

УДК 544.478.41:547.831.3:579.66

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НОВОГО ШТАММА АКТИНОБАКТЕРИЙ RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS ПЗ-8 В ЭНАНТИОСЕЛЕКТИВНОМ ГИДРОЛИЗЕ N-АЦИЛ ПРОИЗВОДНЫХ 3,4-ДИГИДРО-3-МЕТИЛ-2Н-[1,4]БЕНЗОКСАЗИНА И 2-МЕТИЛ-1,2,3,4-ТЕТРАГИДРОХИНОЛИНА

<sup>1</sup>Чулаков Е.Н., <sup>1</sup>Левит Г.Л., <sup>1</sup>Садретдинова Л.Ш., <sup>2</sup>Ремезовская Н.Б.,  
<sup>2</sup>Максимов А.Ю., <sup>2</sup>Демаков В.А., <sup>1</sup>Краснов В.П.

<sup>1</sup>Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения  
Российской академии наук, Екатеринбург, e-mail: chulakov@ios.uran.ru;

<sup>2</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения  
Российской академии наук, Пермь

Изучена возможность применения нового штамма актинобактерий *Rhodococcus erythropolis* ПЗ-8 для проведения энантиоселективного микробиологического гидролиза N-ацетил-3,4-дигидро-3-метил-7,8-дифтор-2Н-[1,4]бензоксазина, N-ацетил-3,4-дигидро-3-метил-2Н-[1,4]бензоксазина, N-ацетил-2-метил-1,2,3,4-тетрагидрохинолина, N-бензоил-3,4-дигидро-3-метил-2Н-[1,4]бензоксазина и N-бензоил-2-метил-1,2,3,4-тетрагидрохинолина. Исследована кинетика процесса биотрансформации амидов в фосфатном буферном растворе (рН 7,4) с добавлением диметилсульфоксида при температуре 30 °С. Показано, что результат микробиологической трансформации существенным образом зависит как от строения гетероциклического амина, так и природы ацильной группы субстрата. Установлено, что в результате микробиологического гидролиза N-ацетил производных фторированного и нефторированного 3,4-дигидро-3-метил-2Н-[1,4] бензоксазинов биотрансформации подвергаются только (S)-амиды с образованием соответствующих (S)-аминов (оптическая чистота, ee > 99%). N-Ацетил-2-метил-1,2,3,4-тетрагидрохинолин не подвергался биотрансформации указанным штаммом в изученных условиях. Микробиологический гидролиз N-бензоил производных 3,4-дигидро-3-метил-2Н-[1,4]бензоксазина и 2-метил-1,2,3,4-тетрагидрохинолина штаммом *Rhodococcus erythropolis* ПЗ-8 проходил нестереоизбирательно, биотрансформации подвергались оба энантиомера субстрата. Результаты данного исследования могут быть полезными для промышленного производства (S)-3,4-дигидро-3-метил-7,8-дифтор-2Н-[1,4]бензоксазина – ключевого полупродукта в синтезе высокоактивного противобактериального препарата левофлоксацина.

**Ключевые слова:** актинобактерии, гидролиз, энантиоселективность, амид

## APPLICATION OF A NEW STRAIN OF ACTINOBACTERIA RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS P3-8 IN ENANTIOSELECTIVE HYDROLYSIS OF N-ACYL DERIVATIVES OF 3,4-DIHYDRO-3-METHYL-2H-[1,4]BENZOXAZINE AND 2-METHYL-1,2,3,4-TETRAHYDROQUINOLINE

<sup>1</sup>Chulakov E.N., <sup>1</sup>Levit G.L., <sup>1</sup>Sadretdinova L.Sh., <sup>2</sup>Remezovskaya N.B.,  
<sup>2</sup>Maksimov A.Yu., <sup>2</sup>Demakov V.A., <sup>1</sup>Krasnov V.P.

<sup>1</sup>Postovsky Institute of Organic Synthesis, Ural Branch, Russian Academy of Sciences,  
Ekaterinburg, e-mail: chulakov@ios.uran.ru;

<sup>2</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm

The possibility of using a new strain of actinobacteria *Rhodococcus erythropolis* P3-8 for enantioselective microbiological hydrolysis of N-acetyl-7,8-difluoro-3,4-dihydro-3-methyl-2H-[1,4]benzoxazine, N-acetyl-3,4-dihydro-3-methyl-2H-[1,4]benzoxazine, N-acetyl-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline, N-benzoyl-3,4-dihydro-3-methyl-2H-[1,4]benzoxazine and N-benzoyl-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline has been studied. The kinetics of the amide biotransformation in a phosphate buffer solution (pH 7.4) supplemented with dimethyl sulfoxide at 30 °C has been investigated. It has been shown that the result of microbiological transformation essentially depends on both the heterocycle structure and the nature of acyl group of the substrate. It has been found that in the course of microbiological hydrolysis of N-acetyl derivatives of fluorinated and non-fluorinated 3,4-dihydro-3-methyl-2H-[1,4] benzoxazines, only (S)-amides are subjected to biotransformation to form the corresponding (S)-amines (optical purity, ee > 99%). N-Acetyl-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline was not transformed by said strain under the examined conditions. Microbiological hydrolysis of N-benzoyl derivatives of 3,4-dihydro-3-methyl-2H-[1,4] benzoxazine and 2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline with *Rhodococcus erythropolis* P3-8 was not stereoselective, both enantiomers of the substrate underwent biotransformation. The results of this study may be useful for the industrial production of (S)-7,8-difluoro-3,4-dihydro-3-methyl-2H-[1,4]benzoxazine, a key intermediate in the synthesis of a highly active antibacterial agent levofloxacin.

**Keywords:** actinobacteria, hydrolysis, enantioselectivity, amide

Ключевыми полупродуктами в синтезе практически важных органических соединений: антибиотиков, хиральных катализаторов, реагентов для разделения оптических

изомеров в результате их дериватизации и пр. являются хиральные амины, в структуре которых аминогруппа находится вблизи асимметрического центра. Стереоконфигу-

рация и оптическая чистота указанных соединений играют решающую роль, как для избирательности протекания химических процессов, так и для проявления биологической активности [1]. Поэтому разработка рациональных подходов к синтезу энантиомеров хиральных аминов представляет значительный интерес. Несмотря на то, что в последнее время появилось множество катализаторов для асимметрического синтеза оптически чистых соединений [2, 3], в промышленных масштабах преобладают методы оптического разделения рацематов, в том числе методы кинетического разделения. Процессы кинетического разделения рацематов активно изучаются и считаются одними из наиболее современных и эффективных подходов к синтезу оптически чистых соединений [4, 5]. Кинетическое разделение рацемических соединений – это процесс достижения частичного или полного разделения, основанный на различиях в скоростях реакции отдельных энантиомеров с хиральным агентом (реагентом, катализатором, растворителем и др.) [6]. Суть метода заключается в том, что под действием хирального нерацемического агента один из энантиомеров рацемата реагирует быстрее, чем другой.

Ранее нами был разработан оригинальный метод синтеза ключевого полупродукта в синтезе высокоактивного антибактериального препарата левофлоксацин – (*S*)-3,4-дигидро-3-метил-7,8-дифтор-2*H*-[1,4]бензоксазина высокой оптической чистоты (*ee* > 99%) в результате кинетического разделения рацемата при ацилировании хлорангидридом (*S*)-напроксена [7].

В последнее время огромный прогресс достигнут в области ферментативного кинетического разделения рацематов [8, 9]. Ферменты часто демонстрируют высокий уровень энантиоселективности, что позволяет использовать их в фармацевтической промышленности для синтеза лекарственных препаратов [10–12]. Преимущество ферментативного катализа над химическим синтезом заключается в том, что, как правило, использование фермента позволяет получить продукт с более высокой степенью оптической чистоты. Ферментативные реакции протекают при нормальной температуре и давлении, что позволяет избежать более экстремальных условий, которые в свою очередь могут привести к проблемам изомеризации и рацемизации. Использование живых микроорганизмов обладает рядом преимуществ перед ферментами, поскольку отсутствует необходимость вы-

делять отдельный фермент и очищать его. Микробиологические процессы, как правило, осуществляются в водном растворе. Это позволяет избежать использования экологически вредных химических веществ, используемых в химических процессах. В связи с этим разработка биокаталитических технологий является перспективной для биотехнологии и фармакологии [1].

В частности, ранее сообщалось об эффективном микробиологическом синтезе (*S*)-3,4-дигидро-3-метил-7,8-дифтор-2*H*-[1,4]бензоксазина в результате гидролиза соответствующего *N*-ацетил производного в присутствии микроорганизмов рода *Bacillus* [13], *Rhodococcus erythropolis* 25 и *Microbacterium paraoxydans* 20-11с [14].

Цель исследования: исследование нового штамма *Rh. erythropolis* ПЗ-8, обладающего высокой амидазной и карбоксилэстеразной активностью, для энантиоселективного гидролиза *N*-ацетил и *N*-бензоил производных 3,4-дигидро-3-метил-2*H*-[1,4]бензоксазина и 2-метил-1,2,3,4-тетрагидрохинолина (схема 1).

#### Материалы и методы исследования

В данной работе мы исследовали новый штамм микроорганизмов, выделенный из лесной подзолистой почвы пригорода г. Перми, который был отнесен к виду *Rhodococcus erythropolis* по совокупности культурально-морфологических, хемотаксономических и биохимических признаков, а также по результатам секвенирования генов 16S рРНК. Исследуемая культура обладает следующими морфологическими характеристиками: грамположительные клетки формируют на плотных средах колонии среднего размера, округлые, не сливные, розовато-кремовые, матовые, поверхность слегка морщинистая, профиль изогнутый (с центральной точкой), консистенция колоний молодой культуры – мягкая, старых – творожистая, на минимальном агаре колонии круглые с ризоидным краем.

Культуры выращивали на минеральной солевой среде (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$  – 1,6;  $\text{NaCl}$  – 0,5;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,5;  $\text{CaCl}_2$  – 0,005;  $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  – 0,01;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,005; pH  $7,2 \pm 0,2$ . Агаризованную среду получали добавлением бактоагара (Sigma) до конечной концентрации 1,5%. Источником углерода служила глюкоза в конечной концентрации 0,1%. В качестве субстрата использовали амиды (*RS*)-**1a-f**, которые служили единственными источниками азота. Ростовые субстраты асептически добавляли до ко-

начной концентрации в автоклавированную и охлажденную до 25 °С среду. Чистота культур контролировалась высевом на агаризованную среду LB. Плотность культуры оценивали по изменению оптической плотности суспензии клеток при 540 нм с учетом разведения на спектрофотометре СФ-46 с использованием кварцевой 1 см кюветы. Одна единица оптической плотности при 540 нм соответствует 0,42 мг сухого веса клеток [1].

Исходные амиды (*RS*)-**1a-f** получали по стандартным методикам из соответствующих аминов (*RS*)-**2a-c** при взаимодействии с уксусным ангидридом или бензоил хлоридом в присутствии триэтиламина (Схема 2) [13]. Выходы целевых продуктов составляли 62–74%. Строение и химическую чистоту синтезированных соединений подтверждали данными спектроскопии ЯМР, элементного анализа и тонкослойной хроматографии.

Исследование биотрансформации амидов (*RS*)-**1a-c** в зависимости от времени

инкубации под действием *Rh. erythropolis* ПЗ-8 (25 мг) проводили при 30 °С и перемешивании 90 об/мин в растворе 0,25 мл ДМСО и 24,75 мл фосфатного буфера (pH 7,4) с начальной концентрации амида (*RS*)-**1a-c** 100 мкг/мл (0,440 ммоль/л для **1a**, 0,523 ммоль/л для **1b** и 0,528 ммоль/л для **1c**) в течение семи дней. Через каждые сутки отбирали аликвоту 2 мл, смесь продуктов реакции экстрагировали 1 мл дихлорметана, сушили над MgSO<sub>4</sub>.

Исследование биотрансформации амидов (*RS*)-**1d,f** под действием *Rh. erythropolis* ПЗ-8 проводили при 30 °С и перемешивании 90 об/мин в растворе 0,5 мл ДМСО и 49,5 мл фосфатного буфера (pH 7,4) с начальной концентрации амида (*RS*)-**1d,f** 50 мкг/мл (0,197 ммоль/л для **1d** и 0,199 ммоль/л для **1f**) в виду плохой растворимости субстратов в условиях реакции. На 3, 5 и 7 сутки отбирали аликвоту 2 мл, смесь продуктов реакции экстрагировали 1 мл дихлорметана, сушили над MgSO<sub>4</sub>.

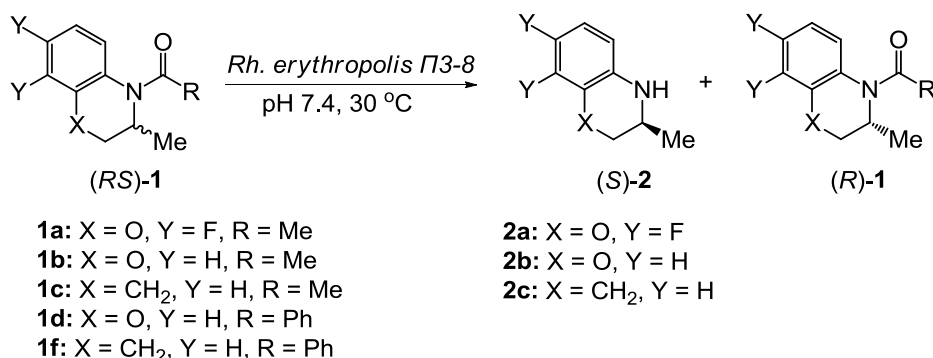


Схема 1. Энантиоселективный микробиологический гидролиз *N*-ацил производных 3,4-дигидро-3-метил-2H-[1,4]бензоксазина и 2-метил-1,2,3,4-тетрагидрохинолина

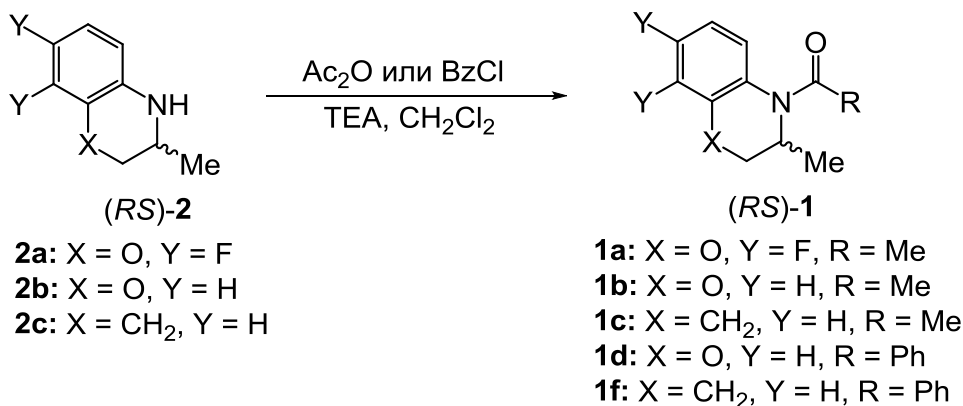


Схема 2. Синтез исходных амидов (*RS*)-**1a-f**

Состав подвижной фазы и времена удерживания амидов 1a-f и аминов 2a-c

Амид	Амин	Подвижная фаза	(R)-амин τ, мин	(S)-амин τ, мин	(R)-амид τ, мин	(S)-амид τ, мин
(RS)-1a	(RS)-2a	гексан-iPrOH 40:1	12,3	16,0	22,6	49,9
(RS)-1b	(RS)-2b	гексан-iPrOH 100:1	18,1	19,9	25,7	39,9
(RS)-1c	(RS)-2c	гексан-iPrOH-MeOH 100:1:1	6,6	7,4	9,5	10,7
(RS)-1d	(RS)-2b	гексан-iPrOH-MeOH 100:1:1	12,1	13,4	20,7	23,2
(RS)-1f	(RS)-2c	гексан-iPrOH-MeOH 100:0.8:0.2	10,0	11,2	26,4	30,25

Изменение концентрации и энантиомерный состав образующихся продуктов гидролиза определяли на хроматографе Knauer Smartline-1000 (Германия) на колонке Chiralcel OD-H (250×4,6 мм, 5 мкм), скорость элюирования 1 мл/мин; детектирование при 230 нм. Состав подвижной фазы и времена удерживания продуктов в смеси представлены в таблице. В качестве примера на рис. 1 приведена типичная хроматограмма смеси амина (RS)-2a и амида (RS)-1a.

Для отнесения времени удерживания (R)- и (S)-энантиомеров амидов 1a-f и аминов 2a-c были синтезированы индивидуальные (S)-энантиомеры аминов 2a-c методом кинетического разделения при ацилировании хлорангидридом (S)-напроксена или N-фталоил-(S)-фенилаланина, как описано ранее [7, 15]. Из (S)-энантиомеров аминов 2a-c были получены (S)-энантиомеры амидов 1a-f.

#### Результаты исследования и их обсуждение

В течение всего процесса биотрансформации N-ацетил производных 3,4-дигидро-3-метил-2H-[1,4]бензоксазинов (RS)-1a,b не было зафиксировано образование соответствующих аминов (R)-2a,b. Следовательно, (R)-энантиомеры амидов 1a,b не подвергаются биохимической трансформации, и их количество может служить внутренним стандартом для определения концентраций (S)-энантиомеров амидов 1a,b и аминов 2a,b. Кинетика стереоселективного гидролиза приведена на рис. 2.

В случае амида (RS)-1a биотрансформация начинается только на 6 сутки, на 7 сутки происходит резкое изменение концентрации исходного субстрата. В случае гидролиза амида (RS)-1b наблюдается 2 резких изменения концентраций продукта и субстрата на 5 и 7 сутки биотрансформации, что может быть обусловлено активацией различных ферментов, входящих в состав микроорганизма.

Для биотрансформации N-ацетил-2-метил-1,2,3,4-тетрагидрохинолина (RS)-1c штамм *Rh. erythropolis* ПЗ-8 оказался непригоден, за 7 суток проведения реакции не наблюдалось появления продукта реакции и изменения концентрации энантиомеров субстрата.

Для гидролиза N-бензоил производных (RS)-1d,f штамм *Rh. erythropolis* ПЗ-8 оказался слишком активным. В случае амида (RS)-1d биотрансформации подвергались оба энантиомера субстрата, причем одновременно, с получением в результате рацемического амина 2b, что свидетельствует о неселективности штамма в отношении данного амида.

В случае амида (RS)-1f наблюдали не только полную трансформацию субстрата в продукт, но и дальнейшую трансформацию продукта, а также появление большого количества примесей неустановленного строения.

#### Заключение

Таким образом, нами найден новый штамм микроорганизмов рода *Rhodococcus erythropolis* для эффективной биотрансформации N-ацил производных аминов. Показано, что результат микробиологической трансформации существенным образом зависит как от строения гетероцикла, так и природы ацильной группы субстрата. Установлено, что в результате микробиологического гидролиза N-ацетил производных фторированного и нефторированного 3,4-дигидро-3-метил-2H-[1,4]бензоксазина биотрансформации подвергаются только (S)-амиды с образованием соответствующих (S)-аминов (*ee* > 99%). N-Ацетил-2-метил-1,2,3,4-тетрагидрохинолин не подвергался биотрансформации.

Микробиологический гидролиз N-бензоил производных 3,4-дигидро-3-метил-2H-[1,4]бензоксазина и 2-метил-1,2,3,4-тетрагидрохинолина штаммом *Rhodococcus erythropolis* ПЗ-8 проходил нестереоизбирательно, биотрансформации подвергались оба энантиомера субстрата.

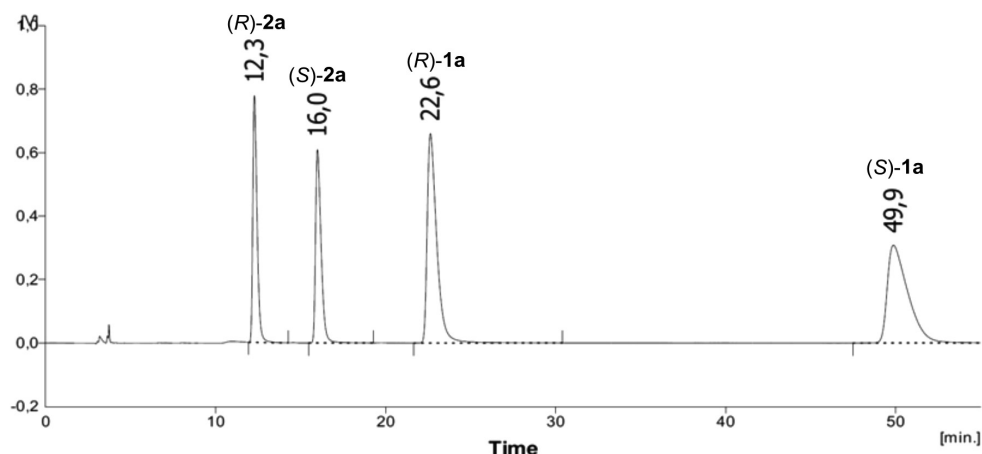


Рис. 1. Типичная хроматограмма смеси амина (S)-2a и амида (R)-1a (Chiralcel OD-H, гексан-iPrOH 40:1, скорость потока 1,0 мл/мин, детектирование при 230 нм)

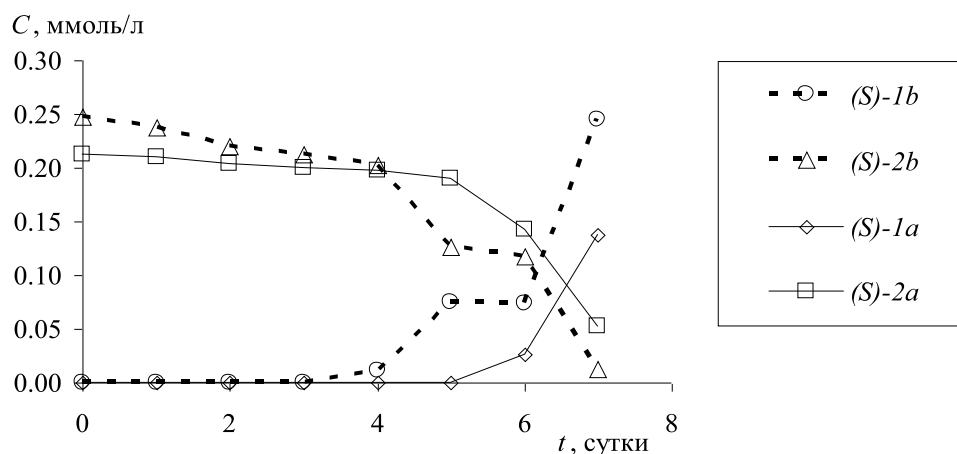


Рис. 2. Зависимость концентрации (C, ммоль/л) амидов (S)-1a,b и аминов (S)-2a,b от времени биотрансформации (начальная концентрация амидов (RS)-1a,b 100 мкг/мл)

Результаты данного исследования могут быть полезными для промышленного производства (S)-3,4-дигидро-3-метил-7,8-дифтор-2H-[1,4]бензоксазина – ключевого полупродукта в синтезе высокоактивного противобактериального препарата левофлоксацин.

Работа выполнена в рамках темы (проекта) государственного задания на 2018 г. № государственной регистрации АААА-А18-118020290144-8.

#### Список литературы / References

1. Луговская Н.П. Характеристика почвенных микроорганизмов, трансформирующих ароматические амиды и нитрилы: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Пермь, 2015. 26 с.  
Lugovskaya N.P. The characteristic of the soil microorganisms transforming aromatic amides and nitriles: avtoref. dis. ... kand. biol. nauk. Perm', 2015. 26 p. (in Russian).
2. Pellissier H. Catalytic Non-Enzymatic Kinetic Resolution. *Advanced Synthesis and Catalysis*. 2011. vol. 353. P. 1613–1666.

3. Müller C.E., Schreiner P.E. Organocatalytic Enantioselective Acyl Transfer onto Racemic as well as meso Alcohols, Amines, and Thiols. *Angewandte Chemie International Edition*. 2011. vol. 50. P. 6012–6042.

4. Krasnov V.P., Gruzdev D.A., Levit G.L. Nonenzymatic acylative kinetic resolution of racemic amines and related compounds. *European Journal of Organic Chemistry*. 2012. P. 1471–1493.

5. Siedlecka R. Recent developments in optical resolution. *Tetrahedron*. 2013. vol. 69. pp. 6331–6363.

6. Kagan H.B., Fiaud J.C. Kinetic resolution. *Topics in stereochemistry*. 1988. vol. 18. P. 249–330.

7. Краснов В.П., Левит Г.Л., Груздев Д.А., Матвеева Т.В., Чулаков Е.Н., Чарушин В.Н. Способ получения (S)-7,8-дифтор-2,3-дигидро-3-метил-4H-[1,4] бензоксазина. Патент РФ 2434004, МПК С 07 D 265/33. Заявитель и патентообладатель Учреждение Российской академии наук Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения РАН. № 2010141933/04; заявл. 14.10.10; опубл. 20.11.11, Бюл. № 32.

8. Schmid A., Dordick J., Kiener A., Wubbolts M., Witholt B. Industrial Biocatalysis today and tomorrow. *Nature*. 2001. vol. 409. P. 258–268.

9. Schmid A., Hollmann F., Park J.B., Bühler B. The use of enzymes in the chemical industry in Europe. *Current Opinion in Biotechnology*. 2002. vol. 13. P. 359–366.
10. Breuer M., Ditrich K., Habicher T., Hauer B., Keßler M., Stürmer R., Zelinski T. Industrial Methods for the Production of Optically Active Intermediates. *Angewandte Chemie International Edition*. 2004. vol. 43. P. 788–824.
11. Patel R.N. Biocatalysis: Synthesis of Key Intermediates for Development of Pharmaceuticals. *ACS Catalysis*. 2011. vol. 1. P. 1056–1074.
12. Solano D.M., Hoyos P., Hernáiz M.J., Alcántara A.R., Sánchez-Montero J.M. Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs. *Bioresource Technology*. 2012. vol. 115. P. 196–207.
13. Miyadera A., Imura A. Enantioselective synthesis of a key intermediate of Levofloxacin using microbial resolution. *Tetrahedron: Asymmetry*. 1999. vol. 10. P. 119–123.
14. Чулаков Е.Н., Левит Г.Л., Тумашов А.А., Луговская Н.П., Ремезовская Н.Б., Максимов А.Ю., Демаков В.А., Краснов В.П. Энантиоселективный микробиологический синтез (S)-3,4-дигидро-3-метил-7,8-дифтор-2H-[1,4]бензоксазина // *Известия Академии наук. Серия химическая*. 2015. № 5. С. 1097–1099.
- Chulakov E.N., Levit G.L., Tumashov A.A., Krasnov V.P., Lugovskaya N.P., Remezovskaya N.B., Maksimov A.Y., Demakov V.A. Enantioselective microbial synthesis of (S)-7,8-difluoro-3,4-dihydro-3-methyl-2H-[1,4]benzoxazine // *Russian Chemical Bulletin*. 2015. T. 64. № 5. P. 1097–1099 (in Russian).
15. Gruzdev D.A., Levit G.L., Krasnov V.P., Chulakov E.N., Sadretdinova L.Sh., Grishakov A.N., Ezhikova M.A., Kodess M.I., Charushin V.N. Acylative kinetic resolution of racemic amines using N-phthaloyl-(S)-aminoacyl chlorides. *Tetrahedron: Asymmetry*. 2010. vol. 21. P. 936–942.