



УДК 547.415.057

НОВЫЙ СИНТЕЗ α -МЕТИЛСПЕРМИДИНА

© 2004 г. Н. А. Григоренко*, Й. Вепсалайнен**, А. Ярвинен***,
Т. А. Кейнанен***, Л. Алхонен***, Ю. Янне***,
А. М. Крицын*, А. Р. Хомутов*#

* Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
119991, Москва, ГСП-1, ул. Вавилова, 32;

** Департамент химии, Университет г. Куопио, Куопио, Финляндия;

*** Центр наук о молекулах им. А.И. Виртанена, Куопио, Финляндия

Поступила в редакцию 14.07.2003 г. Принята к печати 15.02.2004 г.

Исходя из этилового эфира β -аминоасляной кислоты осуществлен с высоким выходом пятистадийный синтез α -метилспермидина – первого аналога полиаминов, способного предотвращать патологические последствия истощения внутриклеточного пула спермидина в трансгенных крысах, суперпродуцирующих спермин/спермидин- N^1 -ацетилтрансферазу.

Ключевые слова: полиамины, α -метилспермидин, спермин/спермидин- N^1 -ацетилтрансфераза.

ВВЕДЕНИЕ

Биогенные полиамины спермин, спермидин и их предшественник путресцин присутствуют в значительных количествах в животных клетках всех типов и являются необходимым фактором нормального клеточного роста и дифференцировки. Разнообразие и жизненная важность клеточных функций полиаминов позволяют рассматривать их как универсальные низкомолекулярные регуляторы клеточного метаболизма. По сравнению с нормальными опухолевые клетки имеют повышенный уровень полиаминов, а его понижение приводит к замедлению роста и гибели этих клеток [1].

Метаболизм полиаминов тесно связан с превращениями орнитина и метионина и включает в себя несколько ферментов (схема 1), ключевыми из которых на путях биосинтеза являются декарбоксилазы орнитина и S -аденозилметионина, а на путях катаболизма – спермин/спермидин- N^1 -ацетилтрансфераза (SSAT). Биосинтез и деградация этих трех короткоживущих ферментов легко индуцируются в ответ на изменения внутриклеточной концентрации полиаминов [1].

Известны две основные стратегии истощения внутриклеточного пула полиаминов. Первый под-

ход основан на ингибировании орнитин и S -аденозилметионин декарбоксилаз (см. обзоры [2, 3]). В этом случае рост клеток восстанавливается после добавления в среду спермидина (Spd) или спермина (Spm), что подтверждает специфичность действия ингибиторов. Однако существенно более эффективен второй подход, заключающийся в активации клеточного катаболизма полиаминов. Для этой цели был синтезирован набор бисалкилированных по концевым аминогруппам производных спермина, которые активно переносятся в клетки системой транспорта полиаминов и индуцируют биосинтез SSAT, что приводит к истощению пула Spd/Spm и торможению клеточного роста (см. обзоры [4, 5]). Были получены клеточные линии, суперэкспрессирующие SSAT, а также SSAT-трансгенные животные [6–8]. Однако оказалось, что в случае супериндукции SSAT экзогенные полиамины не способны восстанавливать рост клеток из-за высокой скорости внутриклеточного катаболизма полиаминов.

Вместе с тем, для дискриминации полиаминзависимых метаболических нарушений и нарушений, прямо не связанных с истощением пула полиаминов, но являющихся следствием активации их катаболизма, необходимы метаболически устойчивые соединения полиаминной природы, способные выполнять основные клеточные функции полиаминов и восстанавливать рост и жизнеспособность клеток с супериндуцированной SSAT. Значение подобных веществ велико еще и потому, что регуляция биохимических процессов подразумевает не только возможности вызывать необходимый ответ клетки или организма, но и наличие способов обращать эффект, в том числе и

Сокращения: Met(Ado) – S -аденозилметионин; α MeSpd – α -метилспермидин (1,8-диамино-5-азанонан); Orn – орнитин; PAO – полиаминооксидаза; Put – путресцин (1,4-диаминобутан); Spd – спермидин (1,8-диамино-5-азаоктан); Spm – спермин (1,12-диамино-4,9-диазадодекан); SSAT – спермин/спермидин- N^1 -ацетилтрансфераза.

Автор для переписки (тел.: (095) 135-6065; эл. почта: alexkhom@genome.eimb.relam.ru; факс: (095) 135-1405).

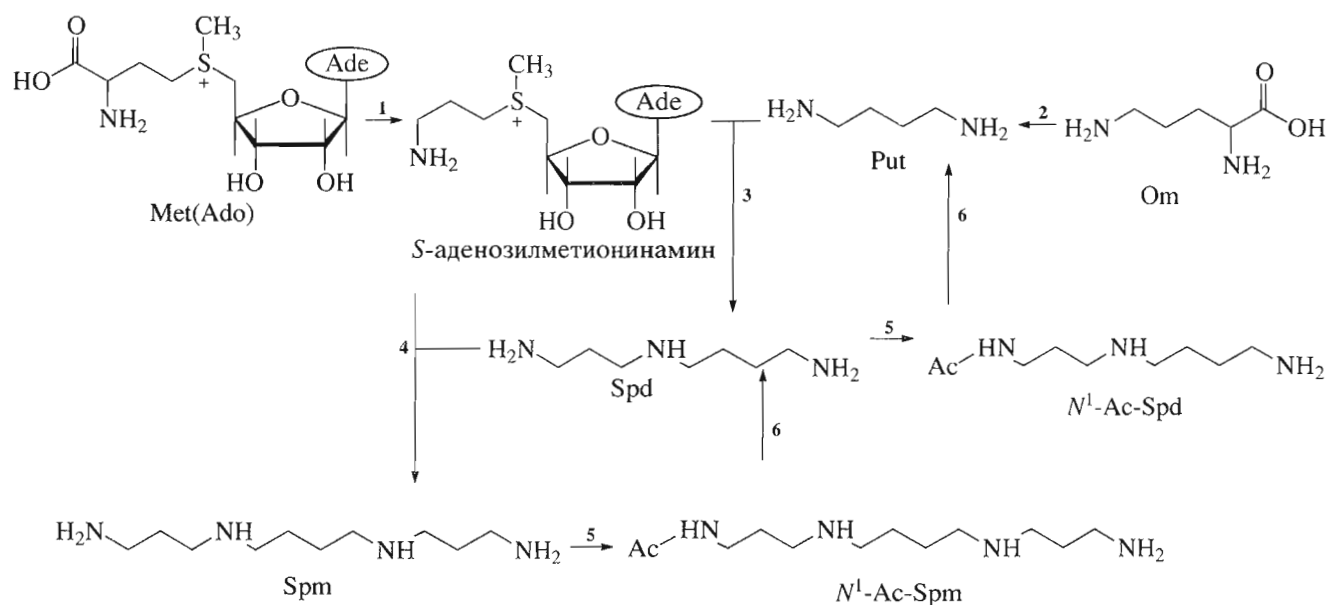


Схема 1. Метаболизм полиаминов [1]. 1 – Met(Ado)-декарбоксилаза (КФ 4.1.1.50); 2 – Orn-декарбоксилаза (КФ 4.1.1.17); 3 – Spd-синтаза (КФ 2.5.1.16); 4 – Spm-синтаза (КФ 2.5.1.22); 5 – SSAT (КФ 2.3.1.57); 6 – PAO (КФ 1.5.3.11).

с помощью химических соединений. Это позволяет оценить избирательность исходного воздействия и свидетельствует об адекватности наших представлений о том или ином биохимическом процессе. Однако в литературе не описаны аналоги полиаминов, способные поддерживать рост и жизнеспособность клеток на фоне супериндукции SSAT.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Инкубация животных клеток с α,α -дифторметилорнитинном, который является необратимым ингибитором декарбоксилазы Orn – ключевого фермента биосинтеза полиаминов, приводит к истощению внутриклеточного пула Put/Spd и торможению роста клеток. При этом добавление в культуральную среду спермидина полностью восстанавливает рост клеток. В случае клеток L1210 и HT29, обработанных α,α -дифторметилорнитинном, было показано, что подобным свойством обладает также α MeSpd (1,8-диамино-5-азанонан) [9].

Напротив, активация катаболизма полиаминов посредством супериндукции SSAT приводит к истощению внутриклеточного пула не Put/Spd, а Spm/Spd и торможению роста клеток. В этом случае добавление в среду спермидина или спермина не приводит к восстановлению роста и жизнеспособности клеток из-за высокой скорости деградации полиаминов. До настоящего времени не было известно ни одного аналога полиаминов, способного восстанавливать рост клеток с супериндуцированной SSAT и возможность использования для

этих целей α MeSpd, тем более в экспериментах *in vivo*, априори представлялась не вполне очевидной.

Недавно на примере SSAT-трансгенных крыс мы показали, что α MeSpd способен предотвращать развитие острого панкреатита, вызванного истощением пула полиаминов в результате супериндукции SSAT, а также стимулировать раннюю регенерацию печени после частичной гепатэктомии [10].

Единственный описанный в литературе метод получения α MeSpd представляет собой восьми-стадийный процесс, а целевой α MeSpd получен в количестве нескольких десятков миллиграммов с суммарным выходом 6% [9]. Отмеченные авторами работы [9] проблемы с растворимостью ключевых промежуточных соединений, а также трудоемкие процедуры выделения и очистки продуктов на последних стадиях делают масштабирование этого синтеза вряд ли целесообразным.

В настоящей работе мы описываем простой пятистадийный синтез α MeSpd (IV), позволяющий получать аналог с суммарным выходом 46%, считая на исходный этиловый эфир β -аминомасляной кислоты (схема 2), в количествах, необходимых для проведения экспериментов с лабораторными животными.

В последнее время для образования C–N-связи в полиаминах в основном используется алкилирование сульфамидов, реже – избытка незащищенного амина, соответствующим алкилгалогенидом (см. обзор [11]). По сравнению с аминоктилгалогенидами аминоспирты или их предшественники, как правило, более доступны, а алкил(арил)сульфо-

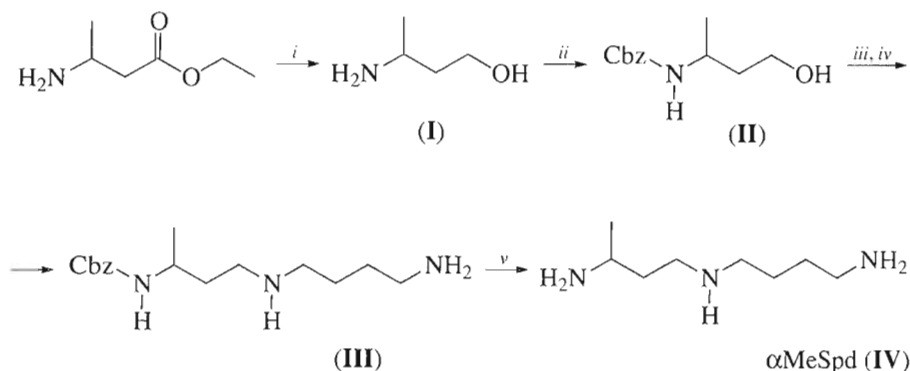


Схема 2. *i* – $\text{LiAlH}_4/\text{THF}/\Delta$; *ii* – $\text{Cbz-Cl}/\text{H}_2\text{O}/\text{NaHCO}_3$; *iii* – $\text{Ms-Cl}/\text{Et}_3\text{N}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$; *iv* – $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2/\text{THF}$; *v* – H_2/Pd .

наты соответствующих *N*-защищенных аминспиртов являются эффективными алкилирующими агентами. Ранее алкилирование избытка триметилендиамина тозилатом 7-этоксиэтилиденаминоокси-4-(*N*-бензилоксикарбонил)-4-азагептанола-1 было успешно использовано нами в синтезе 11-аминоокси-4,9-диаза-1-аминоундекана [12].

Основной интермедиат в синтезе αMeSpd (IV) – *N*-Cbz-3-аминобутанол (II), был приготовлен восстановлением коммерчески доступного этилового эфира β -аминомасляной кислоты действием LiAlH_4 в THF и последующим *N*-карбобензоксилированием полученного 3-аминобутанола (I). Для алкилирования 1,4-диаминобутана, являющегося ключевой стадией синтеза αMeSpd , нами был применен метансульфонат *N*-Cbz-3-аминобутанола (II), который использовался далее без дополнительной очистки. Алкилирование 1,4-диаминобутана проводили при 0°C , что уменьшало количество побочных продуктов, трудно отделяемых от *N*-Cbz- αMeSpd (III) и позволяло получать соединение (III) с выходом 72%.

Каталитическое гидрирование *N*-Cbz- αMeSpd (III) осуществляли при атмосферном давлении над Pd-чернью и после кристаллизации из водного спирта целевой тригидрохлорид αMeSpd (IV) был выделен с выходом 89%. Синтезированный таким способом αMeSpd , по данным ВЭЖХ, в стандартных условиях анализа полиаминов [13] имел чистоту 99.6%.

Следует отметить, что предлагаемая схема синтеза также пригодна для получения *L*- и *D*-изомеров αMeSpd , которые могли бы проявлять различную активность *in vitro* и *in vivo*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: этиловый эфир β -аминомасляной кислоты, 1,4-диаминобутан (Aldrich, США), Cbz-Cl, хлорангидрид метансульфонокислоты (Fluka, Швейцария), LiAlH_4 (Sigma, США). ТСХ

проводили на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Германия) в системах: CHCl_3 –MeOH, 9 : 1 (А); диоксан–25% NH_4OH , 9 : 1 (Б); *n*-BuOH–AcOH–пиридин– H_2O , 4 : 2 : 1 : 2 (В). Колоночную хроматографию выполняли на силикагеле Kieselgel (40–63 мкм, Merck, Германия), системы для элюции указаны в тексте. Вещества на хроматограммах обнаруживали по УФ-поглощению и цветной реакцией с нингидрином.

Спектры ЯМР регистрировали на приборе Bruker Avance 500 DRX (Германия), в качестве внутреннего стандарта использовали Me_4Si (CDCl_3) и натриевую соль 3-триметилсилилпропансульфонокислоты (D_2O). Химические сдвиги приведены в миллионных долях, а КССВ – в герцах.

3-Аминобутанол-1 (I). К суспензии 8.0 г (0.21 моль) LiAlH_4 в 150 мл абс. THF при охлаждении и перемешивании прибавляли по каплям раствор 13.5 г (0.103 моль) свежеперегнанного этилового эфира β -аминомасляной кислоты в 50 мл абс. THF с такой скоростью, чтобы растворитель слабо кипел. По окончании прибавления реакционную смесь кипятили при перемешивании еще 3 ч, оставляли на ночь при комнатной температуре и затем разлагали, осторожно прибавляя последовательно 11.4 мл H_2O , 10.6 мл 20% NaOH, 29.0 мл H_2O и 34.2 мл 40% NaOH. Органический слой отделяли, осадок экстрагировали горячим CHCl_3 (4 × 80 мл), объединенные органические вытяжки сушили MgSO_4 , растворитель упаривали и остаток перегоняли в вакууме. Получали 7.3 г спирта (I) с выходом (80%), n_D^{20} 1.4537, т. кип. 108 – $109^\circ\text{C}/42$ мм Hg (лит. [14]: n_D^{20} 1.4543, т. кип. $73^\circ\text{C}/7$ мм Hg). ^1H -ЯМР (CDCl_3): 3.79–3.68 (2 H, м, CH_2OH); 3.12–3.03 (1 H, м, CHNH_2); 2.58 (3 H, уш. с, $\text{NH}_2 + \text{OH}$); 1.62–1.54 (1 H, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$); 1.50–1.40 (1 H, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$); 1.09 (3 H, д, J 6.52, CH_3).

***N*-(Бензилоксикарбонил)-3-аминобутанол-1 (II).** К охлажденному до 0°C раствору 2.7 г (30 ммоль)

соединения (I) в смеси 30 мл THF, 5 мл H₂O и 3.81 г (45 ммоль) NaHCO₃ при перемешивании прибавляли 4.65 мл (33 ммоль) Cbz-Cl в 5 порций с интервалом в 20 мин. Затем перемешивали еще 2 ч при 0°C и 3 ч при комнатной температуре, водную фазу отделяли, экстрагировали CHCl₃ (2 × 5 мл) и объединенные органические вытяжки упаривали в вакууме досуха. Остаток растворяли в 60 мл CHCl₃, промывали последовательно 1 М HCl (2 × 25 мл), H₂O (2 × 25 мл) и 1 М NaHCO₃ (3 × 20 мл), сушили MgSO₄ и растворитель упаривали в вакууме досуха. Остаток растирали со смесью эфир-гексан (1 : 1) (2 × 40 мл), осадок отфильтровывали и после высушивания в вакууме над P₂O₅ получали 6.03 г (90%) N-Cbz-аминоспирта (II), т. пл. 60°C (этилацетат-гексан), R_f 0.47 (A). ¹H-ЯМР (CDCl₃): 7.37–7.28 (5 H, м, C₆H₅); 5.09 (2 H, с, CH₂Ph); 4.75 (1 H, уш.с, NHCbz); 4.01–3.93 (1 H, м, CH₃CH); 3.67–3.59 (2 H, м, CH₂OH); 2.98 (1 H, уш.с, OH); 1.83–1.72 (1 H, м, CH₂CH₂OH); 1.45–1.35 (1 H, м, CH₂CH₂OH), 1.20 (3 H, д, J 6.52, CH₃).

N⁸-(Бензилоксикарбонил)-1,8-диамино-5-азанонан (III). К охлажденному до 0°C раствору 5.51 г (24.7 ммоль) соединения (II) и 5.22 мл (37.5 ммоль) Et₃N в 60 мл абс. CH₂Cl₂ прибавляли в течение 10 мин при перемешивании раствор 2.14 мл (27.5 ммоль) MsCl в 18 мл абс. CH₂Cl₂, затем перемешивали еще 1 ч при 0°C и 1 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь выливали в 40 мл 1 М NaHCO₃, органическую фазу отделяли, промывали последовательно H₂O (2 × 10 мл), 0.5 М H₂SO₄ (3 × 35 мл), H₂O (2 × 10 мл) и насыщ. NaCl (10 мл), сушили MgSO₄ и упаривали в вакууме досуха. Остаток растворяли в 40 мл абс. THF, охлаждали до 0°C и в одну порцию к охлажденному раствору прибавляли 35.1 г (400 ммоль) 1,4-диаминобутана в 40 мл абс. THF. Реакционную смесь выдерживали 6 ч при 0°C, затем 16 ч при комнатной температуре и затем избыток 1,4-диаминобутана отгоняли в вакууме. Остаток растворяли в смеси диоксан–25% NH₄OH (9 : 1), полученный раствор делили на три части и каждую (7 мл) очищали хроматографией на колонке с SiO₂ (135 г), элюируя смесью диоксан–25% NH₄OH (9 : 1), что приводило к 5.3 г (72%, считая на спирт (II)) N⁸-Cbz-αMeSpd (III) в виде густого масла, R_f 0.15 (B). ¹H-ЯМР (CDCl₃): 7.36–7.28 (5 H, м, C₆H₅); 5.58 (1 H, уш.с, NHCbz); 5.08 (2 H, с, CH₂Ph); 3.81 (1 H, м, CbzNHCH); 2.69 (2 H, м, CH₂NH); 2.65 (2 H, м, CH₂NH); 2.57 (2 H, м, CH₂NH); 1.67 (1 H, м, CH(NHCbz)CH₂); 1.53 (1 H, м, CH(NHCbz)CH₂); 1.49 (2 H, м, CH₂CH₂CH₂CH₂); 1.46 (2 H, м, CH₂CH₂CH₂CH₂); 1.40 (3 H, уш.с, NH + NH₂); 1.17 (3 H, д, J 6.52, CH₃). ¹³C-ЯМР (CDCl₃): 156.04 с; 136.85 с; 128.49 с; 128.01 с (2C); 66.39 т; 49.77 т; 46.43 т; 45.96 д; 42.11 т; 36.64 т; 31.57 т; 27.43 т; 21.25 к.

Тригидрохлорид 1,8-диамино-5-азанона, αMeSpd (IV). К раствору 5.2 г (17.7 ммоль) соеди-

нения (III) в 40 мл смеси AcOH–MeOH (1 : 1) прибавляли ~1.0 мл суспензии Pd-черни в MeOH и гидрировали при атмосферном давлении. Pd-чернь отфильтровывали, промывали MeOH и объединенные фильтраты упаривали в вакууме досуха. Остаток растворяли в EtOH, прибавляли 6.6 мл 7.0 М HCl, упаривали полученный раствор в вакууме досуха и остаток кристаллизовали из смеси MeOH с EtOH. Выпавшие кристаллы отфильтровывали, промывали холодным EtOH, сушили в вакууме над P₂O₅/KOH и получали 4.23 г (89%) αMeSpd (IV), т. пл. 191–192°C (лит. [9]: 283°C, разл. для лиофилизованного образца), R_f 0.45 (B). ¹H-ЯМР (D₂O): 3.53 (1 H, м, CH₃CH); 3.21 (2 H, м, CH(NH₂)CH₂CH₂); 3.15 (2 H, м, NHCH₂(CH₂)₃NH₂); 3.07 (2 H, м, NH(CH₂)₃CH₂NH₂); 2.16 (1 H, м, CH(NH₂)CH₂); 2.02 (1 H, м, CH(NH₂)CH₂); 1.86–1.74 (4 H, м, CH₂CH₂CH₂NH₂); 1.36 (3 H, д, J 6.52, CH₃). ¹³C-ЯМР (D₂O): 50.03 т; 48.36 д; 46.89 т; 41.85 т; 33.34 т; 26.85 т; 25.69 т; 20.38 к.

Работа выполнена при финансовой поддержке Академии наук Финляндии и Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 00-04-48244 и 03-04-49080).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cohen S.S. A Guide to the Polyamines. New York: Oxford University Press, 1998.
2. McCann P.P., Pegg A.E. // Pharmacol. Ther. 1992. T. 56. P. 195–215.
3. Pegg A.E., McCann P.P. // Pharmacol. Ther. 1992. T. 56. P. 359–377.
4. Casero R.A., Woster P.M. // J. Med. Chem. 2001. V. 44. P. 1–26.
5. Frydman B., Valasinas A. // Exp. Opin. Ther. Patents. 1999. V. 9. P. 1055–1068.
6. Vujcic S., Halmekyto M., Diegelman P., Gan G., Kramer D.L., Janne J., Porter C.W. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 38319–38328.
7. Pietila M., Alhonen L., Halmekyto M., Kanter P., Janne J., Porter C.W. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 18746–18751.
8. Alhonen L., Parkkinen J.J., Keinänen T., Sinervirta R., Herzig K.H., Janne J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 8290–8295.
9. Lakanen J.R., Coward J.K., Pegg A.E. // J. Med. Chem. 1992. V. 35. P. 724–734.
10. Rasanen T.-L., Alhonen L., Sinervirta R., Keinänen T., Herzig K.-H., Suppola S., Khomutov A.R., Vepsäläinen J., Janne J. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 39867–39872.
11. Kuksa V., Buchan R., Kong P. // Synthesis. 2000. V. 9. P. 1189–1207.
12. Khomutov A.R., Vepsäläinen J.J., Shvetsov A.S., Hyvonen T., Keinänen T.A., Pustobaev V.N., Eloranta T.O., Khomutov R.M. // Tetrahedron. 1996. V. 52. P. 13751–13766.
13. Hyvonen T., Keinänen T.A., Khomutov A.R., Khomutov R.M., Eloranta T.O. // J. Chromatogr. 1992. V. 574. P. 17–21.
14. van Tamelen E.E., Brenner J.E. // J. Am. Chem. Soc. 1957. V. 79. P. 3839–3843.

A New Synthesis of α -Methylspermidine**N. A. Grigorenko***, **J. Vepsalainen****, **A. Jarvinen*****, **T. A. Keinanen*****,
L. Alhonen***, **J. Janne*****, **A. M. Kritsyn***, and **A. R. Khomutov****

#Phone: +7 (095) 135-6065; fax: +7 (095) 135-1405; e-mail: alexkhom@genome.eimb.relarn.ru

*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova 32, GSP Moscow, 119991 Russia**Department of Chemistry, University of Kuopio,
P.O. Box 1627 Kuopio, FIN-70211 Finland***Virtanen Institute for Molecular Sciences, University of Kuopio,
P.O. Box 1627 Kuopio, FIN-70211 Finland

A five-step synthesis of α -methylspermidine (1,8-diamino-5-azanonane), the first polyamine analogue preventing pathological consequences of spermidine depletion in transgenic rats overproducing spermine/spermidine N^1 -acetyltransferase, from ethyl 3-aminobutyrate was achieved in a high overall yield. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: α -methylspermidine, polyamines, spermine/spermidine N^1 -acetyltransferase