

УДК 577.175.539

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ 1,2-ДЕГИДРИРОВАНИЕ 11-ТРИФТОРАЦЕТАТА 6 α -МЕТИЛГИДРОКОРТИЗОНА

© 2023 г. Т. С. Савинова¹, *, А. Ю. Аринбасарова², А. В. Казанцев³,
О. С. Савинова⁴, Н. В. Лукашёв³

¹ Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана Федеральной службы по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Московская область,
городской округ Мытищи, 141014 Россия

² Федеральный исследовательский центр «Пушинский научный центр биологических исследований
Российской Академии наук», Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина
(ИБФМ РАН), Пушкино, Московская область, 142290 Россия

³ Химический факультет, Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

⁴ Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: tatiana_savinova@rambler.ru

Поступила в редакцию 17.06.2023 г.

После доработки 29.06.2023 г.

Принята к публикации 03.07.2023 г.

Проведена трансформация 11-трифторацетата 6 α -метилгидрокортизона (**11-ТФА МГК**) клетками актинобактерий рода *Arthrobacter* (*Nocardioide*s) в присутствии α -циклодекстрина (α -ЦД). Изучен состав и динамика накопления в культуральной среде продуктов трансформации при различных значениях pH и соотношении α -ЦД/субстрат. Показано, что добавление α -ЦД в среду для трансформации при pH < 7 способствует увеличению скорости 1,2-дегидрирования с образованием 11-трифторацетата 6 α -метилпреднизолон (**11-ТФА МПЛ**). При pH > 7 первичным процессом является гидролиз 11 β -трифторацетил-оксигруппы. При этом можно предположить, что α -ЦД участвует в этих процессах как акцептор трифторацетил-иона.

Ключевые слова: 6 α -метилгидрокортизона 11-трифторацетат, 6 α -метилпреднизолон 11-трифтор-ацетат, 6 α -метилпреднизолон, 1,2-дегидрирование, *Arthrobacter*, *Nocardioide*s, α -циклодекстрин

DOI: 10.31857/S0555109923060132, **EDN:** CXLIBX

Известно, что 1,2-дегидропроизводные Δ^4 -3-кетостероидов, применяемые в качестве активных фармацевтических ингредиентов (**АФИ**) лекарственных препаратов, например, кортикостероидов, проявляют больший терапевтический эффект с меньшим побочным действием по сравнению с 1,2-насыщенным предшественником. Так, 6 α -метилпреднизолон (11 β ,17 α ,21-тригидрокси-6 α -метилпрегна-1,4-диен-3,20-дион, **МПЛ**) фармакологически более эффективен по сравнению с 6 α -метилгидрокортизоном (11 β ,17 α ,21-тригидрокси-6 α -метилпрегна-4-ен-3,20-дион, **МГК**) [1], который в качестве АФИ не применяется. МПЛ – 1,2-дегидропроизводное МГК – является АФИ лекарственных средств для лечения воспалительных, аллергических, онкологических и других заболеваний. В медицинской практике широкое применение получили эфиры МПЛ, такие как 21-ацетат, 21-сукцинат натрия, а также аце-

понат – 17-пропионилокси-производное 21-ацетата МПЛ [<https://www.rlsnet.ru>].

МПЛ получают преимущественно реакцией микробиологического 1,2-дегидрирования МГК, используя в качестве биокатализатора различные бактерии, способные продуцировать 3-кетостероид- Δ^1 -дегидрогеназу (**3-КСД**) (К.Ф. 1.3.99.4). Трансформацию проводят, как правило, покоящимися клетками, используя в качестве среды буферные растворы со значением pH в диапазоне 6.8–7.5 [2–4].

В последние годы большое значение приобрело изучение микробиологического 1,2-дегидрирования 21-ацетокси-производных Δ^4 -3-кетостероидов с диоксиацетоновой боковой цепью [5–8]. Известно, что в процессе микробиологической трансформации возможно элиминирование сложноэфирной защиты гидроксила при C²¹, которое может происходить в результате действия эстераз в широком диапазоне значений pH [7, 9]. Однако также из-

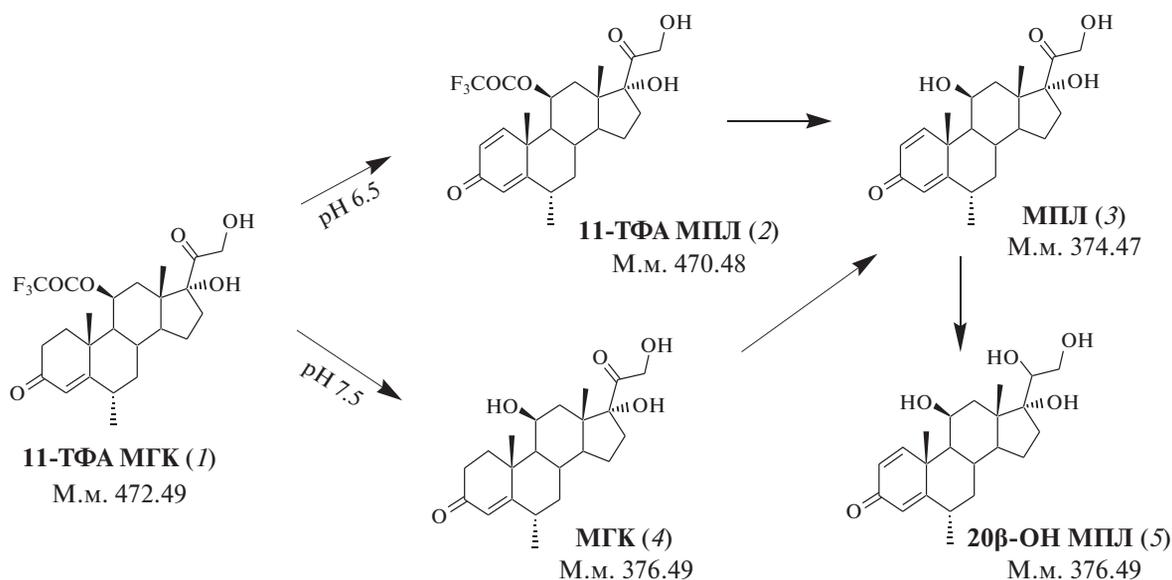


Рис. 1. Схема трансформации 11-ТФА МГК (1) клетками *A. globiformis* ВКПМ Ас-1528.

вестно, что в зависимости от условий проведения процесса биотрансформации может протекать с сохранением сложноэфирной группировки. В связи с этим большое значение приобретает изучение микробиологического 1,2-дегидрирования этерифицированных субстратов с целью сохранения не только 21-ацетокси-группы [7, 8, 10, 11], но и других сложноэфирных защитных групп. Поскольку МПЛ применяется в медицинской практике в виде C^{21} -эфиров, большой интерес уделяется изучению 1,2-дегидрирования C^{21} -эфиров МГК. Известны, в частности, работы по синтезу 21-ацетата МПЛ из 21-ацетата МГК [3, 5, 6].

В химическом синтезе ацепоната МПЛ из МПЛ или 21-ацетата МПЛ важным условием этерификации третичной гидроксильной группы при C^{17} является защита вторичного гидроксила при C^{11} [12]. Наиболее предпочтительным для этой цели служит образование 11-трифторацетил-окси-защитной группы, которая легко удаляется основным сольволизом в мягких условиях [12–14]. 11-Трифторацетил-оксигруппа, как было показано ранее [14], является наиболее приемлемой и в химическом синтезе 6α -метил-производных, в частности МГК из гидрокортизона (ГК) [15, 16]. Причем удаление защитных группировок, включая 11-трифторацетильную, происходит на последней стадии его синтеза. Становится очевидным, что 11-трифторацетат МГК (11-ТФА МГК, рис. 1, 1) можно рассматривать как потенциальный субстрат для дальнейшего 1,2-дегидрирования как с образованием 11-трифторацетата МПЛ (11-ТФА МПЛ, 2), так и его гидролизованного аналога МПЛ (3).

Ранее [16] была показана возможность микробиологического 1,2-дегидрирования производных МГК со сложноэфирной группой при атоме C^{11} в присутствии β -циклодекстрина (β -ЦД). Применение β -ЦД или его производных для увеличения растворимости стероидных субстратов в водной среде детально изучено и применяется в биотехнологических производствах [17, 18]. Известно, что растворимость стероидов в водных растворах в присутствии циклодекстринов (ЦД) может быть увеличена в 2–1200 раз [9]. Следует отметить, что растворимость α -ЦД в воде составляет 14.5% (вес/об.), что значительно превышает таковую β -ЦД (1.85%, вес/об.) [19]. Однако в отличие от β -ЦД в качестве солюбилизующего агента в процессах микробиологического 1,2-дегидрирования стероидов рядов андростана и прегнана α -ЦД применяется намного реже. Описано применение α -ЦД в микробиологическом синтезе преднизолона (ПЛ) из ГК (содержание 2 г/л) культурой *Arthrobacter simplex* [20].

Цель настоящей работы – изучение 1,2-дегидрирования 11 β -трифторацетил-окси-17 α ,21-дигидрокси-6 α -метилпрегн-4-ен-3,20-диона (11-ТФА МГК, 1) бактериями *Arthrobacter globiformis* ВКПМ Ас-1528 (193) (син. *Nocardioideis simplex* ВКМ Ас-2033Д) [21, 22] при различных значениях pH, а также в присутствии в среде α -ЦД.

МЕТОДИКА

Реактивы. В работе были использованы следующие реактивы: α -ЦД ($\geq 98.0\%$ (HPLC), CAS № 10016-20-3, “Sigma-Aldrich”, США), 21-ацетат

кортизона ($\geq 99.0\%$, CAS № 50-04-4, “Sigma-Aldrich”, США), 6α -метилпреднизолон ($\geq 98\%$, CAS № 83-43-2, “Sigma-Aldrich”, США); 6α -метилгидрокортизон (98.92% , CAS № 1625-39-4, “Syn-Zeal Research Pvt”, Индия).

11-ТФА МГК (1) был получен из 21-ацетата ГК, как описано в патенте [23]. 11-ТФА МПЛ (2) был получен 1,2-дегидрированием 11-ТФА МГК (1) клетками *Nocardioides simplex* VKM Ac-1118 в присутствии β -ЦД, как описано в патенте [16]. $11\beta,17\alpha,20\beta,21$ -Тетрагидрокси- 6α -метилпрегна-1,4-диен-3-он (20 β -ОН-МПЛ, 5) был получен известным методом стереоспецифического восстановления 20-кетогруппы МПЛ до гидроксильной группы действием NaBH_4 [24].

Другие материалы и растворители квалификации “х. ч.” и “ч. д. а.” были приобретены у российских поставщиков ООО “АО Реахим” и ООО “Компонент-Реактив”.

Микроорганизм и условия культивирования. В работе использовали актинобактерии *A. globiformis* ВКПМ Ac-1528 из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НИЦ “Курчатовский институт” Национального Биоресурсного Центра (Россия). Штамм поддерживали на скошенной агаризованной кукурузно-глюкозной среде следующего состава (г/л): глюкоза – 10, кукурузный экстракт – 10, вода водопроводная, pH 7.0–7.2. Выращивание проводили в течение 5 сут при температуре 30°C.

Выращивание инокулята. Клетки, выросшие на агаризованной среде, смывали стерильной дистиллированной водой, суспензию клеток вносили по 1–2 мл в колбы Эрленмейера (750 мл) со 100 мл кукурузно-глюкозной среды того же состава (pH 7.0–7.2) и инкубировали на качалке (200–220 об./мин) при температуре 29°C в течение 16–20 ч.

Выращивание трансформирующей культуры. Полученный инокулят использовали для выращивания трансформирующей культуры. В колбы Эрленмейера (750 мл), содержащие по 100 мл кукурузно-глюкозной среды того же состава (pH 7.0–7.2), стерильно вносили по 1–2 мл полученной суспензии клеток и инкубировали на качалке (220 об./мин) при температуре 29°C в течение 16 ч. В качестве индуктора 3-КСД использовали 21-ацетат кортизона, который добавляли в виде раствора в этаноле (150 мг/л) за 5 ч до окончания процесса роста клеток.

Клетки отделяли от среды центрифугированием при 5000 g в течение 15 мин, дважды промывали 0.01 M Na-фосфатным буфером (pH 7.2) и затем ресуспендировали в том же буфере. При этом концентрация клеток составляла 50 мг/мл (сухой вес). Суспензию использовали в дальнейшей работе для проведения процесса 1,2-дегидрирования.

Трансформация 11-ТФА МГК (1). Трансформацию 11-ТФА МГК (1) проводили отмытыми клетками в колбах Эрленмейера (250 мл), содержащих по 25 мл 0.01 M Na-фосфатного буфера (pH 6.5 или 7.5) в качестве реакционной среды на качалке (200–220 об./мин) при температуре 29°C. Концентрация клеток составляла 1 г/л (по сухой биомассе). α -ЦД вносили в виде порошка в концентрации 1.0 или 3.0 г/л до внесения субстрата.

Субстрат (1) вносили в виде раствора в метаноле (MeOH) в концентрации 80 мг/мл. Конечная концентрация субстрата в среде составляла 0.5 г/л, а концентрация MeOH не превышала 5%.

Мониторинг процесса трансформации проводили, отбирая пробы из реакционной среды. Пробы экстрагировали этилацетатом (ЭА) в соотношении ЭА : проба – 4 : 1, об./об. Экстракт обрабатывали активированным углем и упаривали досуха. В сухом остатке определяли состав и содержание продуктов трансформации, используя методы ТСХ и ВЭЖХ. Хроматографический анализ соединений 1–5 (рис. 1) проводили на пластинках ПТСХ-АФ-В-УФ “Sorbfil UV-254” (Россия) в системе бензол : ацетон (3 : 1, об./об.). После просмотра в УФ-свете хроматограммы опрыскивали 1%-ным раствором ванилина в 10%-ном растворе хлорной кислоты, проявляли при температуре 100–110°C. В качестве контрольных образцов использовали соединения известной структуры, а именно, 11-ТФА МГК (1), 11-ТФА МПЛ (2), МПЛ (3), МГК (4) и 20 β -ОН-МПЛ (5).

Для разделения смесей стероидов использовали хроматографическую колонку с 50-кратным количеством силикагеля “Merck” (0.040–0.063 мм, Германия) по отношению к массе сухого остатка. Продукты трансформации элюировали смесью дихлорметана (ДХМ) и метилэтилкетона (МЭК) с содержанием МЭК от 0 до 20%, растворитель упаривали.

Спектры ^1H -ЯМР соединений снимали на спектрометре “Bruker Avance 400” (США) с рабочей частотой 400 МГц в растворе дейтерохлороформа (CDCl_3). В качестве внутреннего стандарта использовали гексаметилдисилоксан.

11-ТФА МГК (1):

^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ : 5.75 (д, $J = 1.5$ Гц, 1H, 4-H), 5.67 (м, 1H, 11 α -H), 4.63 (дд, $J = 20.0$, 4.7 Гц, 1H, 21- CH_2), 4.25 (дд, $J = 20.0$, 4.3 Гц, 1H, 21- CH_2), 1.24 (с, 3H, 19- CH_3), 1.08 (д, $J = 6.4$ Гц, 3H, 6 α - CH_3), 0.81 (с, 3H, 18- CH_3).

11-ТФА МПЛ (2):

^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ : 6.85 (д, $J = 10.1$ Гц, 1H, 1-H), 6.29 (дд, $J = 10.1$, 1.5 Гц, 1H, 2-H), 6.03 (уш.с, 1H, 4-H), 5.70 (м, 1H, 11 α -H), 4.63 (дд, $J = 20.1$, 3.9 Гц, 1H, 21- CH_2), 4.24 (дд, $J = 20.0$, 3.8 Гц,

1H, 21-CH₂), 1.25 (с, 3H, 19-CH₃), 1.13 (д, $J = 6.3$ Гц, 3H, 6 α -CH₃), 0.81 (с, 3H, 18-CH₃).

МПЛ (3):

¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ : 7.24 (д, $J = 10.1$ Гц, 1H, 1-Н), 6.28 (дд, $J = 10.1, 1.5$ Гц, 1H, 2-Н), 6.02 (уш.с., 1H, 4-Н), 4.63 (дд, $J = 19.1, 5.9$ Гц, 1H, 21-CH₂), 4.49 (м, 1H, 11 α -Н), 4.28 (дд, $J = 19.1, 5.8$ Гц, 1H, 21-CH₂), 1.44 (с, 3H, 19-CH₃), 1.12 (д, $J = 6.3$ Гц, 3H, 6 α -CH₃), 0.96 (с, 3H, 18-CH₃).

МГК (4):

¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ : 5.71 (уш.с, 1H, 4-Н), 4.64 (д, $J = 19.8$, Гц, 1H, 21-CH₂), 4.47 (м, 1H, 11 α -Н), 4.29 (д, $J = 19.8$, 1H, 21-CH₂), 1.41 (с, 3H, 19-CH₃), 1.05 (д, $J = 6.3$ Гц, 3H, 6 α -CH₃), 0.94 (с, 3H, 18-CH₃).

20 β -ОН-МПЛ (5):

¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ : 7.27 (д, $J = 10.1$ Гц, 1H, 1-Н), 6.26 (дд, $J = 10.1, 1.5$ Гц, 1H, 2-Н), 6.02 (уш.с., 1H, 4-Н), 4.43 (м, 1H, 11 α -Н), 3.84–3.75 (м, 3H, 20 α -H, 21-CH₂), 1.45 (с, 3H, 19-CH₃), 1.11 (д, $J = 6.3$ Гц, 3H, 6 α -CH₃), 1.09 (с, 3H, 18-CH₃).

Использовали систему ВЭЖХ “Knauer Smartline” (Германия), снабженную инжектором, УФ-детектором с переменной длиной волны, блоком термостатирования колонки, компьютером, и колонку “Kromasil® 100-5C18” 4.6 × 250 мм, размер частиц 5 мкм (“Eka Chemicals AB”, Швеция). Подвижная фаза: ацетонитрил–H₂O в соотношении 40 : 60 об./об. Скорость потока: 1 мл/мин. Детектирование: УФ, длина волны 254 нм.

Времена удерживания: 11-ТФА МГК (1) – 18.3 мин, 11-ТФА МПЛ (2) – 17.2 мин, МПЛ (3) – 6.1 мин, МГК (4) – 6.7 мин, 20 β -ОН-МПЛ (5) – 2.8 мин.

Изучение влияния pH трансформационной среды без трансформирующей культуры как в присутствии в среде α -ЦД, так и без α -ЦД (контроль) проводили в колбах Эрленмейера (250 мл), содержащих по 25 мл 0.01 М Na-фосфатного буфера (pH 6.5 или 7.5). α -ЦД вносили в виде порошка в концентрации 3.0 г/л. Субстрат (1) вносили в виде метанольного раствора в конечной концентрации 0.5 г/л. Реакционные смеси инкубировали на качалке (220 об./мин) в течение 4 сут при температуре 29°C, после чего оценивали содержание стероидов. Для этого содержимое колб экстрагировали ЭА, используя соотношение ЭА : проба (4 : 1, об./об.). Растворитель упаривали до прекращения погона, остаток растворяли в 1 мл смеси ДХМ : MeOH (3 : 1, об./об.). Содержание стероидных соединений оценивали методом количественной ТСХ с применением денситометрического анализа в программе Sorbfil TLC View.

Все эксперименты проводили в 3 биологических повторностях. Статистическая обработка данных проводилась с использованием метода дисперсионного анализа. При обнаружении до-

стоверного значения ($p < 0.05$) F-статистики, различия между индивидуальными средними были оценены с использованием теста множественного сравнения Тьюки ($p \leq 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что молекулярное инкапсулирование субстрата в полости ЦД существенно зависит не только от структуры гостевой молекулы, но и размера полости циклического олигомера глюкозы. Стероидные соединения могут образовывать комплексы (1 : 1) с β -ЦД и γ -ЦД [25]. Описано образование комплексов включения терпеноидов с β -ЦД в эквимолярном соотношении гость-хозяин (1 : 1) [26]. Однако было обнаружено, что в отличие, например, от прогестерона (ПГ) полному погружению молекулы ГК, отличающейся от ПГ наличием гидроксильных групп при атомах C¹¹ и C²¹, в полость β -ЦД, содержащего 7 глюкопиранозных звеньев, препятствовали полярные гидроксильные группы на его поверхности [25]. Тхи и соавт. [27] показали, что возможно образование комплекса включения МПЛ с γ -ЦД (8 звеньев глюкопиранозы) и гидроксипропил γ -ЦД за счет включения колец А и В в полость этих ЦД, так как они обладают полостями большего размера. В литературных источниках имеется скудная информация по применению α -ЦД, содержащего 6 глюкопиранозных звеньев, для интенсификации процессов биотрансформации стероидных соединений, в частности 1,2-дегидрирования кортикостероидов. Описано образование комплекса включения α -ЦД с β -ситостерином, при этом максимальная эффективность инкапсулирования достигала 87% при использовании α -ЦД и β -ситостерина в мольном соотношении 2 : 1 [28]. В патенте [20] описано получение преднизолона из ГК с высоким выходом с использованием культуры *Arthrobacter simplex* (АТСС 6946) с концентрацией субстрата 2 г/л в присутствии α -ЦД при соотношении α -ЦД : ГК, равном 10 : 1 (вес/вес) или ~3.5 : 1 (моль/моль). При этом авторы отмечали, что в присутствии α -ЦД имело место ингибирование осаждения субстрата в водной среде, что приводило к увеличению скорости реакции.

В настоящей работе было проведено изучение микробиологического 1,2-дегидрирования 11-ТФА МГК культурой *A. globiformis* ВКПМ Ас-1528 при концентрации субстрата 0.5 г/л и значениях pH 6.5 и 7.5. Изучено влияние α -ЦД в мольном соотношении к исходному субстрату 1 : 1 и 3 : 1 при pH 6.5.

Схема микробиологического превращения 11-ТФА МГК (1) бактериями *A. globiformis* ВКПМ Ас-1528 представлена на рис. 1.

Динамика накопления продуктов микробиологического превращения 11-ТФА МГК (*I*) представлена на рис. 2 и 3.

Биотрансформация 11-ТФА МГК (*I*) при pH 7.5 и мольном соотношении α -ЦД : субстрат (*I*) – 3 : 1. При значении pH среды для трансформации 7.5 происходило накопление в среде МГК (*4*) – продукта деэтерификации гидроксильной группы при атоме C^{11} , МПЛ (*3*) и продукта его последующего 1,2-дегидрирования – МПЛ (*3*). Так, в указанных условиях (при pH 7.5 в присутствии α -ЦД) за 4 сут клетки бактерий превращали исходный субстрат (*I*) на ~74%, при этом накопление МПЛ (*3*) составляло ~47%, МГК (*4*) – 34%, а продукта восстановления 20-кетогруппы (*5*) – 11.5% (табл. 1, рис. 2). Биотрансформации 11-ТФА МГК (*I*) с меньшим количеством α -ЦД (1 : 1, моль/моль к субстрату) или без добавления α -ЦД в трансформационную среду также протекали через первичное образование МГК (*4*) с последующим его превращением в МПЛ (*3*) и далее в 20 β -ОН-МПЛ (*5*). Аналогичная последовательность превращений была отмечена ранее [31] при проведении микро-биологического 1,2-дегидрирования ГК клетками *A. globiformis* с образованием ПЛ и его 20 β -ОН- производного. Контрольный эксперимент (без применения клеток в качестве биокатализатора) показал, что при pH 7.5 происходил гидролиз трифторацетатной группы субстрата (*I*) с образованием соединения (*4*). В отсутствие α -ЦД в тех же условиях наблюдалось образование гораздо меньшего количества МГК (*4*), чем в присутствии α -ЦД (5 и 7.5% соответственно). То есть при pH > 7 первичным процессом является неэнзиматический гидролиз трифторацетилоксигруппы при C^{11} , который

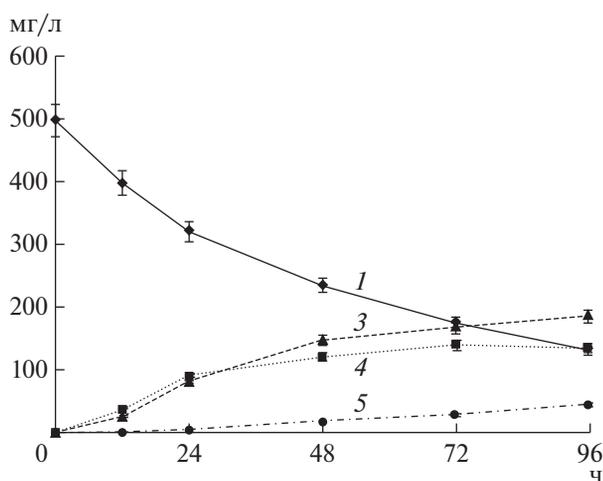


Рис. 2. Динамика накопления продуктов трансформации 11-ТФА МГК бактериями *A. globiformis* ВКПМ Ac-1528 при pH 7.5 в присутствии α -ЦД (11-ТФА МГК: α -ЦД = 1 : 3): *1* – 11-ТФА МГК; *3* – МПЛ; *4* – МГК; *5* – 20 β -ОН-МПЛ.

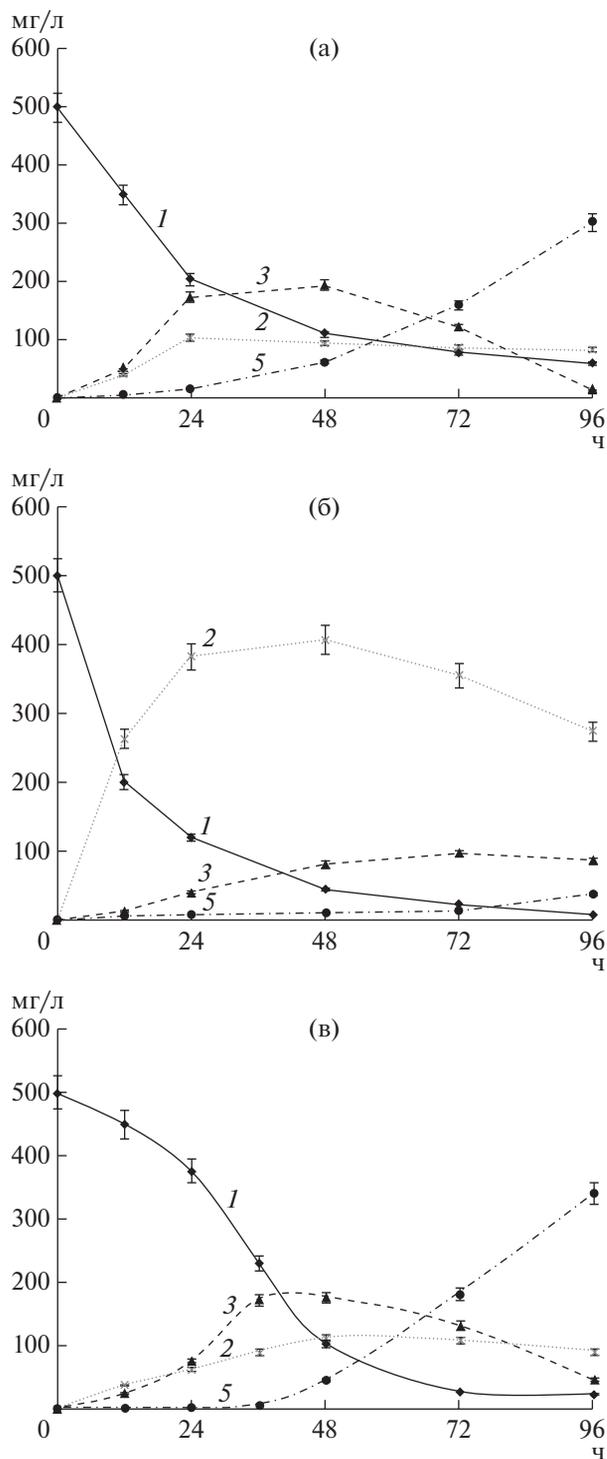


Рис. 3. Динамика накопления продуктов трансформации 11-ТФА МГК бактериями *A. globiformis* ВКПМ Ac-1528 при pH 6.5: *1* – 11-ТФА МГК; *2* – 11-ТФА МПЛ; *3* – МПЛ; *5* – 20 β -ОН-МПЛ. а – без α -ЦД; б – 11-ТФА МГК: α -ЦД = 1 : 3; в – 11-ТФА МГК: α -ЦД = 1 : 1.

Таблица 1. Степень превращения ТФА МГК (1) и выходы продуктов трансформации (2–5) в разных условиях, (% моль)

Соединение	рН 7.5		рН 6.5					
	α-ЦД : субстрат 3 : 1		без α-ЦД		α-ЦД : субстрат			
					1 : 1		3 : 1	
	48 ч	96 ч	48 ч	96 ч	48 ч	96 ч	48 ч	96 ч
1	52.94	73.64	77.78	87.88	79.44	95.75	91.2	98.69
2	*	*	22.32	18.26	19.07	16.74	81.77	55.03
3	37.12	47.04	44.31	11.47	49.08	3.82	20.44	21.95
4	29.62	34.23	*	*	*	*	*	*
5	4.92	11.41	11.16	85.58	15.34	76.08	2.65	9.29

* – не обнаружено.

ускоряется в присутствии α-ЦД. Эти данные согласуются с литературными данными, согласно которым циклодекстрины способны ускорять гидролиз сложных эфиров в щелочных средах [29].

Следует отметить, что в результате гидролиза, спровоцированного основным характером среды и ЦД, образуется МГК (4), который в нашем случае выступает в роли вторичного субстрата 1,2-дегидрирования. Кроме того, для этого соединения показано ингибирование активности 3-КСД [4, 30], что также является фактором, контролирующим процесс трансформации в целом.

Биотрансформация 11-ТФА МГК (1) при рН 6.5 в присутствии и отсутствии α-ЦД. При значении рН 6.5 1,2-дегидрирование субстрата (1) протекало без образования продукта гидролиза 11β-трифторацетатной группы – МГК (4) – как при использовании α-ЦД, так и без него. Контрольный эксперимент без применения биокатализатора при рН 6.5 в условиях биотрансформации показал, что трифторацетатная защита 11β-гидроксильной группы как у 11-ТФА МГК, так и у 11-ТФА МПЛ, стабильна и продуктов их деэтерификации обнаружено не было.

Максимальное накопление целевого 11-ТФА МПЛ (2) – 81.77% – при степени превращения исходного субстрата (1) 91.2% наблюдалось через 48 ч трансформации в присутствии α-ЦД (табл. 1, рис. 3б), взятого в мольном соотношении α-ЦД: субстрат 3 : 1, при этом содержание в среде побочного соединения (5) было незначительным – 2.65%.

В отсутствие α-ЦД максимальное накопление соединения (2) и его 11β-гидрокси-аналога МПЛ (3) также наблюдалось через 48 ч трансформации, однако их содержание составляло всего 22% и 44% соответственно. При этом степень превращения субстрата (1) через 48 ч была 77.8% (табл. 1, рис. 3а). В то же время после 24 ч трансформации

имело место существенное увеличение скорости образования нежелательного продукта восстановления 20-кетогруппы (5). Если на 24 ч его содержание составляло ~1%, то через 48 ч было более 11%, а к концу трансформации (96 ч) – более 85% при степени превращения субстрата ~88%. Таким образом, основным продуктом трансформации 11-ТФА МГК (1) в отсутствие α-ЦД был 20β-ОН-МПЛ (5). Следует отметить, что если процесс конверсии субстрата (1) в присутствии α-ЦД (3 : 1) завершался через 96 ч, то без α-ЦД биоконверсия субстрата (1) прекращалась к 72 ч и далее содержание исходного соединения (1) практически не изменялось, однако происходила интенсивная конверсия образованного МПЛ (3) в 20β-ОН-МПЛ (5).

Уменьшение соотношения α-ЦД: субстрат (1) до эквимолярного (весовое – 2 : 1) приводило к снижению скорости трансформации. Так, если конверсия исходного соединения (1) в присутствии α-ЦД (3 : 1) на 24 ч трансформации составляла 76%, то при использовании эквимолярного количества α-ЦД (1 : 1) – 59.1%, а без α-ЦД – 25% (рис. 3). Кроме того, было отмечено, что, как и в эксперименте без α-ЦД, по мере образования 11-ТФА МПЛ (2) происходил гидролиз сложноэфирной группы при C¹¹ и последующая конвертация МПЛ (3) в 20β-ОН-МПЛ (5). При этом через 96 ч трансформации накопление продукта (5) было значительным (более 76%) при степени превращения исходного субстрата (1) до 96%. На основании анализа и сопоставления полученных результатов стало очевидным, что в изученных условиях трансформации эквимолярное соотношение субстрат: α-ЦД недостаточное.

Следует отметить, что ни в одном из вариантов биотрансформации не было обнаружено образования 11-трифторацетилированного аналога 20β-ОН-МПЛ. Этот факт свидетельствует о том, что восстановлению 20-кетогруппы подвергался только гидролизованный МПЛ (3).

Известно, что комплексы циклодекстринов и стероидных субстратов диссоциируют в водной среде и в биоконверсионной среде находятся в состоянии динамического равновесия со свободным стероидом и молекулами ЦД [19]. Учитывая, что характер связывания субстрата (1), продукта (2) и неэтерифицированных продуктов с α -ЦД может быть различным, можно предположить, что при недостатке α -ЦД возможна конкуренция за образование комплекса между субстратом (1) и продуктами с изменением равновесного состояния в неблагоприятном для продукта (2) направлении. Кроме того, при недостаточном количестве α -ЦД предположительно меняется характер комплексобразования α -ЦД и стероида, что может стать причиной переноса 11-трифторацетильной группы из 11-ТФА МПЛ (2) на молекулу α -ЦД при участии ферментов. Следует отметить, что существенный гидролиз 11-трифторацетатной группы продукта (2) с образованием МПЛ (3), который наблюдался в среде с рН 6.5 в отсутствие α -ЦД, а также при использовании эквимольного соотношения α -ЦД к субстрату (1), прошел практически с момента образования (2) (рис. 3а, 3в). Учитывая, что 11-трифторацетатная группа обладает стабильностью в кислых средах и наличие гидролиза под действием среды исключено, что было подтверждено в контрольном эксперименте, а также исключено предполагаемое каталитическое влияние на процесс деэтерификации α -ЦД, который в среде с рН 6.5 отсутствует, то можно сделать вывод о том, что имел место ферментативный гидролиз трифторацетатной группы.

Известно, что липазы бактерий обладают способностью катализировать реакции гидролиза и трансэтерификации [32]. Бактерии рода *Arthrobacter* (позднее название *Nocardioides*) являются природными продуцентами липолитических ферментов, способных также к гидролизу сложноэфирных связей субстратов и трансэтерификации [33]. Можно предположить, что в условиях биотрансформации субстрата (1) имела место трансэтерификация под действием фермента липазы, которая осуществлялась в 2 этапа: 1 – ацильный перенос трифторацетильной группы с молекулы донора – 11-ТФА МПЛ (2) или 11-ТФА МГК (1) – на липазу культуры *A. globiformis* ВКПМ Ас-1528, которая является акцептором трифторацетил-иона, с промежуточным образованием ацил-ферментного эфира; 2 – последующее расщепление трифторацетил-ферментного соединения в результате атаки второго нуклеофила. При этом вторым нуклеофилом могла быть молекула воды (гидролиз) или молекула гидроксилсодержащего соединения (переацилирование) [34], в качестве которого и может выступать α -ЦД. Способность циклодекстринов участвовать в процессе переноса ацильного радикала в качестве акцептора с образованием структуры с ацилированной вторичной гидроксильной

группой ЦД известна. Так, ацильная миграция была детектирована с помощью ЯМР в процессе изучения катализируемого циклодекстрином деацилирования спиронолактона и установлена зависимость ее скорости от структуры ЦД [35]. Было также найдено, что β -ЦД катализирует деградацию спиронолактона путем ковалентного катализа и скорость деацилирования уменьшается с уменьшением значения рН. Ранее также была показана возможность удаления 11-трифторацетатной группы соединения (2) с помощью клеток бактерий *Agromyces mediolanus* ВКМ Ас-1388 [16].

Образованный в результате переацилирования трифторацетил- α -ЦД имеет, скорее всего, более низкую способность к комплексобразованию с 11-ТФА МПЛ (2), тем самым не препятствуя процессу его деэтерификации с образованием МПЛ (3) и последующему превращению соединения (3) в соединение (5) при применении в процессе трансформации эквимольного количества α -ЦД.

Ингибирование активности 3-КСД трифторацетатным ионом в настоящей работе не было выявлено, возможно, из-за эффекта катализируемой ферментом трансэтерификации с участием α -ЦД в качестве акцептора трифторацетил-иона.

Значительное ускорение процесса 1,2-дегидрирования при рН 6.5 в присутствии α -ЦД (3 : 1) может быть объяснено, во-первых, устранением возможного ингибирования 3-КСД субстратом (1) и отсутствующим соединением (4), а также отсутствием эффекта ингибирования продуктами (2) и (3). Продукты 1,2-дегидрирования стероидных субстратов, как известно, способны ингибировать активность фермента [20]. Кроме того, можно предположить, что снятие эффекта ингибирования происходило за счет образования комплексов включения α -ЦД с субстратом (1) и продуктами (2) и (3) избыточным количеством α -ЦД.

Способность циклодекстринов стабилизировать структуры лабильных соединений, что предотвращает деградацию, гидролиз и другие модификации, была отмечена ранее [36]. Также известно [35, 37], что способность ЦД ускорять гидролитическую деструкцию соединения или, наоборот, защищать от этого процесса, зависит от того, локализована ли лабильная часть молекулы в непосредственной близости от каталитически активной гидроксильной группы ЦД, или имеет место проникновение лабильной части в глубь полости ЦД [35]. Учитывая тот факт, что α -ЦД имеет значительно меньший внутренний диаметр полости по сравнению с β -ЦД и тем более в сравнении с γ -ЦД, можно предположить, что исходный субстрат (1) и продукты его биотрансформации погружены не полностью в полость этого циклического олигомера глюкозы.

Отсутствие в обоих случаях, как с использованием α -ЦД, так и без него, в реакционной среде при pH 6.5 продукта гидролиза исходного субстрата (1) МГК (4) может свидетельствовать также о субстратной специфичности липолитического фермента культуры *A. globiformis* VKPM Ac-1528 в этих условиях. Известно, что липазы обладают чрезвычайно широкой субстратной специфичностью и показывают высокий уровень энантио- и регио-селективности при конверсии различных неприродных соединений [32].

На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что в процессе 1,2-дегидрирования 11-ТФА МГК (1) при pH 6.5 α -ЦД, присутствующий в мольном соотношении 3 : 1 к субстрату, защищает как структуру субстрата (1), так и структуру продукта (2), от ферментативного гидролиза 11-трифторацетатной группы.

Таким образом, впервые установлена возможность 1,2-дегидрирования 11-ТФА МГК бактериями *A. globiformis* ВКПМ Ac-1528 с сохранением сложноэфирной защиты при C¹¹. Обязательными условиями сохранения защиты является наличие в среде α -ЦД в мольном соотношении 3 : 1 к субстрату и проведение процесса при pH < 7. При этом оптимальная продолжительность процесса, при которой достигается максимальный выход 11-ТФА МПЛ (2) до 82% с минимальным образованием побочного продукта (5), составляет 48 ч. Кроме того, основным продуктом трансформации 11-ТФА МГК (1) в отсутствие α -ЦД является 20 β -ОН-МПЛ (5). Добавление α -ЦД приводит к изменению направленности трансформации.

Исследование проведено в рамках Госзадания кафедры органической химии химического факультета МГУ по теме: “Синтез и исследование физических, химических и биологических свойств органических и элементоорганических соединений” – Номер ЦИТИС – АААА-А21-121012290046-4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Annen K., Petzoldt K., Laurent H., Wiechert R., Hofmeister H.* // Патент США. 1990. № 4912098.
2. *Kominek L.A., Wolf H.J.* // Патент США. 1987. № 4704358.
3. *Аринбасарова А.Ю., Кощеченко К.А., Андриюшина В.А., Гриненко Г.С., Скрябин Г.К.* // Патент РФ. 1995. № 1830949.
4. *Arinbasarova A.Yu., Karpov A.V., Fokina V.V., Medentsev A.G., Koshcheyenko K.A.* // *Enzym. Microb. Tech.* 1996. V. 19. № 7. P. 501–506. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(96\)80001-C](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(96)80001-C)
5. *Pinheiro H.M., Cabral J.M.S.* // *Biotech. Bioeng.* 1991. V. 37. № 2. P. 97–102. <https://doi.org/10.1002/bit.260370202>
6. *Santos R.A., Caldeira J.C.G., Pinheiro H.M. and Cabral J.M.S.* // *Biotech. Lett.* 1991. V. 13. № 5. P. 349–354. <https://doi.org/10.1007/BF01027681>
7. *Fokina V.V., Sukhodolskaya G.V., Baskunov B.P., Turchin K.F., Grinenko G.S., Donova M.V.* // *Steroids.* 2003. V. 68. № 5. P. 415–421. [https://doi.org/10.1016/S0039-128X\(03\)00043-6](https://doi.org/10.1016/S0039-128X(03)00043-6)
8. *Фокина В.В., Суходольская Г.В., Шутов А.А., Николаева В.М., Донова М.В., Савинова Т.С., Лукашев Н.В., Суrowцев В.В.* // Патент РФ. 2013. № 2480475.
9. *Донова М.В.* // Биоконверсия стероидных соединений актинобактериями. Пушкино: ОНТИ ПНЦ РАН, 2010. 196 с. ISBN 978-5-904385-12-5.
10. *Kominek L.A., Wolf H.J.* // Патент США. 1985. № 4524134.
11. *Fokina V.V., Donova M.V.* // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2003. V. 87. № 4-5. P. 319–325. <https://doi.org/10.1016/j.jsmb.2003.10.002>
12. *Annen K., Petzoldt K., Laurent H., Wiechert R., Hofmeister H., Wendt H.* // Патент Чехословакии. 1986. № 244147.
13. *Annen K., Laurent H., Hofmeister H., Petzoldt K., Wiechert R.* // Патент США. 1982. № 4330541.
14. *Annen K., Laurent H., Hofmeister H., Topert M.* // Патент США. 1986. № 4619922.
15. *Андриюшина В.А., Стыщенко Т.С., Савинова Т.С., Скрябин К.Г., Гриненко Г.С.* // *Хим.-фарм. журн.* 2008. Т. 42. № 3. С. 32–39. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2008-42-3-32-39>
16. *Савинова Т.С., Казанцев А.В., Лукашев Н.В., Аринбасарова А.Ю., Степанов А.И., Скрябин Г.А.* // Патент РФ. 2008. № 2337918.
17. *Wang M., Zhang L., Shen Y., Ma Y., Zheng Y., Luo J.J.* // *Mol. Cat. B: Enzymatic.* 2009. V. 59. № 1–3. P. 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.12.017>
18. *Zhang L., Wang M., Shen Y., Ma Y., Luo J.* // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2009. V. 159. № 3. P. 642–654. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8499-2>
19. *Hesselink P.G.M., van Vliet S., de Vries H., Hesselink B.W.* // *Enz. Microb. Technol.* 1989. V. 11. № 7. P. 398–404. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(89\)90133-6](https://doi.org/10.1016/0141-0229(89)90133-6)
20. *Udvardy N.E., Bartho I., Hantos G., Trinn M., Vida Z., Szejtli J., Stadler A., Habon I., Balazs M.* // Патент США. 1985. № 4528271.
21. *Shtratnikova V.Yu., Schelkunov M.I., Fokina V.V., Bragin E.Y., Shutov A.A., Donova M.V.* // *BMC Biotechnology.* 2021. V. 21. № 7. <https://doi.org/10.1186/s12896-021-00668-9>
22. *Rohman A., Dijkstra B.W.* // *Biotechnol. Adv.* 2021. V. 49. 107751. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107751>
23. *Савинова Т.С., Казанцев А.В., Лукашев Н.В.* // Патент РФ. 2018. № 2663484.
24. *Buhler D.R., Thomas R.C. Jr., Schlagel C.A.* // *Endocrinology.* 1965. V. 76. № 5. P. 852–864. <https://doi.org/10.1210/endo-76-5-852>
25. *Fourmentin S., Crini G., Lichtfouse E.* // *Cyclodextrin-Steroid Interactions and Applications to Pharmaceuticals, Food, Biotechnology and Environment.* Springer, 2018. P. 19–57. https://doi.org/10.1007/978-3-319-76162-6_2

26. Donze C., Coleman A.W. // Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem. 1993. V. 16. № 1. P. 1–15. <https://doi.org/10.1007/bf00708758>
27. Thi T.D., Nauwelaerts K., Froeyen M., Baudemprez L., Van Speybroeck M., Augustijns P. et al. // J. Pharm. Sci. 2010. V. 99. P. 3863–3873. <https://doi.org/10.1002/jps.22227>
28. Rinaldi L., Binello A., Stolle A., Curini M., Cravotto G. // Steroids. 2015. V. 98. P. 58–62. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.02.016>
29. VanEiten R.L., Clowes G.A., Sebastian J.F., Bender M.L. // J. Am. Chem. Soc. 1967. P. 3253–3262.
30. Fokina V.V., Karpov A.V., Sidorov I.A., Andrijushina V.A., Arinbasarova A.Y. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1997. V. 47. № 6. P. 645–649. <https://doi.org/10.1007/s002530050989>
31. Arinbasarova A.Y., Medentsev A.G., Akimenko V.K., Koshcheenko K.A., Skryabin G.K. // J. Steroid Biochem. 1985. V. 23. № 3. P. 307–312. [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(85\)90409-1](https://doi.org/10.1016/0022-4731(85)90409-1)
32. Безбородов А.М., Загустина Н.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2014. Т. 50. № 4. С. 347–373. <https://doi.org/10.7868/S0555109914040187>
33. Самойлова Ю.В., Сорокина К.Н., Пилигаев А.В., Пармон В.Н. // Катализ в промышленности. 2018. Т. 18. № 6. С. 61–73. <https://doi.org/10.18412/1816-0387-2018-6-61-73>
34. Röttig A., Steinbüchel A. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2013. V. 77. № 2. P. 277. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00010-13>
35. Jarho P., Velde D.V., Stella V.J. // J. Pharm. Sci. 2000. V. 89. №2. P. 241–249. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6017\(200002\)89:2<241::AID-JPS11>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6017(200002)89:2<241::AID-JPS11>3.0.CO;2-0)
36. Arun R., Ashok K.C.K., Sravanthi V.V.N.S.S. // Sci Pharm. 2008. V. 76. P. 567–598. <https://doi.org/10.3797/scipharm.0808-05>
37. Das S.K., Rajabalaya R., David Sh., Gani N., Khanam J., Nanda A. // RJPBCS. 2013. V. 4. № 2. P. 1694–1720.

Microbial 1,2-dehydrogenation of 6 Alpha-Methylhydrocortisone 11-trifluoroacetate

T. S. Savinova^{a,*}, A. Yu. Arinbasarova^b, A. V. Kazantsev^c, O. S. Savinova^d, and N. V. Lukashev^c

^a *Erisman FSCH of Rospotrebnadzor, Mytishchi, 141014 Russia*

^b *Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Science”, Pushchino, 142290 Russia*

^c *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Moscow, 119991 Russia*

^d *Bach Institute of Biochemistry, Biotechnology Research Center of Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

*e-mail: tatiana_savinova@rambler.ru

Transformation of 11-trifluoroacetate 6 α -methylhydrocortisone (11-TFA MHC) by cells of actinobacteria *Arthrobacter (Nocardioides)* was carried out in the presence of α -cyclodextrin (α -CD). The composition and dynamics of the transformation products accumulation in the culture medium at various pH values and the ratio of α -CD/substrate were studied. It was shown that the addition of α -CD to the transformation medium at pH less than 7 promotes an increase in the rate of 1,2-dehydrogenation with the formation of 6 α -methylprednisolone 11-trifluoroacetate (11-TFA MPL). At pH over 7, the primary process is the hydrolysis of the 11 β -trifluoroacetyloxy group. In this case, the participation of α -CD in these processes as an acceptor of the trifluoroacetyl ion is not excluded.

Keywords: 6 α -methylhydrocortisone 11-trifluoroacetate, 6 α -methylprednisolone 11-trifluoroacetate, 6 α -methylprednisolone, 1,2-dehydrogenation, *Arthrobacter*, *Nocardioides*, α -cyclodextrin