



УДК 577.152.411*17.042:547.415.1

АМИНООКСИПРОПИЛАМИН — ЭФФЕКТИВНЫЙ ИНГИБИТОР
ОРНИТИНДЕКАРБОКСИЛАЗЫ *IN VITRO* И *IN VIVO*Хомутов Р. М., Денисова Г. Ф., Хомутов А. Р.*,
Белостыцкая К. М., Шлосман Р. Б., Артамонова Е. Ю.*Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва;*** Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва*

При выяснении роли полиаминов в метаболизме клетки одним из основных подходов является использование избирательных ингибиторов ферментов их обмена. Хотя для интенсивно исследуемой орнитиндекарбоксилазы найдены активные обратимые (α -гидразино- δ -аминовалериановая кислота, I_{50} $2 \cdot 10^{-7}$ М [1]) и необратимые (α -дифторметилорнитин [2] и 2,5-диаминогептиц-6 [3]) ингибиторы, проблема регулирования активности орнитиндекарбоксилазы *in vivo* все же не может считаться решенной. На уровне организма эффективность действия ингибитора может зависеть не только от его способности к проникновению в клетки, но и от таких факторов, ограничивающих действие ингибитора, как высокая концентрация субстрата и продукта в органе, повышенная устойчивость фермент-ингибиторного комплекса к деградации по сравнению со свободным ферментом и малое время жизни самого фермента. По-видимому, неблагоприятным сочетанием этих факторов объясняется слабое подавление активности орнитиндекарбоксилазы в печени крысы α -дифторметилорнитинном (63% при дозе 200 мг/кг [4]), который с изолированным ферментом связывается в эквимолекулярных соотношениях [5].

Очевидно, известный набор веществ для избирательного торможения орнитиндекарбоксилазы *in vivo* было бы целесообразно дополнить соединениями, успешно ингибирующими фермент и при этом отличающимися от субстрата и продукта. С этой целью нами получены и исследованы в качестве ингибиторов аминоксисаналоги продукта ферментативной реакции: 1-аминокси-3-аминопропан (I) и его гомолог 1-аминокси-4-аминобутан (II), которые в отличие от путресцина (1,4-диаминобутан) и кадаверина (1,5-диаминопентан) существуют при нейтральных рН в виде монокатионов, а также незаряженные в этих условиях 1,2-диаминооксиэтан (III) и 1,3-диаминооксипропан (IV).

Соединения (I) и (II) получены алкилированием этилового эфира ацетгидроксимовой кислоты 1,3-хлорбромпропаном и 1,4-дибромбутаном соответственно с последующим аминированием и кислотным снятием защиты согласно работе [6]. Аминоксипроизводные (III) и (IV) получены по методу [7]. Не описанный ранее дихлоргидрат (I) имеет т.пл. 203–204°С (со вслепыванием, метанол — этилацетат). Найдено, %: С 22,29; 22,15; Н 7,23; 7,34; N 16,93; 16,94. $C_3H_{10}N_2O \cdot 2HCl$. Вычислено, %: С 22,09; Н 7,42; N 17,18.

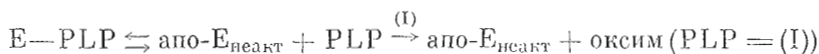
В работе использована орнитиндекарбоксилаза (КФ 4.1.1.17) из печени самцов беспородных мышей, очищенная в 40 раз методом, аналогичным описанному в работе [8], с удельной активностью 1,12 нмоль/мин на 1 мг белка. Активность фермента определяли по освобождению $[^{14}C]O_2$ из $[1-^{14}C]$ орнитина (48 мКи/ммоль, Amersham, Англия) согласно методике [8]. Активность орнитинтрансаминазы (КФ 2.6.1.13) из митохондрий мышей определяли по методу [9]. Активность декарбоксилазы S-аденозилметионина (КФ 1.1.1.50) из *E. coli* определяли, как описано в [10].

Для изучения влияния соединений (I)–(IV) на активность орнитиндекарбоксилазы фермент инкубировали с ингибитором в присутствии $6 \cdot 10^{-5}$ М кофактора фермента пиридоксаль-5'-фосфата (PLP) и затем определяли активность.

В опытах *in vitro* среди синтезированных соединений наиболее активными оказались аминоксианалоги путресцина и кадаверина — (I) и (II), I_{50} $2 \cdot 10^{-8}$ и $2 \cdot 10^{-7}$ М. Ингибирование неконкурентно по отношению к орнитину и не развивается во времени. Активность фермента не восстанавливается при добавлении избытка субстрата, но ингибирование снималось после гель-фильтрации инкубационной смеси на сефадексе G-25 (элюция буфером, содержащим $6 \cdot 10^{-5}$ М PLP). Соединение (I) слабо действует на орнитинтрансминазу и декарбоксилазу S-аденозилметионина (I_{50} 10^{-4} М для обоих ферментов). В отличие от моноаминоксианалогических (I) и (II), не заряженные при нейтральных рН диаминоксианалогические (III) и (IV) не действуют на орнитиндекарбоксилазу даже в концентрации 10^{-6} М.

В опытах *in vivo* мышам однократно вводили внутривенно 16 мг/кг соединения (I) в водном растворе (рН доводили щелочью до 7,0) и спустя 4 ч определяли активность орнитиндекарбоксилазы в печени по методу [8]. Аналогично проводили испытания (I) на индуцированной четыреххлористым углеродом перевиваемой гепатоме G1/135. Активность фермента при этом подавлялась соответственно на 75 и 40%. Таким образом, аминоксианалог путресцина (I) более активен, чем α -дифторметилорнитин.

Высокая активность (I) по отношению к орнитиндекарбоксилазе могла бы объясняться смещением равновесия:



с образованием неактивного апофермента, что, однако, не согласуется с низкой скоростью образования оксимов PLP [11]. Учитывая лабильность связи PLP с апоорнитиндекарбоксилазой (K_m PLP $2,6 \cdot 10^{-7}$ М [12]), можно также допустить катализируемое апоферментом образование оксима PLP с (I), что в условиях эксперимента приводило бы к быстрому связыванию ингибитора избытком PLP и сохранению активности фермента (специально полученный оксим PLP и (I) в присутствии PLP не ингибировал фермент).

Быстрое достижение постоянного уровня торможения связано, по-видимому, с тем, что в активном центре фермента карбонильная группа кофермента активирована посредством образования внутреннего альдими-на (сходство с аспаратаминотрансферазой [13] и отличие от декарбоксилазы S-аденозилметионина [14]). В целом картина торможения орнитиндекарбоксилазы соединением (I) представляется аналогичной ингибированию декарбоксилазы S-аденозилметионина аминоксианалогом продукта [15]. В обоих случаях аналоги при нейтральных рН существуют в виде монокатионов, причем при связывании с ферментом соположительно заряженная NH_2 -группа выполняет якорные функции, а нейтральная аминоксигруппа легко образует оксим холофермента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Inoue H., Kato Y., Takigawa M., Adachi K., Takeda Y. J. Biochem. (Tokyo), 1975, v. 77, № 4, p. 879–893.
2. Metcalf B. W., Berg P., Danzin C., Jung M. J., Casava P., Vevert J. P. J. Amer. Chem. Soc., 1978, v. 100, № 8, p. 2551–2553.
3. Bartholeyns J., Mamont P., Casara P. Cancer Res., 1984, v. 44, № 11, p. 4972–4977.
4. Pösö H., Pegg A. E. Biochim. et biophys. acta, 1982, v. 696, № 2, p. 179–186.
5. Pegg A. E., Seely J. E., Pösö H., Ragione F. D., Zagon I. S. Fed. Proc., 1982, v. 41, № 14, p. 3065–3072.
6. Недоспасов А. А., Хомутов Р. М. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1978, № 10, с. 2397–2399.
7. Bauer L., Suresh K. S. J. Org. Chem., 1963, v. 28, № 6, p. 1604–1608.
8. Денисова Г. Ф., Белостоцкая К. М. Молекулярн. биология, 1984, т. 18, № 3, с. 659–665.

9. Jenkins W. T., Tsai H. In: *Methods in Enzymol.* N. Y.—L.: Acad. Press, 1970, v. 17A, p. 281—285.
10. Pösö H., Sinervirta R., Janne J. *Biochem. J.*, 1975, v. 151, № 1, p. 67—73.
11. Beeler T., Churchich J. E. *J. Biol. Chem.*, 1976, v. 251, № 17, p. 5267—5271.
12. Heller J. S., Canellakis E. S., Bussotti D. L., Coward J. K. *Biochim. et biophys. acta*, 1975, v. 403, № 1, p. 197—207.
13. Braunstein A. E. In: *The Enzymes* (3rd Ed.). N. Y.—L.: Acad. Press, 1973, v. 9B, p. 379—481.
14. Wickner R. B., Tabor C. W., Tabor H. *J. Biol. Chem.*, 1970, v. 245, № 8, p. 2132—2139.
15. Хомутов Р. М., Завалова Л. Л., Сыркин В. И., Артамонова Е. Ю., Хомутов А. Р. *Биооргани. химия*, 1983, т. 9, № 1, с. 130—131.

Поступило в редакцию
17.VI.1985.

AMINOXYPROPYLAMINE AS AN EFFECTIVE INHIBITOR OF ORNITHINE DECARBOXYLASE IN VITRO AND IN VIVO

KHOMUTOV R. M., DENISOVA G. F., KHOMUTOV A. R.*,
BELOSTOTSKAJA K. M., SCHLOSMAN R. B., ARTAMONOVA E. Yu.

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow;
**N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences*
of the USSR, Moscow

Hydroxylamine-containing analogues of putrescine and cadaverine have been found effective in inhibiting the mouse liver ornithine decarboxylase, the best among synthesized were 1-aminoxy-3-aminopropane (I_{50} $2 \cdot 10^{-8}$ M) and 1-aminoxy-4-aminobutane (I_{50} $2 \cdot 10^{-7}$ M). The inhibitory effect of these substances on the mouse liver ornithine-transaminase and S-adenosylmethionine decarboxylase from *E. coli* was displayed at concentrations higher by several orders of magnitude, that demonstrated the specificity of the compounds of this type. 1-Aminoxy-3-aminopropane in experiments in vivo suppressed the ornithine decarboxylase activity in mouse liver at 16 mg/kg by 75%, the toxic effect being insignificant.

Технический редактор Кузьмишкина Е. С.

Сдано в набор 20.08.85 Подписано к печати 03.10.85 Т-49255 Формат бумаги 70×108^{1/16}.
 Высокая печать Усл. печ. л. 12,6 Усл. кр.-отт. 11,5 т.с. Уч.-изд. л. 13,4 Бум. л. 4,5.
 Тираж 898 экз. Зак. 4693

Ордена Трудового Красного Знамени издательство «Наука»,
103717 ГСП, Москва, К-62, Подсосенский пер., 21
2-я типография издательства «Наука», 121099, Москва, Шубинский пер., 6