



УДК 547.238.057

СИНТЕЗ АМИНООКСИАНАЛОГОВ ПУТРЕСЦИНА И СПЕРМИДИНА

*Хомутов А. Р., Хомутов Р. М.***Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Академии наук СССР,
Москва;*** Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Академии наук СССР,
Москва*

Нитрилы, содержащие ω -защищенную аминооксигруппу, в результате обработки NaBH_4 (NaB^3H_4) в присутствии CoCl_2 и последующего гидролиза образующихся ω -алкиламинопроизводных этилового эфира ацетгидроксимовой кислоты удается превратить в аминооксиалкиламины. Описываются синтезы некоторых аминооксианалогов полиаминов. Обсуждаются возможные пути биосинтеза и биodeградации аминооксиспермидинов и аминооксисперминов, а также перспективы их использования для изучения биологических функций полиаминов.

Образование, превращение и функции биогенных полиаминов, спермина, спермидина и путресцина, являются в настоящее время предметом интенсивных исследований, поскольку этим соединениям отводится важная роль в процессах клеточного роста. Для регулирования уровня полиаминов целесообразно использовать, учитывая сложность системы, воздействие на соответствующие ферменты, среди которых более всего внимания уделяется орнитиндекарбоксилазе и декарбоксилазе S-аденозилметионина Met(Ado). Недавно было обнаружено, что аминооксианалоги ($\text{H}_2\text{NO}-$) путресцина и декарбоксилированного Met(Ado) сильно и избирательно подавляют эти декарбоксилазы [1–3], влияя *in vitro* на уровень полиаминов и тормозя пролиферацию клеток [4, 5]. В этой связи существенное значение приобретает вопрос о метаболизме новых ингибиторов, в особенности возможности их участия в спермидин- и сперминсинтазных реакциях, что приводило бы к H_2NO -аналогам спермидина и спермина. Последние соединения представляли и самостоятельный интерес как первые из функционально активных аналогов полиаминов и как реагенты для введения H_2N -групп в нуклеиновые кислоты [6, 7].

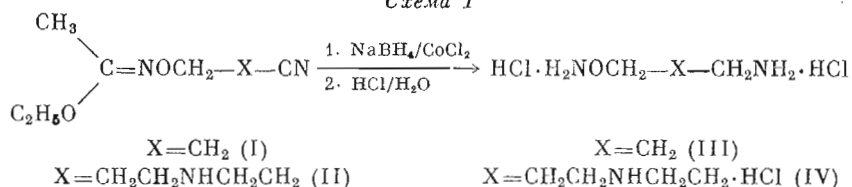
Монотонность структуры полиаминов значительно осложняет задачу направленной их модификации даже в случае простых N-алкильных производных [8, 9], которая решается либо превращением в H_2N -группу определенной функции полиамина, либо сочетанием отдельных фрагментов. Применительно к H_2NO -аналогам это означало необходимость защиты H_2NO -функции в ходе синтеза и использование воздействий, не затрагивающих N–O-связь.

Ранее было показано, что этоксиэтилиденная защита H_2N -O-группы устойчива в условиях восстановительного аминирования β -аминоксипропионового альдегида [10]. Однако воздействие на последний аммиаком и боргидридом натрия приводило к 1-аминокси-3-аминопропану (АРА) с выходом, не превышающим 8–10%, что коррелировало с существованием N-замещенных β -аминоксипропионовых альдегидов преимущественно в виде циклических таутомеров [11].

Обычно восстановление нитрилов в амины требует энергичных воздействий, при которых происходит восстановление и N–O-связи. Нами было найдено, что соответствующим образом защищенные аминооксиалкилнитрилы восстанавливаются в амины боргидридом натрия в присутствии солей Co^{2+} с сохранением N–O-связи (схема 1).

Сокращения: Met(Ado) – S-аденозилметионин, АРА – 1-аминокси-3-аминопропан, АМА – 5'-дезоксаденозил-5'-метилтиоэтилгидроксиламин.

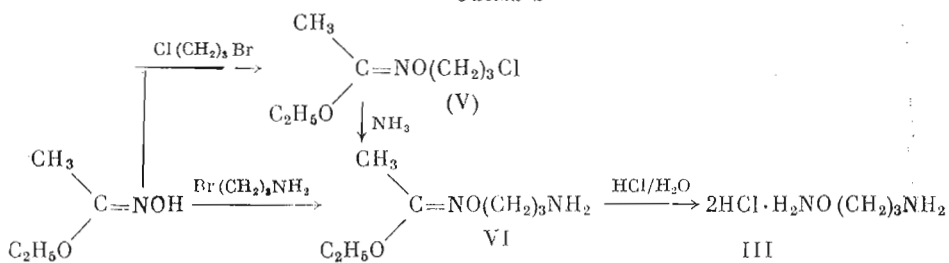
Схема 1



В этих условиях не наблюдалось образования N-замещенных гидроксиламинов и, следовательно, восстанавливалась только нитрильная группа. Реакция протекала с достаточно высокими выходами, что позволило получить и ³H-направленно меченные аналоги путресцина и спермидина, необходимые для биохимических исследований.

Гидролизом N-(1'-этоксипропилиден)-1-аминокси-3-аминопропана (VI), промежуточного соединения в синтезе аминоксидана спермидина (IV), был получен 1-аминокси-3-аминопропан (III), который был также синтезирован аминированием N-(1'-этоксипропилиден)-1-аминокси-3-хлорпропана (V) или алкилированием этилового эфира ацетгидроксимовой кислоты (оксиминоэфир) 1-амино-3-бромпропаном с последующим кислотным удалением защитной группы согласно методике [12] (схема 2).

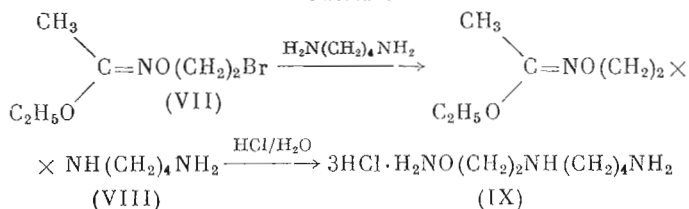
Схема 2



Суммарные выходы были примерно одинаковы для всех способов, однако для получения препаративных количеств АРА (III) оказалось удобнее исходить из коммерческого бромгидрата 1-амино-3-бромпропана.

Получение изомерного аминоксидана спермидина (IX) было осуществлено блочным вариантом, т. е. введением защищенной аминоксигруппы в один из фрагментов структуры спермидина с последующим алкилированием путресцина (схема 3).

Схема 3



Катализируемый спермидин- и сперминсинтазами биосинтез полиаминов протекает как последовательное N-алкилирование путресцина декарбоксилированным S-аденозилметионином (схема 4).

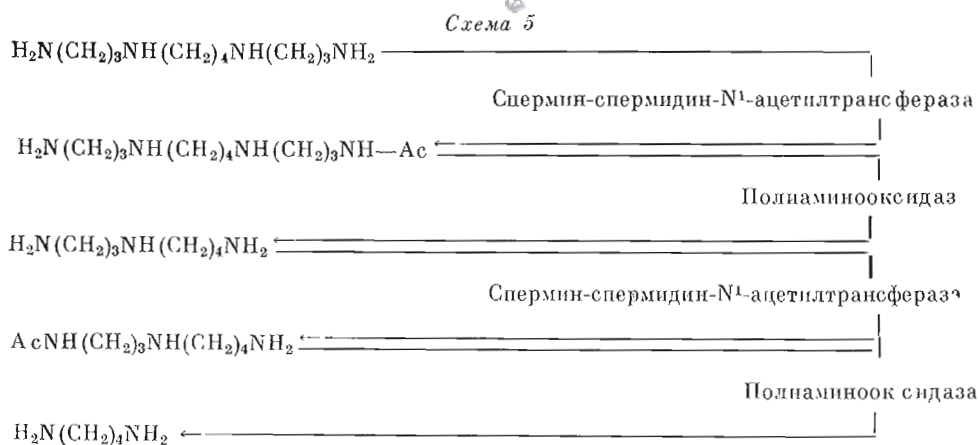
Схема 4



Хотя механизм действия синтаз мало исследован, обоснованно допущение о необходимости депротонирования NH_2 -группы, подвергающейся аминопропинилированию. С этой точки зрения АРА, существующий при нейтральных рН в виде монокатиона ($\text{p}K_{\text{H}_2\text{NO}^-}$ 4,5–5), можно рассматривать как аналог монокатионной формы путресцина, возникающей в процессе ферментативной реакции, что объясняет высокое сродство АРА к спермидинсинтазе [13]. Нельзя также исключить и возможность субстратных свойств АРА при условии, что механизм депротонирования аминогруппы путресцина не связан с переносом протона на существенную для катализа группу активного центра фермента. Другой альтернативой могло бы быть образование в ходе синтазной реакции аминоксианалога спермидина (IV), если аминопропинилированию подвергается аминогруппа АРА. По аналогии с АРА можно ожидать высокого сродства аналога (IV) не столько к спермидин-, сколько к сперминсинтазе, для которой в настоящее время неизвестны эффективные ингибиторы.

В настоящее время 5'-дезоксаденозил-5'-метилтиоэтилгидроксиламин (АМА) рассматривается как наиболее эффективный необратимый ингибитор Met(Ado)-декарбоксилазы, обладающий высоким сродством к ферменту на обратимой стадии торможения и весьма активный *in vitro* [2, 3, 5]. Если в спермидин- и сперминсинтазных реакциях аминогруппа декарбоксилированного Met(Ado) является лишь одной из якорных функций, нельзя исключить возможность участия АМА в синтазных реакциях как донора аминоксиэтильных групп, что приводило бы к аминоксианалогу спермидина (IX). Последнее вещество, а также другие аминоксианалоги полиаминов представляют интерес в исследовании функций полиаминов на молекулярном уровне (возможность реакций по активной H_2NO -группе в комплексах с белками и нуклеиновыми кислотами).

Катаболизм спермидина и спермина включает CoASAc-зависимое N^1 -ацетилирование с последующим образованием путресцина в результате окислительного дезаминирования (схема 5).



Соединения (IV) и (IX) также могли бы ферментативно ацетилироваться, однако в первом случае очевидна невозможность образования путресцина, а для амина (IX) возникновение путресцина представляется маловероятным в силу причин, обсуждавшихся выше для N -замещенных β -аминоксипропионовых альдегидов. Таким образом, преимущество аминоксианалогов полиаминов для изучения биологических функций полиаминов заключается также и в том, что они позволяют рассматривать действие аналогов как таковых, а не связывать их действие с последствиями возможного катаболизма ингибиторов до биологически активных спермидина и путресцина.

В этой связи можно было бы упомянуть о 1,8- N , N -бисалкилированных производных спермидина и 1,12- N , N -бисалкилированных производных спермина [14], которые *in vitro* не влияют на ферменты биосинтеза полиаминов и не способны катаболизировать. Тем не менее они с успехом

применяются *in vitro* и *in vivo* для регулирования уровня полиаминов, а их действие объясняется наличием внутренних регуляторных связей, существующих *in vivo* в системе синтеза и деградации полиаминов. Априори нельзя исключить возможность использования ампиноксипаналогов полиаминов и их производных также и в указанном выше аспекте.

Экспериментальная часть

ТСХ выполнена на пластинках Silufol (Kavalier, ЧССР) в системе $i\text{-PrOH} - 25\% \text{NH}_4\text{OH} - \text{вода}$, 7:1:2. Вещества на хроматограммах обнаруживали нингидрином и в виде флуоресцирующих производных пиридоксаль-5'-фосфата. Спектры ПМР снимали на спектрометре XL-100-15 (Varian, США) в CDCl_3 (соединения с защищенной аминоксигруппой, внутренний стандарт TMS) и в D_2O (соединения со свободной аминоксигруппой, внутренний стандарт — $t\text{-BuOH}$). Удельную активность [^3H]·АРА определяли в сцинтиляторе Supersolve X (Koch-Light, Англия) на радиометре Intertechnique LS-30 (Франция). H_2NO -группы количественно определяли по методике [15].

Дихлоргидрат 1-аминоксипропана (III). Метод А. К раствору 4,6 г (0,2 моль) Na в 100 мл абс. этанола прибавляли при 0° С 20,6 г (0,2 моль) оксиминоэфира [16] и затем в один прием 157 г (1,0 моль) 1,3-бромхлорпропана. Реакционную смесь выдерживали 18 ч при 20° С, разбавляли водой и экстрагировали CHCl_3 . Экстракт сушили MgSO_4 и после трех перегонки получили 18,0 г (выход 50%) *N*-(1'-этоксипропиден)-1-аминоксипропана (V), т. кип. 84–86° С (13 мм Hg), n_D^{22} 1,4448. Спектр ПМР (δ , м.д.): 1,31 и 4,01 (3H, т, J 7,0 Гц и 2H, дд; $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}-$), 1,96 (3H, с, 2'-H), 2,12 (2H, м, 2-H), 3,65 (2H, т, 3-H), 4,06 (2H, т, 1-H).

16,0 г (0,084 моль) производного (V) в 20 мл абс. этанола и 400 мл жидкого аммиака нагревали 18 ч в автоклаве при 80° С, аммиак и спирт отгоняли, остаток выливали в насыщенный водный раствор NaCl и смесь экстрагировали эфиром. Экстракт сушили K_2CO_3 , а затем KOH и после двух перегонки получили 8,7 г (выход 63%) *N*-(1'-этоксипропиден)-1-аминоксипропана (VI), т. кип. 85° С (9 мм Hg), n_D^{22} 1,4478, R_f 0,72. Спектр ПМР (δ , м.д.): 1,30 и 4,01 (3H, т, J 7,0 Гц и 2H, дд; $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}-$), 1,80 (2H, м, 2-H), 1,95 (3H, с, 2'-H), 2,82 (2H, т, 3-H), 3,99 (2H, т, 1-H).

К 3,2 г (0,02 моль) соединения (VI) в 50 мл изопропанола прибавляли 10 мл конц. соляной кислоты, через 10–15 мин выпавший осадок отфильтровывали, промывали изопропанолом и после перекристаллизации из смеси метанол — этилацетат получили 3,17 г (выход 90%) соединения (III), т. пл. 203–204° С (разл.). Найдено, %: С 22,15; Н 7,34; N 16,94. $\text{C}_3\text{H}_{12}\cdot\text{Cl}_2\text{NO}$. Вычислено, %: С 22,09; Н 7,42; N 17,18. Спектр ПМР (δ , м.д.): 2,02 (2H, м, 2-H), 3,10 (2H, т, 3-H), 4,10 (2H, т, 1-H).

Метод Б. К охлажденному до 20° С раствору этилата натрия (из 4,6 г (0,2 моль) Na и 75 мл абс. этанола) прибавляли 21,9 г (0,1 моль) бромгидрата 1-амино-3-бромпропана и затем 10,3 г оксиминоэфира [16], выпавший осадок отфильтровывали, фильтрат выдерживали при 20° С до прекращения образования осадка NaBr, а затем перегоняли. Получили 7,9 г (выход 44%) соединения (VI), т. кип. 87–88° С (11 мм Hg), n_D^{21} 1,4483, R_f 0,72.

Метод В. К 0,156 г (1 ммоль) нитрила *N*-(1'-этоксипропиден)-2-аминоксипропионовой кислоты (I) [12] (спектр ПМР (δ , м.д.): 1,28 и 4,05 (3H, т, J 7 Гц и 2H, дд; $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}-$), 1,94 (3H, с, 2'-H), 2,66 (2H, т, 1-H), 3,95 (2H, т, 2-H)) в 3,5 мл этанола прибавляли 1,5 мл 0,5 М раствора $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ в этаноле, смесь охлаждали до 5° С и при этой температуре прибавляли раствор 0,19 г (5 ммоль) NaBH_4 в 10 мл этанола, а затем перемешивали 18 ч при 4° С. К реакционной смеси прибавляли 10 мл 1 М HCl, смесь упаривали в вакууме досуха, остаток растворяли в воде и соединение (III) выделяли хроматографией на 8,0 мл дауэкса 50×8 (100–200 меш) в H^+ -форме, элюируя последовательно водой и растворами конц. HCl в воде с соотношением 1:20 и 1:10. Фракции, содержащие соедине-

ние (III), упаривали досуха с изопропанолом, остаток суспендировали в 1 мл кипящего изопропанола, осадок фильтровали из горячего раствора и получили 0,1 г (выход 61%) соединения (III), т. пл. 204–206° С (разл.), R_f 0,13.

Дихлоргидрат нитрила 6-аминокси-3-азазантовой кислоты. К 4,8 г (0,03 моль) соединения (VI) при 2° С прибавляли 2,0 мл (0,03 моль) свежеперегнанного акрилонитрила, смесь перемешивали 30 мин при 2° С, затем 1 ч при 50° С и 2,5 ч при 100° С. После перегонки получили 4,8 г (выход 75%) нитрила *N*-(*I'*-этоксиптилиден)-6-аминокси-3-азазантовой кислоты (II), т. кип. 102° С (0,35 мм Hg), n_D^{21} 1,4600. Спектр ПМР (δ , м.д.): 1,26 и 3,96 (3H, т, *J* 7,0 Гц и 2H, дд; $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}-$), 1,82 (2H, м, 5-H), 1,90 (3H, с, 2'-H), 2,52 и 2,93 (2H и 2H, два м, 4- и 2-H), 2,75 (2H, т, 1-H), 3,92 (2H, т, 6-H).

К 0,43 г (0,002 моль) соединения (II) в 10 мл изопропанола прибавляли 0,5 мл конц. HCl, через 10 мин отфильтровывали выпавший осадок и после высушивания в вакууме над $\text{P}_2\text{O}_5/\text{KOH}$ получили 0,36 г (выход 83%) дихлоргидрата нитрила 6-аминокси-3-азазантовой кислоты, т. пл. 148–149° С, R_f 0,61. Найдено, %: С 33,31; Н 7,36; N 19,60. $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}$. Вычислено, %: С 33,35; Н 7,00; N 19,44. Спектр ПМР (δ , м.д.): 2,04 (2H, м, 5-H), 2,93 (2H, т, 1-H), 3,18 и 3,37 (2H и 2H, два м, 4- и 2-H), 4,12 (2H, т, 6-H).

Трихлоргидрат 1-аминокси-4-аза-7-аминогептана (IV). К 0,213 г (1 ммоль) соединения (II) в 3,5 мл этанола прибавляли 2,0 мл 0,5 М раствора $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ в этаноле, смесь охлаждали до 5° С и при этой температуре прибавляли раствор 0,19 г (5 ммоль) NaBH_4 в 10 мл этанола. Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при 5° С и затем прибавляли 10 мл 2 М соляной кислоты, упаривали в вакууме досуха. Остаток растворяли в воде и соединение (IV) выделяли хроматографией на 8,0 мл дауэкса 50×8 (100–200 меш) в H^+ -форме, элюируя последовательно водой, растворами конц. HCl в воде с соотношением 1:20, 1:10, 1:5. Фракции, содержащие О-замещенный гидроксилламин (IV), упаривали досуха с изопропанолом, остаток суспендировали в кипящем изопропанол, фильтровали горячим и получили 0,14 г (выход 53%) соединения (IV), т. пл. 188–189° С. Найдено, %: С 26,60; Н 7,82; N 15,11. $\text{C}_6\text{H}_{20}\text{Cl}_3\text{N}_3\text{O} \cdot \text{H}_2\text{O}$. Вычислено, %: С 26,24; Н 8,07; N 15,30. Спектр ПМР (δ , м.д.): 1,98–2,19 (4H, м, 2- и 6-H), 2,97–3,24 (6H, м, 3-, 5- и 7-H), 4,13 (2H, т, 1-H).

Трихлоргидрат 1-аминокси-3-аза-7-аминогептана (IX). К 10,5 г (0,05 моль) *N*-(1'-этоксиптилиден)-1-аминокси-2-бромэтана (VII) [17] в 5 мл абс. изопропанола прибавляли раствор 22,0 г (0,25 моль) 1,4-диаминобутана в 15 мл абс. изопропанола и смесь выдерживали 24 ч при 20° С. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали абс. изопропанолом, объединенные фильтры упаривали досуха, к остатку прибавляли 150 мл абс. эфира, осадок фильтровали, фильтрат выдерживали ночь над KOH и перегоняли. После двух перегонок получили 6,74 г (выход 62%) *N*-(1'-этоксиптилиден)-1-аминокси-3-аза-7-аминогептана (VIII), т. кип. 73,5–74° С (0,08 мм Hg), n_D^{20} 1,4648, R_f 0,29. Спектр ПМР (δ , м.д.): 1,23 и 3,95 (3H, т, *J* 7,0 Гц и 2H, дд, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}-$), 1,43–1,58 (4H, м, 5- и 6-H), 1,89 (3H, с, 2'-H), 2,60 и 2,66 (4H, м, 4- и 7-H), 2,81 (2H, т, 2-H), 3,96 (2H, т, 1-H).

К 0,65 г (3 ммоль) соединения (VIII) в 10 мл метанола прибавляли 2,0 мл конц. HCl, 3,0 мл изопропанола и смесь оставляли на ночь при –10° С. Выпавший осадок фильтровали, промывали абс. изопропанолом, эфиром и получили 0,67 г (выход 87%) соединения (IX), т. пл. 187–188° С (разл.). Найдено, %: С 28,08; Н 7,86; N 16,14. $\text{C}_6\text{H}_{20}\text{Cl}_3\text{N}_3\text{O}$. Вычислено, %: С 28,11; Н 8,20; N 16,38. Спектр ПМР (δ , м.д.): 1,61–1,76 (4H, м, 5- и 6-H), 2,88–3,16 (4H, м, 4- и 7-H), 3,36 (2H, т, 2-H), 4,30 (2H, т, 1-H).

1-Аминокси-3-амино-[3- ^3H]пропан (^3H)-(III)) синтезирован аналогично описанному для (III), исходя из 40 мг (0,25 моль) (I), 1,06 мг (50 мКи, уд. акт. 1,9 Ки/ммоль) NaB^3H_4 (Изотоп, СССР) и 40 мг (1,1 ммоль) NaBH_4 . Получили 2 мл 0,08 М раствора радиохимически гомогенного соединения ^3H -(III). R_f 0,13, уд. акт. 18,7 мКи/ммоль.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хомутов Р. М., Денисова Г. Ф., Хомутов А. Р., Белостоцкая К. М., Шлосман Р. Б., Аргамонова Е. Ю. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 11. С. 1574–1576.
2. Хомутов Р. М., Завалова Л. Л., Сырку В. И., Аргамонова Е. Ю., Хомутов А. Р. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 1. С. 130–131.
3. Аргамонова Е. Ю., Завалова Л. Л., Хомутов Р. М., Хомутов А. Р. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 2. С. 206–212.
4. Нувönen Т., Alakuijala L., Andersson L., Khomutov A. R., Khomutov R. M., Eloganta T. O. // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. № 23. P. 11138–11144.
5. Kramer D. L., Khomutov R. M., Bukin Yu. V., Khomutov A. R., Porter C. W. // Biochem. J. In press.
6. Khomutov A. R., Kritsky A. M., Artamonova E. Yu., Khomutov R. M. // Nucleosides and Nucleotides. 1987. V. 6. № 1–2. P. 359–362.
7. Kritsky A. M., Khomutov A. R., Yakovlev D. Yu., Gabibov A. G., Rabinkov A. G., Khomutov R. M. // Nucl. Acids Res. (Symp. Ser. № 18). 1987. P. 89–92.
8. Oshima T. // Meth. Enzymol. 1983. V. 94. P. 401–411.
9. Bergeron R. J., Neims A. H., McManis J. S., Hawthorne T. R., Vinson J. R. T., Vortell R., Ingho M. J. // J. Med. Chem. 1988. V. 31. № 6. P. 1183–1190.
10. Хомутов А. Р., Хурс Е. Н., Хомутов Р. М. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 3. С. 385–391.
11. Yamada Y., Noda H., Okada H. // Agr. Biol. Chem. 1973. V. 37. № 9. P. 2201–2203.
12. Хомутов Р. М. // Журн. общ. химии. 1961. Т. 31. С. 1992–1995.
13. Khomutov R. M., Нувönen Т., Karvonen E., Kauppinen L., Paalanen T., Paulin L., Eloganta T., Rajula R.-L., Andersson L. C., Pösö H. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1985. V. 130. № 2. P. 596–602.
14. Porter C. W., Bergeron R. J. // Adv. in Enzyme Reg. V. 27./Ed. Weber G. Oxford: Pergamon Press, 1988. P. 57–79.
15. Korpela T. K., Mäkelä M. J. // Analyt. Biochem. 1981. V. 110. № 2. P. 251–258.
16. Хомутов Р. М., Северин Е. С., Гнучев Н. В., Деревянко Т. Я. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1967. № 8. С. 1820–1823.
17. Хомутов А. Р., Хомутов Р. М. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 12. С. 1662–1674.

Поступила в редакцию
2.XI.1988

SYNTHESIS OF PUTRESCINE AND SPERMIDINE AMINOXYANALOGUES

KHOMUTOV A. R., KHOMUTOV R. M.*

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

**V. A. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

Nitriles containing ω -protected aminoxy group were converted into aminoxyalkylamines with high yields upon treatment with NaBH_4 (NaB^3H_4) in the presence of CoCl_2 followed by hydrolysis of ethyl N-hydroxyacetimidate protecting group. Various synthetic approaches to aminoxyanalogues of spermine, spermidine and putrescine are presented. Possible pathways of biosynthesis and degradation of the polyamine aminoxyanalogues as well as some aspects of their use for investigation of polyamines biological functions are discussed.