

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 577.113.3

РАЦИОНАЛЬНЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПСЕВДОПЕПТИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ – КЛЮЧЕВЫХ ИНТЕРМЕДИАТОВ СИНТЕЗА ПОЛИАМИДНЫХ МИМЕТИКОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ (ПАНКМ)

А.В. Деженков, аспирант, И.А. Прохоров, аспирант,
 А.И. Лютик, старший научный сотрудник, В.И. Швец, заведующий кафедрой,
 Ю.Г. Кириллова, доцент

кафедра Биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова,
 Москва, 119571 Россия
 e-mail: panam.mitht@gmail.com

Представлена универсальная схема синтеза ключевых фрагментов полиамидных миметиков нуклеиновых кислот с использованием реакции Мицунобу и последующим тиолизом защитной *o*-нитробензолсульфонильной группы. Очистку целевых вторичных аминов осуществляли экстракцией при различных pH, без выделения промежуточного полностью защищенного псевдопептидного фрагмента. Показано, что выходы целевых соединений сопоставимы как при использовании стадии очистки промежуточных соединений, так и без нее.
Ключевые слова: псевдопептиды, миметики нуклеиновых кислот, реакция Мицунобу.

Получение аналогов природных пептидов, содержащих в своем составе восстановленную пептидную связь Ψ, представляет интерес с точки зрения изучения их взаимодействия с протеолитическими ферментами с целью применения данных пептидомиметиков в медицине [1, 2]. С другой стороны, регулярное чередование пептидной и псевдопептидной связей является структурной основой для другого важного класса искусственных биополимеров – полиамидных миметиков ДНК (ПАНКМ), более известных как пептидно-нуклеиновые кислоты (ПНК) [3]. Такая модификация пептидной связи позволяет получать структуры, устойчивые к биодеградации, что в сочетании с их аффинностью к олигонуклеотидам-мишеням определяет хорошие перспективы использования этих веществ в биомедицинских технологиях [4]. В настоящее время в нашей лаборатории проводятся исследования по синтезу и изучению свойств

ПАНКМ на основе *L*-глутаминовой кислоты, *L*-аланина и глицина.

Ключевыми структурными фрагментами мономеров ПАНКМ, содержащими восстановленную пептидную связь, выступают псевдопептиды **4** (схема). Одним из известных методов получения восстановленной пептидной связи является конденсация по Мицунобу [5]. Для ее проведения по известным методикам синтезируют и очищают исходные соединения – спиртовую (**1**) и «кислотную» (**2**) компоненты [6, 7]. В качестве «кислотной» компоненты, в случае псевдопептидных интермедиатов ПАНКМ, используют *ortho*-нитробензолсульфонильные производные аминокислот **2(a-f)**. После проведения конденсации по Мицунобу, *ortho*-нитробензолсульфонильную группу в полностью защищенных псевдопептидах **3(a-f)** удаляют тиолизом с получением целевых псевдопептидных фрагментов **4(a-f)**.

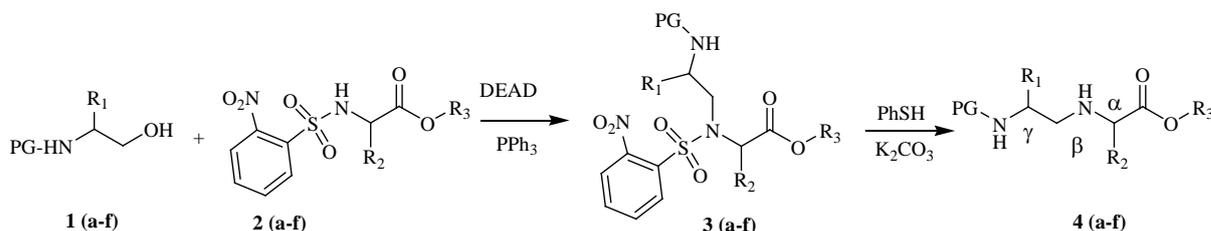


Схема синтеза псевдопептидных фрагментов с использованием реакции Мицунобу и последующим тиолизом защитной *o*-нитробензолсульфонильной группы.

Цель данной работы состояла в упрощении синтетической процедуры и определении граничных условий проведения двухстадийного процесса получения вторичных аминов **4(a-f)**. Основной трудностью данного двухстадийного способа является необходимость разделения реакционной смеси, получающейся в реакции Мицунобу, и выделения целевого полностью защищенного псевдопептидного фрагмента **3**,

поскольку в реакционной смеси присутствует множество компонентов реакции: трифенилфосфин, трифенилфосфиноксид, диэтилазодикарбоксилат и соответствующий симметричный гидразид, исходная спиртовая компонента, защищенный псевдопептид **3**. В ряде случаев, одна или несколько примесей имеют хроматографическую подвижность, близкую с подвижностью целевого вещества в различных

системах растворителей. Это затрудняет процесс синтеза и неизбежно увеличивает расход силикагеля и растворителей на колоночную хроматографию, особенно при больших загрузках (> 2 г).

Мы провели ряд синтезов вторичных аминов **4(a-f)** без выделения промежуточных защищенных производных **3(a-f)** (см. таблицу). Очистку целевых псевдопептидных фрагментов **4(a-f)** проводили экстракцией, состоящей в обработке органического слоя диэтилового эфира 20% раствором лимонной кислоты (рН 4) для перевода целевого вторичного амина в протонированную водорастворимую форму. Затем объединенные водные фракции нейтрализовали

карбонатом калия до рН 7 и экстрагировали псевдопептиды **4(a-f)** хлористым метиленом или хлороформом. В этом случае практически все гидрофобные органические примеси остаются в эфирном экстракте, а неорганические соли – в воде. Полученные таким образом вторичные амины **4(a-f)** (в виде масла) по данным ¹H-ЯМР-спектроскопии и элементного анализа не требуют дополнительной очистки и могут быть сразу же введены в последующие превращения, что существенно при работе с отрицательно заряженными ПАНКМ (**4c**), поскольку в этом случае возможно образование побочных циклических продуктов [8].

Выходы целевых вторичных аминов **4** различного состава

Целевой амин	N-Концевая защитная группа (PG)	Заместитель в γ -положении (R ₁)	Заместитель в α -положении (R ₂)	C-Концевая защитная группа (R ₃)	Выход на две стадии с очисткой промежуточного продукта 3 , %	Выход на две стадии без промежуточной очистки, %
4a	Вос	-H	-CH ₃	-CH ₂ - CH=CH ₂	84	86
4b	Вос	-CH ₃	-H	-CH ₃	67	48
4c	Вос	-CH ₂ CH ₂ COOBzl	-H	-CH ₂ - CH=CH ₂	60	60
4d	Вос	-H	-H	-CH ₃	62	65
4e	Cbz	-CH ₂ CH ₂ COO ^t Bu	-H	-CH ₃	–	56
4f	Cbz	-CH ₃	-H	-CH ₃	–	61

Для эффективного проведения двухстадийного превращения важным условием является отсутствие «кислотной» компоненты **2(a-f)** в смеси, образующейся после реакции Мицунобу. В противном случае она будет также подвергаться тиолизу и загрязнять целевой псевдопептид. Поэтому «кислотная» компонента берется в недостатке.

Как следует из данных таблицы, выходы целевых вторичных аминов **4(a-f)**, полученных по методике без выделения промежуточных полностью защищенных псевдопептидов **3(a-f)**, сопоставимы с выходами по методике с выделением этих сульфамидных производных колоночной хроматографией.

Таким образом, применение данной методики позволяет упростить и удешевить двухстадийный способ получения псевдопептидов **4(a-f)**. В результате работы целевые вторичные амины синтезированы с хорошими выходами и достаточной чистотой для дальнейших превращений. Данный эффект особенно заметен при работе с большими нагрузками исходных веществ (более 2 г спиртовой и «кислотной» компонент), что открывает путь к более технологичному и экономичному получению веществ данного класса.

Общая методика получения псевдопептидов **4(a-f)**

К охлажденному до 0⁰С раствору «кисло-

тной» компоненты (1 экв.), спиртовой компоненты (1.1 экв.) и трифенилфосфина (1.4 экв.) в тетрагидрофуране, по каплям, в атмосфере инертного газа добавляют 2.2 М раствор диэтилазодикарбоксилата (DEAD) в толуоле (1.4 экв.) в течение 20–60 мин. Затем реакционную массу нагревают до комнатной температуры и перемешивают в течение 12 ч в отсутствие воздуха. Прохождение реакции контролируют по ТСХ (система хлористый метилен–метанол, 4.9:0.1); в случае, если в реакционной смеси присутствует непрореагировавшая «кислотная» компонента, то добавляют еще по 0.3 экв. трифенилфосфина и DEAD и перемешивают еще в течение 3–12 ч. Растворитель удаляют. Полученное масло сушат в вакууме масляного насоса, растворяют в диэтиловом эфире и выдерживают при 4⁰С 16 ч. Выпавший осадок трифенилфосфиноксида отфильтровывают. Растворитель удаляют, остаток сушат в вакууме масляного насоса.

Полученную массу растворяют в ацетонитриле, охлаждают до 0⁰С и при интенсивном перемешивании добавляют карбонат калия (2 экв.) и тиофенол (4 экв.). Через 15 мин реакционную массу нагревают до комнатной температуры и перемешивают 15 ч. Растворитель удаляют, остаток растворяют в диэтиловом эфире и обрабатывают экстракцией, как было описано выше, с последующим удалением растворителя и

высушиванием полученного масла в вакууме масляного насоса.

Расход растворителей: в расчете на 10 ммоль «кислотной» компоненты, как правило, используется 80 мл тетрагидрофурана, 40 мл

диэтилового эфира для осаждения трифенилфосфиноксида, 60 мл ацетонитрила, 50 мл диэтилового эфира для экстракции, 3×25 мл раствора 20% лимонной кислоты, 4×20 мл хлористого метилена.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Guo Z., Xian M., Zhang W., McGill A., Wang, P.G. N-Nitrosoanilines: A new class of caspase-3 inhibitors // *Bioorg. Med. Chem.* 2001. V. 9. P. 99–106.
2. Alper P.B., Liu H., Chatterjee A.K., Nguyen K.T., Tully D.C., Tumanut C., Li J., Harris J.L., Tuntland T., Chang J., Gordon P., Hollenbeck T., Karanewsky D.S. Arylaminoethyl amides as noncovalent inhibitors of cathepsin S. Part 2: Optimization of P1 and N-aryl // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006. V. 16. P. 1486–1490.
3. 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. V. 254. P. 1497–1500.
4. Nielsen P.E. Peptide Nucleic Acids (PNA) in chemical biology and drug discovery // *Chemistry & Biodiversity.* 2010. V. 7. P. 786–804.
5. Mitsunobu O. The use of diethyl azodicarboxylate and triphenylphosphine in synthesis and transformation of natural products // *Synthesis.* 1981. № 1. P. 1–29.
6. Боярская Н.П., Прохоров Д.И., Стотланд Е.А., Кириллова Ю.Г., Звонкова Е.Н., Швец В.И. Синтез двух новых тиминсодержащих мономеров отрицательно заряженных ПАНКМ // *Докл. Академии наук.* 2006. Т. 48. № 1. С. 55–58.
7. Кириллова Ю.Г., Баранов А.В., Прохоров Д.И., Есипова О.В., Швец В.И. Препаративное получение β-аминоспиртов из производных дикарбоновых аминокислот // *Журн. орган. химии.* 2009. № 9. С. 1330–1332.
8. 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.

THE EFFICIENT APPROACH FOR PRODUCING PSEUDOPEPTIDE FRAGMENTS – THE KEY INTERMEDIATES OF THE SYNTHESIS OF POLYAMIDE NUCLEIC ACID MIMICS (PANAM)

A.V. Dezhnev, I.A. Prokhorov, A.I. Lyutik, V.I. Shvets, Yu.G. Kirillova[®]

M.V. Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technologies, Moscow 119571 Russia

[®] *Corresponding author e-mail: panam.mitht@gmail.com*

The convenient synthesis of the key structure fragments of polyamide nucleic acid mimic (PANAM) monomers according to route using Mitsunobu's reaction and subsequent thiolysis of protective o-nitrobenzenesulphonyl group is presented. The purification of target secondary amines was occurred after the thiolysis stage by an extraction at various pH, without isolation of fully protected pseudopeptide intermediate derivatives. Thus, it were obtained BocGlyΨAlaOAll, BocAlaΨGlyOMe, BocGluΨGlyOAll, BocGlyΨGlyOMe, CbzAlaΨGlyOMe, CbzGlu(O^tBu)ΨGlyOMe. It was shown that yields of target compounds are comparable both by the employing of purification stage of intermediates and without it. The key condition of successful applying of presented method is the absence of initial "acid component" in the reaction mixture undertaken to thiolysis.

Key words: *pseudopeptides, nucleic acid mimics, Mitsunobu's reaction.*