

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ СТРУКТУРОЙ СЛОЖНЫХ ЭФИРОВ 3-ГИДРОКСИ-1,4-БЕНЗДИАЗЕПИН-2-ОНА И СТЕПЕНЬЮ ИХ ГИДРОЛИЗА КАРБОКСИЛЭСТЕРАЗОЙ

Е. А. Шестеренко
И. И. Романовская
О. В. Севастьянов
Е. А. Семенишина
В. И. Павловский
С. А. Андронати

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

E-mail: romairina@gmail.com

Получено 31.10.2012

Осуществлен синтез ряда новых производных 7-бром-5-арил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-она, содержащих в положении 3 фталимидацильный и гексилацильный фрагменты. Структура соединений установлена методами масс-спектрометрии и спектроскопии ПМР. Впервые исследован гидролиз ранее синтезированных сложных эфиров 3-гидрокси-1,4-бенздиазепин-2-она — потенциальных анксиолитических и снотворных средств, катализируемый карбоксилэстеразой микросомальной фракции печени свиньи. Показано количественное ингибирование эстеразной активности микросомальной фракции печени свиньи в присутствии селективного ингибитора карбоксилэстеразы-ди-(*n*-нитрофенил)-фосфата. Установлена нелинейность зависимости степени гидролиза от длины ацильного фрагмента 3-ацилокси-7-бром-5-фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-онов, а также снижение степени трансформации субстрата при введении заместителя в положение 1 молекулы. Для производных с фталимидацильным и гексилацильным фрагментами в положении 3 молекулы увеличение числа СН₂-групп в этих заместителях и введение атома хлора в *o*-положение фенильного кольца приводит к увеличению степени гидролиза.

Ключевые слова: эфиры 3-гидрокси-1,4-бенздиазепин-2-она, карбоксилэстераза, микросомальная фракция.

Карбоксилэстераза печени млекопитающих благодаря широкой субстратной специфичности и высокой стереоселективности [1] является перспективным биокатализатором энантиоселективного гидролиза и синтеза обширного ряда алициклических, карбоциклических и гетероциклических соединений [2, 3].

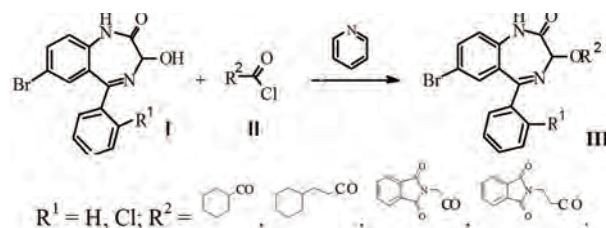
Карбоксилэстераза обладает такими положительными свойствами, как отсутствие коэнзима и суицидальной инактивации, однако из-за нестабильности и высокой стоимости коммерческих препаратов целесообразно использовать ее в составе микросомальной фракции (МФ) печени свиньи.

Ранее нами было показано, что при помощи карбоксилэстеразы МФ возможно получение оптически чистых энантиомеров 3-ацилокси-1,4-бенздиазепин-2-онов [4], потенциальных анксиолитических и снотворных средств [5, 6].

Известно, что структура субстрата влияет на степень его гидролиза, катализируемого карбоксилэстеразой [7, 8], поэтому цель данной работы — исследование влияния заместителей в молекуле производных 1,4-бенздиазепин-2-она на степень их энзиматической трансформации с помощью МФ печени свиньи.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования использовали соединения 1–6 (табл. 1), полученные согласно [8], а также соединения III (7–11, табл. 1), синтезированные по схеме:



Фталимидные производные глицина и β-аланина получены по известной методике [9] сплавлением фталевого ангидрида с соответствующими аминокислотами, хлорангидриды II — обработкой тионилхлоридом соответствующих карбоновых кислот.

Спектры ¹H-ЯМР записаны на приборе Bruker с рабочей частотой 300 МГц, в CDCl₃ и DMSO-d₆, внутренний стандарт TMS, при t 25 °С. Масс-спектры зарегистрированы методом электронного удара на масс-спектрометре MX-1321 (ионизирующее напряжение 70 эВ, t камеры ионизации 200 °С) и методом FАВ (fast atom bombardment) на масс-спектрометре 7070 EQ VG Analytical (энергия пучка ксенона 6 эВ). Тонкослойная хроматография выполнена на пластинках Silufol UV-254, в системах ацетонитрил–хлороформ–гексан (1:1:3) и бензол–ацетонитрил–гексан–метанол (25:15:5:1), проявление — УФ-светом при λ = 254 нм. Спектрофотометрические исследования проводили на приборе СФ-46.

В работе использовали МФ печени свиньи, выделенную методом низкоскоростной седиментации при 10 000 g в присутствии ионов Ca²⁺ [10, 11]. В выделенной МФ определяли содержание протеина по методу Лоури в модификации Хартри [12], а также эстеразную активность (по 1-нафтилацетату) [13].

Влияние бис-(*n*-нитрофенил)-фосфата на энзиматическую активность МФ изучали, применяя в качестве субстрата 1-нафтилацетат в условиях, аналогичных таковым при изучении эстеразной активности энзима [13] в диапазоне концентраций ингибитора 0,03–147,0 мкмоль/дм³.

7-Бром-5-фенил-3-фталимидоацетокси-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-он (10). В плоскодонную колбу, снабженную магнитной мешалкой, помещали 2 г (0,006 моль) 7-бром-3-гидрокси-5-фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-она, приливали 10 см³ безводного хлороформа и 0,4 см³ пиридина. Смесь перемешивали 10 мин при 0 °С, затем прибавляли суспензию 2-(1,3-диоксоизоиндолин-2-ил)этановой кислоты в 10 см³ безводного хлороформа. Реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч, оставляли на ночь, после чего промывали водой (20 см³ × 3), хлороформ упаривали, остаток перекристаллизовывали из этанола. Соединения 7–9, 11 получены аналогичным образом.

Степень гидролиза сложных эфиров 3-гидрокси-1,4-бенздиазепин-2-она 1–11 оценивали по их убыли спектрофотометрически гидроксаматным методом при λ 540 нм [14].

Энзиматический гидролиз проводили в течение 2,5 ч в среде диметилсульфоксид: К-фосфатный буферный раствор (0,0167 моль/дм³, рН 7,0) в объемном отношении 2:3, при температуре 37 °С, концентрации субстратов 0,5 ммоль/дм³ и эстеразной активности МФ 100 ед/см³. За единицу эстеразной активности принимали количество энзима, катализирующее гидролиз 1 мкмоль 1-нафтилацетата в 1 мин.

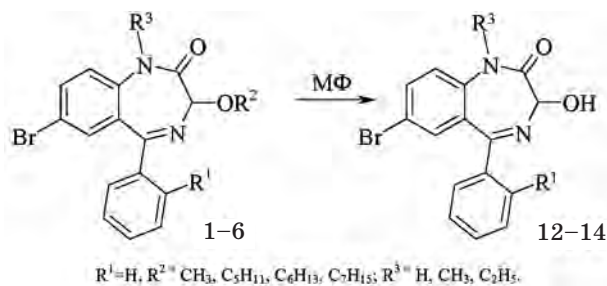
Результаты и обсуждение

Соединения 7–11 идентифицированы методами масс-спектрометрии и спектроскопии ПМР (табл. 1).

Из печени свиньи получена МФ с выходом протеина 38 мг/г ткани и эстеразной активностью 17,25 мкмоль/мг протеина·мин. С помощью выделенной МФ в разработанных условиях [8] осуществлен гидролиз ряда сложных эфиров 3-гидрокси-1,4-бенздиазепин-2-она 1–11.

Для доказательства того, что в гидролизе исследуемых объектов не принимают участия другие энзимы МФ, исследовано ингибирование эстеразной активности микросомальной фракции селективным ингибитором карбоксилэстеразы ди-(*n*-нитрофенил)-фосфатом. Показано количественное ингибирование энзиматической активности МФ печени свиньи в присутствии ингибитора в концентрации 147,06 мкмоль/дм³.

Ранее был проведен энзиматический гидролиз ряда 3-ацилокси-7-бром-5-фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-онов 1–4 с помощью карбоксилэстеразы в составе МФ:




Изучено влияние ацильного фрагмента в молекуле исследуемых субстратов на степень их гидролиза [8]. Показано, что степень гидролиза этих субстратов с помощью микросомальной фракции носит нелинейный характер (табл.1), что может объясняться одновременным влиянием двух факторов — липофильности веществ и стерическими ограничениями встраивания в активный центр энзима, вызываемыми

увеличением длины ацильного фрагмента молекулы. Установлено, что введение алкильных заместителей в положение 1 бензодиазепинового цикла приводит к снижению степени гидролиза в заданных условиях с 38,3% для соединения **1** до 29,3% — для **5** и 24,1% — для **6**, соответственно (табл. 1).

В разработанных условиях осуществлен гидролиз ряда сложных эфиров 7-бром-5-арил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бензодиазепин-2-она **7–11**, катализируемый карбоксилэстеразой МФ печени свиньи, с образованием в качестве конечных продуктов соответствующих 3-гидроксипроизводных (табл. 2).

Таблица 1. Сложные эфиры 3-гидрокси-7-бром-5-арил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бензодиазепин-2-она

| № | R ¹ | R ² | R ³ | T _{пл.} , °С | Выход, % | Масс-спектры, m\Z | ПМР, мд | | | | Степень энзиматического гидролиза, % |
|----|----------------|---|-------------------------------|-----------------------|----------|--|---|---------|-----------------|---------------|--------------------------------------|
| | | | | | | | СН алифатич. | NH | СН аром. | С(3)-Н | |
| 1 | H | CH ₃ | H | 265–273 | 74 | 373* | (DMSO-d6) 2,21 с 3Н (CH ₃)* | 9,37* | 7,10–7,63* | 6,03* | 38,3* |
| 2 | H | C ₅ H ₁₁ | H | 158–160 | 31 | 429* | 2,57–2,62 м 2Н (ОСОСН ₂ -(CH ₂) ₃ -CH ₃) 1,73–1,79 пентет 2Н (ОСОСН ₂ -CH ₂ -(CH ₂) ₂ -CH ₃) 1,35–1,36, м 4Н (ОСОСН ₂ -CH ₂ -(CH ₂) ₂ -CH ₃) 0,88–0,92 т 3Н (CH ₃) * | 9,53* | 7,10–7,64* | 5,95* | 53,2* |
| 3 | H | C ₆ H ₁₃ | H | 131–133 | 20 | 44*3 | 2,57–2,62 м 2Н (ОСОСН ₂ -(CH ₂) ₄ -CH ₃) 1,73–1,79 пентет 2Н (ОСОСН ₂ -CH ₂ -(CH ₂) ₂ -CH ₃) 1,30–1,42 м 6Н (ОСОСН ₂ -CH ₂ -(CH ₂) ₃ -CH ₃) 0,86–0,91 т 3Н (CH ₃) * | 9,55* | 7,10–7,64* | 5,95* | 48,1* |
| 4 | H | C ₇ H ₁₅ | H | 98–101 | 20 | 457* | 2,58–2,64 м 2Н (ОСОСН ₂ -(CH ₂) ₅ -CH ₃) 1,71–1,80 пентет 2Н (ОСОСН ₂ -CH ₂ -(CH ₂) ₄ -CH ₃) 1,30–1,41 м 8Н (ОСОСН ₂ -CH ₂ -(CH ₂) ₄ -CH ₃) 0,87–0,91 т 3Н (CH ₃) * | 9,26* | 7,08–7,63* | 6,02* | 46,1* |
| 5 | H | CH ₃ | CH ₃ | 173–176 | 42,5 | 387* | DMSO 3,36 с 3Н (ОСО-CH ₃), 2,20 с 3Н (CH ₃)* | — | 7,40–7,93 м 8Н* | 5,81 с * | 29,3 |
| 6 | H | CH ₃ | C ₂ H ₅ | 202–205 | 75 | 401* | CH ₃ Cl 4,24–4,31 м 1Н (CH ₂), 3,71–3,78 м 1Н (CH ₂), 2,31 с 3Н (ОСО-CH ₃), 1,11–1,13 т 3Н (CH ₂ -CH ₃)* | — | 7,33–7,70 м 8Н* | 5,89 с* | 24,1 |
| 7 | Cl |  | H | 143–150 | 24 | [M+H] ⁺ 477 | 2,60–2,67; м 1Н (CO-CH) 1,28–2,16; м 10Н | 9,36; с | 7,08–7,61; м | 6,01; с | 31,0 |
| 8 | Cl |  | H | 90–92 | 25 | [M+H] ⁺ = 519 [M+Na] ⁺ = 541 [M+K] ⁺ = 557 | 4,30–4,44, м 2Н, (CH ₂) ₂ 4,15–4,21 м 1Н, (CH ₂) ₂ 4,04–4,11 м 1Н, (CH ₂) ₂ 2,16–2,28; м 1Н (CO-CH) 1,10–1,83 м 10Н | 9,67; с | 7,13–7,60; м | 7Н 4,96; с | 38,3 |
| 9 | Cl |  | H | 258–260 | 76,8 | [M+H] ⁺ = 552 | 4,70–4,85; кв 2Н (CH ₂) | 9,59; с | 7,15–7,90; м | 6,06; с | 23,8 |
| 10 | H |  | H | 249–256 | 82,6 | [M+H] ⁺ = 518 | 4,71–4,87; кв 2Н (CH ₂) | 9,97; с | 7,19–7,91; м | 6,01; с | 0 |
| 11 | H |  | H | 258–259 | 72,7 | [M+H] ⁺ = 532 | 4,07–4,12 т 2Н (CH ₂ COO) 3,04–3,08; т 2Н (NCH ₂) | 9,08; с | 7,08–7,86; м | 5,95; с | 20,8 |

* [8].

Таблиця 2. Характеристики продуктів ензиматического гідроліза сполучень 7–11

| Субстрат | Продукти гідроліза | Масс-спектри, m/Z | Т. пл., °С |
|----------|---|-------------------|------------|
| 7–9 |  | 365 | 150–153 |
| 10, 11 |  | 332 | 219–220 |

Изучение степени гидролиза исследуемых субстратов позволило выявить некоторые закономерности. Так, показано, что введение атома Cl в *o*-положение фенильного кольца приводит к повышению степени трансформации соединения **9** по сравнению с **10** (табл. 1).

Увеличение числа CH₂-групп в циклогексилацильном (соединение **8** по сравнению с **7**) и фталимидацильном (соединение **11** по сравнению с **10**) фрагментах молекулы также способствует возрастанию степени гидролиза субстратов. Это может объясняться стерическими затруднениями при взаимодействии с активным центром энзима субстратов с меньшим числом метиленовых групп между гидролизуемой группой и объемным циклическим заместителем. По-видимому, большая подвижность сложноефирного фрагмента, связанная с увеличением числа CH₂-групп, обеспечивает легкость встраивания в жесткий малый карман активного центра энзима [1].

ЛИТЕРАТУРА

1. Hosokawa M. Structure and catalytic properties of carboxylesterase isozymes involved in metabolic activation of prodrugs // *Molecules*. — 2008. — V. 13, № 2. — P. 412–431.
2. Bornscheuer U. T., Kazlauskas R. J. *Hydrolases in organic synthesis*. — Weinheim: Wiley-VCH, 2006. — 368 p.
3. Imai T., Hosokawa M. Prodrug approach using carboxylesterases activity: catalytic properties and gene regulation of carboxylesterase in mammalian tissue // *J. Pesticide Sci.* — 2010. — V. 35, N 3. — P. 229–239.
4. Шестеренко Е. А., Романовская И. И., Андронати С. А. и др. Стереоселективный гидролиз 1-метил-5-фенил-3-ацетокси-7-бром-1,2-дигидро-3H-1,4-бензодиазепин-2-она с помощью свободной и иммобилизованной микросомальной фракции печени свиньи // *Доп. НАНУ*. — 2011. — № 2. — С. 166–172.
5. Сівко Г. І., Кириченко І. М., Мальцев Г. В. та ін. Протисудомна активність складних ефірів 3-гідроксифеназепаму при їх пероральному введенні // *Одес. мед. журн.* — 2006. — Т. 96, № 4. — С. 27–29.
6. Семенішина Е. А., Павловський В. І., Андронати С. А. та ін. Синтез, структура, протисудомні властивості 7-бром-5-(2'-хлор)феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-бензодиазепин-2-онів // *Вісн. ОНУ, Сер. Хімія*. — 2010. — Т. 14, № 3. — С. 44–57.
7. Zhu L. M. Applications of pig liver esterases (PLE) in asymmetric synthesis // *Tetrahedron*. — 1990. — V. 46, N 19. — P. 6587–6611.
8. Андронати С. А., Шестеренко Е. А., Севастьянов О. В. и др. Гидролиз сложных эфиров 7-бром-3-гидрокси-5-фенил-1,2-дигидро-3H-1,4-бензодиазепин-2-она микросомальной фракцией печени свиньи // *Вісн. ОНУ, Сер. Хімія*. — 2008. — Т. 13, № 11. — С. 37–45.
9. Гринштейн Дж., Виниц М. *Химия аминокислот и пептидов*. — М.: Мир, 1965. — 815 с.
10. Andronati S., Semenishyna E., Pavlovsky V., Simonov Y. et al. Synthesis, structure and affinity of novel 3-alkoxy-1,2-dihydro-3H-1,4-

- benzodiazepin-2-ones for CNS central and peripheral benzodiazepine receptors // *Eur. J. Med. Chem.* — 2010. — V. 45, N 4. — P. 1346–1351.
11. *Eriksson L. C.* Preparation of liver microsomes with high recovery of endoplasmic reticulum and a low grade of contamination // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1978. — V. 508, N 1. — P. 155–164.
12. *Hartree E. F.* Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response // *Anal. Biochem.* — 1972. — V. 48, N 2. — P. 422–427.
13. *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. — P. 150–155.
14. *Balls A. K., Wood H. N.* Acetyl chymotrypsin and its reaction with ethanol // *J. Biol. Chem.* — 1956. — V. 219, N 1. — P. 245–256.

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК МІЖ СТРУКТУРОЮ ЕФІРІВ 3-ГІДРОКСИ-1,4-БЕНЗДІАЗЕПІН-2-ОНУ ТА СТУПЕНЕМ ЇХ ГІДРОЛІЗУ КАРБОКСИЛЕСТЕРАЗОЮ

*Є. А. Шестеренко
І. І. Романовська
О. В. Севастьянов
К. О. Семенішина
В. І. Павловський
С. А. Андронаті*

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

E-mail: romairina@gmail.com

Здійснено синтез ряду нових похідних 7-бром-5-арил-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону, що містять у положенні 3 фталімідоацильний і гексилацильний фрагменти. Структуру сполук встановлено методами мас-спектрометрії та спектроскопії ПМР. Уперше досліджено гідроліз раніше синтезованих складних ефірів 3-гідрокси-7-бром-5-арил-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону — потенційних анксиолітичних і снодійних засобів, що каталізуються карбоксилестеразою у складі мікросомальної фракції печінки свині. Показано кількісне інгібування естеразної активності мікросомальної фракції печінки свині в присутності селективного інгібітора карбоксилестерази — ди-(*n*-нітрофеніл)-фосфату. Встановлено нелінійність залежності ступеня гідролізу від довжини ацильного фрагмента в 3-ацилокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-онах, а також зниження ступеня трансформації субстрату в разі введення замісника в положення 1 молекули. Для похідних з фталімідоацильним і гексилацильним фрагментами в положенні 3 молекули збільшення числа CH₂-груп в цих замісниках і введення атому хлору в *o*-положення фенільного кільця сприяє підвищенню ступеня гідролізу.

Ключові слова: ефіри 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону, карбоксилестераза, мікросомальна фракція.

INTERRELATION BETWEEN 3-HYDROXY-1,4-BENZODIAZEPINE-2-ONE ESTERS STRUCTURE ON THEIR HYDROLYSIS BY CARBOXYL ESTERASE

*E. A. Shesterenko
I. I. Romanovska
O. V. Sevastyanov
E. A. Semenishina
V. I. Pavlovsky
S. A. Andronati*

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

E-mail: romairina@gmail.com

The synthesis of new series of 7-bromo-5-aryl-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-one derivatives, containing in the tree position phthalimidoacyl and hexylacyl fragments was accomplished. The structure of new compounds was proved by mass-spectrometry and PMR-spectroscopy methods. For the first time, hydrolysis of the earlier synthesized 3-hydroxy-7-bromo-5-aryl-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-one esters, potential anxiolytic and hypnotic means, catalyzed by carboxyl esterase in composition of pig liver microsomal fraction was studied. The quantitative inhibition of pig liver microsomal fraction esterase activity in the presence of carboxyl esterase selective inhibitor di-(*p*-nitrophenyl)-phosphate was shown. The nonlinear dependence both of hydrolysis degree with acyl moiety length in 3-acyloxy-7-bromo-5-aryl-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-ones and decreased substrate transformation degree after substituent introduction in the first position of molecule was established. For the derivatives with phthalimidoacyl and hexylacyl-moieties in the molecule 3 position it was shown, that increasing of CH₂-groups number in this substituents and incorporation of chlorine atom in *o*-position of phenyl ring bring to increasing of hydrolysis degree.

Key words: 3-hydroxy-1,4-benzodiazepine-2-one esters, carboxyl esterase, microsomal fraction.