



ШЕСТЕРЕНКО

Євгенія Аркадіївна — кандидат біологічних наук, науковий співробітник лабораторії фізико-хімічних основ біотехнології відділу медичної хімії Фізико-хімічного інституту ім. О.В. Богатського НАН України

НОВІ БІОКАТАЛІЗАТОРИ ДЛЯ СТВОРЕННЯ ПОТЕНЦІЙНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ

За матеріалами наукового повідомлення
на засіданні Президії НАН України
13 грудня 2017 року

*Розроблено способи іммобілізації карбоксилестерази у складі мікросомальної фракції печінки свині в криогелі полівінілового спирту; філофорині з *Phyllophora pergosa* і альгінаті натрію. Одержано високоактивні (65–80% збереження вихідної естеразної активності), стійкі при зберіганні і до дії підвищених температур біокатализатори. Створено біотехнології енантіоселективного гідролізу естерів 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону за допомогою вільних та іммобілізованих препаратів мікросомальної фракції. У результаті ферментативного гідролізу вперше отримано S-енантіомери субстратів зі збільшеним афінитетом до центральних бенздіазепінових рецепторів та протисудомною активністю. Показано, що іммобілізовані препарати мікросомальної фракції печінки свині каталізують енантіоселективний гідроліз естерів 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону з 50% ступенем трансформації протягом 5–12 циклів використання в періодичному режимі.*

Ключові слова: іммобілізація, мікросомальна фракція печінки свині, полімерні носії, енантіоселективний гідроліз, естери 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону.

Енантіомери — хімічні сполуки, які мають однакову будову, але відрізняються просторовим розташуванням атомів. Відомо, що енантіомери лікарських речовин можуть мати істотні відмінності у біологічній активності [1]. Сьогодні на світовому фармацевтичному ринку представлено досить багато лікарських препаратів, що випускаються у вигляді окремих енантіомерів. Їх перевагами є менша токсичність та знижене дозування порівняно з рацематами [2]. Однак кількість опублікованих досліджень, присвячених ферментативному розділенню енантіомерів естерів 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону, потенційних анксиолітичних і снодійних засобів, вкрай обмежена [3–5]. Тому їх синтез і детальне дослідження є актуальним завданням.

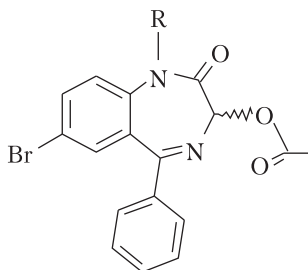


Рис. 1. Об'єкти дослідження — естери 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону: R = Н (1), CH₃ (2), C₂H₅ (3)

Характеристики виділеної мікросомальної фракції печінки свині

Показники	Значення
Вихід білка, мг/г тканини	38,0 ± 1,5
Відношення РНК/білок	0,02
Відношення фосфоліпід/білок	1,16
Естеразна активність (за 1-нафтил-ацетатом), мкмоль/мг білка за хв	17,25 ± 0,6

Оскільки хімічні методи асиметричного синтезу та розділення енантіомерів пов'язані з рядом труднощів [6], розроблення більш доступних біотехнологічних методів їх отримання є перспективним завданням.

Карбоксилестераза печінки свині — один з найбільш досліджуваних ферментів, які застосовуються для отримання енантіомерів лікарських речовин [7–12]. Разом з тим, недоліками її застосування є нестабільність, висока вартість комерційного препарату і одноразове використання. У зв'язку з цим актуалізується застосування доступнішої карбоксилестерази у

складі мікросомальної фракції печінки свині та створення біокатализаторів багаторазової дії з її використанням.

Об'єкти досліджень були синтезовані у відділі медичної хімії Фізико-хімічного інституту ім. О.В. Богатського НАН України під керівництвом академіка НАН України С.А. Андронаті [13]. Це естери 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону, які відрізняються один від одного замісником в 1-му положенні молекули (рис. 1). За даними фармакологічних досліджень, вони мають анксиолітичну, протисудомну дію, а також анагетичну активність.

Карбоксилестераза міститься у мікросомальній фракції — везикулах ендоплазматичного ретикулуму, що утворюються в результаті гомогенізації і центрифугування гепатоцитів — клітин печінки. У таблиці наведено основні біохімічні характеристики отриманої нами мікросомальної фракції печінки свині.

У розроблених умовах за допомогою мікросомальної фракції здійснено енантіоселективний гідроліз обраних сполук з 50% ступенем трансформації (рис. 2).

У результаті енантіоселективного гідролізу відбувається розщеплення естерного зв'язку в R-енантіомері досліджуваних сполук з утворенням відповідних продуктів — 3-гідрокси-похідних, що швидко рацемізуються. Однак S-енантіомери в цих умовах не піддаються гідролізу мікросомальною фракцією [8].

Отже, гідролізом рацематів досліджуваних естерів (1–3) ми вперше отримали S-енантіомери субстратів. Їх молекулярні (рис. 3) і кристалічні структури встановлено методом

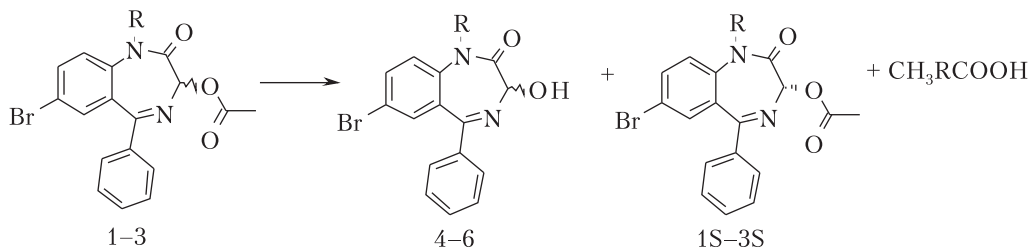


Рис. 2. Енантіоселективний гідроліз естерів 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону (1–3) за допомогою мікросомальної фракції. Умови проведення гідролізу: естеразна активність мікросомальної фракції — 130,0 од/см³; концентрація субстрату — 0,5 ммоль/дм³; час реакції — 150 хв; концентрація ДМСО — 40%; рН = 7,0; Т = 37 °С

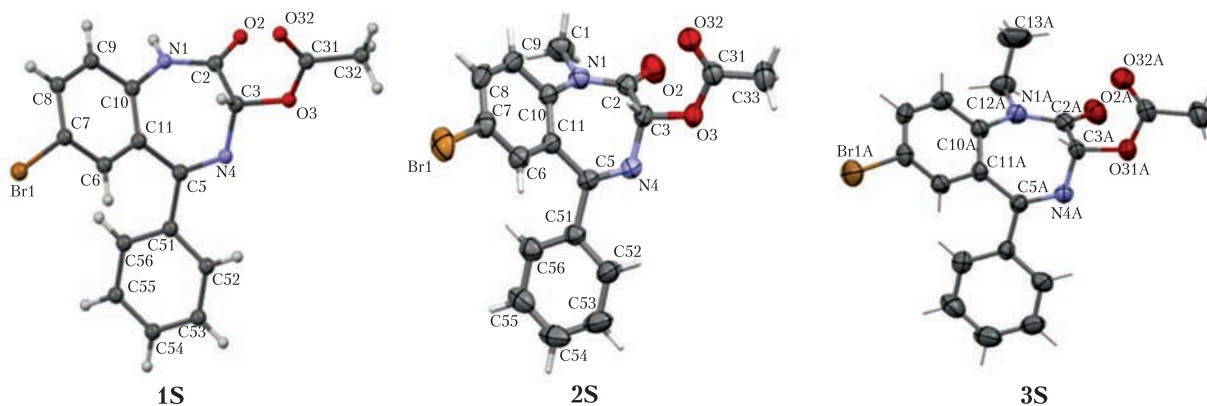


Рис. 3. Молекулярні структури отриманих S-енантіомерів $[\alpha]_D^{20} = +116,9^\circ$ (1S); $+195,3^\circ$ (2S); $+193,8^\circ$ ($c = 1$, у хлороформі)

рентгеноструктурного аналізу, структурні дані депоновано в Кембриджському банку структурних даних [13].

Вивчено деякі фармакологічні властивості отриманих енантіомерів. Методом радіолігандного аналізу показано, що S-енантіомери мають в 1,5–2,1 раза більший афінітет (спорідненість) до центральних бенздіазепінових рецепторів порівняно з відповідними рацематами (рис. 4а) [13]. На моделі антикорозолового тесту встановлено, що протисудомна активність S-енантіомерів в 1,6–2,2 раза вища за активність рацематів (рис. 4б).

Для створення біокатализаторів багаторазової дії для отримання S-енантіомерів використовували іммобілізацію (закріплення) мікросомальної фракції на полімерних носіях. Перевагами обраного нами методу включення в гель є висока ємність носіїв (що особливо важливо для іммобілізації субклітинних фракцій), доступність, економічність, легкість модифікації носіїв, «м'якість» методу іммобілізації [14–16].

Для створення іммобілізованої мікросомальної фракції було обрано полімерні носії природного (карагінан з *Phyllophora nervosa*, альгінат Na) і синтетичного (кріогель полівінілового спирту (ПВС)) походження. Ці носії перспективні для іммобілізації ферментів і субклітинних фракцій, оскільки доступні, нетоксичні і мають різну біологічну активність.

У результаті проведення іммобілізації отримано біокатализатори на основі мікросомальної фракції печінки свині з високим збереженням вихідної естеразної активності (65–80%), три-

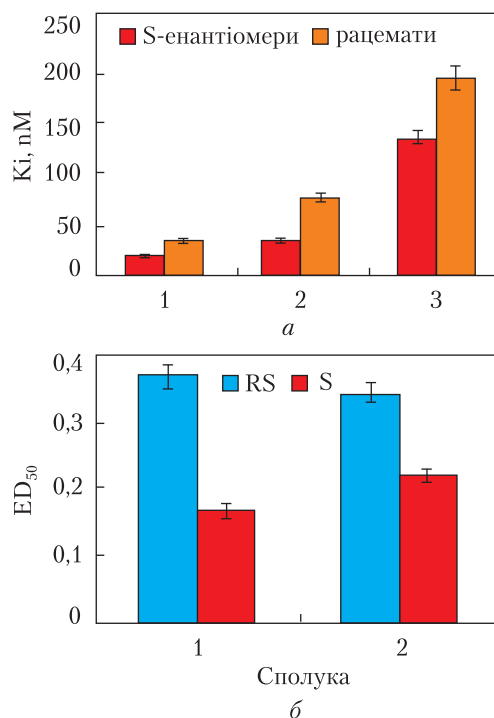


Рис. 4. Порівняння отриманих S-енантіомерів і відповідних рацематів естерів 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону (1–3) за афінітетом до центральних бенздіазепінових рецепторів (а) і протисудомною активністю (б)

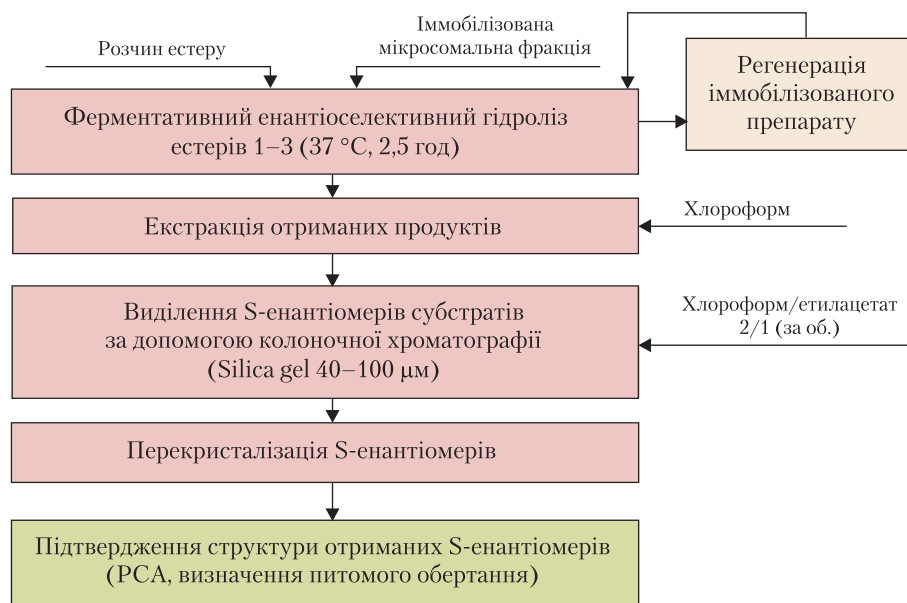
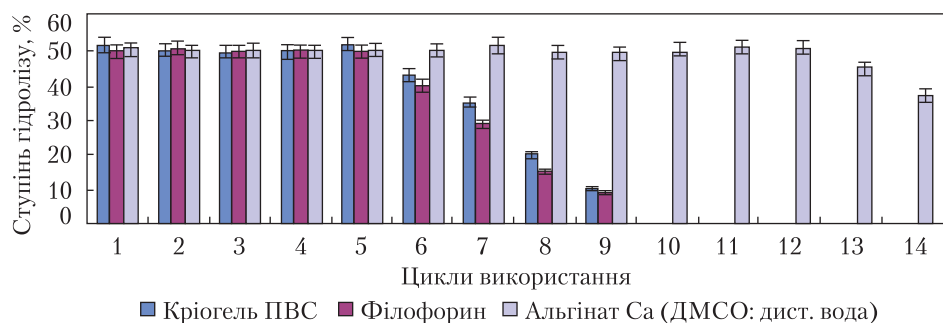


Рис. 5. Біотехнологічна схема одержання S-енантімерів естерів 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону (1–3) за допомогою імобілізованих препаратів мікросомальної фракції

Рис. 6. Цикли використання імобілізованої мікросомальної фракції для отримання енантімерів



валім терміном зберігання (6–9 місяців) за температури 0–4°C.

Вивчення фізико-хімічних характеристик отриманих біокатализаторів показало, що рН і температурний оптимуми імобілізованих препаратів не відрізнялися від таких вільної фракції і становили 7,0 і 37°C відповідно. Одержані біокатализатори характеризуються в 1,7–3 рази більшою термостабільністю порівняно з вільними мікросомами [8, 13].

За допомогою імобілізованої мікросомальної фракції розроблено спосіб отримання S-енантімерів досліджуваних естерів [17, 18]. Біотехнологічну схему отримання S-енантімерів наведено на рис. 5.

Процес відбувається в періодичному режимі. Здійснюється енантіоселективний гідроліз рацематів естерів (1–3). S-енантімер і продукт гідролізу екстрагують з реакційного середовища, розділяють методом хроматографії і доочищують перекристалізацією. Структуру отриманих енантімерів підтверджують за допомогою рентгеноструктурного аналізу і визначення питомого обертання. Використаний біокатализатор регенерують і застосовують у наступному циклі процесу.

Найважливішою перевагою розроблених імобілізованих ферментних препаратів є можливість їх багаторазового використання. Показано, що за допомогою імобілізованої

в криогелі полівінілового спирту і карагінані мікросомальної фракції можливе отримання S-енантіомерів протягом 5 циклів використання в періодичному режимі, а в разі застосування альгінату кальцію як носія — протягом 12 циклів (рис. 6) [18].

Отже, створено нові ефективні, доступні, економічні біокаталізатори багаторазової дії на основі іммобілізованої мікросомальної фракції печінки свині для отримання S-енантіомерів

естерів 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону. Багаторазовість застосування сприяє напрацюванню енантіомерів у кількостях, необхідних для проведення детальних фармакологічних досліджень.

Завдяки широкій субстратній специфічності карбоксилестерази мікросомальної фракції є можливість використання розроблених біокаталізаторів для отримання енантіомерів естерів широкого ряду лікарських речовин.

REFERENCES

[СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ]

1. Rentsch K.M. The importance of stereoselective determination of drugs in the clinical laboratory. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 2002. **54**(1-3): 1. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(02\)00124-0](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(02)00124-0)
2. Bielory L., Leonov A. Stereoconfiguration of anti-allergic and immunologic drugs. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2008. **100**(1): 1. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)60396-1](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)60396-1)
3. Yang S.K., Chen S.J., Huang J.D. Enantioselectivity suggests a cytosolic origin for a commercial pig liver esterase preparation. *Chirality*. 1995. **7**(1): 40. <https://doi.org/10.1002/chir.530070108>
4. Yang S.K., Lu X. Racemization kinetics of enantiomeric oxazepam: stereoselective hydrolysis of enantiomeric oxazepam 3-acetate in rat liver microsomes and brain homogenate. *J. Pharm. Sci.* 1989. **78**(10): 789. <https://doi.org/10.1002/jps.2600781002>
5. Yang S., Liu K., Guengerich P. Enantioselective hydrolysis of oxazepam 3-acetate by esterases in human and rat liver microsomes and rat brain S9 fraction. *Chirality*. 1990. **2**(3): 150. <https://doi.org/10.1002/chir.530020305>
6. Maier N.M., Franco P., Lindner W. Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives. *J. Chromatogr. A*. 2001. **906**(1-2): 3. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00532-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00532-X)
7. Hosokawa M. Structure and catalytic properties of carboxylesterase isozymes involved in metabolic activation of prodrugs. *Molecules*. 2008, **13**(2): 412. <https://doi.org/10.3390/molecules13020412>
8. Shesterenko E.A., Romanovska I.I., Sevastyanov O.V., Andronati S.A. Carboxylesterases in enantioselective synthesis of organic compounds. *Biotechnologia Acta*. 2013. **6**(1): 9. <https://doi.org/10.15407/biotech6.01.009>
[Шестеренко Е.А., Романовская И.И., Севастьянов О.В., Андронати С.А. Карбоксилестеразы в энантиоселективном синтезе органических соединений. *Biotechnologia Acta*. 2013. Т. 6, № 1. С. 9–21.]
9. Lee E.G., Won H.S., Ro H.S. et al. Preparation of enantiomerically pure (S)-flurbiprofen by an esterase from *Pseudomonas* sp. KCTC 10122BP. *J. Mol. Catal. B. Enzym.* 2003. **26**(3-6): 149. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2003.05.004>
10. Ogawa J., Mano J., Hagishita T., Shimizu S. Enantioselective ester hydrolase from *Sphingobacterium* sp. 238C5 useful for chiral resolution of β -phenylalanine and for its β -peptide synthesis. *J. Mol. Catal. B. Enzym.* 2009. **60**(3-4): 138. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.04.011>
11. Yu L., Xu L., Yu X. Purification and properties of a highly enantioselective l-menthyl acetate hydrolase from *Burkholderia cepacia*. *J. Mol. Catal. B. Enzym.* 2009. **57**(1-4): 27. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.06.011>
12. Asakawa K., Noguchi N., Takashima S., Nakada M. Preparation of a new chiral building block containing a benzylic quaternary stereogenic center and a formal total synthesis of (–)-physostigmine. *Tetrahedron: Asymmetry*. 2008. **19**(19): 2304. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2008.09.021>
13. Shesterenko Ye.A., Romanovska I.I., Sevastyanov O.V. et al. Enantioselective hydrolysis of 3-hydroxy-1,4-benzodiazepin-2-one esters by pig liver microsomes. *J. Mol. Catal. B. Enzym.* 2014. **102**: 66. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.01.019>
14. Evtushenkov A.N., Fomichev Yu.K. *Introduction to Biotechnology*. (Minsk: BGU, 2004). [Евтушенков А.Н., Фомичев Ю.К. *Введение в биотехнологию*. Минск: БГУ, 2004.]
15. Heilmann S.M., Drtina G.J., Haddad L.C. Azlactone-reactive polymer supports for immobilizing synthetically useful enzymes. Part I. Pig liver esterase on dispersion polymer supports. *J. Mol. Catal. B. Enzym.* 2004. **30**(1): 33. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2004.03.003>

16. Desai P.D., Dave A.M., Devi S. Chemoselective hydrolysis of methyl 2-acetoxybenzoate using free and entrapped esterase in κ -carrageenan beads. *J. Appl. Polymer Sci.* 2008. **108**(4): 2617. <https://doi.org/10.1002/app.27298>
17. Patent of Ukraine No. 75709. Andronati S.A., Shesterenko Ye.A., Romanovska I.I. et al. Method of the preparation of 3-acyloxy-7-bromo-5-phenyl-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-one S-enantiomers. 10.12.2012. [Пат. Україна № 75709. Андронаті С.А., Шестеренко Є.А., Романовська І.І. та ін. Спосіб отримання S-енантіомерів 3-ацилокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону. Опубл. 10.12.2012. Бюл. № 15.]
18. Patent of Ukraine No. 76777. Andronati S.A., Shesterenko Ye.A., Romanovska I.I. et al. Method of the preparation of 3-acyloxy-7-bromo-5-phenyl-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-one S-enantiomers. 10.01.2013. [Пат. Україна № 76777. Андронаті С.А., Шестеренко Є.А., Романовська І.І. та ін. Спосіб отримання S-енантіомерів 3-ацилокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону. Опубл. 10.01.2013. Бюл. № 1.]

Ye.A. Shesterenko

Bogatsky Physico-Chemical Institute of the National Academy of Sciences of Ukraine (Odesa)

NEW BIOCATALYSTS FOR THE CREATION OF POTENTIAL DRUGS

According to the materials of scientific report at the meeting of the Presidium of NAS of Ukraine, December 13, 2017

Methods of carboxylesterase immobilization as a component of pig liver microsomal fraction immobilization in polyvinyl alcohol, phyllophorine from *Phyllophora nervosa* and sodium alginate were developed. The highly active biocatalysts (65–80% retaining of initial esterase activity), stable at storage and to elevated temperatures action, were obtained. Biotechnologies of 3-hydroxy-1,4-benzodiazepin-2-one esters enantioselective hydrolysis with a help of free and immobilized microsomal fraction preparation were created. As a result of enzymatic hydrolysis the S-enantiomers of substrates, with increased affinity to central benzodiazepine receptors and anticonvulsant activity, were obtained for the first time. The immobilized pig liver microsomal fraction preparations, as it was shown, catalyzed enantioselective hydrolysis of 3-hydroxy-1,4-benzodiazepin-2-one esters with 50% degree of transformation during 5-12 cycles of usage in batch mode.

Keywords: immobilization, pig liver microsomal fraction, polymeric supports, enantioselective hydrolysis, 3-hydroxy-1,4-benzodiazepin-2-one esters.