



УДК 547.415.057

СТАБИЛЬНЫЕ АНАЛОГИ КОФЕРМЕНТ-СУБСТРАТНОГО КОМПЛЕКСА СПЕРМИДИН/СПЕРМИН- N^1 -АЦЕТИЛТРАНСФЕРАЗНОЙ РЕАКЦИИ. СИНТЕЗ, ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ФЕРМЕНТОМ

© 2014 г. Т. А. Кейнанен*, Т. Хивонен**, Й. Вепсалайнен*, Л. Алхонен**,
А. Р. Хомутов***, #, Ю. Янне**

*Департамент Фармации, Биоцентр Куопио, Университет Восточной Финляндии, Куопио, Финляндия

**Центр молекулярных исследований им. А.И. Виртанена, Университет Восточной Финляндии, Куопио, Финляндия

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

Поступила в редакцию 15.05.2013 г. Принята к печати 21.10.2013 г.

Предложен удобный двухстадийный метод синтеза конъюгатов аминоксианалогов спермина, спермидина и путресцина с коэнзимом А и *D*-пантетеином. Использование ацетонового линкера позволяет получать целевые соединения с выходом, близким к количественному. Показано, что активность “бисубстратных” ингибиторов на основе коэнзима А, действующих в микромолярных концентрациях, намного превосходит активность соответствующих производных *D*-пантетеина.

Ключевые слова: спермидин/спермин- N^1 -ацетилтрансфераза, ингибиторы, *O*-замещенные гидроксил-амины, ацетилкоэнзим А, аналоги полиаминов.

DOI: 10.7868/S0132342314020079

ВВЕДЕНИЕ

Создание стабильных аналогов промежуточных соединений ферментативных реакций, включая и аналоги промежуточных кофермент-субстратных комплексов, является одним из основных приемов для получения специфических и высокоэффективных ингибиторов ферментов (см. обзор [1]). Активность таких ингибиторов проявляется, как правило, в интервале 10^{-6} – 10^{-9} М, определяется сродством интермедиата и его аналога к активному центру и зависит от искажений, которые вносит линкер или связь, соединяющие субстраты и/или их аналоги в ковалентный комплекс [2–6]. Наиболее активными ингибиторами этого типа следует, по-видимому, считать аналоги изолейцил-денилата, ингибирующие изолейцил-тРНК-синтазу из *Staphylococcus aureus* в пико-/фемтомолярных концентрациях [7].

Многие ацетил-СоА-зависимые трансферазы, включая и спермидин/спермин- N^1 -ацетилтранс-

феразу (SSAT, КФ 2.3.1.57), осуществляют прямой перенос ацетильной группы с ацетил-СоА на второй субстрат, и стабильные аналоги соответствующих бисубстратных комплексов оказываются весьма эффективными ингибиторами, действующими в концентрациях 10^{-6} – 10^{-9} М (см. работу [8] и ссылки в ней).

Для ингибирования SSAT и родственной ей гистонацетилазы были синтезированы конъюгаты симметричных полиаминов спермина (1,12-диамино-4,9-диазадодекан, Spm) и норспермидина (1,7-диамино-4-азагептан, нор-Spd) с коэнзимом А, моделирующие промежуточный кофермент-субстратный комплекс (рис. 1) [9, 10]. В случае гистонацетилазы эти соединения с ацетатным линкером, оказались весьма активными и действовали в наномолярных концентрациях [9], тогда как в случае SSAT они ингибировали фермент в концентрациях 0.3–3.0 мкМ, в зависимости от строения полиаминного фрагмента [10]. Недавно конъюгат Spm и коэнзима А с ацетатным линкером был использован в рентгеноструктурных исследованиях SSAT для изучения особенностей связывания субстратов в активном центре фермента [11].

Вклад пантетеинового фрагмента коэнзима А в его сродство к SSAT не исследован, а так как в случае сукцинил-СоА-ацетоацетаттрансферазы

Сокращения: CoASH и CoASAc – коэнзим А и его ацетильное производное; *D*-Pant – *D*-пантетеин (*N*-(*D*-пантотенил)аминоэтилмеркаптан); Put – путресцин (1,4-диаминобутан); Spm – спермин (1,12-диамино-4,9-диазадодекан); Spd – спермидин (1,8-диамино-4-азаоктан); нор-Spd – норспермидин (1,7-диамино-4-азагептан); SSAT – спермин/спермидин N^1 -ацетилтрансфераза.

Автор для переписки (тел.: +7 (499) 135-60-65; факс: +7 (499) 135-14-05; эл. почта: alexkhom@list.ru).

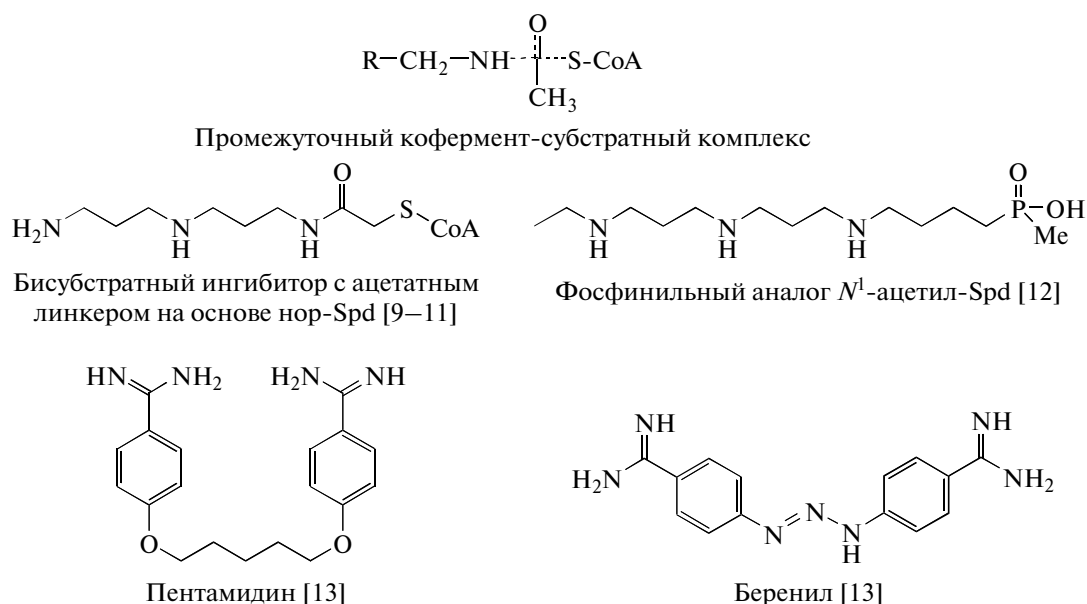


Рис. 1. Структура промежуточного кофермент-субстратного комплекса и некоторые ингибиторы спермидин/спермин- N^1 -ацетилтрансферазы (SSAT).

он весьма значителен [14], то в настоящей работе описаны новые конъюгаты полиаминов не только с коэнзимом А, но и с *D*-пантетеином — последние могли бы проникать в клетку существенно эффективнее “бисубстратных ингибиторов” на основе коэнзима А. Для получения целевых ингибиторов был использован набор гидроксил-аминсодержащих аналогов Spm и Spd (рис. 2) с концевой аминооксигруппой [15–17], что позволило, используя ацетоновый линкер, синтезировать конъюгаты коэнзима А и *D*-пантетеина не только с симметричными, но и с несимметричными аналогами Spm и Spd. Обсуждаются результаты взаимодействия полученных ингибиторов с SSAT.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одной из традиционных задач биохимии полиаминов является разработка методов истощения внутриклеточного пула Spm и Spd, учитывая их повышенное содержание в опухолевых клетках по сравнению с нормальными, и необходимость полиаминов для размножения болезнетворных трипаносоматидов (*Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei gambiense*, *Leishmania donovani* и т.п.) [18]. Для решения этой задачи используются два основных подхода: создание разнообразных специфических ингибиторов ферментов биосинтеза полиаминов [19, 20] и супериндукция SSAT — скоростьопределяющего фермента катаболизма полиаминов. Последний подход оказался более

эффективным — использование терминально бис-алкилированных производных Spm и его гомологов позволяло повышать активность SSAT в клетках в десятки и сотни раз, а большинство из этих соединений обладали еще и выраженной цитостатической активностью [21]. Поэтому интерес к созданию специфических ингибиторов SSAT был невелик, и спектр известных к настоящему времени ингибиторов фермента весьма ограничен. Например, противопаразитарные препараты Беренил (Berenil®) и Пентамидин (Pentamidine®) (рис. 1), ингибируют рекомбинантную SSAT человека с K_i 2.0 и 2.4 мкМ соответственно, однако механизм действия этих бисарилгуанидинов практически не исследован [13].

Поскольку SSAT-реакция протекает путем прямого переноса ацетильной группы с CoASAc на субстрат, то для ингибирования фермента были синтезированы конъюгаты коэнзима А и симметричных полиаминов, Spm и нор-Spd, с использованием ацетатного линкера [10]. Наиболее активным был конъюгат коэнзима А с нор-Spd (рис. 1), имевший IC_{50} 0.3 мкМ, тогда как соответствующее производное Spm было на порядок менее активным. Это хорошо согласуется со сродством Spm и нор-Spd к SSAT; для них значения K_m составляют 9.0 и 130 мкМ соответственно [10].

SSAT дискриминирует N^1 - и N^8 -аминогруппы Spd и избирательно ацетирует аминогруппу лишь в первом положении полиамина. Схемы синтезов, предложенные в работах [9–11] были

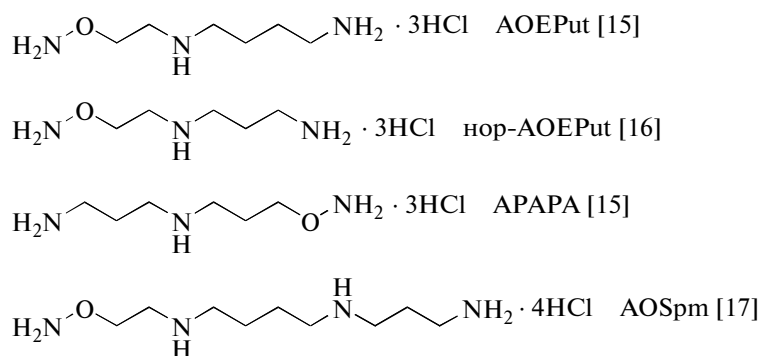


Рис. 2. Гидроксиламинсодержащие аналоги Spm и Spd.

пригодны лишь для получения конъюгатов коэнзима А с симметричными полиаминами. Позднее для получения конъюгатов коэнзима А, а также *D*-пантетеина, избирательно по N^1 - или N^8 -положениям Spd был специально разработан достаточно сложный многостадийный синтез [22], однако об активности N^1 - и N^8 -производных Spd не сообщалось.

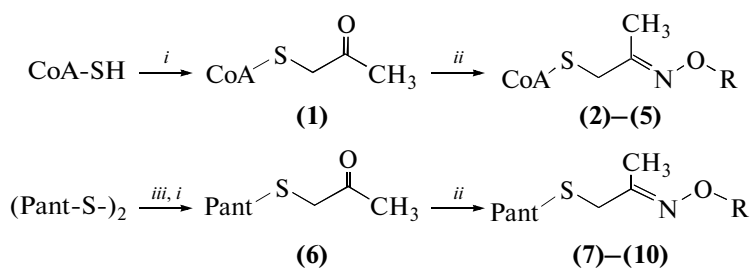
Попытки моделирования коэнзим-субстратного комплекса спермин/спермидин-ацетилтрансферазной реакции конъюгатами, не содержащими аденозинового фрагмента (ацетилкоэнзим А имеет K_m 1.5 мкМ [23]), оказались не слишком удачными и фосфинильный аналог (рис. 1), представляющий собой аналог продукта ферментативной реакции, N^1 -ацетилспермидина, действовал лишь в концентрации 0.1 мМ, т.е. на уровне сродства продукта реакции к ферменту [12].

Изначально аминоксиды аналоги Spm и Spd были синтезированы в качестве изостерных зарядодефицитных аналогов полиаминов (pK_a H_2NO -группы ~4–4.5). Они оказались субстратами или ингибиторами ферментов метаболизма полиаминов, ингибиторами их транспорта, а также обладали низкой токсичностью и регулируемой катаболической устойчивостью (см. обзоры [24, 25]).

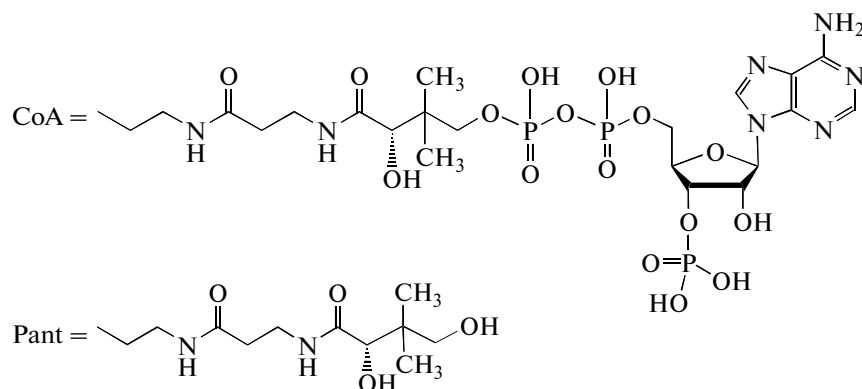
Различия в реакционной способности H_2N - и $\text{H}_2\text{N}-\text{O}$ -групп позволяют рассматривать аминоксиды аналоги полиаминов (рис. 2) в качестве удобных строительных блоков. С их помощью нам удалось реализовать простой двухстадийный синтез бисубстратных ингибиторов SSAT на основе CoASH (соединения (2)–(5)) и *D*-пантетеина (соединения (7)–(10) (схема)). На первой стадии CoASH алкилируют хлорацетоном в слабощелочной среде. Реакция проходит быстро и гладко приводит к кетону (1), который вводится в реакцию с соответствующими *O*-замещенными гидроксиламинами. Использование 1-аминоксиды-7-амино-3-азагептана (AOEPut) и 1-аминоксиды-

си-7-амино-4-азагептана (APAPA), см. рис. 2, позволило получить конъюгаты с коэнзимом А, моделирующие бисубстратные комплексы с участием аминоксиды в первом или восьмом положениях Spd соединения (2) и (3) соответственно. Использование 1-аминоксиды-3,8-диаза-11-аминоундекана (AOSpm) и 1-аминоксиды-6-амино-3-азагептана (нор-AOEPut), см. рис. 2, привело к соединениям (4) и (5), моделирующим бисубстратные комплексы, возникающие при ацетилировании Spm и нор-Spd. Обе стадии синтеза конъюгатов (2)–(5) проходили с выходами близкими к количественным – исходные и побочные продукты не детектировались при помощи ТСХ и ЯМР, что позволило получить эти соединения в количествах, необходимых для проведения ферментативных испытаний и физико-химического анализа, исходя всего лишь из 20 мг CoASH.

Для получения конъюгатов *D*-пантетеина (*D*-Pant) с аминоксиды аналогами полиаминов на первой стадии дисульфид *D*-пантетеина восстанавливали эквивалентным количеством дитиотреитола. Затем, свободные HS-группы алкилировали 0.9 эквивалентами хлорацетона и кетон (6) без выделения вводили в реакцию с 0.85 эквивалентами соответствующего *O*-замещенного гидроксиламина. Такие соотношения реагентов позволили провести все три реакции без выделения промежуточных соединений и легко очистить целевые оксимы (7)–(10) ионообменной хроматографией на сульфосмоле Dowex 50 × 8 в H^+ -форме, поскольку лишь оксимы связывались с катионитом, а все примеси и не вступивший в реакцию кетон (6) легко элюировались водой. Как и в случае конъюгатов CoASH, использование APAPA, AOEPut, AOSpm и нор-AOEPut (рис. 2) позволило получить четыре разных конъюгата *D*-Pant – соединения (7)–(10).



(2), (7): R = -CH₂CH₂NH(CH₂)₄NH₂ (4), (9): R = -CH₂CH₂NH(CH₂)₃NH₂
 (3), (8): R = -CH₂CH₂CH₂NH(CH₂)₃NH₂ (5), (10): R = -CH₂CH₂NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NH₂



i – ClCH₂COCH₃/H₂O/CH₃CN; *ii* – R₂NH/H₂O; *iii* – DTT/H₂O/MeOH.

Схема

Исследование взаимодействия синтезированных соединений (1)–(10) с рекомбинантной SSAT человека показало, что производные CoASH (2)–(5) оказались весьма эффективными ингибиторами (рис. 3), причем действовали намного активнее оксидов *S*-(2-оксопропил)-*D*-пантетеина (6) – соединения (7)–(10), которые даже в 0.1 мМ концентрациях ингибировали фермент не более чем на 20% (данные не приведены). Это однозначно свидетельствовало о значении именно аденозинового фрагмента коэнзима А для эффективного торможения. Подобная зависимость ингибирования от строения аналога *a priori* была не совсем очевидна – известно, что, например, в случае сукцинил-СоА-ацетоацетаттрансферазы, пантетеновая часть субстрата вносит значительный вклад в эффективность связывания его аналогов [14].

Соединение (3) было в 22 раза активнее кетона (1), IC₅₀ 1 мкМ и 22 мкМ соответственно (рис. 3). Кетон (1) действовал слабее любого из СоА-содержащих конъюгатов. Подобная зависимость активности от строения подтверждает вклад полиаминного фрагмента в эффективность торможения.

Наиболее эффективно действующим ингибитором SSAT оказалось соединение (3), моделирующее бисубстратный комплекс с участием аминогруппы в восьмом положении Spd, тогда как

соединение (2), моделирующее бисубстратный комплекс с участием аминогруппы в первом положении Spd, было менее активным (рис. 3). Следует отметить, что использование ацетатного линкера давало обратную картину зависимости действия ингибитора от строения полиаминного фрагмента [10], но активности лучших конъюгатов с ацетоновым и ацетатным линкерами были близки. Следовательно, эффективность действия ингибитора зависит не только от строения полиаминного фрагмента, но и от структуры линкера.

Таким образом, был получен набор новых аналогов бисубстратного комплекса SSAT-реакции на основе CoASH и *D*-пантетеина. Соединения (3) и (5) эффективно тормозили SSAT, причем их активность была сравнима с таковой для лучших из известных ранее ингибиторов фермента.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы CoASH, дисульфид *D*-пантетеина (*D*-пантетин), *трео*-1,4-димеркапто-2,3-бутандиол (дититреитол, DTT), хлорацетон, 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойная кислота) (реактив Элмана) фирмы "Aldrich" и сульфосмола Dowex 50 × 8 (100–200 меш) фирмы "BioRad". 1-Аминоокси-7-амино-3-азагептан и 1-аминоокси-7-амино-4-азагептан синтезированы согласно работе [15], 1-аминоокси-3,8-диаза-

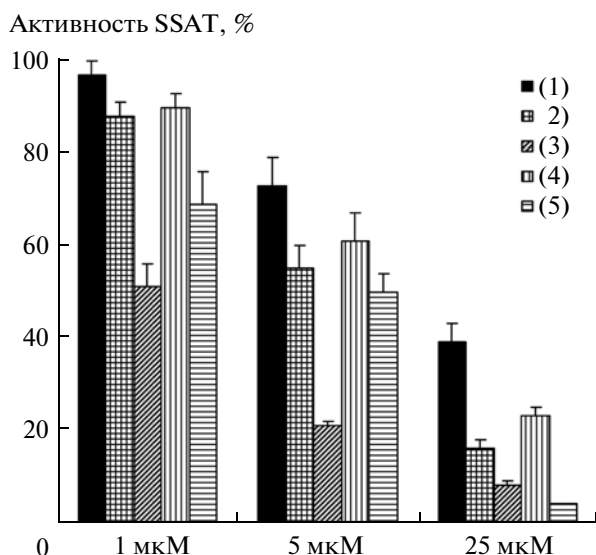


Рис. 3. Ингибирование спермидин/спермин- N^1 -ацетилтрансферазы (SSAT) конъюгатами аминоксианалогов полиаминов с CoA-SH (2)–(5), содержащими ацетоновый линкер, и кетоном (1).

11-аминоундекан – согласно работе [17], а 1-аминоокси-6-амино-3-азагексан как описано в работе [16]. Содержание меркаптогрупп в препаратах CoASH и DTT определяли при помощи 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойной кислоты), реактив Эллмана, согласно описанному в работе [26].

Выделение и определение активности рекомбинантной SSAT человека проводили согласно описанному ранее [27]. Эффективность ингибирования SSAT соединениями (1)–(10) оценивали при 4.5 мкМ концентрации CoAS-[1- 14 C]Ac (уд. акт. 60 мКи/ммоль) фирмы “PerkinElmer” в субстратной смеси.

ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) в системе: *i*-PrOH–25% NH₄OH–H₂O, 7 : 1 : 2 (А); и на пластинках Cellulose F₂₅₄ (Merck) в системе MeCN–2% AcOH, 1 : 1 (Б). Вещества на хроматограммах обнаруживали по УФ-поглощению и цветной реакцией с нингидрином.

Спектры ЯМР (δ , м.д. КССВ, Пц) регистрировали на приборе Bruker Avance 500 DRX (Германия) с рабочей частотой 500.1 МГц для ^1H -ЯМР. В качестве внутреннего стандарта использовали натриевую соль 3-(триметилсилил)-1-пропансульфонокислоты (D₂O). Концентрации аденозиновых производных (1)–(5) определяли спектрофотометрически на приборе Perkin-Elmer UV-Visible, принимая молярный коэффициент поглощения этих веществ, равным таковому для CoASAc (15000 M⁻¹ см⁻¹ [28]).

S-(2-Оксопропил)-CoA (1). К раствору 20 мг (26 мкмоль) CoA-SH в 2 мл H₂O прибавляли при перемешивании 0.025 мл (25 мкмоль) 1 М NaOH

и затем 0.25 мл 0.1 М раствора (25 мкмоль) хлорацетона в MeCN. Реакционную смесь перемешивали при 20°C 1 ч. Количественное определение SH-групп по Эллману в аликвоте реакционной смеси показало, что реакция прошла на 87.5%. К реакционной смеси прибавляли еще 0.005 мл (5 мкмоль) 1 М NaOH и 0.05 мл (5 мкмоль) 0.1 М раствора хлорацетона в MeCN и перемешивали еще 1 ч при 20°C, после чего в аликвоте реакционной смеси свободные SH-группы не определяются. Реакционную смесь упаривали досуха в вакууме масляного насоса и остаток растворяли в 2 мл H₂O, что привело к 1.11×10^{-2} М раствору (1). R_f 0.81 (Б). Вычислено для C₂₄H₄₀N₇O₁₇SP₃: 823.1404. Найдено [M + H]⁺ 824.1. Данные ^1H -ЯМР спектроскопии представлены в таблице.

Общая методика получения O-замещенных оксимов кетона (1). К 0.4 мл 1.11×10^{-2} М (4.4 мкмоль) раствора кетона (1) в H₂O прибавляли 0.045 мл 0.1 М (4.5 мкмоль) раствора гидрохлорида соответствующего аминокси аналога Spm или Spd в H₂O, pH которого доведен 2 М NH₄OH до 5.5, и реакционную смесь перемешивают в течение 2 ч при 20°C, после чего проба на свободные аминоксигруппы (реакция с пиридоксаль-5'-фосфатом, детектирование по флуоресценции) дает отрицательный результат, а ТСХ-хроматография показывает отсутствие исходного кетона (1) и образование единственного продукта. Реакционную смесь упаривали в вакууме досуха и остаток высушивали в вакууме над P₂O₅/KOH. Данные ^1H -ЯМР-спектроскопии для соединений (2)–(5) представлены в таблице.

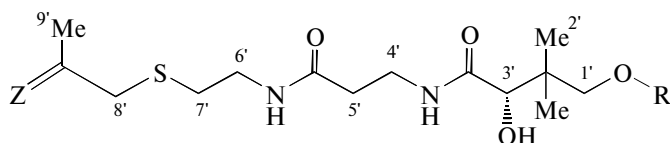
O-(7-Амино-3-аза-1-гептил)оксим S-(2-оксопропил)-CoA (2) получали исходя из кетона (1) и тригидрохлорида 1-аминоокси-7-амино-3-азагептана. R_f 0.61 (Б). Вычислено для C₃₀H₅₅N₁₀O₁₇SP₃: 952.2683. Найдено [M + H]⁺ 953.3.

O-(7-Амино-4-аза-1-гептил)оксим S-(2-оксопропил)-CoA (3) получали исходя из кетона (1) и тригидрохлорида 1-аминоокси-7-амино-4-азагептана. R_f 0.57 (Б). Вычислено для C₃₀H₅₅N₁₀O₁₇SP₃: 952.2683. Найдено [M + H]⁺ 953.3.

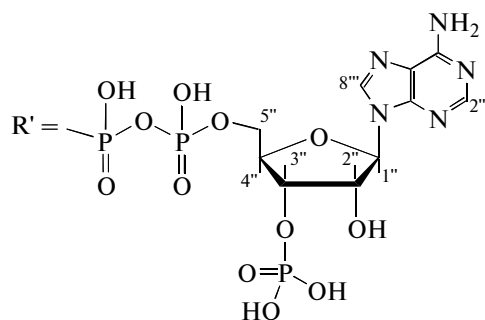
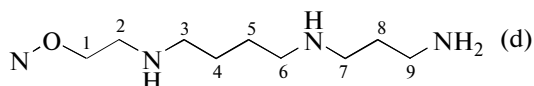
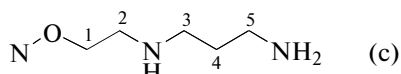
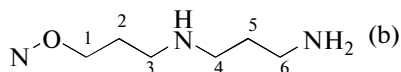
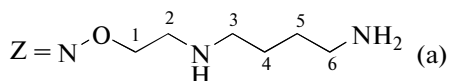
O-(6-Амино-3-аза-1-гексил)оксим S-(2-оксопропил)-CoA (4) получали исходя из кетона (1) и тригидрохлорида 1-аминоокси-6-амино-3-азагексана. R_f 0.58 (Б). Вычислено для C₂₉H₅₃N₁₀O₁₇SP₃: 938.2526. Найдено [M + H]⁺ 939.3.

O-(11-Амино-3,8-диаза-1-ундецил)оксим S-(2-оксопропил)-CoA (5) получали исходя из кетона (1) и тетрагидрохлорида 1-аминоокси-11-амино-3,8-диазаундекана. R_f 0.47 (Б). Вычислено для C₃₃H₆₂N₁₁O₁₇SP₃: 1009.3262. Найдено [M + H]⁺ 1010.3.

S-(2-Оксопропил)-D-пантетеин (6). К раствору 1.0 г (1.8 ммоль) дисульфида D-пантетеи-

Данные ^1H -ЯМР (D_2O) для соединений (1)–(10)

- (1): Z = O; R = R' (6): Z = O; R = H
 (2): Z = a; R = R' (7): Z = a; R = H
 (3): Z = b; R = R' (8): Z = b; R = H
 (4): Z = c; R = R' (9): Z = c; R = H
 (5): Z = d; R = R' (10): Z = d; R = H



Протон	Хим. сдвиг протонов в соединениях (1)–(10), м.д.									
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
2'''	8.24	8.29	8.28	8.29	8.28	—	—	—	—	—
8'''	8.53	8.57	8.56	8.57	8.56	—	—	—	—	—
1''	6.17	6.17	6.19	6.17	6.19	—	—	—	—	—
2''	4.85	4.85	4.85	4.85	4.87	—	—	—	—	—
3''	4.85	4.85	4.85	4.85	4.83	—	—	—	—	—
4''	4.59	4.60	4.60	4.60	4.60	—	—	—	—	—
5''	4.24	4.25	4.27	4.26	4.27	—	—	—	—	—
1'a	3.82	3.84	3.85	3.83	3.85	3.42	3.51	3.51	3.50	3.51
1'b	3.55	3.59	3.61	3.60	3.61	3.42	3.40	3.40	3.38	3.40
2'-Me	0.88	0.91	0.91	0.91	0.92	0.86	0.92	0.93	0.91	0.92
2'-Me	0.75	0.79 ¹⁾	0.79 ²⁾	0.79 ³⁾	0.80 ⁴⁾	0.86	0.89	0.90	0.88	0.89
3'	4.00	4.01	4.03	4.01	4.03	3.89	3.99	4.00	3.98	3.99
4'	3.46	3.48	3.51	3.47	3.50	3.44	3.52	3.53	3.52	3.52
5'	2.45	2.46	2.49	2.46	2.49	2.38	2.51	2.52	2.50	2.52
6'	3.30	3.30	3.33	3.30	3.33	3.30	3.38	3.38	3.37	3.38
7'	2.60	2.59	2.60	2.59	2.62	2.58	2.66	2.65	2.65	2.66
8'	3.52	3.24 ¹⁾	3.25 ²⁾	3.24 ³⁾	3.26 ⁴⁾	3.34	3.31	3.31 ⁵⁾	3.31	3.31
9'	2.29	1.94 ¹⁾	1.94 ²⁾	1.94 ³⁾	1.96 ⁴⁾	2.26	2.02	2.00 ⁵⁾	2.00	2.01
1	—	4.31	4.18 ²⁾	4.31 ³⁾	4.33 ⁴⁾	—	4.35	4.19 ⁵⁾	4.35 ⁶⁾	4.36
2	—	3.36	2.07	3.38	3.38	—	3.42	2.10	3.42	3.40
3	—	3.13	3.20	3.20	3.16	—	3.18	3.21	3.22	3.18
4	—	1.78	3.20	2.14	1.85	—	1.82	3.21	2.13	1.83
5	—	1.76	2.17	3.11	1.85	—	1.80	2.14	3.12	1.81
6	—	3.03	3.20	—	3.16	—	3.07	3.14	—	3.14
7	—	—	—	—	3.16	—	—	—	—	3.14
8	—	—	—	—	2.17	—	—	—	—	2.15
9	—	—	—	—	3.16	—	—	—	—	3.14

Из-за R—O—N=C< двойной связи, химические сдвиги протонов минорного изомера регистрируются при 1) 0.80, 3.40 и 1.95 м.д.; 2) 0.82, 3.37, 1.95 и 4.13 м.д.; 3) 0.81, 3.35, и 1.95, 4.26 м.д.; 4) 0.82, 3.42, 1.97 и 4.27 м.д.; 5) 3.46, 2.01 и 4.15 м.д.; 6) 4.31 м.д.

на в 7.2 мл MeOH прибавляли 2.17 мл 0.827 М (1.8 ммоль) раствора дитиотреитола (концентрация определена титрованием SH-групп по Эллману) в H₂O, pH доводили 0.2 М раствором NaOH до ~8.0 и оставляли при 20°C на 2 ч. К реакционной смеси при перемешивании прибавляли 0.263 мл (3.3 ммоль) свежеперегнанного хлорацетона и затем 1.8 мл (3.6 ммоль) 2 М NaOH порциями по 0.2 мл, поддерживая температуру реакционной смеси не выше 20°C. Перемешивание продолжали еще 30 мин, реакционную смесь упаривали в вакууме досуха, остаток растворяли в 6.6 мл MeOH, что дало 0.5 М раствор соединения (6), считая на введенный в реакцию хлорацетон. Вычислено для C₂₉H₅₃N₁₀O₁₇SP₃: 334.1556. Найдено [M + H]⁺ 335.2. Данные ¹H-ЯМР спектроскопии представлены в таблице.

Общая методика получения O-замещенных оксимов кетона (6). К 2.0 мл (1.0 ммоль) 0.5 М раствора кетона (6) в MeOH прибавляли 1 мл 0.85 М (0.85 ммоль) водного раствора гидрохлорида соответствующего аминоксианалога Spm или Spd, pH которого был доведен 2 М NH₄OH до ~5.5. Реакционную смесь перемешивали в течение 3 ч при 20°C, упаривали в вакууме досуха, остаток растворяли в H₂O и оксимы (7)–(10) выделяли колонной хроматографией на сульфосмолу Dowex 50 × 8 (100–200 меш) в H⁺-форме (объем смолы 8 мл) последовательно элюируя H₂O (40 мл) и смесь 25% NH₄OH–H₂O, 1 : 20. Фракции, содержащие продукт упаривали в вакууме досуха и остаток высушивали в вакууме над P₂O₅. Данные ¹H-ЯМР спектроскопии для соединений (7)–(10) представлены в таблице.

O-(7-Амино-3-аза-1-гептил)оксим S-(2-оксопропил)-D-пантетеина (7) получали исходя из кетона (6) и тригидрохлорида 1-аминокси-7-амино-3-азагептана. Выход 0.39 г (85%); R_f 0.35 (A). Вычислено для C₂₀H₄₁N₅O₅S: 463.2819. Найдено [M + H]⁺ 464.3.

O-(7-Амино-4-аза-1-гептил)оксим S-(2-оксопропил)-D-пантетеина (8) получали исходя из кетона (6) и тригидрохлорида 1-аминокси-7-амино-4-азагептана. Выход 0.38 г (82%); R_f 0.31 (A). Вычислено для C₂₀H₄₁N₅O₅S: 463.2819. Найдено [M + H]⁺ 464.3.

O-(6-Амино-3-аза-1-гексил)оксим S-(2-оксопропил)-D-пантетеина (9) получали исходя из кетона (6) и тригидрохлорида 1-аминокси-6-амино-3-азагексана. Выход 0.34 г (75%); R_f 0.38 (A). Вычислено для C₁₉H₃₉N₅O₅S: 449.2663. Найдено [M + H]⁺ 450.3.

O-(11-Амино-3,8-диаза-1-ундецил)оксим S-(2-оксопропил)-D-пантетеина (10) получали исходя из 0.2 мл (0.1 ммоль) 0.5 М раствора кетона (6) в MeOH и тетрагидрохлорида 1-аминокси-11-

амино-3,8-диазаундекана. Элюция H₂O и смесью 25% NH₄OH–H₂O, 1 : 10. Выход 0.039 г (75%); R_f 0.12 (A). Вычислено для C₂₃H₄₈N₆O₅S: 520.3410. Найдено [M + H]⁺ 521.3.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного контракта № 11.519.11.2017 Министерства Образования и Науки Российской Федерации, гранта РФФИ № 12-04-0148, а также гранта “Стратегическое финансирование” Университета Восточной Финляндии, г. Куопио.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wolfenen R. // Bioorg. Med. Chem. 1999. V. 7. P. 647–652.
2. Müller I.B., Wu F., Bergmann B., Knöckel J., Walter R.D., Gehring H., Wrenger C. // PLoS ONE. 2009. V. 4. P. e4406.
3. Khomutov R.M., Dixon H.B., Vdovina L.V., Kirpichnikov M.P., Morozov Y.V., Severin E.S., Khurs E.N. // Biochem. J. 1971. V. 124. P. 99–106.
4. Somu R.V., Boshoff H., Qiao C., Bennett E.M., Barry C.E. III, Aldrich C.C. // J. Med. Chem. 2006. V. 49. P. 31–34.
5. Kappler F., Vruthula V.M., Hampton A. // J. Med. Chem. 1987. V. 30. P. 1599–1603.
6. Hickman A.B., Namboodiri M.A.A., Klein D.C., Dyda F. // Cell. 1999. V. 97. P. 361–369.
7. Brown M.J.B., Mensah L.M., Doyle M.L., Broom N.J.P., Osbourne N., Forrest A.K., Richardson C.M., O'Hanlon P.J., Pope A.J. // Biochemistry. 2000. V. 39. P. 6003–6011.
8. Yu M., Magalhaes M.L.B., Cook P.F., Blanchard J.S. // Biochemistry. 2006. V. 45. P. 14788–14794.
9. Cullis P.M., Wolfenden R., Cousens L.S., Alberts B.M. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. P. 12165–12169.
10. Ervin B., Persson L., Pegg A.E. // Biochemistry. 1984. V. 23. P. 4250–4255.
11. Hegde S.S., Chandler J., Vetting M.W., Yu M., Blanchard J.S. // Biochemistry. 2007. V. 46. P. 7187–7195.
12. Wu R., Saab N.H., Hyang H., Wiest L., Pegg A.E., Casero R.A., Woster P.M. // Bioorg. Med. Chem. 1996. V. 4. P. 825–836.
13. Libby P.R., Porter C.W. // Biochem. Pharmacol. 1992. V. 44. P. 830–832.
14. Fierke C.A., Jencks W.P. // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. P. 7603–7606.
15. Khomutov A.R., Vepsalainen J., Shvetsov A.S., Hyvonen T., Keinanen T.A., Pustobaev V.N., Eloranta T.O., Khomutov R.M. // Tetrahedron. 1996. V. 52. P. 13751–13766.
16. Khomutov A.R., Svetsov A.S., Vepsalainen J.J., Kritzun A.M. // Tetrahedron Lett. 2001. V. 42. P. 2887–2889.
17. Симонян А.Р., Вепсалайнен Й., Хомутов А.Р. // Биоорг. химия. 2006. Т. 32. С. 643–650. [Simonyan A.R., Vepsalainen J., Khomutov A.R. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2006. V. 32. P. 578–585.]

18. Casero R.A., Marton L.J. // Nat. Rev. Drug Discov. 2007. V. 6. P. 373–390.
19. Seiler N. // Curr. Drug Targets. 2003. V. 4. P. 537–564.
20. Wallace H.M., Fraser A.V. // Amino Acids. 2004. V. 26. P. 353–365.
21. Casero R.A., Woster P.M. // J. Med. Chem. 2009. V. 52. P. 4551–4573.
22. Roblot G., Wylde R., Martin A., Parello J. // Tetrahedron. 1993. V. 29. P. 6381–6398.
23. Della Ragione F., Pegg A.E. // Biochemistry. 1982. V. 21. P. 701–707.
24. Хомутов А.Р. // Биохимия. 2002. Т. 67. С. 1403–1412.
25. Weisell J., Hyvonen M.T., Alhonen L., Vepsalainen J., Keinanen T.A., Khomutov A.R. // Curr. Pharm. Design. May 16 [Epub ahead of print] (В печати).
26. Ellman G.L. // Arch. Biochem. Biophys. 1959. V. 82. P. 70–77.
27. Bernacki R.J., Oberman E.J., Seweryniak K.E., Atwood A., Bergeron R.J., Porter C.W. // Clin. Cancer Res. 1995. V. 1. P. 847–857.
28. Cox B.G., Hammes G.G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. P. 4233–4237.

Stable Analogues of Coenzyme-Substrate Complex of Spermidine/Spermine-*N*¹-Acetyltransferase Reaction. Synthesis, Interaction with the Enzyme

T. A. Keinanen*, T. Hyvonen**, J. Vepsalainen*, L. Alhonen**,
A. R. Khomutov***,#, and J. Janne**

#Phone: +7 (499) 135-60-65; fax: (499) 135-14-05; e-mail: alexkhom@list.ru

*School of Pharmacy, Biocenter Kuopio, University of Eastern Finland, Kuopio

**Virtanen Institute of Molecular Sciences, University of Eastern Finland, Kuopio

***Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

Convenient two-step synthesis of conjugates of HS-CoA and *D*-pantetheine with aminoxy analogues of Spm, Spd and Put was suggested. The use of acetone linker provided target conjugates with quantitative yields. The activity of CoA-derived “bisubstrate” inhibitors being active at microM concentrations was at least 100 times better than that of corresponding derivatives of *D*-pantetheine.

Keywords: spermidine/spermine-*N*¹-acetyltransferase, inhibitors, *O*-substituted hydroxylamines, Ac-CoA, polyamine analogues