

УДК 577.154

С. А. Андронати^{1,2}, Е. А. Шестеренко¹, О. В. Севастьянов¹,
И. И. Романовская^{1,2}, Е. А. Семенишина¹, В. И. Павловский¹

¹ Физико-химический институт им. А. В. Богатского НАН Украины,
Люстдорфская дор., 86, Одесса, 65080, Украина

² Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,
кафедра фармацевтической химии, ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

ГИДРОЛИЗ СЛОЖНЫХ ЭФИРОВ 7-БРОМ-3-ГИДРОКСИ-5-ФЕНИЛ- 1,2-ДИГИДРО-3Н-1,4-БЕНЗДИАЗЕПИН-2-ОНА МИКРОСОМАЛЬНОЙ ФРАКЦИЕЙ ПЕЧЕНИ СВИНЬИ

Исследован гидролиз сложных эфиров 1,4-бенздиазепин-2-она: 3-метилкарбонилокси-, 3-пентилкарбонилокси-, 3-гексилкарбонилокси- и 3-гептилкарбонилокси-7-бром-5-фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-онов выделенной методом низкоскоростной седиментации в присутствии Ca^{2+} микросомальной фракцией печени свиньи. Показано влияние pH, температуры, уровня карбоксилэстеразной активности, концентрации диметилсульфоксида на степень трансформации исследуемых субстратов. Впервые выявлено влияние длины углеродной цепи ацильного фрагмента молекулы исследуемых субстратов на степень их ферментативного гидролиза.

Ключевые слова: гидролиз, сложные эфиры, 1,4-бенздиазепин-2-оны, микросомальная фракция, печень свиньи.

Карбоксилэстеразы (КФ 3.1.1.1) млекопитающих (КЭМ), локализованные преимущественно в эндоплазматической ретикулуле гепатоцитов, осуществляют метаболизм и активацию различных по структуре лекарственных веществ и пролекарств, имеющих в своем составе сложноэфирную группу. Так, расщепление сложноэфирной связи в молекулах цилазаприла и квинаприла (ингибиторы АПФ) приводит к образованию активных метаболитов цилазаприлата и квинаприлата, соответственно [1]. Иринотекан (противоопухолевый препарат) обладает низкой цитотоксической активностью, в отличие от его метаболита, образующегося под действием карбоксилэстеразы [2]. Карбоксилэстераза катализирует гидролиз 3-ацетокси и, в меньшей степени, 6-ацетокси связи в молекуле героина с образованием моноацетилморфина и морфина, соответственно; эфирную связь метоксигруппы в молекуле кокаина [3], а также участвует в метаболизме сложных эфиров оксазепам, лоразепам (транквилизаторов бенздиазепаинового ряда) [4—6]. КЭМ обладает выраженной стереоселективностью; вследствие высокой энантиомерной чистоты получаемых продуктов, фермент, а также частично очищенные препараты карбоксилэстеразы и микросомальная фракция печени могут использоваться для получения оптически активных лекарственных веществ и пролекарств [7] и для изучения метаболизма лекарственных препаратов *in vitro*, исследования структуры и фармакологических свойств полученных метаболитов [2, 3].

Поскольку эстеразная активность печени свиньи в отношении новых производных 1,4-бенздиазепина не исследована, целью настоящей работы было изучение гидролиза сложных эфиров 7-бром-3-гидрокси-5-фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-она (II, IV—VI) микросомальной фракцией печени свиньи.

В качестве объектов исследования были выбраны 3-метилкарбонилокси-, 3-пентилкарбонилокси-, 3-гексилкарбонилокси- и 3-гептилкарбонилокси-7-бром-5-фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-оны (II, IV—VI). Данные соединения были получены согласно схемам 1 и 2.

Схема 1

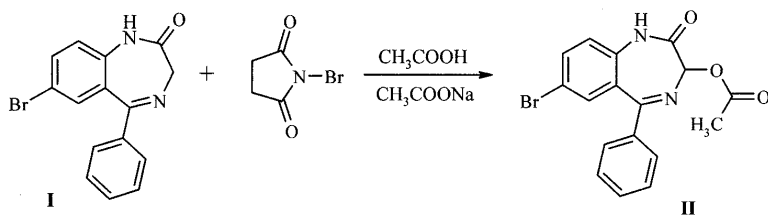
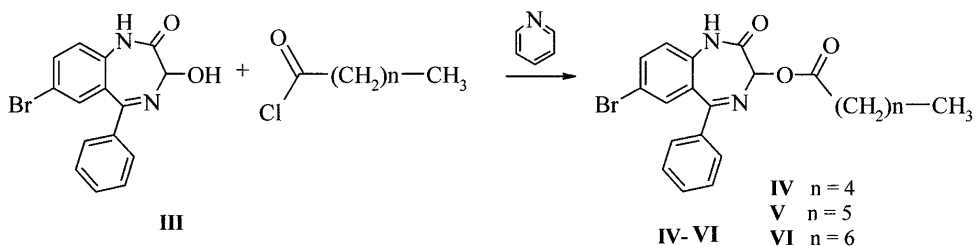


Схема 2



Экспериментальная часть

В работе использовали микросомальную фракцию печени свиньи, выделенную методом низкоскоростной седиментации в присутствии ионов Ca^{2+} [8]: охлажденную ткань печени свиньи гомогенизировали в 4 объемах (от массы печени) изотонического ($0,25$ моль/дм³) раствора сахарозы, приготовленного на трис-НСl буферном растворе ($0,01$ моль/дм³, pH 7,4), содержащем 1 ммоль/дм³ дитиотрейтола (ДТТ), фильтровали и центрифугировали при 8500 g в течение 14 мин. Осадок трижды ресуспендировали в 1 объеме (от массы печени) раствора сахарозы и центрифугировали в аналогичных условиях в течение 11 мин. Осаждение ионами Ca^{2+} проводили, добавляя к объединенной надосадочной жидкости раствор CaCl_2 (1 моль/дм³), приготовленный на трис-НСl буферном растворе ($0,01$ моль/дм³, pH 7,4), до конечной концентрации 8 ммоль/дм³, перемешивали в течение 10 мин, центрифугировали 10 мин при 10000 g, промывали 4 объемами раствора сахарозы и ресуспендировали в Na-цитратном буферном растворе, содержащем 1 ммоль/дм³ ЭДТА и ДТТ, и 20 % (по объему) глицерина. Процесс выделения проводили при 0°C .

В выделенной микросомальной фракции определяли содержание белка по методу Лоури в модификации Хартри [9], отношение РНК/белок [8], эстеразную активность по нафтилацетату [9].

Степень гидролиза сложных эфиров 7-бром-3-гидрокси-5-фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-она (II, IV—VI) определяли по их убыли спектрофотометрически гидроксаматным методом при λ 540 нм [10].

Влияние pH инкубационной среды на активность карбоксилэстеразы микросомальной фракции изучали в среде — диметилсульфоксид: буферный раствор (pH 3,0—10,0) и температуре 37 °С.

Определение температурного оптимума карбоксилэстеразы микросомальной фракции проводили в интервале температур 10—60 °С при pH 8,0.

Катализируемый эстеразами выделенной микросомальной фракции гидролиз сложных эфиров 7-бром-3-гидрокси-5-фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-она (II, IV—VI) проводили в течение 2,5 часов в среде диметилсульфоксид: К-фосфатный буферный раствор (0,0167 моль/дм³, pH 8,0) 2:3, температуре 37 °С и эстеразной активности микросомальной фракции 31,2 ед/см³ — по нафтилацетату (1 ед — 1 мкмоль/мг белка·мин).

7-Бром-3-метилкарбонилокси-5-фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-он (II). К суспензии 5 г (0,016 моль) 7-бром-5-фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-она (I) в 15 мл ледяной уксусной кислоты прибавляли 5,56 г (0,03 моль) бромсукцинимид и 2,6 г (0,03 моль) ацетата натрия. Реакционную смесь нагревали до 85° до растворения осадка (40 мин), охлаждали до комнатной температуры и оставляли на ночь. Образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали уксусной кислотой (3×10 см³), а затем водой до нейтральной реакции. Перекристаллизовывали из этилового спирта. Выход — 4,14 г (74%). Т пл. — 240—246 °С (табл. 1).

7-Бром-3-гексилкарбонилокси-5-фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-он (V). К суспензии 5 г (0,015 моль) 7-бром-3-гидрокси-5-фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-она (III) в 50 см³ абсолютного хлороформа прибавляли 1,2 см³ (0,015 моль) пиридина. Охлаждали до 0°С при перемешивании, добавляли 2,3 см³ (0,015 моль) хлорангидрида гептановой кислоты, перемешивали в течение 2-х ч. Затем реакционную смесь промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции, растворитель упаривали в роторном испарителе при пониженном давлении. Оставшееся масло кристаллизовали из этилового спирта. Выпавший эфир перекристаллизовывали из этанола. Выход — 1,33 г (20 %). Т пл. — 134—138 °С.

Аналогично получены IV, VI.

Результаты и их обсуждение

Синтезированные эфиры 7-бром-5-фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-она идентифицированы методами масс-спектрометрии, ИК, УФ спектроскопии, спектроскопии ПМР (табл. 1).

Из печени свиньи выделена микросомальная фракция с выходом белка 38 мг/г ткани, отношением РНК/белок 0,024 и эстеразной активностью 17,25 мкмоль/мг белка·мин (по нафтилацетату).

Физико-химические характеристики синтезированных сложных эфиров
7-бром-5-фенил-1,2-дигидро-3-гидрокси-3Н-1,4-бенздиазепин-2-она

№ п/п	Выход, %	Т.пл., °С	ЯМР спектры, м.д.			Масс- спек- тры, m/Z	ИК спектры, ν см ⁻¹					УФ-спектры			
			NH амидн.	C-H аром.	C(3)-H		NH своб.	NH ассоц.	C=O эф.	C=O амидн.	λ ₁ , нм	lg ε ₁	λ ₂ , нм	lg ε ₂	
II	74	265—273	9,37	7,10—7,63	6,03	373	3365	3180	1740	1700	234	4,6	322	3,82	
IV	31	158—160	9,53	7,10—7,64	5,95	429	3370	3190	1710 плечо	1690	232	4,45	319	3,71	
V	20	131—133	9,55	7,10—7,64	5,95	443	33670	3190	1710 плечо	1695	232	4,56	318	3,56	
VI	20	98—101	9,26	7,08—7,63	6,02	457	3360	3180	1715 плечо	1680	231	4,391	318	3,207	

Нами показано, что в результате гидролиза исследуемых субстратов микросомальной фракцией в качестве конечного продукта образуется 7-бром-3-гидрокси-5-фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-он III (рис. 1), структура которого подтверждена комплексом физико-химических методов: ТСХ, УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии (табл. 2).

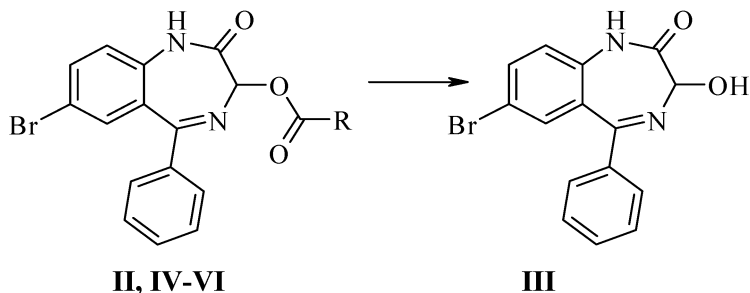


Рис. 1. Гидролиз сложных эфиров 7-бром-3-гидрокси-5-фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-она микросомальной фракцией печени свиньи
 $R = \text{CH}_3$ (II), C_5H_{11} (IV), C_6H_{13} (V), C_7H_{15} (VI)

Таблица 2

**Физико-химические характеристики
 7-бром-5-фенил-1,2-дигидро-3-гидрокси-3Н-1,4-бенздиазепин-2-она,
 полученного различными способами**

Методы		Химический синтез	Ферментативный синтез
Масс-спектрометрии, m/Z		332	332
УФ-спектро- скопия	λ_1 , нм	228	230
	λ_2 , нм	308	309
Т. пл., °С		219—220	219—222

Полученный продукт (III) не обладал оптической активностью вследствие его быстрой рацемизации, что согласуется с данными литературы [9].

С использованием 3-метилкарбонилокси-7-бром-5-фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-она (II) изучили зависимость эстеразной активности микросомальной фракции от pH- и температуры инкубационной среды. Показано, что высокая степень сохранения активности наблюдается при pH 7,0—10,0 и температуре 30—50 °С (табл. 3).

В связи с тем, что сложные эфиры 1,4-бенздиазепин-2-она плохо растворимы в воде, процесс гидролиза проводили в водно-органической среде диметилсульфоксид: К-фосфатный буферный раствор 0,0167 моль/дм³, pH 8,0. Так как применение органического растворителя может оказывать влияние на ферментативную активность, изучена зависимость изменения эстеразной активности микросомальной фракции от концентрации диме-

тилсульфоксида (ДМСО) в реакционной среде. Показано, что ДМСО в концентрациях 5—50 % существенно не влияет на таковую (табл. 4).

Таблица 3

**Влияние pH и температуры инкубационной среды
на эстеразную активность микросомальной фракции**

pH	Активность		τ , °C	Активность	
	нмоль/мг Белка·мин ($M \pm m$)	%		нмоль/мг Белка·мин ($M \pm m$)	%
4	3,41 $\pm$ 0,10	23,2	10	3,84 $\pm$ 0,15	26,1
5	7,85 $\pm$ 0,27	53,4	20	5,59 $\pm$ 0,23	38,0
6	11,08 $\pm$ 0,45	75,4	30	9,63 $\pm$ 0,48	65,5
7	13,37 $\pm$ 0,65	91,0	37	14,70 $\pm$ 0,43	100,0
8	14,70 $\pm$ 0,40	100,0	40	14,05 $\pm$ 0,51	95,6
9	13,98 $\pm$ 0,45	95,1	50	6,01 $\pm$ 0,27	40,9
10	12,25 $\pm$ 0,58	83,3	60	1,97 $\pm$ 0,07	13,4

$n=6$, $P > 0,001$

Таблица 4

Влияние концентрации ДМСО на эстеразную активность микросомальной фракции

Концентрация ДМСО, %	Эстеразная активность, %
0	100
5	100
10	100
15	100
20	100
25	99,0
30	93,5
35	86,8
40	84,3
45	83,9
50	82,3

Степень трансформации исследуемых субстратов зависит от уровня эстеразной активности микросомальной фракции. Так, с увеличением активности ферментного препарата в инкубационной среде от 25 до 100 ед/см³ степень гидролиза II возрастает с 16 % до 50 % (рис. 2).

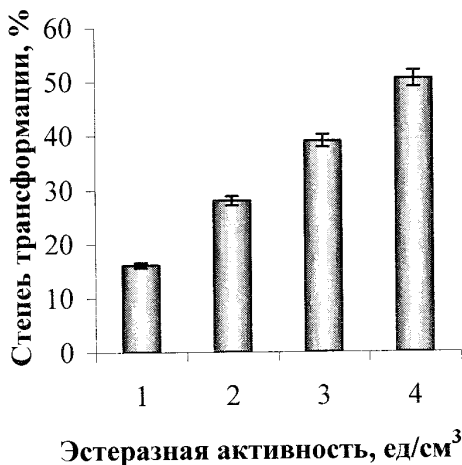


Рис. 2. Зависимость степени трансформации 3-метилкарбонилокси-7-бром-5-фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-она от активности микросомальной фракции (продолжительность инкубации 1 час, температура 37 °С, рН 8,0)
1 — 25 ед/см³ 2—50 ед/см³, —75 ед/см³, 4—100 ед/см³

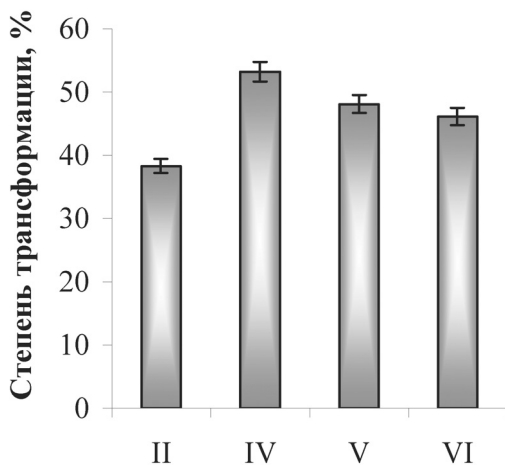


Рис. 3. Зависимость степени гидролиза сложных эфиров 7-бром-3-гидрокси-5-фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-она микросомальной фракцией печени свиньи от длины цепи ацильного фрагмента (продолжительность инкубации 2,5 часа, температура 37 °С, рН 8,0)

Гидролитическая активность микросомальной фракции в отношении сложных эфиров 1,4-бенздиазепин-2-она отличается; так, степень трансформации соединений IV, V, VI составила 53,2 %, 48,1 % и 46,1 %, соответственно, в то время как II гидролизуеться в этих же условиях на 38,3 % (рис. 3), что свидетельствует о большей специфичности карбоксилэстеразы

микросомальной фракции печени свиньи к исследованным субстратам с длиной углеродной цепи (C_5 — C_7) ацильного фрагмента. Полученные результаты согласуются с имеющимися данными в отношении катализируемого КЭМ гидролиза сложных эфиров ряда ароматических и алифатических спиртов и α -карбоновых кислот и объясняются особенностями структуры активного центра фермента, ориентация и локализация которого способствуют гидролизу субстратов с большей степенью гидрофобности [3].

Т. о. исследованы некоторые особенности ферментативного гидролиза сложных эфиров 1,4-бенздиазепин-2-она (рН, температура, влияние растворителя), впервые изучено влияние длины ацильного фрагмента молекулы исследуемых субстратов на степень их трансформации микросомальной фракцией печени свиньи.

Литература

1. Mori M., Hosokawa M., Ogasawara Y. et al. cDNA cloning, characterization and stable expression of novel human brain carboxylesterase // *FEBS Lett.* — 1999. — Vol. 485. — P. 17—22.
2. Hosokawa M. Structure and catalytic properties of carboxylesterase isozymes involved in metabolic activation of prodrug // *Molecules.* — 2008. — Vol. 13, № 2. — P. 412—431.
3. Redinbo M. R., Bencharit S., Potter P. M. Human carboxylesterase 1: from drug metabolism to drug discovery // *Biochemical Society Transactions* — 2003. — Vol. 31, № 1. — P. 620—624.
4. 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. — Vol. 2. — P. 150—155.
5. Yang S., Lu X.-L. Racemization kinetics of enantiomeric oxazepam 3-acetates in rat liver microsomes and brain homogenate // *J. Pharm. Sci.* — 1989. — V. 78, № 10. — P. 789—795.
6. Liu K., Guengerich P., Yang S. Enantioselective hydrolysis of lorazepam 3-acetate by esterases in human and rat liver microsomes and rat brain S9 fraction // *Drug Metab. Dispos.* — 1991. — Vol. 19, № 3. — P. 609—613.
7. Zhu L.-M., Tedford M.C. Application of pig liver esterase (PLE) in asymmetrical synthesis // *Tetrahedron.* — 1990. — Vol. 46, № 19. — P. 6587—6611.
8. Eriksson L.S. Preparation of liver microsomes with high recovery of endoplasmic reticulum and a low grade of contamination // *Biochim. et Biophys. Acta.* — 1978. — Vol. 508, № 1. — P. 155—164.
9. Hartree E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response // *Anal. Biochem.* — 1972. — Vol. 48, № 1. — P. 422—427.
10. Balls A. K., Wood H. N. Acetyl chymotrypsin and its reaction with ethanol // *J. Biol. Chem.* — 1956. — V. 219, № 1. — P. 245—256.

**С. А. Андронаті^{1,2}, Є. А. Шестеренко¹, О. В. Севастьянов¹,
І. І. Романовська^{1,2}, К. О. Семенішина¹, В. І. Павловський¹**

¹ Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського НАН України,
Льютдорфська дор., 86, Одеса, 65080, Україна

² Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
кафедра фармацевтичної хімії
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна

ГІДРОЛІЗ ЕСТЕРІВ 7-БРОМ-3-ГІДРОКСИ-5-ФЕНІЛ-1,2-ДИГІДРО- 3Н-1,4-БЕНЗДІАЗЕПІН-2-ОНУ МІКРОСОМАЛЬНОЮ ФРАКЦІЄЮ ПЕЧІНКИ СВИНІ

Резюме

Вивчений гідроліз естерів 1,4-бенздіазепін-2-ону: 3-метилкарбонілокси-, 3-пентилкарбонілокси-, 3-гексилкарбонілокси- і 3-гептилкарбонілокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-они виділеною методом низькошвидкісної седиментації в присутності Ca^{2+} мікросомальною фракцією печінки свині. Показано вплив рН, температури, рівня карбоксилестеразної активності, концентрації диметилсульфоксиду на ступінь трансформації досліджуваних субстратів. Вперше виявлений вплив довжини вуглецевого ланцюга ацильного фрагменту молекули досліджуваних субстратів на ступінь їх ферментативного гідролізу.

Ключові слова: гідроліз, естери, 1,4-бенздіазепін-2-они, мікросомальна фракція, печінка свині.

**S. A. Andronati^{1,2}, E. A. Shesterenko¹, O. V. Sevastyanov¹,
I. I. Romanovskaya^{1,2}, E. A. Semenishina¹, V. I. Pavlovsky¹**

¹ A. V. Bogatsky's Physico-Chemical Institute, NAS of Ukraine
Lyustdorfskaya dor., 86, Odessa, 65080, Ukraine

² I. I. Mechnikov's Odessa National University,
Chair of Pharmacological Chemistry
Dvoryanskaya St. 2, Odessa, 65082, Ukraine

HYDROLYSIS OF 7-BROMO-3-HYDROXY-5-PHENYL-1,2-DIHYDRO-3H- 1,4-BENZDIAZEPINE-2-ONE ESTERS BY PIG LIVER MICROSOMAL FRACTION

Summary

The hydrolysis of 1,4-benzdiazepine-2-one esters: 3-methylcarbonyloxy-, 3-pentylcarbonyloxy-, 3-hexylcarbonyloxy- and 3-heptylcarbonyloxy-7-bromo-5-phenyl-1,2-dihydro-3H-1,4-benzdiazepine-2-ones by pig liver microsomal fraction, isolated using the low-speed centrifugation method in the presence of Ca^{2+} -ions was studied. The influence of pH, temperature, level of carboxyl esterase activity and dimethyl sulfoxide concentration on the transformation degree of substrates studied, was shown. For first time the influence of acyl moiety carbon chain length of the studied substrates molecule on their enzymatic hydrolysis degree was found.

Key words: hydrolysis, esters, 1,4-benzdiazepine-2-ones, microsomal fraction, pig liver.