

Методы синтеза и технология производства лекарственных средств

© Коллектив авторов, 2005

Д. И. Прохоров, Ю. Г. Кириллова, Н. П. Боярская, А. Н. Тевяшова,
О. В. Есипова, Е. Н. Звонкова, В. И. Швец

СИНТЕЗ ТИМИНСОДЕРЖАЩЕГО МОНОМЕРА ОТРИЦАТЕЛЬНО ЗАРЯЖЕННЫХ ПНК

Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова, Москва

Описан синтез тиминсодержащего мономера отрицательно заряженных ПНК на основе производных L-глутаминовой кислоты. Осуществлены два пути создания псевдопептидного синтона: реакцией восстановительного N-алкилирования и конденсацией по Мицунобу. Показано, что последний способ более предпочтителен.

Полиамидные ДНК-миметики или пептидно-нуклеиновые кислоты (ПНК), известные с 1991 г. [1], привлекают большое внимание исследователей. “Классические” ПНК, разработанные группой датских ученых, состоят из повторяющихся N-(2-аминоэтил)глициновых псевдопептидных звеньев, во второй аминогруппе которых присоединены амидной связью гетероциклические основания (рис. 1, структура А).

Свойства ПНК хорошо изучены за последние 10 лет [1 – 5]. При этом интерес ученых к этим молекулам обусловлен тем, что наряду с уникальными гибридизационными свойствами, не уступающими природным нуклеиновым кислотам, ПНК обладают гораздо большей химической устойчивостью по сравнению с ними. Известно, что ПНК образуют стабильные антипараллельные дуплексы ПНК:ПНК, а также параллельные и антипараллельные дуплексы ПНК:ДНК и ПНК:РНК, причем последние более устойчивы, чем ДНК:ДНК- и ДНК:РНК-дуплексы. С другой стороны, ПНК в очень незначительной степени подвержены гидролизу ферментами, как в клеточных экстрактах, так и *in vivo* [5]. ПНК проявляют антибактериальную [6], противоопухолевую активность [7], а также перспективны для терапии некоторых вирусных заболеваний [8]. Кроме того, ПНК и их многочисленные модификации рассматриваются как кандидаты для диагностики и лечения наследственных заболеваний, связанных с дефектами генома [4]. Однако следует отметить, что применение ПНК и их многочисленных модификаций [2, 6] ограничено рядом недостатков, в частности, плохой растворимостью в воде и склонностью к самоагрегации.

Одним из способов, позволяющих преодолеть вышеуказанные недостатки, является получение олигомеров ПНК, содержащих в своем составе гидрофильные группировки. Ранее уже сообщалось о синтезе последовательностей ПНК, включающих в себя мономерные единицы, построенные на основе хиральных аминокислот, в том числе и заряженных [9, 10]. Было показано, что такого рода модификации не ока-

зывают существенного влияния на стабильность дуплексов, а в некоторых случаях даже увеличивают ее, например, в случае ПНК на основе D-лизина [9]. Олигомеры ПНК, в состав которых входят мономеры на основе дикарбоновых аминокислот (рис. 1, структура Б), оказались наилучшими дискриминаторами мутаций по сравнению с классическими ПНК.

К настоящему времени разработаны разнообразные синтетические стратегии для получения мономеров и олигомеров ПНК различного строения [11 – 13]. Поэтому основная задача нашей работы заключалась в поиске оптимальных путей синтеза мономера (I) (рис. 2), на основе которого возможно в дальнейшем проведение олигомеризации на твердой фазе [11]. Этот мономер в защищенном виде (II) может быть получен конденсацией тимин-1-илуксусной кислоты (III) с псевдопептидной компонентой (IV). Синтез кислоты III подробно описан [14], обычно его осуществляют алкилированием тимина этиловым эфиром бромуксусной кислоты с последующим омылением. Таким образом, главное направление наших исследований было сосредоточено на поиске препаративного пути синтеза

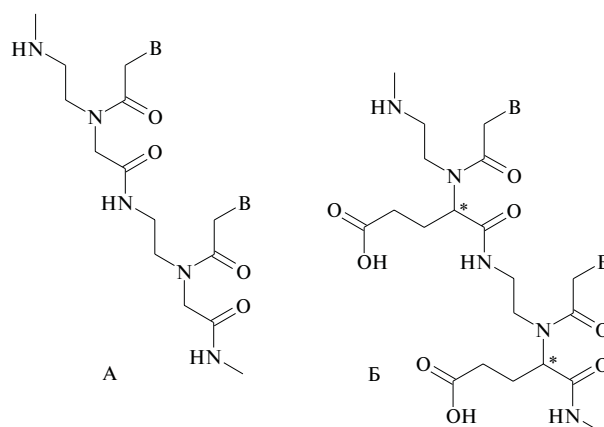


Рис. 1. Структура “классических” (А) и отрицательно заряженных (Б) ПНК (В — гетероциклическое основание)

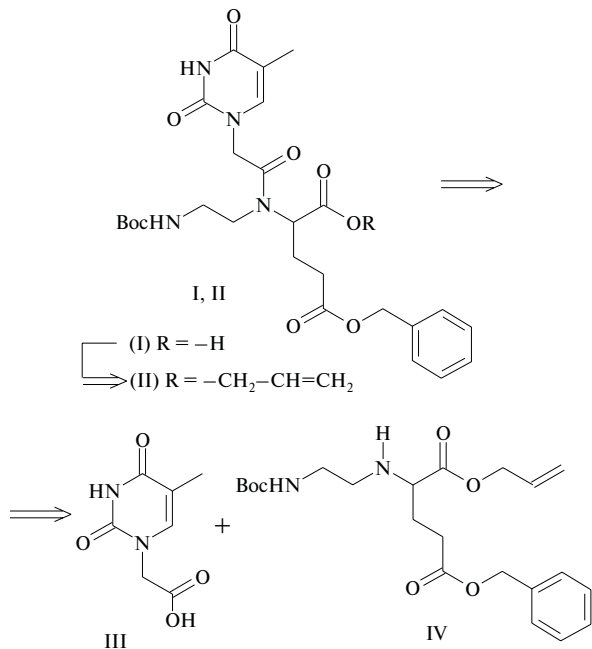


Рис. 2. Структура тиминсодержащего мономера (I) для синтеза отрицательно заряженных ПНК по Вос-протоколу и структурные компоненты (III, IV) для его построения

псевдопептидного синтона IV, а также отработке условий его последующей конденсации с кислотой III.

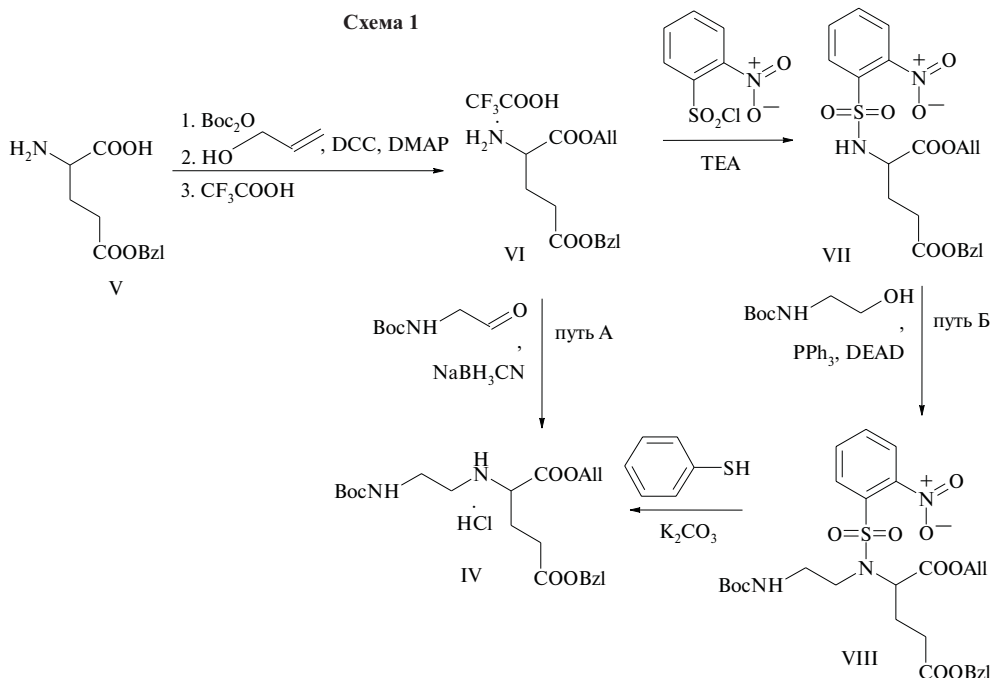
Следует отметить, что сами по себе псевдопептиды, будучи негидролизруемыми аналогами пептидов, могут быть использованы как ингибиторы различных процессов протеолиза. Таким образом, нам представляется актуальным поиск оптимальных путей синтеза таких структур. Из литературных данных известны два широко используемых метода получения восстановленной пептидной связи, а именно — восстановительное N-алкилирование и реакция Мицунобу [17].

В работе нами были опробованы оба способа (схема 1). Исходным соединением в реакции восстанови-

тельного N-алкилирования служил N-Вос-аминоацетальдегид и γ -бензиловый, α -аллиловый диэфир L-глутаминовой кислоты (VI). Последний легко получали из доступного γ -бензилового эфира L-глутаминовой кислоты (V) в три стадии, последовательно защищая аминогруппу, ацилируя α -карбоксыльную группу аллиловым спиртом и удаляя Вос-защиту трифторацетусной кислотой в хлористом метиле. Трифторацетат аминоэфира VII был получен с общим выходом 63%. Структура последнего, а также промежуточных соединений была подтверждена данными ¹H ЯМР-спектроскопии.

Реакцию восстановительного N-алкилирования между N-Вос-аминоацетальдегидом и аминоэфиром VI проводили в метаноле действием цианборгидрида натрия в присутствии уксусной кислоты (см. схему 1, путь А). Предварительную нейтрализацию трифторацетата VII осуществляли насыщенным раствором бикарбоната натрия с последующей экстракцией хлористым метилом (выход 98%). Защищенный аминокетальдегид был получен по известному методу [15] из 3-амино-1,2-пропандиола в две стадии. Целевой псевдопептид IV подвергали хроматографической очистке и выделяли в виде хлоргидрата. Выход реакции составил 41%. Реакция сопровождалась образованием побочного продукта (IX) — производного пироглутаминовой кислоты (схема 2), что было подтверждено с помощью ¹H ЯМР-спектроскопии.

Выделение вторичного амина IV в виде его хлоргидрата необходимо для того, чтобы подобным солеобразованием защитить вторичную аминогруппу и предотвратить возможный процесс циклизации на время хранения вещества до его последующих превращений, так как было замечено, что хранение вещества в форме основания в течение 1 месяца даже при -20 °C приводило к заметному образованию продукта IX с выходом около 50% (по данным ТСХ).



В связи с неблагоприятным прогнозом разработки препаративной технологии для получения псевдопептида IV на основе реакции восстановительного N-алкилирования нами был опробован альтернативный способ. В работе [16] был описан синтез псевдопептидных компонент из аминокислот и производного глицина в условиях реакции Мицунобу [17]. Кроме того, было показано, что получаемые псевдопептиды обладали более высокой оптической чистотой по сравнению с аналогичными структурами, полученными реакцией восстановительного N-алкилирования, что имеет определяющее значение в нашем случае. Исходным соединением в данном подходе служило N-*o*-нитробензолсульфонильное производное L-глутаминовой кислоты (VII) (см. схему 1, путь Б), поскольку наличие электроноакцепторной группы при атоме азота позволяет использовать это соединение в качестве электрофильной компоненты, легко вступающей в реакцию нуклеофильного замещения с N-Вос-этанол-амином. Соединение VII получали из трифторацетата диэфира VI взаимодействием с *o*-нитробензолсульфохлоридом в присутствии триэтиламина в хлористом метиле, с выходом 74 %. Реакцию Мицунобу проводили в ТГФ, в стандартных условиях, применяя диэтил-азодикарбоксилат (DEAD). Выход в этой конденсации после хроматографического разделения реакционной смеси составил 62 %.

Для получения псевдопептида IV *o*-нитробензолсульфонильную группу в соединении (VIII) удаляли, действуя 3-кратным избытком тиофенола и 1,5-кратным избытком поташа в ацетонитриле. Реакция проходила в течение 5 ч. Образующийся в ходе обработки реакции циклический продукт IX отделяли от целевого псевдопептида IV с помощью флэш-хроматографии, после чего последний сразу же вводили в конденсацию с кислотой III.

Стандартным методом образования амидной связи между псевдопептидным фрагментом ПНК и производными нуклеиновых оснований, описанным в различных работах [9–10, 14, 16], является использование различных карбодимидов: дициклогексилкарбодимида (DCC) или 1-[3-(диметиламино)пропил]-3-этилкарбодимида (EDC) в сочетании с нуклеофильными добавками 1-гидроксибензотриазолом (НОВТ) или 3,4-дигидро-3-гидрокси-4-оксо-1,2,3-бензотриазин-ом (DhbtOH). Однако применение такого рода активации, а также использование специфичного N-ацилирующего реагента бензотриазол-1-илокситрис(диметиламино)-фосфоний гексафторфосфата (ВОР) [18] не приводило к приемлемым выходам (таблица).

Причинами такой низкой конверсии могут служить, во-первых, недостаточная активация тимин-1-илуксусной кислоты, во-вторых, стерические особенности вторичного амина IV, и, наконец, образование в ходе реакции побочного продукта циклизации IX. Таким образом, для однозначного и эффективного проведения процесса N-ацилирования необходимо было, с одной стороны, получить устойчивое и активное производное тимин-1-ил уксусной кислоты III, а, с другой стороны, максимально сократить время реакции во избежание побочного процесса циклизации. Использо-

вание метода смешанных ангидридов позволило сократить время реакции до 20 мин, и при этом выход целевого продукта II составил 60 % в случае полупорционного и 78 % в случае 3-х кратного избытка карбоксильной компоненты по отношению к амину IV (см. таблицу).

Тиминовый мономер II выделяли колоночной хроматографией и охарактеризовали с помощью ¹H-ЯМР-спектра, который полностью подтвердил его структуру.

Аллильная группировка была избирательно удалена при действии палладиевого комплекса с трифенилфосфином (Pd[PPh₃]₄⁰) по известному методу [20], что привело к целевому мономеру I, структуру которого подтверждали данными ¹H ЯМР-спектроскопии.

Экспериментальная часть

Спектры ¹H ЯМР регистрировали при 25 °С на импульсном Фурье-спектрометре Bruker MSL-200 (Германия) с рабочей частотой 200 МГц для протонов. Химические сдвиги сигналов протонов приведены в миллионных долях относительно внутреннего стандарта тетраметилсилана (δ 0.000 м.д.). Колоночную хроматографию проводили на сорбенте Kieselgel 40–60 мкм (Merck). Защищенный аминокетальдегид был получен по известному методу [15] из 3-амино-1,2-пропандиола в две стадии. Тимин-1-ил уксусная кислота III была получена согласно стандартной методике [14] из тимина с общим выходом 58,5 %. Трифторацетат α -аллилового, γ -бензилового диэфира L-глутаминовой кислоты (VI) синтезировали исходя из γ -бензилового эфира L-глутаминовой кислоты в три стадии, используя стандартные методы пептидной химии [19]. Выход — 63 %, т.пл. 102–104 °С.

ПМР-спектр (CDCl₃), δ м.д.: 8,48 (с, 2H, N⁺ H₂); 7,35 (м, 5H, C₆H₅-); 5,95 (м, 1H, α -OCH₂CH=CH₂); 5,30 (м, 2H, α -OCH₂CH=CH₂); 5,09 (с, 2H, -CH₂-Ph); 4,60 (м, 2H, α -OCH₂CH=CH₂); 4,1 (м, 1H, α -CH₂); 2,61 (м, 2H, γ -CH₂); 1,92 (м, 2H, β -CH₂).

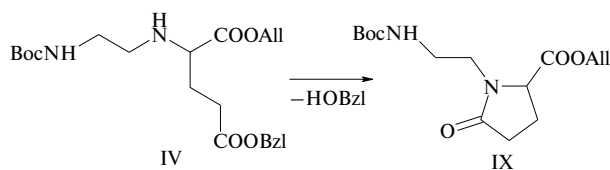
α -Аллиловый, γ -бензиловый диэфир N-(*o*-нитробензолсульфонил)-L-глутаминовой кислоты (VII). К охлажденному до 0 °С раствору 1 г (2,56 ммоль) трифторацетата эфира VI и 0,54 г (5,38 ммоль) триэтиламина в 10 мл дихлорметана добавляли порциями 0,54 г (2,82 ммоль) *o*-нитробензолсульфонилхлорида. Через 20 мин охлаждение снимали, перемешивали 12 ч при комнатной температуре. Растворитель удаляли, полученное желтое масло растворяли в 20 мл воды

Отработка условий реакции конденсации псевдопептидного фрагмента IV с тимин-1-ил уксусной кислотой III

Методы активации	Время	Температура, °С	Соотношение III к IV	Выход, %
DCC/НОВТ/DIEA*	20 ч	+ 20	1,1	15
DCC/DhbtOH/DIEA	15 ч	+ 20	1,1	53
ВОР/DIEA	20 ч	+ 20	3,0	32
IBC/NMM/TEA*	20 мин	- 20	1,5	60
IBC/NMM/TEA	20 мин	- 20	3,0	78

* DIEA-диизопропилэтиламин, IBC — изобутилхлорформат, TEA-триэтиламин, NMM — N-метилморфолин.

Схема 2



и экстрагировали этилацетатом (2×10 мл). Органическую фазу последовательно промывали 1М раствором HCl ($2 \times 1,5$ мл), насыщенным раствором NaCl ($2 \times 1,5$ мл), насыщенным раствором NaHCO_3 ($2 \times 1,5$ мл), снова насыщенным раствором NaCl ($2 \times 1,5$ мл), сушили над Na_2SO_4 . Растворитель удаляли, в результате получали желтое масло. Продукт выделяли на колонке (2×30 см) с силикагелем, элюируя системой растворителей этилацетат — петролейный эфир, 1:1, общий объем элюента 0,5 л. Выход: 0,85 г (74 %), $[\alpha]_D^{20} - 43,4$ °C (с 1, метанол).

ПМР-спектр (CDCl_3), δ , м.д.: 8,05 (д, 1H, $-\text{CH}-\text{C}-\text{N}$ (Ph)); 7,93 (д, 1H, $-\text{CH}-\text{C}-\text{S}$ (Ph)); 7,71 (м, 2H, $-\text{CH}-\text{CH}-$ (Ph)); 7,35 (с, 5H, C_6H_5-); 6,21 (с, 1H, NH); 5,65 (м, 1H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$); 5,21 (т, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$); 5,11 (с, 2H, $-\text{CH}_2-\text{Ph}$); 4,35 (т, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$); 4,29 (кв, 1H, $\alpha-\text{CH}$); 2,60 (м, 2H, $\gamma-\text{CH}_2$); 2,00 (м, 2H, $\beta-\text{CH}_2$).

α -Аллиловый, γ -бензиловый диэфир N' -(*трет*-бутилоксикарбониламиноэтил)- N -(*орто*-нитробензолсульфонил)- L -глутаминовой кислоты (VIII). К раствору 0,75 г (1,57 ммоль) диэфира VII, 0,38 г (2,35 ммоль) Вос-этанолamina и 0,66 г (2,35 ммоль) трифенилфосфина в 10 мл свежеперегнанного ТГФ, охлажденному до 0 °C, добавляли 0,41 г (2,35 ммоль) DEAD в токе аргона с интервалом 2 мин в 5 приемов. Через 30 мин охлаждение снимали и реакционную массу перемешивали при комнатной температуре без аргона в течение 48 ч. Растворитель удаляли, полученное желтое масло сушили в высоком вакууме, затем добавляли 10 мл смеси абсолютного диэтилового эфира и гексана, 1:1, и оставляли на 48 ч при 4 °C. Выпавший белый осадок отфильтровывали через слой силикагеля и промывали той же смесью. Растворители удаляли, вещество сушили в высоком вакууме. Полученное желтое масло хроматографировали на колонке ($1,5 \times 60$ см) с силикагелем в системе растворителей гексан — этилацетат, 3:2, общий объем элюента 0,2 л. Растворитель удаляли, желтое масло сушили в высоком вакууме. Выход: 0,63 г (80 %), $[\alpha]_D^{20} - 2,0$ °C (с 1, метанол).

ПМР-спектр (CDCl_3), δ , м.д.: 8,05 (д, 1H, $-\text{CH}-\text{CH}-\text{SO}_2$ (*o*-NBS)); 7,64 (дд, 2H, $-\text{CH}-\text{CH}-$ (*o*-NBS)); 7,49 (д, 1H, $-\text{CH}-\text{CH}-\text{NO}_2$ (*o*-NBS)); 7,35 (с, 5H, C_6H_5-); 5,65 (м, 1H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$); 5,21 (т, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$); 5,11 (с, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{Ph}$); 4,89 (с, 1H, NH-Вос); 4,66 (кв, 1H, $\alpha-\text{CH}$); 4,44 (т, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$); 4,21 (кв, 2H, Вос-NH- CH_2-CH_2-); 3,60 (дт, 2H, Вос-NH- CH_2-CH_2-); 2,60 (м, 2H, $\gamma-\text{CH}_2$); 2,10 (м, 2H, $\beta-\text{CH}_2$); 1,45 (с, 9H, Вос).

α -Аллиловый, γ -бензиловый диэфир N -(*трет*-бутилоксикарбониламиноэтил)- L -глутаминовой кис-

лоты, гидрохлорид (IV). Путь А. К раствору предварительно нейтрализованного трифторацетата эфира VI (4,00 г, 14,40 ммоль) в 40 мл метанола при 0 °C добавляли Вос-аминоацетальдегид (3,04 г, 17,40 ммоль). Реакционную смесь 30 мин перемешивали при 0 °C, после чего последовательно добавляли уксусную кислоту (0,99 мл) и цианборгидрид натрия (0,50 г, 7,90 ммоль). Через 30 мин растворитель удаляли и полученное масло растворяли в 150 мл этилацетата. После промывания насыщенным раствором NaHCO_3 (50 мл) и насыщенным раствором NaCl (50 мл) органический экстракт сушили над Na_2SO_4 , растворитель удаляли. Полученное желтоватое масло растворяли в абс. эфире (60 мл), охлаждали до -25 °C и обрабатывали эквивалентным количеством (5,04 мл) 3,4 М HCl в абс. эфире, а затем 60 мл высушенного гексана. Образующийся маслянистый осадок отделяли декантацией, сушили в высоком вакууме, растворяли в 50 мл абс. эфира и при перемешивании добавляли 1 мл метанола и 10 мл гексана. Смесь перемешивали 2 ч при комнатной температуре, а затем выдерживали при 4 °C в течение 12 ч. Выпавший белый осадок отфильтровывали, промывали абс. эфиром и сушили в вакуумном эксикаторе над P_2O_5 . Выход: 2,10 г (41 %).

ПМР-спектр (CDCl_3), δ , м.д.: 7,35 (с, 5H, C_6H_5-); 6,40 (м, 1H, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}-\text{COOAll}$); 5,65 (м, 1H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$); 5,21 (т, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$); 5,11 (с, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{Ph}$); 4,89 (с, 1H, NH-Вос); 4,48 (кв, 1H, $\alpha-\text{CH}$); 4,44 (т, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$); 4,21 (кв, 2H, Вос-NH- CH_2-CH_2-); 4,10 (т, 2H, Вос-NH- CH_2-CH_2-); 2,60 (м, 2H, $\gamma-\text{CH}_2$); 2,10 (м, 2H, $\beta-\text{CH}_2$); 1,45 (с, 9H, Вос).

Реакция сопровождалась образованием побочного продукта IX. ПМР-спектр (CDCl_3), δ , м.д.: 5,9 (м, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 5,3 (м, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 4,88 (с, 1H, Вос-NH); 4,65 (дд, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 4,39 (д, 1H, $\alpha-\text{CH}$); 3,55 (м, 1H, CH_2); 3,42 (м, 1H, CH_2); 3,12 (м, 2H, CH_2); 2,50 (м, 1H, CH_2); 2,37 (м, 2H, CH_2); 2,10 (м, 1H, CH_2); 1,45 (с, 9H, Вос).

Путь Б. К раствору 50,2 мг (0,083 ммоль) диэфира VIII в 1,4 мл ацетонитрила при перемешивании добавляли 17,1 мг (0,124 ммоль) карбоната калия и 18,2 мг (0,165 ммоль) тиофенола. Через 5 ч растворитель удаляли, остаток желтого цвета растворяли в 5 мл эфира и добавляли 10 мл 10 % раствора лимонной кислоты. Водный слой экстрагировали эфиром (2×5 мл). Органическую фазу промывали 10 % раствором лимонной кислоты (2 мл). К собранному водным фазам добавляли 4 г твердого карбоната калия (выделяется газ) и экстрагировали эфиром (4×3 мл). Эфирный экстракт сушили Na_2SO_4 , растворитель удаляли, вещество (масло желтого цвета) сушили при 0,5 мм рт. ст. Выход IV — 15,0 мг (82 %). Характеристики вещества IV, полученного путями А и Б, полностью совпадали.

α -Аллиловый, γ -бензиловый диэфир N -[2-(*трет*-бутилоксикарбониламиноэтил)- N -(*тимин*-1-ил)ацетил]- L -глутаминовой кислоты (II). К предварительно охлажденному до -20 °C раствору тимин-1-ил уксусной кислоты III (0,35 г, 1,89 ммоль) и (1,89 ммоль) N -метилморфолина в 5 мл свежеперегнанного ДМФ в атмосфере инертного газа добавляли

в один прием 0,25 мл (0,97 ммоль) изобутилхлорформата. Через 4 мин добавляли 0,10 мл (0,73 ммоль) триэтиламина с последующим добавлением охлажденного до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ раствора 0,27 г (0,63 ммоль) диэфира IV в 1 мл ДМФ. Реакционную смесь перемешивали 30 мин в атмосфере инертного газа при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ и 1 ч при комнатной температуре. Растворитель удаляли, а остаток растворяли в 20 мл этилацетата и последовательно промывали насыщенным раствором NaCl (1 \times 10 мл), насыщенным раствором NaHCO_2 (2 \times 10 мл) и снова насыщенным раствором NaCl (1 \times 10 мл). Органический слой сушили Na_2SO_4 . Растворитель удаляли. Продукт выделяли на хроматографической колонке (15 \times 250 мм) в системе растворителей этилацетат — гексан, 2:8. Растворитель удаляли, полученное вещество сушили при 0,5 мм рт. ст. Выход: 0,29 г (78 %), т. пл. $68 - 70\text{ }^{\circ}\text{C}$, $[\alpha]_D^{20} - 11,9\text{ }^{\circ}$ (с 1, метанол).

ПМР-спектр (DMSO-d_6), δ , м.д.: 11,20 (с, 1H, 3-NH-Thy); 7,60 (м, 5H, C_6H_5); 6,45 (с, 1H, 6-H-Thy); 6,85 (м, 1H, NH-Boc); 5,88 (м, 1H, $\alpha\text{-OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 5,22 (м, 2H, $\alpha\text{-OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 5,08 (с, 2H, $-\text{CH}_2\text{Ph}$); 4,12 (с, 2H, Thy- $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$); 4,05 (м, 2H, $\alpha\text{-OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$); 4,25 (м, 1H, $\alpha\text{-CH-Glu}$); 3,51 (м, 1H, N- CH_2); 3,25 (м, 3H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 2,48 (м, 2H, $\gamma\text{-CH}_2\text{-Glu}$); 2,22 (м, 1H, $\beta\text{-CH-Glu}$); 2,05 (м, 1H, $\beta\text{-CH-Glu}$); 1,69 (с, 3H, 5- $\text{CH}_3\text{-Thy}$); 1,45 (с, 9H, tBu).

γ -Бензиловый эфир N-[2-(N-трет-бутилоксикарбониламиноэтил)]-N-[(тимин-1-ил)ацетил]-L-глутаминовой кислоты (I). К раствору II (100 мг, 0,17 ммоль) в 1,17 мл ТГФ в атмосфере инертного газа добавляли морфолин (48,5 мл, 1,71 ммоль) и $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$ (19,2 мг, 0,017 ммоль). Через 12 ч растворитель удаляли, остаток растворяли в этилацетате (10 мл) и промывали последовательно раствором NaCl (доведенным до pH 3,0 с помощью 0,1 М раствора KHSO_4) (3 \times 7 мл) и насыщенным раствором NaCl (3 \times 7 мл). Органический слой сушили Na_2SO_4 . Растворитель удаляли. Полученное масло растворяли в 5 мл этилацетата и продукт кристаллизовали добавлением из гексана. Выпавшее кристаллическое вещество собирали фильтрованием, сушили при 0,5 мм рт. ст. Выход 60,2 мг (65 %), т. пл. $132 - 135\text{ }^{\circ}\text{C}$.

ПМР-спектр (DMSO-d_6), δ , м.д.: 11,25 (с, 1H, 3-NH-Thy); 7,35 (м, 5H, C_6H_5); 7,25 (с, 1H, 6-H-Thy); 7,12 (м, 1H, NH-Boc); 5,12 (с, 2H, $-\text{CH}_2\text{Ph}$); 4,45 (с, 2H, Thy- $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$); 4,27 (м, 1H, $\alpha\text{-CH-Glu}$); 3,20 (м, 1H, N- CH_2); 3,05 (м, 3H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 2,45 (м, 2H, $\gamma\text{-CH}_2\text{-Glu}$); 2,30 (м, 1H, $\beta\text{-CH-Glu}$); 1,85 (м, 1H, $\beta\text{-CH-Glu}$); 1,75 (с, 3H, 5- $\text{CH}_3\text{-Thy}$); 1,35 (с, 9H, tBu).

Таким образом, в результате проделанной работы мы можем сделать следующие выводы. Основная

сложность синтеза целевого мономера ПНК сопряжена с неустойчивостью псевдопептида IV особенно в форме основания, склонного к циклизации с образованием производного пироглутаминовой кислоты IX. Тем не менее, мы пришли к заключению, что для создания псевдопептидного синтона предпочтительнее использовать конденсацию по Мицунобу, поскольку применяется более доступное исходное вещество (этаноламин вместо 3-амино-1,2-пропандиола), реакции проходят однозначно и с высокими выходами. Выполненная нами работа, на наш взгляд, освещает некоторые методические аспекты получения псевдопептидов различного строения и делает их практически доступными для развития новых самостоятельных направлений их использования, например в качестве ингибиторов процессов протеолиза. Кроме того, продемонстрировано преимущество метода смешанных ангидридов для препаративного получения тиминсодержащего мономера отрицательно заряженных ПНК.

ЛИТЕРАТУРА

1. P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, et al., *Science*, **254**(5037), 1497 – 1500 (1991).
2. N. Sugimoto, N. Satoh, K. Yasuda, et al., *Biochemistry*, **40**(29), 8444 – 8451 (2001).
3. E. Uhlmann, A. Peyman, G. Breipohl, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **37**(20), 2796 – 2823 (1998).
4. R. Gambari, *Curr. Pharm. Des.*, **7**, 1839 – 1862 (2001).
5. V. V. Demidov, V. N. Potaman, M. D. Frank-Kamenetskii, et al., *Biochem. Pharmacol.*, **48**, 1310 – 1313 (1994).
6. L. Good, S. K. Awasthi, R. Dryselius, et al., *Nat. Biotechnol.*, **19**(4), 360 – 364 (2001).
7. L. Mologni, P. E. Nielsen, and C. Gambacorti-Passerini, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **264**(2), 537 – 543 (1999).
8. T. Mayhood, N. Kaushik, P. K. Pandey, et al., *Biochemistry*, **39**(38), 11532 – 11539 (2000).
9. G. Haaima, A. Lohse, O. Buchardt, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **35**(17), 1939 – 1942 (1996).
10. A. Püschl, S. Sforza, G. Haaima, et al., *Tetrahedron Lett.*, **39**(26), 4707 – 4710 (1998).
11. L. Christensen, R. Fitzpatrick, B. Gildea, et al., *J. Pept. Sci.*, **1**(3), 175 – 183 (1995).
12. S. A. Thomson, J. A. Josey, R. Cadilla, et al., *Tetrahedron*, **51**(22), 6179 – 6194 (1995).
13. D. W. Will, G. Breipohl, D. Langner, et al., *Tetrahedron*, **51**(44), 12069 – 12082 (1995).
14. K. L. Dueholm, M. Egholm, C. Behrens, et al., *J. Org. Chem.*, **59**(19), 5767 – 5773 (1994).
15. K. L. Dueholm, M. Egholm, and O. Buchardt, *Org. Prep. Proced. Int.*, **25**, 457 – 461 (1993).
16. B. Falkiewicz, A. S. Kołodziejczyk, B. Liberek, et al., *Tetrahedron*, **57**, 7909 – 7917 (2001).
17. O. Mitsunobu, *Synthesis*, **1**(b), 1 – 29 (1981).
18. B. Castro, J. R. Dormoy, G. Evin, et al., *Tetrahedron Lett.*, **14**(April), 1219 – 1222 (1975).
19. А. А. Гершкович, В. К. Киберев, *Химический синтез пептидов*, Наукова Думка, Киев (1992).
20. S. Friedrich-Bochnitschek, H. Waldmann, and H. Kunz, *J. Org. Chem.*, **54**(4), 751 – 756 (1989).

Поступила 07.02.05

SYNTHESIS OF A THYMIN-CONTAINING MONOMER OF NEGATIVELY CHARGED POLYNUCLEIC ACIDS

D. I. Prokhorov, Yu. G. Kirillova, N. P. Boyarskaya, A. P. Tevashova, O. V. Esipova, E. N. Zvonkova, and V. I. Shvets

Moscow State Academy of Fine Chemical Technology, Moscow, Russia

The synthesis of a thymin-containing monomer of negatively charged PNAs from L-glutamic acid derivatives is described. Two approaches to pseudopeptide backbone creation were realized: (i) reaction of reductive N-alkylation and (ii) Mitsunobu condensation. It is shown that the latter pathway is more favorable.