

ХИМИЯ И ТЕХНОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 577.113.3

РАЗРАБОТКА НЕПРЯМОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭНАНТИОМЕРНОЙ ЧИСТОТЫ МОНОМЕРОВ ХИРАЛЬНЫХ ПОЛИАМИДНЫХ МИМЕТИКОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ (ПАНКМ)

Ю.Г. Кириллова, доцент, А.В. Рякин, студент, Д.И. Прохоров, научный сотрудник, М.А. Льянов, инженер, О.В. Есипова, доцент, С.В. Еремин, старший преподаватель, Е.Н. Звонкова, профессор
кафедра Биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова
e-mail: panam.mitht@gmail.com

Описан подход для определения энантиомерной чистоты хиральных α -(бензил)-карбоксиэтил- и γ -метилзамещенных мономеров полиамидных миметиков нуклеиновых кислот (ПАНКМ) непрямой методом. Способ основан на получении C-концевых производных с метиловым эфиром L- или DL-изолейцина с последующим определением относительного содержания основного и минорного диастереомеров с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Также представлен анализ ^1H -ЯМР-спектров диастереомерных смесей.

An indirect approach for the determination of enantiomeric purity of chiral α -(benzyl)-carboxyethyl- and γ -methyl-substituted monomers of polyamide nucleic acids mimics (PANAM) is described. The test consist in the synthesis of C-terminal diastereomers with methyl ester of L- or DL-isoleucine for each PANAM monomer and estimation of the relative content (abundance ratio) of main and minor diastereomers by means of reverse phase HPLC and ^1H -NMR spectroscopy.

Ключевые слова: пептидно-нуклеиновые кислоты (ПНК), полиамидные миметики нуклеиновых кислот (ПАНКМ), хиральные мономеры, энантиомерная чистота, обращенно-фазовая ВЭЖХ, ^1H -ЯМР-спектроскопия.

Key words: peptide nucleic acids (PNA), polyamide nucleic acids mimics (PANAM), chiral monomers, enantiomeric purity, reverse phase HPLC, ^1H -NMR-spectroscopy.

Введение

С момента открытия полиамидных миметиков нуклеиновых кислот (ПАНКМ), более известных в иностранной литературе как «классические» пептидно-нуклеиновые кислоты (ПНК) [1], был предложен ряд различных модификаций этих молекул с целью улучшения аффинности и/или специфичности их связы-

вания с мишенями – комплементарными последовательностями нуклеиновых кислот (НК) [2, 3]. Одна из наиболее интересных модификаций данного класса НК-миметиков основана на введении заместителя в α - или γ -положения аминокислотного фрагмента, что приводит к образованию структурно-упорядоченных хиральных молекул ПАНКМ (рис. 1).

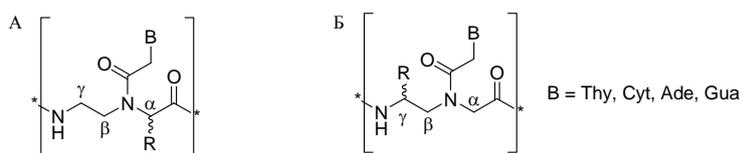


Рис. 1. Хиральные α -ПАНКМ (А) и γ -ПАНКМ (Б).

Из опубликованных ранее источников известно [4], что конфигурация оптических центров хиральных миметиков нуклеиновых кислот напрямую влияет на их физико-химические свойства и биохимическое поведение (направление закручивания спирали, стабильность образуемых комплексов с нуклеиновыми кислотами и др.). В этой связи, актуальной задачей является разработка хорошо воспроизводимых методов для оценки и контроля энантиомерной чистоты (ЭЧ) мономеров и олигомеров ПАНКМ. В настоящее время в литературе описан способ определения ЭЧ мономеров с предварительной дериватизацией по N-концу L- и D-мономеров ПАНКМ с последующим анализом с помощью ^{19}F -ЯМР-спектроскопии [5]. Также были представлены работы по определению ЭЧ мономеров и олигомеров ПАНКМ с предварительной дериватизацией веществ и последую-

щим анализом диастереомерных смесей методом ВЭЖХ [6].

Кроме того, был представлен метод синтеза мономера γ -ПАНКМ на основе L-Glu, и проведена оценка его ЭЧ на хиральном сорбенте прямым способом, без предварительной дериватизации [7]. Другой хроматографический метод – газовая хроматография (ГХ) на хиральном сорбенте был использован для оценки ЭЧ олигомеров ПАНКМ, проведенной после полного гидролиза олигомерной последовательности и обработки продуктов гидролиза трифторуксусным ангидридом [8].

Ранее нами также был предложен прямой способ оценки ЭЧ различных мономеров ПАНКМ, основанный на использовании ВЭЖХ в сочетании с хиральным сорбентом на основе иммобилизованного антибиотика – эремомицина, который обладает высокой энантиоселек-

тивностью по отношению к модифицированным α - и β -аминокислотам и их производным [9]. Для большинства анализируемых нами веществ в данных условиях наблюдалось разделение отдельных энантиомеров, однако полной селективности и универсальности данный метод не продемонстрировал. Также следует отметить, что при разделении некоторых мономеров было зафиксировано наличие дополнительных пиков в хроматограмме, которые, скорее всего, соответствуют ротамерным структурам, возникающим в результате затрудненного вращения вокруг амидной связи в мономере ПАНКМ (рис. 2).

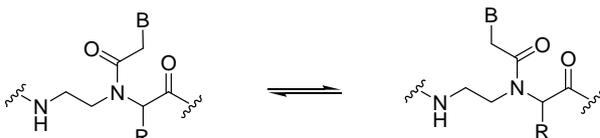


Рис. 2. Ротамерные структуры в молекуле ПАНКМ.

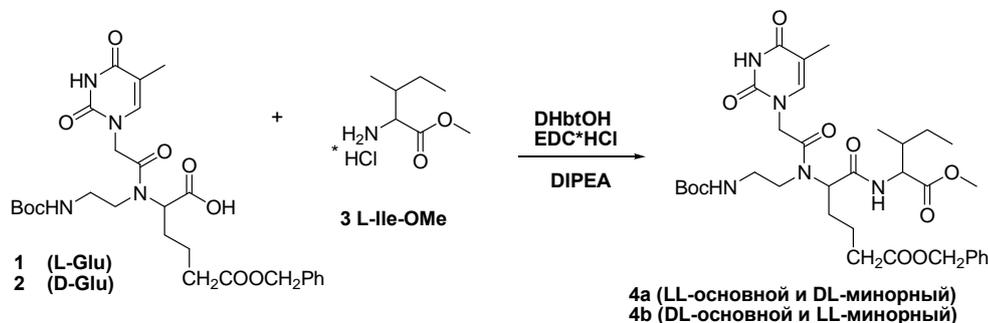


Рис. 3. Схема получения С-концевых диастереомеров α -замещенных тиминового мономера ПАНКМ.

Подбор системы для разделения *LL*- и *DL*-диастереомеров проводили для смеси производных **4a** и **4b** (рис. 4В), при этом мы не наблюдали расщепления на ротамеры, и компоненты смеси удалось разделить полностью. ВЭЖХ-анализ соединения **4a** в подобранной системе показал следующий результат: содержания *LL*-диастереомера – 90.1% и *DL* – 9.9% (рис. 4Б).

Анализ ^1H -ЯМР-спектров показал наличие основных и дополнительных пиков, причем для каждого диастереомера, как правило, наблюдали удвоение сигналов из-за наличия в растворе ротамерных форм (см. рис. 2). Сигнал, позволяющий с наибольшей достоверностью оценить соотношение диастереомеров в смеси, соответствует протонам терминальной метильной группы изолейцинового фрагмента.

В случае диастереомеров **4a, b** сравнение сигналов ОМе-группы (рис. 4Г и 4Д) показывает, что **4a** содержит существенную примесь (~7.5%) минорного *DL*-диастереомера, (сигналы с химическим сдвигом 3.61 м.д. (6.1%) и 3.59 м.д. (1.3%). Смесь диастереомеров **4b** также содержит примесь, содержание которой, по данным расчетов в программе WINNMR, составляет ~ 9% (сумма относительных интегральных площадей для пиков при 3.62 и 3.61 м.д.). Таким образом, анализ данных ОФ ВЭЖХ

Результаты и их обсуждение

Представляемый в данной работе альтернативный подход к определению энантиселективности синтеза мономеров ПАНКМ основан на получении С-концевых диастереомеров, с последующим разделением их с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Этот метод был использован для оценки энантиомерной чистоты α -замещенных тиминового мономера ПАНКМ **1, 2** [10] (рис. 3), представляющих собой оптические изомеры. Эти соединения конденсировали с асимметрическим агентом *L*-IleOMe **3**, используя *N*-этил-*N*'-(3-диметиламинопропил)карбодимид (EDC) в присутствии нуклеофильной добавки – 3-гидрокси-1,2,3-бензотриазин-4-она (DHbtOH), в результате чего были получены два диастереомера **4a, b**, структура которых была подтверждена данными ^1H -ЯМР-спектроскопии.

и результатов ^1H -ЯМР-спектроскопии достаточно хорошо коррелирующих между собой, позволяют сделать вывод о недостаточной ЭЧ исходных мономеров **1** и **2**, однако следует учитывать тот факт, что образование нежелательного стереоизомера возможно в результате рацемизации в процессе получения диастереомера по С-концу.

Альтернативным подходом для решения поставленной задачи может служить синтез пары диастереомеров для исходного мономера ПАНКМ (например, *L*-конфигурации) путем конденсации последнего с оптически чистым, а также рацемическим асимметрическим агентом и последующая оценка соотношения главных и минорных компонентов в данных смесях с помощью методов анализа, используемых ранее для соединений **4a, b**.

В данной работе такой подход был использован для оценки ЭЧ тиминового γ -метилзамещенного мономера ПАНКМ **5** [11]. Это соединение конденсировали с *L*-IleOMe **3** и с рацемическим *DL*-IleOMe **6** соответственно (рис. 5) в описанных ранее для α -(бензил)-карбокситил-мономеров (**1** и **2**) условиях, в результате чего были получены две диастереомерные смеси **7a** и **7b**, структура компонентов была подтверждена данными ^1H -ЯМР-спектроскопии.

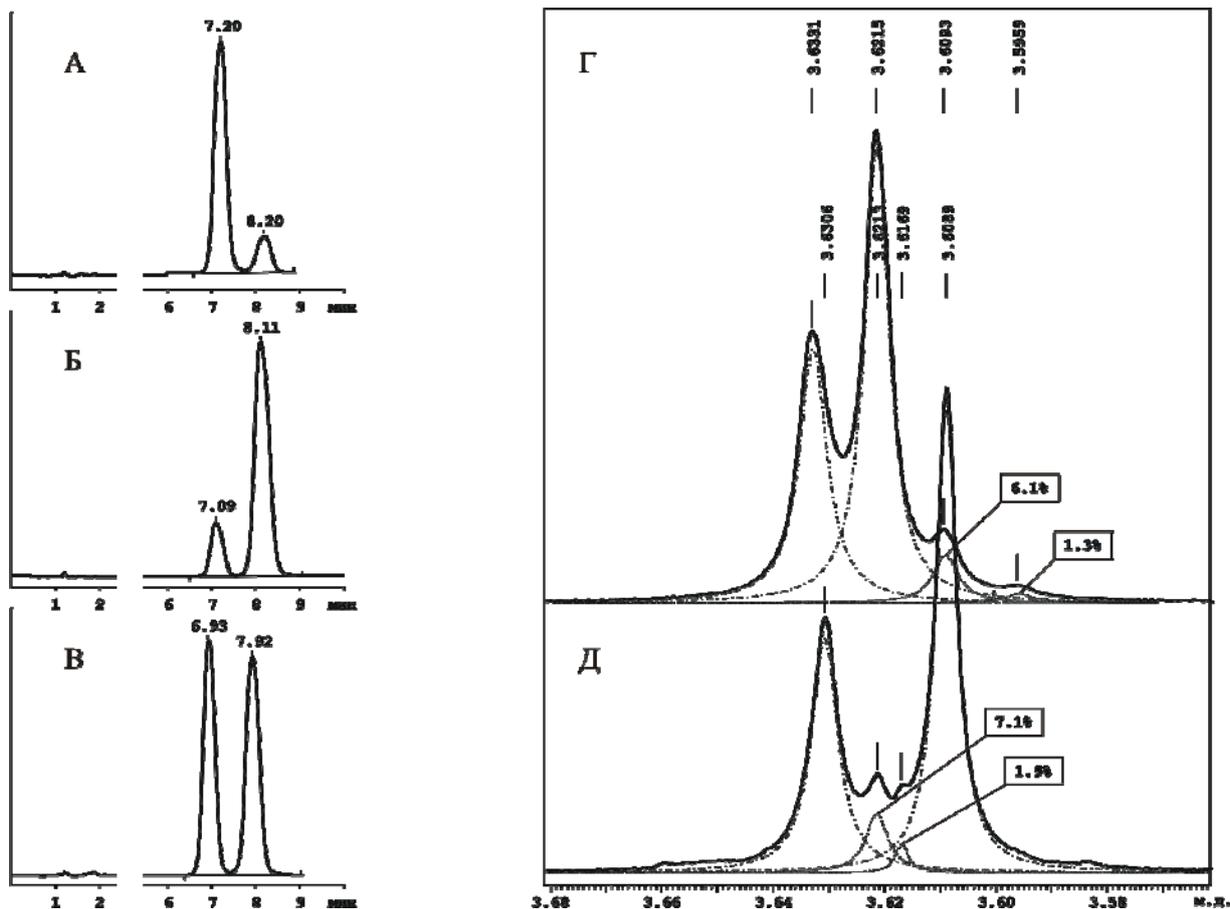


Рис. 4. Хроматограммы диастереомеров **4a** (А), **4b** (Б) и их смеси (В); фрагменты ¹H-ЯМР-спектров области эфирной метильной группы диастереомера **4a** (Г) и смеси **4a** и **4b** (Д).

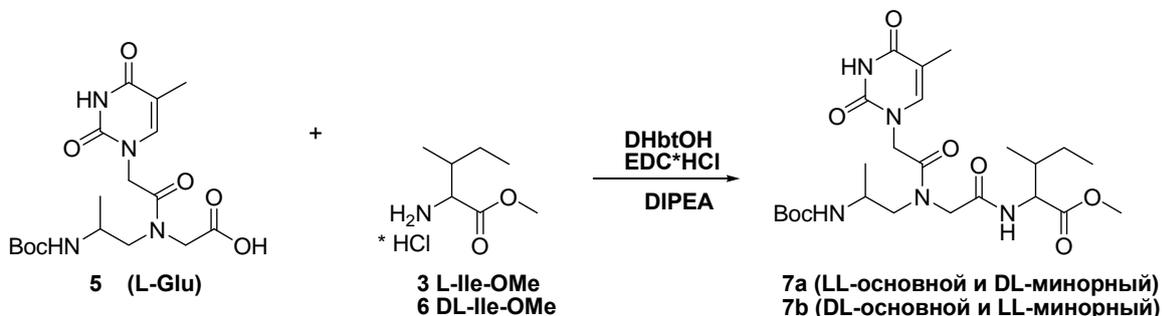


Рис. 5. Схема получения диастереомеров тиминового γ-метилзамещенного мономера ПАНКМ.

Так же, как и в случае соединений **4a, b**, для диастереомеров **7a, b** был проведен анализ хроматограмм и ¹H-ЯМР-спектров (рис. 6). Видно, что содержание минорного *DL*-диастереомера в смеси **7a** незначительно (<<5%), причем на данных хроматограммах отсутствует разделение ротамеров. В свою очередь, данные ¹H-ЯМР-спектроскопии демонстрируют отсутствие сигналов, соответствующих минорным компонентам, что так же означает, что ЭЧ мономера **5** составляет не менее 95%, в рамках предела обнаружения ¹H-ЯМР-спектроскопии.

Полученные результаты показывают, что разработанные нами подходы к определению энантиомерной чистоты мономеров ПАНКМ с использованием дериватизации по С-концу, ОФ ВЭЖХ и ¹H-ЯМР-спектроскопии позволяют

подтвердить высокое значение энантиомерных избытков исходных мономеров **1, 2** и **7**.

Однако, в случае заряженных мономеров **1, 2** возможна дополнительная рацемизация в процессе получения соответствующих диастереомеров **4a, b**, поэтому остается актуальным поиск альтернативных путей, исключая возможность этого побочного процесса в ходе дериватизации. Одним из решений данной проблемы может служить поиск новых хиральных селекторов для прямого анализа ВЭЖХ (на основе хитозана и др.), а также получение других диастереомерных производных, например модификацией по N-концу исследуемых мономеров ПАНКМ, с последующим анализом как методом ЯМР-спектроскопии, так и ВЭЖХ.

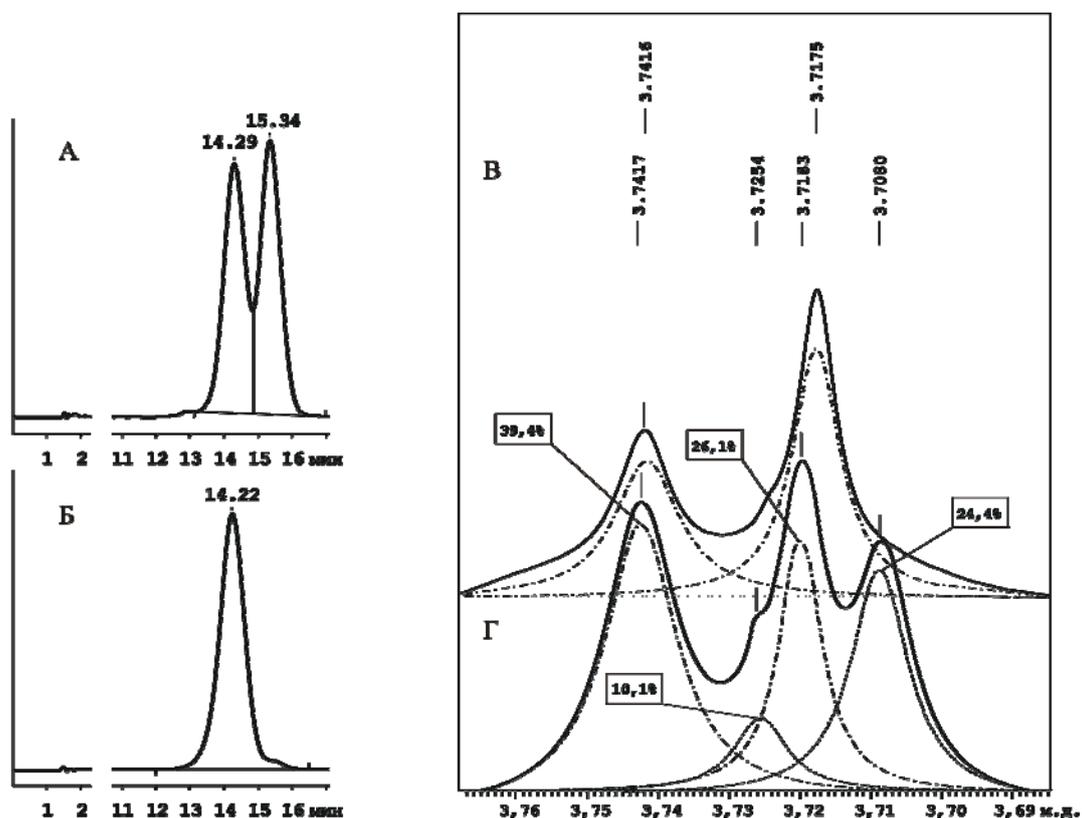


Рис. 6. Хроматограммы диастереомерных смесей **7a** (*LL*-основной и *DL*-минорной) (А) и **7b** (*LL*-основной и *DL*-минорной; *LD*-основной и *DD*-минорной) (Б); фрагменты ^1H -ЯМР-спектров области эфирной метильной группы диастереомеров **7a** (В) и **7b** (Г).

Экспериментальная часть

В работе использовались отечественные реактивы и препараты марки «х. ч.» и «ч. д. а»: этилацетат, ацетон, *n*-гексан, NaHCO_3 , NaCl , KHSO_4 диизопропилэтиламин, а также импортные реактивы: метиловый эфир *L*-изолейцина гидрохлорид (Reanal, Венгрия). Протекание реакций контролировали с помощью ТСХ на пластинках Silica gel 60 F254 (Merck, Германия), используя в качестве элюента этилацетат. Визуализацию пятен на пластинках проводили в УФ-свете (254 нм), опрыскиванием 0.5% раствором нингидрина в этаноле с последующим нагреванием, насыщенным раствором перманганата калия с последующей отмывкой в воде. Растворители удаляли на ротационном вакуумном испарителе (20 мм рт. ст.). Вещества сушили в вакууме масляного насоса (0.5 мм рт. ст.).

Спектры ^1H -ЯМР полученных соединений регистрировали при 25°C на импульсном Фурье-спектрометре Bruker DPX-300 (Германия) с рабочей частотой 300 МГц. Химические сдвиги протонов приведены в миллионных долях относительно внутреннего стандарта тетраметилсилана (δ 0.000 м.д.).

Высокоэффективную жидкостную хроматографию проводили на хроматографе высокого давления фирмы Knauer (Германия), детекция при длине волны 254 нм. Разделение полученных диастереомеров проводили, используя обращенно-фазовую колонку Separon SGX RP-S

S18, 5 мкм, 4×150 мм, система для разделения ацетонитрил–вода, 1:1, скорость потока 1 мл/мин. Обработку хроматограмм проводили с использованием программы Мультихром, версия 1.5.

Гидрохлорид метилового эфира *DL*-изолейцина **5** получали по известному методу [13].

Общая методика получения диастереомерных производных мономеров ПАНКМ (на примере соединения **4a**).

Метиловый эфир *N*-[(*mpem*-бутилоксикарбонил)-аминоэтил]-*N*-(тимин-1-илацетил)-*L*- γ -глутамил(*O*-бензил)-*L*-изолейцина (4a**).** К раствору 0.07 г (0.12 ммоль) γ -бензилового эфира-*N*-[(*mpem*-бутилоксикарбонил)-аминоэтил]-*N*-(тимин-1-илацетил)-*L*-глутаминовой кислоты (**1**) в 7 мл ДМФА добавляли 0.03 г (0.16 ммоль) EDC·HCl. Реакционную смесь перемешивали в течение 30 мин. Затем добавляли 0.026 г (0.16 ммоль) DhbtOH, 53 мкл (0.31 ммоль) диизопропилэтиламина и гидрохлорид метилового эфира *L*-изолейцина 0.024 г (0.12 ммоль), перемешивали 24 ч. Растворитель удаляли в вакууме масляного насоса, к остатку прибавляли насыщенный раствор NaCl (5 мл), экстрагировали этилацетатом (10 мл × 2). Объединенный экстракт промывали 0.1 М раствором KHSO_4 , насыщенным раствором NaHCO_3 , насыщенным раствором NaCl. Растворитель удаляли, вещество сушили в вакууме масляного насоса. Выход: 0.04 г (55.7%); R_f 0.46.

¹H-ЯМР-спектр (DMSO-*d*₆, δ, м.д.): 10.20 (1H, с, NH); 8.3 (1H, с, HN-Thy); 7.4 (5H, м, C₆H₅); 5.30 (2H, м, CH₂Ph); 4.80 (2H, с, -NThy-CH₂-); 4.40-4.60 (2H, м, CH₂); 3.68 (3H, м, -OCH₃); 3.47 (1H, м, α-CH-); 2.35 (2H, м, γ-CH₂); 2.30 (1H, м, β-CH₂); 1.95 (1H, м, β-CH₂); 1.86 (3H, с, CH₃-Thy); 1.47 (9H, с, C(CH₃)₃); 1.18 (2H, м, -CH₂-Ile); 0.95 (6H, м, 2(CH₃)-Ile).

Соединения **4b** и **7a**, **b** получали таким же образом, соблюдая аналогичные стехиометрические соотношения всех компонентов.

Метилловый эфир N-[(трет-бутилоксикарбонил)-аминоэтил]-N-(тимин-1-илацетил)-D-γ-глутамил(O-бензил)-L-изолейцина (4b).

Выход: 0.08 г (65.7%). *R*_f 0.68.

¹H-ЯМР-спектр (DMSO-*d*₆, δ, м.д.): 10.50 (1H, с, NH); 8.40 (1H, с, HN-Thy); 7.50 (5H, м, C₆H₅); 5.40 (2H, м, CH₂Ph); 4.90 (2H, с, -NThy-CH₂-); 4.70-4.50 (2H, м, CH₂); 3.70 (3H, м, -OCH₃); 3.51 (1H, м, α-CH-); 2.39 (2H, м, γ-CH₂); 2.32 (1H, м, β-CH₂); 1.97 (1H, м, β-CH₂); 1.86

(3H, с, CH₃-Thy); 1.46 (9H, с, C(CH₃)₃); 1.19 (2H, м, -CH₂-Ile); 0.95 (6H, м, 2(CH₃)-Ile).

Метилловый эфир N-[(трет-бутилоксикарбонил)аминоизопротил]-N-(тимин-1-илацетил)-глицил-L-изолейцина (7a).

Выход: 0.05 г (90.2%). *R*_f 0.57.

¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃, δ, м.д.): 7.40 (1H, с, H-Thy); 4.86 (2H, м, -CH₂-N-); 3.9 (2H, м, -N-CH₂-CO-N-); 3.74 (3H, м, -OCH₃); 3.50 (1H, д, -CH); 1.90 (3H, с, CH₃-Thy); 1.74 (3H, м, CH₃-Ala); 1.45 (9H, с, C(CH₃)₃); 1.26 (2H, м, -CH₂-Ile); 0.90 (6H, м, 2(CH₃)-Ile).

Метилловый эфир N-[(трет-бутилоксикарбонил)аминоизопротил]-N-(тимин-1-илацетил)-глицил-DL-изолейцина (7b).

Выход: 0.05 г (91.2%). *R*_f 0.53.

¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃, δ, м.д.): 7.20 (1H, с, H-Thy); 4.82 (2H, м, -CH₂-N-); 3.87 (2H, м, -N-CH₂-CO-N-); 3.72 (3H, м, -OCH₃); 3.44 (1H, д, -CH); 1.89 (3H, с, CH₃-Thy); 1.72 (3H, м, CH₃-Ala); 1.43 (9H, с, C(CH₃)₃); 1.25 (2H, м, -CH₂-Ile); 0.89 (6H, м, 2(CH₃)-Ile).

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (госконтракт № 14.740.11.0634) и Российского фонда фундаментальных исследований (грант 09-04-01026а).

ЛИТЕРАТУРА:

- 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.
- Puschl A., Sforza S., Naaima G., Dahl O., Nielsen P.E. Peptide Nucleic Acids (PNAs) with a functional backbone // *Tetrahedron Lett.* 1998. V. 39. P. 4707–4710.
- Naaima G., Lohse A., Buchardt O., Nielsen P.E. Peptide nucleic acids (PNAs) containing thymine monomers derived from chiral amino acids: Hybridization and solubility properties of D-lysine PNA. // *Anqew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1996. V. 35. № 17. P. 1939–1941.
- Corradini R., Sforza S., Tedeschi T., Totsingan F., Marchelli R. Peptide nucleic acids with a structurally biased backbone: effects of conformational constraints and stereochemistry // *Curr. Topics in Med. Chem.* 2007. V. 7. № 7. P. 681–694.
- 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.
- Dueholm K.L., Petersen K.H., Jensen D.K., Egholm M., Nielsen P.E., Buchardt O. Peptide nucleic acid (PNA) with a chiral backbone based on alanine. // *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 2004. V. 4. № 8. P. 1077–1080.
- Huang H., Joe G.H., Choi S.R., Kim S.N., Kim Y.T., Pak C.S., Hong J.H., Lee W. Synthesis of enantiopure γ-glutamic acid functionalized peptide nucleic acid monomers. // *Bull. Korean Chem. Soc.* 2010. V. 31. № 7. P. 2054–2056.
- Corradini R., Silvestro G. Direct enantiomeric separation of N-aminoethylamino acids: determination of the enantiomeric excess of chiral peptide nucleic acids by GC. // *Tetrahedron: Asymmetry*. 1999. V. 10, № 11. P. 2063–2066.
- Прохоров Д.И., Льянов М.А., Есипова О.В., Еремин С.В., Кириллова Ю.Г. Разработка теста для определения оптической чистоты хиральных мономеров ПАНКМ // *Вестник МИТХТ*. 2011. Т. 5. № 6. С. 63–65.
- Прохоров Д.И., Боярская Н.П., Кириллова Ю.Г., Тевяшова А.Н., Есипова О.В., Звонкова Е.Н., Швец В.И. Синтез тиминсодержащего мономера отрицательно заряженных ПНК. // *Хим.-фарм. журн.* 2005. Т. 39. № 6. С. 39–43.
- Льянов М.А., Кириллова Ю.Г., Прохоров Д.И., Лютик А.И., Есипова О.В., Швец В.И. Синтез двух тиминсодержащих мономеров ПНК на основе L-аланина и глицина // *Вестник МИТХТ*. 2011. Т. 5. № 1. С. 104–108.
- Гершкович А.А., Кибирев В.К. Химический синтез пептидов. – Киев: Наукова думка. 1992. 360 с.