



УДК 547.415.057

ЭНАНТИОСЕЛЕКТИВНЫЙ СИНТЕЗ (*R*)- И (*S*)-3-МЕТИЛСПЕРМИДИНОВ© 2015 г. М. А. Хомутов[#], Т. А. Кейнанен*, М. Т. Хивонен*, Я. Вейсель*,
Й. Вепсалайнен*, Л. Алхонен*, С. Н. Кочетков, А. Р. ХомутовИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
119991, Москва, ул. Вавилова, 32

*Департамент Фармации, Университет Восточной Финляндии, Куопио, Финляндия

Поступила в редакцию 20.03.2015 г. Принята к печати 06.04.2015 г.

Неизвестные ранее энантиомерно чистые (*R*)- и (*S*)-1,8-диамино-3-метил-4-азанонаны (3-MeSpd's) синтезированы с высокими суммарными выходами и высокой оптической чистотой из коммерчески доступных *R*- и *S*-изомеров *N*-Вос-2-аминопропанола-1. Обсуждаются возможности использования *R*- и *S*-изомеров 3-MeSpd для изучения стереоспецифичности системы транспорта полиаминов в клетки и особенностей дезоксигипузинсинтазной реакции.

Ключевые слова: полиамины, аналоги спермидина, (*R*)-3-MeSpd и (*S*)-3-MeSpd, спермидин/спермин-*N*¹-ацетилтрансфераза, дезоксигипузинсинтаза, клетки DU145.

DOI: 10.7868/S0132342315050061

ВВЕДЕНИЕ

Биогенные полиамины спермин (1,12-диамино-4,8-диазододекан, Spm) и спермидин (1,8-диамино-4-азаоктан, Spd) присутствуют в клетках всех типов в микро- и миллимолярных концентрациях и жизненно необходимы для их нормального роста. Высокое внутриклеточное содержание Spm и Spd определяет множественность и разнообразие их клеточных функций, многие из которых на молекулярном уровне остаются все еще малоизученными, что и обеспечивает поступательное развитие этой области биохимии [1]. Повышенное содержание Spm и Spd в опухолевых клетках [2] и необходимость полиаминов для размножения безлетворных трипаносоматидов [3] формируют прикладную составляющую исследований клеточных функций биогенных полиаминов и поиска новых регуляторов их метаболизма. Правомерность подобного подхода подтверждается противоопухолевой активностью ингибиторов биосинтеза полиаминов [4] и индукторов ферментов катаболизма Spm и Spd [5], а также успешным использованием α -диформетилорнитина (DFMO, Eflornithine[®]), эффективного ингибитора биосинтеза

Spm и Spd, для лечения поздних стадий сонной болезни [6].

Изучение клеточных функций полиаминов на молекулярном уровне осложнено их частичной взаимозаменяемостью и легкостью взаимопревращений Spm и Spd [1]. Одним из решений, хорошо дополняющим существующие подходы, позволяющие дискриминировать клеточные эффекты Spm и Spd (использование мутантных микроорганизмов [7] и трансгенных животных [8]), может быть истощение внутриклеточного пула полиаминов и использование для обращения эффекта функционально активных миметиков Spm и Spd, не способных к взаимопревращениям. Однако соединения, обладающие таким комплексом свойств, до настоящего времени неизвестны.

Среди множества описанных в литературе аналогов Spd его наиболее удачными миметиками, по-видимому, следует считать описанные нами ранее *S*-монометилированные производные [9, 10], включая *R*- и *S*-изомеры 1-метилспермидина (1-MeSpd) [11]. Анализ данных по взаимодействию рацемических *S*-монометилированных аналогов Spd с ферментами метаболизма полиаминов и клетками [9, 10, 12], а также активности в этих системах *R*- и *S*-изомеров 1-MeSpd [13, 14], показал, что необходимой метаболической устойчивостью в комбинации со способностью выполнять функции Spd в клетках может обладать лишь один из стереоизомеров 3-MeSpd. Это предположение основывалось на отсутствии у рацемического 3-MeSpd

Список сокращений: DHS – дезоксигипузинсинтаза, Ms – метансульфонил, Ns – 2-нитрофенилсульфонил, Spd – спермидин, 1-MeSpd (1,8-диамино-5-азанонан), Spm – спермин, 2-MeSpd (1,8-диамино-2-метил-4-азаоктан), 3-MeSpd (1,8-диамино-3-метил-4-азаоктан), SSAT – спермидин/спермин-*N*¹-ацетилтрансфераза.

[#] Автор для переписки (тел.: +7 (499) 135-60-65, e-mail: hommaximus@mail.ru).

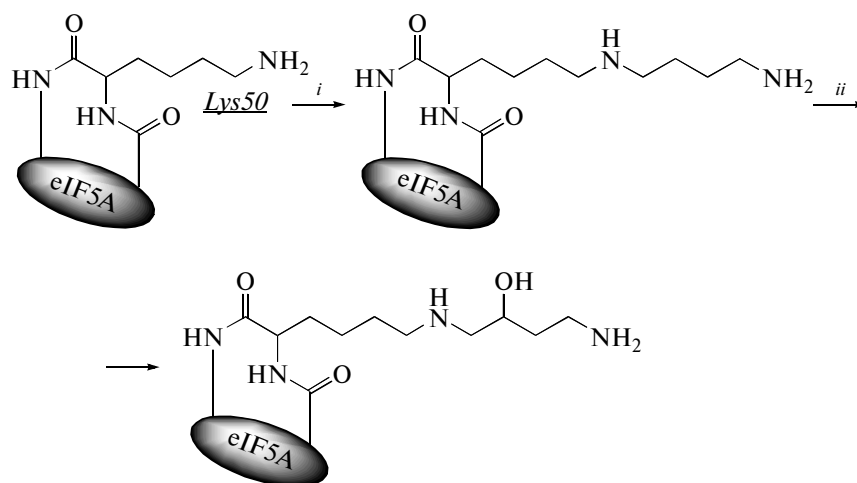


Рис. 1. Гипузинилирование фактора инициации трансляции 5A (eIF5A). *i* – дезоксигипузинсинтаза (DHS); *ii* – дезоксигипузингидроксилаза.

субстратных свойств в спермидин/спермин- N^1 -ацетилтрансферазной реакции [10] (это обстоятельство обеспечивает катаболическую устойчивость аналога), а также и на неспособности 3-MeSpd превращаться в культуре клеток в 1,12-диамино-3-метил-4,9-диазадодекан (3-метилспермин, 3-MeSpm) [9].

Рацемический 3-MeSpd в течение трех суток поддерживает рост клеток с дефицитом полиаминов [9], однако, в противоположность рацемическим 1- и 2-MeSpd, при хроническом дефиците полиаминов (клетки, обработанные дифторметилорнитинном в течение 10 сут и более) не способен к восстановлению их роста [15]. В этих условиях содержание Spd в клетке становится ниже критического, что делает невозможным посттрансляционную модификацию жизненно необходимого фактора инициации трансляции 5A (eIF5A). Ключевая стадия этого превращения катализируется дезоксигипузинсинтазой (DHS), которая осуществляет перенос аминобутильного фрагмента Spd на ϵ -аминогруппу Lys-50 фактора eIF5A [16], а рацемические 1-, 2- и 3-MeSpd's служат донорами аминобутильного фрагмента в реакции DHS [15] (рис. 1).

Рацемический 1-MeSpd поддерживает рост клеток с хроническим дефицитом полиаминов несмотря на то, что предпочтительным субстратом DHS является (*S*)-1-MeSpd [17]. Таким образом, в случае 1-MeSpd система транспорта полиаминов не дискриминирует *R*- и *S*-изомеры 1-MeSpd, и в клетки проникает достаточное количество активного изомера. Поэтому для объяснения неспособности рацемического 3-MeSpd поддерживать рост клеток DU145 с хроническим дефицитом полиаминов приходится предположить, что лишь один из изо-

меров 3-MeSpd служит субстратом DHS, и этот изомер 3-MeSpd или не проникает в клетки, или его транспорт ингибируется другим изомером, который не является донором аминобутильного остатка в дезоксигипузинсинтазной реакции.

Для проверки этих предположений необходимы неизвестные ранее (*R*)- и (*S*)-3-MeSpd's, синтез которых и описывается в настоящей работе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для построения скелета энантиомерно чистых (*R*)- и (*S*)-3-MeSpd's оправданным представляется использование коммерчески доступных хиральных исходных соединений. По-видимому, оптимальными предшественниками являются *R*- и *S*-изомеры *N*-Вос-2-аминопропанола-1, которые с успехом использовались нами ранее для получения (*R*)- и (*S*)-1-MeSpd [11]. *S*- и *R*-изомеры *N*-Вос-2-аминопропанола-1 были превращены по описанной методике [11] в *S*- и *R*-изомеры *N*³-Вос-1,3-диаминобутана, соединения (I) и (II) соответственно (схема).

Бензилоксикарбонилированием свободной аминогруппы соединений (I) и (II) были получены *N*¹-Cbz-*N*³-Вос-1,3-диаминобутаны (III) и (IV), из которых избирательным удалением Вос-группы при помощи HCl/EtOH были приготовлены ключевые интермедиаты – *N*¹-Cbz-1,3-диаминобутаны (V) и (VI). *N*¹-Cbz-Диамины (V) и (VI) служили предшественниками соответствующих нозилатов (VII) и (VIII). Алкилирование последних *N*-(4-йодбутил)фталимидом в DMF и “one-pot”-удаление нозильной защиты с высоким выходом привело к *N*¹-Cbz-*N*⁸-фталоилтриами-

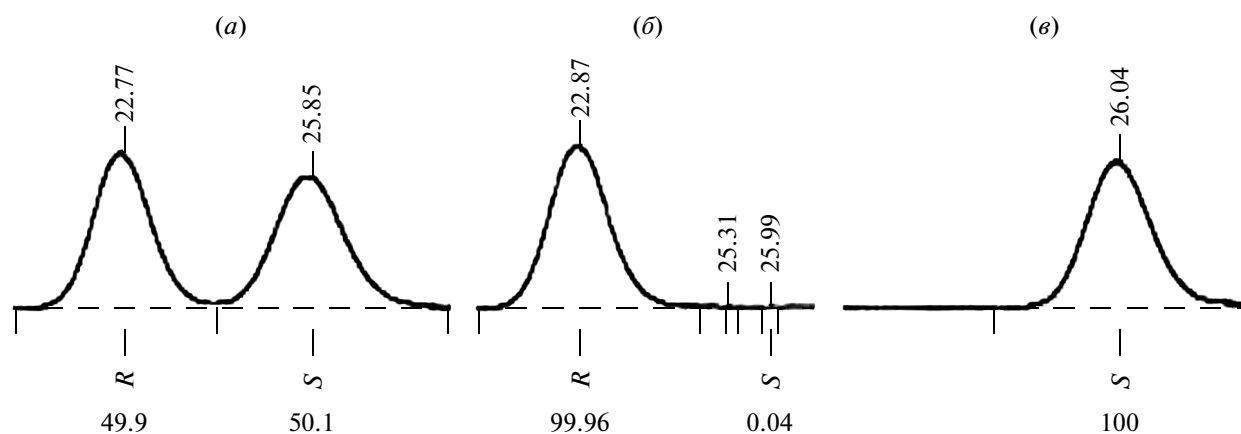


Рис. 2. Разделение трисиланированных *R*- и *S*-изомеров 3-МеSpd. Фрагменты профилей элюции рацемического 3-МеSpd (а), (*R*)-3-МеSpd (б) и (*S*)-3-МеSpd (в) на хиральной ВЭЖХ-колонке Lux-2 (5 мкм 5 × 250 мм, Phenomenex®). Цифры над пиками соответствуют времени выхода веществ (мин), а цифры под ними — площади пиков (в процентах). Условия разделения см. в Экспериментальной части.

нам (IX) и (X), которые были очищены хроматографией на SiO₂. Последовательным удалением фталильной и Cbz-групп гидразинолизом и каталитическим гидрированием над Pd-чернью были

получены целевые *S*- и *R*-изомеры 3-МеSpd (XIII) и (XIV) с суммарными выходами 25 и 30%, считая на исходные изомеры *N*-Boc-2-аминопропанола-1 соответственно.

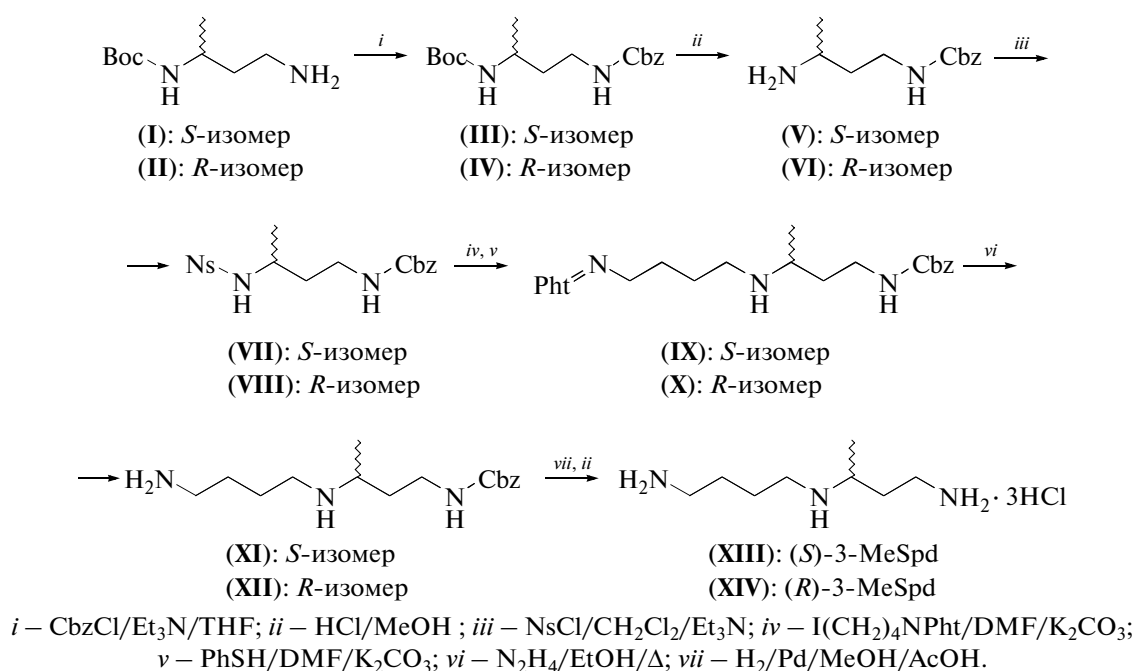


Схема.

Для анализа оптической чистоты синтезированных (*R*)- и (*S*)-3-МеSpd мы разработали метод разделения их трисиланированных производных с помощью ВЭЖХ на хиральной колонке Lux-2 (Phenomenex®), используя для элюции MeOH, содержащий 0.1% диэтиламина. В этих условиях (*R*)- и

(*S*)-3-МеSpd хорошо разделяются (рис. 2), времена удерживания изомеров равны 22.77–22.87 и 25.85–26.04 мин соответственно, а их оптическая чистота составляет более 99.5% (рис. 2).

Биохимические эксперименты (см. работу [18]) подтвердили наши предположения – лишь

R-изомер 3-MeSpd способен поддерживать рост клеток с хроническим дефицитом полиаминов (10 и более суток инкубации с диформетилорнитинином), и лишь этот изомер является субстратом DHS. Кроме того, используя (*R*)- и (*S*)-3-MeSpd's, удалось впервые показать, что система транспорта Spd обладает стереоспецифичностью, а инкубация клеток DU145 с рацемическим 3-MeSpd приводит к накоплению в них неактивного (*S*)-3-MeSpd.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

При выполнении работы были использованы: триэтиламин, хлорангидрид метансульфоокислоты (MsCl) и бензиловый эфир хлороугольной кислоты (CbzCl) – все фирмы “Fluka”; *S*- и *R*-изомеры *N*-Вос-2-аминопропанола-1, хлорангидрид *o*-нитробензолсульфоокислоты (NsCl), тиофенол (PhSH) и *N*¹-(4-бромбутил)фталимид – все фирмы “Aldrich”.

(*R*)- и (*S*)-*N*³-(*трет*-бутилоксикарбонил)-1,3-диаминобутаны были синтезированы согласно работе [11]; *N*-(4-йодбутил)фталимид был получен из соответствующего бромида по реакции Габриеля кипячением с NaI в ацетоне.

Колоночную хроматографию выполняли на силикагеле Kieselgel 40–63 мкм (Merck), системы для элюции указаны в тексте. ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) в системах: диоксан–25% NH₄OH, 8 : 2 (А); диоксан–25% NH₄OH, 9 : 1 (Б); EtOAc–гексан, 2 : 3 (В); CH₂Cl₂–MeOH–25% NH₄OH, 100 : 5.4 : 0.6 (Г); *n*-BuOH–AcOH–пиридин–H₂O, 4 : 2 : 1 : 2 (Д). Вещества на хроматограммах визуализировали по УФ-поглощению, Воспроизводные при помощи бромфенолового синего, а соединения со свободной аминогруппой – используя цветную реакцию с нингидрином.

Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре Bruker Avance 500 DRX (рабочая частота 500.1 МГц для ¹H-ЯМР и 125.8 МГц для ¹³C-ЯМР) в CDCl₃ (если не указано иное), внутренний стандарт – Me₄Si (CDCl₃) и натриевая соль 3-триметилсилилпропансульфоокислоты (D₂O). Химические сдвиги приведены в миллионных долях, а КССВ – в герцах. Температуру плавления определяли в открытом капилляре на приборе Mel-Temp 1202D фирмы Electrothermals. Анализ оптической чистоты синтезированных *R*- и *S*-изомеров 3-MeSpd проводили методом ВЭЖХ на хиральной колонке Lux-2 (Phenomex®). Величину удельного вращения определяли на приборе 341 Polarimeter фирмы Perkin-Elmer, растворители и концентрации растворов указаны в тексте. Элементный анализ выполняли на CHN-анализаторе Carlo Erba 1106.

(*S*)-*N*¹-(Бензилоксикарбонил)-*N*³-(*трет*-бутилоксикарбонил)-1,3-диаминобутан (III). К охлажденному до 8°C раствору 2.4 г (12.8 ммоль) (*S*)-*N*³-(*трет*-бутилоксикарбонил)-1,3-диаминобутана

(I) и 2.6 г (16 ммоль) Et₃N в 35 мл смеси C₆H₆/Et₂O (2 : 1) при перемешивании прибавляли за 30 мин раствор 2.2 г (13 ммоль) CbzCl в 10 мл абс. C₆H₆, перемешивали 1 ч при 8°C и 4 ч при 20°C. Осадок отфильтровывали, фильтрат промывали последовательно H₂O (2 × 5 мл), 10% лимонной кислотой (4 × 4 мл), H₂O (5 мл), 5 М NaCl (2 × 5 мл) и высушивали над MgSO₄. Растворитель отгоняли в вакууме, остаток очищали колоночной хроматографией на SiO₂ (60 г), элюируя смесью CH₂Cl₂–MeOH, 98 : 2. Фракции, содержащие соединение (III), упаривали в вакууме досуха. Получили густое масло, затвердевавшее при высушивании в вакууме (25°C/0.5 мм Hg). После перекристаллизация из гексана получили 3.31 г (81.3%) соединения (III), т.пл. 82.5–83°C, *R*_f 0.72 (А), [α]_D²⁰ +48.9° (с 2.0, CH₂Cl₂). Найдено, %: С 63.41; Н 8.18; N 8.66. C₈H₂₄Cl₃N₃. Вычислено, %: С 63.33; Н 8.13; N 8.69. ¹H-ЯМР: 7.39–7.27 (5 H, м, C₆H₅), 5.57 (1 H, уш.с, NHCbz), 5.12–5.02 (2 H, м, CH₂C₆H₅), 4.34 (1 H, уш.с, CbzNHCH₂), 3.74 (1 H, уш.с, CbzNHCH₂), 3.46–3.41 (1 H, м, NHCH₂CH₂), 3.05–2.98 (1 H, м, NHCH₂CH₂), 1.74–1.68 (1 H, м, CH₃CH), 1.48–1.42 (10 H, м, NHC(CH₃)₃), 1.14 (3 H, д, J 6.5, CH₃). ¹³C-ЯМР: 128.52, 128.13, 128.04, 77.41, 77.30, 77.09, 76.77, 66.54, 43.83, 37.98, 37.86, 37.17, 28.43, 21.64.

(*R*)-*N*¹-(Бензилоксикарбонил)-*N*³-(*трет*-бутилоксикарбонил)-1,3-диаминобутан (IV). Получали аналогично соединению (III), исходя из 1.84 г (9.79 ммоль) соединения (II), 2.02 г (20 ммоль) Et₃N и 1.7 г (10 ммоль) CbzCl, что приводило к 2.71 г (86%) соединения (IV), [α]_D²⁰ –50.4° (с 2.0, CH₂Cl₂). Найдено, %: С 63.37; Н 8.11; N 8.68. C₈H₂₄Cl₃N₃. Вычислено, %: С 63.33; Н 8.13; N 8.69. Хроматографическая подвижность и данные ЯМР-спектроскопии идентичны соединению (III).

(*S*)-*N*¹-(Бензилоксикарбонил)-1,3-диаминобутан (V). К раствору 1.0 г (3.1 ммоль) соединения (III) в 5 мл абс. EtOH прибавляли 2 мл 6.7 М HCl/EtOH и через 3 ч при 20°C реакционную смесь упаривали в вакууме досуха. Остаток растворяли в 10 мл абс. EtOH, выливали в 40 мл абс. Et₂O и оставляли на ночь при –20°C. Выделившееся масло отделяли, промывали декантацией абс. Et₂O (10 мл) и к остатку прибавляли 4 мл 2 М NaOH и 6 мл CH₂Cl₂. Органическую фазу отделяли, а водную фазу экстрагировали CH₂Cl₂ (4 × 4 мл). Объединенные CH₂Cl₂-вытяжки промывали H₂O (2 мл), 5 М NaCl (3 × 5 мл) и высушивали над K₂CO₃. Растворитель отгоняли в вакууме, остаток высушивали в вакууме над P₂O₅ и получали 0.515 г (75%) соединения (V) в виде густого масла, *R*_f 0.44 (Б), ¹H-ЯМР: 7.35–7.26 (5 H, м, C₆H₅), 5.48 (1 H, уш. с, NHCbz), 5.09 (2 H, с, CH₂C₆H₅), 3.4–3.2 (2 H, м, CbzNHCH₂),

3.01–2.92 (1 Н, м, CH_3CH), 1.62–1.55 (1 Н, м, NHCH_2CH_2), 1.47–1.38 (1 Н, м, NHCH_2CH_2), 1.25–1.22 (2 Н, м, NH_2), 1.20 (3 Н, д, J 6.5, CH_3). ^{13}C -ЯМР: 156.55, 136.85, 128.55, 128.09, 77.40, 77.09, 76.77, 66.60, 45.56, 39.18, 29.75, 24.90.

(R)-N¹-(Бензилоксикарбонил)-1,3-диаминобутан (VI). Получали аналогично соединению (V), исходя из 1.17 г (3.63 ммоль) соединения (IV) и 2.5 мл 6.7 М HCl/EtOH в 5 мл абс. EtOH что приводило к 0.6 г (75%) соединения (VI) в виде густого масла. Хроматографическая подвижность и данные ЯМР-спектроскопии идентичны данным для соединения (V).

(S)-N¹-(Бензилоксикарбонил)-N³-(2-нитрофенилсульфонил)-1,3-диаминобутан (VII). К охлажденному до 4°C раствору 0.515 г (2.32 ммоль) соединения (V) и 0.36 мл (8.8 ммоль) Et_3N в 4.5 мл абс. CH_2Cl_2 прибавляли при перемешивании в течение 10 мин раствор 0.525 г (2.37 ммоль) NsCl в 2.5 мл абс. CH_2Cl_2 , перемешивали 1 ч при 4°C и еще 3 ч при 20°C. Осадок отфильтровывали, фильтрат разбавляли 10 мл CH_2Cl_2 и последовательно промывали H_2O (2 × 5 мл), 10% лимонной кислотой (4 × 4 мл), H_2O (5 мл), 5 М NaCl (2 × 5 мл) и высушивали над MgSO_4 . Растворитель отгоняли в вакууме, остаток высушивали в вакууме над P_2O_5 и получали 0.93 г (98.5%) соединения (VII), в виде полузакристаллизовавшегося масла, R_f 0.22 (B). ^1H -ЯМР: 8.22–8.05 (1 Н, м, $\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2$), 7.84–7.83 (1 Н, м, $\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2$), 7.73–7.69 (2 Н, м, $\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2$), 7.36–7.31 (5 Н, м, C_6H_5), 5.09 (2 Н, с, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 3.59–3.52 (1 Н, м, NHCbz), 3.44–3.36 (1 Н, м, NHCH_2CH_2), 3.26–3.18 (1 Н, м, NHCH_2CH_2), 1.78–1.77 (1 Н, уш.с., NHNs), 1.58–1.51 (2 Н, м, NHCH_2CH_2), 1.26–1.24 (1 Н, м, CH_3CH), 1.04 (3 Н, д, J 6.5, CH_3). ^{13}C -ЯМР: 156.53, 147.96, 136.71, 133.65, 133.00, 130.78, 128.60, 128.18, 125.52, 77.41, 77.10, 76.77, 66.74, 48.76, 37.64, 37.15, 21.67.

(R)-N¹-(Бензилоксикарбонил)-N³-(2-нитрофенилсульфонил)-1,3-диаминобутан (VIII). Получали аналогично соединению (VII), исходя из 0.6 г (2.7 ммоль) соединения (IV), 0.41 мл (3.01 ммоль) Et_3N и 0.61 г (2.75 ммоль) NsCl , что приводило к 1.07 г (97.4%) соединения (VIII) в виде густого масла. Хроматографическая подвижность и данные ЯМР-спектроскопии идентичны данным для соединения (VII).

(S)-N¹-(Бензилоксикарбонил)-N⁸-(фталойл)-3-метил-1,8-диамино-4-азаоктан (IX). К раствору 0.92 г (2.26 ммоль) соединения (VII) в 7.5 мл абс. DMF прибавляли 1.09 г (3.31 ммоль) N -(4-йодбутил)фталимида, 1.2 г (7.23 ммоль) безв. K_2CO_3 и перемешивали 12 ч при 40°C. Затем к реакционной смеси прибавляли 0.6 г (3.6 ммоль) безв. K_2CO_3 , 0.73 мл (7.2 ммоль) PhSH и перемешивали

еще 16 ч при 20°C. Осадок отделяли центрифугированием, промывали DMF (2 × 5 мл), растворитель отгоняли в вакууме, к остатку прибавляли 10 мл H_2O , экстрагировали EtOAc (3 × 15 мл), объединенные органические вытяжки промывали 5 М NaCl (10 мл) и высушивали над MgSO_4 . Растворитель отгоняли в вакууме, остаток очищали колоночной хроматографией на SiO_2 (50 г), элюируя смесью CH_2Cl_2 – MeOH –25% NH_4OH , 100 : 1.8 : 0.2, что после высушивания в вакууме над $\text{P}_2\text{O}_5/\text{KOH}$ приводило к получению 0.78 г (81.2%) соединения (IX) в виде густого масла, R_f 0.23 (Г). ^1H -ЯМР: 7.9–7.75 + 7.68–7.65 (4 Н, м, C_6H_4), 7.34–7.26 (5 Н, м, C_6H_5), 5.91 (1 Н, уш.с, NHCbz), 5.06 (2 Н, с, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 3.68–3.66 (2 Н, т, CH_2NHCbz), 3.33–3.23 (2 Н, м, CHNHCH_2), 2.75–2.66 (2 Н, м, CH_2NPhT), 2.58–2.52 (1 Н, м, CHNHCH_2), 1.76–1.69 (2 Н, м, CH_2CHNH), 1.63–1.45 (5 Н, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NPhT}$ + CH_3CH), 1.07 (3 Н, д, J 6.5, CH_3). ^{13}C -ЯМР: 168.77, 156.79, 137.25, 134.21, 132.48, 128.78, 128.31, 128.26, 123.51, 77.67, 77.36, 77.03, 66.69, 52.39, 46.69, 39.19, 38.06, 36.10, 27.87, 26.69, 20.70.

(R)-N¹-(Бензилоксикарбонил)-N⁸-(фталойл)-3-метил-1,8-диамино-4-азаоктан (X). Получали аналогично соединению (IX), исходя из 1.05 г (2.58 ммоль) соединения (VIII) и 1.26 г (3.83 ммоль) N -(4-йодбутил)фталимида, что после удаления нозильной защиты приводило к 0.963 г (87.8%) соединения (X) в виде густого масла. Хроматографическая подвижность и данные ЯМР-спектроскопии идентичны данным для соединения (IX).

(S)-N¹-(Бензилоксикарбонил)-3-метил-1,8-диамино-4-азаоктан (XI). К раствору 0.78 г (1.84 ммоль) соединения (IX) в 10 мл абс. EtOH прибавляли 2.5 мл 1 М $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ и кипятили при перемешивании 2 ч. Реакционную смесь упаривали в вакууме досуха, к остатку прибавляли 10 мл теплого 25% NH_4OH и 5 мл теплого CHCl_3 , органический слой отделяли, а водный экстрагировали горячим CHCl_3 (4 × 4 мл). Объединенные органические вытяжки промывали 5 М NaCl (7 мл) и высушивали над K_2CO_3 . Растворитель отгоняли в вакууме, остаток очищали колоночной хроматографией на SiO_2 (22 г), элюируя последовательно смесью диоксан–25% NH_4OH , 97 : 3 и диоксан–25% NH_4OH , 95 : 5, что после высушивания в вакууме над $\text{P}_2\text{O}_5/\text{KOH}$ приводило к 0.44 г (81.6%) соединения (XI), в виде густого масла, R_f 0.23 (Б). ^1H -ЯМР: 7.34–7.25 (5 Н, м, C_6H_5), 6.06 (1 Н, уш.с, NHCbz), 5.07 (2 Н, с, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 3.34–3.22 (2 Н, м, CH_2NHCbz), 2.81–2.72 + 2.53–2.47 (1 Н + 1 Н, м, $\text{CbzNHCH}_2\text{CH}_2$), 2.69–2.65 (1 Н + 2 Н, CH_3CH + CHNHCH_2), 1.61–1.50 (5 Н, м, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.29–1.24 (4 Н, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 1.07 (3 Н, д, J 6.5, CH_3). ^{13}C -ЯМР: 156.80, 128.80, 128.33,

120.91, 77.67, 77.36, 77.04, 66.74, 52.59, 47.18, 42.42, 39.31, 35.94, 31.95, 28.11, 20.68.

(R)-N¹-(Бензилоксикарбонил)-3-метил-1,8-диамино-4-азаоктан (XII). Получали аналогично соединению (XI), исходя из 0.956 г (2.25 ммоль) соединения (X) и 2.8 мл 1 М раствора N₂H₄ · H₂O/EtOH, что приводило к 0.606 г (92%) соединения (XII) в виде густого масла. Хроматографическая подвижность и данные ЯМР-спектроскопии идентичны данным для соединения (XI).

Тригидрохлорид (S)-1,8-диамино-3-метил-4-азаоктана (XIII). К раствору 0.44 г (1.5 ммоль) соединения (XI) в 8 мл смеси AcOH–MeOH, 1 : 1 прибавляли ~0.2 мл суспензии Pd-черни в MeOH и гидрировали при атмосферном давлении до прекращения выделения CO₂. Pd-чернь отфильтровывали, промывали MeOH, объединенные фильтраты упаривали в вакууме досуха. Остаток растворяли в EtOH, прибавляли 2 мл 5.0 М HCl, упаривали в вакууме досуха и остаток перекристаллизовывали из смеси MeOH–EtOH, что после высушивания в вакууме над P₂O₅/KOH приводило к 0.34 г (84%) соединения (XIII), т.пл. 231–232°C; [α]_D²⁰ +4.1° (с 5.0, H₂O); ee > 99.5%; R_f 0.24 (Д). ¹H-ЯМР (D₂O): 3.48–3.41 (1 H, м, CH(CH₃)); 3.20–3.03 (6 H, м, H₂NCH₂(CH₂)₂CH₂NH + NH₂CH₂); 2.24–2.17 (1 H, м, CHCH₂); 2.00–1.91 (2 H, м, CHCH₂); 1.83–1.74 (4 H, м, C-CH₂CH₂-C); 1.37 (3 H, д, J 6.7, CH(CH₃)). ¹³C-ЯМР (D₂O): 54.88, 47.10, 41.68, 38.75, 33.07, 26.84, 25.83, 17.96. Найдено, %: C 35.71; H 8.95; N 15.64. C₈H₂₄Cl₃N₃. Вычислено, %: C 35.76; H 9.00; N 15.64.

Тригидрохлорид (R)-1,8-диамино-3-метил-4-азаоктана (XIV). Получали аналогично соединению (XIII), исходя из 0.6 г (2.05 ммоль) соединения (XI), что приводило к получению 0.44 г (79.5%) соединения (XIV); [α]_D²⁰ –4.1° (с 3.0, H₂O); ee > 99.5%. Найдено, %: C 35.70; H 8.93; N 15.66. C₈H₂₄Cl₃N₃. Вычислено, %: C 35.76; H 9.00; N 15.64. Остальные физико-химические характеристики идентичны соединению (XIII).

Определение оптической чистоты (R)- и (S)-3-MeSpd. Рацемический 3-MeSpd и его R- и S-изомеры были превращены в соответствующие трисдансильные производные согласно работе [19]. ВЭЖХ полученных трисдансильных производных на хиральной колонке Lux-2 (5 мкм, 5 × 250 мм, Phenomenex®), элюция MeOH, содержащим 0.1% диэтиламина (0.6 мл/мин), позволяет количественно разделить R- и S-изомеры 3-MeSpd. Времена выхода составляют 22.77–22.87 мин и 25.85–26.04 мин, для R- и S-изомеров соответственно (рис. 2).

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант 13-04-40307-Н), Академии Финляндии (грант 266196), программы президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”, а также гранта “Стратегическое финансирование” Университета Восточной Финляндии, г. Куопио.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Casero R.A., Marton L.J. // Nat. Rev. Drug Discov. 2007. V. 6. P. 373–390.
2. Wallace H.M. // Expert. Opin. Pharmacother. 2007. V. 8. P. 2109–2116.
3. Heby O., Persson L., Rentala M. // Amino Acids. 2007. V. 33. P. 359–366.
4. Seiler N. // Curr. Drug Targets. 2003. V. 4. P. 537–564.
5. Casero R.A., Woster P.M. // J. Med. Chem. 2009. V. 52. P. 4551–4573.
6. Burri C.C., Brun R. // Parasitol. Res. 2003. V. 90. P. 49–52.
7. Chattopadhyay M.K., Tabor C.W., Tabor H. // J. Bacteriol. 2009. V. 191. P. 5549–5552.
8. Janne J., Alhonen L., Pietila M., Keinänen T.A. // Eur. J. Biochem. 2004. V. 271. P. 877–894.
9. Hyvönen M.T., Keinänen T.A., Khomutov M., Simonian A., Weisell J., Kochetkov S.N., Vepsäläinen J., Alhonen L., Khomutov A.R. // J. Med. Chem. 2011. V. 54. P. 4611–4618.
10. Хомутов М.А., Хивонен М.Т., Симонян А.Р., Вепсалайнен Й., Алхонен Л., Кочетков С.Н., Кейнанен Т.А. // Биоорган. химия. 2011. Т. 37. С. 253–258. [Khomutov M.A., Hyvönen M.T., Simonian A.R., Vepsäläinen J., Alhonen L., Kochetkov S.N., Keinänen T.A. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2011. V. 37. P. 225–230.]
11. Grigorenko N.A., Khomutov A.R., Keinänen T.A., Järvinen A., Alhonen L., Jänne J., Vepsäläinen J. // Tetrahedron. 2007. V. 63. P. 2257–2262.
12. Дайдх С., Хомутов М.А., Симонян А.Р., Кочетков С.Н., Мадхубала Р. // Молекулярная биология. 2011. Т. 45. С. 673–678.
13. Keinänen T.A., Hyvönen M.T., Alhonen L., Vepsäläinen J., Khomutov A.R. // Amino Acids. 2014. V. 46. P. 605–620.
14. Hyvönen M.T., Howard M.T., Anderson C.B., Grigorenko N., Khomutov A.R., Vepsäläinen J., Alhonen L., Jänne J., Keinänen T.A. // Biochem. J. 2009. V. 422. P. 321–328.
15. Hyvönen M.T., Keinänen T.A., Khomutov M., Simonian A., Vepsäläinen J., Park J.H., Khomutov A.R., Alhonen L., Park M.H. // Amino Acids. 2012. V. 42. P. 685–695.
16. Park M.H., Wolff E.C., Lee Y.B., Folk J.E. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 27827–27832.
17. Hyvönen M.T., Keinänen T.A., Cerrada-Gimenez M., Sinervirta R., Grigorenko N., Khomutov A.R., Vepsäläinen J., Alhonen L., Jänne J. // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. P. 34700–34706.
18. Hyvönen M.T., Khomutov M., Petit M., Weisell J., Kochetkov S.N., Alhonen L., Vepsäläinen J., Khomutov A.R., Keinänen T.A. // Chem. Biol. 2015. (in press).
19. Kabra P.M., Lee H.K. // J. Chromatogr. 1986. V. 380. P. 19–32.

Enantioselective Synthesis of (*R*)- and (*S*)-3-Methylspermidines

M. A. Khomutov^{*, #}, T. A. Keinanen^{*, **}, M. T. Hyvonen^{*, **}, J. Weisell^{*, **},
J. Vepsalainen^{*, **}, L. Alhonen^{*, **}, S. N. Kochetkov^{*}, A. R. Khomutov^{*}

[#]Phone: +7 (499) 135-6065; e-mail: hommaximus@mail.ru

^{*}Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilov 32, Moscow, 119991 Russia

^{**}School of Pharmacy, University of Eastern Finland, Kuopio, Finland

Earlier unknown enantiomerically pure (*R*)- and (*S*)-1,8-diamino-3-methyl-4-azaoctane's (3-MeSpd's) were synthesized with high overall yields and optical purity starting from commercially available *R*- and *S*-isomers of *N*-Boc-2-aminopropanol-1. Application of *R*- and *S*-isomers of 3-MeSpd for the investigation of the stereospecificity of spermidine transporter and peculiarities of deoxyhypusine synthase reaction are discussed.

Keywords: polyamines, spermidine analogues, (*R*)-3-MeSpd and (*S*)-3-MeSpd, spermidine/spermine-*N*¹-acetyltransferase, deoxyhypusine synthase, DU145 cells