

УДК 577.113.3

ИССЛЕДОВАНИЕ ПУТЕЙ СИНТЕЗА ЦИТОЗИНОВОГО МОНОМЕРА ОТРИЦАТЕЛЬНО ЗАРЯЖЕННЫХ ПЕПТИДНО-НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

А.В. Баранов, Н.С. Цвид, В.И. Лукьянченко, Д.И. Прохоров,
Ю.Г. Кириллова, В.И. Швец

Впервые получен и охарактеризован цитозинсодержащий мономер отрицательно заряженных ПНК и проведена оптимизация путей его синтеза.

ВВЕДЕНИЕ

Полиамидные ДНК-миметики (пептидно-нуклеиновые кислоты, или ПНК) [1] находят в настоящее время широкое применение в качестве молекулярного инструмента для исследования функциональной роли нуклеиновых кислот благодаря высокой химической и биологической устойчивости и уникальным гибридационным свойствам. Тем не менее, до сих пор остается актуальным поиск новых миметиков ДНК, обладающих другими свойствами и способных к созданию упорядоченных комплексов с природными НК. Наши усилия в этой области направлены на создание отрицательно заряженных ПНК (ОЗ ПНК). В нашей лаборатории в препаративных количествах были наработаны тиминсодержащие мономеры ОЗ ПНК [2-4], из которых на твердой фазе были получены гомотиминовые декамеры ОЗ ПНК. Данные предварительных экспериментов по гибридизации показали высокое сродство полученных нами тиминсодержащих декамеров по отношению к гомоадениновым декамерам ДНК, причем степень связывания зависела от ионной силы раствора. Целью настоящего исследования явился синтез цитозинового мономера, включение которого в олигомеры ОЗ ПНК позволит в дальнейшем, с одной стороны, повысить температуру плавления дуплекса (пара G-C связана тремя водородными связями, тогда как пара A-T – двумя), а с другой стороны – оценить специфичность гибридизации ОЗ ПНК как с нуклеиновыми кислотами, так и с «классическими» ПНК.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Первоначально синтез целевого мономера (1) (схема 1) проводили по схеме, включающей конденсацию псевдопептида (3) [4] с Cbz-защищенным карбоксиметилированным производным цитозина (2), полученным из цитозина по известному методу [5]. Однако выход конденсации менее 10% оказался неприемлемым для дальнейшего препаративного получения мономера.

Другая стратегия синтеза мономера предполагала *N*-алкилирование ^{Cbz}Cyt (4) бромацильным производным псевдопептида (5) [6]. Последний получали, действуя на псевдопептидный остов (3) бромацетилбромидом в хлористом метиле в присутствии ТЕА в качестве третичного основания, либо бромуксусной кислотой по методу смешанных ангидридов с ИВСФ. Первый способ оказался предпочтительнее вследствие простоты проведения реакции и большего выхода (86%) целевого продукта (5).

Структуру соединения (5) подтверждали данными ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектроскопии. Было проведено моделирование химических сдвигов для двух альтернативных продуктов указанной реакции замещения в программе GAMESS (US) [7]. Геометрия ключевых фрагментов молекулы была оптимизирована с использованием гибридного *ab initio* DFT-метода B3LYP с базисом 3-21G, химические сдвиги были получены GIAO-модулем этой же программы [8] с использованием комбинации метода и базиса RHF/3-21G. По результатам расчета сигналы протонов метиленовой группы остатка уксусной кислоты мало отличаются в случае двух возможных путей замещения, однако сигналы

химических сдвигов для рассматриваемых атомов углерода отличаются значительно (рис. 1), что указывает на необходимость тщательного анализа именно ^{13}C -ЯМР-спектра. Сравнив экспериментально полученные сдвиги с рассчитанными

данными, мы пришли к выводу, что в ходе реакции осуществляется именно ацилирование, а не алкилирование псевдопептида (3) производным бромуксусной кислоты, с образованием целевого продукта (5).

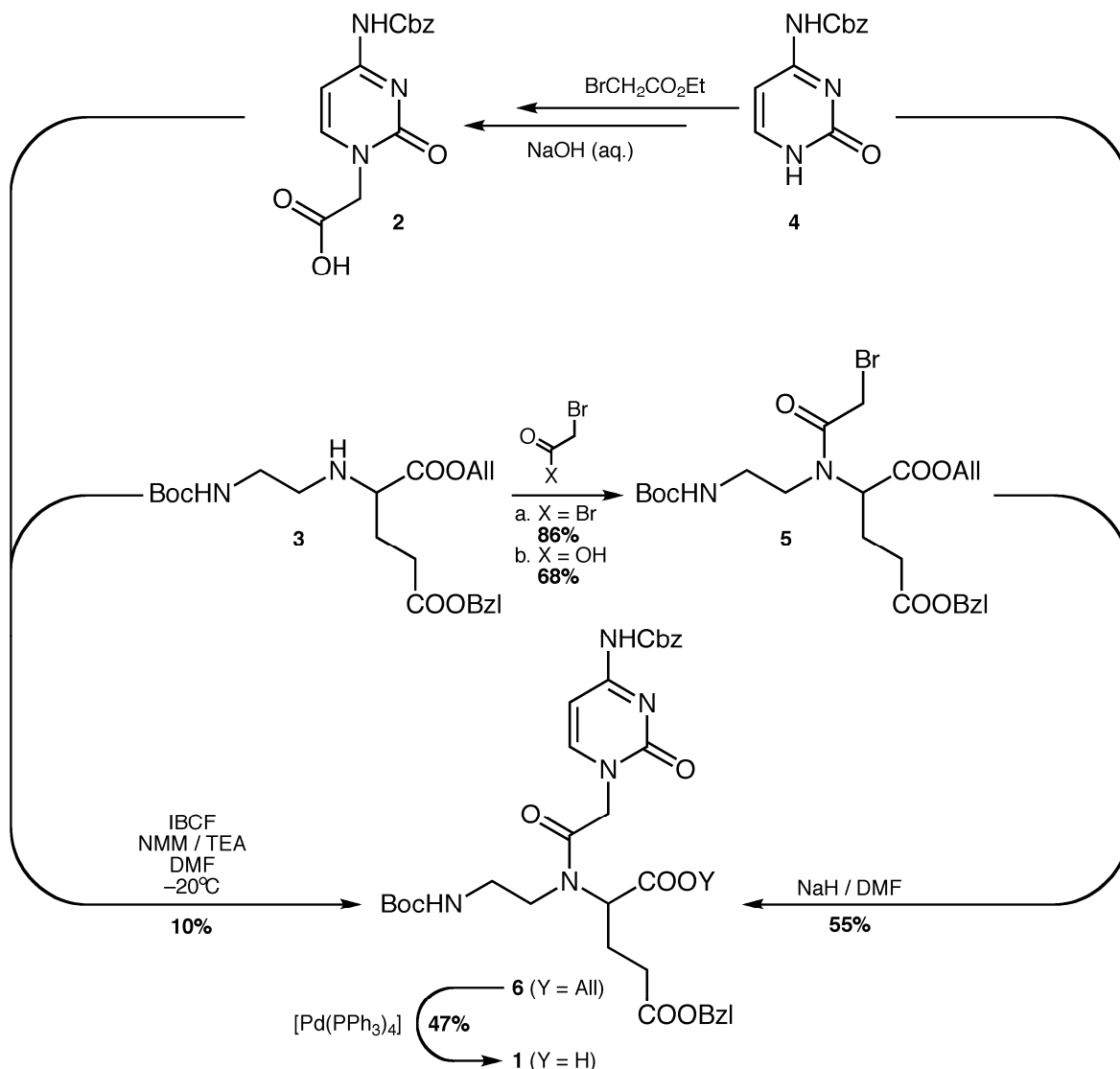


Схема 1. Пути синтеза цитозинсодержащего мономера ОЗ ПНК.

Алкилирование $\text{C}^{\text{Cbz}}\text{Cyt}$ (4) бром-ацильным псевдопептидным производным (5) является региоселективным, поэтому среди продуктов реакции наблюдался исключительно продукт замещения по N^1 положению пиримидинового кольца (6). Цитозинсодержащий полностью защищенный мономер ОЗ ПНК выделяли с помощью колоночной хроматографии. Выход составил 55%. α -Аллиловый, γ -бензиловый диэфир N -[2-(*трет*-бутилоксикарбонил)аминоэтил]- N' -[N^4 -

(бензилоксикарбонил)-цитозин-1-илацетат]- L -глутаминовой кислоты (1) был получен удалением α -аллильной защиты с помощью палладиевого катализатора – тетраakis(трифенилфосфин)палладия (0) $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$. Выход в реакции составил 47%.

Таким образом, была подобрана и отработана оптимальная схема синтеза цитозинсодержащего мономера ОЗ ПНК, пригодная также, на наш взгляд, для получения и других мономеров заряженных ПНК.

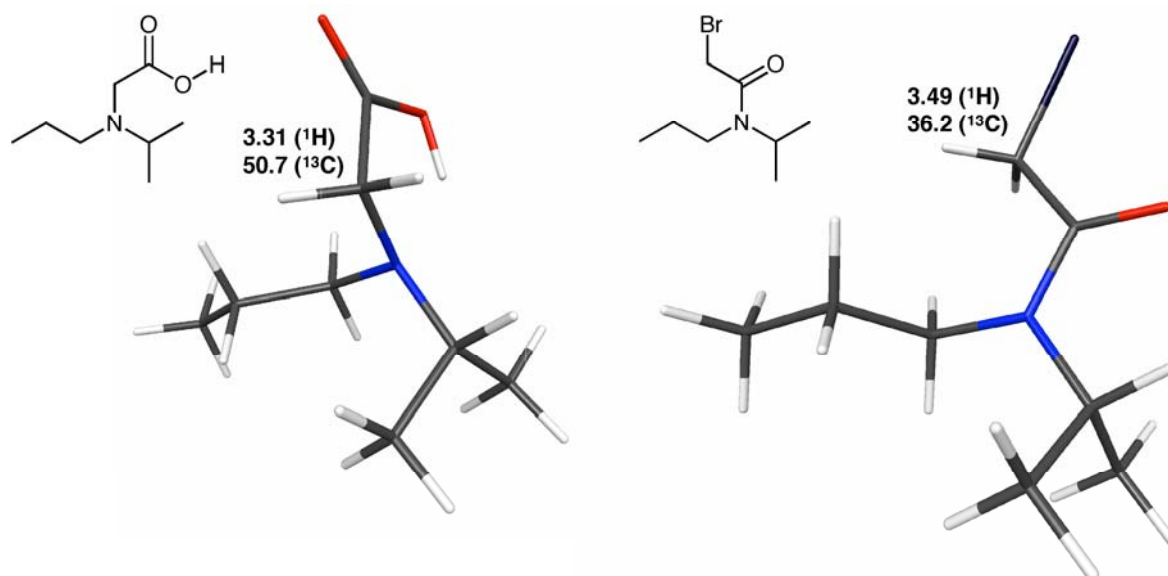


Рис. 1. Модельные структуры ключевых фрагментов двух возможных продуктов, образующихся либо за счет алкилирования (слева), либо за счет ацилирования (справа) псевдопептида (**3**) бромацетилбромидом. Для случая алкилирования предполагается, что в ходе обработки реакционной массы бромгидридная группа гидролизуеться до карбоксильной. Указаны вычисленные значения химических сдвигов (δ , м. д.).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали следующие реактивы и растворители категории ч.д.а.: хлористый метилен, триэтиламин, гексан, этилацетат, гексан, диметилформамид, тетрагидрофуран (Реахим, Россия), бромацетилбромид, гидрид натрия, $[Pd(PPh_3)_4]$, морфолин (Aldrich, США). Следующие растворители и реактивы были очищены перед использованием: хлористый метилен (перегоняли над P_2O_5), триэтиламин (перегоняли над KOH), диметилформамид (перегоняли над фталевым ангидридом в вакууме), тетрагидрофуран (дважды перегоняли над KOH, непосредственно перед реакцией – один раз над $LiAlH_4$). Спектры ЯМР полученных соединений регистрировали при 25°C на импульсном Фурье-спектрометре Bruker DPX-300 (Германия) с рабочей частотой 300 МГц для 1H - и 75 МГц для ^{13}C -ЯМР-спектров в $CDCl_3$. Химические сдвиги протонов приведены в миллионных долях относительно внутреннего стандарта тетраметилсилана (δ 0.000 м. д.). При описании 1H -ЯМР-спектров приняты следующие сокращения: s – синглет, d – дублет, t – триплет, q – квартет, m – мультиплет.

Протекание реакций контролировали с помощью ТСХ на пластинках Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Германия). Колоночную хроматографию при атмосферном давлении проводили на сорбенте Silica gel 60 (0.040–0.063) (Merck, Германия). Растворители удаляли на ротационном вакуумном испарителе (20 мм рт. ст.). Вещества высушивали в высоком вакууме масляного насоса (0.5 мм рт. ст.).

α -Аллиловый, γ -бензиловый диэфир *N*-[2-(*трет*-бутилоксикарбонил)аминоэтил]-*N'*-бромацетил-*L*-глутаминовой кислоты (**5**)

К раствору α -аллилового, γ -бензилового диэфира *N*-[2-(*трет*-бутилоксикарбонил)аминоэтил]-*L*-глутаминовой кислоты (**3**) (900 мг, 2.14 ммоль) в 50 мл хлористого метилена добавляли ТЕА (0.33 мл, 240 мг, 2.35 ммоль) и бромацетилбромид (0.20 мл, 470 мг, 2.35 ммоль). Через 3 ч растворитель удаляли, остаток растворяли в 40 мл этилацетата и полученный раствор последовательно промывали водой (2 \times 20 мл), 20%-ным раствором лимонной кислоты (2 \times 10 мл), концентрированным раствором гидрокарбоната калия (2 \times 10 мл), насыщенным раствором хлорида натрия (2 \times 10 мл).

Органическую фазу сушили (Na_2SO_4), растворитель удаляли. Продукт (**5**) хроматографировали на силикагеле (элюент: гексан – этилацетат, 2 : 3), вещество сушили в вакууме (0.5 мм рт. ст.). Выход: 1.00 г (86%). R_f 0.6 (гексан – этилацетат, 1 : 1). ^1H -ЯМР-спектр (δ , м. д.): 7.35 (5H, m, C_6H_5); 5.91 (1H, m, $\alpha\text{-OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 5.36 (2H, m, $\alpha\text{-OCH}_2\text{-CH}=\text{CH}_2$); 5.12 (2H, q, $-\text{CH}_2\text{Ph}$); 4.15 (2H, m, $\alpha\text{-OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 3.91 (1H, m, $\alpha\text{-CH}(\text{Glu})$); 3.75 (1H, m, $\text{WocHNCH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 3.62 (1H, m, $\text{WocHNCH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 3.25 (2H, m, $\text{WocHNCH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 3.07 (2H, m, Br-CH_2); 2.65–2.25 (4H, m, $\gamma\text{-CH}_2(\text{Glu})$, $\beta\text{-CH}_2(\text{Glu})$); 1.39 (9H, s, tBu). ^{13}C -ЯМР-спектр (CDCl_3 , δ , м. д.): 23.2, 25.6, 27.9, 29.6, 38.2, 49.5, 59.0, 66.2, 66.3, 65.8, 79.3, 118.8, 127.9, 128.0, 128.1, 131.0, 135.3, 155.5, 167.3, 169.8, 172.5.

α -Аллиловый, γ -бензиловый диэфир N -[2-(*трет*-бутилоксикарбонил)аминоэтил]- N' -[N^4 -(бензилоксикарбонил)-цитозин-1-илацетат]- L -глутаминовой кислоты (6**)**

Дисперсию NaN (53 мг, 1.22 ммоль) в минеральном масле промывали гексаном, после чего добавляли раствор N^4 -(бензилоксикарбонил)цитозина (**4**) (300 мг, 1.22 ммоль) в 3 мл безводного DMF. Через 5 мин к смеси прибавляли раствор соединения (**5**) (330 мг, 0.61 ммоль) в 2 мл безводного DMF. Через 24 ч растворитель удаляли, полученное масло растворяли в 15 мл этилацетата и промывали водой (2 \times 10 мл) и насыщенным раствором хлорида натрия (2 \times 10 мл). Органическую фазу сушили (Na_2SO_4), растворитель удаляли. Продукт (**6**) выделяли колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: этилацетат), вещество сушили в вакууме (0.5 мм рт. ст.). Выход: 215 мг (55%). R_f 0.7 (этилацетат). ^1H -ЯМР-спектр (δ , м. д.): 8.05 (1H, d, 6-НСyt); 7.05 (1H, d, 5-НСyt); 7.44–7.29 (10H, m, 2 \times C_6H_5); 5.89 (1H, m, $\alpha\text{-OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 5.52 (1H, m, NH-Woc); 5.41–4.94 (10H, m, $\alpha\text{-OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, 2 \times $-\text{CH}_2\text{Ph}$, $\text{Cyt-CH}_2\text{C}=\text{O}$, $\alpha\text{-OCH}_2\text{-CH}=\text{CH}_2$); 3.99 (1H, m, $\alpha\text{-CH}(\text{Glu})$); 3.75 (1H, m,

$\text{WocHNCH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 3.47 (1H, m, $\text{WocHNCH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 3.25 (2H, m, $\text{WocHN-CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 2.45 (3H, m, $\gamma\text{-CH}_2(\text{Glu})$, $\beta\text{-CH}_2(\text{Glu})$); 2.23 (1H, m, $\beta\text{-CH}_2(\text{Glu})$); 1.39 (9H, s, tBu). ^{13}C -ЯМР-спектр (δ , м. д.): 24.4, 28.4, 30.8, 38.4, 45.0, 51.4, 60.3, 65.9, 66.4, 66.5, 79.5, 95.7, 118.2, 127.1, 127.6, 128.9, 132.1, 136.1, 141.2, 153.7, 155.9, 159.0, 162.9, 164.2, 171.5, 173.1.

γ -Бензиловый эфир N -[2-(*трет*-бутилоксикарбонил)аминоэтил]- N' -[N^4 -(бензилоксикарбонил)-цитозин-1-илацетат]- L -глутаминовой кислоты (1**)**

К раствору 206 мг (0.29 ммоль) соединения (**6**) в 2.4 мл тетрагидрофурана в атмосфере Ar добавляли 254 мг (0.25 мл, 2.92 ммоль) морфолина и 32.8 мг (0.029 ммоль) $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$. Через 12 ч растворитель удаляли, остаток растворяли в этилацетате (10 мл) и промывали последовательно насыщенным раствором хлорида натрия, доведенным до pH 3.0 с помощью 0.1 М раствора гидросульфата калия, (3 \times 7 мл) и насыщенным раствором хлорида натрия (3 \times 7 мл). Органический слой сушили (Na_2SO_4), растворитель удаляли. Полученное желтое масло растворяли в 5 мл этилацетата и добавляли гексан до завершения процесса кристаллизации. Выпавшее кристаллическое вещество (**1**) отфильтровывали и сушили в вакууме (0.5 мм. рт. ст.). Выход: 90 мг (47%). R_f 0.43 (хлористый метилен – метанол – уксусная кислота, 9 : 1 : 0.1). ^1H -ЯМР-спектр (δ , м. д.): 8.05 (1H, d, 6-НСyt); 7.05 (1H, d, 5-НСyt); 7.44–7.29 (10H, m, 2 \times C_6H_5); 5.52 (1H, m, NH-Woc); 5.41–4.94 (6H, m, 2 \times $-\text{CH}_2\text{Ph}$, $\text{Cyt-CH}_2\text{C}=\text{O}$); 3.99 (1H, m, $\alpha\text{-CH}(\text{Glu})$); 3.75 (1H, m, $\text{WocHNCH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 3.47 (1H, m, $\text{WocHN-CH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 3.25 (2H, m, $\text{WocHNCH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 2.45 (3H, m, $\gamma\text{-CH}_2(\text{Glu})$, $\beta\text{-CH}_2(\text{Glu})$); 2.23 (1H, m, $\beta\text{-CH}_2(\text{Glu})$); 1.39 (9H, s, tBu). ^{13}C -ЯМР-спектр (δ , м. д.): 24.8, 31.2, 39.2, 45.7, 51.7, 62.0, 67.9, 79.0, 95.8, 128.2, 128.4, 128.4, 132.1, 135.5, 149.7, 153.1, 156.1, 156.4, 163.6, 163.7, 168.4, 173.4.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide / P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchard // *Science*. – 1991. – № 254. – P. 1497 – 1500.
2. Синтез тиминсодержащего мономера отрицательно заряженных ПНК / Д. И. Прохоров, Н. П. Боярская, Ю. Г. Кириллова, А. Н. Тевяшова, О. В. Есипова, Е. Н. Звонкова, В. И. Швец // *Хим.-фарм. журнал*. – 2005. – Т. 39, № 6. – С. 3 – 43.
3. Synthesis of protected pseudopeptides from dicarboxylic amino acids by Mitsunobu condensation / N. P. Boyarskaya, D. I. Prokhorov, Yu. G. Kirillova, E. N. Zvonkova, V. I. Shvets // *Tetrahedron Lett.* – 2005. – Vol. 46, № 43. – P. 7359 – 7362.
4. Синтез двух новых тиминсодержащих мономеров отрицательно заряженных ПНК / Н. П. Боярская, Ю. Г. Кириллова, Д. И. Прохоров, Е. А. Стотланд, Е. Н. Звонкова, В. И. Швец // *Доклады Академии наук*. – 2006. – Т. 408, № 1. – С. 55 – 58.
5. Synthesis of peptide nucleic acid monomers containing the four natural nucleobases: thymine, cytosine, adenine, and guanine and their oligomerization / K. Dueholm [et al] // *J. Org. Chem.* – 1994. – Vol. 59, № 19. – P. 5767–5773.
6. Meltzer, P.C. Peptide nucleic acids: synthesis of thymine, adenine, guanine, and cytosine nucleobases / P.C. Meltzer, A.Y. Liang, P. Matsudaira // *J. Org. Chem.* – 1995. – Vol. 60, № 13. – P. 4305 – 4308.
7. General atomic and molecular electronic structure system / M.W. Schmidt [et al] // *J. Comput. Chem.* – 1993. – Vol. 14, № 11. – P. 1347 – 1363.
8. Freitag, M.A. Predicting shielding constants in solution using gauge invariant atomic orbital theory and the effective fragment potential method / M.A. Freitag [et al] // *J. Chem. Phys.* – 2004. – Vol. 120, № 3. – P. 1197 – 1202.