

طراحی، سنتز و ارزیابی زیستی مهارکننده‌های نوین اوره‌ای آنزیم اپوکساید هیدرولاز محلول

الهام رضایی

گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

مهدی هدایتی، لاله حقوقی راد

مرکز تحقیقات سلولی ملکولی، مرکز تحقیقات علوم غدد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

سید عباس طباطبایی*⁺

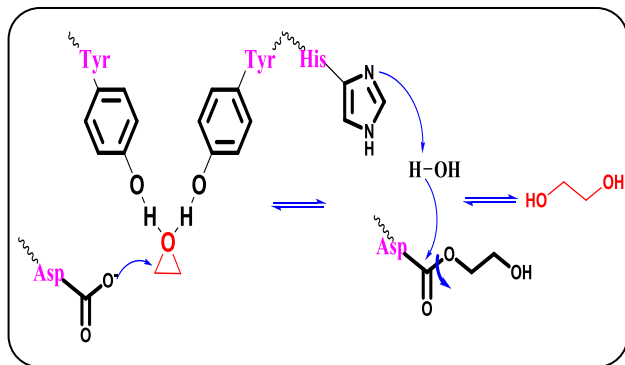
گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

چکیده: آنزیم اپوکساید هیدرولاز محلول (sEH)، اپوکسی ایکوزاترئونیک اسید (EETs) ایجاد شده توسط اپوکسی‌ناز از آراشیدونیک اسید را تبدیل به شکل دیول می‌کند. اپوکسی ایکوزاترئونیک اسید دارای بازه بالای فعالیت فیزیولوژیکی می‌باشد که در این میان، اتساع رگ‌ها در مجرای عروقی، شریان اورنده کلیوی و شریان‌های کرونر از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است که منجر به تنظیم فشار خون و پرفیوژن میوکارد می‌شود. همچنین، اپوکسی ایکوزاترئونیک اسید قادر به تنظیم بیان ملکول‌های چسبندگی، تجمع پلاکت‌ها، مهاجرت سلول‌های عروقی عضله‌های صاف و ویژگی‌های ترومبولیتیک می‌باشد که درگیر در مکانیسم‌های محافظت شریانی بر علیه آترواسکلروزیس می‌باشد. بنابراین، مهار آنزیم اپوکساید هیدرولاز محلول منجر به انباشتگی این سوبسترا در بدن می‌شود که می‌تواند رویکرد نوینی در درمان عارضه فشار خون و آترواسکلروزیس باشد. از آن جا که بیش‌تر مهارکننده‌های گزارش شده تا به حال، ویژگی‌های فارماکوکنتیکی نامناسبی داشته‌اند و برای کاربرد بالینی دلخواه نمی‌باشند. تلاش برای معرفی مهارکننده‌های نوین این آنزیم با قدرت مناسب و ویژگی‌های فارماکوکنتیک بهبود یافته همچنان ادامه دارد. در این پژوهش، ترکیب‌های جدید اکسادیازولی دارای گروه اوره‌ای به منظور مهار آنزیم sEH معرفی شده‌اند. ترکیب‌های طراحی شده در مطالعه‌های داکینگ تمایل بالایی به جایگاه فعال آنزیم نشان داده و با بازده خوبی سنتز و توسط IR و Mass و ¹HNMR تأیید ساختاری شد. برخی از ترکیبات سنتز شده در ارزیابی زیستی، فعالیت مهارتی قابل قیاسی با ۱۲- (۳-آدامانتان - ۱ - ایل - یوریدو) - دودکانوئیک اسید (AUDA)، مهارکننده قوی اوره‌ای اپوکساید هیدرولاز محلول، داشتند.

کلمات کلیدی: مهارکننده؛ عامل‌های ضد فشار خون؛ اپوکساید هیدرولاز محلول؛ اوره؛ اکسادیازولی.

KEYWORDS: Inhibitor; Antihypertensive agents; Soluble epoxide hydrolase; Urea; Oxadiazole.

مقدمه



شکل ۱- مکانیسم آنزیم اپوکساید هیدرولاز محلول.

مکانیسم فعالیت هیدرولازی این آنزیم شد. دو اسید آمینه تیروزین ۳۸۱ و ۴۶۵ با برقراری پیوند هیدروژنی با اکسیژن اپوکساید سوپسترا باعث پولاریزه شدن حلقه اپوکساید شده و یون اکسیژن در اسید آمینه آسپارتات ۳۳۳ به عنوان نوکلئوفیل به حلقه اپوکساید حمله کرده و ایجاد حدواسط کووالانتهی می‌کند. سپس پروتون ملکول آب توسط اسید آمینه هیستیدین ۴۳۱ گرفته و یون هیدروکسی ایجاد شده با حمله به حدواسط ایجاد فرم دیول می‌کند. (شکل ۱) بنابراین در طراحی مهارکننده‌های این آنزیم پیوند با آمینو اسیدهای تیروزین و آسپارتات ضروری ترین پیوندها برای مهار کردن آنزیم اپوکساید هیدرولاز محلول می‌باشد [۱۱].

در سال ۲۰۰۲ میلادی ترکیب‌های ۳،۱ دی‌استخلافی اوره‌ای، آمیدی و کارباماتی به عنوان مهارکننده‌های نسل اول آنزیم اپوکساید هیدرولاز محلول معرفی شدند که به علت نقطه ذوب بالا و حلالیت کم، اثر بخشی مناسبی در مطالعه‌های درون تن نداشتند [۱۲]. (شکل ۲) برای رفع این مشکل، گروه قطبی را در فاصله مناسبی از گروه اوره‌ای قرار دادند و ترکیب‌هایی طراحی شدند که اثر بخشی و محلولیت قابل پذیرشی داشتند و به عنوان نسل دوم مهار کننده‌های اپوکساید هیدرولاز محلول معرفی شدند [۱۳]. در این مجموعه، ترکیب ۱۲- (۳-آدامانتان-۱-یل-یوریدو)-دودکانوئیک اسید (AUDA) با اثر بخشی درون تن مناسب معرفی شد که در این مطالعه به عنوان استاندارد استفاده شده است. (شکل ۲) در کل، برای طراحی مهار کننده‌های آنزیم اپوکساید هیدرولاز محلول وجود یک پذیرنده و یک دهنده باند هیدروژنی به عنوان فارماکوفر اولیه در کنار دو گروه لیپوفیل برای مهار آنزیم ضروری می‌باشد که بر این اساس ترکیب‌های گوناگون آمیدی و اوره‌ای به عنوان مهارکننده‌های آنزیم اپوکساید هیدرولاز محلول معرفی شده‌اند [۲۲-۱۴] در این مطالعه ۷ ترکیب جدید اکسادیازولی

آنزیم سیتوزول اپوکساید هیدرولاز یا اپوکساید هیدرولاز محلول، آنزیم هیدرولیتیک β/α هیدرولازی می‌باشد که مشتق‌های سپس اپوکساید‌های استخلاف دار همانند اپوکسی ایکوزاترئونیک اسید (EETs)، لوکوتوکسین و اسکوالن اکساید را هیدرولیز و تبدیل به شکل دیول آن می‌کند [۱]. این آنزیم به صورت همودایمر با وزن ملکولی ۶۲/۵ کیلودالتون می‌باشد سر C ترمینال آنزیم دارای فعالیت هیدرولازی و سر N ترمینال دارای فعالیت لیپید فسفاتازی می‌باشد. سر N ترمینال آنزیم برای فعالیت سر C ترمینال این آنزیم ضروری می‌باشد اما عکسش صادق نمی‌باشد. بنابراین با مهار فعالیت اپوکساید هیدرولازی آنزیم فعالیت لیپید فسفاتازی آنزیم همچنان باقی می‌ماند. بیش‌ترین پراکندگی این آنزیم در سیتوزول بافت کبدی می‌باشد ولی در بیش‌تر بافت‌ها چه در ناحیه سیتوزول و چه در ناحیه پرواکسی زوم یافت می‌شود. با مهار آنزیم اپوکساید هیدرولاز محلول میزان سوپسترای EETs در بدن افزایش می‌یابد که دارای بازه گسترده‌ی اثرهای فیزیولوژیک می‌باشد [۳، ۲]. این متابولیت در سلول‌های ماهیچه‌ی صاف شریان‌های کرونر و در شریان‌های آوران کلیه با مکانیسم وابسته به GPR و فعال کردن پروتئین کیناز A، باعث تغییر حساسیت کانال پتاسیمی وابسته به کلسیم و در نتیجه فعال شدن کانال شده و سرانجام باعث هایپرپلاریزاسیون سلول و بسته شدن شریان‌های کرونر قلبی و آوران کلیوی می‌شود. به همین سبب فاکتور هایپرپلاریزان اندوتلیوم عروقی EDHF نامیده می‌شود. EETs در اندوتلیوم شریان‌ها باعث افزایش بیان ژن آنزیم نیتریک اکسید ستاز شده که در نتیجه افزایش سطح نیتریک اکسید، باعث بسته شدن شریان‌ها می‌شود. EET در کلیه مقاومت شریانی را کاهش داده و با مهار باز جذب سدیم از توبول‌ها باعث افزایش دفع سدیم می‌شود. مجموعه این فعالیت‌ها سبب شده EETs به عنوان عامل تنظیم کننده‌ی فشار خون مطرح شود. آترواسکلروزیس بیماری مزمن شریانی است که در ایجاد آن مکانیسم‌های التهابی همراه با دیس لیپیدمی نقش دارد. اپوکسی ایکوزاترئونیک اسید با افزایش HDL و کاهش LDL و با مهار بیان ژن‌ها و پروتئین‌های پیش التهابی در پیش‌گیری از بروز و پیشرفت این بیماری نقش مهمی دارد. EETs فاکتور هسته‌ای کاپا β را مهار کرده و در نتیجه مانع بیان ژن‌های پروتئین‌های پیش التهابی همانند اینترلوکین ۶، سیکلوکسیژناز، لیپوکسیژنازها، VCAM-1، iCAM-1 و TNF α می‌شود [۱۰-۴].

ساختار بلوری آنزیم اپوکساید هیدرولاز محلول برای اولین بار در سال ۱۹۹۹ میلادی به دست آمد که منجر به کشف

طیف‌های NMR، Mass و IR به ترتیب با استفاده از دستگاه‌های Finnigan TSQ-70 mass و Bruker FT-400، 80 MHz spectrometer و Perkin Elmer 843 به دست آمد. همچنین نقطه ذوب ترکیب‌ها با استفاده از Electrothermal، مدل ۹۱۰۰ بدون تصحیح به دست آمد.

سنتز مشتق‌های ۴-کلرو-۲-فنوکسی بنزوئیک اسید (3a, 3b)
۱۳/۸ گرم سدیم (۰/۳ مول) به ۲۷۰ میلی لیتر متانول خشک در بالن دودهانه مجهز به مبرد و خشک کن افزوده شد. پس از حل شدن سدیم، مقدار ۵۴/۱۵ (۰/۳ میلی مول) ۴و۲-دی کلروبنزوئیک اسید به محلول سدیم متوکسید درست شده افزوده شد. محلول به مدت ۱۵ دقیقه تا حل شدن کامل پودر ۴و۲-دی کلروبنزوئیک اسید به هم زده شد. به محلول حاصل ۰/۳ مول از مشتق ۲-کلروفنول و ۲-برموفنول افزوده شد. سپس حلال به طور کامل پرانده شد و به محتویات بالن به ترتیب ۵۰ میلی لیتر دی متیل فرمامید خشک و مقدار کمی پودر مس افزوده شد. واکنش تحت گاز آرگون به مدت ۲ ساعت بازروانی و سپس با آب رقیق و با کاغذ صافی صاف شد. محلول زیر صافی با هیدروکلریک اسید رقیق اسیدی و رسوب به دست آمده در استیک اسید و آب بلورگیری شد [۲۳].

۴-کلرو-۲- (۲-کلروفنوکسی) بنزوئیک اسید (3a)

بازده: ۵۵٪، نقطه ذوب: ۱۷۴-۱۷۳

IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 2950 (OH, COOH); 1705 (C=O).
MS: m/e (%) 282 (M⁺, 3); 247 (3); 155 (100); 99 (86); 63 (38); 45 (44).
¹HNMR (80 MHz, CDCl₃): 6.69 (d, 1H, J = 7.16 Hz); 7.05-7.58 (m, 5H-aromatic); 8.09 (d, 1H-aromatic, J = 8.46 Hz); 10.20 (bs, 1H, COOH).

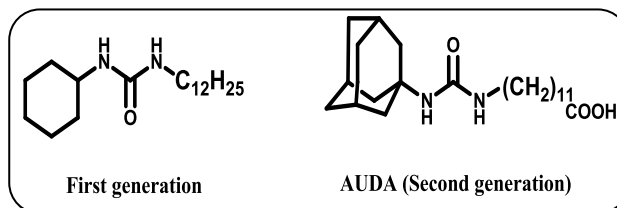
۲- (۲-برموفنوکسی) ۴-کلرو بنزوئیک اسید (3b)

بازده: ۶۹٪، نقطه ذوب: ۱۱۵-۱۱۴

IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 2950 (OH, COOH); 1700 (C=O).
MS: m/e (%) 326 (M⁺, 88); 310 (60); 247 (100); 156 (100).
¹HNMR (80 MHz, CDCl₃): 7.19 (t, 1H, J = 6.86 Hz); 7.25-7.08 (m, 5H-aromatic); 8.11 (d, 1H-aromatic, J = 7.46 Hz); 11.00 (bs, 1H, COOH).

سنتز مشتقات متیل ۴-کلرو-۲-فنوکسی بنزوات (4a, 4b)

به ۵ گرم (۱۷/۴ میلی مول) اسید سنتز شده در مرحله پیش در ۱۰۰ میلی لیتر متانول خشک، حدود ۲/۵ میلی لیتر محلول اشباع هیدروکلریک اسید در متانول خشک افزوده شد. واکنش در شرایط



شکل ۲- مهار کننده های نسل ۱ و ۲ آنزیم اپوکساید هیدرولاز محلول.

دارای ریشه اوره ای و حلقه اکسادیازوی به همراه حلقه های لیئوفیل فنیلی طراحی و سنتز شدند. مطالعه‌های داکینگ و همچنین ارزیابی زیستی این ترکیب‌ها انجام شد.

بخش تجربی

مطالعه‌های مولکولار مدلینگ (Molecular Modeling)

در این پژوهش، فرایند داکینگ (Docking) مولکول‌های طراحی شده، به منظور درک بهتر امکان و چگونگی اتصال مولکول‌های طراحی شده در جایگاه فعال آنزیم sEH انجام گرفته است. ساختار سه بعدی کریستالوگرافی شده آنزیم sEH به صورت فایل pdb از تارنمای اینترنتی Protein Data Bank، با کد (3ANS) گرفته شد. در این ساختار، آنزیم sEH همراه با لیگاند آمیدی سنتتیک در جایگاه فعال خود کریستالوگرافی شده است. ساختار کریستالوگرافی شده، از نوع انسانی و قدرت تفکیک آن ۱/۹۸ آنگسترم می‌باشد. نخست ساختمان‌های شیمیایی لیگاندهای طراحی شده با استفاده از نرم‌افزار ChemBioDraw Ultra رسم و با فرمت mol ذخیره شدند. سرانجام با استفاده از نرم افزار شرودینگر لیگاندهای طراحی شده برای فرایند داکینگ آماده شدند. برای آماده‌سازی پروتئین، فایل pdb دانلود شده مربوط به ساختار همولوژی را با نرم‌افزار ViewerLite باز کرده و آب و لیگاندهای درونی و بیرونی و ملحقات اضافی حذف شد. با استفاده از نرم‌افزار شرودینگر اتم‌های هیدروژن به آن اضافه‌شده و شارژ آن محاسبه شد. عملیات Docking با استفاده از نرم‌افزار Glide و به روش استاندارد لیگاند انعطاف‌پذیر - پروتئین ثابت (Flexible ligand-Rigid protein) صورت گرفت. برای امتیاز دهی از روش XP که دقت بالایی دارد استفاده شد. سرانجام نتیجه‌ها با استفاده از نرم افزار Pymol به صورت قابل نمایش گرافیکی درآمدند.

بخش شیمی

در این مطالعه کلیه مواد و حلال‌های مورد استفاده از شرکت‌های Merck و Sigma تهیه و بدون خالص سازی مورد استفاده قرار گرفت.

سنتز مشتقات ۲-آمینو-۵-[۴-کلرو-۲-فنوکسی]فنیل-۱، ۳، ۴-اکسادیازول (6a, 6b)

به سوسپانسیون از ۸/۴ میلی مول بنزوئیدرازید به دست آمده از مرحله پیش در ۱۰ میلی لیتر دی اکسان، محلولی از ۰/۷ گرم (۸/۴ میلی مول) بی کربنات سدیم در ۵ میلی لیتر آب افزوده شد. پس از ۵ دقیقه ۱ گرم (۹/۴) میلی مول سیانوژن برمید به واکنش افزوده شد و واکنش ۴ ساعت در دمای محیط استیر شد. سپس آب افزوده و رسوب به دست آمده صاف و در اتیل استات بلورگیری شد [۲۳].

۲-آمینو-۵-[۴-کلرو-۲-فنوکسی]فنیل-۱، ۳، ۴-اکسادیازول (6a)

بازده: ۷۴٪، نقطه ذوب: ۱۷۰-۱۶۵

IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3330, 3115 (NH₂); 1675 (C=N).
MS: m/e (%) 321 (M⁺, 13); 286 (100); 216 (19); 186 (6); 75 (14).

۲-آمینو-۵-[۲-برموفنوکسی]-۴-کلرو فنیل-۱، ۳، ۴-اکسادیازول (6b)

بازده: ۸۲٪، نقطه ذوب: ۱۹۱-۱۸۶

IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3416, 3309 (NH₂); 1660 (C=N).
MS: m/e (%) 365 (M⁺, 14); 286 (100); 215 (86); 179 (31); 139 (32).

سنتز مشتق های N-۵-[۴-کلرو-۲-فنوکسی فنیل]-۱ و ۳-۴-اکسادیازول-۲-ایل-N^۳ فنیل اوره (7a-7g)

محلول ۱/۵ میلی مول از جسم های 6a-6b و ۱/۵ میلی مول مشتق های گوناگون فنیل ایزوسیانات در اتیل استات به مدت ۱ ساعت بازروانی شد. پس از سرد شدن کریستال های 7a-7g به دست آمد [۲۰].

N-۵-[۴-کلرو-۲-فنوکسی] فنیل-۱ و ۳-۴-اکسادیازول-۲-ایل-N^۳ فنیل اوره (7a)

بازده: ۴۴٪، نقطه ذوب: ۱۷۷-۱۷۶

IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3330, 3258 (NH); 1690 (C=O).
MS: m/e (%) 440 (M⁺, <1); 321 (5); 312 (21); 286 (100); 216 (23).
¹HNMR (400 MHz, DMSO): 6.90 (s, 1H-aromatic); 7.07 (br, 1H-aromatic); 7.18-7.27 (m, 2H-aromatic); 7.30 (t, 2H-aromatic, J = 8 Hz); 7.40-7.45 (m, 4H-aromatic); 7.64 (dd, 1H-aromatic, J = 8, 4 Hz); 7.95 (d, 1H-aromatic, J = 8 Hz); 9.53 (s, NH); 11.07 (brs, NH).

خشک به مدت سه ساعت بازروانی شد. سپس حلال واکنش پرانده و باقی مانده در کلروفرم حل شده و سه بار با محلول اشباع سدیم بیکربنات اشباع شسته شد. محلول کلروفرمی پرانده که سرانجام فراورده روغنی شکلی به دست آمد [۲۳].

متیل ۴-کلرو-۲-۲-کلرو-۲-فنوکسی (بنزوات (4a)

بازده: ۹۰٪

IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 1731 (C=O).
MS: m/e (%) 296 (M⁺, 3); 261 (10); 202 (8); 111 (32); 99 (42); 59 (95).
¹HNMR (80 MHz, CDCl₃): 3.8 (s, 3H, COOCH₃); 6.8-7.4 (m, 6H-aromatic); 7.89 (d, 1H-aromatic, J = 8.6 Hz).

متیل ۲-۲-برموفنوکسی-۴-کلرو فنیل بنزوات (4b)

بازده: ۵۰٪

IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 1736 (C=O).
¹HNMR (80 MHz, CDCl₃): 3.83 (s, 3H, COOCH₃); 6.61-7.37 (m, 4H-aromatic); 7.64 (dd, 2H-aromatic, J = 6.28, 1.83 Hz); 7.89 (d, 1H-aromatic, J = 8.38 Hz).

سنتز مشتقات ۴-کلرو-۲-فنوکسی بنزوئیک اسید هیدرازید (5a, 5b)

به محلول ۵۰۰ میلی گرم (۱/۶۸ میلی مول) استر (4a, 4b)، ۰/۵ سی سی (۱/۴ مول) هیدرازین مونوهیدراته به آرامی افزوده شد. پس از یک ساعت، واکنش با آب رقیق شده و رسوب سفید رنگی به دست آمد که در کلروفرم بلور شد [۲۳، ۲۴].

سنتز ۴-کلرو-۲-۲-کلرو-۲-فنوکسی (بنزوئیک اسید هیدرازید (5a)

بازده: ۸۴٪، نقطه ذوب: ۱۴۲-۱۳۸

IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3421, 3324 (NH, NH₂); 1660 (C=O).
MS: m/e (%) 296 (M⁺, 16); 265 (100); 230 (9); 202 (9).
¹HNMR (80 MHz, CDCl₃): 4.03 (br, 2H, NH₂); 6.6 (d, 1H-aromatic, J = 1.83 Hz); 7.1-7.6 (m, 5H-aromatic); 8.18 (d, 1H-aromatic, J = 8.4 Hz); 8.7 (br, 1H, NH).

سنتز ۲-۲-برموفنوکسی-۴-کلرو-بنزوئیک اسید هیدرازید (5b)

بازده: ۵۶٪، نقطه ذوب: ۱۵۷-۱۵۵

IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3426, 3329 (NH, NH₂); 1654 (C=O).
MS: m/e (%) 340 (M⁺, 92); 308 (100); 261 (42); 231 (100); 201 (100); 139 (100); 97 (75).
¹HNMR (80 MHz, CDCl₃): 4.53 (br, 2H, NH₂); 6.55 (d, 1H-aromatic, J = 6.83 Hz); 7.22-7.75 (m, 5H-aromatic); 8.20 (d, 1H-aromatic, J = 7.96 Hz); 8.52 (br, 1H, NH).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO): 6.87 (s, 1H-aromatic); 7.07 (br, 1H-aromatic); 7.22-7.27 (m, 2H-aromatic); 7.33 (t, 2H-aromatic, $J = 8$ Hz); 7.45-7.53 (m, 4H-aromatic); 7.80 (dd, 1H-aromatic, $J = 8, 4$ Hz); 7.96 (d, 1H-aromatic, $J = 8$ Hz); 9.57 (s, NH); 11.08 (brs, NH).

N-[۵]-[۲]-[۲]-برموفنوکسی-۴-کلرو فنیل-۱-او۳و۴-اکسادیازول-۲-ایل- N^{\ominus} (۴-متیل فنیل) اوره (7f) بازده: ۴۴٪، نقطه ذوب: ۲۱۰-۲۱۲

IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3267, 3200 (NH); 1688 (C=O).
MS: m/e (%) 498 (M+, <1); 366 (6); 312 (75); 286 (100); 133 (80).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO): 2.26 (s, 3H, CH_3); 6.86 (s, 1H-aromatic); 7.13 (d, 2H-aromatic, $J = 8$ Hz); 7.24 (dd, 2H-aromatic, $J = 8, 4$ Hz); 7.39-7.49 (m, 4H-aromatic); 7.80 (dd, 1H-aromatic, $J = 8, 4$ Hz); 7.96 (d, 1H-aromatic, $J = 12$ Hz); 9.49 (s, NH); 11.06 (s, NH).

N-[۵]-[۲]-[۲]-برموفنوکسی-۴-کلرو فنیل-۱-او۳و۴-اکسادیازول-۲-ایل- N^{\ominus} (۳-کلرو فنیل) اوره (7g) بازده: ۶۳٪، نقطه ذوب: ۲۰۷-۲۰۹

IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3278 (NH); 1696 (C=O).
MS: m/e (%) 518 (M+, 3); 457 (4); 439 (6); 403 (3).
 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO) 6.87 (s, 1H-aromatic); 7.24 (dd, 2H-aromatic, $J = 8, 4$ Hz); 7.38 (d, 2H-aromatic, $J = 12$ Hz); 7.47 (t, 2H-aromatic, $J = 8$ Hz); 7.54 (d, 2H-aromatic, $J = 8$ Hz); 7.80 (d, 1H-aromatic, $J = 8$ Hz); 7.97 (d, 1H-aromatic, $J = 8$ Hz); 9.46 (s, NH); 11.11 (s, NH)

N-[۵]-[۲]-[۲]-برموفنوکسی-۴-کلرو فنیل-۱-او۳و۴-اکسادیازول-۲-ایل- N^{\ominus} (۴-کلرو فنیل) اوره (7h) بازده: ۶۳٪، نقطه ذوب: ۲۰۳-۲۰۴

IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3250 (NH); 1696 (C=O).
MS: m/e (%) 366 (3); 312 (43); 286 (100); 216 (47); 152 (100); 126 (100); 90 (52).
 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO) 6.86 (s, 1H-aromatic); 7.11-7.47 (m, 7H-aromatic, $J = 8, 4$ Hz); 7.79 (t, 2H-aromatic, $J = 8$ Hz); 7.97 (d, 1H-aromatic, $J = 8$ Hz); 9.72 (s, NH); 11.18 (brs, NH).

ارزیابی فعالیت مهار کنندگی آنزیم اپوکساید هیدرولاز محلول

به منظور ارزیابی قدرت مهارتی آنزیم اپوکساید هیدرولاز محلول ترکیب‌های سنتز شده، از کیت با شماره کاتالوگ ۱۰۰۱۱۶۷۱ که شامل آنزیم اپوکساید هیدرولاز محلول، بافر برای رقیق سازی،

N-[۵]-[۴]-[۲]-[۲]-کلرو فنوکسی (۲-کلرو فنوکسی) فنیل-۱-او۳و۴-اکسادیازول-۲-ایل- N^{\ominus} (۳-متیل فنیل) اوره (7b) بازده: ۸۳٪، نقطه ذوب: ۲۰۵-۲۰۷

IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3288, 3270 (NH); 1690 (C=O).
MS: m/e (%) 454 (M+, 2); 374 (68); 321 (6); 312 (22); 286 (35); 207 (40); 155 (9); 146 (44); 107 (53); 44 (100).
 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO): 2.29 (s, 3H, CH_3); 6.89 (d, 2H-aromatic, $J = 12.0$ Hz); 7.19-7.33 (m, 5H-aromatic); 7.42 (d, 1H-aromatic, $J = 8$ Hz); 7.46 (d, 1H-aromatic, $J = 8$ Hz); 7.66 (dd, 1H-aromatic, $J = 8, 2$ Hz); 7.95 (d, 1H-aromatic, $J = 12.0$ Hz); 9.53 (s, NH); 11.09 (brs, NH)

N-[۵]-[۴]-[۲]-[۲]-کلرو فنوکسی (۲-کلرو فنوکسی) فنیل-۱-او۳و۴-اکسادیازول-۲-ایل- N^{\ominus} (۴-متیل فنیل) اوره (7c) بازده: ۵۷٪، نقطه ذوب: ۱۸۶-۱۸۸

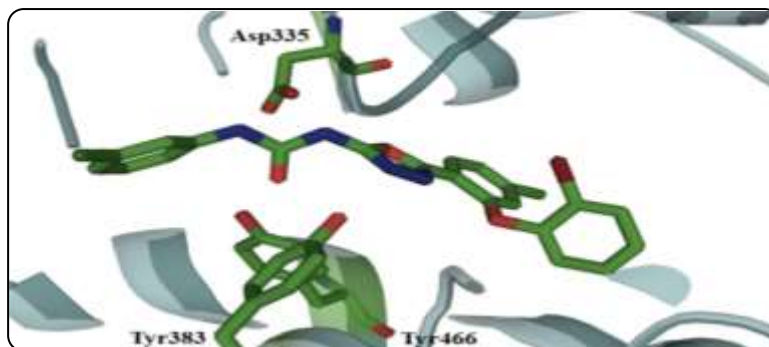
IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3270, 3240 (NH); 1705 (C=O).
MS: m/e (%) 454 (M+, 3); 368 (8); 321 (6); 321 (19); 312 (33); 286 (33); 155 (62); 107 (100).
 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO): 2.25 (s, 3H, CH_3); 6.91 (s, 1H-aromatic); 7.07 (d, 1H-aromatic, $J = 8$ Hz); 7.14 (d, 1H-aromatic, $J = 8$ Hz); 7.23 (d, 1H-aromatic, $J = 8$ Hz); 7.32 (dd, 2H-aromatic, $J = 8, 4$ Hz); 7.38-7.48 (m, 3H-aromatic); 7.66 (dd, 1H-aromatic, $J = 8, 2$ Hz); 7.95 (d, 1H-aromatic, $J = 12.0$ Hz); 9.50 (s, NH); 11.06 (brs, NH).

N-[۵]-[۴]-[۲]-[۲]-کلرو فنوکسی (۲-کلرو فنوکسی) فنیل-۱-او۳و۴-اکسادیازول-۲-ایل- N^{\ominus} (۳-دی کلرو فنیل) اوره (7d) بازده: ۵۱٪، نقطه ذوب: ۲۰۵-۲۰۷

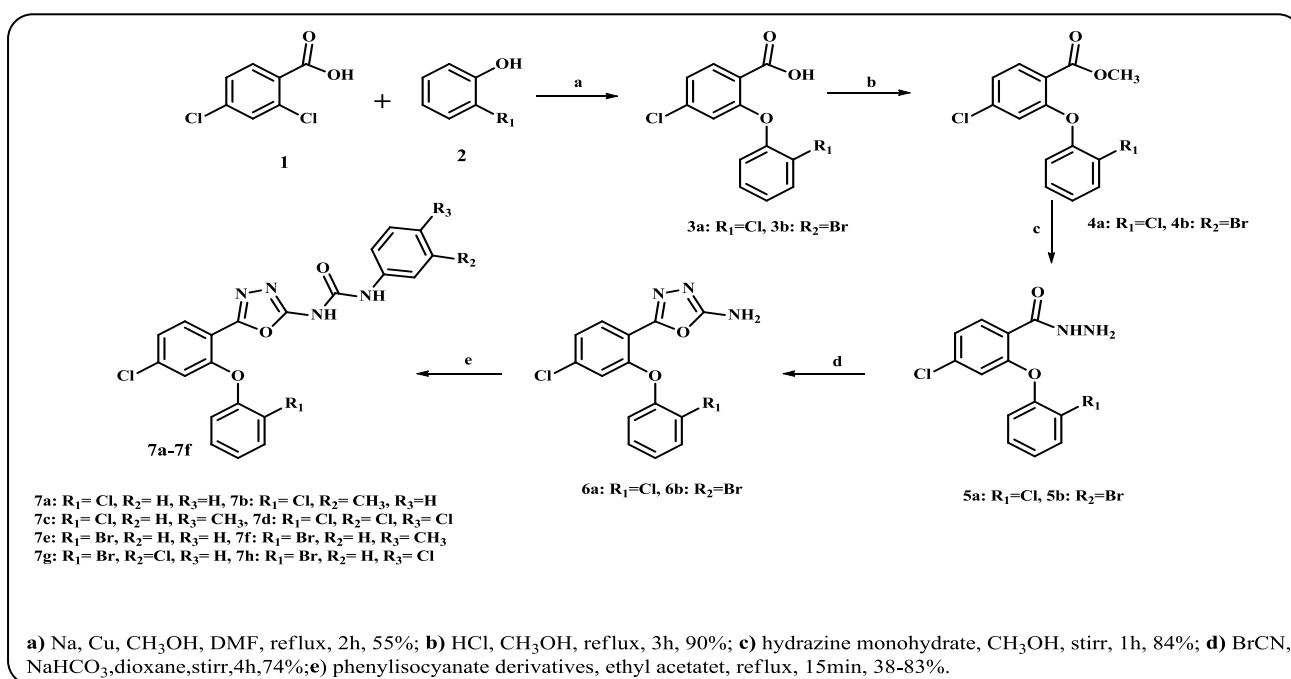
IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3277 (NH); 1685 (C=O).
MS: m/e (%) 508 (M+, 3); 368 (8); 321 (6); 321 (19); 312 (33); 286 (33); 155 (62); 107 (100).
 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO): 6.90 (s, 1H-aromatic); 7.23 (d, 1H-aromatic, $J = 4$ Hz); 7.31 (t, 1H-aromatic, $J = 8$ Hz); 7.41-7.46 (m, 3H-aromatic); 7.54 (d, 1H-aromatic, $J = 8$ Hz); 7.65 (d, 1H-aromatic, $J = 8$ Hz); 7.96 (d, 2H-aromatic, $J = 8$ Hz); 9.75 (brs, NH); 11.20 (br, NH).

N-[۵]-[۲]-[۲]-برموفنوکسی-۴-کلرو فنیل-۱-او۳و۴-اکسادیازول-۲-ایل- N^{\ominus} فنیل اوره (7e) بازده: ۳۸٪، نقطه ذوب: ۱۷۷-۱۷۹

IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3267, 3200 (NH); 1695 (C=O).
MS: m/e (%) 366 (5); 312 (19); 286 (100); 216 (54); 91 (31).



شکل ۳: قرار گیری ترکیب شماره 7h در جایگاه فعال آنزیم اپوکساید هیدرولاز محلول



شکل ۴- شمای کلی واکنش سنتز ترکیب‌های نوین اورهای.

تمایل بیش‌تری نشان دادند. همچنین، ترکیب‌های دارای استخلاف متیل و کلر در جایگاه پارای حلقه N-فنیل (R_3) تمایل بیش‌تری نسبت به سایر ترکیب‌ها نشان دادند به طوری که ترکیب 7h که دارای استخلاف برم در جایگاه R_1 و استخلاف کلر در جایگاه R_3 می‌باشند بیش‌ترین تمایل را به جایگاه فعال آنزیم نشان داد.

شکل ۳ ترکیب 7h را نشان می‌دهد که به خوبی در جایگاه فعال آنزیم اپوکساید هیدرولاز قرار گرفته و در فاصله مناسب از سه آمینو اسید تیروزین ۳۸۳ و ۴۶۶ و اسپارتات ۳۳۸ برای پیوند هیدروژنی ضروری جهت مهارکنندگی آنزیم اپوکساید هیدرولاز محلول می‌باشد.

سوبسترا، (۳- فنیل - اکسیرانیل) - استیک اسید سیانو- (۶- متوکسی - نفتالن-۲- ایل) - متیل استر (PHOME)، پلیت ۹۶ چاهکی و کاورمی باشد استفاده شد. این کیت بر پایه فلورسانس در طول موج جذبی و نشری ۳۳۰ و ۴۶۵ نانومتر می‌باشد.

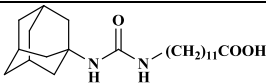
نتیجه‌ها و بحث

مدل‌سازی مولکولی^(۱)

طبق نتیجه‌های داکینگ (جدول ۱) ترکیب‌های دارای استخلاف برم در جایگاه R_1 دارای تمایل همانندی به جایگاه فعال آنزیم اپوکساید هیدرولاز محلول در مقایسه با AUDA می‌باشند و نسبت به ترکیب‌های کلر دار در این جایگاه

(۱) Molecular Modeling

جدول ۱- فعالیت مهاری ترکیبات جدید سنتز شده در غلظت ۱ نانومولار بر علیه آنزیم اپوکساید هیدرولاز محلول و انرژی آزاد گیبس ترکیبات در مطالعه داکینگ

شماره	ترکیب	درصد فعالیت مهاری در غلظت ۱ نانومولار	انرژی آزاد گیبس (kcal/mol)
۷a	$R_1 = Cl, R_2 = H, R_3 = H$	۸	-۲/۴۵
۷b	$R_1 = Cl, R_2 = CH_3, R_3 = H$	۳	-۲/۴۵
۷c	$R_1 = Cl, R_2 = H, R_3 = CH_3$	۲۰	-۵/۹۵
۷d	$R_1 = Cl, R_2 = Cl, R_3 = Cl$	۱۲	-۳/۵۶
۷e	$R_1 = Br, R_2 = H, R_3 = H$	۳۰	-۶/۳۲
۷f	$R_1 = Br, R_2 = H, R_3 = CH_3$	۳۴	-۶/۱۵
۷g	$R_1 = Br, R_2 = Cl, R_3 = H$	۲۵	-۶/۰۲
۷h	$R_1 = Br, R_2 = H, R_3 = Cl$	۴۹	-۶/۹۵
'AUDA		۵۰	-۶/۶۹

بخش شیمی

بیش تری در مقایسه با ترکیبهای کلر دار می باشند و همچنین ترکیبها دارای استخلاف متیل و کلر در جایگاه پارای حلقه N-فنیل (R_3) فعالیت مهاری بیشتری نسبت به سایر ترکیبهای نشان دادند.

نتیجه گیری

در این پژوهش ترکیبهای نوین اوره‌ای دارای حلقه ۱ و ۳-اکسادیازولی به عنوان مهار کننده های آنزیم اپوکساید هیدرولاز محلول طراحی و سنتز شدند. ترکیبهای طراحی شده در مطالعه‌های داکینگ از تمایل خوبی به اکتیو سایت آنزیم اپوکساید هیدرولاز محلول برخوردار بودند. همچنین، نتیجه‌های مطالعه‌های آنزیمی نشان می‌دهد ترکیبهای سنتز شده دارای فعالیت مهاری آنزیمی می‌باشند به طوری که ترکیب 7h فعالیت مهاری همانند ترکیب استاندارد AUDA (مهارکننده اوره ای قوی آنزیم اپوکساید هیدرولاز محلول) نشان داد. به نظر می‌رسد این ساختارها می‌توانند ترکیبهای راهبر مناسبی برای طراحی‌های بیشتر باشند. از آن جا که مهارکننده‌های آنزیم اپوکساید هیدرولاز محلول دارای اثرهای

ترکیبهای طراحی شده طبق شکل ۴ با بازده قابل قبولی سنتز شدند. ابتدا ترکیب اسیدی ۳ طی واکنش جانشینی هسته دوستی روی حلقه آروماتیک از ۲ و ۴-دی کلروبنزوئیک اسید و فنل مربوطه در حضور کاتالیست مس به دست آمد. سپس استر و به دنبال آن هیدرازید از اسید سنتز و در مجاورت با سیانوژن برمید حلقه آمینو ۱، ۳، ۴-اکسادیازول بسته شد. سرانجام فرآورده‌های 7a-7h از واکنش ترکیب ۶ با مشتق‌های فنیل ایزوسیانات به دست آمد شد که با استفاده از آزمون‌های تشخیصی IR، Mass و NMR مورد تأیید قرار گرفت.

ارزیابی فعالیت مهار کنندگی آنزیم اپوکساید هیدرولاز محلول

جدول ۱، فعالیت مهاری ترکیبهای نوین سنتز شده و ترکیب استاندارد AUDA در غلظت ۱ نانومولار را نشان می‌دهد. نتیجه‌های به دست آمده از مطالعه‌های داکینگ و ارزیابی زیستی تطابق چشمگیری داشته است به طوری که بهترین ترکیب در هر دو مطالعه ترکیب شماره 7h می‌باشد که فعالیت مهاری برابری با ترکیب AUDA داشته است. به مانند مطالعه‌های داکینگ، ترکیبها دارای استخلاف برم در جایگاه R_1 دارای فعالیت مهاری

(استاد دانشکده داروسازی دانشگاه تهران) و سر کار خانم دکتر راما سلیمانی (دانش آموخته داروسازی عمومی سال ۱۳۸۰ از دانشگاه تهران) که در انجام این پژوهش ما را یاری کرده اند، تقدیر و تشکر می‌شود. از درگاه خداوند متعال، برای این عزیزان که در قید حیات نمی‌باشند، رحمت و مغفرت واسعه آرزو می‌نماییم.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۲/۳

ضد فشار خون بالا و ضد درد و ضد التهاب می‌باشند، انجام آزمون‌های درون تنی برای بررسی این اثرها توصیه می‌شود.

قدردانی

بدینوسیله از حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی با بودجه مالی (۱۹۶۴۲) در انجام این پژوهش کمال تشکر و قدردانی را داریم. همچنین، از جناب آقای دکتر عباس شفیعی

مراجع

- [1] Miyamoto T., Silva M., Hammock B.D., [Inhibition of Epoxide Hydrolases and Glutathione S-transferases by 2-, 3-, and 4-Substituted Derivatives of 4'-Phenylchalcone and its Oxide](#), *Arch Biochem Biophys*, **254** (1): 203-213 (1987).
- [2] Dietze E.C., Kuwano E., Casas J., Hammock B.D., [Inhibition of Cytosolic Epoxide Hydrolase by trans-3-Phenylglycidols](#), *Biochem. Pharmacol*, **42** (6): 1163-1175 (1991).
- [3] Pecic S., Pakhomova S., Newcomer M.E., Morisseau C., Hammock B.D., Zhu Z., [Synthesis and Structure-Activity Relationship of Piperidine-Derived Non-Urea Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitors](#), *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **23** (2): 417-421 (2013).
- [4] Shen H.C., Ding F.X., Wang S., Xu S., Chen H.S., Tong X., [Discovery of Spirocyclic Secondary Amine-Derived Tertiary Ureas as Highly Potent, Selective and Bioavailable Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitors](#), *Bioorg, Med. Chem. Lett.*, **19** (13): 3398-3404 (2009).
- [5] Xie Y., Liu Y., Gong G., Smith D.H., Yan F., Rinderspacher A., [Discovery of Potent Non-Urea Inhibitors of Soluble Epoxide Hydrolase](#), *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19** (8): 2354-2359 (2009).
- [6] Huang S.X., Li H.Y., Liu J.Y., Morisseau C., Hammock B.D., Long Y.Q., [Incorporation of Piperazino Functionality into 1,3-Disubstituted Urea as the Tertiary Pharmacophore Affording Potent Inhibitors of Soluble Epoxide Hydrolase with Improved Pharmacokinetic Properties](#), *J. Med. Chem.*, **53** (23): 8376-8386 (2010).
- [7] Kim I.H., Tsai H.J., Nishi K., Kasagami T., Morisseau C., Hammock B.D., [1,3-Disubstituted Ureas Functionalized with Ether Groups are Potent Inhibitors of the Soluble Epoxide Hydrolase with Improved Pharmacokinetic Properties](#), *J. Med. Chem.*, **50** (21): 5217-5226 (2007).
- [8] Shen H.C., Ding F.X., Wang S., Deng Q., Zhang X., Chen Y., [Discovery of a Highly Potent, Selective, and Bioavailable Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitor with Excellent Ex vivo Target Engagement](#), *J. Med. Chem.*, **52** (16): 5009-5012 (2009).

- [9] Shen H.C., Ding F.X., Deng Q., Xu S., Tong X., Zhang X., [A Strategy of Employing Aminoheterocycles as Amide Mimics to Identify Novel, Potent and Bioavailable Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitors](#), *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19** (19): 5716-5721 (2009).
- [۱۰] ضیایی، عظیم آقابزرگ نانوا، پریچهر؛ لطفی نوسود، یزدان بخش؛ خللی، بهزاد؛ تهیه ۴ - آریلیدین - ۲ - آلکیل تیو - H^۴ - تiazول - ۵ - اون ها با استفاده از آمینواسید های دی تیوکاربامات و آلدهید ها، نشریه شیمی و مهندسی شیمی / ایران، (۳): ۳۵ تا ۴۳ (۱۳۹۵).
- [11] Schiøtt B., Bruice T.C., [Reaction Mechanism of Soluble Epoxide Hydrolase: Insights from Molecular Dynamics Simulations](#), *J. Am. Chem. Soc.*, **124** (49): 14558-14570 (2002).
- [12] Morisseau C., Goodrow M.H., Newman J.W., Wheelock C.E., Dowdy D.L., Hammock B.D., [Structural Refinement of Inhibitors of Urea-Based Soluble Epoxide Hydrolases](#), *Biocheml. Pharmacol.*, **63**(9): 1599-1608(2002).
- [13] Kim I.H., Nishi K., Tsai H.J., Bradford T., Koda Y., Watanabe T., Morisseau C., Blanchfield J., Toth I., Hammock B.D., [A Design of Bioavailable Derivatives of 12-\(3-adamantan-1-yl-ureido\)dodecanoic acid, a Potent Inhibitor of the Soluble Epoxide Hydrolase](#), *Bioorg. Med. Chem.*, **15** (1): 312-323 (2007).
- [14] Anandan S.K., Webb H.K., Chen D., Wang Y.X., Aavula B.R., Cases S., [1-\(1-Acetyl-piperidin-4-yl\)-3-adamantan-1-yl-urea \(AR9281\) as a Potent, Selective, and Orally Available Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitor with Efficacy in Rodent Models of Hypertension and Dysglycemia](#), *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **21** (3): 983-988 (2011).
- [15] Pecic S., Deng S.X., Morisseau C., Hammock B.D., Landry D.W., [Design, Synthesis and Evaluation of Non-Urea Inhibitors of Soluble Epoxide Hydrolase](#), *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **22** (1): 601-605 (2012).
- [16] Kim I.H., Heirtzler F.R., Morisseau C., Nishi K., Tsai H.J., Hammock B.D., [Optimization of Amide-Based Inhibitors of Soluble Epoxide Hydrolase with Improved Water Solubility](#), *J. Med. Chem.*, **48**(10): 3621-3629 (2005).
- [17] Anandan S.K., Do Z.N., Webb H.K., Patel D.V., Gless R.D., [Non-urea Functionality as the Primary Pharmacophore in Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitors](#), *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**(4): 1066-1070 (2009).
- [18] Anandan S.K., Gless R.D., [Exploration of Secondary and Tertiary Pharmacophores in Unsymmetrical N,N'-diaryl Urea Inhibitors of Soluble Epoxide Hydrolase](#), *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20** (9): 2740-2744 (2010).
- [19] Li HY., Jin Y., Morisseau C., Hammock B. D., Long Y. Q., [The 5-Substituted Piperazine as a Novel Secondary Pharmacophore Greatly Improving the Physical Properties of Urea-Based Inhibitors of Soluble Epoxide Hydrolase](#), *Bioorg. Med. Chem.*, **14** (19): 6586-65892 (2006).
- [20] Rezaee Zavareh E., Hedayati M., Hoghooghi Rad L., Kiani A., Shahhosseini S., Faizi M., Tabatabai S.A., [Design, Synthesis and Biological Evaluation of Some Oxadiazole Derivatives as Novel Amide-Based Inhibitors of Soluble Epoxide Hydrolase](#), *Lett. Drug. Des. Discovery*, **11**(6): 721-730 (2014).

- [21] Rezaee Zavareh E., Hedayati M., Hoghooghi Rad L., Shahhosseini S., Faizi M., Tabatabai S.A., Design, Synthesis and Biological Evaluation of 4-Benzamidobenzoic Acid Hydrazide Derivatives as Novel Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitors, *Iranian J. Pharm. Res.*, **13**(Suppl): 51-59 (2014).
- [22] Rezaee E., Hedayati M., Hoghooghi Rad L., Shahhosseini S., Faizi M., Tabatabai S.A., Novel Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitors with a Dihydropyrimidinone Scaffold: Design, Synthesis and Biological Evaluation, *Med. Chem. Comm.*, **7** (11): 2128-2135 (2016).
- [23] Faizi M., Sheikhha M., Ahangar N., Ghomi HT., Shafaghi B., Shafiee A., Tabatabai S.A., Design, Synthesis and Pharmacological Evaluation of Novel 2-[2-(2-chlorophenoxy) phenyl]-1, 3, 4-Oxadiazole Derivatives as Benzodiazepine Receptor Agonists, *Iranian J. Pharm. Res.*, **11**(1): 83-90 (2012).
- [24] Naimi-Jamal M. R., Mokhtari J., Gorban Dekamin M., Javanshir S., Hamzeali H., Efficient Synthesis and Deprotection of Semicarbazones under Solvent-Free Conditions, *Iran. J. Chem. Chem. Eng. (IJCCE)*, **31**(2): 1-8 (2012).