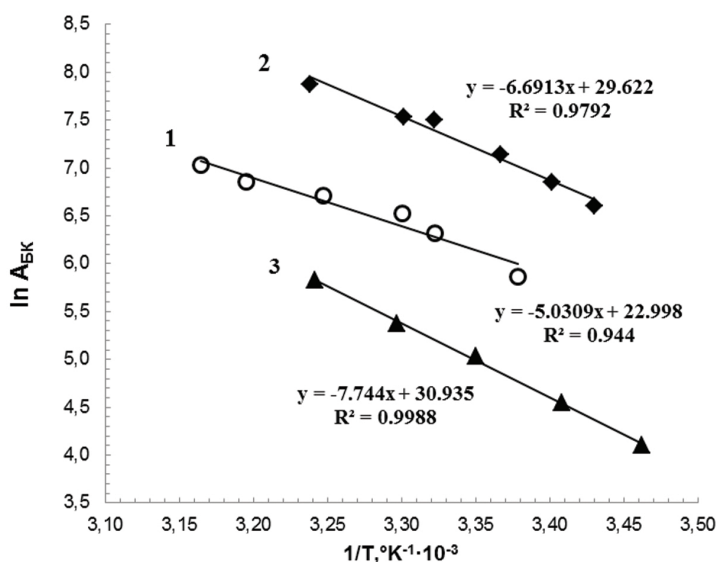


Рис. 5. Температурная зависимость синтетазной, эстеразной и амидазной активности IEAEN (0.1 М ФБ, pH 6.0): 1 – синтетазная активность (по синтезу CFC); 2 – эстеразная активность (по гидролизу MEPG); 3 – амидазная активность (по гидролизу CFC)

Fig. 5. Temperature dependence of synthetase, esterase and amidase activities of IEAEN (0.1 M FB, pH 6.0): 1 – synthetase activity (for CFC synthesis); 2 – esterase activity (for MEPG hydrolysis); 3 – amidase activity (for CFC hydrolysis)

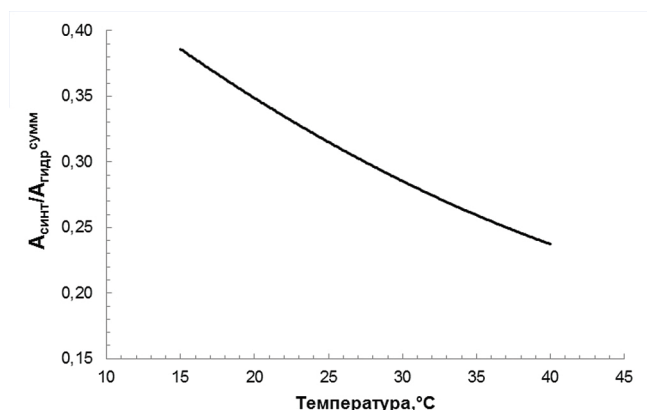


Рис. 6. Зависимость от температуры соотношения синтетазной и суммарной гидролазной (эстеразной и амидазной) активности IEAEN в процессах синтеза CFC (0.1 М ФБ, pH 6.0)

Fig. 6. Temperature dependence of the ratio of synthetase and total hydrolase (esterase and amidase) activity of IEAEN in the processes of CFC synthesis (0.1 M FB, pH 6.0)

Из результатов, представленных на рис. 6 следует, что снижение температуры процесса синтеза CFC, катализируемого IEAEN, предпочтительно для сдвига кинетического равновесия в сторону синтеза аминокефалоспоринов.

В качестве рабочей выбрана температура 30°C, обеспечивающая как достаточно высокое соотношение скоростей синтетазного и двух гидролитических процессов, так и значительную величину синтетазной активности БК, обеспечивающую его рациональное использование.

Зависимость синтетазной, эстеразной и амидазной активностей IEAEN от концентрации ЭГ в реакционной среде

Эффективность биокаталитического синтеза цефалоспоринов можно повысить путем замедления скорости гидролитических процессов за счет использования водно-органических сред, таким образом снижая удельную концентрацию воды в реакционной среде. Органическим соединением, смешивающимся с водой и эффективно снижаю-

щим скорость гидролитических процессов, является двухатомный спирт ЭГ [8, 11, 12, 15, 21, 24].

Изучено влияние ЭГ на катализируемые IEAEN процессы, протекающие при синтезе CFC в среде 0.3 М ФБ. На рис. 7 представлены зависимости синтетазной и двух гидролазных (эстеразной и амидазной) активностей IEAEN от концентрации ЭГ в реакционной среде. Рассчитанное отношение синтетазной активности БК к суммарной гидролазной в зависимости от концентрации ЭГ показано на рис. 8.

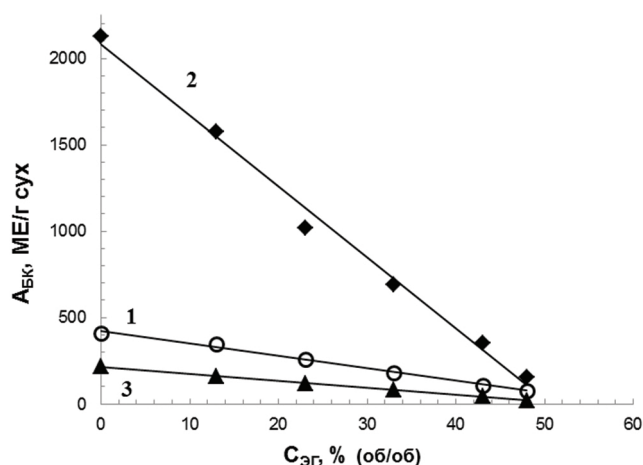


Рис. 7. Зависимость синтетазной, эстеразной и амидазной активностей IEAEN от концентрации ЭГ в реакционной смеси (30°C; 0.3 М ФБ, pH 7.0): 1 – синтетазная активность (по синтезу CFC); 2 – эстеразная активность (по гидролизу МЕРГ); 3 – амидазная активность (по гидролизу CFC)

Fig. 7. Dependence of the synthetase, esterase, and amidase activities of IEAEN on the EG concentration in the reaction mixture (30°C; 0.3 М FB, pH 7.0):

1 – synthetase activity (for CFC synthesis); 2 – esterase activity (for МЕРГ hydrolysis); 3 – amidase activity (for CFC hydrolysis)

Строгая линейность увеличения относительной эффективности синтеза аминоцефалоспоринов с ростом концентрации ЭГ (рис. 8) объясняется тем, что влияние ЭГ на соотношение скоростей реакций является следствием снижения концентрации воды в реакционной смеси. Рабочей концентрацией ЭГ в реакционной смеси выбрана С_{ЭГ}=43 об.%. При более высоких концентрациях ЭГ снижение уровня синтетазной активности IEAEN требует увеличения нагрузки по БК, что приводит к тому, что на единицу целевого конечного продукта требуется значительно большее количество БК.

Таким образом, были выбраны следующие оптимальные по pH, температуре и концентрации органического растворителя в реакционной среде

условия проведения процессов биокаталитического синтеза CFC, катализируемых IEAEN – pH (6.0±0.3), 30°C, С_{ЭГ} = 43 об.%. В этих выбранных условиях проводили оптимизацию процессов биокаталитического синтеза CFC, а также его полупродукта (CFG) по начальной концентрации КА (С_{КА}⁰) и мольному избытку АА над КА (X⁰).

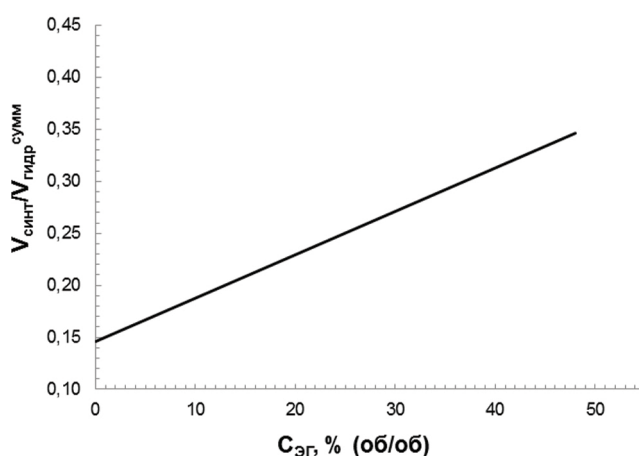


Рис. 8. Зависимость от концентрации ЭГ в реакционной смеси соотношения синтетазной и суммарной гидролазной (эстеразной и амидазной) активности IEAEN в процессах синтеза CFC (30°C; 0.3 М ФБ, pH 7.0)

Fig. 8. Dependence of the ratio of synthetase and total hydrolase (esterase and amidase) activity of IEAEN on the concentration of EG in the reaction mixture in the CFC synthesis processes (30°C; 0.3 М FB, pH 7.0)

Изучение растворимости соединений, вовлеченных в процесс синтеза CFC

Критическим параметром при выборе условий проведения процесса биокаталитического синтеза CFC является растворимость вовлеченных в него компонентов. Растворимость аминокислот 7-АССА, РГ и CFC, представляющих собой цвиттер-ионы, и амина МЕРГ·HCl, несущего одну диссоциирующую группу, изучали методом насыщения [13] в оптимизированных для синтеза CFC условиях (30°C, 0.3 М ФБ, С_{ЭГ} = 43 об.%).

Зависимость растворимости (S, mM) цвиттер-ионов от pH, описывается уравнением:

$$S = S^{\pm} \cdot \left(1 + \frac{[H^+]}{K_1} + \frac{K_2}{[H^+]} \right), \quad (1)$$

где [H⁺] – концентрация ионов водорода в растворе при заданном pH, mM; K₁ – константа ионизации карбоксильной группы цвиттер-иона, mM; K₂ – константа ионизации аминогруппы цвиттер-иона,

мМ; $S^{\pm}$ — характеристическая растворимость цвиттер-ионов (растворимость электронейтральной формы).

Растворимость компонентов реакционной смеси синтеза CFC изучали при кислом, нейтральном и щелочном pH. Для цвиттер-ионов 7-АССА, PG и CFC рассчитаны константы ионизации карбоксильной (pK_1) и аминогруппы (pK_2), а также характеристическая растворимость ($S^{\pm}$, мМ).

В условиях, когда $[H^+]$ значительно меньше, чем K_1 , зависимость растворимости цвиттер-ионов от pH сводится к уравнению:

$$S = S^{\pm} + S^{\pm} \cdot K_2 \cdot \frac{1}{[H^+]}. \quad (1.1),$$

Линеаризация экспериментальных данных, полученных при изучении растворимости 7-АССА, CFC и PG при нейтральном и слабощелочном pH в координатах уравнения (1.1, S vs. $1/[H^+]$), представлена на рис. 9.

В условиях, когда $[H^+]$ значительно превышает K_2 , зависимость растворимости (S , мМ) цвиттер-ионов от pH описывается уравнением:

$$S = S^{\pm} + \frac{S^{\pm}}{K_1} \cdot [H^+]. \quad (1.2)$$

Для амина МЕРГ·HCl рассчитана константа ионизации аминогруппы (pK_2) и характеристическая растворимость (S° , мМ).

Зависимость растворимости (S , мМ) амина от pH описывается уравнением:

$$S = S^{\circ} + \frac{S^{\circ}}{K_2} \cdot [H^+], \quad (1.3)$$

Где K_2 — константа ионизации аминогруппы, мМ; S° — характеристическая растворимость амина (растворимость незаряженной формы), мМ.

На рис. 10 представлена линеаризация в координатах уравнения (S vs. $[H^+]$) экспериментальных данных, полученных при изучении растворимости цвиттер-ионов 7-АССА, CFC и PG при нейтральном и слабощелочном pH и растворимости амина МЕРГ·HCl при нейтральном и щелочном pH.

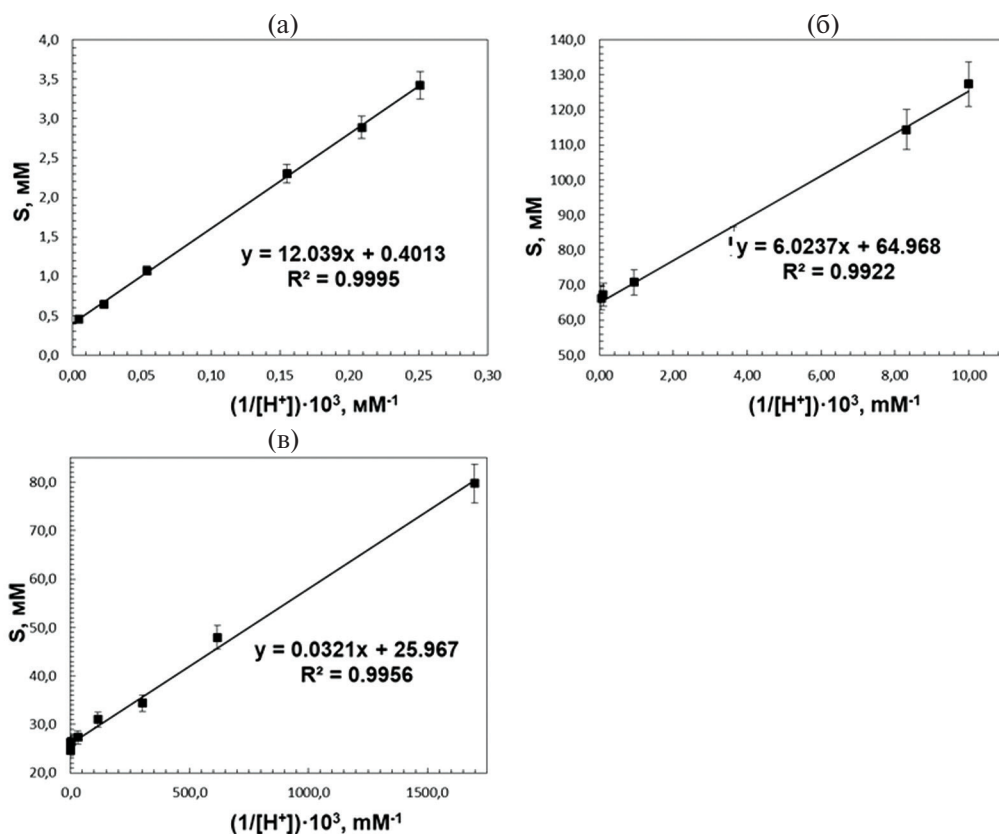


Рис. 9. Зависимость растворимости цвиттер-ионов от pH при нейтральном и слабощелочном pH: а — 7-АССА; б — CFC; в — PG

Fig. 9. Dependence of solubility of zwitterions on pH at neutral and weakly alkaline pH: а — 7-ACCA; б — CFC; в — PG

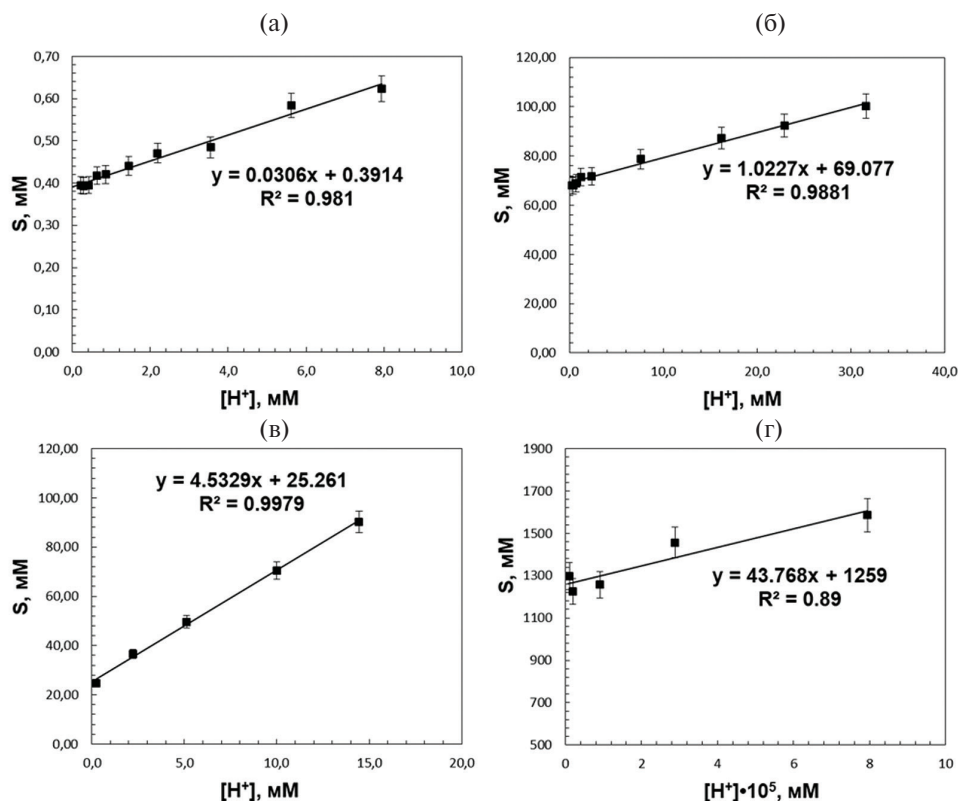


Рис. 10. Зависимость растворимости компонентов, вовлеченных в процесс синтеза CFC, от pH при слабокислом, нейтральном и щелочном pH: а – 7-ACCA; б – CFC; в – PG; г – МЕРГ·НCl

Fig. 10. Dependence of solubility of compounds involved in CFC synthesis on pH at slightly acidic, neutral and alkaline pH: а – 7-ACCA; б – CFC; в – PG; г – МЕРГ·НCl

Таблица 2. Константы ионизации и характеристическая растворимость 7-ACA и соединений, вовлеченных в процесс синтеза CFC

Table 2. Ionization constants and characteristic solubility of 7-ACA and compounds involved in CFC synthesis

Соединение	Константы ионизации		$S^{\pm(o)}$, mM
	pK_1	pK_2	
7-ACA	2.24 ± 0.03 [21]	4.58 ± 0.05 [21]	1.42 ± 0.14 [21]
7-ACCA	1.89 ± 0.03	4.52 ± 0.05	0.40 ± 0.03
CFC	1.17 ± 0.03	7.04 ± 0.05	67.4 ± 0.5
PG	2.25 ± 0.03	8.91 ± 0.05	25.6 ± 0.5
МЕРГ·НCl	—	6.54 ± 0.05	1260 ± 10

Условия: 30°C, 0.3 М ФБ, $C_{ЭГ} = 43$ об. %

Conditions: 30°C, 0.3 M FB, $C_{EG} = 43$ vol. %

Рассчитанные значения констант ионизации и характеристической растворимости для 7-ACCA, CFC, PG и МЕРГ·НCl приведены в табл. 2. Данные для 7-ACA, являющейся КА при синтезе CFG, были получены ранее в работе [21], где растворимость 7-ACA изучалась в идентичных условиях (30°C, 0.3 М ФБ, $C_{ЭГ} = 43$ об. %).

С использованием констант, представленных в табл. 2, были рассчитаны теоретические кривые зависимости растворимости 7-ACA, 7-ACCA, PG, CFC от pH по уравнению (1) и МЕРГ·НCl по уравнению (1.3) (рис. 11).

Основываясь на растворимости соединений, вовлеченных в процессы синтеза CFC и CFG,

выбраны условия для оптимизации процессов биокаталитического синтеза CFC и CFG по начальной концентрации КА (C_{KA}^0) и мольному избытку АА над КА (X^0).

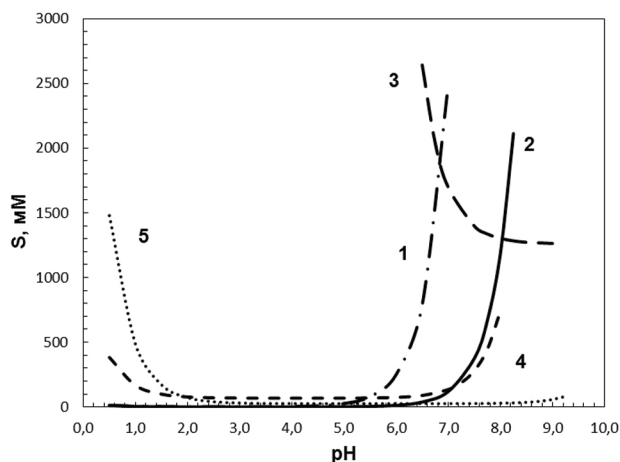


Рис. 11. Теоретические кривые зависимости растворимости 7-АСА и компонентов реакционной смеси синтеза CFC от pH: 1 – 7-АСА; 2 – 7-АССА; 3 – МЕРГ·НСl; 4 – CFC; 5 – РГ. (30°C, 0.3 М ФБ, $C_{ЭГ} = 43$ об.%)

Fig. 11. Theoretical curves of the dependence solubility of 7-ACA and components of the reaction mixture for the synthesis of the CFC on pH

1 – 7-АСА; 2 – 7-АССА; 3 – МЕРГ НСl; 4 – CFC; 5 – РГ. (30°C, 0.3 М FB, $C_{EG} = 43$ vol.%)

В диапазоне pH 5.7 – 6.3, близком к оптимуму синтетазной активности IEAEN (pH 6.0), растворимость 7-АСА высока (от 120 до 500 мМ), что позволяет готовить исходный раствор субстратов для синтеза CFG простым растворением КА с последующим внесением в него АА.

Растворимость 7-АССА в диапазоне pH 5.7 – 6.3 составляет от 6 до 24 мМ, что примерно в 20 раз ниже, чем растворимость 7-АСА. В связи с этим при синтезе CFC для приготовления исходного раствора субстратов, содержащего 7-АССА в концентрации, превышающей ее растворимость в рабочем для фермента диапазоне pH, использовали эффект перенасыщения по КА [25]. Аликвоту 7-АССА растворяли при pH около 7.4, где ее растворимость велика (300 мМ), затем вносили aliquоту МЕРГ·НСl, и после полного растворения АА при необходимости доводили pH до 6.3 путем добавления 1 М H_3PO_4 с сохранением 7-АССА в растворе. В настоящем исследовании были получены исходные растворы субстратов для синтеза CFC с концентрацией 7-АССА вплоть до $C_{KA}^0 = 75$ мМ. При этом растворимость CFC (70–80 мМ) обеспечивала его сохранение в растворе даже при полной трансформации КА в продукт. В том же диапазоне C_{KA}^0 изучали процесс биокаталитического синтеза CFG.

Высокая растворимость МЕРГ·НСl (3200 – 10000 мМ), значительно превосходящая растворимость 7-АССА (6–24 мМ) и 7-АСА (120–500 мМ), в рабочем диапазоне pH позволяла использовать большой мольный избыток АА над КА (X^0). При изучении процессов биокаталитического синтеза CFC и CFG X^0 варьировали в диапазоне от 1.5 до 4.5 М/М.

С точки зрения растворимости, 7-АСА в качестве КА обладает преимуществом по сравнению с 7-АССА из-за возможности достижения большей концентрации целевого продукта трансформации в реакционной смеси. Однако, при увеличении концентрации субстратов, РГ, являющийся продуктом гидролитических реакций в процессе синтеза CFC или CFG, будет выпадать в осадок из-за своей малой растворимости (25 – 26 мМ) и значительно ухудшать массообменные процессы, снижая эффективность синтеза целевого продукта.

Оптимизация катализируемых IEAEN процессов синтеза CFC и CFG по начальной концентрации КА и мольному избытку АА над КА

Критерием оптимизации процессов биокаталитического синтеза CFC и CFG являлся максимальный достигаемый выход целевого продукта ($\eta^{\max}$). Оптимизацию проводили по двум параметрам: начальной концентрации КА (C_{KA}^0) в диапазоне от 10 до 75 мМ и мольному из-

бытку АА над КА ($X^0 = \frac{C_{AA}^0}{C_{KA}^0}$) в диапазоне 1.5–4.5 М/М. Эксперименты

осуществляли в следующих, предварительно выбранных условиях: 30°C, 0.3 М ФБ, $C_{ЭГ} = 43$ об.%, спонтанное снижение pH от значения, при котором растворяли субстраты (6.5–6.8), до pH 5.7 и поддержание значения pH в диапазоне 5.7–6.0 до завершения процесса. Биокатализатор IEAEN вносили в количестве, обеспечивающем содержание активного фермента в реакционной смеси $C_E = 5$ –15 МЕ/мл, так, чтобы продолжительность процесса, включая плато максимальной концентрации продукта, составляла 30–60 мин.

В каждом эксперименте по синтезу β -лактама осуществляли динамический контроль состава реакционной смеси по всем компонентам (КА, АА, целевой продукт, РГ) и рассчитывали балансы по β -лактаму и РГ. Примеры зависимостей состава реакционных смесей от времени в процессах биокаталитического синтеза CFC и CFG, катализируемого IEAEN, представлены на рис. 12 и 13 соответственно.

В обоих процессах наблюдалось плато на кривых накопления целевого продукта (рис. 12 и 13, кривые 1 и 2). В этих экспериментах максимальный выход CFC, рассчитанный как среднее значение на плато, составил (85.0 ± 0.8) %, максимальный выход CFG – (85.6 ± 1.5) %. Снижение баланса по

PG через 20 минут (рис. 12 и 13, кривые 6) обусловлено выпадением PG в осадок из-за его низкой растворимости. В обоих процессах стопроцентный баланс по КА сохранялся вплоть до достижения плато максимального выхода по целевому продукту ($\eta_{\text{макс}}$). Далее в ряде экспериментов по биокаталитическому синтезу (например, см. рис.13) наблюдалось его незначительное падение (не более, чем на 5 %), вызванное, щелочной деструкцией продуктов [10] при поддержании pH.

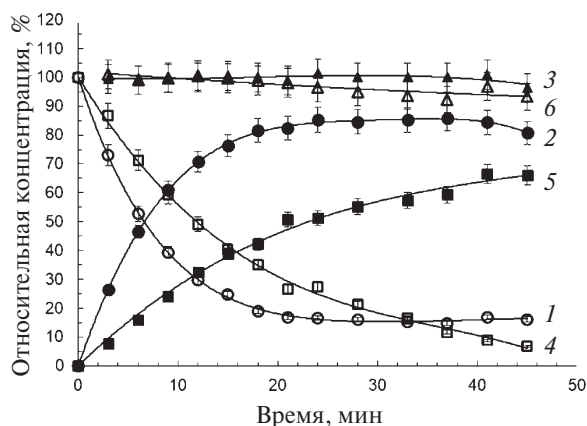


Рис. 12. Зависимость состава реакционной смеси от времени в процессе синтеза CFC, катализируемого IEAEN при $C_{\text{КА}} = 30$ мМ, $X^0 = 4.5$ М/М: 1 – 7-ACCA; 2 – CFC; 3 – баланс по β -лактамному ядру; 4 – MEPG; 5 – PG; 6 – баланс по PG

Fig. 12. Dependence in the composition of the reaction mixture with time during CFC synthesis catalyzed by IEAEN at $C_{\text{КА}} = 30$ mM, $X^0 = 4.5$ M/M: 1 – 7-ACCA; 2 – CFC; 3 – balance for β -lactam; 4 – MEPG; 5 – PG; 6 – balance by PG

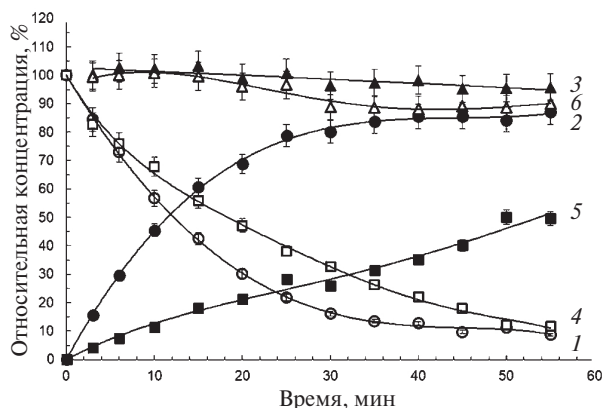
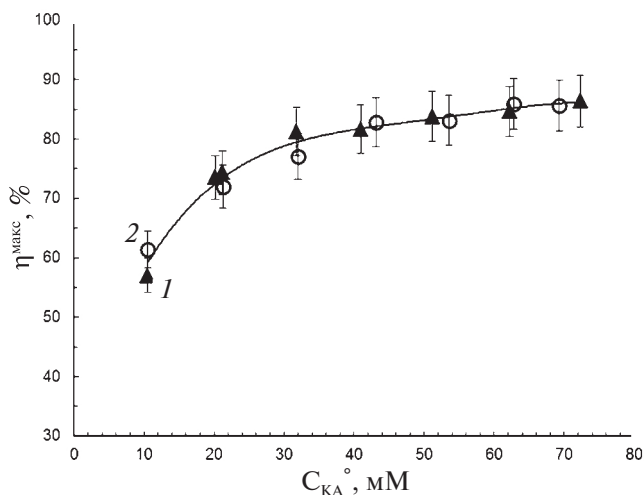


Рис. 13. Зависимость состава реакционной смеси от времени в процессе синтеза CFG, катализируемого IEAEN ($C_{\text{КА}} = 30$ мМ, $X^0 = 4.0$ М/М): 1 – 7-ACA; 2 – CFG; 3 – баланс по β -лактамному ядру; 4 – MEPG; 5 – PG; 6 – баланс по PG.

Fig. 13. Dependence in the composition of the reaction mixture with time during CFG synthesis catalyzed by IEAEN ($C_{\text{КА}} = 30$ mM, $X^0 = 4.0$ M/M): 1 – 7-ACA; 2 – CFG; 3 – balance for β -lactam; 4 – MEPG; 5 – PG; 6 – balance by PG

Зависимости максимального выхода процессов биокаталитического синтеза CFC и CFG ($\eta_{\text{макс}}$, %) от начальной концентрации КА ($C_{\text{КА}}^0$, мМ) были исследованы в диапазоне 10–70 мМ при $X^0 = 3.0$ М/М. Во всем исследованном диапазоне $C_{\text{КА}}^0$ точки, характеризующие оба процесса, в пределах ошибки эксперимента ложатся на общую кривую с насыщением (рис. 14). При насыщении в диапазоне $C_{\text{КА}}^0$ от 60 до 70 мМ максимальный выход процессов биокаталитического синтеза CFC и CFG одинаков и составлял в среднем 85.6 ± 2.9 %.

Рис. 14. Зависимость максимального выхода CFC и



CFG от начальной концентрации КА при биокаталитическом ацилировании, катализируемым IEAEN ($X^0 = 3.0$ М/М, $C_E = 5$ –17 МЕ/мл): 1 – синтез CFC из 7-ACCA и MEPG; 2 – синтез CFG из 7-ACA и MEPG

Fig. 14. Dependence of the maximum yield of CFC and CFG on the initial KA concentration in biocatalytic acylation catalyzed by IEAEN ($X^0 = 3.0$ M/M, $C_E = 5$ –17 IU/ml): 1 – synthesis of CFC from 7-ACCA and MEPG; 2 – synthesis of CFG from 7-ACA and MEPG

Зависимости максимального выхода ($\eta_{\text{макс}}$, %) CFC и CFG от начального мольного избытка АА над КА (X^0 , М/М) были исследованы в диапазоне 1.5–4.7 мМ при $C_{\text{КА}}^0 = 30$ мМ. Во всем исследованном диапазоне X^0 точки, характеризующие оба процесса, в пределах ошибки эксперимента ложатся на общую кривую с насыщением (рис. 15). При насыщении в диапазоне $X^0 = 3.5$ –4.7 М/М максимальный выход процессов биокаталитического синтеза CFC и CFG одинаков и составляет в среднем (84.9 ± 1.0) %.

На основании полученных результатов были выбраны следующие оптимальные условия процессов синтеза CFC и CFG, катализируемых IEAEN: 30°C , 0.3 М ФБ, $C_{\text{ЭГ}} = 43$ об.%, спонтанный градиент pH в диапазоне pH 6.4–5.7, $C_{\text{КА}}^0 = 60$ –70 мМ, $X^0 = 3.0$ –3.2 М/М. Использование большего избытка АА над КА ($X^0 > 3.2$

М/М) при выбранных оптимальных значениях C_{KA}^0 (60–70 мМ) приводило к быстрому выпадению в осадок РГ из-за его низкой растворимости, резкому ухудшению массообменных процессов и снижению максимального выхода целевого продукта. В выбранных оптимальных условиях максимальный выход биокаталитического синтеза как CFC, так и CFG составил $84.9 \pm 1.5\%$.

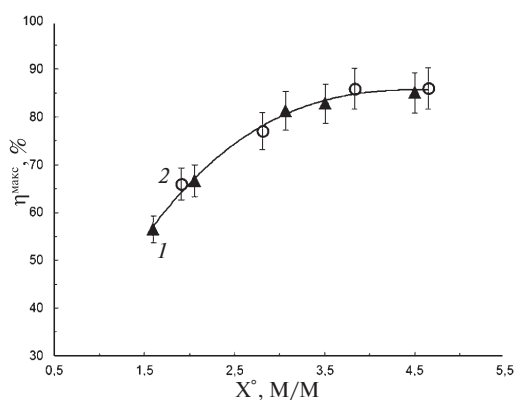


Рис. 15. Зависимость максимального выхода продукта от начального мольного избытка АА над КА (X° , мМ) при биокаталитическом ацилировании, катализируемым ИЕАЕН ($C_{KA}^0 = 30$ мМ, $C_E = 9-12$ МЕ/мЛ): 1 – синтез CFC из 7-АССА и МЕРРГ; 2 – синтез CFG из 7-АСА и МЕРРГ

Fig. 15. Dependence of the maximal yield of the product on the initial molar excess of AA over KA (X° , mM) in biocatalytic acylation catalyzed by IEAEN ($C_{KA}^0 = 30$ mM, $C_E = 9-12$ IU/ml): 1 – synthesis of CFC from 7 ACCA and MERPG; 2 – synthesis of CFG from 7-ACA and MERPG

Полученные результаты (рис. 14 и 15) свидетельствуют о том, что АЕН одинаково эффективно катализирует ацилирование ключевых аминокислот 7-АССА и 7-АСА, несущих в С3-положении С1 и ацетоксиметильную группу, соответственно. Таким образом, ключевые биокаталитические стадии традиционного и альтернативного химико-биокаталитических путей синтеза CFC (рис. 1, трансформации 2 и 3) являются одинаково эффективными.

Различная специфичность АЕН к ацильным акцепторам (КА) определяется силой гидрофобного взаимодействия цефема (структуры цефалоспорины, несущей β-лактамное ядро) с активным центром АЕН [5]. Таким образом, одинаковая эффективность процессов биокаталитического ацилирования 7-АССА и 7-АССА, катализируемых ИЕАЕН, вероятно, заключается в том, что способность к гидрофобному взаимодействию ацетоксиметильной группы и С1, стоящих в С3-положении этих КА, с цефемом отличаются друг от друга незначительно.

Таким образом, был изучен и оптимизирован процесс биокаталитического ацилирования 7-АССА, катализируемый ИЕАЕН, с получением антибиотика CFC. В оптимизированных условиях проведено сравнительное изучение процессов биокаталитического ацилирования 7-АССА и 7-АССА. Показано, что эти процессы являются равноэффективными и могут применяться в зависимости от наличия реактивов и возможности создания необходимых условий проведения процесса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Патент РФ. 2012. № 2502797.
2. Патент США. 1977. № US4152432A.
3. Постников С. С. Токсическое действие антибиотиков // В кн. Практическая пульмонология / Под ред. Белевского А.С. Москва: Атмосфера. 2006. №2. С. 43–47.
4. Штиллер В. Уравнение Аррениуса и неравновесная кинетика. – М.: Мир, 2000. 176 с.
5. Barends T.R.M., Polderman-Tijmes J. J., Jekel P. A., et al. The sequence and crystal structure of the alpha-amino acid ester hydrolase from Xanthomonas citri define a new family of beta-lactam antibiotic acylases // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 23076–23084. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302246200>
6. Chen J., Jiang B., Lou H., Yu L., Ruan, Z. Bioequivalence Studies of 2 Oral Cefaclor Capsule Formulations in Chinese Healthy Subjects // Arzneimittelforschung. 2012. V. 62. № 3. P. 134–137. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1298012>
7. Datta S., Christena L.R., Rajaram Y.R.S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials // Biotechnol. 2013. V. 3. P. 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>
8. Deaguero A.L., Blum J.K., Bommarius A.S. Biocatalytic synthesis of β-lactam antibiotics // In: Flickinger M.C. (Ed) Encyclopedia of Industrial Biotechnology: bioprocess, bioseparation, and cell technology. John Wiley & Sons, Inc. 2010. P. 1–32. <https://doi.org/10.1002/9780470054581.eib640>

9. Eldarov M.A., Sklyarenko A.V., Mardanov A.V., et al. Cephalosporin-Acid Synthetase of *Escherichia coli* Strain VKPM B-10182: Genomic Context, Gene Identification, Producer Strain Production // Appl. Biochem. Microbiol. 2015. V. 51. № 5. P. 505–510. <https://doi.org/10.1134/S0003683815050051>
10. Ivama V. M., Rodrigues L. N. C., Guaratini C. C. I., Zanoni M. V. B. Spectrophotometric determination of cefaclor in pharmaceutical preparations // Química Nova. 1999. V. 2. № 2. <https://doi.org/10.1590/S0100-40421999000200011>
11. Kurochkina V.B., Sklyarenko A.V. Biotechnology: State of the Art and Prospects for Development. /Ed. G.E. Zaikov. New-York: Nova Science Publishers 2008. Ch. 20. P. 175–204.
12. Kurochkina V. B., Sklyarenko A. V., Berezina O. V., Yarotsky S. V. Alpha-amino acid ester hydrolases: Properties and applications // Appl. Biochem. Microbiol. 2013. V. 49. №8. P. 672–694. <https://doi.org/10.1134/S0003683813080036>
13. Kurochkina V. B., Sklyarenko A. V., Satarova J. 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. <https://doi.org/10.1007/s00449-011-0560-9>
14. Ma L., Hu K., Yu W., et al. Enzymatic Synthesis of β -lactam Antibiotics: From Enzyme Dataset Construction to Action Mechanism and Semi-Rational Design // Curr Protein Pept Sci. 2026. V. 27. № 4. P. 339–361. <https://doi.org/10.2174/0113892037376289250825072957>
15. Pan X., Xu L., Li Y., et al. Strategies to Improve the Biosynthesis of β -Lactam Antibiotics by Penicillin G Acylase: Progress and Prospects // Front. Bioeng. Biotechnol. 2022. V. 10. 936487. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.936487>
16. Qu X., Deng Q., Li Y., et al. Pharmacokinetics and safety of the two oral cefaclor formulations in healthy chinese subjects in the fasting and postprandial states // Front. Pharmacol. 2022. V. 13. 1012294. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1012294>
17. Sheldon R.A., Woodley J.M. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry // Chem. Reviews. 2018. V. 118. № 2. P. 801–838. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00203>
18. Sklyarenko A.V., Berezina O. V., Satarova D. E., Yarotsky S. V. Recombinant alpha-amino ester acid hydrolase from *Xanthomonas rubrilineans* VKPM B-9915 is a highly efficient biocatalyst of cephalixin synthesis // Mosc. Univ. Chem. Bull. 2014. V.69. № 2. P. 62–67. <https://doi.org/10.3103/S0027131414020084>
19. 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. <https://doi.org/10.1134/S0003683815060150>
20. Sklyarenko A.V., Groshkova I.A., Sidorenko A.I., Yarotsky S.V. Alternative Cefazolin Synthesis with a Cephalosporin-Acid Synthetase // Appl. Biochem. Microbiol. 2020. V. 56. № 5. P. 526–537. <https://doi.org/10.1134/S0003683820050130>
21. Sklyarenko A.V., Groshkova I.A., Krestyanova I.N., Yarotsky S.V. Alternative synthesis of cefamandole using biocatalytic acylation catalyzed by immobilized cephalosporin-acid synthetase // Appl. Biochem. Microbiol. 2022. V. 58. №3. P. 251–260. <https://doi.org/10.1134/S0003683822030127>
22. Spencer J. L., Flynn E. H., Roeske R. W., et al. Chemistry of Cephalosporin Antibiotics. VII. Synthesis of Cephaloglycin I and Some Homologs // Journal of Medicinal Chemistry. 1966. V. 9. № 5. P. 746–750. <https://doi.org/10.1021/jm00323a024>
23. Takahashi T., Yamazaki Y., Kato K. Substrate specificity of an α -amino acid ester hydrolase produced by *Acetobacter turbidans* A.T.C.C. 9325 // Biochem J. 1974. V.137. №3. P. 497–503. <https://doi.org/10.1042/bj1370497>
24. Volpato G., Rodrigues R. C., Fernandez-Lafuente R. Use of Enzymes in the Production of Semi-Synthetic Penicillins and Cephalosporins: Drawbacks and Perspectives // Curr Med Chem. 2010. V. 17. P. 3855–3873. <https://doi.org/10.2174/092986710793205435>
25. Wang L., Sklyarenko A.V., Duanhua Li., et al. Enzymatic synthesis of cefazolin using immobilized recombinant cephalosporin-acid synthetase as the biocatalyst // Bioprocess Biosyst Eng. 2018. V. 41. P. 1851–1867. <https://doi.org/10.1007/s00449-018-2007-z>

RERERENCES

1. RF Patent no. 250279, 2012.
2. US Patent no. 4152432A, 1977.
3. Postnikov S. S. Toxic Effects of Antibiotics. /Ed. A. S. Belevsky. Moscow: *Practical Pulmonol.*, 2006, no. 2, pp. 43–47.
4. Stiller W. Arrhenius equation and nonequilibrium kinetics. /Ed. L.S. Polak. Moscow: *Mir*, 2000, pp. 176.
5. Barends T.R.M., Polderman-Tijmes J. J., Jekel P. A., et al. The sequence and crystal structure of the alpha-amino acid ester hydrolase from *Xanthomonas citri* define a new family of beta-lactam antibiotic acylases. *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, pp. 23076–23084. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302246200>

6. Chen J., Jiang B., Lou H., Yu L., Ruan, Z. Bioequivalence Studies of 2 Oral Cefaclor Capsule Formulations in Chinese Healthy Subjects. *Arzneimittelforschung*, 2012, vol. 62, no. 3, pp. 134–137. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1298012>
7. Datta S., Christena L.R., Rajaram Y.R.S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *Biotechnol.*, 2013. vol. 3. pp. 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>
8. Deaguero A.L., Blum J.K., Bommarius A.S. Biocatalytic synthesis of β -lactam antibiotics. *Encycl. Ind. Biotechnol.: bioprocess, biosep., cell technol.*, 2010, pp. 1–32. <https://doi.org/10.1002/9780470054581.eib640>
9. Eldarov M.A., Sklyarenko A.V., Mardanov A.V., et al. Cephalosporin-Acid Synthetase of *Escherichia coli* Strain VKPM B-10182: Genomic Context, Gene Identification, Producer Strain Production. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2015, vol. 51, no. 5, pp. 505–510. <https://doi.org/10.1134/S0003683815050051>
10. Ivama V. M., Rodrigues L. N. C., Guaratini C. C. I., Zanoni M. V. B. Spectrophotometric determination of cefaclor in pharmaceutical preparations. *Quím. Nova*, 1999, vol. 2, no. 2. <https://doi.org/10.1590/S0100-40421999000200011>
11. Kurochkina V.B., Sklyarenko A.V. Biotechnology: State of the Art and Prospects for Development. Ed. G.E. Zaikov. New-York: *Nova Science Publishers*, 2008, Ch. 20, pp. 175–204.
12. Kurochkina V. B., Sklyarenko A. V., Berezina O. V., Yarotsky S. V. Alpha-amino acid ester hydrolases: Properties and applications. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2013, vol. 49, no. 8, pp. 672–694. <https://doi.org/10.1134/S0003683813080036>
13. Kurochkina V. B., Sklyarenko A. V., Satarova J. E., Yarotsky S. V. Ionization constants and solubility of compounds involved in enzymatic synthesis of aminopenicillins and aminocephalosporins. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 2011, vol. 34, no. 9, pp. 1103–1117. <https://doi.org/10.1007/s00449-011-0560-9>
14. Ma L., Hu K., Yu W., et al. Enzymatic Synthesis of β -lactam Antibiotics: From Enzyme Dataset Construction to Action Mechanism and Semi-Rational Design. *Curr Protein Pept Sci*, 2026, vol. 27, no. 4, pp. 339–361. <https://doi.org/10.2174/0113892037376289250825072957>
15. Pan X., Xu L., Li Y., et al. Strategies to Improve the Biosynthesis of β -Lactam Antibiotics by Penicillin G Acylase: Progress and Prospects. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2022, vol. 10. 936487. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.936487>
16. Qu X., Deng Q., Li Y., et al. Pharmacokinetics and safety of the two oral cefaclor formulations in healthy chinese subjects in the fasting and postprandial states. *Front. Pharmacol.*, 2022, vol. 13. 1012294. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1012294>
17. Sheldon R.A., Woodley J.M. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. *Chem. Reviews*, 2018, vol. 118, no. 2, pp. 801–838. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00203>
18. Sklyarenko A.V., Berezina O. V., Satarova D. E., Yarotsky S. V. Recombinant alpha-amino ester acid hydrolase from *Xanthomonas rubrilineans* VKPM B-9915 is a highly efficient biocatalyst of cephalixin synthesis. *Moscow University Chem. Bull.*, 2014, vol.69, no. 2, pp. 62–67. <https://doi.org/10.3103/S0027131414020084>
19. Sklyarenko A.V., Eldarov M. A., Kurochkina V.B., Yarotsky S.V. Enzymatic synthesis of β -lactam acids (review). *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2015, vol. 51, no. 6, pp. 627–640. <https://doi.org/10.1134/S0003683815060150>
20. Sklyarenko A.V., Groshkova I.A., Sidorenko A.I., Yarotsky S.V. Alternative Cefazolin Synthesis with a Cephalosporin-Acid Synthetase. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2020, vol. 56, no. 5, pp. 526–537. <https://doi.org/10.1134/S0003683820050130>
21. Sklyarenko A.V., Groshkova I.A., Krestyanova I.N., Yarotsky S.V. Alternative synthesis of cefamandole using biocatalytic acylation catalyzed by immobilized cephalosporin-acid synthetase. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2022, vol. 58, no. 3, pp. 251–260. <https://doi.org/10.1134/S0003683822030127>
22. Spencer J. L., Flynn E. H., Roeske R. W., Siu F. Y., Chauvette R.R.. J. Medicin. Chem., 1966, vol. 9, no. 5, pp. 746–750. <https://doi.org/10.1021/jm00323a024>
23. Takahashi T., Yamazaki Y., Kato K. Substrate specificity of an α -amino acid ester hydrolase produced by *Acetobacter turbidans* A.T.C.C. 9325. *Biochem J.*, 1974, V.137, no. 3, P. 497–503. <https://doi.org/10.1042/bj1370497>
24. Volpato G., Rodrigues R.C., Fernandez-Lafuente R. Use of Enzymes in the Production of Semi-Synthetic Penicillins and Cephalosporins: Drawbacks and Perspectives. *Curr Med Chem.*, 2010, vol.17, pp. 3855–3873. <https://doi.org/10.2174/092986710793205435>
25. Wang L., Sklyarenko A.V., Duanhua Li., et al. Enzymatic synthesis of cefazolin using immobilized recombinant cephalosporin-acid synthetase as the biocatalyst. *Bioprocess Biosyst Eng.*, 2018, vol.41, pp. 1851–1867. <https://doi.org/10.1007/s00449-018-2007-z>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Грошкова Инга Алексеевна — младший научный сотрудник НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Российская Федерация
E-mail: ingagrosh@mail.ru

Горбунов Никита Андреевич — лаборант-исследователь НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Российская Федерация
E-mail: nick0845@gmail.com

Скляренко Анна Владимировна — кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Российская Федерация
E-mail: asklyarenko@yandex.ru

Яроцкий Сергей Викторович — кандидат химических наук, начальник лаборатории НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Российская Федерация
E-mail: yarser@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.04.2026

После доработки 18.06.2026

Принята к публикации 11.07.2026

AUTHOR INFORMATION

Groshkova, Inga A. — Junior Researcher, National Research Center «Kurchatov Institute», Moscow, Russian Federation
E-mail: ingagrosh@mail.ru

Gorbunov, Nikita A. — Research Laboratory Assistant, National Research Center «Kurchatov Institute», Moscow, Russian Federation
E-mail: nick0845@gmail.com

Sklyarenko, Anna V. — Ph.D. in Chemistry, Leading Researcher, National Research Center «Kurchatov Institute», Moscow, Russian Federation
E-mail: asklyarenko@yandex.ru

Yarotsky, Sergey V. — Ph.D. in Chemistry, Head of Laboratory, National Research Center «Kurchatov Institute», Moscow, Russian Federation
E-mail: yarser@yandex.ru

Received April 27, 2026

Revised June 18, 2026

Accepted July 11, 2026