



УДК 577.122.335:616.155.392

ФОСФИНОВЫЙ АНАЛОГ МЕТИОНИНА ТОРМОЗИТ РОСТ ЛЕЙКОЗНЫХ КЛЕТОК L1210 И ПРЕВРАЩАЕТСЯ В ФОСФИНОВЫЙ АНАЛОГ S-АДЕНОЗИЛМЕТИОНИНА

© 2000 г. Р. М. Хомутов[#], Ю. Н. Жуков, А. Р. Хомутов*,
Е. Н. Хурс, Д. Л. Крамер**, Дж. Т. Миллер**, К. В. Портер**

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 117984, Москва, ул. Вавилова, 32;

* Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва;

** Росвелл парк кансер институт, Баффало, США

Поступило в редакцию 08.02.2000 г. Принято к печати 17.04.2000 г.

Аналог метионина, содержащий фосфиновый фрагмент-Р(О)(ОН)Н вместо карбоксильной группы, тормозит рост лейкозных клеток и превращается внутриклеточно в фосфиновый аналог S-аденозилметионина.

Ключевые слова: 1-амино-3-(метилтио)пропилфосфиновая кислота; 1-амино-3-[метил-(5'-дезоксидезокси-5'-аденозилтио)пропилфосфиновая кислота; ингибиторы клеточного роста; клетки L1210.

Одним из рациональных подходов для воздействия на рост злокачественных клеток является использование различий в метаболизме нормальных и опухолевых клеток, что подтверждается прогрессом в лекарственной терапии ряда форм рака. Реализация такого подхода связана с поиском веществ, действие которых в максимальной степени учитывало бы эти различия, имеющие скорее количественный, чем качественный характер.

В клеточном метаболизме метионин – предшественник S-аденозилметионина [Met(Ado)], значение которого определяется жизненной необходимостью процессов биологического метилирования для роста и функционирования клеток. Кроме того, 1-амино-3-[метил-(5'-дезоксидезокси-5'-аденозилтио)пропан [dcMet(Ado)] служит донором аминопропильных групп в синтезе биогенных полиаминов спермина и спермидина, а S-аденозилгомоцистеин [Hcy(Ado)] является основным естественным ингибитором реакций биометилирования.

Для опухолевых клеток отмечались заметные изменения в обмене метионина, которые сопровождалась аномалиями в процессах биометилирования, что позволяет рассматривать метаболизм метионина как перспективную биохимическую мишень при поиске новых противоопухолевых средств [1].

В настоящее время известно несколько групп веществ, влияющих на обмен метионина и тормозящих рост опухолевых клеток. Ингибиторы

Met(Ado)-синтетазы (КФ 2.5.1.6) – 1-аминоциклопентанкарбоновая кислота и L-цис-2-амино-4-метоксибутен-3-овая кислота (АМК), вызывают уменьшение внутриклеточного содержания Met(Ado) и торможение клеточного роста [2]. Нуклеозидные ингибиторы Hcy(Ado)-гидролазы (КФ 3.3.1.1) вызывают повышение уровня Hcy(Ado), результатом чего является торможение Met(Ado)-зависимых реакций и роста опухолевых клеток [3]. Аналоги Met(Ado) могли бы быть использованы для прямого воздействия на Met(Ado)-зависимые процессы. Однако среди таких аналогов до сих пор не было обнаружено эффективных соединений, что в значительной степени связано с трудностями транспорта подобных веществ через клеточные стенки [4].

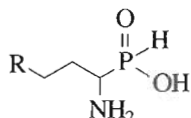
В этом исследовании впервые показывается, что фосфорорганический аналог метионина способен тормозить рост лейкозных клеток и превращаться внутриклеточно в аналог Met(Ado).

Основные инструменты исследования в данной работе – соединения, относящиеся к семейству 1-аминоалкилфосфиновых кислот, в которых Н(ОН)(О)Р-фрагмент имитирует карбоксильную группу аминокислоты и биологическая активность которых определяется их конкуренцией с природными аминокислотами и возможностью превращений в реакциях аминокислотного обмена [5–10].

Было исследовано влияние на рост лейкозных клеток синтезированных нами (+)- и (–)-изомеров 1-амино-3-(метилтио)пропилфосфиновой (I) кислоты, а также 1-амино-3-меркаптопропилфосфиновой (II), 1-амино-3-[(5'-дезоксидезокси-5'-адено-

[#] Автор для переписки (e-mail: khomutov@genome.eimb.relam.ru; факс: (095) 135-14-05).

зил)тио]пропилфосфиновой (III) и 1-амино-3-[метил-(5'-дезоксидезокси-5'-аденозил)тио]пропилфосфиновой (IV) кислот, которые рассматривались как аналоги соответственно метионина, его предшественника гомоцистеина, а также продуктов его превращений Hcy(Ado) и Met(Ado). Кроме того, испытывались полученные нами фосфиновые аналоги 1-метилметионина, S-этилгомоцистеина, метионинсульфоксида, S-метилметионина и 1-аминоциклопентанкарбоновой кислоты, чтобы оценить зависимость действия от строения в этом ряду соединений.



R = SCH₃ (I); SH (II); S-Ado (III); S⁺(CH₃)-Ado (IV)

Было известно, что аналог (I) обладал высокой антибактериальной активностью [11] и ингибировал метионил-tPHK-синтетазу [8]. Аналог (IV) был субстратом tPHK-метилтрансфераз (КФ 2.1.1) и ингибитором декарбоксилазы Met(Ado) (КФ 4.1.1.50), а кислота (III) ингибировала ферментативное метилирование подобно Hcys(Ado) [9].

В литературе нет данных о противоопухолевой активности как соединений (I)–(IV), так и других представителей семейства аминокислотных фосфиновых кислот.

Синтезы фосфиновых аналогов, использованных в этой работе, описаны ранее [12–14]; синтез (–) и (+)-изомеров (I) был осуществлен ферментативным гидролизом (±)-N-фенацетил-(I) аналогично работе [15]. Влияние аналогов на рост клеток L1210 изучали согласно известным методикам [16] на средах с разными концентрациями L-метионина, при различных временах инкубации. Ингибирующая активность аналогов и вещества сравнения АМК характеризовалась концентрацией, вызывающей торможение роста клеток на 50% (ID₅₀).

Как видно из таблицы, фосфиновые аналоги основных соединений метаболизма метионина (I)–(IV) тормозили клеточный рост, тогда как остальные исследованные вещества (см. выше) были практически неактивны, т.е. не действовали в концентрациях 5–6 мМ.

Ингибирующий эффект фосфината (I) зависел от содержания L-метионина в среде, что вместе с активностью только (–)-изомера (I) и пассивностью других исследованных фосфиновых аналогов метионина свидетельствовало о том, что фосфинат (I) действительно являлся аналогом природной аминокислоты.

Активность аналогов (II) и (IV) была сопоставима с таковой для аналога (I) на среде с 100 мкМ L-метионином, но заметно уступала активности фосфината (I) при снижении концентрации ами-

нонгибирование роста клеток L1210 фосфиновыми аналогами аминокислот

Аналог	IC ₅₀ * при концентрации L-метионина в среде, мкМ	
	100	30
(–)-Изомер (I)	2	0.5
(II)	3 (1.5**)	3 (1.5**)
(III)	>3	>3
(IV)	2 (0.25**)	2 (0.25**)
АМК	0.2	0.2

* Минимальная концентрация аналога (мМ), ингибирующая клеточный рост на 50% при инкубации в течение 48 ч.

** В пересчете на активный изомер.

нокислоты в среде. Однако при таком сравнении не учитывалось, что аналоги (II) и (IV) были рацематами [12–14], тогда как в случае фосфината (I) показано, что активной была только (–)-форма. Допуская подобие аналогов (II) и (IV) соответствующим аминокислотам (что для соединения (IV) следовало из работы [9]), можно было ожидать, что и в этих случаях клеточный рост будет ингибироваться только одним изомером, как и для фосфината (I). Соответственно в таблице приведены данные о торможении клеточного роста аналогами (II) и (IV) в пересчете на активные изомеры. Эти данные свидетельствуют об эффективности последнего соединения как ингибитора роста клеток.

Возможность биосинтеза аналога (IV) из фосфината (I) была исследована экспериментально. Параллельно с контролем за ростом клеток (см. выше) определяли влияние аналога (I) на содержание аденозиновых метаболитов [Met(Ado), Hcys(Ado) и dcMet(Ado)] и биогенных полиаминов, а также на активность декарбоксилазы Met(Ado). После инкубации лейкозных клеток с (–)-изомером (I) наблюдались повышение концентрации Met(Ado) и появление среди клеточных аденозиновых метаболитов нового вещества, идентичного по ВЭЖХ заведомому аналогу (IV). При этом не было отмечено образования аналога (III) как стабильного продукта превращений аналога (IV) и существенного изменения уровня спермина и спермидина, а также изменения активности декарбоксилазы Met(Ado). Уместно отметить, что соединение (IV) не было субстратом этого фермента, но являлось конкурентным ингибитором [9].

Таким образом, фосфинат (I) проникал в опухолевые клетки и превращался в аналог (IV). Вызываемое фосфинатом (I) торможение роста клеток могло быть обусловлено конкуренцией с метионином как при транспорте через клеточные

стенки, так и при внутриклеточных превращениях метионина. Механизм действия фосфината (I) может быть связан с торможением синтеза белка на этапе аминокислотирования тРНК, а также и с влиянием аналога (IV), образовавшегося из фосфината (I), на Met(Ado)-зависимые процессы.

Поскольку избирательность действия является одной из важнейших характеристик противоопухолевых цитостатиков, нами было изучено влияние фосфината (I) на рост нормальных клеток ретины и эпителия роговицы глаза, часто используемых для оценки токсичности веществ *in vitro*. При концентрациях до 25 мМ и разных временах инкубации фосфинат (I) практически не влиял на клеточный рост, т.е. был малотоксичен [17]. Избирательность воздействия фосфината (I) на разные виды клеток подтверждалась и тем, что дрожжевые клетки в отличие от лейкозных не были способны превращать фосфинат (I) в аналог (IV) в обычных условиях биосинтеза Met(Ado) [9].

Авторы выражают благодарность Г.Б.Ф. Диксон (департамент биохимии университета Кембридж, Англия) за ценные советы при подготовке рукописи данной работы.

Настоящая работа поддержана грантами NIH/NCI № CA-22153, INTAS № 93-119-ext, РФФИ № 96-15-97699 и № 97-04-48709.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Porter C.W., Sufrin J.R. // *Anticancer. Res.* 1986. V. 6. P. 525–542.
2. Sufrin J.R., Lombardini J.B., Kramer D.L., Alks V., Bernack R.J., Porter C.W. // *Biological Methylation and Drug Design* / Eds Bocharde R.T., Creveling C.R., Ueland P.M. N.Y.: The Humana Press, 1986. P. 373–384.
3. Ueland P.M. // *Pharmacol. Rev.* 1982. T. 34. C. 223–253.
4. Coward J.K. // *Biological Methylation and Drug Design* / Eds Bocharde R.T., Creveling C.R., Ueland P.M. N.Y.: The Humana Press, 1986. P. 724–750.
5. Хурс Е.Н., Осипова Т.И., Хомутов Р.М. // *Биоорганическая химия.* 1989. Т. 15. С. 552–555.
6. Laber K., Amrhein N. // *Biochem J.* 1987. V. 248. P. 351–358.
7. Хомутов Р.М., Хурс Е.Н., Джавахия В.Г., Воинова Т.М., Ермолинский Б.С. // *Биоорганическая химия.* 1987. Т. 13. С. 1422–1424.
8. Viryukov A.I., Osipova T.I., Khomutov R.M. // *FEBS Lett.* 1978. V. 91. P. 246–248.
9. Сырку В.И., Завалова Л.Л., Хомутов Р.М. // *Биоорганическая химия.* 1986. Т. 12. С. 839–841.
10. Хомутов Р.М., Фалеев Н.Г., Белянкин А.В., Хомутов А.Р., Хурс Е.Н., Перышкова О.Е., Беликов В.М. // *Биоорганическая химия.* 1997. Т. 23. С. 919–921.
11. Dingwall J.G. // *Abstr. of the III Internat. Conf. of Chemistry and Biotechnology of Biologically Active Natural Products.* Sofia, Bulgaria, 1986. V. 1. P. 87–103.
12. Хомутов Р.М., Осипова Т.И. // *Изв. АН СССР. Сер. хим.* 1978. № 8. С. 1954.
13. Осипова Т.И., Белянкин А.В., Хомутов А.Р., Жуков Ю.Н., Хурс Е.Н., Хомутов Р.М. // *Изв. РАН. Сер. хим.* 1996. № 11. С. 2729–2732.
14. Жуков Ю.Н., Хомутов А.Р., Осипова Т.И., Хомутов Р.М. // *Изв. РАН. Сер. хим.* 1999. № 7. С. 1360–1363.
15. Solodenko V.A., Belik M.Y., Galushko S.V., Kukhar V.P., Kozlova E.V., Mironenko D.A., Svvedas V.K. // *Tetrahedron: Asymmetry.* 1993. V. 4. P. 1965–1968.
16. Kramer D.L., Porter C.W., Bocharde R.T., Sufrin J.R. // *Cancer Res.* 1990. V. 50. P. 3838–3842.
17. Щипанова А.И., Жуков Ю.Н., Осипова Т.И., Хурс Е.Н., Хомутов Р.М. // Тез. докл. 7 съезд офтальмологов России. 16–20 мая. МЗ РФ, Об-во офтальмологов. М., 2000. С. 168–169.

The Inhibition of the L1210 Cell Growth by a Phosphinic Analogue of Methionine and Its Transformation to the Corresponding S-Adenosylmethionine Analogue

R. M. Khomutov[#], Yu. N. Zhukov*, A. R. Khomutov**, E. N. Khurs*, D. L. Kramer***, J. T. Miller***, and C. W. Porter***

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

**Bakh Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

***Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, NY, United States

A phosphinic analogue of methionine bearing a phosphinic H(OH)(O)P fragment in place of the carboxyl group inhibited the growth of the L1210 cells and was intracellularly transformed to the phosphinic analogue of S-adenosylmethionine.

Key words: 1-amino-3-(methylthio)propylphosphinic acid, 1-amino-3-[methyl(5'-deoxy-5'-adenosyl)thio]propylphosphinic acid, cell growth inhibitors, L1210 cells

[#] To whom correspondence should be addressed; fax: +7 (095) 135-1405; e-mail: khomutov@genome.eimb.relarn.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 9. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.