УДК 577.113.3

ПРЕОРГАНИЗАЦИЯ γ-ПНК: СИНТЕЗ МОДЕЛЬНОГО ДИМЕРА И ИССЛЕДОВАНИЕ ЕГО СТРУКТУРЫ МЕТОДАМИ ДВУМЕРНОЙ ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ

А.В. Деженков[1], Д.А. Чешков[2], И.А. Прохоров[1], А.И. Лютик[1], Ю.Г.Кириллова[1,3,@]

*[1]Кафедра биотехнологии и промышленной фармации,
Московский технологический университет (Институт тонких химических технологий), Москва, 119571 Россия*
[2]Государственный научный центр РФ АО «Государственный ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский институт химии и технологии элементоорганических соединений», Москва, 105118 Россия
[3]Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России, Москва, 119435 Россия
[@]Автор для переписки, e-mail: pna-mitht@yandex.ru

Представлен синтез димера, состоящего из гамма-тиминового хирального мономера на основе L-Ala и тиминового аед-ПНК-мономера, в котором метиленовые протоны псевдопептидного остатка замещены на атомы дейтерия, синтезированного из дейтерированного глицина. Дейтерированный мономер вводили в реакцию ацилирования по методу смешанных ангидридов с трифторацетатом хирального мономера гамма-ПНК на основе L-Ala, последний был получен из полностью защищенного тиминсодержащего мономера действием трифторуксусной кислоты. Структуру и чистоту целевого димера и интермедиатов подтверждали данными ЯМР-спектроскопии, элементный состав оценивали по данным элементного анализа.
Для отнесения сигналов метиленовой части остатка хирального фрагмента в димере был использован метод двумерной фазочувствительной COSY-ЯМР-спектроскопии с двухквантовым фильтром (DQF-COSY). При анализе спектра были найдены химические сдвиги и вычислены константы спин-спинового взаимодействия протонов хиральной части димера. Учитывая зависимость Карплуса, связывающую величину двугранного угла между вицинальными протонами с их константой спин-спинового взаимодействия, сделан вывод, что хиральный фрагмент находится в конформации правозакрученной спирали во всех ротамерных формах димера.

Ключевые слова: *пептидно-нуклеиновые кислоты, ПНК, хиральные мономеры ПНК, псевдопептиды, DQF-COSY-ЯМР-спектроскопия, преорганизация ПНК.*

γ-PNA PREORGANIZATION: SYNTHESIS OF MODEL DIMER AND ITS STRUCTURE STUDY BY 2D NMR SPECTROSCOPY

A.V. Dezhenkov[1], D.A. Cheshkov[2], I.A. Prokhorov[1], A.I. Lutik[1], Yu.G. Kirillova[1,3,@]

[1]Moscow Technological University (Institute of Fine Chemical Technologies), Moscow, 119571 Moscow, Russia
[2]Research Institute of Chemistry and Technology of Organoelement Compounds, Moscow,105118 Russia
[3]Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, 119435 Russia
[@]Corresponding author e-mail: pna-mitht@yandex.ru

The synthesis of a dimer consisting of γ-thymine chiral monomer based on L-Ala and thymine aeg-PNA monomer (synthesized from deuterated glycine), in which the methylene protons of the pseudopeptide residue were exchanged with deuterium atoms, was described. The deuterated monomer was introduced into acylation reaction by means of a mixed anhydride procedure with γ-PNA chiral monomer trifluoroacetate based on L-Ala. The latter was obtained from the fully protected thymine monomer by the reaction with trifluoroacetic acid. The structure and purity of the target monomer were confirmed by NMR-spectroscopy, and the elemental composition was estimated by quantitative elemental analysis.

The double quantum filtered COSY-NMR-spectroscopy (DQF-COSY) method was used to determine the methylene signals of the dimer chiral fragment. With the use of the spectrum analysis, the chemical shifts and calculated spin-spin coupling constants of the protons from the dimer chiral part were found. Given that Karplus equation associates the value of the dihedral angle between the vicinal protons with their spin-spin coupling constant, it was concluded that the chiral fragment is in the right-helix conformation for all the dimer rotamers.

Keywords: *peptide nucleic acid, PNA, PNA chiral monomers, pseudopeptides, DQF-COSY-NMR spectroscopy, PNA preorganization.*

Введение

Актуальным направлением биоорганической химии является исследование взаимодействий различных синтетических молекул с нуклеиновыми кислотами (НК, рис. 1А) для управления процессами транскрипции РНК (антиген-стратегия) и экспрессии белка (антисмысловая стратегия) [1]. Полиамидные миметики нуклеиновых кислот, или пептидно-нуклеиновые кислоты (ПНК) [2] – искусственные стабильные биополимеры, проявляющие очень хорошие свойства молекулярного узнавания комплементарных последовательностей нуклеиновых кислот, как в отношении аффинности, так и селективности. Структура этого типа миметиков сочетает полиамидный скелет (с чередованием амидной связи и ее восстановленной формы) и нуклеиновые основания, присоединенные к скелету через карбоксиметильный линкер (рис. 1Б).

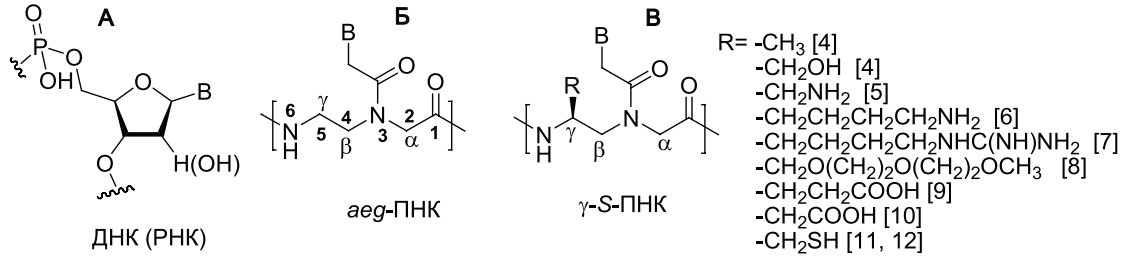

Рис. 1. Структурные фрагменты природных нуклеиновых кислот (А), аминоэтилглициновых (*aeg*) (Б) и ациклических γ-(5)-*S*-хиральных ПНК (В).

Однако так называемые «классические» ПНК на основе *N*-2-аминоэтильного глицина (*aeg*-) показывают низкую растворимость и слабую биодоступность в экспериментах *in vivo*. Один из подходов к преодолению этих недостатков заключается в получении различных модификаций ПНК – как циклических [3], так и ациклических [4–12]. Ранее было показано, что введение различных функциональных групп в состав боковых радикалов ациклического скелета может улучшать биодоступность таких соединений. Например, положительно заряженные ПНК на основе аргинина [7, 13] могут взаимодействовать с мембраной эукариотических клеток, посредством эндоцитоза проходить через нее и локализоваться в ядре, что делает возможным использование гуанидиновых ПНК для антиген-терапии.

Однако оказалось, что не менее важный вклад в связывание с мишенями нуклеиновых кислот вносит пространственная конфигурация молекул ПНК. Рядом исследователей было показано, что наличие хирального центра, его конфигурация (*R* или *S*) и его местоположение в структуре мономера (α(2)- или γ(5)-положение) (рис. 1Б, В) влияют на аффинность олигомеров ПНК к НК через преорганизацию их вторичной структуры [4]. При использовании КД-спектроскопии было показано, что ахиральные *aeg*-ПНК имеют неупорядоченную структуру и принимают спиральную форму только при образовании комплекса с НК, введение же хирального центра в структуру ПНК способствует преорганизации молекулы ПНК. Важно отметить, что в случае γ-положения и *S*-конфигурации хирального центра ПНК олигомер принимает форму правозакрученной спирали [4–12], что обеспечивает высокую аффинность и селективность γ-*S*-ПНК лучше, чем для *aeg*-ПНК.

Позже для доказательства пространственной преорганизации молекул ПНК были привлечены

методы двумерной (2D) ЯМР-спектроскопии. Для этой цели использовали модельный димер *aeg*-Cyt-γ-*S*-Me-Thy (рис. 2А), содержащий в своей структуре хиральный мономер *γ*-ПНК, изучение структуры которого методами двумерной ЯМР-спектроскопии подтверждало наличие правозакрученной преорганизации [4, 14], но, в то же время, наложение сигналов аминоэтильных протонов псевдопептидных остовов препятствовало четкому определению констант спин-спинового взаимодействия, которые в данном случае являются ключевыми факторами для проведения исследования.

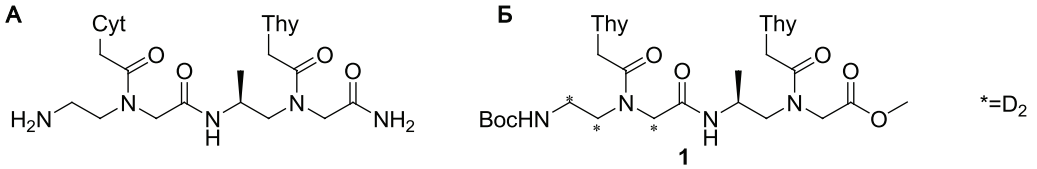

Рис. 2. Структура модельного димера *aeg*-Cyt-γ-*S*-Me-Thy [4] (А); структура модельного димера **1** с включением мономера *aeg*-ПНК с дейтерированным псевдопептидным фрагментом (Б).

В этой работе мы представляем синтез димера **1** (рис. 2Б), состоящего из тиминового хирального мономера на основе L-Ala и тиминового *aeg*-ПНК мономера, в котором метиленовые протоны псевдопептидного остатка замещены на атомы дейтерия, что позволит упростить одномерный ^{1}H-ЯМР-спектр димера **1** и его интерпретацию. Структура модельного димера была исследована методами двумерной ЯМР-спектроскопии с целью установления его преорганизации.

Результаты и их обсуждение

Синтез димера **1** предполагал получение мономера **2** *aeg*-ПНК на основе дейтерированного глицина и последующую его конденсацию с аминокомпонентом, полученным из защищенного γ-метильного мономера на основе L-Ala. Синтез мономера **2** представлен на схеме 1. Гидрохлорид метилового эфира дейтерированного глицина (**4**) был получен из D_2-глицина (**3**) действием тионилхлорида в метаноле с последующим превращением в Boc-защищенное производное **5**. Восстановлением последнего $LiAlD_4$ в ТГФ получали дейтерированный Boc-этаноламин (**6**). «Кислотная компонента» **7** для конденсации по Мицунобу [15] была получена из амина **4** взаимодействием с 2-нитробензолсульфонил хлоридом в присутствии триэтиламина. Реакция Мицунобу между спиртовой компонентой **6** и дейтерированным Ns-производным **7** приводила к образованию полностью защищенного псевдопептида **8**, при последующем тиолизе которого получали вторичный амин **9**. Ацилирование амина **9** бромацетилбромидом в присутствии триэтиламина приводило к бромацетамидному производному **10**. Последнее использовали для алкилирования тимина (**11**), с получением полностью защищенного тиминсодержащего мономера **12**. Удаление метильной защиты осуществляли действием 2 M NaOH, получая Boc-защищенный дейтерированный *aeg*-мономер **2**. Протекание реакций контролировали методом ТСХ, структуру полученных соединений доказывали с помощью ^{1}H- и ^{13}C-ЯМР-спектроскопии, данными элементного анализа.

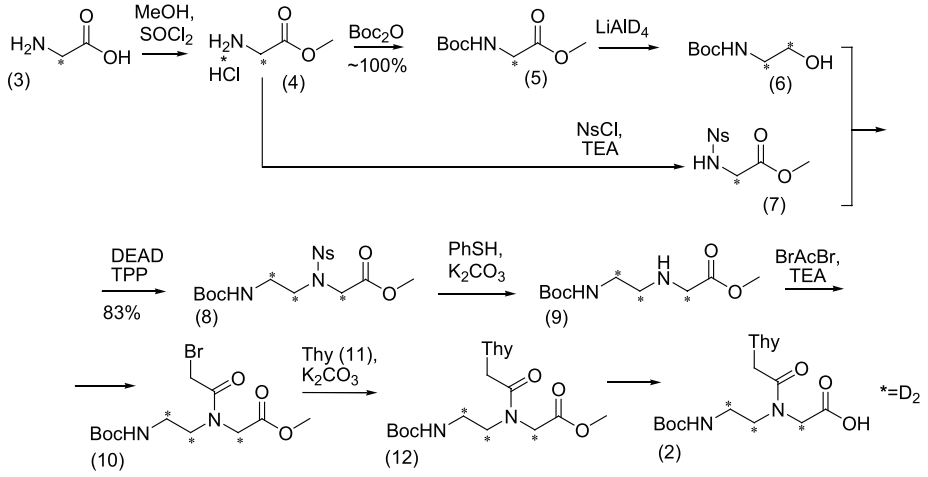

Схема 1. Синтез *aeg*-мономера ПНК из дейтерированного глицина.

Полученный мономер **2** вводили в реакцию ацилирования по методу смешанных ангидридов (в присутствии изобутилхлорформиата (IBCF) в качестве активирующего агента) с трифторацетатом **14** хирального мономера *γ*-ПНК на основе L-Ala, который был получен из полностью защищенного тиминсодержащего

мономера **13** γ-ПНК на основе L-Ala [16] действием трифторуксусной кислоты в присутствии *м*-крезола. В результате был получен целевой димер **1** (схема 2). Структуру и чистоту соединений **1, 13, 14** подтверждали данными ^{1}H-, ^{13}C-ЯМР-спектроскопии, элементный состав оценивали по данным элементного анализа.

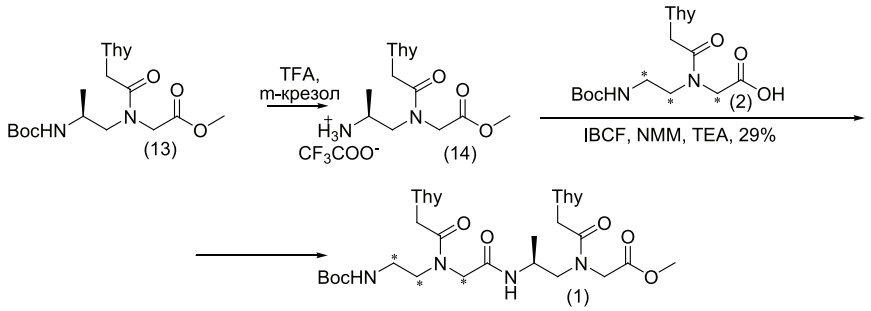

Схема 2. Получение димера **1** хиральных ПНК на основе L-Ala.

Далее структура димера **1** была исследована методами ЯМР-спектроскопии. Для установления направления его преорганизации было необходимо обнаружить в ^{1}H-ЯМР-спектре сигналы, соответствующие метиленовым протонам *4-H*^{a} и *4-H*^{b} (рис. 3).

Однозначная расшифровка одномерного ^{1}H-ЯМР-спектра представляется весьма затруднительной из-за наличия ротамерных форм димера **1**, что обусловлено затрудненным вращением вокруг амидных связей (рис. 4) [17]. Таким образом, каждая группа протонов проявляется в спектре в виде четырех сигналов, и в случае большого количества мультиплетов в одномерном протонном спектре возможно их сильное перекрывание. Поэтому для более точного отнесения сигналов метиленовой

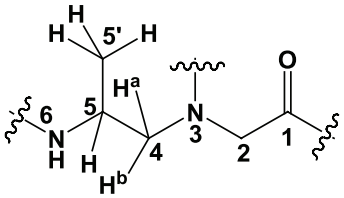

Рис. 3. Структура хиральной части димера **1**.

части остатка хирального фрагмента в димере **1** был использован метод двумерной фазо-чувствительной ^{1}H-^{1}H-COSY-ЯМР-спектроскопии с двухквантовым фильтром (DQF-COSY). Регистрацию спектров проводили в дейтероацетоне при 40ºС, так как димер **1** ограниченно растворим в этом растворителе.

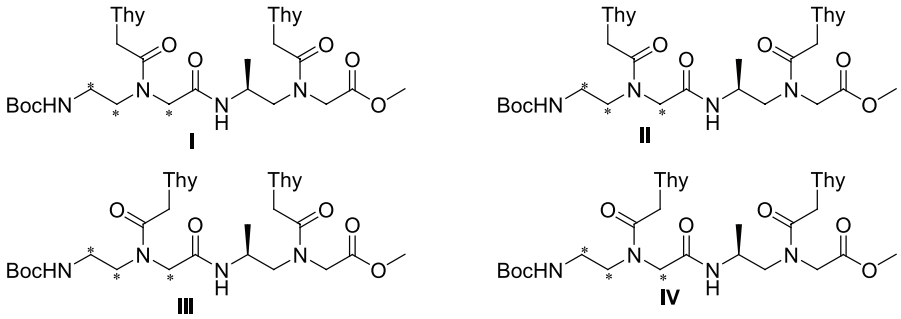

Рис. 4. Структуры ротамеров хирального димера **1**.

В ходе анализа DQF-COSY-спектра мы обнаружили четыре кросс-пика между протоном *5-H* и протоном аминогруппы *6-H* (рис. 5А, 6А), а также четыре кросс-пика между протонами метильной группы *5'-CH*$_3$ (рис. 3А) и протоном из метиленовой части *5-H* при хиральном центре (рис. 5Б). По влиянию магнитно-анизотропных (экранирующих) карбонильных остатков в ацетамидном линкере нам удалось отнести конформеры **I–IV** (рис. 4) на двумерном спектре (рис. 5А, Б).

Однако сигналы, соответствующие метиленовым протонам *4-H*^{a} и *4-H*^{b}, отображаются большим числом мультиплетов из-за большего числа соседних протонов и наличия заторможенных конформаций **I–IV** димера (рис. 4), и этот фрагмент спектра, в целом, не выглядит столь репрезентативным (рис. 6Б). Тем не менее, нами были обнаружены основные кросс-пики между протонами *4-H*^{a} и *5-H*, *4-H*^{b} и *5-H* хиральной метиленовой части (рис. 6Б).

Это позволило найти химические сдвиги, отвечающие протонам *4-H*^{a} и *4-H*^{b} (см. рис. 3) и приблизительные константы спин-спинового взаимодействия между ними, а также между протонами *4-H*^{a} и *5-H* и протонами *4-H*^{b} и *5-H*; данные представлены в таблице.

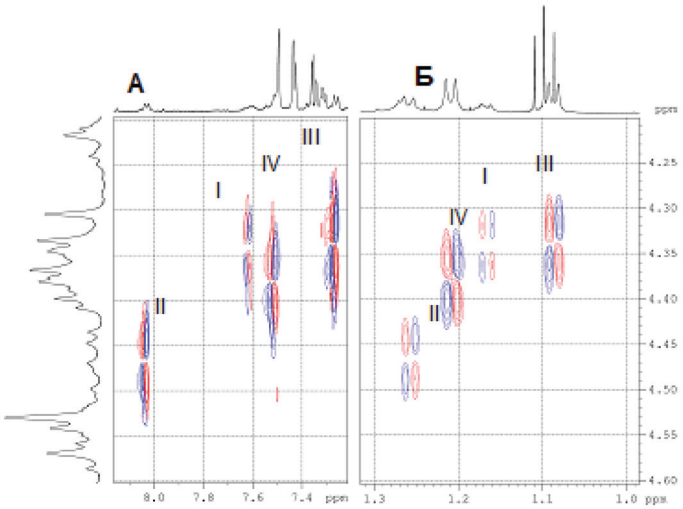

Рис. 5. Фрагменты DQF-COSY-спектра димера **1**: кросс-пики между протоном *5-H* и протоном аминогруппы *6-H* (А); кросс-пики между протонами метильной группы *5'-CH$_3$* и протоном *5-H* при хиральном центре (Б).

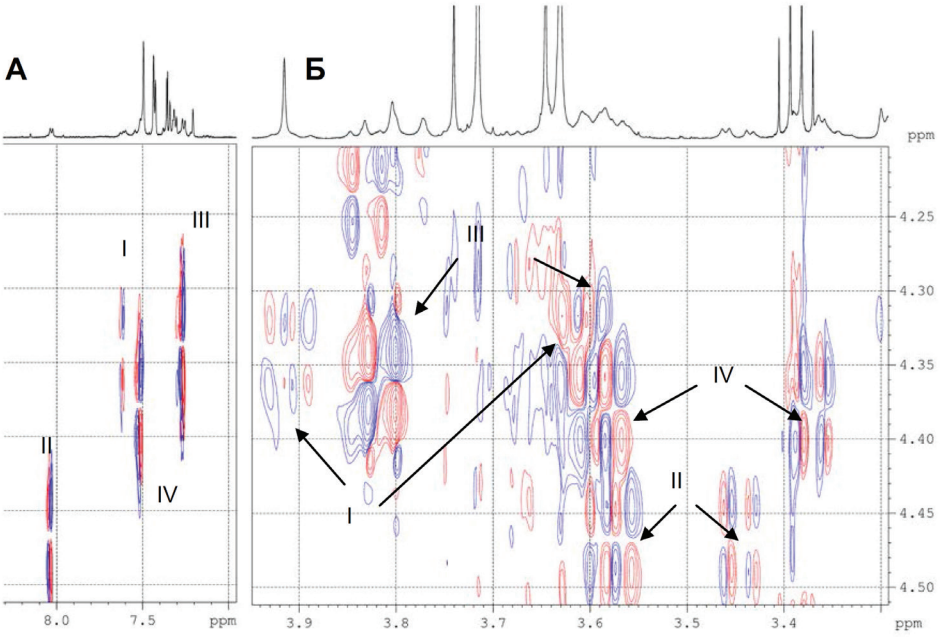

Рис. 6. Фрагменты DQF-COSY-спектра димера **1**: кросс-пики между протоном *5-H* и протоном аминогруппы *6-H* (А); кросс-пики между протонами *4-H^a* и *4-H^b*, *5-H* хиральной метиленовой части.

Химические сдвиги протонов *4-H^a* и *4-H^b* и константы спин-спинового взаимодействия протонов *4-H^a* и *4-H^b*, *4-H^a* и *5-H*, а также *4-H^b* и *5-H*

	I	II	III	IV
4-H^a	3.60 м.д. (dd, $J_{(4\text{-}Hb)}$=14.7 Гц, $J_{(5\text{-}H)}$=10.9 Гц)	3.72 м.д. (dd, $J_{(4\text{-}Hb)}$=14.5 Гц, $J_{(5\text{-}H)}$=8.5 Гц)	3.77 м.д. (dd, $J_{(4\text{-}Hb)}$=13.8 Гц, $J_{(5\text{-}H)}$=9.5 Гц)	3.84 м.д. (dd, $J_{(4\text{-}Hb)}$=14.6 Гц, $J_{(5\text{-}H)}$=9.2 Гц)
4-H^b	3.19 м.д. (dd, $J_{(4\text{-}Ha)}$=13.9 Гц, $J_{(5\text{-}H)}$=4 Гц)	3.30 м.д. (dd, $J_{(4\text{-}Ha)}$=14.1 Гц, $J_{(5\text{-}H)}$=4.1 Гц)	3.36 м.д. (dd, $J_{(4\text{-}Ha)}$=14.8 Гц, $J_{(5\text{-}H)}$=4 Гц)	3.47 м.д. (dd, $J_{(4\text{-}Ha)}$=15.1 Гц, $J_{(5\text{-}H)}$=4.2 Гц)

В нашем случае константы спин-спинового взаимодействия для различных ротамерных структур **I–IV** составили $J_{(4\text{-Ha-4-Hb})}$ ~14.4 Гц, $J_{(4\text{-Ha-5-H})}$ ~9.5 Гц и $J_{(4\text{-Hb-5-H})}$ ~4.1 Гц. Заметим, что некоторые вицинальные константы спин-спинового взаимодействия между протонами *5-H* и *4-H*^{b}, равные 4.1 Гц, можно легко обнаружить в одномерном ^{1}H-ЯМР-спектре (рис. 7).

Учитывая зависимость Карплуса, связывающую величину двугранного угла между вицинальными протонами с их константой спин-спинового взаимодействия, можно сделать вывод, что фрагмент –^{6}NH–^{5}CH(CH$_3$)–^{4}CH$_2$– (рис. 8А) находится в конформации правозакрученной спирали во всех ротамерных формах **I–IV**.

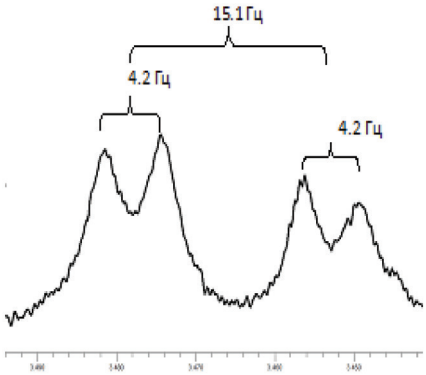

Рис. 7. Фрагмент ^{1}H-ЯМР-спектра димера **1**.

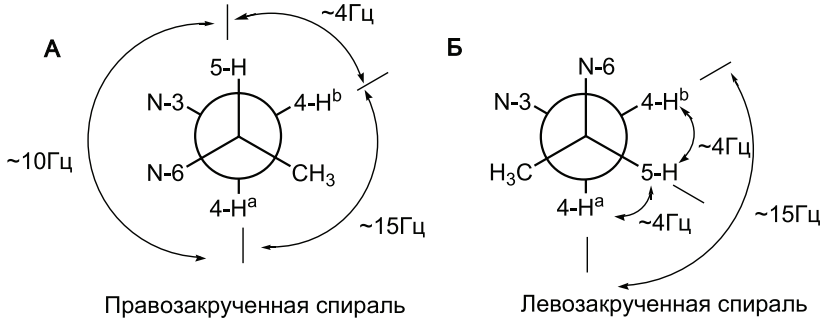

Рис. 8. Проекции Ньюмана для право- и левозакрученных хиральных ПНК.

Заключение

Таким образом, был синтезирован модельный димер **1**, состоящий из γ-*S*-метильного тиминового мономера на основе L-Ala и тиминового *aeg*-мономера с дейтерированным псевдопептидным фрагментом. Анализ структуры димера **1** ЯМР-спектроскопией показал, что димер в растворе находится в четырех конформерных формах, для каждой из которых были определены константы спин-спинового взаимодействия между протонами в хиральной части димера с использованием ^{1}H-^{1}H-DQF-COSY-ЯМР-спектроскопии. Значения констант указывают, что наличие метильной группы и *S*-конфигурации хирального центра в γ-положении хирального мономера преорганизует структуру олигомера (димера) в правозакрученную спираль.

Однако в проведенном эксперименте в 2D-ЯМР-спектре для димера **1** из восьми сигналов, соответствующих протонам *4-H*^{a} и *4-H*^{b} (рис. 6Б), пять видны как отдельные сигналы, а три сигнала остались не разрешенными и проявляются одним трудно интерпретируемым кросс-пиком. По всей видимости, дейтероацетон не является подходящим растворителем для проведения ЯМР-экспериментов из-за ограниченной растворимости димера **1** даже при наличии концевых *N*-Boc- и *C*-OMe-защитных групп, поэтому эксперимент проводили при повышенной температуре (40ºС), что сказывается на разрешении сигналов. Поэтому для получения репрезентативной картины двумерного спектра структура модельного димера нуждается в корректировке. Например, в качестве *C*-концевой защитной группы можно использовать бензильную группу, которая будет способствовать растворимости в органическом растворителе. Кроме того, замена атомов водорода на дейтерий также возможна в аминокислотной части хирального мономера.

Экспериментальная часть

В работе использовали следующие реактивы: тионилхлорид, *N*-метилморфолин, изобутилхлорформиат, NsCl, тиофенол, бромацетил бромид (Aldrich, США), тимин (Acros, США), DEAD (40% раствор в толуоле) (Fluka, Швейцария), гидрид натрия, ди-*трет*-бутилпирокарбонат, $LiAlD_4$, PPh_3 (Merck, Германия), реактивы марки х.ч. и ч.д.а. отечественного производства: глицин-D_2, уксусная кислота, триэтиламин, ТГФ, ДМФА, метанол, этанол, хлористый метилен, этилацетат, гексан, 1,4-диоксан, ацетонитрил, диэтиловый эфир, P_2O_5, KOH, NaOH, $LiAlH_4$, гидрокарбонат натрия, хлорид натрия, сульфат натрия, гидрид кальция, оксид бария, карбонат калия, лимонная кислота. Следующие растворители были очищены перед использованием: хлористый

метилен (перегоняли над P_2O_5), ДМФА (перегоняли над фталиевым ангидридом в вакууме), тетрагидрофуран (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 и CaH_2), *N*-метилморфолин (кипятили над BaO и затем перегоняли), 1,4-диоксан (кипятили над Na и затем перегоняли).

^{1}H-ЯМР-спектры полученных соединений регистрировали при 25ºС на импульсных Фурье-спектрометрах Bruker DPX-300 (Германия) (с рабочей частотой 300 МГц для ^{1}H и 75 МГц для ^{13}C) и Bruker AVANCE-600 (с рабочей частотой 600.13 МГц для ядер ^{1}H и 150.92 МГц для ядер ^{13}C). Химические сдвиги приведены в миллионных долях относительно внутреннего стандарта тетраметилсилана (δ 0.000 м.д.). Константы спин-спинового взаимодействия (J) приведены в Гц. При описании ^{1}H-ЯМР-спектров приняты следующие сокращения: s – синглет, d – дублет, t – триплет, dd – двойной дублет, q – квартет, m – мультиплет. Спектры регистрировали в $CDCl_3$, ДМСО-d_6 или ацетоне-d_6.

Регистрацию спектров димера **1** осуществляли в ацетоне-d_6 при 40ºС.

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.

Гидрохлорид метилового эфира D_2-глицина (4). В круглодонную колбу, снабженную магнитной мешалкой, помещали 100 мл абсолютного метанола и охлаждали его до -60ºС, затем по каплям добавляли тионилхлорид (31 г, 19 мл, 262.7 ммоль) и порциями вносили D_2-глицин (**3**) (10 г, 133.3 ммоль). Суспензию перемешивали 2 ч при -5ºС, затем 12 ч при комнатной температуре. По мере этерификации осадок растворялся. Растворитель удаляли, к остатку добавляли 100 мл диэтилового эфира. Суспензию охлаждали в течение 12 ч при 4ºС. Выпавшие кристаллы собирали фильтрованием, промывали диэтиловым эфиром и сушили в вакууме (0.2 мм рт. ст.). Выход 15.3 г, кристаллы белого цвета (94%). R_f 0.57 (изопропанол – 25% водный раствор аммиака, 4:1); ^{1}H-ЯМР-спектр (ДМСО-d_6, 300 МГц) δ 8.66 (s, 3H, -N$\underline{H}_3$), 3.70 (s, 3H, -OC$\underline{H}_3$); ^{13}C-ЯМР-спектр (ДМСО-d_6, 75 МГц) δ 168.4, 52.9, 40.5.

Метиловый эфир *N-(трет*-бутилоксикарбонил)-D_2-глицина (5). К раствору гидрохлорида метилового эфира D_2-глицина (**4**) (2 г, 15.9 ммоль) в смеси воды и 1,4-диоксана (50 мл/50 мл) добавляли $NaHCO_3$ (1.6 г, 19.1 ммоль) и ди-*трет*-бутилпирокарбонат (4.18 г, 4.4 мл, 19.1 ммоль). Смесь перемешивали в течение 12 ч при комнатной температуре. Полученный раствор экстрагировали этилацетатом (3·50 мл). Органическую фазу сушили Na_2SO_4, растворитель удалили на ротационном испарителе, остаток сушили в вакууме (0.2 мм рт. ст.). Выход 3.01 г, бесцветное масло (количественный). R_f 0.86 (гексан/этиацетат, 1:1); ^{1}H-ЯМР-спектр ($CDCl_3$, 300 МГц) δ 5.02 (s, br, 1H, -N$\underline{H}$), 3.76 (s, 3H, -C$\underline{H}_3$), 1.46 (s, 9H, Boc(^{t}Bu)-).

Метиловый эфир *N-(орто*-нитробензолсульфонил)-D_2-глицина (7). К охлажденному до 0ºС раствору амина **4** (2 г, 15.94 ммоль) в DCM (50 мл) добавляли диизопропилэтиламин (6.16 г, 8.3 мл, 47.81 ммоль) и порциями *о*-нитробензосульфонилхлорид (4.24 г, 19.12 ммоль). Через 15 мин реакционной массе позволяли нагреться до комнатной температуры и оставляли перемешиваться в течение 12 ч. Растворитель удаляли при пониженном давлении, к остатку добавляли 40 мл воды и полученный раствор экстрагировали этилацетатом (3×40 мл). Органические слои объединяли и промывали 1 М раствором HCl (2×20 мл), насыщенным раствором $NaHCO_3$ (2×20 мл), насыщенным раствором NaCl (2×20 мл). Органическую фазу сушили Na_2SO_4, растворитель удаляли на ротационном испарителе, продукт в виде кристаллов затирали из гексана и сушили в вакууме (0.2 мм рт. ст.). Выход 2.52 г, кристаллы белого цвета (58%). R_f 0.23 (гексан–этилацетат, 1:1); ^{1}H-ЯМР-спектр (ДМСО-d_6, 300 МГц) δ 8.56 (s, 1H, -N$\underline{H}$), 8.11-7.73 (m, 4H, -Ph(Ns)), 3.50 (s, 3H, -OC$\underline{H}_3$); ^{13}C-ЯМР-спектр (ДМСО-d_6, 75 МГц) δ 169.9, 147.7, 136.3, 134.5, 133.9, 130.1, 124.8, 52.3, 44.1.

***N-(трет*-Бутилоксикарбонил)-2D_2-1-аминоэтанол (6).** К раствору защищенного глицина **5** (2 г, 5.29 ммоль) в абс. THF (50 мл) при охлаждении до 0ºС порциями прибавляли $LiAlD_4$ (556 мг, 6.61 ммоль). Ход реакции контролировали с помощьюТСХ, при этом разбавляя контрольные аликвоты водой. После полной конверсии исходного соединения смесь разлагали 5% раствором $KHSO_4$ до pH 4. Раствор экстрагировали диэтиловым эфиром (2×30 мл). Органическую фазу сушили Na_2SO_4, растворитель удаляли, остаток хроматографировали на колонке (элюент: гексан–этилацетат, 1:1). Фракции, содержащие целевой спирт,-концентрировали и остаток сушили в вакууме (0.2 мм рт. ст.). Выход 910 мг, бесцветное масло (53%). R_f 0.48 (гексан–этилацетат, 1:1); ^{1}H-ЯМР-спектр ($CDCl_3$, 300 МГц) δ 5.12 (s, br, 1H, -N$\underline{H}$), 2.93 (s, 1H, -O$\underline{H}$), 1.43 (s, 9H, Boc(^{t}Bu)-); ^{13}C-ЯМР-спектр ($CDCl_3$, 75 МГц) δ 156.8, 79.6, 62.1, 43.0, 28.4.

Метиловый эфир *[N-(трет-б*утилоксикарбонил)-2D_2-аминоэтил]-*N-(о*-нитробензосульфонил)-D_2-глицина (8). К охлажденному до 0ºС рас-

твору спирта **6** (830 мг, 5.06 ммоль), сульфамида **7** (1.33 г, 4.82 ммоль) и трифенилфосфина (1.53 г, 5.78 ммоль) в 70 мл THF в атмосфере аргона добавляли по каплям DEAD (40% раствор в толуоле) (2.8 мл, 5.78 ммоль). Реакционную массу перемешивали при комнатной температуре в течение 12 ч. Растворитель удаляли, полученное масло сушили в вакууме масляного насоса, растворяли в 50 мл диэтилового эфира и выдерживали 12 ч при 4ºС. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали диэтиловым эфиром, растворитель фильтрата удаляли при пониженном давлении. Продукт выделяли при помощи колоночной хроматографии (элюент: хлористый метилен–метанол, 50:1), сушили в вакууме (0.2 мм рт. ст.). Выход 1.68 г, кристаллы желтого цвета (83%). R_f 0.54 (гексан–этилацетат, 1:1); ^{1}H-ЯМР-спектр (ДМСО-d_6, 300 МГц) δ 8.07-8.00 (m, 1H, -SPh), 7.75-7.56 (m, 3H, -Ph(Ns)), 5.16 (2s, 1H, BocN$\underline{H}$-), 3.50 (s, 3H, -OC$\underline{H}_3$), 1.42 (s, 9H, Boc(^{t}Bu)-); ^{13}C-ЯМР-спектр (ДМСО-d_6, 75 МГц) δ 169.5, 156.1, 147.9, 133.8, 132.9, 131.8, 131.0, 124.2, 79.6, 52.4, 48.1, 47.2, 37.7, 28.3.

Метиловый эфир *[N-(трет*-бутилоксикарбонил)-2D$_2$-аминоэтил]-D$_2$-глицина (9). К раствору защищенного псевдопептида **8** (1.64 г, 3.89 ммоль) в 50 мл ацетонитрила при интенсивном перемешивании и охлаждении до 0ºС добавляли карбонат калия (1.07 г, 7.77 ммоль) и тиофенол (1.3 г, 1.2 мл, 11.66 ммоль). Через 15 мин смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 12 ч. Растворитель удаляли при пониженном давлении, остаток растворяли в 40 мл диэтилового эфира и промывали 20% раствором лимонной кислоты (5×20 мл). Водный слой промывали диэтиловым эфиром (1×15 мл), доводили до pH 6 добавлением карбоната калия и экстрагировали хлористым метиленом (3×30 мл). Органическую фазу сушили Na_2SO_4, растворитель удаляли на ротационном испарителе. Продукт сушили в высоком вакууме. Выход 860 мг, масло желтого цвета (93%). R_f 0.13 (гексан–этилацетат, 1:1); ^{1}H-ЯМР-спектр ($CDCl_3$, 300 МГц) δ 5.19 (s, br, 1H, BocN$\underline{H}$-), 3.67 (s, 3H, -OC$\underline{H}_3$), 1.99 (s, br, 1H, -N$\underline{H}$), 1.38 (s, 9H, Boc(^{t}Bu)-); ^{13}C-ЯМР-спектр ($CDCl_3$, 75 МГц) δ 172.8, 156.1, 79.0, 51.7, 49.7, 47.7, 39.6, 28.3.

Метиловый эфир *N*-[2-*(трет-б*утилоксикарбонил)-2D$_2$-аминоэтил]-*N′*-бромацетил-D$_2$-глицина (10). К раствору амина **9** (400 мг, 1.68 ммоль) в DCM (50 мл) добавляли бромацетил бромид (0.46 г, 0.2 мл, 2.02 ммоль) при охлаждении до 0ºС. После этого добавляли TEA (0.3 мл, 2.02 ммоль) по каплям и смесь перемешивали в течение 1 ч. Растворитель удаляли при пониженном давлении, остаток растворяли в этилацетате (50 мл) и последовательно промывали водой (2×25 мл) и насыщенным раствором NaCl (2×25 мл). Органическую фазу сушили Na_2SO_4, растворитель удаляли. Продукт выделяли при помощи колоночной хроматографии (элюент: гексан–этилацетат, 2:3) и сушили в вакууме (0.2 мм рт. ст.). Выход 380 мг, масло желтого цвета (63%). R_f 0.28 (гексан–этилацетат, 1:1); ^{1}H-ЯМР-спектр ($CDCl_3$, 300 МГц) δ 5.41 (s, br, 1H, BocN$\underline{H}$-), 3.91 (s, 2H, -C$\underline{H}_2$), 3.78 и 3.75 (2s, 3H, -OC$\underline{H}_3$), 1.43 и 1.41 (2s, 9H, Boc(^{t}Bu)-); ^{13}C-ЯМР-спектр ($CDCl_3$, 75 МГц) δ 170.2, 167.8, 156.0, 79.9, 52.8, 49.5, 48.7, 37.9, 28.3, 26.0.

Метиловый эфир *N*-[2-(*трет*-бутилоксикарбонил)-2D$_2$-аминоэтил]-*N′*-[тимин-1-ацетил]-D$_2$-глицина (12). К суспензии тимина (**11**) (232 мг, 1.84 ммоль) в 15 мл свежеперегнанного ДМФА при перемешивании добавляли предварительно высушенный карбонат калия (254 мг, 1.84 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 15 мин при комнатной температуре, после чего прибавляли раствор бромида **10** (330 мг, 0.92 ммоль) в 15 мл ДМФА. Через 12 ч растворитель удаляли при пониженном давлении, остаток растворяли в воде (50 мл) и экстрагировали хлороформом (3×25 мл). Органическую фазу сушили Na_2SO_4, растворитель удаляли, остаток сушили в вакууме (0.2 мм рт. ст.). Вещество использовали далее без дополнительной очистки. Выход 262 мг, кристаллы белого цвета (71%). R_f 0.57 (этилацетат); ^{1}H-ЯМР-спектр (ДМСО-d_6, 300 МГц) δ 11.28 и 11.27 (2s, 1H, ThyN$\underline{H}$-), 7.32-7.21 (m, 1H, C$^6\underline{H}$Thy), 6.90 и 6.70 (2s, BocNH-), 4.64 и 4.46 (2s, 2H, -C$\underline{H}_2$), 3.71 и 3.62 (2s, 3H, -OC$\underline{H}_3$), 1.74 и 1.71 (2s, 3H, -C$\underline{H}_3$Thy), 1.37 и 1.36 (2s, 9H, Boc(^{t}Bu)-); ^{13}C-ЯМР-спектр (ДМСО-d_6, 75 МГц) δ 170.3, 168.1, 164.8, 156.2, 151.4, 142.4, 108.6, 78.5, 52.7, 52.2, 49.1, 48.2, 41.6, 28.6, 12.4.

***N-[*2-*(трет*-Бутилоксикарбонил)-2D$_2$-аминоэтил]-*N′*-[тимин-1-ацетил]-D$_2$-глицин (2).** К суспензии эфира **12** (229 мг, 0.57 ммоль) в смеси ТГФ–вода (8:1; 22.5 мл) добавляли 2.3 мл 2 М раствора NaOH при охлаждении до 0ºС. Через 15 мин температуру доводили до комнатной и смесь перемешивали в течение 45 мин. После этого pH доводили до 6 добавлением 0.1 М раствора $KHSO_4$. Воду упаривали, к остатку добавляли 50 мл метанола, осадок отфильтровывали. Фильтрат сушили Na_2SO_4, растворитель удаляли на ротационном испарителе. Продукт сушили в вакууме масляного насоса. Выход 221 мг, кристаллы белого цвета (количественный). R_f 0.30 (DCM–метанол–уксусная кислота, 9:1:0.1); ^{1}H-ЯМР-спектр (ДМСО-d_6, 300 МГц) δ 11.27 и 10.28 (2s, br, 1H, ThyN$\underline{H}$-), 7.41-7.19 (m, 1H, C$^6\underline{H}$Thy), 6.90 и 6.72 (2s, BocN$\underline{H}$-), 4.70-4.40 (m, 2H, -C$\underline{H}_2$), 1.79-1.67 (m, 3H, -C$\underline{H}_3$Thy), 1.37 и 1.10 (2s, 9H, Boc(^{t}Bu)-); ^{13}C-ЯМР-спектр (ДМСО-d_6, 75 МГц) δ 171.9, 168.9, 164.8, 156.2, 151.9, 142.6, 108.5, 78.5, 51.3, 49.0, 48.2, 41.8, 28.6, 12.4. Вычислено для $C_{16}H_{17}D_6N_4O_7Na$, %: C 46.60, H 7.09, N 13.59, C/N 3.43, Найдено; %: C 46.13, H 7.88, N 13.26, C/N 3.48.

Метиловый эфир (трифторацетат) аминоизопропил-*N'*-[тимин-1-ацетил]-глицина (14). К охлажденному до 0ºС раствору мономера **13** [16] (220 мг, 0.51 ммоль) в 30 мл DCM прибавляли *м*-крезол (0.5 мл) и трифторуксусную кислоту (5 мл). Через 2 ч растворитель удаляли, остаток переупаривали с толуолом (3·20 мл) и диэтиловым эфиром (3×20 мл). Полученное масло сушили в вакууме (0.2 мм рт. ст.). Выход 226 мг, кристаллы белого цвета (количественный). R_f 0.43 (гексан–этилацетат, 1:1); ^{1}H-ЯМР-спектр ($CDCl_3$, 300 МГц) δ 11.35 и 11.30 (2s, 1H, ThyNH-), 7.95 и 7.77 (2s, br, 2H, -N$\underline{H}_2$) 7.37 и 7.28 (2s, 1H, C$^6\underline{H}$Thy), 4.75-4.05 (m, 4H, (-C$\underline{H}_2$N)·2), 3.73 и 3.65 (2s, 3H, -OC$\underline{H}_3$), 3.59-3.28 (m, 3H, NH$_2$C$\underline{H}$C$\underline{H}_2$-), 1.83-1.69 (m, 3H, -C$\underline{H}_3$Thy), 1.28-1.06 (m, 3H, C$\underline{H}_3$-).

Метиловый эфир 4-[*N-(трет*-бутилоксикарбонил)аминоизопропил]-5-*[N'*-(тимин-1-ацетил)-глицинил-6-*N''*-2D$_2$-аминоэтил-7-[*N'''*-(тимин-1-ил-ацетил)]-D$_2$-глицина (1). К охлажденному до -20ºС раствору мономера **2** (50 мг, 0.13 ммоль) и *N*-метилморфолина (0.27 г, 0.03 мл, 0.26 ммоль) в 5 мл свежеперегнанного ДМФА в атмосфере аргона добавляли изобутилхлорформиат (0.021 г, 0.02 мл, 0.13 ммоль). Через 3 мин добавляли охлажденный до -20ºС раствор амина **14** (67.35 мг, 0.15 ммоль) в 5 мл ДМФА. Реакционную массу перемешивали 30 мин при -20ºС, а затем 1 ч при комнатной температуре. Растворитель удаляли при пониженном давлении. К остатку добавляли 20 мл метанола, осадок отфильтровывали. Фильтрат сушили Na_2SO_4, растворитель удаляли. Продукт выделяли при помощи колоночной хроматографии (элюент: хлористый метилен–метанол, 4:1) и сушили в вакууме (0.2 мм рт. ст.). Выход: 25 мг, кристаллы белого цвета (29%). R_f 0.63 (DCM–метанол, 4:1); ^{1}H-ЯМР-спектр (ацетон-d_6, 600 МГц) δ 10.71-10.26 (m, 2H, -2N$\underline{H}$(Thy)), 7.58-7.35 (m, 2H, 2·C$^6\underline{H}$Thy), 7.34-7.11 (m, 1H, N$\underline{H}$C=O амид), 6.57-6.02 (m, 1H, BocN$\underline{H}$-), 4.90-3.98 (m, 7H, 3·-C$\underline{H}_2$N-, -NHC$\underline{H}$-), 3.88-3.16 (m, 2H, -NHCHC$\underline{H}_2$-), 1.86-1.76 (m, 6H, 2·-C$\underline{H}_3$Thy), 1.47, 1.44, 1.42 и 1.40 (4s, 9H, Boc(^{t}Bu)-), 1.33-1.10 (m, 3H, -C$\underline{H}_3$Ala).

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (грант 4.128.2014/К) и Российского научного фонда (грант 14-25-00013).

Список литературы / References:

1. Milligan J.F., Matteucci M.D., Martin J.C. Current concepts in antisense drug design // J. Med. Chem. 1993. V. 36. P. 1923–1937.

2. 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.

3. Kumar V.A., Ganesh K.N. Conformationally constrained PNA фnalogues: Structural evolution toward DNA/RNA binding selectivity. // Acc. Chem. Res. 2005. V. 38. P. 404–412.

4. Dragulescu-Andrasi A., Rapireddy S., Frezza B.M., Gayathri C., Gil R.R., Ly D.H. A simple γ-backbone modification preorganizes peptide nucleic acid into a helical structure // J. Am. Chem. Soc. 2006. V. 128. P. 10258–10267.

5. Mitra R., Ganesh K.N. Aminomethylene peptide nucleic acid (am-PNA): Synthesis, regio-/stereospecific DNA binding, and differential cell uptake of (α/γ,R/S)am-PNA analogues // J. Org. Chem. 2012. V. 77. P. 5696−5704.

6. Tedeschi T., Sforza S., Corradini R., Marchelli R. Synthesis of new chiral PNAs bearing a dipeptide-mimic monomer with two lysine-derived stereogenic centres // Tetrahedron Lett. 2005. V. 46 P. 8395–8399.

7. Sahu B., Chenna V., Lathrop K.L., Thomas S.M., Zon G., Livak K.J., Ly D.H. Synthesis of conformationally preorganized and cell-permeable guanidine-based γ-peptide nucleic acids (γGPNAs) // J. Org. Chem. 2009. V. 74. P. 1509–1516.

8. Sahu B., Sacui I., Rapireddy S., Zanotti K.J., Bahal R., Armitage B.A., Ly D.H. Synthesis and characterization of conformationally preorganized, (*R*)-diethylene glycol-containing γ-peptide nucleic acids with superior hybridization properties and water solubility // J. Org. Chem. 2011. V. 76. P. 5614–5627.

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

10. De Costa N.T.S., Heemstra J.M. Evaluating the effect of ionic strength on duplex stability for PNA having negatively or positively charged side chains // PLoS One. 2013. V. 8. P. 1−8.

11. de Koning M.C., Petersen L., Weterings J.J., Overhand M., van der Marel G.A., Filippov D.V. Synthesis of thiol-modified peptide nucleic acids designed for post-assembly conjugation reactions // Tetrahedron. 2006. V. 62. P. 3248–3258.

12. Dose C., Seitz O. Convergent synthesis of peptide nucleic acids by native chemical ligation // Org. Lett. 2005. V. 7. P. 4365–4368.

13. Zhou P., Dragulescu-Andrasi A., Bhattacharya B., O'Keefe H., Vatta P., Hyldig-Nielsen J.J., Ly D.H. Synthesis of cell-permeable peptide nucleic acids and characterization of their hybridization and uptake properties // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2006. V. 16. P. 4931–4935.

14. Vieville J.M.P., Barluenga S., Winssinger N., Delsuc M-A. Duplex formation and secondary structure

of γ-PNA observed by NMR and CD // Biophys. Chem. 2016. V. 210. P. 9–13. http://dx.doi.org/10.1016/j.bpc.2015.09.002

15. 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. P. 7909–7917.

16. Lyanov M.A., Kirillova Yu.G., Prokhorov D.I., Lyutik A.I., Esipova O.V., Shvets V.I. Synthesis of two PNA thymine monomers based on L-alanine and glycine // Vestnik MITHT (Fine Chem. Technol.). 2010. V. 5. № 1. P. 104–108. (in Russ.).

17. Chen S.M., Mohan V., Kiely J.S., Griffith M.C., Griffey R H. Molecular dynamics and NMR studies of single-stranded PNAs // Tetrahedron Lett. 1994. V. 35. P. 5105–5108.

18. He W., Crawford M.J., Rapireddy S., Madrid M., Gil R.R., Ly D.H., Achim C. The structure of a γ-modified peptide nucleic acid duplex // Mol. BioSyst. 2010. V. 6. P. 1619–1629.

19. Yeh J.I., Shivachev B., Rapireddy S., Crawford M.J., Gil R.R., Du S., Madrid M., Ly D.H. Crystal structure of chiral γPNA with complementary DNA strand: Insights into the stability and specificity of recognition and conformational preorganization // J. Am. Chem. Soc. 2010. V. 132. P.10717–10727.

Об авторах:

Деженков Андрей Владимирович, аспирант кафедры биотехнологии и промышленной фармации Института тонких химических технологий ФГБОУ ВО «Московский технологический университет» (119571, Россия, Москва, пр-т Вернадского, д. 86).

Чешков Дмитрий Александрович, научный сотрудник Государственного научного центра РФ АО «Государственный ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский институт химии и технологии элементоорганических соединений» (105118, Россия, Москва, ш. Энтузиастов, 38).

Прохоров Иван Андреевич, стажер-исследователь кафедры биотехнологии и промышленной фармации Института тонких химических технологий ФГБОУ ВО «Московский технологический университет» (119571, Россия, Москва, пр-т Вернадского, д. 86).

Лютик Алла Игоревна, кандидат химических наук, старший научный сотрудник кафедры биотехнологии и промышленной фармации Института тонких химических технологий ФГБОУ ВО «Московский технологический университет» (119571, Россия, Москва, пр-т Вернадского, д. 86).

Кириллова Юлия Геннадьевна, кандидат химических наук, доцент кафедры биотехнологии и промышленной фармации Института тонких химических технологий ФГБОУ ВО «Московский технологический университет» (119571, Россия, Москва, пр-т Вернадского, д. 86); старший научный сотрудник, Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА, 119435, Россия, Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а).