

На правах рукописи



Вакуленко Софья Романовна

***N*+PC МЕТОДОЛОГИЯ СИНТЕЗА ФОСФИНОВЫХ
КИСЛЫХ ПЕПТИДОВ**

Специальность 1.4.3 – Органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Черноголовка – 2025

Работа выполнена в лаборатории фосфорорганических соединений Института физиологически активных веществ ФГБУН Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук (ИФАВ РАН)

Научный руководитель: **Рагулин Валерий Владимирович**
доктор химических наук, главный научный
сотрудник лаборатории фосфорорганических
соединений ИФАВ РАН

Официальные оппоненты: **Грачев Михаил Константинович**
доктор химических наук, профессор,
заведующий кафедрой органической химии
Института биологии и химии ФГБОУ ВО
«Московский педагогический государственный
университет»

Офицеров Евгений Николаевич
доктор химических наук, профессор, профессор
кафедры химии и технологии биомедицинских
препаратов ФГБОУ ВО «Российский химико-
технологический университет имени
Д.И. Менделеева»

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский
государственный университет промышленных
технологий и дизайна»

Защита состоится 16 декабря 2025 г. в 14.00 на заседании диссертационного совета 24.1.108.03 при ФГБУН Федеральном исследовательском центре проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук по адресу: 142432, Московская область, г. Черноголовка, Северный проезд, д.1, зал заседаний Ученого совета.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на официальном сайте ФИЦ ПХФ и МХ РАН <https://icp-ras.ru/>. Текст автореферата размещен на официальном сайте Высшей аттестационной комиссии по адресу <https://vak.gisnauka.ru/>.

Автореферат разослан _____ 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета 24.1.108.03

кандидат биологических наук



Л.В. Аникина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Известно, что 42-аминокислотный β -амилоид (A β 42) принимает непосредственное участие в развитии болезни Альцгеймера, образуя так называемые амилоидные бляшки. Согласно литературным данным, при одновременном введении 4-месячным трансгенным мышам амилоида A β 42 и Ac-IGL производного пептида (32-34) – наблюдается значительное улучшение когнитивных функций по сравнению с введением только амилоида A β 42. Однако, пептиды подвергаются гидролитическому и ферментативному расщеплению благодаря воздействию различных пептидаз, в том числе матриксных металлопротеиназ (ММР).

Замена природной пептидной связи {C(O)NH} на негидролизуемый метиленфосфорильный фрагмент {P(O)(OH)CH₂} приводит к имитации переходного состояния пептидного гидролиза с тетракоординированным атомом углерода, тем самым обеспечивая эффективное ингибирование нежелательных ферментативных реакций с участием соединений пептидного строения.

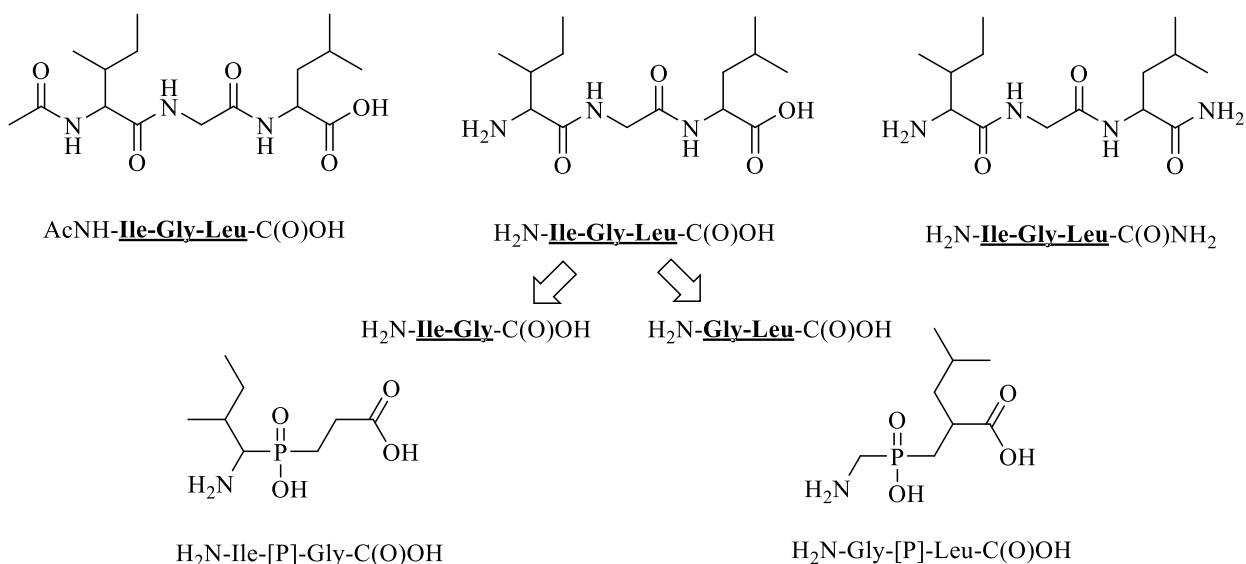


Схема 1. Структура различных форм трипептида IGL и фосфиновых структурных аналогов его дипептидных составляющих.

Поэтому дипептидные составляющие амилоида A β 42 могут являться перспективными объектами для фосфиновой структурной модификации

путем встраивания в молекулу исходного дипептидного компонента амилоида метиленфосфорильного фрагмента (схема 1).

Таким образом, развитие методологии синтеза фосфиновых псевдопептидов – структурных изостеров дипептидных составляющих A β 42, их аналогов и гомологов, является актуальной задачей.

Цель работы: развитие N+PC методологии синтеза фосфиновых кислых псевдо-дипептидов – структурных фосфиновых изостеров дипептидных компонент амилоида A β 42, их аналогов и гомологов.

Для достижения поставленной цели были сформулированы и решены следующие основные задачи:

1. Разработка оптимального метода синтеза фосфиновых кислых структурных изостеров природных дипептидных составляющих бета-амилоида A β 42, их аналогов и гомологов;
2. Разработка N+PC процедуры синтеза глицил-содержащих фосфиновых псевдо-дипептидов;
3. Исследование механизма реакции путем регистрации интермедиатов реакции – смешанных циклических фосфо-карбоновых ангидридов, фосфолактонов с трех- и четырехкоординированным атомом фосфора;
4. Исследование реакционной способности фосфонистых карбоновых кислот;
5. Развитие N+PC процедуры синтеза труднодоступных пептидов с использованием ацеталей;
6. Исследование гидролитической устойчивости ноотропного препарата «Семакса» в смеси с фосфиновыми псевдопептидами в присутствии лейцинаминопептидазы.

Научная новизна и практическая значимость

Разработана перспективная более короткая $N+PC$ стратегия синтеза фосфиновых дипептидов с использованием свободных фосфонистых карбоновых кислот. Изучена реакционная способность PC -компоненты в исследуемой реакции. Обнаружен лактоновый структурный мотив в ряду интермедиатов, образующихся в процессе амидоалкилирования фосфонистых карбоновых кислот. Предложена спирофосфорановая гипотеза механизма образования фосфор-углеродной связи в исследуемой реакции. Впервые показан обратимый характер превращения фосфиновый пептид – фосфолактон. Предложен метод синтеза фосфиновых кислых пептидов с использованием ацеталей. Получен ряд новых фосфиновых кислых дипептидов, труднодоступных другими методами синтеза. Обнаружены ингибирующие свойства фосфиновых структурных изостеров IGL, трипептидного (Abeta 32-34) компонента бета-амилоида, в качестве защиты ноотропного препарата Семакс от агрессивного гидролитического воздействия лейцинаминопептидазы.

Методология и методы

При выполнении диссертационного исследования для выделения и очистки получаемых соединений использовались классические методы экстракции, осаждения, перекристаллизации, тонкослойной и колоночной хроматографии. Все вновь полученные соединения были охарактеризованы необходимым набором физико-химических и спектральных данных с применением методов масс-спектрометрии высокого разрешения (HRMS), методов ЯМР спектроскопии на ядрах 1H , ^{13}C и ^{31}P , методов двумерной 1H - 1H COSY, 1H - ^{13}C HSQC и 1H - ^{13}C HMBC ЯМР спектроскопии и данными элементного анализа.

Полнота опубликования результатов и ценность научных работ соискателя ученой степени

Всего по материалам диссертации соискателем совместно с соавторами опубликовано 6 статей в отечественных и иностранных рецензируемых научных журналах, а также 6 тезисов докладов на конференциях разного уровня.

Все статьи, выполненные в соавторстве, процитированы в диссертации в соответствии с п. 14 критериев «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. с учетом всех последующих изменений. Результаты, описанные в диссертации, являются оригинальными, отсутствуют заимствованные материалы без ссылки на источник заимствования.

Степень достоверности и апробация научных результатов

Достоверность результатов, полученных в работе, обеспечивается согласованностью и непротиворечивостью экспериментальных данных, полученных с помощью разных современных методов анализа структуры полученных соединений и стабильной воспроизводимостью.

Результаты работы были представлены на следующих конференциях:

1. Головаш (Вакуленко) С. Р., Рагулин В. В. Синтез N-защищенных глицил-содержащих фосфиновых пептидов // Всероссийская научная конференция «Современные проблемы органической химии», 12-14 сентября 2022 г., Новосибирск. – С. 124.
2. Головаш (Вакуленко) С. Р., Рагулин В. В. Развитие методологии синтеза фосфиновых пептидов // VI Всероссийская молодежная конференция «Проблемы и достижения химии кислород- и азотсодержащих биологически активных соединений», 17-18 ноября 2022 г., Уфа. – С. 21.
3. Головаш (Вакуленко) С. Р., Иванов Д. Е., Рагулин В. В. Синтез фосфоизостеров дипептидных компонент амилоида // Всероссийская научная конференция «Современные проблемы органической химии», 26-30 июня 2023 г. – С. 216.

4. Головаш (Вакуленко) С. Р., Иванов Д. Е., Рагулин В. В. Амидоалкилирование фосфонистых карбоновых кислот // X Молодежная конференция ИОХ РАН, 29-31 мая 2023 г. – С. 129.
5. Иванов Д. Е., Головаш (Вакуленко) С. Р., Бородачев А. В., Дмитриев М. Э., Рагулин В. В. Простой синтез свободных фосфиновых кислых дипептидов // Всероссийская молодежная научная школа-конференция «Актуальные проблемы органической химии», 15-21 марта 2024 г. – С. 164.
6. Ivanov D. E., Golovash (Vakulenko) S. R., Borodachev A. V., Dmitriev M. E., Ragulin V. V. Amidoalkylation of phosphonous isostere of aspartic acid // XIII International Conference on Chemistry for Young Scientists “MENDELEEV 2024”, St. Petersburg, September 2–6, 2024. Book of abstracts. – St. Petersburg: VVM Publishing LLC, 2024. – P. 569.

Положения, выносимые на защиту

- Метод синтеза фосфиновых кислых структурных изостеров природных дипептидных составляющих бета-амилоида A β 42, их аналогов и гомологов;
- Новый подход к получению N-глицил-содержащих псевдо-дипептидов;
- Механизм реакции амидоалкилирования фосфонистых карбоновых кислот;
- Способ получения труднодоступных фосфиновых пептидов с использованием ацеталей;
- Ингибирующая активность фосфиновых изостеров дипептидных составляющих IGL, фрагментов 31-33 бета-амилоида A β 42 в отношении агрессивного воздействия лейцил-аминопептидазы и влияние на ферментативную устойчивость ноотропного препарата «Семакс».

Личный вклад автора

Автор принимал активное участие в поиске и анализе литературы по теме исследования. Совместно с научным руководителем д.х.н. Рагулиным

В.В. были сформулированы задачи исследования, разработаны методики проведения экспериментов. Результаты получены автором или при его непосредственном участии. Автором были выполнены синтез исходных фосфонистых кислот, содержащих структурный изостер соответствующей аминокислоты, и синтез целевых фосфиновых пептидов. Самостоятельно проведена обработка результатов экспериментов, выполненных методами ТСХ, ЯМР на ядрах ^1H , ^{13}C , ^{31}P и HRMS. Автором была самостоятельно выполнена очистка исходных реагентов и целевых фосфиновых пептидов, проведены исследования и интерпретация полученных данных.

Масс-спектры высокого разрешения (HRMS) были получены на Orbitrap Exactive (ThermoFisher Scientific, Bremen) масс-спектрометре (НМИЦ эндокринологии Минздрава России). ЯМР ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ и DEPT ^{13}C спектральные данные записаны на приборе Bruker DPX-200 н.с. Шестовым В.И. и с.н.с. Калашниковой И.П. (ИФАВ РАН), а также на приборе Advance 500 аналитического центра ФИЦ проблем химической физики и медицинской химии РАН.

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 126 страницах машинописного текста и содержит 24 рисунка, 35 схем, 4 таблицы и 99 литературных ссылок. Работа состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, заключения и списка цитируемой литературы.

Благодарности

Автор глубоко признателен и благодарен своему научному руководителю – Рагулину Валерию Владимировичу за постоянное внимание, действенную помощь, дискуссии и стимулирующую критику. Автор выражает благодарность коллективу лаборатории прикладной спектроскопии и лаборатории фосфорорганических соединений ИФАВ РАН. Автор выражает благодарность Константину Валерьевичу Шевченко (ИМГ РАН НИЦ “Курчатовский институт”) за проведение ферментативных исследований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Синтез фосфиновых кислых аналогов дипептидных составляющих IGL

Одной из целей данной работы был синтез фосфиновых аналогов дипептидных составляющих IGL с различным расположением фосфор-углеродной связи: Ile-ψ[P(O)(OH)CH₂]-Gly и Gly-ψ[P(O)(OH)CH₂]-Leu.

Для получения псевдоизолейцил-ψ[P(O)(OH)CH₂]-глицина **1** и псевдолейцил-ψ[P(O)(OH)CH₂]-глицина **2** мы предложили N+PC стратегию синтеза фосфиновых дипептидов (схема 2), которая включает стадию амидоалкилирования фосфонистых кислот (PC-компонент) **3**, содержащих структурный изостер соответствующей аминокислоты (в форме бензилового эфира).

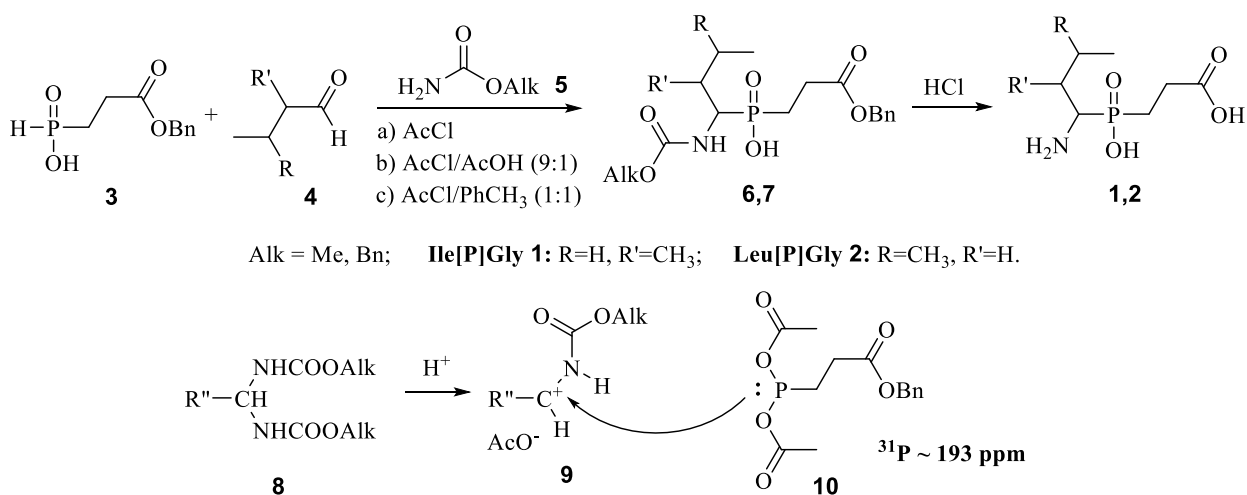


Схема 2. Синтез фосфиновых изостеров лейцил- и изолейцилглицина и предполагаемый механизм реакции

Об окончании реакции судили по исчезновению сигнала исходного фосфорного соединения в районе 30÷40 м.д. в спектре ЯМР ³¹P реакционной массы. Также нам удалось зафиксировать сигнал в области, характерной для соединений трехкоординированного фосфора 193 м.д., который, как мы полагаем, соответствует ацилированной форме трехкоординированного фосфора **10**, который, непосредственно участвует в образовании PC-связи путем нуклеофильной атаки на положительно заряженный углерод

ацилиминиевого катиона **9**. Последний в свою очередь генерируется *in situ* из алкилиденбискарбамата **8**, стабильного интермедиата реакции.

Получение фосфинового аналога глицил-лейцина затруднено вследствие невозможности использования формальдегида, который существует в полимерной форме или в виде водного раствора, что несовместимо с используемой нами синтетической процедурой. Поэтому амидоалкилированием РС-компоненты **11** был получен аналог ближайшего гомолога – псевдо-аланиллейцина **12** (схема 3).

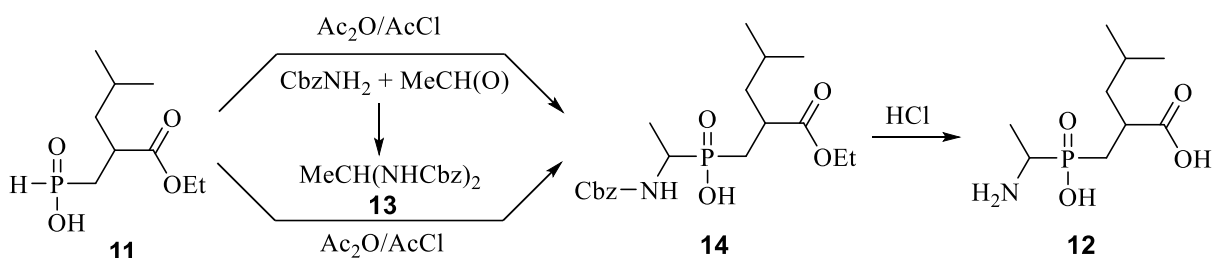


Схема 3. Синтез фосфинового кислого структурного изомера аланиллейцина

Мы исследовали два подхода к синтезу псевдо-аланиллейцина **12**: трехкомпонентный вариант с использованием уксусного альдегида и бензилкарбамата и альтернативную двухкомпонентную версию реакции с предварительным синтезом дибензил *N,N*-этилиденбискарбамата **13**. В качестве оптимального метода был признан двухкомпонентный вариант синтеза с высоким выходом *N*-Cbz-защищенного фосфинового аланиллейцина (этилового эфира) **14** (83%) (схема 3).

В ходе исследований мы нашли, что процесс амидоалкилирования фосфонистой кислоты достаточно быстро протекает в среде ацетилхлорида или в смеси с уксусным ангидридом. Однако, в этом случае часто наблюдается заметное дезалкилирование эфирного фрагмента молекулы и образование фосфиновой карбоновой кислоты (от 5 до 20%). Кроме того, протекают побочные реакции с участием ацетальдегида и образованием не содержащих фосфор соединений, что заметно снижает выход целевого продукта реакции. Поэтому при разработке процедуры получения глицил-содержащих

фосфиновых пептидов мы ввели в реакцию свободные фосфонистые карбоновые кислоты в качестве нуклеофильной компоненты.

2. Общая процедура синтеза N-защищенных глицил-содержащих фосфиновых пептидов

Для решения проблемы введения в молекулу псевдопептида фрагмента, изостера глицина, нами была разработана общая процедура синтеза фосфиновых N-защищенных глицил-содержащих дипептидов **17**. Мы предлагаем использование диалкил N,N'-метиленискарибаматов **16** в качестве электрофильной компоненты, содержащей глициновую составляющую образующегося пептида (схема 4).

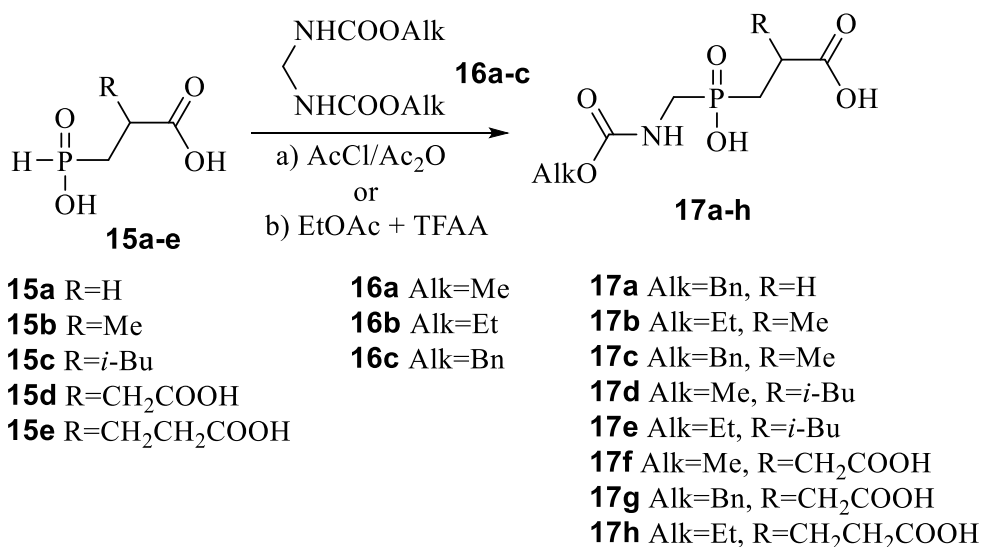


Схема 4. Синтез глицил-содержащих фосфиновых псевдопептидов

Синтез диалкил метиленискарибаматов **16** был осуществлен путем взаимодействия диэтилоксиметана, являющегося ацеталем формальдегида, с двумя эквивалентами соответствующего алкилкарбамата в среде уксусного ангидрида (схема 5). Мы обнаружили, что для близкого к оптимальному протеканию реакции требуется не менее двух эквивалентов TFA в растворе и предполагаем, что TFA (2 экв.) взаимодействует с диэтилацеталем с образованием молекулы формальдегида *in situ*, которая в условиях кислого катализа реагирует с двумя молекулами алкилкарбамата с поэтапным

образованием соответствующего *N,N'*-метиленбисалкилкарбамата **16a**, **16b**, **16c**.

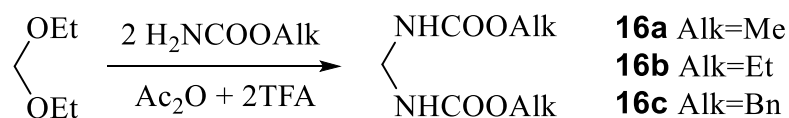


Схема 5. Синтез метиленбискарбаматов

Полученные диалкил метиленбискарбаматы **16** не являются кислотоустойчивыми, поэтому реакцию следует проводить:

- а) путем медленного добавления TFA к смеси алкилкарбамата и ацетала;
- б) в течение относительно короткого времени (не более 2-4 ч).

3. Изучение реакционной способности фосфонистых карбоновых кислот и механизма реакции

Введение в реакционную сферу свободных фосфонистых карбоновых кислот позволило неожиданно обнаружить необычно `большую реакционную способность последних по сравнению с соответствующими карбоновыми эфирами.

Поэтому мы провели сравнительное изучение реакционной способности РС-компоненты на примере фосфонистой пропионовой кислоты **15a** в сравнении с ее этиловым **15a'** и бензиловым **15a''** эфирами. В качестве модельных реакций были выбраны синтез фосфиновых N-Cbz-защищенных псевдопептидов валилглицина **18** и лейцилглицина **19** в двух- и трехкомпонентной версиях амидоалкилирования в смеси AcCl/Ac₂O = 1/4÷7 (схема 6).

Нам удалось обнаружить, что при использовании фосфонистой карбоновой кислоты в среде AcCl/Ac₂O (1:4) реакция проходит ~ за час, а при использовании эфиров – требуется более длительное время, от нескольких часов до суток.

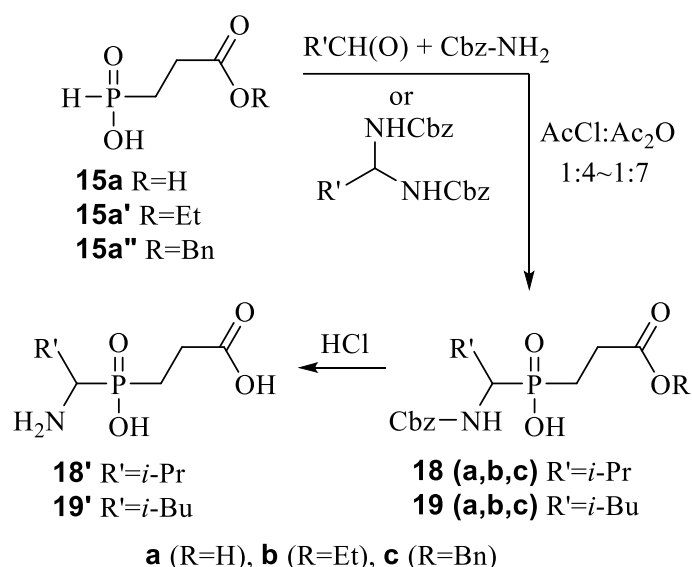


Схема 6. Двух- и трехкомпонентная версии синтеза фосфиновых валилглицил- и лейцилглицил псевдопептидов

Для выяснения причин `большой` реакционной способности фосфонистых кислот по сравнению с их эфирами мы провели изучение поведения фосфонистой пропионовой кислоты и ее этилового и бензилового эфиров в смеси ацетила хлористого с уксусным ангидридом в отсутствие альдегидов и алкилкарбаматов.

Методом ^{31}P ЯМР спектроскопии удалось обнаружить соединения трехкоординированного фосфора, диацетилфосфониты **20** (a,b,c) (схема 7), с синглетами в области δ_{P} 193-196 м.д., генерируемые *in situ* в условиях амидоалкилирования в смеси уксусный ангидрид / ацетилхлорид.

Однако, только в случае фосфонистой карбоновой кислоты **15a** (R=H) в спектре фиксируются два синглета в области δ_{P} 193.3 м.д. и δ_{P} 182.2 м.д.. Появление второго сигнала (δ_{P} 182.2 м.д.) мы объясняем образованием ацилированной формы смешанного циклического ангидрида с трехкоординированным атомом фосфора - фосфолактона **20d** (схема 6) в условиях дегидратирующего воздействия реакционной среды.

Мы предположили, что циклический интермедиат, фосфолактон **20d** может быть ответственным за необычно высокую реакционную способность фосфонистых карбоновых кислот по сравнению с их эфирами в исследуемой реакции.

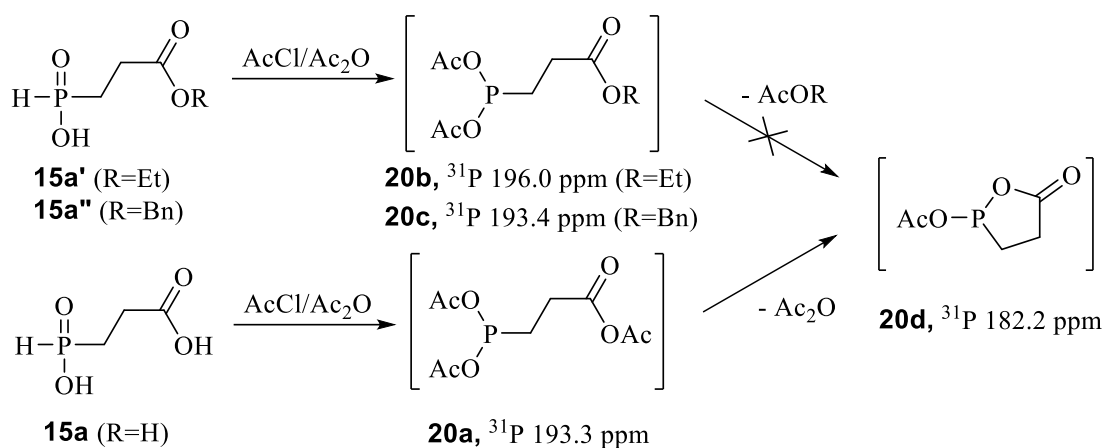


Схема 7. Предполагаемая схема генерирования *in situ* в реакционной среде соединений трехкоординированного фосфора – фосфонитов 20 (a,b,c) и циклического смешанного ангидрида – фосфолактона 20 d

Однако, сравнение молекулы циклического интермедиата, смешанного фосфо-карбонового ангидрида **20d** с молекулой интермедиата **20a** линейного строения не дает оснований для объяснения `большей реакционной способности фосфолактона **20d** (схема 7), рассматривая ближайшее окружение атома фосфора с двумя электроноакцепторными фрагментами {OC(O)} в обоих случаях.

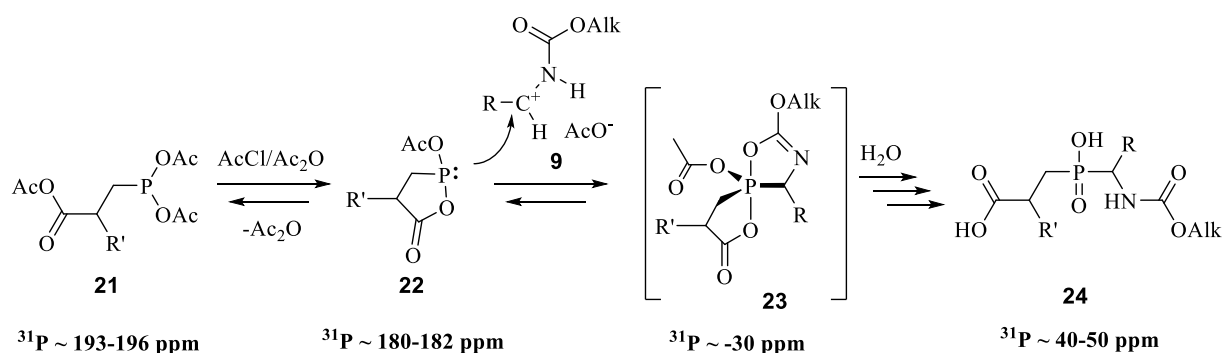


Схема 8. Механизм образования Р-С связи в амидоалкировании фосфонитных карбоновых кислот

Поэтому была предложена гипотеза образования спиробициклических соединений пятикоординированного фосфора (спирофосфоранов) **23** *in situ* для объяснения механизма образования фосфор-углеродной связи в исследуемой карбаматной версии реакции Кабачника-Филдса с образованием фосфиновых кислых псевдопептидов **24** (схема 8).

Мы предположили, что дегидратирующие свойства реакционной среды способствуют сохранению лактонового структурного мотива интермедиатов исследуемой реакции {фосфолактон P^{III} **22** $\rightarrow$ спирофосфоран (фосфолактон P^V **23**)} (схема 8). В этой связи, можно предположить, что процесс последующего превращения спиробициклического интермедиата, спирофосфорана **23**, в целевой продукт реакции, фосфиновый кислый пептид линейного строения **24** (схема 8) может претерпевать образование относительно стабильного интермедиата с сохранением смешанного фосфо-карбонового ангидридного цикла, т.е. фосфолактона P^{IV} с 4-координированным атомом фосфора **24'** (схема 9).

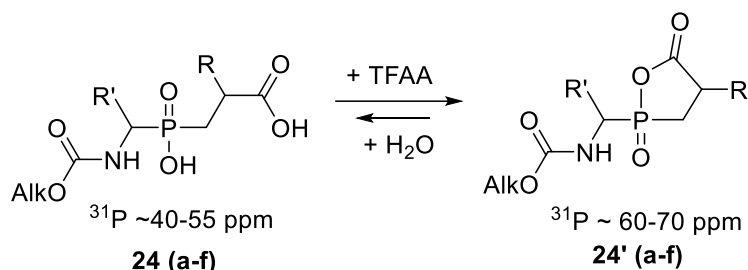


Схема 9. Обратимый характер превращения: фосфиновый пептид – фосфолактон

Кроме того, мы предположили, что процесс превращения фосфолактона **24'** в пептид **24** носит обратимый характер, и воздействие на продукт реакции, фосфиновый пептид **24**, дегидратирующего агента (например, DCC или TFAA) может привести к генерированию относительно стабильного продукта **24'** с образованием смешанного ангидридного (фосфолактонового) цикла (схема 9). Таким образом, процесс дегидратации может обеспечить эффективную активацию карбоновой функции для перспективного последующего присоединения нуклеофильной аминокислотной или аминокислотной компоненты.

Для доказательства обратимости процесса были проведены ^{31}P ЯМР исследования (схема 9) процесса дегидратации пептидов **24(a-f)**. В качестве дегидратирующих агентов мы исследовали трифторуксусный ангидрид (TFAA) и дициклогексилкарбодиимид (DCC).

Мы обнаружили, что при использовании DCC в качестве дегидратирующего агента образуется смесь фосфолактона **24'** и линейной формы псевдопептида **24**. Использование TFAA обеспечило значительно более лучшие результаты, и псевдопептиды **24** нацело преобразовывались в циклическую форму **24'**. При этом добавление воды в реакционную сферу смещает равновесие в сторону линейной формы пептида **24** (схема 9).

Таблица 1. Результаты исследования циклизации псевдопептидов **24 и образования фосфолактонов **24'**, данные фрагментов ^{13}C ЯМР спектров**

№(a-f) Псевдопептида; Местонахождение пептида-оригинала в аминокислотной последовательности бета-амилоида 42	Фосфиновый пептид 24			Фосфиновый лактон 24'			
	COO	PCH ₂		POC=O		PCH ₂	
	s, δ_{C} , ppm	δ_{C} , ppm	d, $^1J_{\text{PC}}$ Гц	δ_{C} , ppm	d, $^{2+3}J_{\text{PC}\Gamma_{\text{C}}}$ Гц	δ_{C} , ppm	d, $^1J_{\text{PC}} \Gamma_{\text{C}}$
(a) Val[P]Phe*; Amyloid- β (18-19)	179.1 178.9	28.4	88.9	170.2 169.2	12.8 14.6	27.2 27.0 26.6 24.8	63.7 66.2 65.5 65.5
(b) Phe[P]Ala*; Amyloid- β (20-21)	181.7 181.6	29.5 29.2	88.1 87.8	171.0 170.6 170.4 169.7	13.4 16.2 12.9 15.3	29.7 29.4	64.8 67.7
(c) Ile[P]Gly*; Amyloid- β (32-33)	178.5 178.2	22.0 21.8 21.6	89.9 89.2 89.6	168.5 168.2 167.5	12.2 11.8 15.1	22.4 22.1 22.0 21.4	66.0 63.8 66.7 63.8
(d) Gly[P]Leu*; Amyloid- β (33-34)	181.4	28.7	90.8	171.1 170.3	14.4 15.5	29.0 28.7	69.3 66.3
(e) Gly[P]Gly*; Amyloid- β (37-38)	177.6 177.4	21.5	92.6	168.2 167.5	16.6 16.6	24.7 22.4	73.0 67.1
(f) Ile[P]Ala*; Amyloid- β (41-42)	181.8	30.6 30.4 30.1 29.9	85.5 89.6 89.6 84.4	171.5 171.2 171.1 170.9 170.7 170.0	12.4 11.9 14.3 14.3 10.5 13.8	30.5 30.4 30.0 29.7 28.9	63.4 61.5 62.5 64.8 64.8

*Примечание: здесь в таблице 1 и далее [P] = $\psi[\text{P}(\text{O})(\text{OH})\text{CH}_2]$

Мы провели более полное ЯМР исследование на ядрах углерода $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ фосфиновых изостеров дипептидных составляющих бета-амилоида **24(a-f)** в растворе CDCl_3 , содержащем TFAA. Данные таблицы 1, полученные в результате этого исследования, подтверждают образование фосфолактона **24'** в результате дегидратирующего воздействия TFAA на фосфиновый пептид **24**.

Достаточно наглядно можно наблюдать образование смешанного фосфо-карбонового ангидрида (фосфолактона), регистрируя изменения в углеродных спектрах псевдо-глицил-лейцина (Gly-[P]-Leu) (рис. 1-2), где наблюдается появление двух дублетов в области 170-171 м.д., которые мы относим к углероду лактонового цикла **24'd**, в то время как сигнал ~181 м.д., характерный для углерода карбоксильной группы уменьшается (рис. 2).

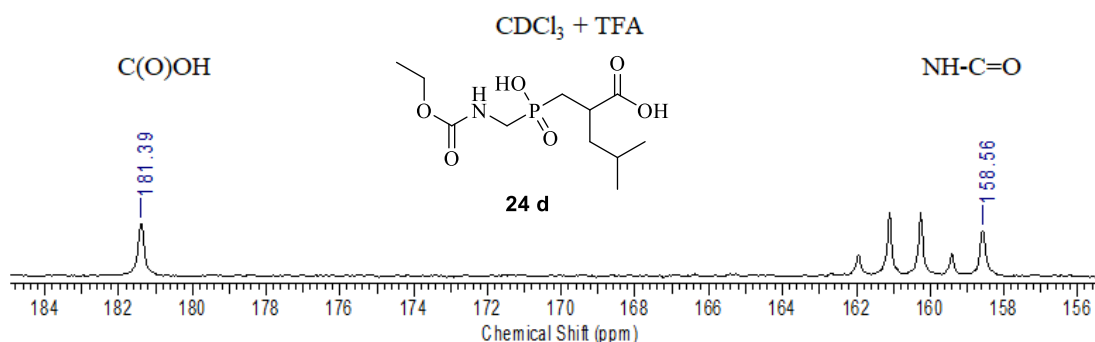
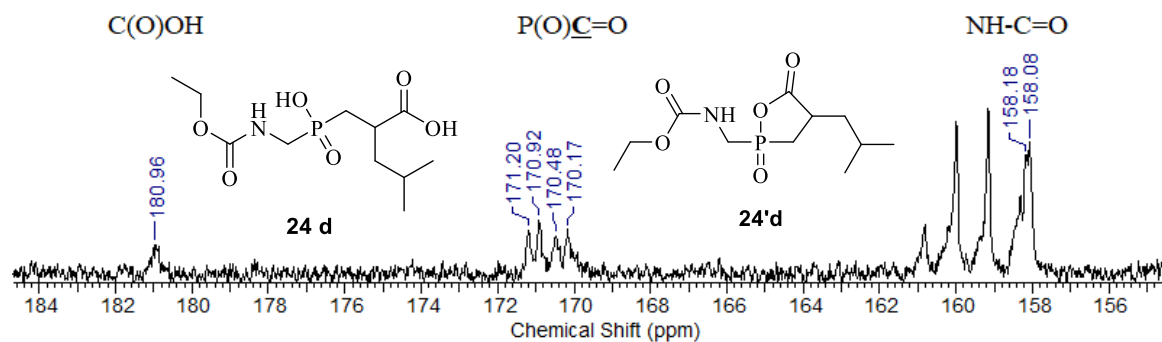


Рисунок 1. Фрагмент $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР спектра исходного псевдо-глицил-лейцина **24d**

Таким образом, сравнение фрагментов $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР спектров Gly-[P]-Leu (рис. 1 и 2), показывает, что удалось зарегистрировать одновременное наличие линейной формы пептида **24d** и циклической формы смешанного ангидрида (фосфолактона) **24'd** (рис. 2).

Дальнейшее добавление TFAA приводит к окончательному исчезновению сигнала углерода карбоксильной группы, что показано на рис. 3 и 4 для фрагментов $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР спектров псевдо-фенилаланил-аланина **24b**, а также данными таблицы 1 для всего ряда исследуемых фосфиновых пептидов.



13

Рисунок 2. Фрагмент $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР спектра ($\text{CDCl}_3 + \text{TFAA}$) генерируемого *in situ* фосфолактона **24' d** в результате дегидратации псевдо-глицил-лейцина **24 d**

Обнаружено, что химические сдвиги ЯМР ^{13}C атомов углерода, непосредственно связанных с атомом фосфора (фрагмент PCH_2 C-концевой части псевдопептида), заметно не изменяются при образовании ангидридного цикла, но при этом существенно уменьшаются константы спин-спинового взаимодействия с ядром атома фосфора ($^1J_{\text{PC}}$). (таблица 1). В ряду фосфиновых пептидов **24(a-f)** значения константы $^1J_{\text{PC}}$ находятся в диапазоне 85-93 Гц (табл. 1). Для генерируемых *in situ* фосфолактонов **24'(a-f)** эта константа фиксируется в диапазоне 61–73 Гц (таблица 1). Столь заметное уменьшение константы $^1J_{\text{PC}\alpha}$ может служить своеобразным индикатором наличия ангидридного (фосфолактонового) цикла.

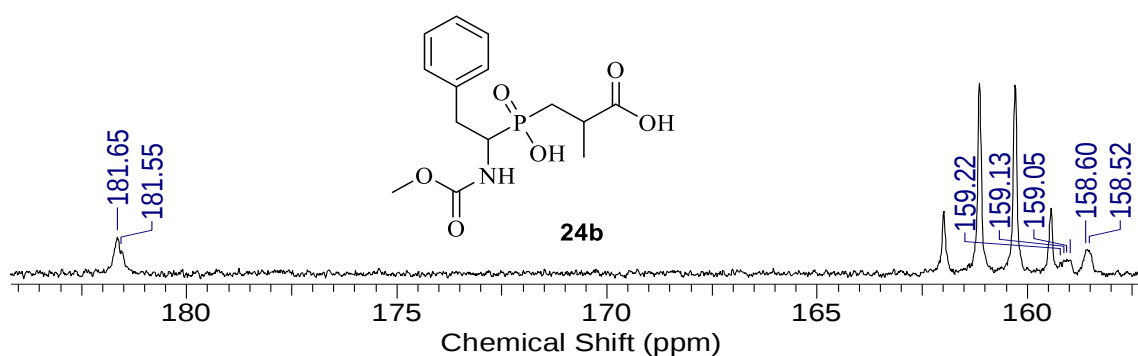


Рисунок 3. Фрагмент $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР спектра ($\text{CDCl}_3 + \text{TFA}$) исходного псевдо-фенилаланил-аланина **24 b**

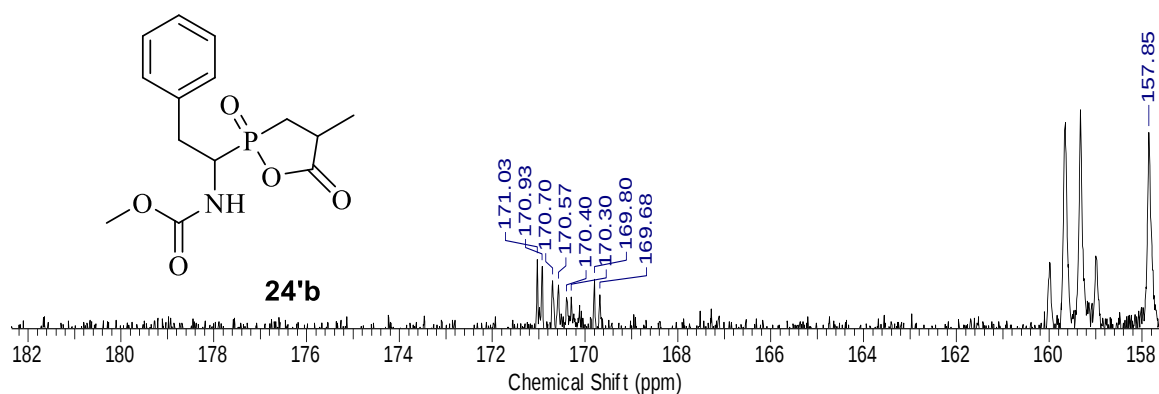


Рисунок 4. Фрагмент $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР спектра ($\text{CDCl}_3 + \text{TFAA}$) генерируемого *in situ* фосфолактона 24'b в результате дегидратации псевдо-фенилаланил-аланина 24 b

Сигнал углерода NC=O защитной группы при атоме азота обычно с образованием фосфолактонового цикла значительно не изменяется, это может свидетельствовать о том, что данная часть молекулы не задействована в образовании лактонового цикла и на нее значительно не влияют эти изменения.

Важным результатом этого эксперимента является возможность активации С-концевой функции фосфинового кислого пептида для последующего образования классической пептидной связи и образования фосфиновых трипептидов путем нуклеофильной атаки атома азота третьей аминокислотной компоненты на электрофильный карбоновый углерод фосфолактонового цикла.

Таким образом, этот результат может быть основой для последующего развития синтеза коротких фосфиновых три-(и более) псевдопептидов.

4. Ацетали в N+PC процедуре синтеза фосфиновых пептидов

Мы нашли, что применение свободных фосфонистых карбоновых кислот в N+PC методологии синтеза фосфиновых пептидов в среде достаточно жесткого и эффективного ацетилхлорида позволяет в этой процедуре использовать ацетали альдегидов. В процессе ацетилирования

гидрофосфорильной РС компоненты при образовании интермедиатов с трехкоординированным фосфором образуется сухой хлористый водород. Последний участвует в эффективном генерировании электрофильной компоненты синтеза, *N*-ацилиминиевого катиона, и может генерировать альдегиды из соответствующих ацеталей. Это позволяет использовать некоторые альдегиды, стабильные только в виде ацеталей, что открывает возможность получения некоторых труднодоступных фосфиновых пептидов.

Мы предлагаем использование ацеталей в соответствии со схемой 10. В этой реакции были исследованы диэтилацеталь уксусного альдегида и диметилацеталь бензилуксусного альдегида. Надо отметить, что уксусный и бензилуксусный альдегиды являются относительно неудобными карбонильными компонентами при непосредственном их введении в реакционную сферу, вероятно, по причине побочных процессов, обусловленных повышенной С-Н кислотностью, а также летучестью (уксусный альдегид).

Мы нашли, что введение этих альдегидов в реакционную сферу в виде ацеталей приводит к положительным результатам.

Эти данные позволили применить в исследуемой реакции этоксикарбонилуксусный альдегид в виде диэтилацетала, что дает возможность получить неизвестные производные *N*-аспартил-содержащих фосфиновых пептидов **25** ($R = \text{EtOC(O)CH}_2$) (схема 10).

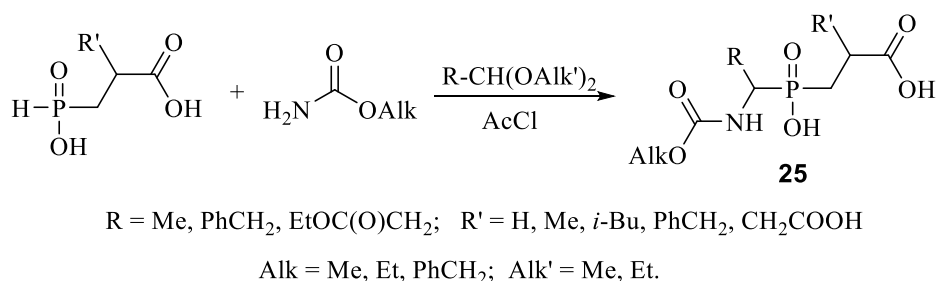


Схема 10. Ацетали в N+PC процедуре синтеза фосфиновых пептидов

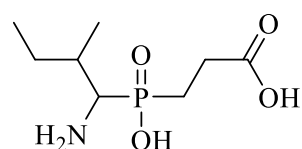
Таким образом, данная процедура позволяет использовать малостабильные альдегиды в виде ацеталей, что открывает возможность получения некоторых труднодоступных фосфиновых пептидов, например, аспартил-содержащих пептидов.

Развитие N+PC методологии синтеза фосфиновых пептидов позволило обнаружить ряд положительных моментов по сравнению с более изученной NP+C методологией синтеза и открывает возможности для синтеза новых фосфиновых пептидов и поиска эффективных ингибиторов Zn-металлопротеиназ.

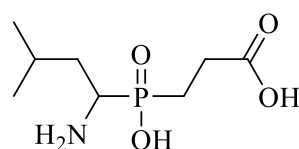
5. Исследование протеолиза Семакса в присутствии лейцинаминопептидазы и фосфиновых пептидов

Защита физиологически активных соединений пептидного строения от агрессивного воздействия экзопептидаз является актуальной задачей. Для изучения ингибирующей активности ряда фосфиновых псевдо-дипептидов в качестве объекта исследования мы выбрали известный лекарственный препарат – «Семакс», который обладает ноотропными свойствами.

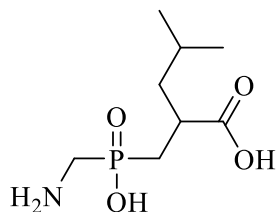
Основным недостатком препарата, представляющего собой гептапептид Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro (Семакс), является значительная гидролитическая лабильность N-концевой Met-Glu пептидной связи при агрессивном воздействии аминопептидаз, в том числе лейцинаминопептидазы, что заметно снижает его физиологическую активность. Поэтому мы провели серию экспериментов, результаты которых позволили нам сделать выводы о значительной устойчивости Семакса в смеси с фосфиновыми пептидами в присутствии лейцинаминопептидазы.



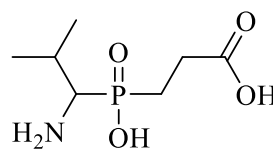
1 H₂N-Ile-[P]-Gly-C(O)OH



2 H₂N-Leu-[P]-Gly-C(O)OH



17'e H₂N-Gly-[P]-Leu-C(O)OH



18' H₂N-Val-[P]-Gly-C(O)OH

Рисунок 5. Фосфиновые аналоги дипептидных составляющих бета-амилоида

В качестве объектов исследования как потенциальных ингибиторов лейцинаминопептидазы были взяты свободные фосфиновые дипептиды – фосфоизостеры IGL (изолейцил-глицил-лейцина), трипептидного (Abeta 32-34) компонента бета-амилоида, и его структурные аналоги: псевдо-изолейцил-глицин **1** (Abeta 32-33) и его структурный аналог псевдо-лейцил-глицин **2**, а также псевдо-глицил-лейцин **17'e** (Abeta 33-34) и псевдо-валил-глицин **18'** (Abeta 36-37) в свободной форме.

Методика эксперимента заключалась в добавлении лейцинаминопептидазы к раствору Семакса в фосфатно-солевом буфере (pH 7.4) или к его смеси с фосфиновыми кислыми псевдопептидами и дальнейшем перемешивании с отбором аликутов для определения протеолиза Семакса через определенные промежутки времени.

Мы провели эксперименты, результаты которых позволяют сделать выводы об устойчивости Семакса в смеси с фосфиновыми пептидами в отношении агрессивного воздействия лейцинаминопептидазы.

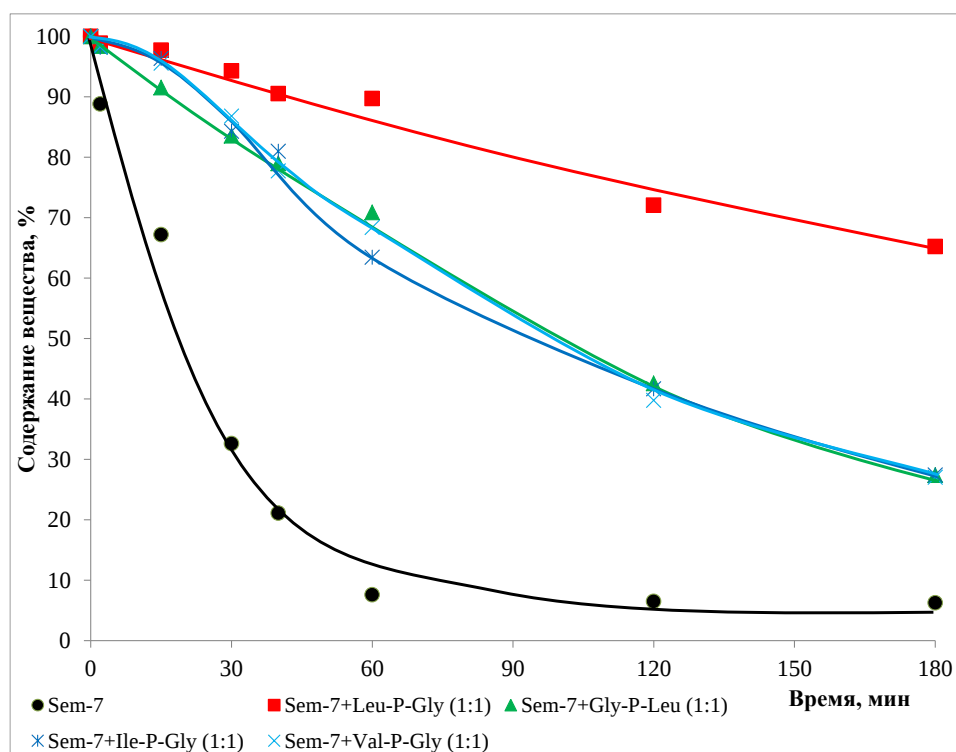


Рисунок 6. График устойчивости Семакса в присутствии лейцинаминопептидазы при соотношении Семакс-пептиды 1:1

На графике, изображенном на рисунке 6, соотношение Семакса к фосфиновым кислым пептидам составляет 1:1. Можно наблюдать, что с течением времени концентрация Семакса в присутствии псевдо-пептидов снижается незначительно. В то время как основная часть (~ 70%) Семакса без добавления фосфиновых пептидов (кривая черного цвета) была гидролизована уже через 30 минут после начала эксперимента (рис. 6).

Этот эффект, по-видимому, связан с ингибированием лейцинаминопептидазы фосфиновыми псевдопептидами, что приводит к заметному замедлению гидролиза Семакса.

При увеличении концентрации дипептидов в соотношении Семакс-псевдо-дипептид (1:5) эта тенденция еще более выраженная, интересно отметить, что активность трех пептидов (**1**, **2** и **17'e**), изостеров и аналогов IGL, почти уравнивается (рис. 7).

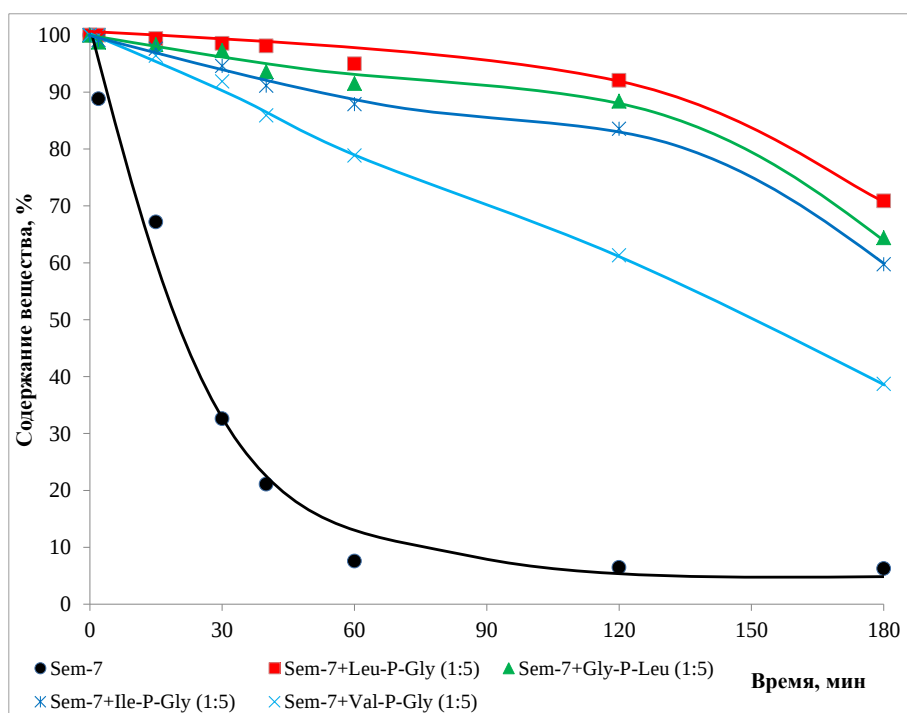


Рисунок 7. Данные устойчивости Семакса в присутствии лейцинаминопептидазы при соотношении Семакс-пептиды 1:5

Таким образом, полученные результаты позволяют утверждать, что свободные фосфиновые кислые пептиды, структурные изостеры дипептидных компонент бета-Амилоида, могут значительно замедлять гидролиз Семакса за счет ингибирования лейцинаминопептидазы и, возможно, эти соединения имеют перспективы для контроля ферментативной активности в живых организмах.

Выводы

1. Разработанная новая эффективная (N+PC) процедура позволяет удобно и с хорошим выходом получать глицил-содержащие псевдо-дипептиды.
2. Разработанная новая (A+N+PC) процедура с использованием ацеталей обеспечивает получение фосфиновых пептидов, синтез которых затруднен или невозможен при использовании других известных методов.
3. Синтезированный ряд новых фосфиновых изостеров дипептидных составляющих бета-амилоида A β 42 и их гомологов обеспечивает подход к синтезу и изучению свойств более сложных пептидных производных.
4. Исследование реакционной способности фосфонистых карбоновых кислот и обнаружение новых интермедиатов изучаемой реакции – смешанных фосфо-карбоновых ангидридов с трех-, четырех- и пяти- координированным атомом фосфора указывает на сохранение фосфолактонового структурного мотива в ходе всех превращений в исследуемом процессе и приводит к более глубокому пониманию механизма изучаемого многостадийного процесса.
5. Предложенная спирофосфорановая гипотеза позволяет объяснить механизм образования фосфор-углеродной связи и необычно высокую реакционную способность фосфонистых карбоновых кислот.
6. Показана способность фосфиновых дипептидов со свободной кислотной карбоновой функцией к дегидратации с образованием фосфолактонов – смешанных фосфо-карбоновых ангидридов, которые являются перспективными реагентами с активированной карбоновой функцией для последующего пептидного синтеза путем присоединения третьей аминокислотной компоненты.
7. Найдено, что новые фосфиновые пептиды, фосфоизостеры трипептидного фрагмента амилоида (IGL, A β 32-34) могут значительно замедлять ферментативный гидролиз Семакса и, возможно, других пептидов в результате ингибирования лейцинаминопептидазы.

Список статей, опубликованных автором по теме диссертации

1. Головаш (Вакуленко) С. Р., Дмитриев М. Э., Шестов В. И., Рагулин В. В. Синтез фосфиновых изостеров лейцил- и изолейцилглицинов // Журнал общей химии. – 2020. – Т. 90, № 9. – С. 1636–1640.
2. Головаш (Вакуленко) С. Р., Григоркевич О. С., Цебрикова Г. С., Дмитриев М. Э., Рагулин В. В. Синтез фосфинового аналога аланиллейцина // Журнал общей химии. – 2020. – Т. 90, № 4. – С. 645–649.
3. Dmitriev M. E., Golovash (Vakulenko) S. R., Borodachev A. V., Ragulin V. V. Mechanism of Phosphorus-Carbon Bond Formation in the Amidoalkylation of Phosphonous Carboxylic Acids // Journal of Organic Chemistry. – 2021. – Vol. 86, No. 1. – P. 593–600.
4. Golovash (Vakulenko) S. R., Borodachev A. V., Dmitriev M. E., Ragulin V. V. N+PC strategy for the synthesis of phosphinic pseudopeptides incorporating glycine isostere // Mendeleev Communications. – 2023. – Vol. 33, No. 6. – P. 784–785.
5. Головаш (Вакуленко) С. Р., Иванов Д. Е., Бородачев А. В., Шестов В. И., Дмитриев М. Э., Рагулин В. В. Синтез фосфоизостеров дипептидных компонент амилоида // Журнал общей химии. – 2024. – Т. 94, № 1. – С. 98–104.
6. Golovash (Vakulenko) S. R., Ivanov D. E., Borodachev A. V., Simonov S. V., Dmitriev M. E., Ragulin V. V. Acetals in amidoalkylation of phosphonous carboxylic diacids // Mendeleev Communications. – 2025. – Vol. 35, No. 3. – P. 266–268.