УДК 577.113.3 DOI: 10.32362/2410-6593-2018-13-5-14-22

ВЫБОР ЗАЩИТНЫХ ГРУПП ПРИ ОПТИМИЗАЦИИ СИНТЕЗА МОНОМЕРОВ γ-ПНК НА ОСНОВЕ L-ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ

И.А. Прохоров[1], А.А. Мелкумова[1], А.С.М. Абдельбаки[1,2], О.В. Есипова[1], Ю.Г. Кириллова[1,3,@]

[1]МИРЭА – Российский технологический университет (Институт тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова), Москва 119571, Россия
[2]Университет Эль-Файюм, Эль-Файюм 63514, Египет
[3]Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России, Москва 119435, Россия
[@]Автор для переписки, e-mail: pna-mitht@yandex.ru

Работа посвящена оптимизации синтеза γ-(S)-карбоксиэтильных мономеров ПНК на основе L-Glu. ПНК – перспективные соединения, которые гибридизуются с ДНК или РНК, а благодаря своим свойствам находят применение в молекулярной биологии, персонализированной медицине, а также могут использоваться для создания наноматериалов. Для увеличения выхода целевых мономеров было предложено заменить бензильную защитную группу на карбокси-функции бокового радикала на циклогексильную. Были предложены две синтетические схемы. В первой из них исходным соединением выступала γ-бензил-N-Boc-глутаминовая кислота, которую восстанавливали до β-аминоспирта; гидроксильную функцию защищали диметил-трет-бутилсилильной группой; бензиловый эфир в боковом радикале расщепляли восстановлением на палладиевом катализаторе, используя формиат аммония. Однако осуществить последующее ацилирование циклогексилового спирта не удалось. Во второй из предложенных схем была использована известная последовательность реакций, которая привела к образованию циклического производного Cbz-защищенной глутаминовой кислоты. Затем данным соединением ацилировали циклогексиловый спирт с получением целевого сложного эфира. Последующая трансформация защитных групп эфира приводила в три стадии к дизащищенной L-глутаминовой кислоте. Затем реакцией восстановления был получен желаемый защищенный β-аминоспирт, содержащий циклогексильную защитную группу в боковом радикале. Далее это соединение использовали в реакции Мицунобу с получением полностью защищенного остова мономера ПНК. Последовательно проведенная реакция тиолиза Ns-защитной группы привела к образованию целевого вторичного амина, стабильность которого существенно превзошла стабильность его аналога с бензильной защитой, полученного и исследованного ранее. При этом выход реакции тиолиза повысился в 2 раза. Структура новых соединений подтверждена данными ^{1}H-ЯМР-спектроскопии.

Ключевые слова: *γ-ПНК, Boc-протокол, циклогексильная защитная группа, конденсация по Мицунобу, удаление орто-нитробензолсульфогруппы тиолизом.*

SELECTION OF PROTECTIVE GROUPS UPON OPTIMIZING THE SYNTHESIS OF γ-PNA BASED ON L-GLU

I.A. Prokhorov[1], A.A. Melkumova[1], A.S.M. Abdelbaky[1,2], O.V. Esipova[1], Yu.G. Kirillova[1,3,@]

[1]MIREA – Russian Technological University (M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies), Moscow 119571 Russia
[2]Fayoum University, Fayoum 63514, Egypt
[3]Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, FMBA of Russia, Moscow 119435, Russia
[@]Corresponding author e-mail: pna-mitht@yandex.ru

This work is devoted to optimization of the synthesis of γ-S-carboxyethyl monomers of PNA based on L-Glu. PNA are promising compounds that hybridize with DNA or RNA, and due to their properties they are used in molecular biology, personalized medicine, and can also be used to create nanomaterials. To increase the yield of the desired monomers, it has been proposed to replace the benzyl protecting group with the carboxy function of the side radical by cyclohexyl one. Two synthetic schemes were proposed. In the first of them, γ-benzyl-N-Boc-glutamic acid, which was reduced to β-amino alcohol, was the starting compound. The hydroxyl group was protected by a dimethyl-tert-butylsilyl group. The benzyl ester in the side radical was cleaved by reduction on a palladium catalyst using ammonium formate. However, the subsequent acylation of cyclohexyl alcohol failed. In the second of the proposed schemes, a known sequence of reactions was used, which led to the formation of a cyclic derivative of Cbz-protected glutamic acid. Then, the resulting compound was acylated with cyclohexyl alcohol to give the desired ester. The subsequent transformation of the protective groups of the ester resulted in the diprotected L-glutamic acid in three stages. Subsequent reduction gave the desired protected β-amino alcohol containing a cyclohexyl protecting group in the side radical. This compound was further used in the Mitsunobu reaction to obtain a completely protected core of the PNA monomer. Subsequent thiolysis reaction resulted in the formation of the target secondary amine, the stability of which substantially exceeded the stability of its analog with benzyl protection, obtained and investigated before. The structure of the new compounds obtained is confirmed by ^{1}H-NMR spectroscopy.

Keywords: *γ-PNA, Boc protocol, cyclohexyl protecting group, Mitsunobu condensation, removal of ortho-nitrobenzenesulfonic group by thiolysis.*

Введение

Замена природной пептидной –CONH-группы на стабильную изостерическую группу Ψ-(CH_2NH) применяется для получения биологически активных пептидных аналогов, которые устойчивы к действию ферментов. Соединения такого типа являются также ключевыми интермедиатами в синтезе мономеров пептидно-нуклеиновых кислот (ПНК) [1] и их ациклических хиральных модификаций [2]. И те, и другие находят применение в молекулярной биологии и медицине благодаря своим гибридизационным свойствам и устойчивости [3]. В настоящее время ПНК имеют достаточно широкий спектр практических приложений, в частности, они используются как молекулярные инструменты для детектирования и управления структурой и функциями нуклеиновых кислот [4], а также регулирования экспрессии генов [5]. ПНК используют для разработки генотерапевтических средств [6], они находят применение в области материаловедения и нанотехнологий [7] благодаря способности к самосборке и молекулярному узнаванию.

Однако, несмотря на многие привлекательные особенности, так называемые «классические», или *aeg*-ПНК (т. е. ПНК, построенные на основе 2-(*N*-аминоэтил)глицина, рис. 1б) имеют ряд недостатков по сравнению с другими аналогами олигонуклеотидов. Так, из-за незаряженного скелета эти ПНК ограниченно растворяются в воде. Кроме того, они имеют тенденцию к агрегации и осаждению на поверхности других макромолекул неспецифическим образом [8]. Ранее было предпринято несколько попыток решения этих проблем [9, 10], в том числе введение заряженных аминокислотных остатков, таких как лизин или глутаминовая кислота в олигомерной форме, по концевой группе ПНК-олигомера, включение в α- и/или γ-положения псевдопептидного скелета заместителей, несущих полярные или заряженные – гидрокси-, амино-, гуанидино- или

карбокси-группы (рис. 1в). При этом были выявлены несомненные преимущества дальнейшего использования γ-(*S*)-ПНК вследствие повышенных показателей аффинности и селективности, которые они продемонстрировали при взаимодействии с комплементарными мишенями.

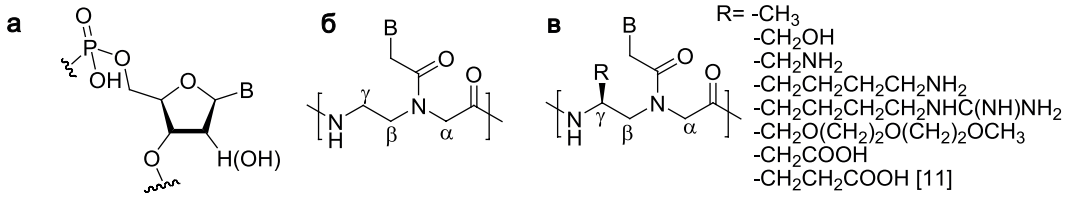


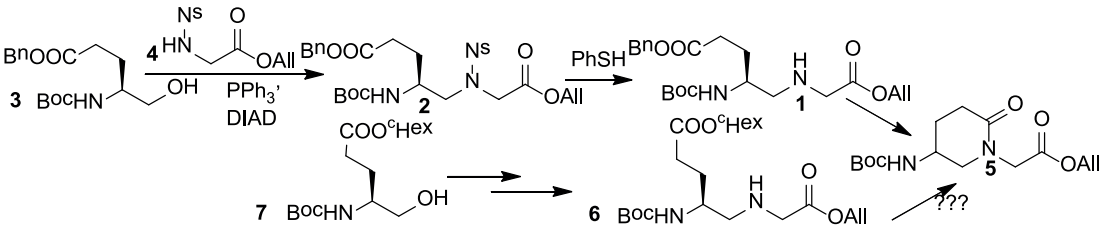
Рис. 1. Структуры мономерных звеньев: (а) ДНК (РНК); (б) «классической» *aeg*-ПНК; (в) ПНК, модифицированных по γ-положению псевдопептидного фрагмента, или γ-ПНК (B – нуклеиновое гетероциклическое основание).

В этом контексте определенный интерес представляют отрицательно заряженные γ-(*S*)-ПНК, поскольку сохранение основных структурных черт *aeg*-ПНК обеспечит их устойчивость *in vivo*, а наличие хирального центра определенной конфигурации будет способствовать лучшему молекулярному узнаванию комплементарных мишеней. В то же время ионные свойства отрицательно заряженных γ-(*S*)-ПНК будут схожи со свойствами природных нуклеиновых кислот, что улучшит их проникновение в клетку при помощи катионных переносчиков, а также повысит их растворимость.

Ранее мы показали перспективность синтеза γ-карбоксиэтил-(*S*)-ПНК (γ-*ce*-(*S*)-ПНК) на основе L-глутаминовой кислоты [11]. Для синтеза ключевого интермедиата в синтезе мономеров – псевдопептида в настоящее время широко используется конденсация Мицунобу [12] между спиртовой и кислотной компонентой. Она протекает в мягких и нейтральных условиях (pH ~ 7; 0 °C) и демонстрирует стереоспецифичность, функциональную и региоселективность. Эти условия позволяют избежать образования побочных продуктов и рацемизации [13].

Ранее для получения псевдопептидного интермедиата, построенного на основе псевдопептида L-GluΨGly **1** (схема 1), также была использована конденсация по Мицунобу из аминокислотных предшественников **3** и **4** с последующим тиолизом для удаления *орто*-нитробензолсульфонильной защиты [14]. При этом в ходе тиолиза проходила побочная реакция образования циклического продукта – δ-лактама **5**. По этой причине выход в реакции тиолиза довольно низкий и, как правило, не превышает 40%.

Схема 1



Схемы получения производных псевдопептида L-GluΨGly **1** (реализованная ранее [14]) и **6** (предлагаемая).
(Сокращения: All – аллил-, Bn – бензил-, Boc – *трет*-бутилоксикарбонил-, DIAD – диизопропилазодикарбоксилат, cHex – циклогексил-, Ns – *орто*-нитробензолсульфонил-, Ph – фенил-).

Для увеличения выхода целевых мономеров было предложено заменить бензильную защитную группу карбокси-функции бокового радикала на циклогексильную (см. схему 1). Известно, что циклогексильная защитная группа используется в пептидном синтезе для подавления многих нежелательных процессов [15]. К тому же она полностью совместима с известным Boc-протоколом твердофазного синтеза [16], а именно: устойчива при действии трифторуксусной кислоты, но удаляется в сильнокислых условиях действием растворов, содержащих трифторметансульфокислоту [17]. Таким образом, целью настоящей работы была оптимизация получения псевдопептидного остова γ-карбоксиэтил-(*S*)-ПНК путем замены бензильной защитной группы в боковом радикале в γ-положении псевдопептида на циклогексильную. Также необходимо было оценить склонность полученного псевдопептида к образованию побочного циклического продукта.

Результаты и их обсуждение

Для получения спиртовой компоненты **7** (см. схему 1) были предложены две синтетические схемы.

Первоначально предполагалось получать спиртовую компоненту **7** в шесть стадий, исходя из γ-бензил-*N*-Boc-глутаминовой кислоты (**8**) (схема 2). На первой стадии был использован препаративный способ получения β-аминоспирта **3** [18], при этом было показано хорошее масштабирование процесса: при 30-ти-граммовой загрузке кислоты **8** выход реакции составил 74%. Получение силилового эфира **9** проходило с весьма средним выходом (33%). Бензиловый эфир в боковом радикале расщепляли восстановлением на палладиевом катализаторе, используя формиат аммония. Однако последующую стадию ацилирования циклогексилового спирта провести не удалось.

Схема 2

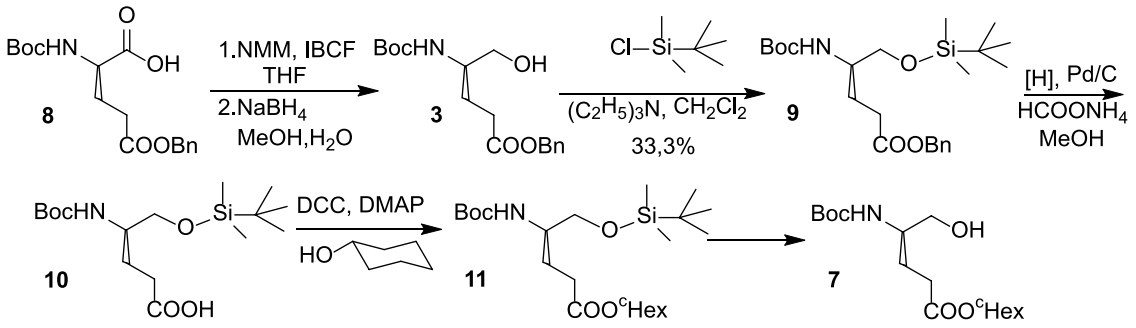
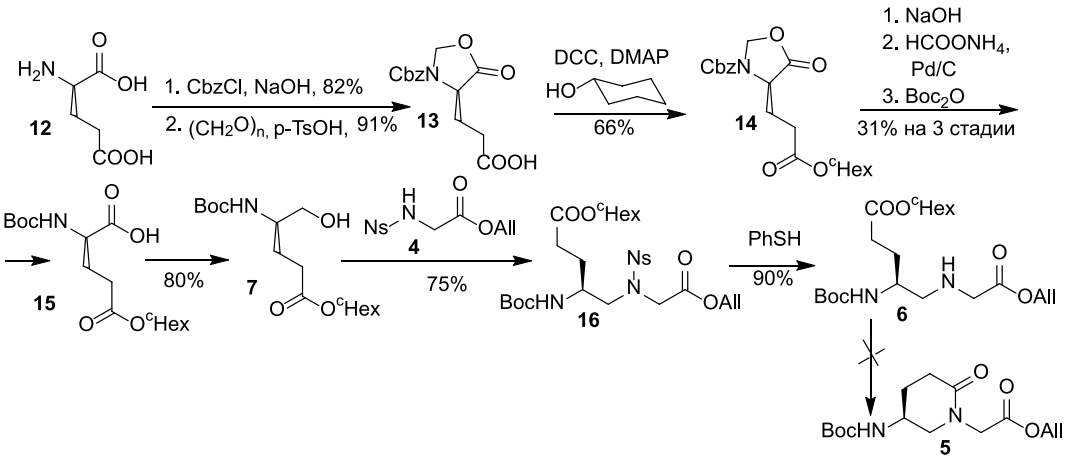


Схема синтеза спиртовой компоненты с циклогексильной защитной группой, исходя из γ-бензилового эфира *N*-Boc-L-Glu.
(Сокращения: DCC – 1,3-дициклогексилкарбодиимид, DMAP – 4-(*N,N*-диметиламино)пиридин, IBCF – *изо*-бутилхлорформиат, NMM – *N*-метилморфолин, остальные – см. схему 1).

В альтернативном способе получения спиртовой компоненты **7** (схема 3) была использована известная последовательность реакций [19], когда исходя из L-глутаминовой кислоты (**12**) в две стадии получали циклическое производное Cbz-защищенной глутаминовой кислоты **13**, которым селективно ацилировали циклогексиловый спирт. Последующая трансформация защитных групп эфира **14** приводила к дизащищенной L-глутаминовой кислоте **15** в три стадии. Далее реакцией восстановления был получен целевой β-аминоспирт **7**, содержащий циклогексильную защитную группу в боковом радикале, с выходом 80%. Синтез полностью защищенного псевдопептида **16** осуществляли конденсацией по Мицунобу стандартным способом с использованием спиртовой компоненты **7** и кислотной компоненты **4**, в качестве которой использовали аллиловый эфир Ns-защищенного глицина, полученный по ранее разработанной методике [14].

Схема 3



Альтернативная схема синтеза спиртовой компоненты **7** с последующим получением псевдопептида **6**.
(Сокращения: Cbz – бензилоксикарбонил-, Ts – тозил-, остальные – см. схемы 1 и 2).

Далее был проведен сравнительный тиолиз Ns-группы на двух субстратах: Ns-защищенных по γ-положению псевдопептидах соответственно с циклогексильной (**16**) и с бензильной защитой карбоксифункции (**2**). Реакции были поставлены параллельно: в одинаковых условиях, с использованием одних и тех же загрузок (0.2 г), с одинаковой продолжительностью (2 ч). При этом ТСХ-анализ показал, что полученное в результате тиолиза бензильное производное **1** действительно склонно к циклизации, как было установлено нами ранее [14]. В случае же тиолиза циклогексильного производного **16** побочного продукта **5** зафиксировано не было, при этом выход целевого псевдопептида **6** – интермедиата для получения **γ**-карбоксиэтил-(*S*)-ПНК составил ~90%. Кроме этого, нам удалось выделить и охарактеризовать псевдопептид **6** с помощью ^{1}H-ЯМР-спектроскопии, что крайне затруднительно сделать в случае бензильного производного **1** ввиду его быстрого превращения в циклический продукт **5**.

Заключение

Таким образом, при замене бензильной защитной группы карбокси-функции бокового радикала в псевдопептиде на циклогексильную выход реакции тиолиза Ns-группы был повышен более, чем в 2 раза. Также было показано, что побочный процесс циклизации псевдопептидного фрагмента **6** с циклогексильной защитной группой, если и идет, то значительно медленнее по сравнению с аналогом **1**, содержащим бензильную защитную группу.

Экспериментальная часть

В работе использовали следующие реактивы: *N*-метилморфолин, изобутилхлорформиат, CbzCl, Pd/C, NsCl, тиофенол, (Aldrich, США), DIAD (Fluka, Швейцария), ди-*трет*-бутилпирокарбонат, $NaBH_4$, $LiAlH_4$, PPh_3 (Merck, Германия), остальные реактивы, а также растворители марки х.ч. и ч.д.а. – отечественного производства. Следующие растворители были очищены перед использованием: хлористый метилен (перегоняли над P_2O_5), ДМФА (перегоняли над фталиевым ангидридом в вакууме), тетрагидрофуран (THF) (перегоняли над KOH и непосредственно перед реакциями над $LiAlH_4$), ацетонитрил (кипятили над P_2O_5 в течение 2 ч с последующей перегонкой), триэтиламин (перегоняли над KOH), *N*-метилморфолин (кипятили над BaO и затем перегоняли), толуол (перегоняли над P_2O_5).

^{1}H-ЯМР-спектры полученных соединений регистрировали при 25 °C на импульсном Фурье-спектрометре Bruker DPX-300 (Германия) с рабочей частотой 300 МГц. Химические сдвиги приведены в миллионных долях относительно внутреннего стандарта тетраметилсилана. Спектры регистрировали в $CDCl_3$, ДМСО-d_6.

Колоночную хроматографию проводили на сорбенте Silica gel 60 (0.040-0.063 мм) (Merck, Германия). Протекание реакций контролировали с помощью ТСХ на пластинках Silica gel 60 F_{254} (Merck, Германия). Вещества на пластинках обнаруживали в УФ-свете (254 нм) и опрыскиванием 0.5% раствором нингидрина в этаноле, либо в комплексе молибденовой кислоты и сульфата церия(IV) с последующим нагреванием.

Вещества сушили в вакууме масляного насоса (0.2 мм рт. ст.).

α-Аллиловый эфир *N*-(*орто*-нитробензолсульфонил)глицина (**4**) получали по методике, разработанной ранее [14].

Бензиловый эфир *N*-(*трет*-бутилоксикарбонил)-5-гидроксипентановой кислоты (3). К охлажденному до -30 °C раствору 15.11 г IBCF (14.47 мл, 110.7 ммоль, 1.2 экв.) в THF (155.5 мл) с одинаковой скоростью из двух капельных воронок добавляли растворы 29.9 г (92.28 ммоль, 1 экв.) **γ**-бензилового эфира *N*-Boc-L-Glu (**8**) в THF (155.5 мл) и 9.32 г (10.14 мл, 92.28 ммоль, 1 экв.) NMM при постоянном перемешивании в атмосфере аргона. По окончании добавления смесь перемешивали 5 мин при -30 °C, затем дали реакционной смеси нагреться до -15 °C, после чего отфильтровали. Осадок на фильтре промыли THF (30 мл). Полученный фильтрат охладили до -15 °C и к нему несколькими порциями добавили свежеприготовленный раствор 10.47 г (276.8 ммоль, 3 экв.) $NaBH_4$ в 220 мл смеси MeOH: H_2O (1:1). Смесь перемешивали 10 мин. Затем добавили 270 мл воды и 560 мл этилацетата. Экстрагировали дополнительно водную фракцию этилацетатом (2×500 мл) (наблюдали выделение газа). Объединенные органические фазы промыли 1.5 М раствором лимонной кислоты (300 мл), насыщенным раствором $NaHCO_3$ (300 мл) и насыщенным раствором NaCl (300 мл). Органический экстракт сушили Na_2SO_4, фильтровали, далее пропускали через слой окиси алюминия высотой 8 см, упарили на роторном испарителе. Выделенное вещество переупарили с метанолом (3×30 мл) и сушили в вакууме масляного насоса. Выход: 21.12 г (74%); R_f 0.35 (этилацетат/петролейный эфир 70/100 (ПЭЛ), 1:1). ^{1}H-ЯМР-спектр ($CDCl_3$, δ, м.д.): 7.35 (s, 5H, C_6H_5); 5.11 (s, 2H, CH_2Ph); 4.71 (s, 1H, N<u>H</u>-Boc); 3.64 (d, 2H, C<u>H</u>$_2$-OH); 3.57 (m, 1H, α-CH); 2.45 (m, 2H, γ-CH_2); 1.90 (m, 1H, β-CH); 1.79 (m, 1H, β-CH); 1.40 (s, 9H, *t*-Bu).

Бензиловый эфир *N*-(*трет*-бутилоксикарбонил)-5-(*трет*-бутилдиметилсилил)-оксипентановой кислоты (9). К охлажденному раствору 1 г (3.1 ммоль, 1.5 экв.) спирта **3** в 10 мл дихлорметана (DCM) и 0.696 г (4.64 ммоль, 1.5 экв.) *трет*-бутил-

диметилсилилхлорида в 10 мл DCM по каплям добавили 0.469 г (0.644 мл, 4.64 ммоль, 1.5 экв.) триэтиламина в атмосфере аргона. Затем реакционную смесь перемешивали в течение 24 ч при комнатной температуре. После удаления растворителя добавляли воду и экстрагировали диэтиловым эфиром (2×15 мл). Объединенные органические фазы промыли 1.5 М раствором лимонной кислоты (10 мл), насыщенным раствором $NaHCO_3$ (15 мл) и насыщенным раствором NaCl (15 мл). Объединенный органический экстракт сушили Na_2SO_4, фильтровали, растворитель удаляли. Целевой продукт выделяли колоночной хроматографией в системе этилацетат/ПЭЛ, 1:4. Выход: 0.33 г (33%); R_f 0.62 (этилацетат/ПЭЛ, 1:3).

***N*-(*трет*-Бутилоксикарбонил)-5-[*трет*-бутилдиметилсилил]-оксипентановая кислота (10).** Эфир **9** (0.91 г, 2.08 ммоль, 1 экв.), $HCOONH_4$ (0.655 г, 10.4 ммоль, 5 экв.) и Pd/C (10% вес.) растворили в 50 мл MeOH, полученный раствор кипятили с обратным холодильником в течение 30 мин. Смесь фильтровали через целит, растворитель удаляли. Выход: 0.58 г (80%); R_f 0.21 (этилацетат/ПЭЛ/уксусная кислота, 1:3:0.05).

(4*S*)-5-Оксо-3-(бензилоксикарбонил)-4-оксазолидинпропановая кислота (13). К охлажденному до 0 °C раствору 5 г (34 ммоль, 1 экв.) L-глутаминовой кислоты (**12**) в 17 мл водного 4 М NaOH (68 ммоль, 2 экв.) по каплям одновременно из двух капельных воронок добавляли растворы 1.5 г (9.33 мл, 37.25 ммоль, 1.1 экв.) водного раствора NaOH и 7.54 г (6.28 мл, 44.2 ммоль, 1.3 экв.) CbzCl. После добавления реагентов перемешивание продолжали 5 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь экстрагировали диэтиловым эфиром (2×15 мл). pH водной фазы довели до ~4 с помощью 3 М HCl и экстрагировали этилацетатом (3×20 мл), объединенные органические фракции сушили Na_2SO_4, фильтровали, растворитель удаляли. Остаток в виде светло-желтого тягучего масла сушили в вакууме масляного насоса. Выход: 7.81 г (82%); R_f 0.60 (этилацетат/ПЭЛ/уксусная кислота, 4:1:0.05). ^{1}H-ЯМР-спектр (DMSO-d_6): 7.54-7.57 (d, 1H, N<u>H</u>); 7.33 (s, 5H-Ph (Cbz)); 5.02 (s, 2H-Ph-C<u>H</u>$_2$ (Cbz)); 3.99 (m, 1H-α); 2.30 (m, 2H-γ-CH_2); 1.89-2.05, m, 1.68-1.84, m, (2H-β-CH_2).

N-Cbz-защищенную L-глутаминовую кислоту, полученную на предыдущей стадии (7.81 г, 27.8 ммоль), параформ (1.6 г), *пара*-толуолсульфокислоту (150.0 мг) и толуол (110 мл) кипятили с насадкой Дина-Старка с обратным холодильником в течение 7.5 ч. Толуол упарили, в колбу с продуктом добавили свежий толуол и повторно упарили на роторном испарителе. Выход: 7.44 г (91.3%); R_f 0.5 (этилацетат/ПЭЛ/уксусная кислота, 1:1:0.05). ^{1}H-ЯМР-спектр (DMSO-d_6): 7.37 (s, 5H-Ph (Cbz)); 5.20 (s, 2H-Ph-C<u>H</u>$_2$ (Cbz)); 5.55, d, 5.24, d, (2H-O-C<u>H</u>$_2$-N); 4.4 (m, 1H-α); 2.52 (m, 2H-γ-CH_2); 2.32, m, 2.22, m, (2H-β-CH_2).

γ-Циклогексиловый эфир (4*S*)-5-оксо-3-(бензилоксикарбонил)-4-оксазолидинпропановой кислоты (14). Раствор 3.61 г (12.3 ммоль, 1 экв.) кислоты **13** в 70 мл CH_2Cl_2 охладили до 0 °C в течение 10 мин. Затем, в атмосфере аргона, при перемешивании добавили 0.54 г DMAP (4.4 ммоль, 0.3 экв. от DCC) и 3.05 г DCC (14.8 ммоль, 1.2 экв.) в 20 мл CH_2Cl_2. Спустя 15 мин после перемешивания добавили 6.16 г циклогексанола (6.5 мл, 61.6 ммоль, 5 экв.) и перемешивали дополнительно 10 мин, далее реакционную смесь перемешивали 18 ч при комнатной температуре. Растворитель удаляли, полученный осадок растворяли в этилацетате (100 мл), фильтровали через слой силикагеля. Затем фильтрат промыли подкисленным (pH 5) насыщенным раствором NaCl (2×75 мл) и насыщенным раствором NaCl (1×150 мл), сушили Na_2SO_4, фильтровали и удаляли растворитель, сушили в вакууме масляного насоса. Целевой продукт выделяли колоночной хроматографией в системе этилацетат/ПЭЛ, 1:4. Выход: 3.05 г (66%); R_f 0.31 (этилацетат/ПЭЛ, 1:4). ^{1}H-ЯМР-спектр ($CDCl_3$): 7.38 (s, 5H-Ph (Cbz)); 5.56, s, 5.24, d, (2H-γ'-CH_2); 5.20 (s, 2H-Ph-C<u>H</u>$_2$ (Cbz)); 4.74 (m, 1H-^{c}Hex); 4.40 (m, 1H-α); 2.49-2.19 (m, 2H-γ-CH_2 + 2H-β-CH_2); 1.89-1.17 (m, 10H-^{c}Hex).

γ-Циклогексиловый эфир *N*-(*трет*-бутилоксикарбонил)-L-глутаминовой кислоты (15). Эфир **14** (3.05 г, 8.13 ммоль, 1 экв.) растворили в 50 мл этанола и охладили до 0 °C, затем добавили по каплям 8.1 мл 1 М NaOH (8.13 ммоль, 1 экв.). Реакционную смесь перемешивали в течение 30 мин при 0 °C и 90 мин при комнатной температуре. Затем смесь подкислили 4 М HCl до pH 6, концентрировали до 10 мл, затем добавили 20 мл воды, и экстрагировали этилацетатом (2×30 мл), объединенный экстракт промывали насыщенным раствором NaCl (2×60 мл), сушили Na_2SO_4, растворитель удаляли и остаток использовали далее без дополнительной очистки. R_f 0.53 (этилацетат/ПЭЛ/уксусная кислота, 1:2:0.05).

γ-Циклогексиловый эфир *N*-(бензилоксикарбонил)-L-глутаминовой кислоты, полученный на предыдущей стадии (2.22 г, 6.12 ммоль, 1 экв.), растворили в смеси этанола (80 мл) и воды (5 мл), добавили 1.93 г $HCOONH_4$ (30.6 ммоль, 5 экв.) и 0.44 г Pd/C (20% вес.). Полученный раствор кипятили с обратным холодильником в течение 4 ч, фильтровали через целит, растворитель удаляли и остаток использовали далее без дополнительной очистки. R_f 0.34 (этилацетат/метанол/аммиак, 3:1:1).

γ-Циклогексиловый эфир L-глутаминовой кислоты, полученный на предыдущей стадии (1.4 г, 6.12 ммоль, 1 экв.), растворили в 60 мл смеси iPrOH:H_2O (1:1), затем добавили 0.67 г $NaHCO_3$ (7.96 ммоль, 1.3 экв) и 1.6 г Boc_2O (7.34 ммоль, 1.2 экв.). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре

16 ч, изопропиловый спирт удаляли и экстрагировали этилацетатом (50 мл), экстракт промывали раствором NaCl, подкисленным 4 М HCl (pH~5) (2×50 мл), и насыщенным раствором NaCl (2×50 мл), сушили Na_2SO_4, растворитель удаляли, остаток досушивали в вакууме масляного насоса. Выход: 0.84 г (31% на три стадии, исходя из соединения **14**); R_f 0.64 (этилацетат/ПЭЛ/уксусная кислота, 1:2:0.05). ^{1}H-ЯМР-спектр ($CDCl_3$): 5.59 (s, 1H-NH-Boc); 4.76 (m, 1H-α); 4.23 (m, 1H-^{c}Hex); 2.39 (m, 2H-γ-CH_2); 2.18, m, 1.98, m (2H-β-CH_2); 1.45 (s, 9H-Boc);1.91-1.51, m, 1.42-1.15, m (10H-^{c}Hex).

γ-Циклогексиловый эфир 4-[(*N-трет*-бутилоксикарбонил)амино]-5-пентановой кислоты (7). К охлажденному до -30 °C раствору 0.42 г IBCF (0.4 мл, 3.06 ммоль, 1.2 экв.) в THF (6 мл) с одинаковой скоростью из двух капельных воронок добавляли растворы 0.84 г (2.55 ммоль, 1 экв.) кислоты **12** в THF (6 мл) и 0.26 г (0.28 мл, 2.55 ммоль, 1 экв.) NMM при постоянном перемешивании в атмосфере аргона. По окончании добавления смесь перемешивали 5 мин при -30 °C, затем нагревали до -15 °C, после чего фильтровали. Осадок на фильтре промыли 3 мл THF. Полученный фильтрат охладили до -15 °C и к нему несколькими порциями добавили свежеприготовленный раствор 0.29 г (7.65 ммоль, 3 экв.) $NaBH_4$ в 10 мл смеси MeOH: H_2O (1:1). Смесь перемешивали 10 мин. Затем добавили 12 мл воды и 25 мл этилацетата. Экстрагировали дополнительно водную фракцию этилацетатом (2×25 мл). Объединенные органические фракции промыли 1.5 М раствором лимонной кислоты (20 мл), насыщенным раствором $NaHCO_3$ (20 мл) и насыщенным раствором NaCl (20 мл), сушили Na_2SO_4, фильтровали. Обезвоженный фильтрат пропустили через 1 см слой окиси алюминия, растворитель удалили, переупаривали с метанолом (3×5 мл), остаток досушивали в вакууме масляного насоса. Выход: 0.64 г (80%); R_f 0.29 (этилацетат/ПЭЛ, 1:1). ^{1}H-ЯМР-спектр ($CDCl_3$): 4.95-4.82 (m, 1H, NH-Boc); 4.82-4.70 (m, 1H-^{c}Hex); 3.64 (m, 2H, C$\underline{H}_2$-OH); 3.57 (m, 1H-α); 2.65 (s, -OH); 2.49-2.30 (m, 2H-γ-Glu); 1.97-1.63 (m, 2H-β-Glu); 1.45 (s, 9H-Boc); 1.61-1.30 (m, 10H-^{c}Hex).

γ-Циклогексиловый эфир (*S*)-4-[*N*-(*трет*-бутилоксикарбонил)амино]-5-[*N*-(*орто*-нитро-бензолсульфонил)-*N*-(аллилоксикарбонил)амино]пентановой кислоты (16). К охлажденному до 0 °C раствору 0.22 г (0,72 ммоль, 1 экв) α-аллилового эфира *N*-(*орто*-нитробензолсульфонил)глицина (**4**) 0.26 г (0.83 ммоль, 1.15 экв.) γ-циклогексилового эфира 4-[(*N-трет*-бутилоксикарбонил)амино]-5-пентановой кислоты (**7**) и 0.24 г (0.93 ммоль, 1.3 экв.) трифенилфосфина в тетрагидрофуране (25 мл) по каплям добавляли раствор 0.19 г (0.18 мл, 0.933 ммоль, 1.3 экв.) DIAD в течение 20 мин в атмосфере аргона. Затем реакционную массу нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 12 ч. Растворитель удаляли, остаток хроматографировали в системе этилацетат/ПЭЛ, 1:1, а затем в системе хлористый метилен/ПЭЛ/метанол, 2.5:2.5:0.25. Выход: 0.317 г (77%); R_f 0.54 (этилацетат/ПЭЛ, 1:1). ^{1}H-ЯМР-спектр ($CDCl_3$): 8.02-7.62 (m, 4H-Ns); 5.81 (m, 1H-All (2)); 5.24 (d, 2H-All (3)); 4.76 (m, 1H-^{c}Hex); 4.64 (d, 1H, N$\underline{H}$-Boc); 4.52 (m, 2H-All (1)); 4.39, s, 4.26, s, (CH_2-2PP*); 3.83 (m, 1H-5PP); 3.62-3.36 (m, CH_2-4PP); 2.45-2.36 (m, 2H-γ-Glu); 1.97-1.63 (m, 2H-β-Glu); 1.45 (s, 9H-Boc); 1.61-1.30 (m, 10H-^{c}Hex).

γ-Циклогексиловый эфир (*S*) 4-[*N*-(*трет*-бутилоксикарбонил)амино]-*N*-(аллилоксикарбонил)-амино]пентановой кислоты (6). Псевдопептид **13** (0.317 г, 0.53 ммоль, 1 экв.) растворили в ацетонитриле (9 мл) и охладили до 0 °C. Затем при интенсивном перемешивании добавляли 0.15 г (1.06 ммоль, 2 экв.) K_2CO_3 и 0.58 г (0.54 мл, 5.3 ммоль, 10 экв.) тиофенола. Через 15 мин реакционную массу нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 2 ч. Далее растворитель удаляли, к остатку добавили диэтиловый эфир (2×20 мл) и 20% лимонную кислоту (15 мл, pH 4). Эфир отделили и довели pH водной фракции до 7 добавлением K_2CO_3. Полученный нейтральный раствор экстрагировали хлористым метиленом (2×15 мл). Объединенные органические фракции сушили Na_2SO_4, фильтровали, растворитель удаляли, остаток сушили в вакууме масляного насоса. Выход: 0.198 г (90%); R_f 0.39 (этилацетат/ПЭЛ, 3:2). ^{1}H-ЯМР-спектр ($CDCl_3$): 5.92 (m, 1H-All (2)); 5.29 (d, 2H-All (3)); 4.84 (d, 1H, N$\underline{H}$-Boc); 4.76 (m, 1H-^{c}Hex); 4.65 (m, 2H-All (1)); 3.69 (m, 1H-5PP); 3.50, d, 3.46, d, (CH_2-2PP); 2.80-2.63 (m, CH_2-4PP); 2.53 (m, NH); 2.45-2.36 (m, 2H-γ-Glu); 1.97-1.63 (m, 2H-β-Glu); 1.45 (s, 9H-Boc); 1.61-1.30 (m, 10H-^{c}Hex).

Благодарность

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 14-25-00013).

Список литературы:

1. Nielsen P.E., Egholm M., Berg R.H., Buchardt O. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide // Science. 1991. № 254 (5037). P. 1497–1500.

References:

1. Nielsen P.E., Egholm M., Berg R.H., Buchardt O. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide *Science*. 1991; 254(5037): 1497-1500.

*PP – протоны псевдопептидного остова.

2. Varizhuk A.M., Dezhenkov A.V., Kirillova Yu.G. Chiral acyclic PNA modifications: Synthesis and properties // Studies in Natural Products Chemistry. 2016. V. 47. P. 261–305.

3. Egholm M., Buchardt O., Christensen L., Behrens C., Freier S.M., Driver D.A., Berg R.H., Kim S.K., Norden B., Nielsen P.E.PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules // Nature. 1993. № 365 (6446). P. 566–568.

4. Nielsen P.E. Peptide nucleic acid. A molecule with two identities. // Acc. Chem. Res. 1999. № 32. P. 624–630.

5. Chin J.Y., Kuan J.Y., Lonkar P.S., Krause D.S., Seidman M.M., Peterson K.R., Nielsen P.E., Kole R., Glazer P.M. Correction of a splice-site mutation in the beta-globin gene stimulated by triplex-forming peptide nucleic acids // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2008. № 105. P. 13514–13519.

6. Janowski B.A., Kaihatsu K., Huffman K.E., Schwartz J.C., Ram R., Hardy D., Mendelson C.R., Corey D.R. Inhibiting transcription of chromosomal DNA with antigene peptide nucleic acids // Nat. Chem. Biol. 2005. № 1. P. 210–215.

7. Myers C.P., Williams M.E. Directed self-assembly of inorganic redox complexes with artificial peptide scaffolds // Coord. Chem. Rev. 2010. № 254. P. 2416–2428.

8. Tackett A.J., Corey D.R., Raney K.D. Non-Watson–Crick interactions between PNA and DNA inhibit the ATPase activity of bacteriophage T4 Dda helicase // Nucleic Acids Res. 2002. № 30. P. 950–957.

9. Corradini R., Sforza S., Tedeschi T., Totsingan F., Manicardi A., Marchelli R. Peptide nucleic acids with a structurally biased backbone. Updated review and emerging challenges // Curr. Top Med. Chem. 2011. № 11(12). P. 1535–1554.

10. Sugiyama T., Kittaka A. Chiral peptide nucleic acids with a substituent in the N-(2-aminoethy)glycine backbone // Molecules. 2012. № 18(1). P. 287–310.

11. Kirillova Y.G., Boyarskaya N.P., Dezhenkov A.V., Tankevich M.V., Prokhorov I.A., Varizhuk A.M., Eremin S.V., Esipov D.S., Smirnov I.P., Pozmogova G.E. Polyanionic carboxyethyl peptide nucleic acids (ce-PNAs): Synthesis and DNA binding // PLoS ONE. 2015. V. 10(10). e0140468.

12. Falkiewicz B., Kołodziejczyk A.S., Liberek B., Wiśniewski K. Synthesis of achiral and chiral peptide nucleic acid (PNA) monomers using Mitsunobu reaction // Tetrahedron. 2001. V. 57. № 37. P. 7909–7917.

13. Manna A., Rapireddy S., Sureshkumar G., Ly D.H. Synthesis of optically-pure γPNA monomers: A comparative study Tetrahedron // 2015. V. 71. P. 3507–3514.

14. Boyarskaya N.P., Prokhorov D.I., Kirillova Yu.G., Zvonkova E.N., Shvets V.I. Synthesis of protected pseudopeptides from dicarboxylic amino acids by Mitsunobu condensation // Tetrahedron Lett. 2005. V. 46. № 43. P. 7359–7362.

15. Tam J.P. Cyclohexyl ester as a new protecting

2. Varizhuk A.M., Dezhenkov A.V., Kirillova Yu.G. Chiral acyclic PNA modifications: Synthesis and properties. *Studies in Natural Products Chemistry*. 2016; 47: 261-305.

3. Egholm M., Buchardt O., Christensen L., Behrens C., Freier S.M., Driver D.A., Berg R.H., Kim S.K., Norden B., Nielsen P.E. PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. *Nature*. 1993; 365(6446): 566-568.

4. Nielsen P.E. Peptide nucleic acid. A molecule with two identities. *Acc. Chem. Res*. 1999; 32: 624-630.

5. Chin J.Y., Kuan J.Y., Lonkar P.S., Krause D.S., Seidman M.M., Peterson K.R., Nielsen P.E., Kole R., Glazer P.M. Correction of a splice-site mutation in the beta-globin gene stimulated by triplex-forming peptide nucleic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 2008; 105: 13514-13519.

6. Janowski B.A., Kaihatsu K., Huffman K.E., Schwartz J.C., Ram R., Hardy D., Mendelson C.R., Corey D.R. Inhibiting transcription of chromosomal DNA with antigen peptide nucleic acids. *Nat. Chem. Biol.* 2005; (1): 210-215.

7. Myers C.P., Williams M.E. Directed self-assembly of inorganic redox complexes with artificial peptide scaffolds. *Coord. Chem. Rev.* 2010; 254: 2416-2428.

8. Tackett A.J., Corey D.R., Raney K.D. Non-Watson–Crick interactions between PNA and DNA inhibit the ATPase activity of bacteriophage T4 Dda helicase. *Nucleic Acids Res*. 2002; 30: 950-957.

9. Corradini R., Sforza S., Tedeschi T., Totsingan F., Manicardi A., Marchelli R. Peptide nucleic acids with a structurally biased backbone. Updated review and emerging challenges. *Curr. Top Med. Chem.* 2011; 11(12): 1535-1554.

10. Sugiyama T., Kittaka A. Chiral peptide nucleic acids with a substituent in the N-(2-aminoethy)glycine backbone. *Molecules*. 2012; 18(1): 287-310.

11. Kirillova Y.G., Boyarskaya N.P., Dezhenkov A.V., Tankevich M.V., Prokhorov I.A., Varizhuk A.M., Eremin S.V., Esipov D.S., Smirnov I.P., Pozmogova G.E. Polyanionic carboxyethyl peptide nucleic acids (ce-PNAs): Synthesis and DNA binding. *PLoS ONE*. 2015; 10(10). e0140468.

12. Falkiewicz B., Kołodziejczyk A.S., Liberek B., Wiśniewski K. Synthesis of achiral and chiral peptide nucleic acid (PNA) monomers using Mitsunobu reaction. *Tetrahedron*. 2001; 57(37): 7909-7917.

13. Manna A., Rapireddy S., Sureshkumar G., Ly D.H. Synthesis of optically-pure γPNA monomers: A comparative study. *Tetrahedron*. 2015; 71: 3507-3514.

14. Boyarskaya N.P., Prokhorov D.I., Kirillova Yu.G., Zvonkova E.N., Shvets V.I. Synthesis of protected pseudopeptides from dicarboxylic amino acids by Mitsunobu condensation. *Tetrahedron Lett.* 2005; 46(43): 7359-7362.

15. Tam J.P. Cyclohexyl ester as a new protecting group for aspartyl peptides to minimize aspartimide

group for aspartyl peptides to minimize aspartimide formation in acidic and basic treatments // Tetrahedron Lett. 1979. № 42. P. 4033–4035.

16. Christensen L., Fitzpatrick R., Gildea B., Petersen K.H., Hansen H.F., Koch T. Egholm M., Buchardt O., Nielsen P.E., Coull J., Berg R.H. Solid-phase synthesis of peptide nucleic acids // J. Peptide Sci. 1995. № 1(3). P. 175–183.

17. Nielsen P.E., Haaima G., Lohse A., Buchardt O. Peptide nucleic acids (PNAs) containing thymine monomers derived from chiral amino acids: Hybridization and Solubility properties of D-lysine PNA // Angew. Chem. Int. Ed. Eng. 1996. № 35(17). P. 1939–1942.

18. Кириллова Ю.Г., Баранов А.В., Прохоров Д.И., Есипова О.В., В.И.Швец. Препаративное получение β-аминоспиртов из производных дикарбоновых аминокислот // Журн. орг. химии. 2009. № 9. С. 1330–1332.

19. Itoh M. Selective protection of α- or side-chain carboxyl groups of aspartic and glutamic acid. A facile synthesis of β-aspartyl and γ-glutamyl peptides // Chem. Pharm. Bull. 1969. № 17(8). P. 1679–1686.

formation in acidic and basic treatments. *Tetrahedron Lett.* 1979; (42): 4033-4035.

16. Christensen L., Fitzpatrick R., Gildea B., Petersen K.H., Hansen H.F., Koch T. Egholm M., Buchardt O., Nielsen P.E., Coull J., Berg R.H. Solid-phase synthesis of peptide nucleic acids. *J. Peptide Sci.* 1995; (3): 175-183.

17. Nielsen P.E., Haaima G., Lohse A., Buchardt O. Peptide nucleic acids (PNAs) containing thymine monomers derived from chiral amino acids: Hybridization and solubility properties of D-lysine PNA. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 1996; 35: 1939-1942.

18. Kirillova Yu.G., Baranov A.V., Prokhorov D.I., Esipova O.V., Shvets V.I. Preparative synthesis of β-amino alcohols from α-amino dicarboxylic acid derivatives. *Rus. J. Org. Chem*. 2009; 45: 1315-1317.

19. Itoh M. Selective protection of α- or side-chain carboxyl groups of aspartic and glutamic acid. A facile synthesis of β-aspartyl and γ-glutamyl peptides. *Chem. Pharm. Bull*. 1969; 17(8): 1679-1686.

Об авторах:

Прохоров Иван Андреевич, ассистент кафедры биотехнологии и промышленной фармации Института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (119571, Россия, Москва, пр. Вернадского, 86).

Мелкумова Анна Александровна, студент 5 курса кафедры биотехнологии и промышленной фармации Института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (119571, Россия, Москва, пр. Вернадского, 86).

Абдельбаки Ахмед Салах Махмуд, аспирант 3 года обучения кафедры биотехнологии и промышленной фармации Института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (119571, Россия, Москва, пр. Вернадского, 86).

Есипова Ольга Валерьевна, доцент, кандидат химических наук, доцент кафедры биотехнологии и промышленной фармации Института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (119571, Россия, Москва, пр. Вернадского, 86).

Кириллова Юлия Геннадьевна, кандидат химических наук, доцент кафедры биотехнологии и промышленной фармации Института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (119571, Россия, Москва, пр. Вернадского, 86); старший научный сотрудник отдела биофизики, ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины» ФМБА России (119435, Россия, Москва, М. Пироговская ул., 1А).

About the authors:

Ivan A. Prokhorov, Assistant of the Chair of Biotechnology and Industrial Pharmacy, M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University (86, Vernadskogo Pr., Moscow 119571, Russia).

Anna A. Melkumova, Master Student of the Chair of Biotechnology and Industrial Pharmacy, M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University (86, Vernadskogo Pr., Moscow 119571, Russia).

Ahmed Salakh Mahmoud Abdelbaky, Postgraduate Student of the Chair of Biotechnology and Industrial Pharmacy, M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University (86, Vernadskogo Pr., Moscow 119571, Russia); Assistant Lecturer, Department of Biochemistry, University of Fayoum (Fayoum 63514, Egypt).

Olga V. Esipova, docent, Ph.D. (Chemistry), Associate Professor of the Chair of Biotechnology and Industrial Pharmacy, M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University (86, Vernadskogo Pr., Moscow 119571, Russia).

Yulia G. Kirillova, Ph.D. (Chemistry), Associate Professor of the Chair of Biotechnology and Industrial Pharmacy, M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University (86, Vernadskogo Pr., Moscow, 119571 Russia); Senior Researcher, Department of Biophysics, Federal State Budgetary Institution “Federal Research and Clinical Center for Physico-Chemical Medicine” of the Federal Medical and Biological Agency of Russia (1A, Malaya Pirogovskaya St., Moscow 119435, Russia).

Для цитирования: Прохоров И.А., Мелкумова А.А., Абдельбаки А.С.М., Есипова О.В., Кириллова Ю.Г. Выбор защитных групп при оптимизации синтеза мономеров γ-ПНК на основе L-глутаминовой кислоты // Тонкие химические технологии / Fine Chemical Technologies. 2018. Т. 13. № 5. С. 4–22. DOI: 10.32362/2410-6593-2018-13-5-4-22

For citation: Prokhorov I.A., Melkumova A.A., Abdelbaky A.S.M., Esipova O.V., Kirillova Yu.G. Selection of protective groups upon optimizing the synthesis of γ-PNA monomers based on L-Glu. *Tonkie khimicheskie tekhnologii / Fine Chemical Technologies.* 2018; 13(5): 4-22. DOI: 10.32362/2410-6593-2018-13-5-4-22