



ПИСЬМА
РЕДАКТОРУ

УДК 547.238.057

НОВЫЕ АМИНООКСИАНАЛОГИ БИОГЕННЫХ ПОЛИАМИНОВ

© 1996 г. А. Р. Хомутов[#], А. С. Швецов, Й. Вепсалайнен*, Д. Л. Крамер**, Т. Хивонен***, Т. Кейнанен***, Т. О. Элоранта***, К. В. Портер**, Р. М. Хомутов****

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 117071, Москва, Ленинский просп., 33;

* Департамент органической химии Университета Куопио, Финляндия;

** Онкологический центр, Институт Росвелла Парка, Баффало, США;

*** Департамент биохимии и биотехнологии Университета Куопио, Финляндия;

**** Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва

Поступило в редакцию 15.12.95 г.

Предложен ряд структурных аналогов путресцина, спермидина и спермина, в которых аминотетраметиленовый фрагмент заменен на аминоксигруппу. Описывается синтез неизвестного ранее аминоксисаналога спермина. Обсуждаются биохимические аспекты активности аминоксисаналогов полиаминов и избирательного торможения нормальных и лейкозных клеток.

Ключевые слова: спермидин, спермин, O-замещенные гидроксилламины, 11-аминокси-4,9-диаза-1-аминоундекан.

Полиамины – спермин (Spm), спермидин (Spd) и путресцин (Put) – являются необходимыми факторами роста и дифференцировки клеток и рассматриваются как универсальные низкомолекулярные регуляторы клеточного метаболизма, а также как важные элементы архитектуры белков и нуклеиновых кислот [1].

Биосинтез полиаминов начинается с пиридоксаль-5'-фосфат- (PLP) и пируватзависимого декарбокислирования орнитина (Orn) и S-аденозилметионина (Met(Ado)) соответственно. Катализирующие эти реакции Orn- и Met(Ado)-декарбокислазы (КФ 4.1.1.17 и 4.1.1.50) чувствительны к карбонильным реагентам, что явилось основой использования производных O-замещенных гидроксилламинов для конструирования высокоспецифических ингибиторов этих ферментов. 3-Аминоксис-1-аминопропан (АРА) и 5'-дезоксиаденозил-5'

метилтиоэтилгидроксилламин (АМА) избирательно и необратимо тормозили эти ферменты в низких концентрациях [2–6] и оказались ценным инструментом в изучении клеточных функций полиаминов и регулирования их метаболизма [7–13].

Среди различных аналогов и производных полиаминов до сих пор не были известны вещества, в которых сохранялись бы основные структурные элементы и стерические параметры молекулы, но направленно изменялись свойства определенных функциональных групп. В качестве таких соединений мы предлагаем использовать гидроксилламинсодержащие аналоги полиаминов, в которых >N–C-фрагмент заменен на >N–O-группу. В этих изостерных аналогах сохранена пространственная характеристика прототипов, но основность атома азота >N–O-группы значительно снижена (рК ~ 5) по сравнению с аминоксигруппой.

Соединение	X = CH ₂	X = O
$\text{H}_2\text{N}-\text{X}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}_2$	Put	АРА
$\text{H}_2\text{N}-\text{X}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}_2$	Spd	1-Ao-Spd
$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{X}-\text{NH}_2$	Spd	8-Ao-Spd
$\text{H}_2\text{N}-\text{X}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}_2$	Spm	моно-Ao-Spm

АРА, специфический карбонильный реагент для Orn-декарбокислазы, может рассматриваться

и как изостерный аналог Put. АРА – также эффективный конкурентный ингибитор спермидинсинтазы (КФ 2.5.1.16) [14], которая в отличие от Orn-декарбокислазы не имеет карбонильного

[#] Автор для переписки.

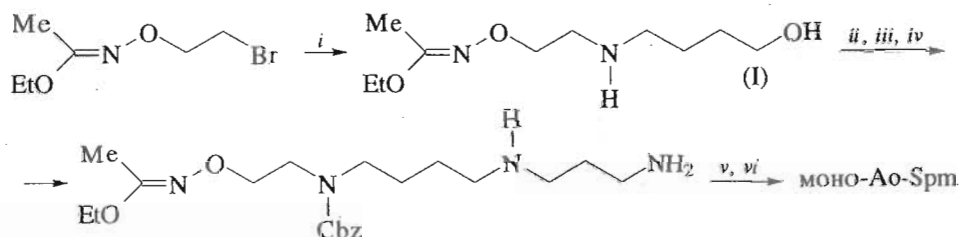
кофактора или простетической группы. Аналогично сходством Put и АРА объяснялось влияние последнего на меланиногенез фитопатогенного гриба *Pyricularia oryzae* [15].

Исследование взаимодействия 1-Ао-Spd и 8-Ао-Spd [16] со сперминсинтазой (КФ 2.5.1.22) показало, что оба аналога являлись конкурентными ингибиторами; активность 8-Ао-Spd была заметно выше, а его сродство к ферменту на порядок превосходило таковое для Spd [17]. И в этом случае ингибирование фермента не связано со свойствами аналогов как карбонильных реагентов.

Представлялось обоснованным распространить данный подход на Spm. В настоящей работе описывается синтез первого из его аминоксиданалогов – 11-аминоксид-4,9-диаза-1-аминоундекана (моно-Ао-Spm) и проводится сравнительный анализ влияния 1-Ао-Spd, 8-Ао-Spd и моно-Ао-Spm на рост культуры клеток почек детеныша хомяка (ВНК) и лейкозных (L1210) клеток.

Монотонность структуры полиаминов значительно осложняет задачу их направленной модификации, которая решается либо превращением

в замещенные амины (имины) соответствующих производных амидов, нитрилов или оснований Шиффа, либо путем алкилирования соответствующим образом построенного фрагмента. Использование последней стратегии синтеза применительно к моно-Ао-Spm означало необходимость введения защищенной аминоксигруппы (этиловый эфир ацетгидроксимовой кислоты) на одной из первых стадий синтеза и последующее наращивание полииминометиленовой цепи. Аминоксидэтилирование избытка 4-аминобутанола 2-(N-1'-этоксидэтилиден)аминоксид-1-бромэтаном [18] приводило к N-замещенному иминоспирту (I), который N-бензилоксикарбонилируют и затем превращают в соответствующий тозилат. Последний обрабатывают избытком триметилендиамина и затем последовательно удаляют бензилоксикарбонил- и этоксидэтилиденные группы, что дает моно-Ао-Spm с общим выходом 17.5%; т. пл. 221–223°C (с разл.); R_f 0.22 (*n*-BuOH – AcOH – Py – H₂O, 4 : 2 : 1 : 2). ЯМР (D₂O): δ_H 4.36 (2H, м, NOCH₂), 3.44 (2H, м, NOCH₂CH₂), 3.20–3.08 (8H, м, CH₂NH₂, CH₂NHCH₂, CH₂NH), 2.10 (2H, м, CH₂CH₂NH₂), 1.84–1.77 (4H, м, CH₂CH₂CH₂CH₂).



i) H₂N(CH₂)₄OH/*i*-PrOH/K₂CO₃/80°C; ii) Cbz-Cl; iii) Tos-Cl; iv) H₂N(CH₂)₃NH₂; v) H₂/Pd; vi) HCl/H₂O

Изучение влияния 1-Ао-Spd, 8-Ао-Spd и моно-Ао-Spm на рост клеток ВНК и L1210 в условиях, описанных ранее [6, 7], показало, что все эти аналоги не цитотоксичны. Исходя из данных ВЭЖХ-анализа внутриклеточного пула полиаминов и экспериментов с [³H]-1-Ао-Spd и [³H]-8-Ао-Spd (неопубликованные данные авторов), можно заключить, что аналоги проникали в клетки, причем транспорт 1-Ао-Spd и 8-Ао-Spd оказался конкурентным по отношению к Put, а моно-Ао-Spm – по отношению к Spd.

Взаимодействие 1-Ао-Spd, 8-Ао-Spd и моно-Ао-Spm с клетками ВНК и L1210 характеризовалось выраженной избирательностью. Все три аналога в концентрации 1 мМ не тормозили рост ВНК-клеток. Напротив, в случае клеток L1210 значения IC₅₀ для 1-Ао-Spd и 8-Ао-Spd составляли 70 и 100 мкМ соответственно. Увеличение длины полииминометиленовой цепи (моно-Ао-Spm) приводило к повышению IC₅₀ до 500 мкМ, что согласовывалось с важной ролью Spd в поддержании роста и жизнеспособности клеток L1210 [8].

Для сравнения уместно привести активности известных ингибиторов биосинтеза полиаминов в отношении клеток L1210. Аналог Spm, N^α,N^ω-(диэтил)-Spm, имеет IC₅₀ 1 мкМ [19], тогда как величины IC₅₀ необратимых ингибиторов декарбоксилазы орнитина, метилового эфира α-(фторметил)дегидроорнитина и 6-гептин-2,5-диамина, составляют 100 и 10 мкМ соответственно [20]. К последнему типу можно отнести и АМА, подавлявший рост клеток L1210 в концентрации 100 мкМ [8].

Это сравнение показывает, что ростингибирующая активность 1-Ао-Spd и 8-Ао-Spd в отношении клеток L1210 сопоставима с активностью известных ингибиторов, однако эти два аналога характеризуются выраженной избирательностью действия в отношении лейкозных клеток.

Не выделяясь своей активностью, моно-Ао-Spm принципиально отличался от других соединений этого ряда, в том числе и от 1-Ао-Spd и 8-Ао-Spd, способностью поддерживать рост ВНК-клеток с истощенным пулом полиаминов и в то же время тормозить рост клеток L1210 с индуцированной

недостаточностью Put и Spd (известное противоопухолевое вещество, DFMO, вызывает истощение пула полиаминов не только в опухолевых, но и в нормальных клетках). Возможным объяснением действия моно-Ао-Spm является его способность превращаться в клетках ВНК в Put и Spd и быть устойчивым к ферментам катаболизма полиаминов клеток L1210. В этом же ряду особенностей находится и высокая устойчивость моно-Ао-Spm к сывороточным полиаминооксидазам по сравнению с 1-Ао-Spd, 8-Ао-Spd и с легкоокисляемым АРА [5].

Таким образом, используемый в данной работе метод направленной модификации биогенных полиаминов позволяет получать проникающие в клетки структурные аналоги полиаминов с заданными свойствами ингибиторов ферментов или их субстратов. Эти соединения способны избирательно тормозить рост лейкозных клеток, обладают низкой цитотоксичностью и регулируемой катаболической устойчивостью.

Настоящая работа получила поддержку грантов ISF МВС 300 (Фонд Сороса) и РФФИ (№ 95-04-12278а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Inhibition of Polyamine Metabolism // Eds. P.P. McCann, A.E. Pegg, A. Sjoerdsma. L.: Acad. Press, 1987.
- Хомутов Р.М., Завалова Л.Л., Сырку В.Л., Артамонова Е.Ю., Хомутов А.Р. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. С. 130–131.
- Weitkamp E.L.C., Dixon H.B.F., Khomutov A.R., Khomutov R.M. // Biochem. J. 1991. V. 277. P. 643–645.
- Хомутов Р.М., Денисова Г.Ф., Хомутов А.Р., Белостоцкая К.М., Шлосман Р.Б., Артамонова Е.Ю. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. С. 1574–1576.
- Hyvonen T., Khomutov A.R., Khomutov R.M., Lapinjoki S., Eloranta T.O. // J. Biochem. (Tokyo). 1990. V. 107. P. 817–820.
- Mett H., Stanek J., Lopez-Ballester J.A., Janne J., Alhonen L., Sinervirta R., Frei J., Regenass U. // Cancer Chemother. Pharmacol. 1993. V. 32. P. 39–45.
- Hyvonen T., Alakuijala L., Andersson L., Khomutov A.R., Khomutov R.M., Eloranta T.O. // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. P. 11138–11144.
- Kramer D.L., Khomutov R.M., Bukin Yu.V., Khomutov A.R., Porter C.W. // Biochem. J. 1989. V. 259. P. 325–331.
- Poulin R., Secrist J.A., III, Pegg A.E. // Biochem. J. 1989. V. 263. P. 215–221.
- Persson L., Khomutov A.R., Khomutov R.M. // Biochem. J. 1989. V. 257. P. 929–931.
- Autelli R., Stjernborg L., Khomutov A.R., Khomutov R.M., Persson L. // Eur. J. Biochem. 1991. V. 196. P. 551–556.
- Kramer D.L., Miller J.T., Bergeron R.J., Khomutov R.M., Khomutov A.R., Porter C.W. // J. Cell Physiol. 1993. V. 155. P. 399–407.
- Hyvonen T., Keinanen T., Khomutov A.R., Khomutov R.M., Eloranta T.O. // Life Sci. 1994. V. 56. P. 349–360.
- Khomutov R.M., Hyvonen T., Karvonen E., Kauppinen L., Paalanen T., Paulin L., Eloranta T.O., Pajula R.-L., Andersson L.C., Poso H. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1985. V. 130. P. 596–602.
- Хомутов А.Р., Джавахия В.Г., Воинова Т.М., Ермолинский Б.С., Хомутов Р.М. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. С. 706–709.
- Хомутов А.Р., Хомутов Р.М. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. С. 698–703.
- Eloranta T.O., Khomutov A.R., Khomutov R.M., Hyvonen T. // J. Biochem. (Tokyo). 1990. V. 108. P. 593–598.
- Хомутов А.Р., Хомутов Р.М. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. С. 1661–1674.
- Pera P.J., Kramer D.L., Sufrin J.R., Porter C.W. // Cancer Res. 1986. V. 46. P. 1148–1154.
- Porter C.W., McManis J., Casero R.A., Bergeron R.J. // Cancer Res. 1987. V. 47. P. 2821–2825.

New Aminooxy Analogs of Biogenic Polyamines

A. R. Khomutov*, A. S. Shvetsov*, J. Vepsalainen**, D. L. Kramer***, T. Hyvonen****, T. Keinanen****, T. O. Eloranta****, C. W. Porter***, and R. M. Khomutov*****

*Bakh Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 33, Moscow, 117071 Russia

**Department of Organic Chemistry, University of Kuopio, Finland

***Roswell Park Institute, Grace Cancer Drug Center, Buffalo, NY, USA

****Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Kuopio, Finland

*****Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, GSP-1, 117984 Russia

Abstract—A series of structural analogs of putrescine, spermidine, and spermine with the aminomethylene fragment substituted by the aminooxy group was suggested. The synthesis of the new aminooxy analogs of spermine was described. Biochemical aspects of the activity of the aminooxy analogs of polyamines were discussed in respect of their selective inhibition of normal and leukemic cells.

Key words: spermidine, spermine, O-substituted hydroxylamines, 11-aminooxy-4,9-diaza-1-aminoundecane.