



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **76777** (13) **U**  
(51) МПК (2013.01)  
**C07D 243/14** (2006.01)  
**C07C 7/00**  
**C07C 45/54** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>u 2012 09078</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Шестеренко Євгенія Аркадівна (UA),</b> <b>Романовська Ірина Ігорівна (UA),</b> <b>Севастьянов Олег Всеволодович (UA),</b> <b>Павловський Віктор Іванович (UA),</b> <b>Андронаті Сергій Андрійович (UA)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>23.07.2012</b>	
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>10.01.2013</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.01.2013, Бюл.№ 1</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМ. О.В. БОГАТСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ,</b> Люстдорфська дорога, 86, м. Одеса, 65080 (UA)

**(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ S-ЕНАНТІОМЕРІВ 3-АЦИЛОКСИ-7-БРОМ-5-ФЕНІЛ-1,2-ДИГІДРО-3Н-1,4-БЕНЗДІАЗЕПІН-2-ОНУ**

**(57) Реферат:**

Спосіб отримання S-енантіомерів 3-ацилокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону включає проведення стереоселективного гідролізу рацематів циклічних сполук та стереоселективний гідроліз.

UA 76777 U

UA 76777 U

Корисна модель належить до біотехнології і біоорганічної хімії, а саме до способу отримання за допомогою іммобілізованої мікросомальної фракції печінки свині S-енантіомерів 3-ацетокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону, які можуть знайти застосування у медицині і фармацевтичній промисловості.

Відомий спосіб проведення енантіоселективного гідролізу 3-ацетокси-7-хлор-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону за допомогою вільної мікросомальної фракції печінки щурів (див. Yang S.K., Liu K., Guengerich F.P. Enantioselective hydrolysis of oxazepam 3-acetate by esterases in human and rat liver microsomes and rat brain S9 fraction// Chirality. - 1990. - Vol. 2, № 3. - P. 150-155).

Відомий спосіб іммобілізації карбоксилестерази печінки свині в гранули альгілату натрію. Однак іммобілізований фермент використовувався для стереоселективного гідролізу офлоксацину, а не естерів 7-бром-3-гідрокси-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону.

Спосіб передбачає використання гранул альгілату натрію, модифікованого  $\text{Ca}^{2+}$  з іммобілізованою в них карбоксилестеразою для отримання левофлоксацину (L-енантіомер офлоксацину) антибактеріального препарату, що належить до групи фторхінолонів. Реакцію проводили в реакторі періодичної дії в 0,1 моль/дм фосфатному буферному розчині рН 6,8, 30 °С і перемішуванні 200 об/хв. Після чого гранули видаляли з реакційного середовища, промивали буферним розчином і використовували повторно. Кінцевий продукт відокремлювали від реакційної суміші за допомогою вискоєфективної рідинної хроматографії (див. Lee S.-Y., Min B.-H., Hwang S.-H. et al. Enantioselective production of levofloxacin by immobilized porcine liver esterase// Biotechnol. Lett. - 2001. - Vol. 23, № 13. - P. 1033-1037).

Даний спосіб взятий як найближчий аналог.

Аналог та спосіб, що заявляється, мають такі спільні ознаки:

- проведення стереоселективного гідролізу естерів циклічних сполук.
- використання препарату карбоксилестерази печінки свині, іммобілізованого в гранулах альгілату Na, модифікованого  $\text{Ca}^{2+}$ .

Але відомий спосіб мав суттєві недоліки - комерційний препарат карбоксилестерази (Sigma Chemical Co., USA) має високу вартість, низький рівень збереження вихідної активності (58 %); розроблений у прототипі біокатализатор використовується лише впродовж 5 циклів з 100 % збереженням естеразної активності, крім того, застосування вискоєфективної рідинної хроматографії не дозволяє отримувати продукт реакції в препаративній кількості.

В основу корисної моделі, що заявляється, поставлено задачу розробити спосіб отримання S-енантіомерів естерів 7-бром-3-гідрокси-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону, в якому шляхом використання карбоксилестерази у складі мікросомальної фракції печінки свині можливо значно підвищити кількість циклів використання біокатализатора, збереження його естеразної активності та збільшити доступність іммобілізованого препарату.

Поставлена задача вирішена у способі отримання S-енантіомерів естерів 7-бром-3-гідрокси-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону, тим що передбачає проведення стереоселективного гідролізу рацематів циклічних сполук за допомогою карбоксилестерази печінки свині, іммобілізованої в альгілаті Na, модифікованому  $\text{Ca}^{2+}$ , тим, що як циклічні сполуки використовують естери 3-гідрокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону, стереоселективний гідроліз яких здійснюють при температурі реакційного середовища 37 °С впродовж 1 години за допомогою карбоксилестерази у складі мікросомальної фракції печінки свині (естеразна активність 258,7 од/см<sup>3</sup>), з наступним виділенням продукту з реакційного середовища методом колонкової хроматографії. Згідно з корисною моделлю, циклічні сполуки використовують естери 3-гідрокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону, стереоселективний гідроліз яких здійснюють при температурі реакційного середовища 37 °С впродовж 1 години за допомогою карбоксилестерази у складі мікросомальної фракції печінки свині (естеразна активність 258,7 од/см<sup>3</sup>), з наступним виділенням продукту з реакційного середовища методом колонкової хроматографії.

Корисна модель, що заявляється, містить такі нові ознаки:

- одержання іммобілізованої в альгілаті Na, модифікованому  $\text{Ca}^{2+}$ , мікросомальної фракції печінки свині з 70 % збереженням вихідної активності мікросомальної фракції.
- проведення стереоселективного гідролізу рацематів естерів 7-бром-3-гідрокси-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону за допомогою іммобілізованої мікросомальної фракції печінки свині;

- виділення продуктів реакції - S-енантіомерів естерів 7-бром-3-гідрокси-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону з реакційного середовища за допомогою колонкової хроматографії.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю заявлених ознак та досягнутим технічним результатом - проведення стереоселективного гідролізу рацематів естерів 7-бром-3-гідрокси-5-

феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону, що здійснюють при температурі реакційного середовища 37 °С впродовж 1 години за допомогою карбоксилестерази у складі мікросомальної фракції печінки свині (естеразна активність 258,7 од/см<sup>3</sup>) з наступним виділенням продукту з реакційного середовища методом колонкової хроматографії дозволяє отримувати S-енантіомери естерів 7-бром-3-гідрокси-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону впродовж 12 циклів використання біокаталізатора з 100 % збереженням естеразної активності іммобілізованої мікросомальної фракції (70 % від вихідної активності вільної мікросомальної фракції).

Добре відомо, що фармакологічна активність енантіомерів може значно відрізнятись (див. Спасов А.А., Иежица И.Н., Васильев П.М. и др. Фармакология стереоизомеров лекарственных веществ. - Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2011. - 348 с), тому стереохімічна характеристика хіральних лікарських препаратів є дуже важливою. Розробка препаративних методів розділення енантіомерів, в кількостях, необхідних для проведення фармакологічних досліджень, в тому числі естерів 7-бром-3-гідрокси-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону, потенційних анксиолітичних і снодійних засобів (див. Сівко Г.І., Кириченко І.М., Мальцев Г.В., Семенішина Е.А., Павловський В.І., Кравченко І.А. Протисудомна активність складних ефірів 3-гідроксифеназепаму при їх пероральному введенні// Одеський медичний журнал. - 2006. - Т. 96, № 4. - С 27-29), є актуальною.

Карбоксилестераза печінки свавців є перспективним біокаталізатором енантіоселективного гідролізу і синтезу широкого ряду аліциклічних, карбоциклічних і гетероциклічних сполук (див. Bornscheuer U.T., Kazlauskas R.J.// Hydrolases in organic synthesis/ Weinheim, Wiley-VCH, 2006. - 368 p.

Але до недоліків комерційного препарату карбоксилестерази належить: нестабільність, висока вартість, однократність використання. Тому нами для проведення стереоселективного гідролізу естерів 7-бром-3-гідрокси-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону була вибрана мікросомальна фракція печінки свині, у зв'язку з її більшою доступністю: методика її виділення є більш простою, порівняно з високоочищеним препаратом карбоксилестерази.

Заявлений спосіб забезпечує отримання S-енантіомерів естерів 7-бром-3-гідрокси-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону, краще збереження естеразної активності карбоксилестерази після іммобілізації, значне підвищення кратності застосування препарату з 100 % збереженням естеразної активності іммобілізованої мікросомальної фракції (70 % від активності вільної мікросомальної фракції) та збільшення кількості отриманого продукту.

У даному способі з'ясовано залежність ступеня трансформації субстратів за допомогою мікросомальної фракції печінки свині, іммобілізованої в альгінаті натрію, модифікованому Ca<sup>2+</sup>, від температури інкубаційного середовища і активності біокаталізатора. Також встановлено залежність естеразної активності біокаталізатора, необхідної для досягнення 50 % ступеня трансформації субстратів, від їх структури.

Заявлений спосіб здійснюється наступним чином.

У розчин, що містить естер 7-бром-3-гідрокси-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону з концентрацією 0,5 ммоль/дм<sup>3</sup>, диметилсульфоксид і дистильовану воду в співвідношенні 2:3, вводили мікросомальну фракцію, попередньо змішану з 4 % розчином альгінату Na, і утворенням в результаті гранул, стабілізованих 5 % водним розчином хлориду кальцію. Реакційну суміш витримували при перемішуванні (250 об/хв) при температурі 37 °С протягом 60 хв.

Через 60 хв інкубації при 37 °С гранули з включеною мікросомальною фракцією відокремлювали фільтруванням та використовували багаторазово (до 12 раз з 100 % збереженням активності іммобілізованого препарату), введенням в новий розчин з описаними вище компонентами. Отриманий S-енантіомер естеру 7-бром-3-гідрокси-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону виділяли з реакційної суміші екстрагуванням хлороформом з подальшим виділенням методом колоночної хроматографії (носії: силікагель L 40/100  $\mu$ , Chemapol, Чехія) з використанням системи хлороформ:етилацетат 1,5:2,5. Структуру S-енантіомеру встановлювали за допомогою рентгеноструктурного аналізу (рентгенівські дифракційні дані вимірювали при  $t_{\text{кдмн}}$  в монокристальному дифрактометрі "Oxford Diffraction SuperNova" з мікрофокусним джерелом CuK $\alpha$  випромінювання ( $\lambda=1,54184$ )), кут обертання - поляриметричним методом (вимірювали на поляриметрі Perkin-Elmer 241-MC).

Приклади здійснення способу:

Приклад 1.

В ємність, що містить 1 дм<sup>3</sup> розчину 3-ацетокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону з концентрацією 0,5 ммоль/дм<sup>3</sup>, приготованого на суміші диметилсульфоксид: дистильована вода в співвідношенні 2:3, вводили мікросомальну фракцію

(естеразна активність 258,7 од/см<sup>3</sup>), попередньо змішаною з 4 % розчином альгілату натрію, і утворенням в результаті гранул, стабілізованих 5 % водним розчином хлориду кальцію. Реакційну суміш витримували при перемішуванні (250 об/хв) при 37 °С протягом 60 хв. Після інкубації гранули відокремлювали фільтруванням та використовували багаторазово (до 12 раз з 100 % збереженням естеразної активності іммобілізованого препарату), введенням в новий розчин з описаними вище компонентами.

Отриманий S-енантіомер 3-ацетокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону виділяли з реакційної суміші екстракцією 0,75 дм<sup>3</sup> хлороформу і наступною колонковою хроматографією (носії: силікагель L 40/100  $\mu$ , Chemapol, Чехія) з використанням системи хлороформ:етилацетат=1,5:2,5. Вихід продукту становив 50 % (50,0 мг). Кут обертання  $[\alpha]_D^{20} = +195,3^\circ$ ,  $c=1$  в хлороформі.

Приклади №№ 2-6 ілюструють здійснення способу аналогічно прикладу № 1, але при використанні різних температур (10-50 °С) реакційного середовища.

Приклади №№ 7-9 демонструють здійснення способу аналогічно прикладу № 1, але при використанні біокатализатора з різною естеразною активністю.

В таблиці 1 наведена залежність ступеня трансформації 3-ацилокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-онів за допомогою іммобілізованої мікросомальної фракції печінки свині, від температури інкубаційного середовища і активності біокатализатора.

Приклади №№ 10-18 ілюструють здійснення способу аналогічно прикладу № 1, але при використанні інших естерів 7-бром-3-гідрокси-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону.

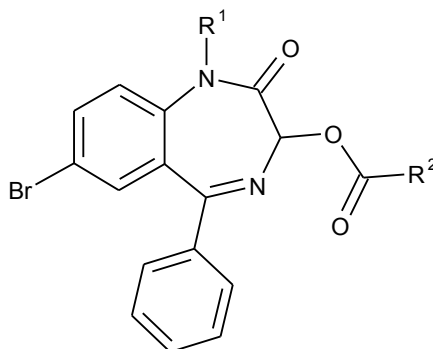
В таблиці 2 наведена залежність естеразної активності іммобілізованої мікросомальної фракції, необхідної для 50 % ступеня гідролізу субстратів від структури 3-ацилокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-онів. На фіг. 1 наведена залежність ступеня трансформації 3-ацетокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону від кратності використання біокатализатора. Фіг. 1 демонструє, що іммобілізований препарат мікросомальної фракції каталізує енантіоселективний гідроліз 3-ацетокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону з 100 % збереженням естеразної активності впродовж 12 циклів використання біокатализатора. Показано, що естеразна активність іммобілізованої мікросомальної фракції відносно до вивчуваних естерів 7-бром-3-гідрокси-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону носить нелінійний характер. Так, естеразна активність, що необхідна для 50 % трансформації субстрату, становила 167,9 од/см<sup>3</sup> для 3-пропінілокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону (приклад 11), в той час як для сполук з прикладів 10 і 12, необхідна кількість біокатализатора становила 258,7 од/см<sup>3</sup> і 189,1 од/см<sup>3</sup>, відповідно. Також встановлено, що введення алкільних замісників в перше положення молекули субстрату (прикладі 17, 18) приводить до збільшення необхідної естеразної активності.

Отримані результати дозволяють прийти до наступного висновку: розроблений спосіб дозволяє отримувати S-енантіомери естерів 7-бром-3-гідрокси-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону у препаративних кількостях та можливістю багаторазового використання біокатализатора.

Таблиця 1

№№	T, °C	Естеразна активність біокатализатора, од/см <sup>3</sup>	Ступінь трансформації, %
1	37	258,7	50,0
2	10	258,7	15,0
3	20	258,7	17,5
4	30	258,7	34,8
5	40	258,7	48,7
6	50	258,7	25,4
7	37	77,6	14,6
8	37	142,3	22,9
9	37	188,9	35,3

Таблиця 2



№№ прикладу	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Естеразна активність біокаталізатора, од/см <sup>3</sup>
10*	H	CH <sub>3</sub>	258,7
11	H	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	167,9
12	H	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	189,1
13	H	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	204,0
14	H	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	203,2
15	H	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	204,3
16	H	C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>	275,6
17**	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	286,0
18***	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>3</sub>	291,2

$[\alpha]_D^{20}$  (C=1, в хлороформі): \*+116,9°, \*\* +195,3°, \*\*\*+ 193,8°.

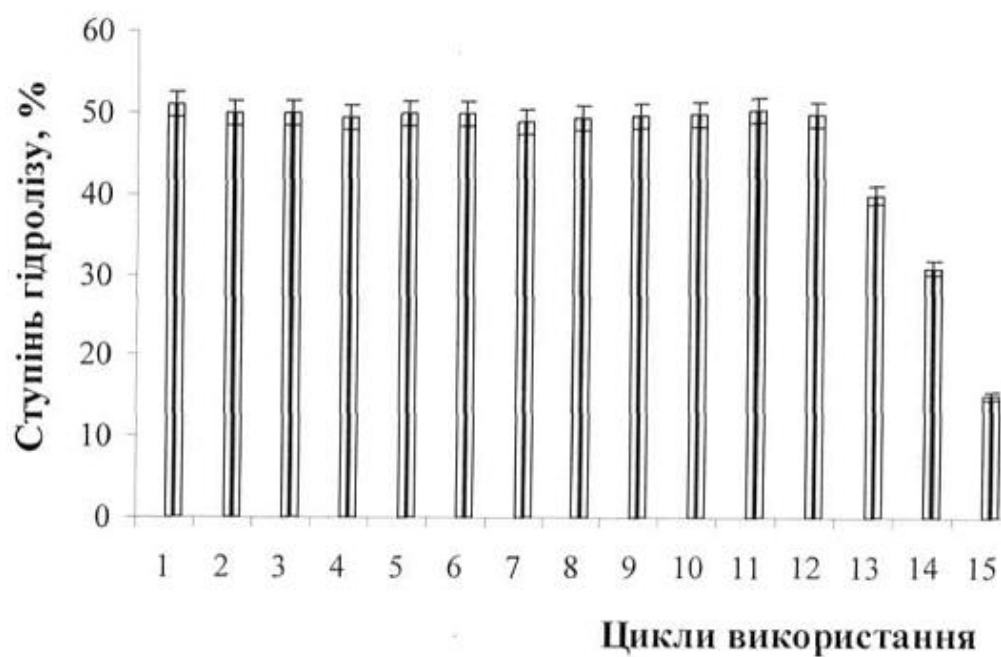
Вихід: \*50,0 % (50,0 мг), \*\*46,2 % (46,2 мг), \*\*\*43,1 % (43,1 мг)

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

5

Спосіб отримання S-енантіомерів 3-ацилокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону, що передбачає проведення стереоселективного гідролізу рацематів циклічних сполук за допомогою карбоксилестерази печінки свині, іммобілізованої в альгінаті Na, модифікованому Ca<sup>2+</sup>, який **відрізняється** тим, що як циклічні сполуки використовують естери 3-гідрокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-ону, стереоселективний гідроліз яких здійснюють при температурі реакційного середовища 37 °C впродовж 1 години за допомогою карбоксилестерази у складі мікросомальної фракції печінки свині (естеразна активність 258,7 од/см<sup>3</sup>), з наступним виділенням продукту з реакційного середовища методом колонкової хроматографії.

10




---

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601