

УДК 577.152.311/547.8/548.73

КАРБОКСИЛЭСТЕРАЗЫ В ЭНАНТИОСЕЛЕКТИВНОМ СИНТЕЗЕ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Е. А. ШЕСТЕРЕНКО, И. И. РОМАНОВСКАЯ, О. В. СЕВАСТЬЯНОВ, С. А. АНДРОНАТИ

Физико-химический институт им. А. В. Богатского НАН Украины, Одесса

E-mail: romairina@gmail.com

Получено 05.07.2012

В обзоре приведены классификация, структура и механизм каталитического действия карбоксилэстераз различного происхождения.

Показана перспективность использования карбоксилэстераз для изучения метаболизма и активации многих лекарственных веществ и пролекарств *in vitro*. Актуально также применение энзимов как биокатализаторов стереоселективного гидролиза и синтеза ряда сложных эфиров ациклических, карбоциклических и гетероциклических соединений. Установлено, что получаемые с помощью карбоксилэстеразы энантиомеры характеризуются высоким химическим выходом и оптической чистотой, а иммобилизация на различных носителях стабилизирует энзим и позволяет многократно использовать полученные биокатализаторы. Проведенные авторами исследования выявили особенности энзиматического гидролиза новых 3-ацилокси-1,4-бенздиазепин-2-онов — потенциальных анксиолитических и снотворных средств с помощью карбоксилэстеразы микросомальной фракции печени свиньи. С использованием свободной и иммобилизованной в гели филофорина и альгината, стабилизированных Ca^{2+} , микросомальной фракции впервые осуществлен энантиоселективный гидролиз 3-ацетокси-7-бром-1-метил-5-фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-она. Выделен S-энантиомер субстрата, что свидетельствует о большей специфичности карбоксилэстеразы микросомальной фракции печени свиньи к его R-энантиомеру.

Ключевые слова: карбоксилэстераза, микросомальная фракция печени свиньи, стереоселективный синтез, 3-ацилокси-1,4-бенздиазепин-2-оны, иммобилизация.

Известно, что энантиомеры биологически активных веществ (БАВ), обладая подобными химическими и физическими свойствами, обладают существенными отличиями в фармакологической активности, что обусловлено уникальной способностью живого организма специфично включать их в те или иные метаболические процессы [1]. Поэтому представляет интерес получение и детальное исследование энантиомеров лекарственных веществ.

Поскольку методы асимметрического синтеза и разделения энантиомеров — самопроизвольная кристаллизация, использование оптически активных растворителей, получение диастереомеров, хроматография на хиральных стационарных фазах — сопряжены с определенными трудностями [2], перспективной является разработка

более доступных препаративных биотехнологических методов их получения.

Известно, что карбоксилэстеразы (КЭ) являются одними из наиболее изучаемых и активных энзимов для стереоселективного гидролиза и синтеза ряда ациклических, карбоциклических и гетероциклических соединений [3].

КЭ обладают такими преимуществами, как стабильность, отсутствие коэнзима, экономичность (в частности КЭ печени сельскохозяйственных животных, микробного происхождения) и др. Коммерческие препараты КЭ представляют собой смеси изоэнзимов, обладающих сходной стереоселективностью, что делает возможным их применение в асимметрическом синтезе в качестве «индивидуального» энзима [4].

Биологическая роль, структура и механизм каталитического действия карбоксилэстераз

КЭ (КФ 3.1.1.1.) — сериновые α,β -гидролазы, катализирующие гидролиз эфирной и амидной связей в молекулах различной структуры [5].

Энзимы этого семейства найдены практически у всех видов животных, растений, грибов и микроорганизмов. КЭ выявлены во многих органах, тканях и биологических жидкостях млекопитающих. В первую очередь они экспрессируются в эндоплазматическом ретикулуме гепатоцитов, в меньшей степени — в тонком кишечнике, почках, легких, сердце, моноцитах и макрофагах [6]. Согласно существующей классификации карбоксилэстеразы млекопитающих (КЭМ) подразделяются на 5 основных групп (КЭМ1–КЭМ5) в соответствии с гомологией аминокислотной последовательности [5], причем большинство идентифицированных в настоящее время КЭМ принадлежит к семейству КЭМ1 или КЭМ2. Они, в свою очередь, могут быть разделены на пять подсемейств.

Семейство КЭМ1 включает основные формы изоэнзимов карбоксилэстеразы млекопитающих. Большинство членов этого семейства экспрессируются в печени. К семейству КЭМ1А принадлежат основные формы карбоксилэстеразы человека, обезьян и кроликов, к подсемействам КЭМ1В — основные изоформы карбоксилэстеразы крыс, хомяков, мышей, а к КЭМ1С — собак, кошек и свиней.

В семейство КЭМ2 входят карбоксилэстеразы тонкого кишечника человека (КЭМ2А1), крыс (КЭМ2А10), мышей (КЭМ2А8), экспрессирующиеся преимущественно в тонком кишечнике [6].

Семейство КЭМ3 человека имеет около 40% идентичности аминокислотной последовательности как с КЭМ1, так и с КЭМ2 и экспрессируется в печени и ЖКТ. К этому семейству относится карбоксилэстеразоподобный протеин (КЭМ4А2), который экскретируется с мочой. В семейство КЭМ5 входят изоэнзимы КЭМ, имеющие иную структуру по сравнению с изоформами других семейств КЭМ [7].

Основная биологическая роль карбоксилэстераз млекопитающих — метаболизм ксенобиотиков. Энзим расщепляет сложноэфирные, амидные или тиоэфирные связи широкого спектра соединений, отличающихся по химической структуре [8].

Вторая биологическая роль карбоксилэстераз — трансформация холестерина и жирных кислот в печени и периферических тканях. КЭ является гидролазой сложных эфиров холестерина и ацил-КоА.

Карбоксилэстеразы человека, а также гомологи у других млекопитающих участвуют в синтезе тестостерона и метаболизме ретинола [6, 9].

Третья биологическая роль карбоксилэстераз — транспортировка и удерживание протеинов в эндоплазматическом ретикулуме. Карбоксилэстераза связывается с С-реактивным протеином (С-РП) и удерживает этот протеин до его высвобождения в цитоплазму, а также связывается в эндоплазматическом ретикулуме с β -глюкуронидазами — энзимами второй фазы метаболизма ксенобиотиков [10, 11].

Молекулярная масса коммерческих препаратов КЭМ составляет 162–168 кДа, молекула энзима состоит из 3 субъединиц с молекулярной массой около 60 кДа [7]. Структура КЭ человека 1 представлена на рис. 1.

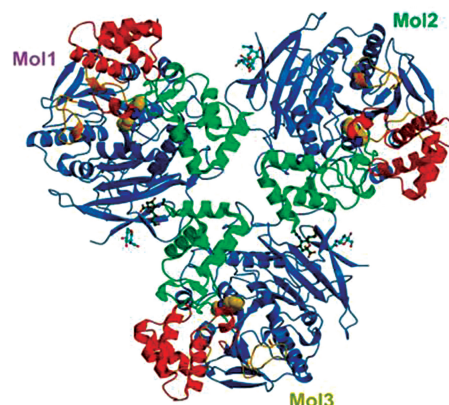


Рис. 1. Структура карбоксилэстеразы человека 1: Mol 1, Mol 2, Mol 3 — субъединицы энзима.

Каталитический домен, α/β -домен и регуляторный домен каждого из мономеров показаны синим, зеленым и красным цветом, соответственно [12]

В отличие от карбоксилэстераз млекопитающих, микробные карбоксилэстеразы классифицируют совместно с липазами и фосфолипазами [13]. Согласно существующей номенклатуре микробные эстеразы, так же как и КЭМ, в соответствии с гомологией аминокислотной последовательности подразделяются на 7 семейств. Карбоксилэстеразы являются представителями 4 из них (семейства V–VII).

К карбоксилэстеразам семейства V относятся энзимы мезофильных (*Pseudomonas oleovorans*, *Haemophilus influenzae*, *Aceto-*

bacter pasteurianus), психрофильных (*Moraxella* sp., *Psychrobacter immobilis*) и термофильных (*Sulfolobus acidocaldarius*) микроорганизмов. Они проявляют значительную гомологию (20–25%) с энзимами, не принадлежащими к подклассу эстераз, в частности с эпоксигидролазами и галопероксидазами [14].

К семейству VI принадлежат энзимы с достаточно низкой молекулярной массой (23–26 кДа), включая эстеразу из *Pseudomonas fluorescens*. КЭ активна в форме димера и содержит типичную каталитическую триаду Сер-Асп-Гис. У членов этого семейства выявлена 40%-я гомологичность с лизофосфолипазами эукариот.

КЭ семейства VII имеют значительную молекулярную массу (около 55 кДа) и проявляют высокую гомологичность с ацетилхолинэстеразами эукариот и КЭ тонкого кишечника или печени млекопитающих, например свиньи. К этому семейству относятся КЭ *Arthrobacter oxydans* и *Bacillus subtilis*. В семействе VIII наблюдается высокая гомологичность КЭ с β -лактамазами класса C. Важнейшим представителем этого семейства является КЭ из *Arthrobacter globiformis*.

Как и в случае млекопитающих, карбоксилэстеразы микроорганизмов проявляют гидролитическую активность в отношении нескольких типов субстратов, включая различные алифатические и циклические сложные эфиры, ацил-СоА, производные аминокислоты др. [15].

Исследование метаболизма лекарственных веществ *in vitro* с помощью карбоксилэстеразы

Поскольку энантиомеры лекарственных средств (ЛС) могут существенно отличаться по своим фармакологическим свойствам, актуальной является задача детального исследования метаболизма лекарств и активации пролекарств, имеющих в своем составе оптически активный атом углерода, *in vitro* с использованием КЭ.

Так, КЭМ1 расщепляет связь метилового эфира в молекуле R-кокаина с образованием бензоилэксгоина — основного метаболита кокаина.

Карбоксилэстераза млекопитающих — единственный энзим, известный своей способностью образовывать токсичный метаболит кокаина — кокаэтилен, образующийся при совместном употреблении кокаина и этанола. КЭМ1 эффективно расщепляет 3-ацетильную связь, а также, в меньшей степени, 6-ацетильную связь в молекуле героина

с образованием моноацетилморфина и морфина, соответственно [6].

Карбоксилэстеразы печени человека катализируют гидролиз неполярных ЛС или сложных эфиров ксенобиотиков до более растворимых экскретируемых кислотных и спиртовых метаболитов. Так, меперидин гидролизуется до меперидиновой кислоты и этанола энзимом КЭМ1, но не КЭМ2. Гидролиз меперидина с помощью КЭМ1 связан со специфичностью этого энзима к сложным эфирам, содержащим простые алифатические спиртовые остатки [16, 17].

Препарат иринотекан — противоопухолевое средство, используемое для лечения различных злокачественных новообразований, таких, в частности, как колоректальный рак. Иринотекан гидролизуется до 7-этилгидроксикамптотецина-10 (SN-38), который оказывает противоопухолевое действие. Показано, что несколько карбоксилэстераз человека и грызунов гидролизуют иринотекан, но активность зависит от вида энзима. Компьютерное моделирование показало, что способность каждого энзима к активации иринотекана зависит от размера входа в активный центр [10].

Кинетические исследования с серией нитрофениловых и нафтиловых эфиров подтвердили, что активация иринотекана карбоксилэстеразой лимитируется размерами входа в активный центр, которые ограничивают доступ к аминокислотным остаткам активного центра энзима, катализирующим реакцию [10].

Установлено, что карбоксилэстеразы печени и почек мыши, активно гидролизующие иринотекан, в большом количестве экспрессируются в печени и почках и в незначительном — в кишечнике и легких [18].

Циклезонид — новый ингаляционный глюкокортикостероид, разработанный для лечения бронхиальной астмы, под действием КЭМ также преобразуется в активный метаболит дезизобутирилциклезонид. Роль карбоксилэстеразы, холинэстеразы и А-эстеразы в гидролизе циклезонида была определена с использованием ряда ингибиторов [5].

Показано, что КЭМ катализируют стереоселективный гидролиз сложных эфиров производных 3-гидрокси-бенздиазепин-2-она [19]. Так, изучен гидролиз гемисукцината оксазепамы (39) карбоксилэстеразой печени мышей, крыс и морских свинок (рис. 1). Установлено, что процесс трансформации проходит стереоселективно; (+)-изомер является лучшим субстратом карбоксил-

эстеразы, о чем свидетельствуют K_m , составившие $2,5 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³ для (+)-изомера, $3,3 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³ для рацемата и $14,3 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³ для (-)-изомера, независимо от вида лабораторных животных [20].

Сложные эфиры оксазепамы и монокарбоновых кислот также стереоселективно гидролизуются карбоксилэстеразами печени крысы и человека, равно как и супернатантом 9000 g (S9-фракция) гомогената головного мозга [21].

Карбоксилэстеразы микросомальной фракции (МФ) печени были более специфичны к (R)-энантиомеру, однако, в отличие от них, карбоксилэстеразы S9-фракции головного мозга проявляли большую специфичность по отношению к (S)-энантиомеру [22]. Дальнейшие исследования выявили, что при трансформации в печени (S)-энантиомер ингибирует гидролиз (R)-изомера, в то время как (R)-энантиомер является активатором гидролиза (S)-энантиомера. Однако в S9-фракции наблюдалась противоположная картина [23]. Подобные результаты были получены и при трансформации 3-ацетата лоразепамы [24].

Карбоксилэстеразы в энантиоселективном синтезе органических соединений

Благодаря широкой субстратной специфичности и высокой стереоселективности КЭ являются перспективными биокатализаторами энантиоселективного гидролиза и синтеза обширного ряда ациклических, карбоциклических и гетероциклических соединений [3].

В литературе представлены работы по применению КЭ для стереоселективного синтеза ряда ациклических соединений.

Так, катализируемый карбоксилэстеразой печени свиньи (КЭПС) гидролиз сложных замещенных малоновых эфиров приводит к образованию ценных хиральных продуктов.

Показано, что лучшим субстратом является доступный 2-[(трет-бутоксидиметил]-2-метилмалонат (**1**), гидролизующийся в присутствии КЭПС до (+)-(R)-кислоты (рис. 2) с высоким (96%) оптическим выходом [25].

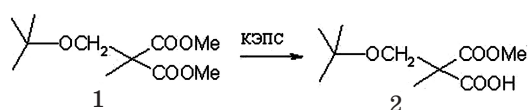


Рис. 2

С помощью КЭПС осуществлен стереоселективный гидролиз ряда сложных диэфиров с неразветвленной цепью (рис. 3). Так, диметил-цис-2,4-диметилглутамат (**5**) гидролизует до сложного полуэфира (выход — 85%, энантиомерный избыток — 64%) [26].

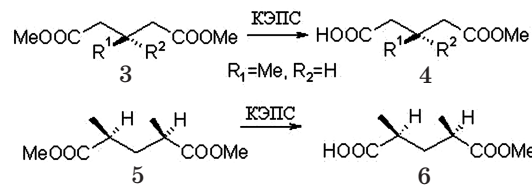


Рис. 3

КЭ из пекарских дрожжей катализировала энантиоселективный гидролиз ряда сложных эфиров 2-гидроксигептановой кислоты (рис. 4), хиральных синтонов, важных для синтеза различных прогестероидов, с энантиомерным выходом $\geq 99\%$ [27].

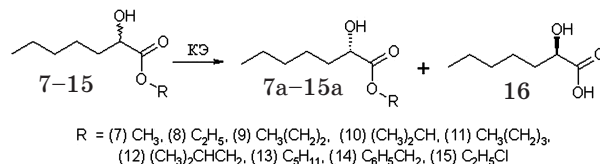


Рис. 4

Рекомбинантная эстераза *Burkholderia gladioli*, выделенная из культуры *E. coli*, использовалась для стереоселективного гидролиза линалилацетата (**17**) (рис. 5). Однако образующийся в результате гидролиза (S)-(+)-линалоол (**18**) (используемый в парфюмерной промышленности) имел низкую степень энантиомерной чистоты — 45% [28].

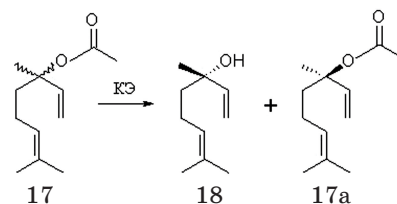


Рис. 5

С использованием лиофилизированного мицелия *Rhizopus oryzae*, обладающего выраженной карбоксилэстеразной активностью, осуществлена стереоселективная этерификация рацемического 2-октанола масляной кислотой. Получен R-энантиомер эфира с высоким энантиомерным выходом — 97% [29].

КЭ применяли для получения энантиомерно чистых соединений карбоциклической структуры. Осуществлен стереоселективный гидролиз диметилциклопропан-

(19), циклобутан- (21) и циклогексан-1,2-дикарбоксилатов (23) (рис. 6). Образующиеся в качестве продуктов реакции кислые сложные эфиры легко превращаются в γ -лактоны с энантиомерным избытком 97% [30].

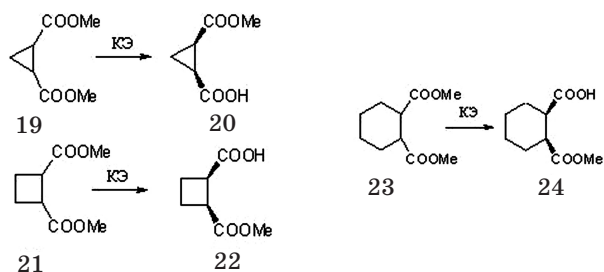


Рис. 6

Изучена катализируемая КЭПС трансформация мезоэфиров *cis*-циклогекс-4-ен-1,2-дикарбоксилата (25) с образованием моноэфира метил-Н-(1*S*,2*R*)-циклогекс-4-ен-1,2-дикарбоксилата (рис. 7). Полученный продукт имел высокую степень оптической чистоты > 97% [31].

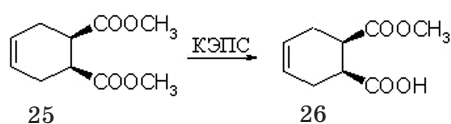


Рис. 7

КЭПС катализовала стереоселективный гидролиз диэтилового эфира *N*-третбутоксикарбониламинопропилбензилдиэтилмалонной кислоты (27), до соответствующего (*S*)-моноэфира (рис. 8) с высоким химическим и оптическим выходом — 82% и >99%, соответственно [32].

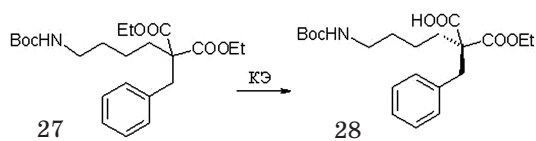


Рис. 8

Исследованы особенности получения *S*-энантиомеров флурбупрофена (29) и ибупрофена (31), обладающих большей фармакологической активностью, из рацематов соответствующих этиловых эфиров с применением КЭ из *Pseudomonas* sp. КСТС 10122ВР (рис. 9). Энантиомерный избыток в обоих случаях превышал 99% [33, 34].

Для получения *S*-ибупрофена из метилового эфира (*R,S*)-ибупрофена использовали также КЭ из *B. subtilis*, реакция протекала с высоким энантиомерным избытком [35].

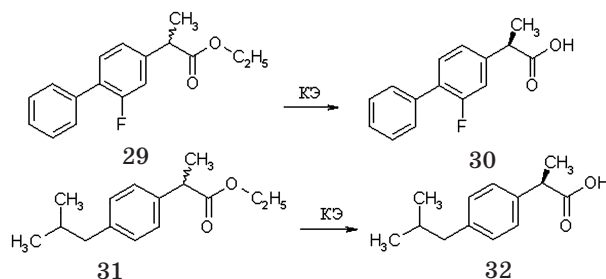


Рис. 9

КЭ из *Spingobacterium* sp. 238С5 катализовала стереоселективный гидролиз β -фенилаланина (33) (рис. 10) и еще ряда ациклических и циклических аминокислот, имеющих *L*-конфигурацию [36].

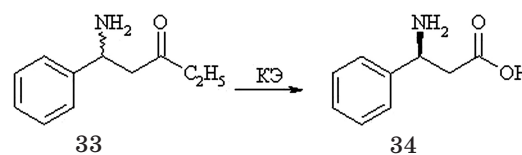


Рис. 10

С использованием карбоксилэстеразы из *Burkholderia cepacia* проведен стереоселективный гидролиз ряда сложных эфиров ментола 35–40 (рис. 11). Наибольший энантиомерный выход *L*-ментола наблюдался в случае использования формиата (35) и ацетата ментола (36) (97%) [37].

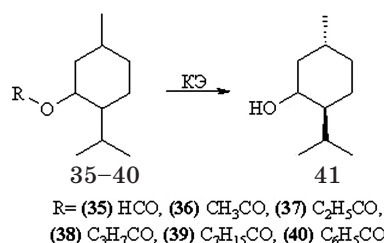


Рис. 11

Карбоксилэстераза из *Klebsiella oxytoca* катализовала стереоселективное разделение сложных эфиров 42–51 с высокой степенью энантиомерной чистоты, причем сродство энзима к тому или иному энантиомеру зависело от структуры субстрата (рис. 12) [38].

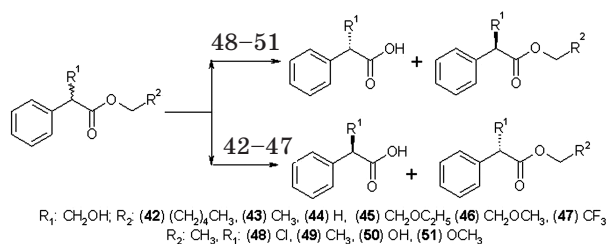


Рис. 12

Показано, что КЭПС является перспективным биокатализатором в процессе синтеза (-)-физостигмина, катализируя стереоселективный гидролиз его предшественника диметил-2-(2-хлор-5-метоксифенил)-2-метилмалоната (**52**) (рис. 13) с высоким химическим (86%) и оптическим (99%) выходом [39].

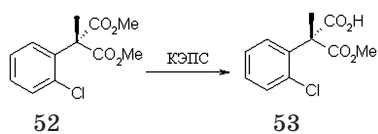


Рис. 13

КЭПС применяли как биокатализатор гидролиза сложных эфиров гетероциклических соединений. Установлено, что внутриклеточная карбоксилэстераза дрожжей *Kluyveromyces marxianus* CBS 1553 катализировала стереоселективный гидролиз рацемических эфиров 1,2-о-изопропилиденглицерина, являющихся трудногидролизруемыми субстратами стереоселективного гидролиза с использованием большинства известных эстераз. Исследование кинетических параметров реакции гидролиза ацетата 1,2-о-изопропилиденглицерина (**54**) (рис. 14) выявило сходные значения $V_{\text{макс}}$ гидролиза энантиомеров, но значительные отличия констант Михаэлиса — K_m S-энантиомера, поэтому она значительно уступает таковой R-энантиомера (5,3 и 70 мкмоль/дм³, соответственно) [40].

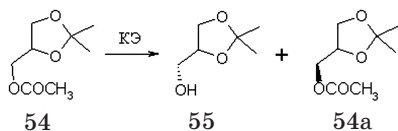


Рис. 14

КЭПС катализировала гидролиз ряда сложных бициклических мезоэфиров (**56**, **58**, **60**) (рис. 15).

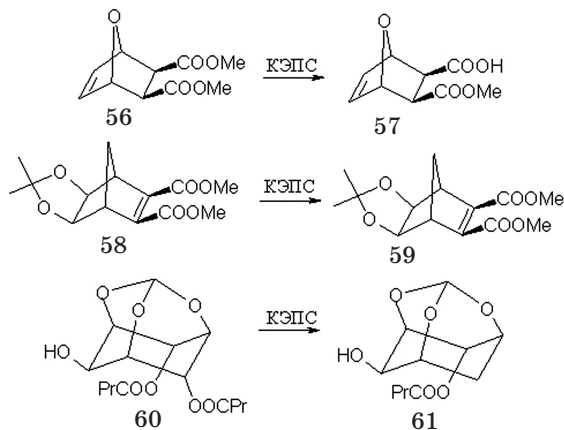
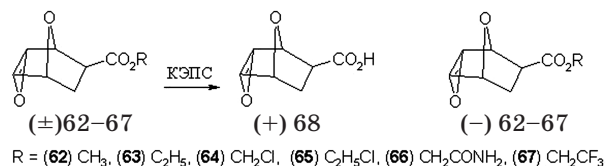


Рис. 15

Также показано, что КЭПС катализировала стереоселективный гидролиз ряда сложных эфиров трициклических моноэфиров **62–67** (рис. 16). Максимальная стереоселективность наблюдалась в случае 2'-хлорэтилового эфира и составляла 90,6% для образующегося метаболита и 99,4% — для нетрансформированного субстрата [41].



R = (**62**) CH₃, (**63**) C₂H₅, (**64**) CH₂Cl, (**65**) C₂H₅Cl, (**66**) CH₂CONH₂, (**67**) CH₂CF₃

Рис. 16

Сложные эфиры экзо- и эндо-цис-мезо-оксобицикло[2,2,1]-гептана являются хорошими субстратами КЭПС; соответствующие сложные полуэфиры образуются с высоким как химическим, так и оптическим выходом (80–98%) (рис. 17). Соответствующие продукты могут быть успешно использованы для синтеза природных соединений [42].

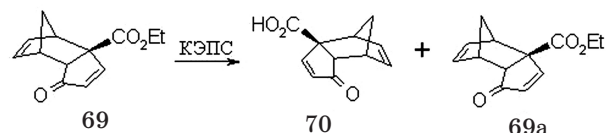


Рис. 17

Исследован катализируемый КЭПС гидролиз диэфиров 1,4-(изопропилендиокси)-2,5-тетрагидрофурана **71**, **73** с образованием соответствующих (+)-полуэфиров (рис. 18) с высоким оптическим выходом — более 72% [43].

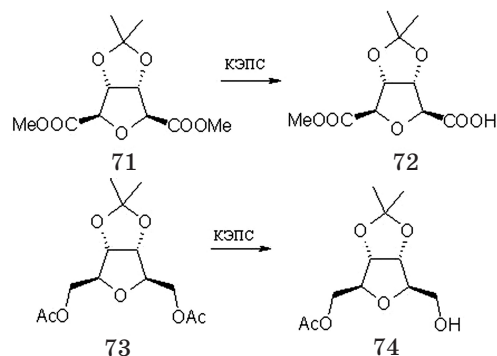


Рис. 18

КЭ из *Bacillus niacini* EM001 катализировала стереоселективный гидролиз офлоксацина (**75**) с образованием левофлоксацина (S-офлоксацина) (рис. 19) с энантиомерным избытком 67% [44].

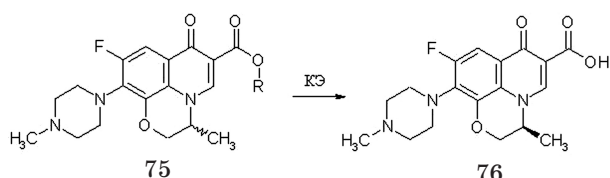


Рис. 19

КЭПС и КЭ печени быка с успехом применяли для стереоселективного гидролиза сложных эфиров производных пиперидиона. Показано что гидролиз (\pm)-транс-3-этоксикарбонил-1,4-(4-фторфенил)-N-метилпиперидин-2,6-диона (**77**) проходит с образованием (-)-изомера с энантиомерным избытком 90% (рис. 20) [45].

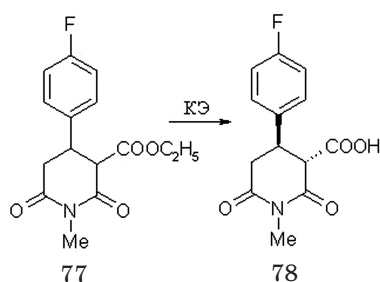


Рис. 20

Методы иммобилизации карбоксилэстеразы

Иммобилизация — это процесс закрепления энзима на поверхности или внутри носителя. Существуют два основных метода иммобилизации энзимов: физический и химический [46, 47].

Физическая иммобилизация энзимов представляет собой включение энзима в такую среду, в которой доступной для него является лишь ограниченная часть общего объема. При физической иммобилизации энзим не связан с носителем ковалентными связями. Существует четыре основных метода физической иммобилизации: адсорбция на нерастворимых носителях; включение в поры геля; пространственное отделение энзима от остального объема реакционной системы с помощью полупроницаемой мембраны; включение в двухфазную среду, где энзим растворим и может находиться только в одной из фаз [48, 49].

Главным отличительным признаком химических методов иммобилизации является то, что в результате химического воздействия на структуру энзима в его молекуле создаются новые ковалентные связи, в частности между протеином и носителем.

Препараты иммобилизованных энзимов, полученные с применением химических методов, обладают двумя важными свойствами. Во-первых, ковалентная связь энзима с носителем обеспечивает высокую прочность образующегося конъюгата. Во-вторых, химическая модификация энзимов способна приводить к существенным изменениям их свойств, таких как субстратная специфичность, каталитическая активность и стабильность [50, 51].

В литературе приведены сведения о закрепленных на различных носителях препаратах КЭ со стабилизированной энзиматической активностью [52–54], что является перспективным для многократного использования биокатализаторов в реакции стереоселективного синтеза алифатических, карбоциклических и гетероциклических соединений.

Одним из наиболее распространенных способов иммобилизации КЭ является ее включение в гели полимеров синтетического и природного происхождения. Так, КЭПС была иммобилизована в гранулы Эупергита С (полиакрилатного полимера) для применения в стереоселективном гидролизе (-)-(1S,4R)-4-гидрокси-2-циклопентенилацетата. Показаны высокое (68%) сохранение эстеразной активности КЭПС при иммобилизации и высокая степень энантиомерной чистоты образующегося в результате гидролиза продукта ($\geq 98\%$) [55].

Иммобилизованную в гранулы к-каррагинана КЭПС использовали для стереоселективного гидролиза метил-2-ацетоксибензоата в реакторах периодического и непрерывного действия с неподвижным слоем. Показано 50%-е сохранение исходной активности КЭПС после 8 циклов применения в реакторе периодического действия [56].

КЭПС, иммобилизованная в гранулы к-каррагинана, катализировала стереоселективный гидролиз и трансэтерификацию ряда сложных эфиров первичных, вторичных и третичных спиртов в среде несмешивающихся с водой органических растворителей с оптическим выходом до 90% [57].

Сопоставление химического (ковалентного) и физического способов иммобилизации КЭПС на микропористых мембранах выявило, что степень сохранения активности выше в случае физической иммобилизации. Полученные препараты применяли для стереоселективного гидролиза диэтилового эфира *цис*-циклогекс-4-ен-1,2-дикарбоновой кислоты (**79**) с образованием соответствующего (1S,2R)-моноэфира (рис. 21)

(оптическая чистота продукта не зависела от метода иммобилизации и составляла 95–97%) [58].

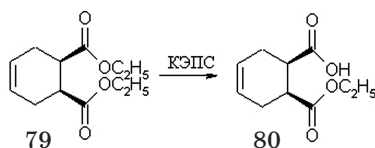


Рис. 21

Ковалентным связыванием КЭПС с диоксидом кремния при помощи соли диазония был получен биокатализатор без значительной потери эстеразной активности, применявшийся для проведения стереоселективного гидролиза диметилового эфира 2-метил-2-фенилмалоновой кислоты до соответствующего (+)-(R)-моноэфира в течение 4 циклов использования с максимальным оптическим выходом 85% [59].

Совместной лиофилизацией КЭПС с метоксиполиэтиленгликолем получен биокатализатор переэтерификации ряда спиртов 55–58 виниловыми эфирами (рис. 22), что позволило значительно увеличить химический и оптический выход (до 97 и 96% соответственно) в оптимальных условиях проведения процесса [60].

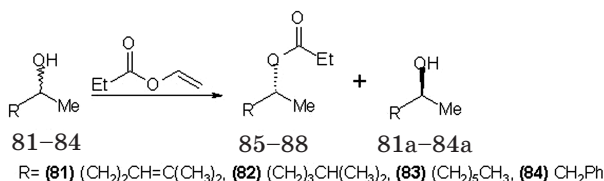


Рис. 22

Совместную лиофилизацию КЭПС с метоксиполиэтиленгликолем, бычьим сывороточным альбумином, а также аминотилполистиролом использовали для повышения стабильности КЭПС в органических растворителях для стереоселективного разделения граммовых количеств 1-алкокси-, 1-этилсульфанил-, 1-фтор-3-арил-2-пропанолов, 1-феноксипропанола и 1-метокси-2-фенокси-2-пропанола (оптический выход в большинстве случаев варьировал в пределах 80–99%) [61].

Свободная и иммобилизованная на Целите 545 рекомбинантная эстераза *Pseudomonas uorescens*, выделенная из культуры *E. coli*, катализировала стереоселективный гидролиз и синтез ряда алифатических и гетероциклических соединений с различным химическим и оптическим выходом (от < 1 до 99%); максимальная энантимерная

чистота наблюдалась для α -фенилэтанола и его ацетата [62].

В результате поперечной сшивки КЭ из *Bacillus subtilis* глутаровым альдегидом получен препарат с увеличенной стабильностью к действию высоких температур и сохранением 70%-й исходной эстеразной активности. Осуществление стереоселективного гидролиза DL-ментилацетата позволило получать L-ментол с высокой степенью энантимерной чистоты (> 94%) в реакторе периодического действия в течение 10 циклов использования препарата с потерей эстеразной активности менее 8% [63].

Гидролиз сложных эфиров 3-гидрокси-1,4-бенздиазепин-2-она, катализируемый карбоксилэстеразой микросомальной фракции печени свиньи

Поскольку энантиоселективность карбоксилэстеразы МФ печени свиньи в отношении гидролиза новых производных 3-гидрокси-1,4-бенздиазепина не изучена, нами был выбран ряд сложных эфиров 3-гидрокси-1,4-бенздиазепин-2-она с целью исследования данного процесса. В разработанных условиях (эстеразная активность 100 ед/см³, pH 7,0, t = 37 °C, τ = 2,5 ч, концентрация диметилсульфоксида — ДМСО 40%) с помощью выделенной МФ осуществлен гидролиз соединений 89–94 (рис. 23) с образованием соответствующих 3-гидроксипроизводных (95–97).

Известно, что структура субстрата может влиять на степень его трансформации карбоксилэстеразой [3], поэтому было исследовано влияние заместителей в молекуле сложных эфиров 3-гидрокси-1,4-бенздиазепин-2-она на степень их биоконверсии *in vitro* с помощью микросомальной фракции печени свиньи. Показано, что степень трансформации сложных эфиров 7-бром-3-гидрокси-5-фенил-1,2-дигидро-3H-1,4-бенздиазепин-2-она под влиянием микросомальной фракции изменяется в зависимости от их структуры.

Так, степень трансформации соединений 90, 91, 92 с разной длиной ацильного фрагмента в положении 3 бенздиазепинового цикла составила 53,2%, 48,1% и 46,1%, соответственно, в то время как 89 гидролизуются в этих же условиях на 38,3% (рис. 24) [64]. Установлено, что введение алкильных заместителей в 1-е положение бенздиазепинового цикла приводит к снижению степени гидролиза в заданных условиях с 38,3% для соединения 89 до 29,3% — для 93 и 24,1% — для 94, соответственно (рис. 23).

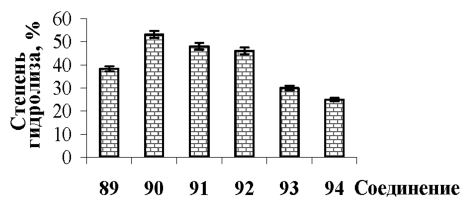


Рис. 23. Зависимость степени гидролиза 3-ацетокси-7-бром-5-фенил-1,2-дигидро-3*H*-1,4-бенздиазепин-2-онов с применением микросомальной фракции печени свиньи от структуры субстратов

С помощью выделенной МФ в разработанных условиях осуществлен стереоселективный гидролиз соединения **93** с 50% -й степенью трансформации (рис. 24).

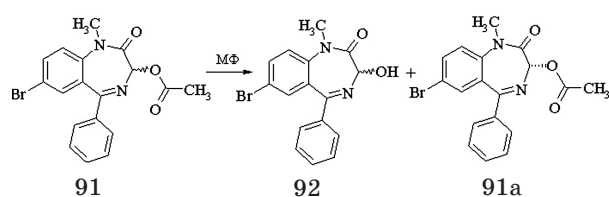


Рис. 24. Стереоселективный гидролиз **93** с помощью МФ

Нами было показано, что образующееся в результате гидролиза соединение **96** подвергается рацемизации в процессе гидролиза и последующего выделения, что согласуется с данными литературы [21].

Был получен энантиомер **93a**, методом рентгеноструктурного анализа установлены его молекулярная и кристаллическая структуры. Показано, что выделенное соединение является *S*-энантиомером, что свидетельствует о большей специфичности карбоксилэстеразы МФ печени свиньи к *R*-энантиомеру 3-ацетокси-7-бром-1-метил-5-фенил-1,2-дигидро-3*H*-1,4-бенздиазепин-2-она.

Соединение **93a** кристаллизуется в моноклинной хиральной пространственной группе $P2_1$. Его абсолютная конфигурация (а) и конформация (б) приведены на рис. 25.

Диазепиновый цикл в молекуле **93a** имеет конформацию псевдованны. Угол вращения $[\alpha]_D^{20} = +195,3^\circ$, $c = 1$ в хлороформе.

В кристалле связанные двойной винтовой осью молекулы образуют цепочки, параллельные кристаллографической оси *b* за счет C8-H...O32 (3,439(2) Å) водородной связи (рис. 26). Внутри цепочки взаимное расположение 7-бромзамещенных бензольных колец, конденсированных с диазепиновым циклом, указывает на диполь-дипольное и стэкинг-взаимодействия между ними. Структурные данные депонированы в Кембриджском банке структурных данных под номером CCDC 789193 [65].

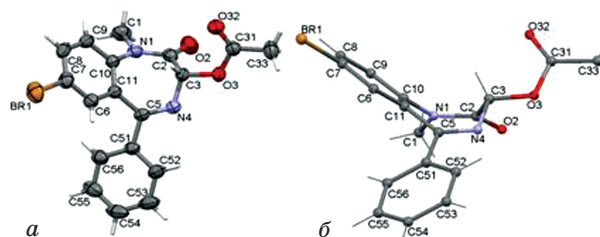


Рис. 25. Молекулярная структура субстрата **93a**: а — вид молекулы в проекции на ее среднюю плоскость; б — вид молекулы, иллюстрирующий ее конформацию

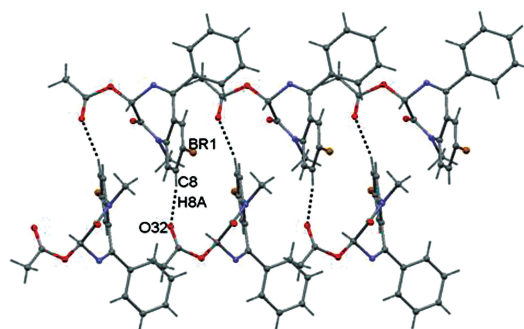


Рис. 26. Цепи в кристалле *S*-энантиомера субстрата **93a**

Поскольку показано, что карбоксилэстераза в составе микросомальной фракции печени свиньи является перспективным биокатализатором стереоселективного гидролиза сложных эфиров 3-гидрокси-1,4-бенздиазепин-2-она, целесообразно было разработать способы ее иммобилизации, что способствует повышению стабильности энзимного препарата и дает возможность многократно использовать биокатализатор для получения стереоизомеров эфиров 3-гидрокси-1,4-бенздиазепин-2-она.

Выделенную МФ иммобилизовали в гранулы филофорина из *Phyllophora nervosa* и альгината Na, стабилизированных ионами Ca^{2+} . В результате иммобилизации получены биокатализаторы с высоким сохранением исходной эстеразной активности (80 и 70%, соответственно) в форме прочных гранул сферической формы, стабильные в используемой водно-органической среде.

Показано отсутствие значительных отличий pH (7,0) и температурных (37 °C) оптимумов эстеразной активности свободного и иммобилизованных МФ.

С помощью иммобилизованных в филофорине и альгинате Ca МФ осуществлен стереоселективный гидролиз соединения **93** в течение 5 и 12 циклов, соответственно, в периодическом режиме (рис. 27).

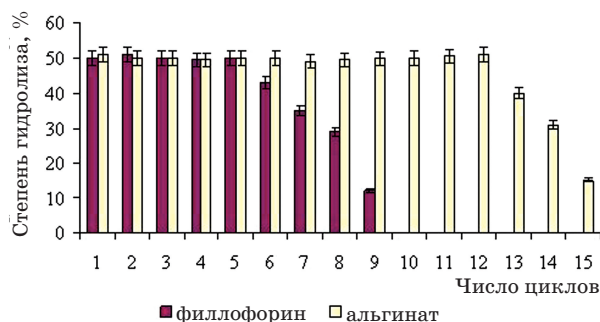


Рис. 27. Зависимость степени трансформации соединения 91 от кратности применения иммобилизованных препаратов

ЛИТЕРАТУРА

1. Rentsch K. M. The importance of stereoselective determination of drugs in the clinical laboratory // *J. Biochem. Biophys. Methods.* — 2002. — V. 54, N 1. — P. 1–9.
2. Bielory L., Leonov A. Stereoconfiguration of antiallergic and immunologic drugs // *Ann. Allergy Asthma Immunol.* — 2008. — V. 100, N 1. — P. 1–9.
3. Zhu L.-M., Tedford M. C. Applications of pig liver esterases (PLE) in asymmetric synthesis // *Tetrahedron.* — 1990. — V. 46, N 13. — P. 6587–6611.
4. Lam L. K., Brown C. M., De Jeso B. et al. Enzymes in organic synthesis. 42. Investigation of the effects of the isozymal composition of pig liver esterase on its stereoselectivity in preparative-scale ester hydrolysis of asymmetric synthetic value // *Chirality.* — 1988. — V. 110, N 13. — P. 4409–4411.
5. Hosokawa M. Structure and catalytic properties of carboxylesterase isozymes involved in metabolic activation of prodrugs // *Molecules.* — 2008. — V. 13, N 2. — P. 412–431.
6. Redinbo M. R., Bencharit S., Potter P. M. Human carboxylesterase 1: from drug metabolism to drug discovery // *Biochem. Soc. Trans.* — 2003. — V. 31, N 1. — P. 620–624.
7. Satoh T., Hosokawa M. Structure, function and regulation of carboxylesterases // *Chem. Biol. Interact.* — 2006. — V. 162, N 3. — P. 195–211.
8. Hosokawa M., Maki T., Satoh T. Characterization of molecular species of liver microsomal carboxylesterase of several animal species and humans // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1990. — V. 277, N 3. — P. 219–277.
9. Watanabe K., Matsunaga T., Kimura T. et al. Stereospecific and regioselective hydrolysis of cannabinoid esters by ES46.5K, an esterase from mouse hepatic microsomes, and its differences from carboxylesterases of rabbit and porcine liver // *Biol. Pharm. Bull.* — 2005. — V. 28, N 9. — P. 1743–1747.
10. Wadkins R., Morton C., Danks M. Structural constraints affect the metabolism of 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxy-camptothecin (CPT-11) by carboxylesterases // *Mol. Pharmacol.* — 2001. — V. 60, N 2. — P. 355–362.
11. Brzezinski M., Spink B., Dean R. et al. Human liver carboxylesterases hCE-1: binding specificity for cocaine, heroine and their metabolites and analogs // *Drug. Metab. Disp.* — 1997. — V. 25, N 9. — P. 1089–1096.
12. Bencharit S., Morton C. L., Hyatt J. L. et al. Crystal structure of human carboxylesterase 1 complexed with the Alzheimer's drug tacrine // *Chem. Biol. Interact.* — 2003. — V. 10, N 4. — P. 341–349.
13. Arpigny J. L., Jaeger K. E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties // *Biochem. J.* — 1999. — V. 343, N 1. — P. 177–183.
14. Bornscheue U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis // *FEMS Microbiol. Rev.* — 2002. — V. 26, N 1. — P. 73–81.
15. Akoh C.-C., Lee G.-C., Liaw Y.-C. et al. GDSL family of serine esterases/lipases // *Prog. Lipid Res.* — 2004. — V. 43, N 6. — P. 534–552.
16. Satoh T., Hosokawa M. The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions // *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* — 1998. — V. 38, N 2. — P. 257–288.
17. Zhang J., Burnell J. C., Dumaul N., Bosron W. F. Binding and hydrolysis of meperidine by human liver carboxylesterase hCE-1 // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* — 1999. — V. 290, N 1. — P. 314–318.
18. Micheal W., Mingxing X. Mouse liver and kidney carboxylesterase rapidly hydrolyzes antitumor prodrug irinotecan and the n-terminal three quarter sequence determines substrate selectivity // *Drug Metab.* — 2003. — V. 31, N 1. — P. 21–27.

19. Yang S. K., Chen S. J., Huang J. D. Enantioselectivity suggests a cytosolic origin for a commercial pig liver esterase preparation // *Chirality*. — 1995. — V. 7, N 1. — P. 40–43.
20. Salmona M., Saronio C., Bianchi R. et al. In vitro hydrolysis of oxazepam succinate half-ester by a stereospecific soluble esterase from different animal species // *J. Pharm. Sci.* — 1974. — V. 63, N 2. — P. 222–225.
21. Yang K., Lu X. Racemization kinetics of enantiomeric oxazepam: stereoselective hydrolysis of enantiomeric oxazepam 3-acetate in rat liver microsomes and brain homogenate // *Ibid.* — 1989. — V. 78, N 10. — P. 789–795.
22. Macsay G., Tegyei Z., Otvos L. Stereospecificity of esterases hydrolysis of oxazepam acetate // *Ibid.* — 1978. — V. 67, N 9. — P. 1208–1210.
23. 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. — V. 2, N 3. — P. 150–155.
24. 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. — V. 19, N 3. — P. 609–613.
25. Björkling F., Boutelje J., Gatenbeck S. et al. The effect of dimethyl sulfoxide on the enantioselectivity in the pig liver esterase catalyzed hydrolysis of dialkylated propanedioic acid dimethyl esters // *Bioorg. Chem.* — 1996. — V. 14, N 2. — P. 176–181.
26. Chen C.-S., Fujimoto Y., Sih C. J. Bifunctional chiral synthons via microbiological methods. 1. Optically active 2,4-dimethylglutaric acid monomethyl esters // *J. Am. Chem. Soc.* — 1981. — V. 103, N 12. — P. 3580–3582.
27. Ushio K., Yamauchi S., Masuda K. Preparation of enantiomerically pure (S)-2-hydroxyheptanoate via bakers' yeast catalyzed hydrolytic resolution // *Biotechnol. Lett.* — 1991. — V. 13, N 7. — P. 495–500.
28. Schlacher A., Stanzer T., Osprian I. et al. Detection of a new enzyme for stereoselective hydrolysis of linalyl acetate using simple plate assays for the characterization of cloned esterases from *Burkholderia gladioli* resolution // *J. Biotechnol.* — 1998. — V. 62, N 1. — P. 47–54.
29. Gandolfi R., Converti A., Pirozzi D. et al. Efficient and selective microbial esterification with dry mycelium of *Rhizopus oryzae* // *Ibid.* — 2001. — V. 92, N 1. — P. 21–26.
30. Gais H. J., Buelow G., Zatorski A. et al. Enzyme-catalyzed asymmetric synthesis. 8. Enantioselectivity of pig liver esterase catalyzed hydrolyses of 4-substituted meso cyclopentane 1,2-diester // *J. Org. Chem.* — 1989. — V. 54, N 21. — P. 5115–5122.
31. Sousa H., Afonso C., Mota J. et al. Enantioselective hydrolysis of a meso-diester using pig liver esterase in a two-phase stirred tank reactor // *Ind. Eng. Chem. Res.* — 2003. — V. 42, N 22. — P. 5516–5525.
32. Chartrain M., Maligres P., Cohen D. Porcine liver esterase-catalyzed enantioselective hydrolysis of a prochiral diester into its optically pure (S)-ester acid, a precursor to a growth hormone secretagogue // *J. Biosci. Bioengin.* — 1999. — V. 87, N 3. — P. 386–389.
33. 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. — V. 26, N 3. — P. 149–156.
34. Kim G. J., Lee E. G., Gokul B. et al. Identification, molecular cloning and expression of a new esterase from *Pseudomonas* sp. KCTC 10122BP with enantioselectivity towards racemic ketoprofen ethyl ester // *Ibid.* — 2003. — V. 22, N 1. — P. 29–35.
35. Безбородов А. М., Загустина Н. А., Попов В. О. Ферментативные процессы в биотехнологии. — М.: Наука, 2008. — 335 с.
36. Ogawa J., Mano J., Hagishita T. et al. 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. — V. 60, N 3. — P. 138–144.
37. Yu L., Xu L., Yu X. et al. Purification and properties of a highly enantioselective l-menthyl acetate hydrolase from *Burkholderia cepacia* // *Ibid.* — 2009. — V. 57, N 1. — P. 27–33.
38. Wang P. Y., Tsai S. W. Enzymatic hydrolytic resolution of (R,S)-tropic acid esters and (R,S)-ethyl α -methoxyphenyl acetate in biphasic media // *Ibid.* — 2009. — V. 57, N 1. — P. 158–163.
39. Asakawa K., Noguchi N., Takashima S. et al. Preparation of a new chiral building block containing a benzylic quaternary stereogenic center and a formal total synthesis of (–)-physostigmine // *Tetrahedron: Asymmetry*. — 2008. — V. 19, N 19. — P. 2304–2309.
40. Monti D., Ferrandi E. E., Righi M. et al. Purification and characterization of the enantioselective esterase from *Kluyveromyces marxianus* CBS 1553 // *J. Biotechnol.* — 2008. — V. 133, N 1. — P. 65–72.
41. Bloch R., Guibe-Jampel E., Girard C. Stereoselective pig liver esterase-catalyzed hydrolysis of rigid bicyclic meso-diester: Preparation of optically pure 4,7-epoxytetra- and hexa-hydrophthalides // *Tetrahedron Lett.* — 1985. — V. 26, N 34. — P. 4087–4090.
42. Guanti G., Banfi L., Narisano E. et al. Enzymes in asymmetric synthesis: effect of reaction media on the PLE catalysed hydro-

- lysis of diesters // *Ibid.* — 1986. — V. 27, N 38. — P. 4639–4642.
43. *Hultin P. G., Mueseler F. J., Jones J. B.* Enzymes in organic synthesis. Pig liver esterase and porcine pancreatic lipase catalyzed hydrolyses of 3,4-(isopropylidenedioxy)-2,5-tetrahydrofuran diesters // *J. Org. Chem.* — 1991. — V. 56, N 18. — P. 5375–5380.
44. *Kima H. K., Nab H. S., Park M. S. et al.* Occurrence of ofloxacin ester-hydrolyzing esterase from *Bacillus niacini* EM001 // *J. Mol. Catal. B. Enzym.* — 2004. — V. 27, N 4–6. — P. 237–241.
45. *Curzons A., Powell L., Keay A.* Process for stereospecific hydrolysis of piperidinedione derivatives. WO/1933/022284. Application number PTG/GB93/00721 Publication Date 11/11/1993 Filing Date: 06/04/1993.
46. *Евтушенко А. Н., Фомичев Ю. К.* Введение в биотехнологию. — Минск: БГУ, 2004. — 104 с.
47. *Волова Т. Г.* Биотехнология. — Новосибирск: Изд-во Сиб. отделения РАН, 1999. — 252 с.
48. *Вудворд Дж.* Иммуобилизованные клетки и ферменты. Методы. — М.: Мир, 1988. — 378 с.
49. *Егоров Н. С. Самуилов В. Д.* Биотехнология. — М.: Высшая школа, 1987. — 159 с.
50. *Березин И. В., Мартинек К.* Введение в прикладную энзимологию. — М.: Изд-во МГУ, 1982. — 384 с.
51. *Тривен М.* Иммуобилизованные ферменты. — М.: Мир, 1983. — 213 с.
52. *Shimazaki Y., Kuroda T.* Production of enzyme reactors after separation by non-denaturing two-dimensional electrophoresis and immobilization on membrane // *Biotechnol. Lett.* — 2009. — V. 31, N 10. — P. 1545–1549.
53. *Almeida R. V., Branco R. V., Peixoto B. et al.* Immobilization of a recombinant thermostable esterase (Pf2001) from *Pyrococcus furiosus* on microporous polypropylene: Isotherms, hyperactivation and purification // *Biochem. Eng. J.* — 2008. — V. 39, N 3. — P. 531–537.
54. *Shimazaki Y., Sakikawa T., Kimura A.* Analysis of activity of esterase captured onto an immunoaffinity membrane // *Clin. Chim. Acta.* — 2012. — V. 413, N 1–2. — P. 269–272.
55. *Laumen K., Reimerdes E. H., Schneider M. et al.* Immobilized porcine liver esterase: a convenient reagent for the preparation of chiral building blocks // *Tetrahedron Lett.* — 1985. — V. 26, N 4. — P. 407–410.
56. *Desai P. D., Dave A. M., Devi S.* Chemo-selective hydrolysis of methyl 2-acetoxybenzoate using free and entrapped esterase in K-carrageenan beads // *J. Appl. Polymer Sci.* — 2008. — V. 108, N 4. — P. 2617–2622.
57. *Barbara S., Robert W., Steven W. et al.* Carrageenan-immobilized esterase. United States Patent 5262313. Application Number: 07/715829 Publication Date: 11/16/1993 Filing Date: 06/14/1991.
58. *Sousa H. A., Rodrigues C., Klein E. et al.* Immobilisation of pig liver esterase in hollow fiber membranes // *Enz. Microbial Technol.* — 2001. — V. 29, N 10. — P. 625–634.
59. *Herdan J.-M., Balulescu M., Cira O.* Enantioselective hydrolysis of racemic esters using pig liver esterase // *J. Mol. Catalysis A: Chemical.* — 1996. — V. 107, N 1. — P. 409–414.
60. *Ruppert S., Gais H.-J.* Activity enhancement of pig liver esterase in organic solvents by colyophilization with methoxypolyethylene glycol: kinetic resolution of alcohols // *Tetrahedron: Asymmetry.* — 1997. — V. 8, N 21. — P. 3657–3664.
61. *Gais H.-J., Jungen M., Jadhav V.* Activation of pig liver esterase in organic media with organic polymers. Application to the enantioselective acylation of racemic functionalized secondary alcohols // *J. Org. Chem.* — 2001. — V. 66, N 10. — P. 3384–3396.
62. *Krebsfänger N., Schierholz K., Bornscheuer U. T.* Enantioselectivity of a recombinant esterase from *Pseudomonas fluorescens* towards alcohols and carboxylic acids // *J. Biotechnol.* — 1998. — V. 60, N 1. — P. 105–111.
63. *Zheng G.-W., Yu H.-L., Li C.-X.* Immobilization of *Bacillus subtilis* esterase by simple cross-linking for enzymatic resolution of DL-menthyl acetate // *J. Mol. Catal. B. Enzym.* — 2011. — V. 70, N 3–4. — P. 138–143.
64. *Андронати С. А., Шестеренко Е. А., Севастьянов О. В. и др.* Гидролиз сложных эфиров 7-бром-3-гидрокси-5-фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-она микросомальной фракцией печени свиньи // *Вісн. ОНУ, Сер. Хімія.* — 2008. — Т. 13, № 11. — С. 37–45.
65. *Шестеренко Е. А., Романовская И. И., Андронати С. А. и др.* Стереоселективный гидролиз 1-метил-5-фенил-3-ацетокси-7-бром-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-она с помощью свободной и иммобилизованной микросомальной фракции печени свиньи // *Доп. НАНУ.* — 2011. — № 2. — С. 166–172.

КАРБОКСИЛЕСТЕРАЗИ В ЕНАНТІОСЕЛЕКТИВНОМУ СИНТЕЗИ ОРГАНІЧНИХ СПОЛУК

С. А. Шестеренко
І. І. Романовська
О. В. Севастьянов
С. А. Андронаті

Фізико-хімічний інститут
ім. О. В. Богатського НАН України, Одеса

E-mail: romairina@gmail.com

В огляді наведено класифікацію, структуру і механізм каталітичної дії карбоксилестераз різного походження.

Показано перспективність використання карбоксилестераз для вивчення метаболізму та активації низки лікарських речовин і проліків *in vitro*. Актуальним є також використання ензимів як біокаталізаторів стереоселективного гідролізу і синтезу складних ефірів ациклических, карбоциклических та гетероциклических сполук. Встановлено, що одержані за допомогою карбоксилестерази енантиомери характеризуються високим хімічним виходом і оптичною чистотою, а іммобілізація на різних носіях стабілізує ензим і дає змогу багаторазово використовувати отримані біокаталізатори. Проведені авторами дослідження виявили особливості ензиматичного гідролізу нових 3-ацилокси-1,4-бенздіазепін-2-онів — потенційних анксиолітичних та снодійних засобів за допомогою карбоксилестерази мікросомальної фракції печінки свині. З використанням вільної та іммобілізованої в гелі філофорину і альгінату, стабілізованих Ca^{2+} , мікросомальної фракції вперше здійснено енантиоселективний гідроліз 3-ацетокси-7-бром-1-метил-5-феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону. Виділено S-енантиомер субстрату, що свідчить про більшу специфічність карбоксилестерази мікросомальної фракції печінки свині до його R-енантиомера.

Ключові слова: карбоксилестераза, мікросомальна фракція печінки свині, стереоселективний синтез, 3-ацилокси-1,4-бенздіазепін-2-они, іммобілізація.

CARBOXYLESTERASES IN ENANTIOSELECTIVE SYNTHESIS OF ORGANIC COMPOUNDS

E. A. Shesterenko
I. I. Romanovska
O. V. Sevastyanov
S. A. Andronati

Bogatsky Physico-Chemical Institute
of National Academy of Sciences of Ukraine,
Odesa

E-mail: romairina@gmail.com

The classification, structure, and mechanism of catalytic action of carboxylesterase of different origin are presented in the review.

The prospects of carboxylesterases application for metabolism and both several drugs and prodrugs activation investigation *in vitro* are shown. The enzyme usage as biocatalyst of stereoselective hydrolysis and synthesis of a wide range of acyclic, carbocyclic and heterocyclic compounds — esters are also urgent. It was established that enantiomers obtainable with the help of carboxylesterase are characterized by high chemical yields and optical purity; immobilization on different supports stabilizes the enzyme and allows the repeated usage of obtained biocatalysts. The own studies conducted and the enzymatic hydrolysis features of news 3-acylhydroxy-1,4-benzodiazepin-2-ones — potential anxiolytic and hypnotic means, with a help of pig liver microsomal fraction carboxylesterase have been established. For the first time the enantioselective hydrolysis of 3-acetoxy-7-bromo-1-methyl-5-phenyl-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-one was accomplished using free and immobilized in phyllophorine and alginate, stabilized by Ca^{2+} microsomal fraction. The S-enantiomer of substrate was isolated, which suggests the increased specificity of pig liver microsomal fraction carboxylesterase to its R-enantiomer.

Key words: carboxylesterase, pig liver microsomal fraction, stereoselective synthesis, 3-acylhydroxy-1,4-benzodiazepine-2-ones, immobilization.