

Е. А. Шестеренко, И. И. Романовская,
академик НАН Украины С. А. Андронати, Б. Вихер,
Ю. А. Симонов, В. Х. Кравцов, О. В. Севастьянов,
Е. А. Семенишина, В. И. Павловский

Стереоселективный гидролиз 1-метил-5-фенил-3-ацетокси-7-бром-1,2-дигидро-3H- 1,4-бенздиазепин-2-она с помощью свободной и иммобилизованной микросомальной фракции печени свиньи

*З використанням виділеної з печінки свині микросомальної фракції (вихід білка 38 мг/г тканини, естеразна активність 17,25 мкмоль/мг білка · хв) у розроблених умовах здійснено енантіоселективний гідроліз 1-метил-5-феніл-3-ацетокси-7-бром-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону. Методом рентгеноструктурного аналізу доведено отримання S-енантіомера субстрату ($[\alpha]_D^{20} = +195,3^\circ$, $c = 1$ у хлороформі), встановлено його кристалічну і молекулярну структури. Вперше з використанням карагінану з *Phyllophora peruvosa* отримано іммобілізований препарат микросомальної фракції печінки свині, який каталізував енантіоселективний гідроліз досліджуваного 1-метил-5-феніл-3-ацетокси-7-бром-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону впродовж 5 циклів використання в реакторі періодичної дії.*

Карбоксилэстераза (КФ 3.1.1.1) микросомальной фракции (МФ) печени млекопитающих вследствие широкой субстратной специфичности и высокой стереоселективности является перспективным биокатализатором энантиоселективного гидролиза и синтеза сложных эфиров [1], в том числе 3-ацилокси-1,2-дигидро-3H-1,4-бенздиазепин-2-онов [2]. Вместе с тем энантиоселективность МФ печени свиньи в отношении новых производных 1,4-бенздиазепина не изучена. Для получения оптически активных соединений, отличающихся по структуре и фармакологическим свойствам, перспективно использование биокатализаторов многократного действия. Известно, что иммобилизация МФ в гели полимеров (альгинат, хитозан) приводит к стабилизации ферментативной активности [3], однако сведения об эстеразной активности МФ печени свиньи, иммобилизованной в филлофорин, отсутствуют.

Природный сульфатированный полисахарид бурых морских водорослей, филлофорин, близкий по структуре к κ -каррагинану, является перспективным носителем для иммобилизации, поскольку обладает гелеобразующим свойством, легко модифицируется, обеспечивает высокую концентрацию белка в матрице, нетоксичен [4].

Ранее было показано [5], что 3-ацилокси-1,2-дигидро-3H-1,4-бенздиазепин-2-оны в присутствии карбоксилэстеразы микросомальной фракции печени свиньи гидролизуются до соответствующих 3-гидроксипроизводных с различной степенью трансформации в зависимости от величины ацильного фрагмента и условий ферментативного гидролиза.

В настоящем сообщении изложено исследование энантиоселективности гидролиза 3-ацилокси-1,2-дигидро-3*H*-1,4-бенздиазепин-2-онов в разработанных нами условиях [5] на примере 1-метил-5-фенил-3-ацетокси-7-бром-1,2-дигидро-3*H*-1,4-бенздиазепин-2-она. Данный субстрат был использован, исходя из предположения о большей конфигурационной стабильности энантиомеров 1-замещенных 3-гидрокси-1,2-дигидро-3*H*-1,4-бенздиазепин-2-онов. Следовательно, как показано в [6], энергетический барьер взаимопревращений энантиомеров темазепана выше, чем оксазепана. Целью исследования являлось также получение на основе карбоксилэстеразы МФ печени свиньи биокатализатора многоразового использования.

Материалы и методы исследований. В ходе работы использовали МФ печени свиньи, выделенную методом низкоскоростной седиментации при 10000 g в присутствии ионов Ca^{2+} [7].

В выделенной МФ определяли содержание белка методом Лоури в модификации Хартри [8], эстеразную активность (по 1-нафтилацетату) [9]. Степень гидролиза 1-метил-5-фенил-3-ацетокси-7-бром-1,2-дигидро-3*H*-1,4-бенздиазепин-2-она (**I**) оценивали по его убыли спектрофотометрически гидроксаматным методом при λ 540 нм (см. A. Balls, H. Wood, 1956). Ферментативный гидролиз соединения **I** проводили в течение 2,5 ч в среде диметилсульфоксид: К-фосфатный буферный раствор (0,0167 моль/дм³, рН 7,0) в объемных соотношениях 2 : 3, при 37 °С и эстеразной активности свободной и иммобилизованной МФ 100 е./см³. За единицу эстеразной активности принимали количество фермента, катализирующее гидролиз 1 мкмоль 1-нафтилацетата в минуту.

Выделение нетрансформированного энантиомера исходного соединения из реакционной среды после проведения гидролиза осуществляли экстракцией хлороформом с последующим разделением методами колоночной хроматографии с использованием в качестве носителя силикагеля L 40/100 μ ("Chemapol") и препаративной тонкослойной хроматографии (носитель кизельгель 60 GF254, "Merck").

Монокристаллы исследуемого эфира получали перекристаллизацией из диметилсульфоксида, их строение определялось методом рентгеноструктурного анализа. Рентгеновские дифракционные данные измерены при комнатной температуре в монокристалльном дифрактометре "Oxford Diffraction SuperNova" с микрофокусным источником $\text{Cu}_{K\alpha}$ -излучения ($\lambda = 1,54184$). Сбор и обработка данных выполнены с использованием программы CrysAlis^{Pro} [10]. Результаты скорректированы с учетом факторов Лоренца и поляризации, а также поглощения. Структура решена прямым методом по программе SIR-2004 [11] и уточнена методом наименьших квадратов в полноматричном приближении на основе F^2 по программе SHELXL-97 [12]. Все неводородные атомы уточнены в анизотропном приближении. Положения атомов водорода были найдены путем разностного синтеза Фурье. Их уточнение выполнено с учетом идеальной молекулярной геометрии (C–H 0,093–0,098 нм) и изотропным температурным параметром, превышающим в 1,2 раза эквивалентный изотропный температурный фактор атома углерода, с которым они связаны. Абсолютная структура определена на основе эффекта аномального рассеяния [13].

Кристаллы $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{BrN}_2\text{O}_3$ моноклинные, пространственная группа $P2_1$, $a = 0,8443(8)$, $b = 0,6923(6)$, $c = 1,4251(13)$ нм, $\beta = 98,8787(9)^\circ$, $V = 0,8229(13)$ нм³, $Z = 2$, $d_{\text{выч}} = 1,563$ г/см³, $\mu(\text{Cu}_{K\alpha}) = 3,569$ мм⁻¹, 12683 рентгеновских отражений были измерены до $\theta_{\text{max}} = 72,11^\circ$ с кристалла размером $0,6 \times 0,2 \times 0,2$ мм ($R_{\text{int}} = 0,0266$, $R_\sigma = 0,0122$). Значительные R -факторы для 3138 независимых отражений с $I > 2\sigma(I)$ и 219 уточняемых параметров равны: $R_1 = 0,0225$, $wR_2 = 0,0601$ (для всех 3146 независимых отражений). Па-

раметр Флэка $x = 0,000(13)$ (для 8192 фриделевских пар отражений). Структурные данные депонированы в Кембриджском банке структурных данных под номером CCDC 789193.

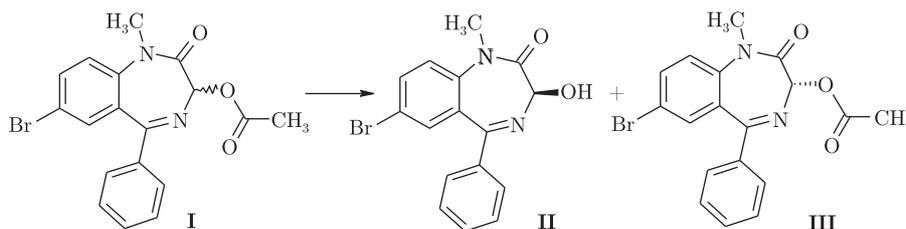
Для иммобилизации МФ использовали каррагинан из *Phyllophora nervosa*, предоставленный с. н. с. ГП Одесского центра ЮгНИРО, канд. хим. наук Р. Ф. Замбриборщом.

Иммобилизованный препарат получали смешиванием МФ с 5%-м раствором филлофораина (массовое соотношение белок : носитель 1 : 5) с последующим формированием гранул в 20%-м растворе CaCl_2 ($t = 0-4$ °C, $\tau = 30$ мин).

Влияние pH инкубационной среды на активность карбоксилэстеразы свободной и иммобилизованной МФ изучали в среде диметилсульфоксид / буферный раствор при pH 3,0–10,0; $t = 37$ °C. Определение температурного оптимума свободной и иммобилизованной МФ проводили в интервале температур от 10 до 60 °C при pH 8,0. Термостабильность эстеразной активности МФ изучали инкубацией равных по активности проб свободного и иммобилизованного препаратов в той же среде (pH 8,0) при 50 °C в течение 5 ч. Константы термоинактивации рассчитывали по tg угла наклона прямой графика зависимости десятичного логарифма величины остаточной активности от времени методом линейной регрессии.

Результаты и их обсуждение. Из печени свиньи получена МФ с выходом белка 38 мг/г ткани и эстеразной активностью 17,25 мкмоль/мг белка · мин (по 1-нафтилацетату).

С помощью выделенной МФ в разработанных условиях [5] осуществлен гидролиз 1-метил-5-фенил-3-ацетокси-7-бром-1,2-дигидро-3*H*-1,4-бенздиазепин-2-она (**I**) с 50%-й степенью трансформации:



Показано, что продуктом гидролиза является 1-метил-5-фенил-7-бром-3-гидрокси-1,2-дигидро-3*H*-1,4-бенздиазепин-2-он (**II**). Его структура подтверждена методами ТСХ, УФ спектроскопии и масс-спектрометрии. Подобно другим 3-гидрокси-1,2-дигидро-3*H*-1,4-бенздиазепин-2-онами продукт подвергается быстрой рацемизации в процессе гидролиза и выделения.

Установлены кристаллическая и молекулярная структуры и абсолютная конфигурация полученного *S*-энантиомера субстрата (**III**) ($[\alpha]_D^{20} = +195,3^\circ$). Соединение кристаллизуется в моноклинной хиральной пространственной группе $P2_1$. На рис. 1 показано строение *S*-энантиомера субстрата (**III**) и его абсолютная конфигурация. Семичленный цикл в молекуле **III** принимает конформацию псевдованны. Атомы N1, C2, N4 и C5, определяющие дно ванны, расположены практически в одной плоскости, отклоняясь от нее не более чем на 0,00017 нм, а атомы C3, C10 и C11 отклоняются в одну сторону от этой плоскости на 0,0772(25), 0,07315(30) и 0,07256(30) нм соответственно. Диэдральные углы между плоскостью дна ванны и двумя плоскостями, определяемыми атомами N1, C10, C11, C5 и C2, C3, N4, равны $36,3(1)^\circ$ и $62,8(1)^\circ$ соответственно. Фенильное кольцо образует с бромбензогруппой диэдральный угол $64,92(6)^\circ$. Приведенные диэдральные углы близки по величине к аналогичным углам в родственных 7-бромзамещенных бенздиазепинах [14], в которых они принимают значение в интервале от $34,9$ до $39,5^\circ$, от $59,1$ до $61,2^\circ$ и от $59,5$ до $78,0^\circ$

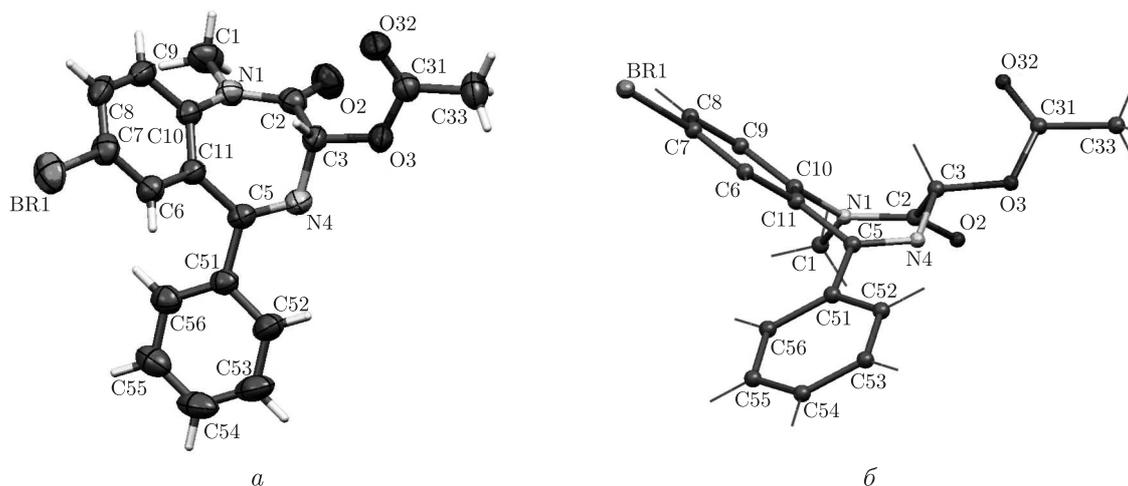


Рис. 1. Молекулярная структура *S*-энантиомера субстрата (III):
a — вид молекулы в проекции на ее среднюю плоскость (эллипсоиды тепловых колебаний даны для 50%-го уровня вероятности); *б* — вид молекулы, иллюстрирующий ее конформацию

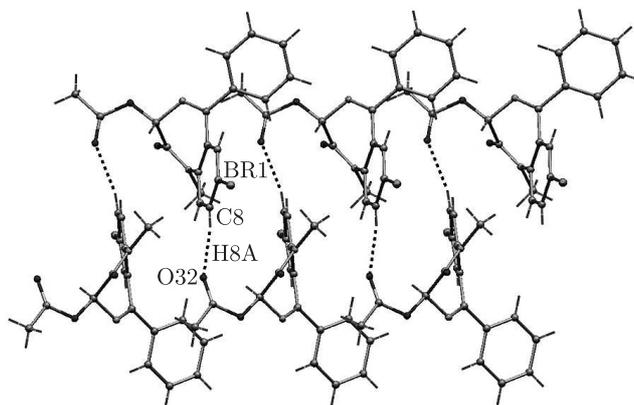


Рис. 2. Цепочки в кристалле *S*-энантиомера субстрата (III)

соответственно, что свидетельствует об устойчивости конформации молекулы. Экваториально расположенная ацетоксигруппа образует с дном ванны диэдральный угол $49,96(9)^\circ$, торсионный угол $C2-C3-O3-C31$ равен $79,8(2)^\circ$. Длины связей в молекуле и некоторые валентные углы приведены в табл. 1 и близки к соответствующим им величинам в родственных 7-бромзамещенных бензодиазепинах [14]. Расстояния $O2-C2 = 0,1209(2)$ нм, $O32-C31 = 0,1203(3)$ нм и $N(4)-C(5) = 0,1277(2)$ нм подтверждают двойной характер этих связей. Расстояние $N(1)-C(10) = 0,1415(2)$ нм свидетельствует о π -сопряжении амидогруппы с бромбензогруппой. Координация атома азота N1 плоскостная, сумма валентных углов при нем равна $359,92^\circ$.

В кристалле молекулы, связанные двойной винтовой осью, образуют цепочки, параллельные кристаллографической оси *b* за счет $C8-H \cdots O32(1-x, 0,5+y, -z) = 0,3439(2)$ нм ($H \cdots O32 = 0,253$ нм, угол $C8-H \cdots O32 = 166,5^\circ$) водородной связи (рис. 2). Внутри цепочки взаимное расположение 7-бромзамещенных бензольных колец, конденсированных с диазепиновым циклом, близко к антипараллельному, что указывает на диполь-дипольное

и стэкинг-взаимодействия между ними. Кратчайшее С...С расстояние между соседними в цепочке бензольными кольцами составляет 0,3379 нм, а центроид...центроид расстояние равно 0,450 нм.

Полученные данные свидетельствуют о большей специфичности карбоксилэстеразы МФ печени свиньи к *R*-энантиомеру исследуемого соединения **I**.

В результате иммобилизации получен биокатализатор с 80%-м сохранением исходной эстеразной активности после иммобилизации и при хранении в течении 6 мес., в форме прочных гранул сферической формы диаметром 2,5 мм — стабильный в используемой водно-органической среде. Показано отсутствие значительных отличий рН (8,0) и температурных (37 °С) оптимумов эстеразной активности свободного и иммобилизованного препаратов, однако последний характеризуется большей термостабильностью (*k* термоинактивации составили для свободной и иммобилизованных форм $0,8 \cdot 10^{-3}$ мин⁻¹ и $1,5 \cdot 10^3$ мин⁻¹ соответственно).

С помощью иммобилизованной МФ осуществлен стереоселективный гидролиз соединения **I** с образованием 1-метил-5-фенил-7-бром-3-гидрокси-1,2-дигидро-3*H*-1,4-бенздиазепин-2-она и максимальной степенью превращения 50% на протяжении 5 циклов применения иммобилизованного препарата в реакторе периодического действия (рис. 3).

Таким образом, с помощью микросомальной фракции печени свиньи осуществлен стереоселективный гидролиз 1-метил-5-фенил-3-ацетокси-7-бром-1,2-дигидро-3*H*-1,4-бенздиазепин-2-она; установлены молекулярная и кристаллическая структуры выделенного *S*-энантиомера субстрата. В результате иммобилизации МФ печени свиньи в филофорин по-

Таблица 1. Длины связей и некоторые валентные углы в молекуле **III**

Связь	<i>d</i> , нм	Угол	ω , град
Br(1)–C(7)	0,1893(19)	C(31)–O(3)–C(3)	115,91(15)
O(2)–C(2)	0,1209(2)	C(2)–N(1)–C(10)	124,08(15)
O(3)–C(31)	0,1350(2)	C(2)–N(1)–C(1)	116,40(17)
O(3)–C(3)	0,1424(2)	C(10)–N(1)–C(1)	119,44(16)
O(32)–C(31)	0,1203(3)	C(5)–N(4)–C(3)	117,12(14)
N(1)–C(2)	0,1368(3)	O(2)–C(2)–N(1)	123,43(18)
N(1)–C(10)	0,1415(2)	O(2)–C(2)–C(3)	122,85(18)
N(1)–C(1)	0,1471(2)	N(1)–C(2)–C(3)	113,70(15)
N(4)–C(5)	0,1277(2)	O(3)–C(3)–N(4)	105,63(13)
N(4)–C(3)	0,1442(2)	O(3)–C(3)–C(2)	109,53(15)
C(2)–C(3)	0,1527(3)	N(4)–C(3)–C(2)	108,35(15)
C(5)–C(11)	0,1490(2)	N(4)–C(5)–C(11)	123,59(16)
C(5)–C(51)	0,1490(2)	N(4)–C(5)–C(51)	117,80(14)
C(6)–C(11)	0,1395(2)	C(11)–C(5)–C(51)	118,60(15)
C(10)–C(11)	0,1406(2)	C(6)–C(11)–C(10)	119,34(15)
C(6)–C(7)	0,1374(2)	C(6)–C(11)–C(5)	118,44(14)
C(7)–C(8)	0,1393(3)	C(10)–C(11)–C(5)	122,19(15)
C(8)–C(9)	0,1374(3)	C(7)–C(6)–C(11)	120,47(16)
C(9)–C(10)	0,1399(3)	C(6)–C(7)–C(8)	120,90(17)
C(31)–C(33)	0,1483(3)	C(6)–C(7)–Br(1)	119,74(14)
C(51)–C(56)	0,1391(3)	C(8)–C(7)–Br(1)	119,35(14)
C(51)–C(52)	0,1399(3)	C(9)–C(10)–N(1)	119,10(16)
C(52)–C(53)	0,1382(3)	C(11)–C(10)–N(1)	122,10(16)
C(53)–C(54)	0,1367(4)	O(32)–C(31)–O(3)	122,44(19)
C(54)–C(55)	0,1384(4)	O(32)–C(31)–C(33)	126,20(2)
C(55)–C(56)	0,1388(3)	O(3)–C(31)–C(33)	111,33(18)

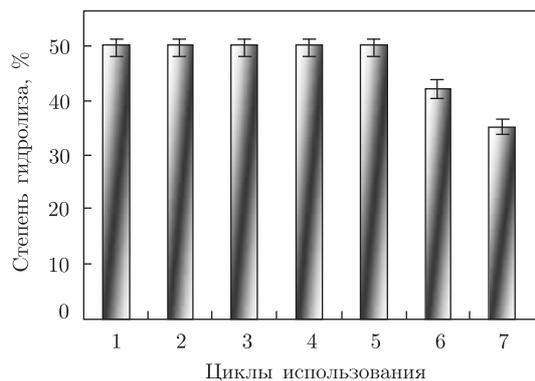


Рис. 3. Зависимость степени трансформации **I** от кратности применения иммобилизованного препарата ($t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\text{pH } 7,0$; $\tau = 1\text{ ч}$)

лучен стабильный препарат, катализирующий энантиоселективный гидролиз исследуемого 1-метил-5-фенил-3-ацетокси-7-бром-1,2-дигидро-3*H*-1,4-бенздиазепин-2-она на протяжении 5 циклов применения в реакторе периодического действия.

1. *Tamm C.* Pig liver esterase catalyzed hydrolysis: substrate specificity and stereoselectivity // *Pure Appl. Chem.* – 1992. – **64**, No 8. – P. 1187–1191.
2. *Liu K., Guengerich F. P., Yang S. K.* Enantioselective hydrolysis of lorazepam 3-acetate by esterases in human and rat liver microsomes and rat brain S9 fraction // *Drug Metab. Dispos.* – 1991. – **19**, No 3. – P. 609–613.
3. *Zihnioglu F., Telefoncu A.* Preparation and characterization of chitosan-entrapped microsomal UDP-glucuronyl transferase // *Artific. Cells, Blood Substit. and Biotechnol.* – 1995. – **23**, No 4. – P. 545–552.
4. *Замбриборц Р. Ф.* Особенности полисахаридов филофоры Броди и пути их использования в пищевой промышленности // *Промысловые водоросли и их использование.* – Москва: ВНИРО, 1987. – С. 132–139.
5. *Андронати С. А., Шестеренко Е. А., Севастьянов О. В. и др.* Гидролиз сложных эфиров 7-бром-3-гидрокси-5-фенил-1,2-дигидро-3*H*-1,4-бенздиазепин-2-она микросомальной фракцией печени свиньи // *Вісн. Одес. ун-та, Сер. Хімія.* – 2008. – **13**, № 11. – С. 37–45.
6. *Oswald P., Desmet K., Sandra P. et al.* Determination of the enantiomerization energy barrier of some 3-hydroxy-1,4-benzodiazepine drugs by supercritical fluid chromatography // *J. Chromatogr. B.* – 2002. – **779**, No 2. – P. 283 – 295.
7. *Kamath S. A., Ananth N. K.* Interaction of Ca^{2+} with endoplasmic reticulum of rat liver: a standardized procedure for the isolation of rat liver microsomes // *Anal. Biochem.* – 1972. – **48**, No 1. – P. 53–61.
8. *Hartree E. F.* Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response // *Ibid.* – 1972. – **48**, No 1. – P. 422–427.
9. *Macsay G., Tegyei Z., Otvos L.* Stereospecificity of esterases hydrolysing oxazepam acetate // *J. Pharm. Sci.* – 1978. – **67**, No 9. – P. 1208–1210.
10. *CrysAlis Pro software, ver. 1.171.33, Oxford Diffraction Ltd, Abingdon, Oxfordshire, UK, 2009.*
11. *Burla M. C., Caliandro R., Camalli M. et al.* R. SIR2004. – an improved tool for crystal structure determination and refinement // *J. Appl. Cryst.* – 2005. – **38**, No 2. – P. 381–388.
12. *Sheldrick G. M.* A short history of SHELX // *Acta Cryst.* – 2008. – **64**, No 1. – P. 112–122.
13. *Flack H. D.* On enantiomorph-polarity estimation // *Ibid.* – 1983. – **39**, No 6. – P. 876–881.
14. *Андронати С. А., Андронати К. С., Нецадин Д. П. и др.* 5-Фенил-, 5-(*o*-хлор)фенил-1-метил-7-бром-3-окси-1,2-дигидро-3*H*-1,4-бенздиазепин-2-оны и их инклюзивные комплексы с бензолом // *Доп. НАН України.* – 1999. – № 6. – С. 149–155.

Фізико-хімічний інститут ім. А. В. Богатського
НАН України, Одеса
Університет ім. Адама Мицкевича, Познань, Польща
Інститут прикладної фізики АН Молдови, Кишинев

Поступило в редакцію 15.09.2010

E. A. Shesterenko, I. I. Romanovska,
Academician of the NAS of Ukraine S. A. Andronati, B. Wicher, Yu. A. Simonov,
V. Ch. Kravtsov, O. V. Sevastyanov, E. A. Semenishina, V. I. Pavlovsky

1-Methyl-5-phenyl-3-acetoxy-7-bromo-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-one stereoselective hydrolysis by free and immobilized pig liver microsomal fraction

*Using the microsomal fraction isolated from pig liver (protein yield 38 mg/g tissue, esterase activity 17.25 $\mu\text{mol}/\text{mg protein} \cdot \text{min}$) under the conditions developed, the 1-methyl-5-phenyl-3-acetoxy-7-bromo-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-one stereoselective hydrolysis is accomplished. The X-ray analysis method proves obtaining the substrate S-enantiomer ($[\alpha]_D^{20} = +195.3^\circ$, $c = 1$ in chloroform), whose crystal and molecular structures are established. For the first time, with *Phyllophora nervosa* carrageenan usage, the pig liver microsomal fraction immobilized preparation is obtained. It is able to catalyze the enantioselective hydrolysis of 1-methyl-5-phenyl-3-acetoxy-7-bromo-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-one under study during 5 cycles of usage in a batch reactor.*