

Институт физиологически активных веществ
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Федерального исследовательского центра проблем химической физики и
медицинской химии
Российской академии наук

На правах рукописи



Вакуленко Софья Романовна

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

1.4.3 – Органическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
д.х.н., главный научный сотрудник
В. В. Рагулин

Черноголовка – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	12
1.1 Болезнь Альцгеймера.....	12
1.1.1 История открытия заболевания	12
1.1.2 Современные теории причин возникновения болезни Альцгеймера	13
1.1.3 Способы лечения	14
1.2 Трипептид IGL, как перспективный лидер в дизайне антагонистов бета-амилоида.	15
1.3 Протеазы.....	18
1.4 Ингибиторы протеаз	19
1.5 Фосфиновые псевдопептиды как ингибиторы цинк-металлопротеиназ. ...	23
1.6 Методы синтеза α -аминоалкилфосфоновых кислот	24
1.6.1 Реакция Кабачника-Филдса.....	24
1.6.2 Амидоалкилирование или карбаматная версия реакции Кабачника-Филдса	30
1.7 Подходы к синтезу фосфиновых кислых дипептидов	32
1.7.1 NP+C синтетический подход.....	32
1.7.2 N+PC синтетический подход.....	34
1.8 Фосиноприл.....	35
ГЛАВА 2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	37
2.1 Синтез фосфиновых кислых аналогов дипептидных составляющих IGL. .	37
2.1.1. Синтез фосфиновых изостеров лейцил- и изолейцилглицинов.....	38
2.1.2. Синтез фосфинового аналога аланиллейцина	39
2.2 Общая процедура синтеза N-защищенных глицил-содержащих фосфиновых пептидов	41
2.3 Изучение реакционной способности фосфонистых карбоновых кислот и механизма образования P-C связи в процессе амидоалкилирования.....	44
2.4 Ацетали в A+N+PC процедуре синтеза фосфиновых пептидов.....	58
2.5 Исследование протеолиза семакса в присутствии лейцинаминопептидазы и фосфиновых пептидов	59
ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	63
Общая экспериментальная часть.....	63
Методики синтеза и спектральные данные.	64

3.1 Фосфиновые изостеры лейцил- и изолейцилглицинов	64
3.2 Фосфиновый аналог аланиллейцина	70
3.3 Синтез N-защищенных глицил-содержащих фосфиновых пептидов	74
3.3.1 Фосфонистые карбоновые кислоты	74
3.3.2 Синтез N,N'- Метилен-бис(алкилкарбаматов)	78
3.3.3 Амидоалкилирование фосфонистых карбоновых кислот с использованием метиленискарбаматов	79
3.4 Изучение реакционной способности фосфонистых карбоновых кислот и механизма реакции.....	87
3.5. Исследование обратимого превращения фосфиновый пептид – фосфолактон	95
3.6 Ацетали в A+N+PC процедуре синтеза фосфиновых пептидов.....	106
3.7 Исследование протеолиза семакса в присутствии лейцинаминопептидазы и фосфиновых пептидов	114
Выводы.	116
Список литературы	117

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Болезнь Альцгеймера является одним из самых распространенных дегенеративных заболеваний нервной системы [1,2]. При этом, согласно прогнозам ученых, в течение следующих 50 лет ожидается увеличение распространения заболевания в 3,7 раза [3]. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) – Болезнь Альцгеймера входит в список десяти основных причин смертности в мире по статистике за 2000, 2019, 2020 и 2021 годы [4]. Несмотря на некоторое снижение показателя смертности на 2020 и 2021 годы по сравнению с пиком смертности в 2019 – проблема по-прежнему остается актуальной.

На сегодняшний день существует несколько теорий развития заболевания, одной из которых является амилоидная теория. Согласно этой теории, *бета*-амилоид (A β 42) принимает непосредственное участие в развитии болезни Альцгеймера, образуя так называемые амилоидные бляшки [5]. Несмотря на большое количество работ, посвященных данной теме, четкого представления о том, являются ли амилоидные бляшки результатом патологических изменений, или сами наносят вред, нет. Однако, достоверно известна прямая взаимосвязь роста количества бляшек и прогрессирования заболевания [6].

Недавние разработки в области исследования деменции, основанные на значительном прогрессе в науке и медицинской технике, привели к выдающимся достижениям в эпидемиологическом изучении заболеваний, определении причин, а также в диагностике и методах лечения. Тем не менее, эффективность существующих лекарств остается ограниченной.

Традиционно процесс разработки лекарственных средств включает в себя несколько этапов: идентификация мишени, поиск соединения лидера, оптимизация базовой структуры и доклиническая оценка фармакологических свойств [7,8]. Соединение лидер является первоначальным структурным прототипом будущего лекарства и обладает желаемой физиологической активностью. Для улучшения

фармакологических свойств и минимизации побочных эффектов производится оптимизация лидерного соединения путем модификации молекулярной структуры. Одним из эффективных подходов такой модификации является получение биоизостеров – соединений с замещенной группой или атомом в молекуле соединения лидера, которые сохраняют сходство в физико-химических свойствах и биологической активности с оригинальным соединением, но могут иметь отличную структуру.

Согласно литературным данным, при одновременном введении 4-месячным трансгенным мышам амилоида $A\beta_{42}$ и Ac-IGL производного пептида (32-34) – наблюдается значительное улучшение когнитивных функций по сравнению с введением только амилоида $A\beta_{42}$ [9].

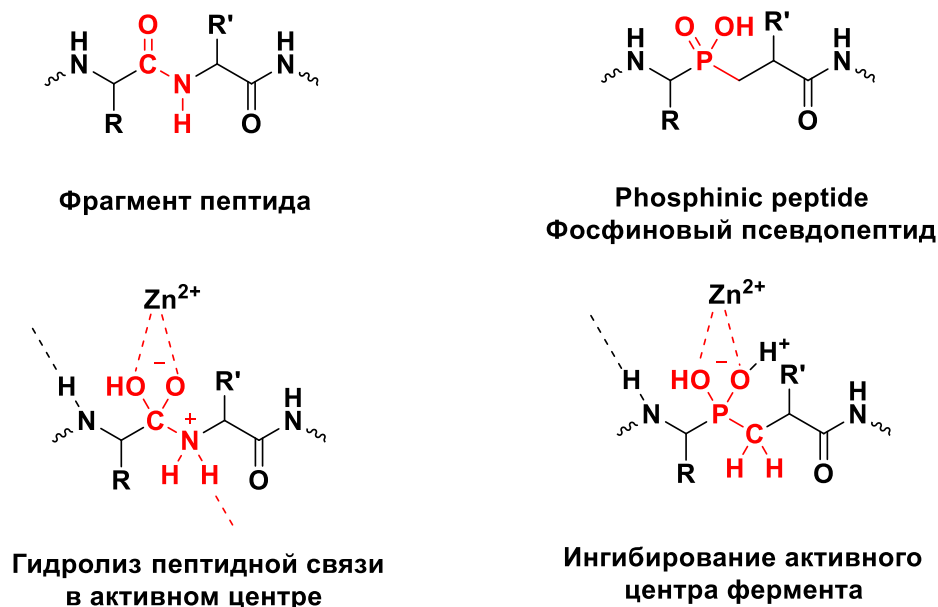


Рисунок 1. Строение пептидов, фосфиновых псевдо-пептидов и переходных состояний пептидного гидролиза

Однако пептиды подвергаются гидролитическому и ферментативному расщеплению благодаря воздействию различных пептидаз, в том числе матриксных металлопротеиназ (ММР), которые представляют собой широкое семейство цинк-содержащих эндопротеаз, вовлеченных во множество биологических процессов.

Замена природной пептидной связи $\{C(O)NH\}$ на негидролизуемый метиленфосфорильный фрагмент $\{P(O)(OH)CH_2\}$ приводит к имитации переходного состояния пептидного гидролиза с тетракоординированным атомом углерода, тем самым обеспечивая эффективное ингибирование нежелательных ферментативных реакций с участием соединений пептидного строения.

Поэтому дипептидные составляющие амилоида $A\beta_{42}$ могут являться перспективными объектами для фосфиновой структурной модификации путем встраивания в молекулу исходного дипептидного компонента амилоида метиленфосфорильного фрагмента.

Таким образом, развитие методологии синтеза фосфиновых псевдо-пептидов – структурных изостеров дипептидных составляющих $A\beta_{42}$, их аналогов и гомологов является актуальной задачей.

Цель исследования:

Развитие $N+PC$ методологии синтеза фосфиновых псевдо-дипептидов – структурных фосфиновых изостеров дипептидных компонентов амилоида $A\beta_{42}$, их аналогов и гомологов.

Основные задачи исследования:

В рамках диссертационной работы определены следующие наиболее актуальные задачи:

- Разработка оптимального синтеза фосфиновых дипептидных аналогов природных дипептидных составляющих бета-амилоида $A\beta_{42}$, их аналогов и гомологов;
- Разработка $N+PC$ процедуры синтеза N -глицил-содержащих псевдо-дипептидов;
- Исследование механизма реакции путем регистрации интермедиатов реакции – смешанных циклических ангидридов, фосфолактонов с трех- и четырехкоординированным фосфором;
- Исследование реакционной способности фосфонистых карбоновых кислот;

- Развитие $N+PC$ процедуры синтеза труднодоступных пептидов с использованием ацеталей;
- Исследование устойчивости ноотропного препарата «Семакса» в смеси с фосфиновыми псевдопептидами от гидролитического воздействия лейцинаминопептидазы.

Научная новизна и практическая значимость работы

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 – фосфиновый лактон. Предложен метод синтеза фосфиновых кислых пептидов с использованием ацеталей. Получен ряд новых фосфиновых пептидов, труднодоступных другими методами синтеза. Обнаружены ингибирующие свойства фосфиновых структурных изостеров IGL, трипептидного (Abeta 32-34) компонента бета-амилоида, в качестве защиты ноотропного препарата «Семакса» 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.

Статьи по результатам работы:

1. Головаш (Вакуленко) С.Р., Дмитриев М.Э., Шестов В.И., Рагулин В.В. Синтез фосфиновых изостеров лейцил- и изолейцилглицинов // Журнал общей химии, 2020, 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. 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, 86(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, 33(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, 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, 35(3), P. 266-268.

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., В.В. Рагулин. 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., 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. Amydoalkylation of phosphonous isostere of aspartic acid / XIII International Conference on Chemistry for Young Scientists “MENDELEEV

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 (Termofisher 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.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Болезнь Альцгеймера

1.1.1 История открытия заболевания

В 1906 году на конференции психиатров Юго-Западной Германии Алоис Альцгеймер впервые описал форму слабоумия, которая впоследствии стала известна, как болезнь Альцгеймера. Он описал пациентку по имени Августа – 51-летнюю женщину из Франкфурта, у которой наблюдались прогрессирующие когнитивные нарушения, очаговые симптомы, галлюцинации, бред и психосоциальные нарушения. После смерти пациентки, ее мозг был отправлен на экспертизу, в результате которой было установлено, что в процессе заболевания происходит скопление белковых образований, так называемых бляшек, которые закупоривают сосуды головного мозга, а также нейроволоконных сплетений, обусловленных скоплением тау-белка, что, вероятно вызывает артериосклеротические изменения [10-14].

Впоследствии в 1910 году врач из Германии Эмиль Крепелин обнаружил патологические особенности предстарческого слабоумия у его ученика и был первым, кто назвал болезнь Альцгеймера самостоятельным заболеванием [15,16].

В настоящее время болезнь Альцгеймера является нейродегенеративным заболеванием, которое является наиболее распространенным типом деменции [1,2]. В большинстве случаев клиническая картина включает в себя прогрессирующее снижение когнитивных функций, в первую очередь памяти, а также развитие поведенческих расстройств [10-17].

Ранние симптомы БА включают изменения в мышлении или бессознательном поведении, ухудшение памяти в отношении новой информации и изменения в речи. Пациенты на поздних стадиях БА страдают тяжелой потерей памяти, галлюцинациями, дезориентацией и отсутствием самодостаточности, когда люди в конечном итоге умирают из-за респираторного синдрома, инфекции или голодания [18].

1.1.2 Современные теории причин возникновения болезни Альцгеймера

За последние 30 лет было выдвинуто множество гипотез возникновения болезни Альцгеймера. Рассмотрим наиболее распространенные:

- Холинергическая теория

Приверженцы данной концепции утверждают, что болезнь Альцгеймера и у молодых, и у пожилых людей вызвана существенным снижением выработки ацетилхолина – нейромедиатора, аммонийного производного, который контролирует передачу электрического импульса от нейронов к мышечной ткани.

Ацетилхолин, как известно, синтезируется в нервных клетках различных отделов мозга, выделяется из них в синапсы при прохождении нервного импульса и обеспечивает при этом возникновение различных физиологических реакций. Основные места его синтеза в мозге – нейроны гиппокампа и коры головного мозга. В гиппокампе располагаются центры обучения и памяти, координации поведения и обеспечения постоянства внутренней среды, в коре – центры мышления и речи. Кроме того, уменьшение выработки ацетилхолина в центральной нервной системе сопровождается падением содержания норадреналина, серотонина и соматостатина в мозге [6].

- Тау-теория

Согласно тау-теории, нити белка (тау-белка) объединяются, что приводит к образованию нейрофибриллярных клубков внутри отдельных нервных клеток. Такие скопления нитей нарушают транспортную систему между нейронами, воздействуя на микротрубочки, а также белок, который входит в состав нейронов (ТАУ-белок) со временем может формировать скопления в нейронах, нарушая нормальное их функционирование с последующей гибелью нейронов [6, 19].

- Теория амилоидного каскада

Амилоидная теория объясняет патофизиологию и клинические проявления болезни Альцгеймера скоплением амилоида A β (белка) в тканях головного мозга преждевременно до начала болезни. Согласно этой версии причины развития болезни Альцгеймера – отложения фрагмента трансмембранного белка под названием бета-амилоиды, которые являются одним из основных составляющих в амилоидных бляшках в мозговой ткани при развитии заболевания.

Ген APP, отвечающий за продуцирование белка с бета-амилоидом, располагается на 21 хромосоме и способствует накоплению амилоида еще в молодости. Интересно, что десять лет назад была разработана вакцина, способная расщеплять амилоидные бляшки в мозговой ткани. Но, к сожалению, на восстановление нервных связей и нормального функционирования мозга лекарство не повлияло [6].

1.1.3 Способы лечения

В настоящее время при лечении БА, как правило, используется мультимодальный подход. Применяются терапевтические вмешательства, которые включают в себя фармацевтическое, нейрофизиологическое, когнитивное, поведенческое, а также лечебное питание и физическое здоровье [20-22].

К сожалению, в наши дни до сих пор не было установлено таких терапевтических вмешательств, которые смогли бы остановить прогрессирование или обратить вспять угнетение нервной системы, вызванное болезнью Альцгеймера.

Тем не менее, существует 4 фармацевтических препарата, одобренных FDA, которые временно останавливают или замедляют ухудшение когнитивного, функционального и поведенческого характера. Три из них являются ингибиторами холинэстеразы, а именно донепезил, ривастигмин и галантамин. Они повышают уровень ацетилхолина, нейротрансмиттера в мозге, который участвует в процессах

обучения и памяти [20, 21]. Четвертый препарат – мемантин является антагонистом NMDA-рецептора [23] и работает путем повышения уровня глутамата, другого нейромедиатора, который также принимает участие в процессах памяти и обучения [24]. Как правило, используется при более тяжелых стадиях протекания болезни, может использоваться как отдельно, так и в дополнении с ингибиторами холинэстеразы.

Несмотря на это, положительные свойства используемых лекарств при болезни Альцгеймера (БА) ограничены, так как они эффективны в течение приблизительно одного года и работают только у половины людей, которым назначаются. В настоящее время нет других подтвержденных методов лечения БА [25].

Таким образом, современное лечение направлено на купирование симптоматики и включает в себя комплекс мер по замедлению прогрессирования симптомов заболевания. Однако корень проблемы продолжает оставаться нерешенным.

1.2 Трипептид IGL, как перспективный лидер в дизайне антагонистов бета-амилоида

Гипотеза каскада бета-амилоидных белков A β , которая фокусируется на отложении и токсичности фибриллярных белков A β , была широко признана в качестве одного из важнейших механизмов в патогенезе болезни Альцгеймера.

Однако в последнее время эта традиционная гипотеза пересматривается к гипотезе синаптического A β , которая подразумевает, что нефибриллярные олигомеры A β играют решающую роль в нарушении синаптической функции, что очень хорошо коррелирует с ухудшением когнитивных функций у пациентов с болезнью Альцгеймера [26]. Это новое понимание в гипотезе амилоида особенно интересно в свете дальнейших исследований токсичности других форм A β , например, мономеров, особенно на ранних стадиях болезни Альцгеймера, когда концентрация бета-амилоида довольно низкая, но, вероятно достаточная, чтобы запустить некоторые процессы. Хотя патофизиологические концентрации A β , согласно литературным данным, влияют на активацию фосфолипазы A2 при 0,24

нМ [27], блокирование индуцированной никотином экспрессии TrkA и снижение жизнеспособности клеток PC12 при 10 – 100 нМ [28], подавление спонтанной синаптической активности при 8 нМ [29], и моделирование глутаматопосредственной трансмиссии в базальном переднем мозге крысы при 100 нМ [30], прямые мишени Аβ при таких низких концентрациях неизвестны.

Согласно литературным данным, фосфатидилинозитол 4-киназа второго типа (PI4KII) является мишенью для патофизиологических концентраций Аβ (≤ 10 нМ) [31-32]. Учеными было обнаружено, что короткий пептид Ile-Gly-Leu (IGL), соответствующий аминокислотной последовательности Аβ₃₂₋₃₄, противодействует нейротоксичности 10 нМ Аβ посредством ослабления Аβ-индуцированного ингибирования активности PI4KII, что указывает на то, что последовательность IGL является потенциальным лидерным соединением в дизайне новых антагонистов Аβ для лечения болезни Альцгеймера [33].

Были синтезированы и протестированы на воздействие *in vitro* на Аβ-индуцированное ингибирование активности рекомбинантного PI4KII человека и усиление экситотоксичности глутамата в первичных культивируемых нейронах гиппокампа три модифицированные формы IGL (ацетил IGL (Ac-IGL), IGL-NH₂ и ацетил- IGL-NH₂ (Ac-IGL-NH₂)). Поскольку Ac-IGL сохранял свою анти-Аβ-активность *in vitro*, его эффекты *in vivo* дополнительно исследовали путем внутригиппокампальной инъекции Аβ с Ac-IGL и без него трансгенным мышам, экспрессирующим тау V337М человека, с последующим анализом поведения в водном лабиринте Морриса и гистологическим наблюдением за мозгом [9].

Таким образом, опираясь на данные, полученные разными учеными, можно сделать вывод о том, что среди трех модифицированных трипептидов ацетил – IGL ослабил ингибирование активности PI4KII, вызванное Аβ, а также усилил нейротоксичность глутамата в первичных культивируемых нейронах гиппокампа крысы. Инъекция Аβ в гиппокамп мышей нарушала пространственную память и увеличивала количество дегенерирующих нейронов в двусторонних областях гиппокампа. Однако совместное введение ацетил – IGL с бета-амилоидом

предотвращает нарушение обучения, а также дегенерацию нейронов, вызванную Аβ.

Известно, что аминокислотные последовательности могут подвергаться воздействию различных пептидаз (протеаз), в том числе Zn-металлопротеиназ [9], что приводит к полному или частичному пептидному гидролизу. Таким образом, эффективность действия трипептида значительно снижается. Для того, чтобы предотвратить гидролитическое воздействие пептидаз на аминокислотную последовательность необходимо заменить природную пептидную связь на метиленфосфорильный фрагмент. Такие соединения называются фосфиновыми изостерами или фосфиновыми пептидами. Они являются близкими структурными аналогами переходного состояния пептидного гидролиза с тетракоординированным углеродом и поэтому являются ингибиторами Zn-металлопротеиназ (рис.1 на стр.5).

Структурная модификация природных соединений является одним из самых плодотворных подходов для поиска новых физиологически активных веществ. Фосфиновые структурные аналоги природных пептидов являются ингибиторами матриксных металлопротеиназ (ММР), представляющих собой семейство Zn-содержащих эндопротеаз, вовлеченных в разнообразные биологические процессы. Металлопротеиназы 2-го и 9-го типов (ММР-2 и ММР-9), называемые желатиназами, играют важную роль в постинфарктном ремоделировании миокарда. Нежелательную активность желатиназ, проявляющуюся в отрицательном воздействии на ткани сердечно-сосудистой системы, можно снизить или исключить полностью с помощью ингибиторов, содержащих Zn-хелатирующую группу. Эффективными ингибиторами Zn-металлопротеиназ являются фосфиновые псевдо-пептиды, структурные изостеры пептидов, в молекуле которых две аминокислотные компоненты дипептида связаны Zn-хелатирующим фосфиновым фрагментом.

Таким образом, недостаточная эффективность природного трипептида IGL, а также возможность вариации синтетических манипуляций над молекулой для

увеличения ее эффективности, как антагониста бета-амилоида, обуславливают актуальность синтеза и изучения намеченных нами соединений.

1.3 Протеазы

Пептиды играют важную роль в регуляции многих процессов в организме, включая процессы регенерации клеток, защиту от токсинов и многие другие. Они могут служить гормонами, факторами роста, нейротрансмиттерами, лигандами ионных каналов и противoinфекционными средствами. Биологическая активность пептидов как особого класса терапевтических средств тесно связана с их химической структурой. Пептидная терапия считается относительно безопасной и хорошо переносимой, поскольку пептиды могут метаболизироваться в организме [34].

В последние годы пептиды стали уникальным классом терапевтических средств и получили широкое применение в медицине и биотехнологии как терапевтические агенты, благодаря своим отличительным биохимическим характеристикам и фармакологическому потенциалу.

Несмотря на вышеизложенные преимущества, пептидная терапия обладает рядом существенных недостатков, одним из которых является низкая стабильность *in vivo*, которая обусловлена воздействием на них ферментов – протеаз.

Протеазы представляют собой класс ферментов, играющих фундаментальную роль во многих важных биологических процессах. Установлено, что пептидазы связаны с широким спектром патологических состояний, что оправдывает значительные усилия за последние 50 лет, которые ученые прикладывают к разработке синтетических ингибиторов, способных эффективно блокировать неконтролируемую активность данных ферментов при патологических состояниях [35].

Помимо своих неспецифических функций в катаболизме белков, протеазы действуют как процессинговые ферменты, которые осуществляют высокоселективное расщепление специфических субстратов и влияют на поведение клеток, выживание и смерть.

Секвенирование генома человека и некоторых модельных организмов показало, что большое разнообразие функций протеаз обусловлено эволюционным изобретением большого количества структурных и каталитически разнообразных ферментов с общей способностью гидролизовать пептидные связи [36].

Полный набор протеаз, вырабатываемых клетками человека, состоит как минимум из 569 протеаз и гомологов, которые распределены в пять классов:

- металлопротеиназы;
- сериновые протеазы;
- цистеиновые протеазы;
- треониновые протеазы;
- аспарагиновые протеазы.

Протеазы воздействуют на протеолитические сайты в пептиде, которые можно идентифицировать с помощью исследований стабильности и определения метаболитов [37].

Самым большим семейством протеаз человека являются металлопротеиназы, сто двадцать один (121) представитель которых секретируется и присутствует во внеклеточном или перичеллюлярном компартменте, что делает их довольно доступными мишенями для небольших синтетических ингибиторов, полученных путем структурной модификации пептидного скелета, которая обеспечивает улучшение протеолитической стабильности пептида [38].

1.4 Ингибиторы протеаз

Структурная модификация природных соединений является одним из самых плодотворных подходов для поиска новых физиологически активных веществ. Фосфиновые структурные аналоги природных пептидов являются ингибиторами матриксных металлопротеиназ (ММР), представляющих собой семейство цинк-содержащих эндопротеаз, вовлеченных в разнообразные биологические процессы. Металлопротеиназы 2-го и 9-го типов (ММР-2 и ММР-9), называемые желатиназами, играют важную роль в постинфарктном ремоделировании миокарда. Нежелательную активность желатиназ, проявляющуюся в

отрицательном воздействии на ткани сердечно-сосудистой системы, можно снизить или исключить полностью с помощью ингибиторов, содержащих цинк-хелатирующую группу [39]. Эффективными ингибиторами цинк-металлопротеиназ являются фосфиновые псевдо-пептиды, структурные изостеры пептидов, в молекуле которых две аминокислотные компоненты дипептида связаны цинк-хелатирующим фосфиновым фрагментом.

Таким образом, недостаточная эффективность природного трипептида IGL, а также вариабельность синтетических манипуляций над молекулой для увеличения ее эффективности, как антагониста бета-амилоида, обуславливает актуальность синтеза и изучения намеченных нами соединений.

Одним из примеров получения ингибиторов протеаз является модификация фрагмента адренокортикотропного гормона (АКТГ) Met-Glu-His-Phe.

Сам по себе тетрапептид является крайне привлекательным в качестве биологически активного соединения, так как способен участвовать в процессах, связанных с функционированием центральной нервной системы.

Однако ноотропный эффект природных фрагментов АКТГ недолговечный и ограниченный. Относительная нестабильность регуляторных пептидов в тканях и жидкостях организма обусловлена протеолизом. Период полураспада подавляющего большинства регуляторных пептидов варьируется от нескольких минут до двух часов [40], что является основным препятствием для использования их в качестве лекарственных средств.

Лабильность пептида обусловила необходимость в модификации их строения для увеличения устойчивости при медицинском применении.

Удачной попыткой для достижения этой цели оказалась конденсация тетрапептида с трипептидом Pro-Gly-Pro. Полученный препарат (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro), получивший название «Семакс», был более чем в 50 раз более устойчив по сравнению с исходным пептидом [41]. Это позволило использовать

Семакс в медицинской практике для стимулирования умственной работоспособности, лечении острого ишемического инсульта и других заболеваний ЦНС [41].

Повышение устойчивости пептида Met-Glu-His-Phe планировалось и при модификации самой молекулы. Этого можно добиться, превращая α -глутамилпептиды в γ -глутамилпептиды. И одни и другие пептидные аналоги являлись биологически активными соединениями. Так, показано, что (R)-2-Амино-5-(((S)-1-карбокси-2-(1H-индол-3-ил)этил)амино)-5-оксопентановая кислота, состоящая из остатков γ -глутаминовой кислоты и триптофана, оказывала иммунодепрессивное действие, подавляла реакции гуморального и клеточного иммунитета, нетоксична и не обладала мутагенными и тератогенными свойствами [42].

Устойчивость пептида Pro-Gly-Pro можно повысить при получении фосфинового производного этого пептида. Предлагаемая фосфиновая замена пептидной связи сохраняет исходную аминокислотную последовательность. Образующийся фосфоизостер повышает устойчивость псевдопептидной связи к гидролитическому действию пептидаз. Следовательно, можно ожидать сильного ингибирующего воздействия на процессы, происходящие в организме, по сравнению с исходным пептидом, лабильным в условиях протеолиза [39-41]. В качестве примера можно привести сравнение свойств Pro-Gly-Pro и его фосфинового аналога [43]:

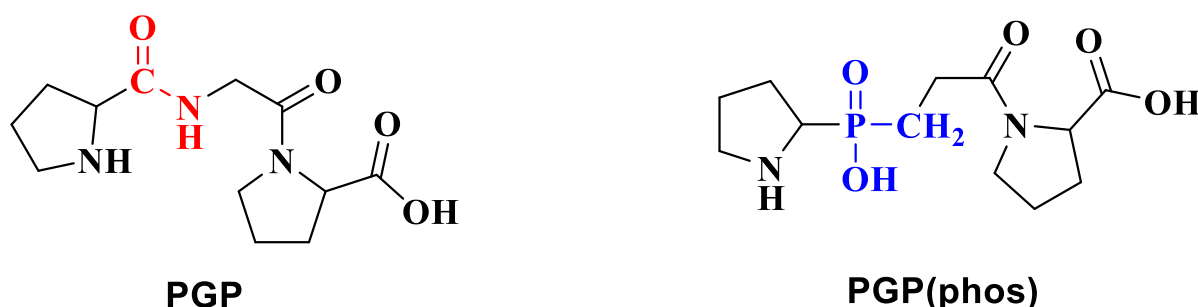


Рисунок 2. Строение пептидов Pro-Gly-Pro и Pro- ψ [P(O)(OH)CH₂]-Gly-Pro

Кроме увеличения стабильности, по сравнению с Pro-Gly-Pro, его фосфиновый структурный изостер обладает также антиагрегационными свойствами и, тем самым, может влиять на образования отложений в клеточной системе протеинопатии. С последними связано много заболеваний, в их числе болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и диабет II типа. Таким образом, потенциальные антиагрегационные свойства делают фосфиновый аналог Pro-Gly-Pro кандидатом для дальнейшего исследования в качестве агента при лечении протеинопатий [43].

Исследования в области фосфиновой модификации пептидов показали, что цинк-металлопептидаза «ангиотензинпревращающий фермент (АПФ)» была успешно атакована синтетическими ингибиторами, что привело к созданию лекарств, одобренных в настоящее время для клинического применения [44, 45].

Эти ингибиторы АПФ относятся к разным классам соединений, характеризующихся природой цинк-хелатной группы, присутствующей в их химической структуре.

Интересно, что ингибитор АПФ «фосиноприлат» представляет собой первый и до сих пор уникальный фосфиновый псевдопептид, используемый в качестве препарата, воздействующего на протеазы. Показано, что этот класс соединений проявляет себя в качестве чрезвычайно мощных ингибиторов по отношению к различным подсемействам цинк-металлопротеаз.

Кроме того, фосфиновые псевдопептиды использовались для получения мощных ингибиторов протеазы вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) [46-47], а в последнее время - ингибиторов вируса гепатита С (ВГС) [48].

Таким образом, фосфиновая модификация природных пептидов для получения ингибиторов цинк-металлопротеиназ представляет большой интерес, как в синтетическом, так и в практическом плане.

1.5 Фосфиновые псевдопептиды как ингибиторы цинк-металлопротеиназ

Предпочтительным подходом к разработке ингибиторов цинк-металлопротеиназ является присоединение цинк-хелатирующей группы к пептидному фрагменту [49]

Использование фосфорильной группы в качестве цинк-хелатирующей функции обусловлено близкой структурной имитацией переходного состояния пептидного гидролиза. В качестве фосфиновых ингибиторов были исследованы три группы псевдопептидов, содержащих фосфор:

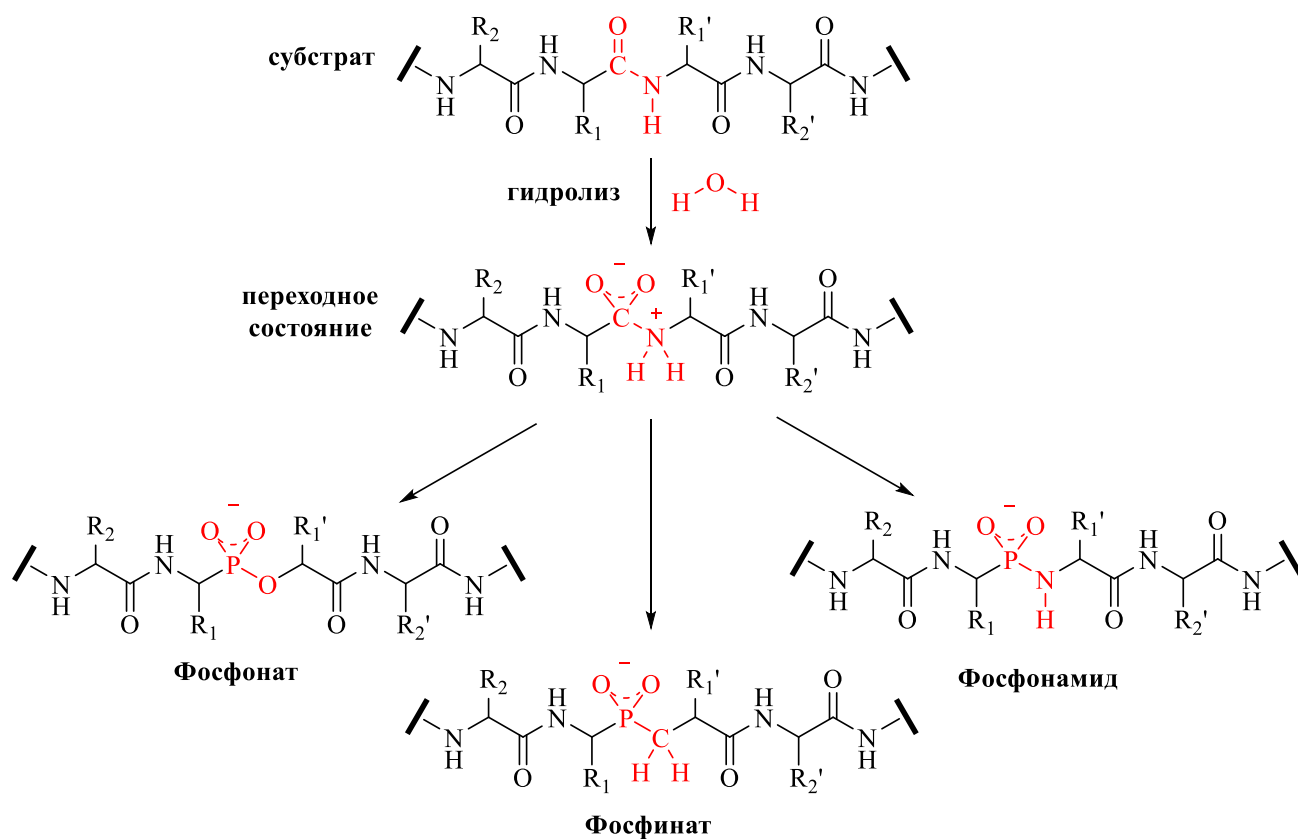


Рисунок 3. Фосфорсодержащие псевдопептиды

Очевидно, что наиболее близкая структурная имитация наблюдается у фосфонамида, [51, 52] однако, ограниченная стабильность P – N связи в процессе гидролиза препятствовала их дальнейшему использованию в качестве ингибиторов [53-57].

Существуют сведения, что фосфонаты являются одними из самых мощных ингибиторов карбоксипептидазы А [53]. Однако при тестировании эндопептидазами фосфонаты оказались менее эффективными [56].

Также было обнаружено, что замена NH-группы на CH₂-группу оказывает лишь незначительное влияние на ингибиторную способность [57].

Таким образом, ограничения использования фосфонамидов и фосфонатов обусловили использование фосфинатов в качестве стабильных соединений, способных эффективно ингибировать цинк-металлопротеазы [57].

1.6 Методы синтеза α-аминоалкифосфоновых кислот

1.6.1 Реакция Кабачника-Филдса

До открытия реакции Кабачника-Филдса в 1952 году [58,59] простых и универсальных методов синтеза α-аминофосфоновых кислот не существовало. Единичные попытки синтеза были многоступенчатыми и малоэффективными [60]. Таким образом, данная реакция занимает лидирующее положение среди высокоэффективных методов получения α-аминофосфоновых кислот.

Стратегия синтеза представляет из себя трехкомпонентную реакцию с использованием карбонильного соединения (альдегида или кетона), амина, и диалкилфосфита, в результате которой образуются α-аминофосфоновые кислоты, которые являются структурными аналогами α-аминокислот [61].



Схема 1. Реакция Кабачника-Филдса

До недавнего времени не существовало единого мнения на счет механизма данной реакции в связи со сложностью определения последовательности основных стадий процесса. В современной литературе рассматривается преимущественно два возможных механизма реакции [61-62].

Первый из них заключается в первоначальном образовании Р-С связи путем присоединения гидрофосфорильного соединения к карбонильной группе с последующим замещением гидроксигруппы в α-гидрокси производном на аминогруппу [61].

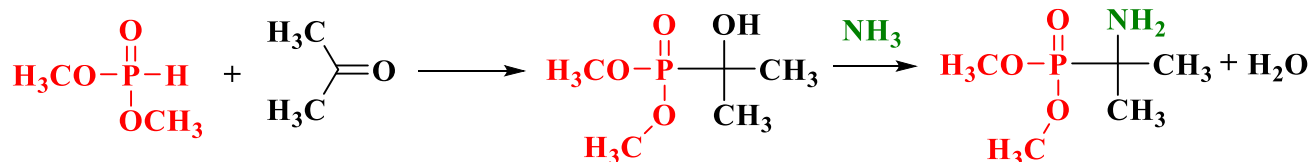


Схема 2. “α-Гидроксифосфонатный” вариант механизма реакции Кабачника-Филдса

Существуют предположения, что механизм данной реакции схож с механизмом реакции Манниха [62]. Данная реакция, названная в честь Карла Манниха, [63, 64] представляет собой трехкомпонентную органическую реакцию, которая включает аминоалкилирование кислого протона рядом с карбонильной группой. Конечным продуктом является β-аминокарбонильное соединение, также называемое основанием Манниха.

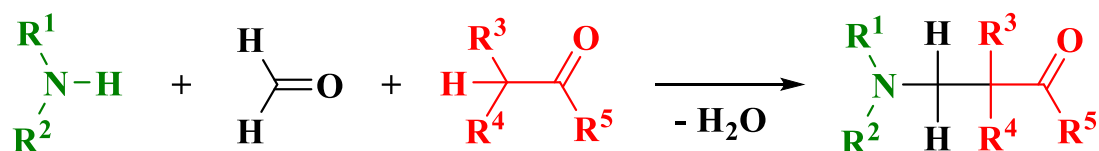


Схема 3. Реакция Манниха

Классическая реакция Манниха начинается с нуклеофильного присоединения амина к карбонильной группе с последующей дегидратацией с образованием основания Шиффа. Первичные или вторичные амины (-NH₂) или аммиак (NH₃) реагируют с формальдегидом (HCHO) (или другим альдегидом), в результате чего происходит образование основания Шиффа.

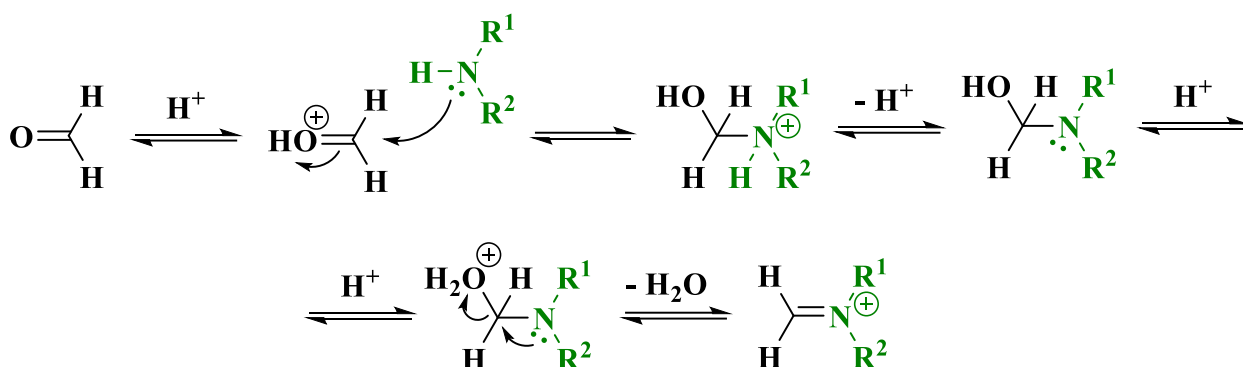


Схема 4. Механизм образования основания Шиффа в процессе реакции Манниха

Основание Шиффа является электрофилом, который вступает в реакцию электрофильного присоединения с енолом, образующимся *in situ* из соединения с карбонильной функциональной группой [65].

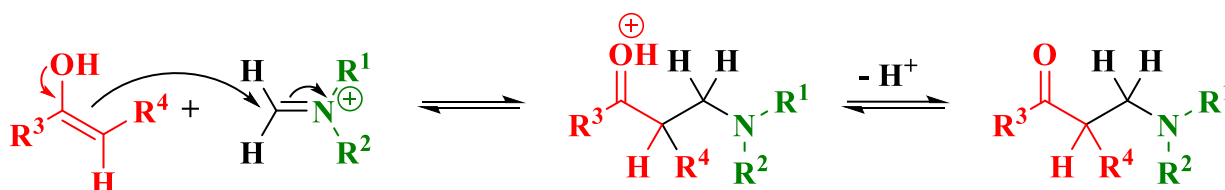


Схема 5. Реакция электрофильного присоединения основания Шиффа к енолу, образованному *in situ* в ходе реакции Манниха

Таким образом, по аналогии с реакцией Манниха, механизм реакции Кабачника-Филдса заключается в образовании промежуточного интермедиата реакции – имина, или основания Шиффа, которое образуется путем взаимодействия первичного амина и карбонильного соединения, что приводит к образованию C=N связи [63].

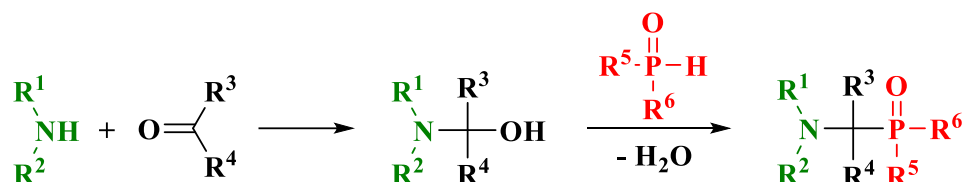


Схема 6. Образование α -аминоспирта в реакции Кабачника-Филдса

Формирование имина происходит в результате дегидратации *in situ* промежуточного α -аминоспирта. Эта реакция имеет обратимый характер, таким образом, присутствие в реакционной смеси дегидратирующих агентов смещает

равновесие в сторону образования интермедиата, а, следовательно, положительно сказывается на значениях выходов продукта реакции.

Следующая стадия реакции протекает за счет нуклеофильной атаки фосфора на углерод имида с образованием конечного продукта [64].

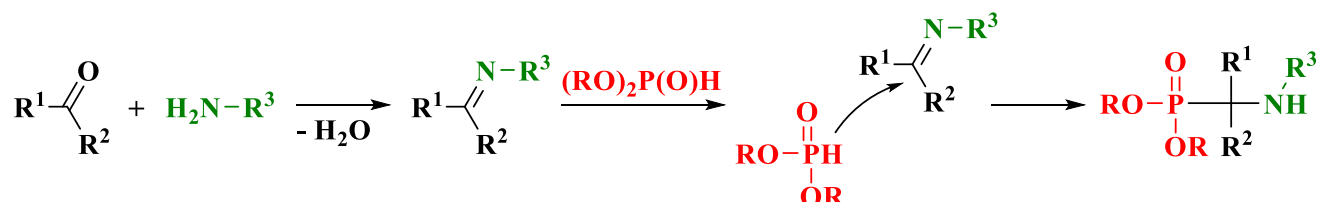


Схема 7. Нуклеофильная атака атома фосфора на углерод имида

Исследования карбаматной версии реакции Кабачника-Филдса, проведенные в ИФАВ РАН в последнее время [67-69], позволили предложить механизм образования фосфор-углеродной связи в исследуемой реакции по типу реакции Арбузова.

Реакция Михаэлиса-Арбузова была открыта Михаэлисом в 1898 году [70] и подробно изучена Александром Арбузовым [71]. Классический вариант реакции Арбузова представляет собой алкилирование триалкилфосфитов алкилгалогенидами с образованием диалкилфосфонатов:

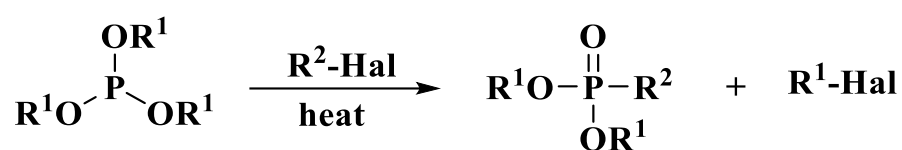


Схема 8. Реакция Арбузова

Данная реакция идет в две стадии, первая из которых протекает в соответствии с механизмом $\text{S}_{\text{N}}2$ нуклеофильного замещения и заключается в нуклеофильной атаке трехкоординированного фосфора триалкилфосфита на α -углерод алкилгалогенида с образованием интермедиата реакции триалкоксифосфониевой соли и отщеплении галогенид-иона X^- от алкилгалогенида. Таким образом, результатом первой стадии реакции Арбузова

является образование интермедиата с четырехкоординированным фосфором, одним из заместителей которого является алкильная группа алкилгалогенида.

Вторая стадия реакции Арбузова иначе называется перегруппировкой Арбузова и происходит благодаря нуклеофильной атаке галогенид-иона X^- на электрофильный атом углерода алкоксигруппы.

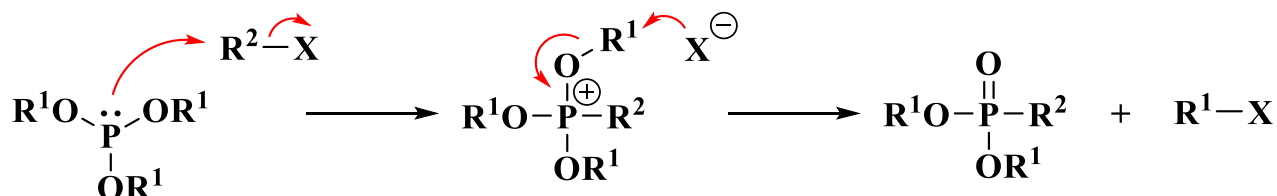
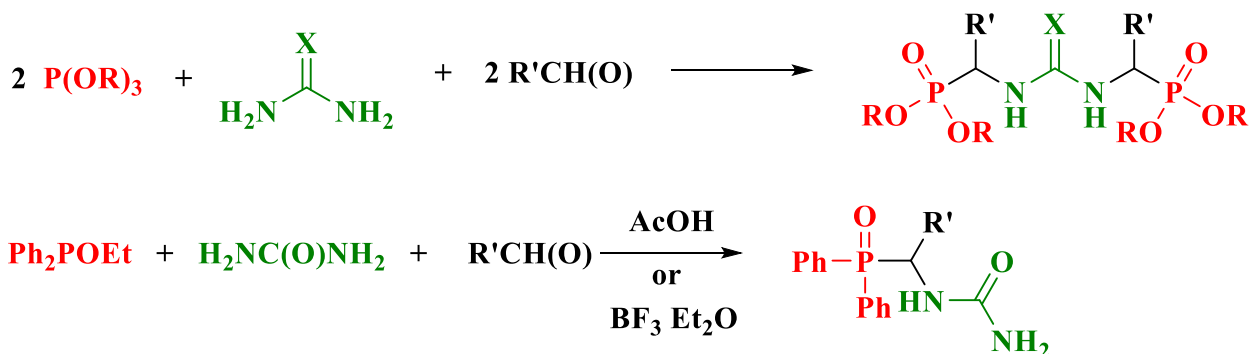


Схема 9. Механизм реакции Арбузова

Активация фосфора, как нуклеофила может происходить за счет преобразования фосфорной компоненты в трехвалентную форму, что может быть обеспечено силилированием в случае использования гидрофосфорильных соединений.

Развитие трехкомпонентной реакции Кабачника-Филдса привело к использованию амидов и алкилкарбаматов в качестве компоненты, несущей азот. Так, появилась возможность получения N-защищенных α -аминоалкилфосфоновых кислот, которые являются удобными строительными блоками для дальнейшего построения молекул пептидного характера с более сложными структурами.

Один из примеров использования амидов в реакции Кабачника-Филдса встречается в работе, посвященной синтезу с участием мочевины или тиомочевины с использованием трифенилфосфита и альдегидов с нагреванием смеси реагентов в дихлорэтаноле или толуоле и выделением продуктов взаимодействия как с участием одного, так и обоих атомов азота мочевины [72]



X = O, S; R = Ph, Et, CH₂CH₂Cl; R' = Me, *i*-Pr, Bu, Ph, Ar.

Схема 10. Пример использования амидов в реакции Кабачника-Филдса

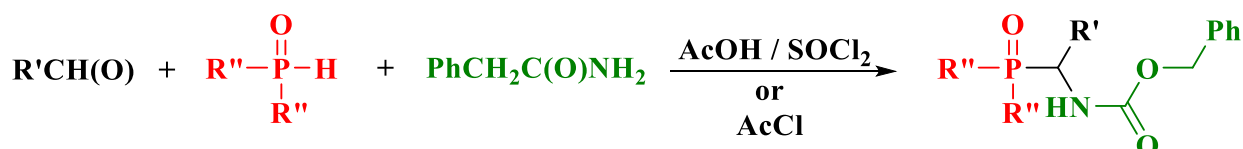
Последующее развитие процедуры повлекло за собой исследование других подходов к синтезу, в числе которых, реакция Олексижина - амидоалкилирование хлоридов трехвалентного фосфора в уксусной кислоте. [73,74].



X = Cl, Me, Et, Ph; R' = Alk, Ph; R'' = H; R'+R'' = (CH₂)₅

Схема 11. Реакция Олексижина

Позже группой китайских ученых была предложена процедура амидоалкилирования гидрофосфорильных соединений в ацетилхлориде или смеси уксусной кислоты и тионилхлорида [75-76].



R' = Ar, *i*-Bu, Bu; R'' = Alk, Ph

Схема 12. Амидоалкилирование гидрофосфорильных соединений

Однако такие условия проведения реакции оказались довольно жесткими, что повлекло за собой частичную потерю защитной группы на атоме азота.

Поэтому N-защищенные α -аминофосфоновые кислоты подвергались кислотному гидролизу без выделения. Кроме того, было отмечено частичное дезалкилирование эфирных фрагментов у фосфорильного фрагмента, что в свою очередь значительно затрудняет выделение продукта реакции [76]. В этой связи актуальным является поиск более мягких условий проведения реакции.

1.6.2 Амидоалкилирование или карбаматная версия реакции Кабачника-Филдса

Ченом и Ковардом предложено получение фосфиновых псевдодипептидов в трехкомпонентной конденсации карбамата, альдегида и β -этоксикарбоксилфосфоновой кислоты (схема 13) [77,78].

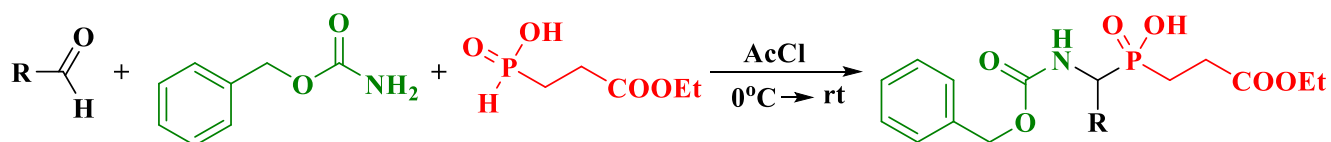


Схема 13. Синтез фосфиновых дипептидов

Реакция была аналогична предыдущему применению фосфитов в качестве метода синтеза производных α -аминофосфиновой кислоты [76]. Алифатические и ароматические альдегиды ($R = \text{Me}, \text{Et}, p\text{-MeO-C}_6\text{H}_4$) аналогично реагировали с бензилкарбаматом и 2-этоксикарбонилэтилфосфонистой кислотой в присутствии ацетилхлорида. Реакция протекала с хорошим выходом конечных продуктов (48-75%) после обработки.

Большая реакционная способность алкилкарбаматов по сравнению с амидами была обнаружена при более мягких условиях амидоалкилирования гидрофосфорильных соединений [79-83]. Так, в среде уксусного ангидрида при комнатной температуре, впервые удалось выделить N,N' -алкилиденбискарбаматы (схема 14) в качестве стабильных промежуточных продуктов реакции [79-83]. Ранее в качестве промежуточных продуктов в реакции Олесижина были предложены родственные соединения, бисамиды [73] и амидоалкилацетаты [74].

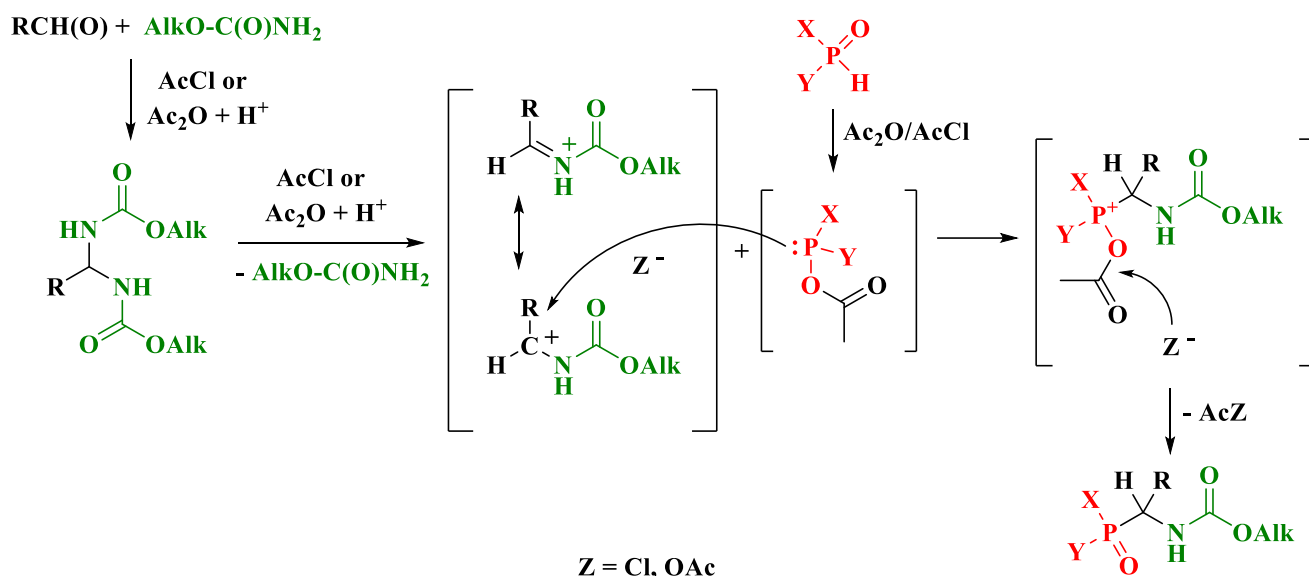


Схема 14. Образование связи Р-С в результате превращений по типу реакции Арбузова

Бискарбаматы являются источником ацилиминиевых катионов, заряженных оснований Шиффа, которые образуются в условиях кислотного катализа и являются высокореакционными электрофильными компонентами реакции [79-83]. Промежуточный продукт, содержащий ангидридный фрагмент $\text{P}^{\text{III}}\text{-OAc}$ (схема 14), был предложен в качестве нуклеофильного компонента, непосредственно участвующего в образовании фосфор-углеродной связи. Это было подтверждено экспериментами с использованием предварительно синтезированного ацетилдиэтилфосфита, а также тетраэтилпирофосфита для получения *in situ* ацетилдиэтилфосфита [79].

Таким образом, фосфиновые пептиды, имеющие структурное сходство с переходным состоянием пептидного субстрата при гидролизе, рассмотрены для выявления ингибиторов протеаз. Классическая трёхкомпонентная реакция Кабачника-Филдса (*фосфо-Манних*) является ключевой базой для синтеза фосфиновых пептидов, поскольку на её основе были разработаны амидная и карбаматная версии, причём карбаматная версия из-за более мягких условий амидоалкирования гидрофосфорильных соединений становится предпочтительнее как классической версии, так и амидной версии в свете результатов последних исследований [67-69, 79-83].

1.7 Подходы к синтезу фосфиновых кислых дипептидов

1.7.1 NP+C синтетический подход

Л. Полинг с коллегами в 1946 году предположил, что соединения, имеющие электронное строение, схожее с переходным состоянием биокатализируемой реакции, могут быть использованы в качестве высокоэффективных ингибиторов ферментов [84]. Так, введение фосфорильной группы может имитировать тетракоординированное переходное состояние углерода во многих органических реакциях. Один из наиболее известных подходов представляет собой замену карбоксильной группы фосфорильной функцией, что приводит к получению фосфорных изостеров аминокислот - α -аминофосфоновых, α -аминофосфиновых кислот, которые в свою очередь являются ингибиторами ферментов, что делает их потенциально полезными в лечении различных заболеваний [85-87].

Методология NP+C синтеза фосфиновых псевдо-пептидов, базируется на построении аминоалкилфосфонистого блока **15.1** (схема 15) [88]. В качестве наиболее эффективного подхода использовалась процедура присоединения силиловых эфиров N-защищенных α -аминоалкилфосфонистых кислот **15.2**, полученных путем ацилирования азота и силилирования фосфора фосфонистых изостеров аминокислот **15.1** (схема 15), к соответствующим образом α -R'-замещенным акрилатам (схема 15). Такие акрилаты являются носителями структурных изостеров второй аминокислотной составляющей дипептида. Гидролиз полученного в результате присоединения продукта с защищенным атомом азота приводит к получению фосфинового изостера природного дипептида в виде свободной аминофосфиновой кислоты – свободного пептида **15.3**.

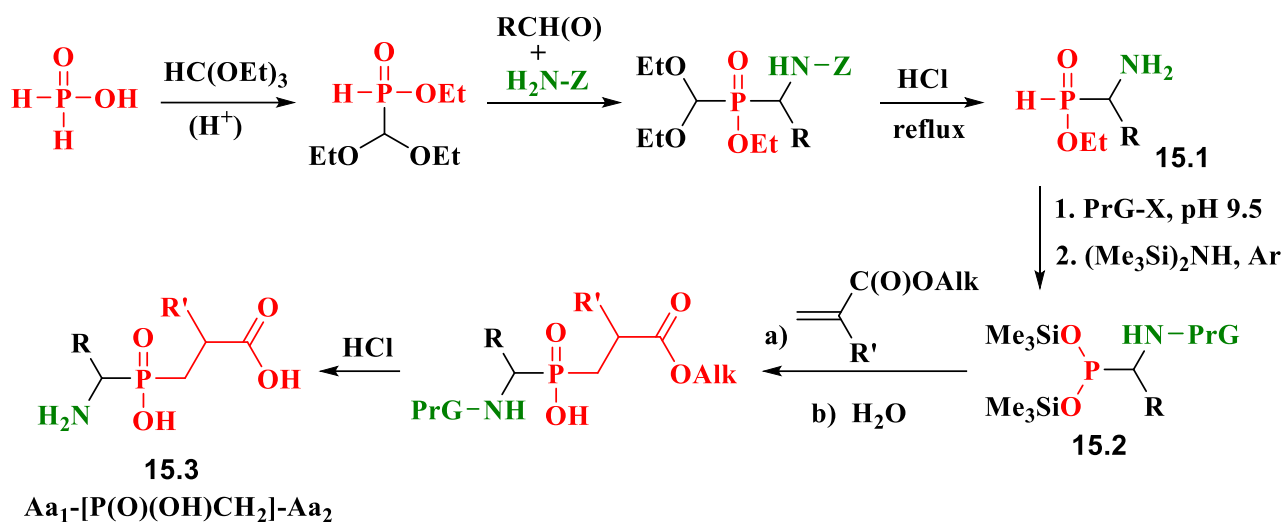


Схема 15. Синтез фосфонистых изостеров аминокислот и свободных фосфиновых пептидов

Данная методика характеризуется простым доступом к защищенным фосфонистым субстратам. Различные варианты получения этих Р-Н субстратов, первоначально предложенные Бейлисом с коллегами (компания Ciba-Geigy) [88], основаны на трехкомпонентной конденсации альдегида, фосфорноватистой кислоты и тритил- или дифенилметиламина в качестве амино-компоненты или присоединении H_3PO_2 к дифенилметилям. Впоследствии аминогруппу можно защитить бензилоксикарбонильной группой (Cbz) в водном растворе [89]. Процедура особенно удобна для алкильных и арильных заместителей с единственным исключением для глицинового изостера ($\text{R}=\text{H}$). Дополнительная функциональность боковой цепи требует внимания в отношении ее ортогональной защиты при синтезе α -аминофосфонистых кислот и их дальнейших превращениях.

Основными преимуществами подхода являются простота и дешевизна, хотя препаративный выход невелик за счет как минимум 4-стадийного синтеза гидрофосфорильных (фосфонистых) изостеров аминокислот **15.1**, обусловленного необходимостью промежуточной установки и удаления соответствующих защитных групп на атомах **N** (COOAlk) и **P** (CH(OEt)_2) (схема 15).

Кроме того, в некоторых случаях присоединение таких блоков к α -замещенным акрилатам не удастся осуществить [90-93].

1.7.2 N+PC синтетический подход

N+PC синтетический подход является альтернативным методом синтеза псевдопептидов путем обратной последовательности построения целевой молекулы. На первом этапе осуществляется присоединение бис(триметилсилил)гипофосфита (BSH), генерированного *in situ* из солей гипофосфористой кислоты, к α -R'-замещенным акрилатам (схема 16), что приводит к образованию фосфонистых кислот, содержащих структурный аналог (изостер) соответствующей аминокислоты. Последующее образование второй P-C связи и α -аминофосфорильной функции по реакции Кабачника-Филдса обеспечивает получение молекулы фосфоизостера дипептида [79-83].

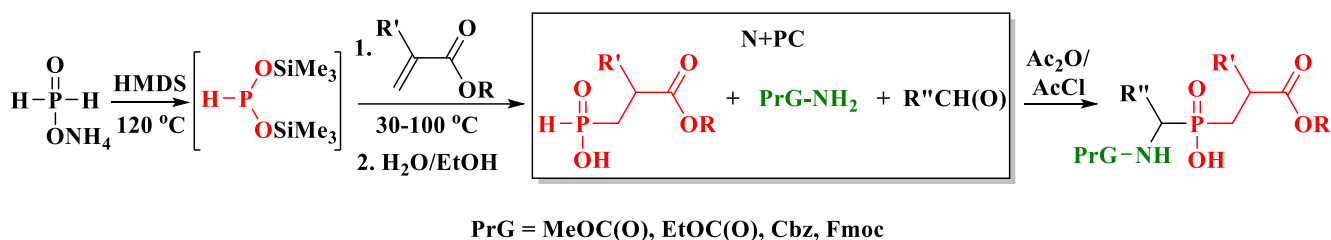


Схема 16. N+PC синтетический подход к синтезу фосфиновых кислых пептидов

Одним из преимуществ данной стратегии является возможность использования малореакционных исходных реагентов, например, легколетучих карбонильных соединений для синтеза N-защищенных α -аминофосфорильных соединений с хорошими выходами.

Первоначально была предложена процедура реакции Кабачника-Филдса с использованием амидов в качестве амино-компоненты [68, 69] и хлоридов трехвалентного фосфора, альдегидов или кетонов в уксусной кислоте (реакция Олексижина).

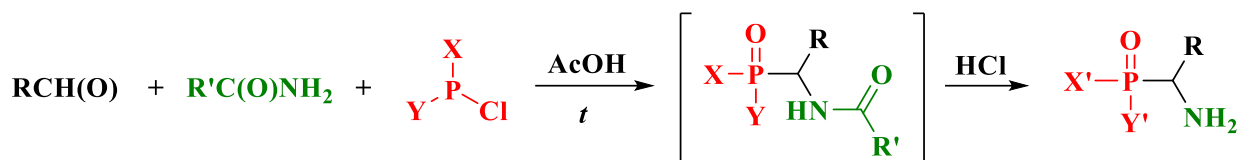


Схема 17. Пример реакции Олексижина

В дальнейшем реакция была модифицирована Юаном с коллегами [75] для диалкилфосфитов с карбонильными соединениями и амидами или карбаматами в ацетилхлориде или смеси тионилхлорида и уксусной кислоты.

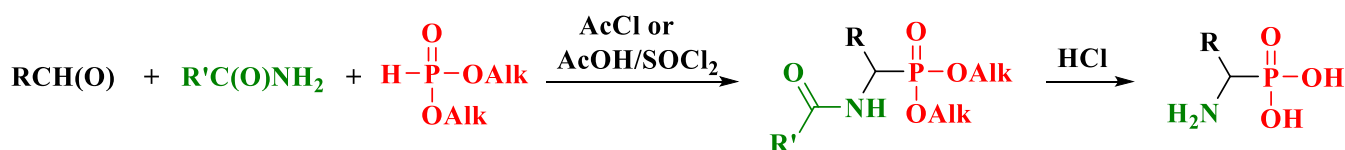


Схема 18. Модифицированная реакция Олексижина

Обычно N-ацилированные α-аминоалкилфосфорные соединения без их выделения подвергают кислому гидролизу с последующим выделением α-аминоалкилфосфоновых кислот. Процесс амидоалкилирования диалкилфосфитов в жестких условиях в среде ацетилхлорида может сопровождаться частичным дезаклилированием алкоксикарбонильного фрагмента.

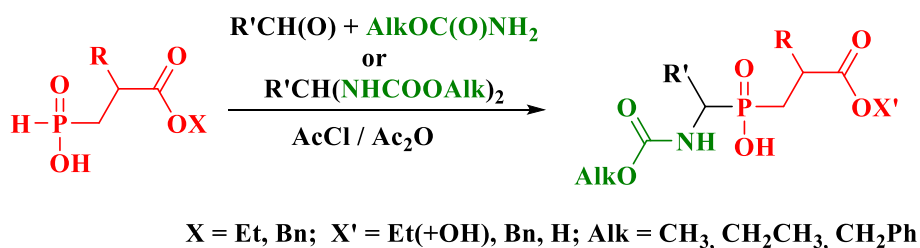


Схема 19. Дезаклилирование алкоксикарбонильного фрагмента молекулы псевдопептида

1.8 Фосиноприл

Примером практического применения производных фосфиновых кислот в качестве лекарственных препаратов является Фосиноприл, производное эфира фосфиновой кислоты, содержащее в молекуле замещенный пролиновый фрагмент. В качестве эфирной функции использована ацилоксиалкиловая защита, позволяющая получить лекарственную форму активной фосфиновой кислоты. При этом повышается проницаемость ацилоксиалкиловых эфиров фосфиновой кислоты

через гематоэнцефалический барьер и повышается эффективность действующего начала – самой молекулы фосфиновой кислоты [94].

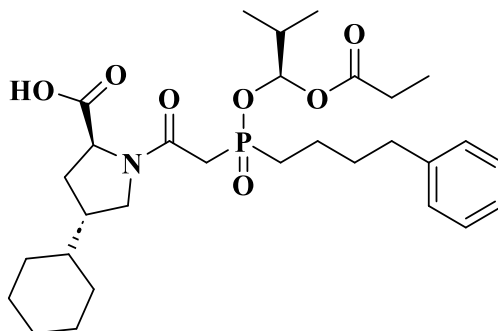


Рисунок 4. Структура Фосиноприла

Фосиноприл (Моноприл) представляет собой ингибитор ангиотензинпревращающего фермента (ИАПФ) и в настоящий момент является единственным представителем III поколения ИАПФ [94]. Ангиотензинпревращающий фермент (АПФ) является протеолитическим ферментом, который принимает непосредственное участие в регуляции широкого спектра физиологических и патофизиологических эффектов на сердце и сосудистой системе [95].

Фосиноприл является высокоэффективным препаратом для лечения артериальной гипертензии и сердечной недостаточности. Кроме того, было обнаружено, что Фосиноприл оказывает нефропротективное влияние, снижая уровень микроальбуминурии и замедляя прогрессирование хронической болезни почек.

Исследования на животных трансгенных моделях позволяют предположить, что АПФ-ингибиторы, защищая сердечно-сосудистую систему, могут в то же время способствовать аккумуляции бета-амилоидных бляшек, поскольку АПФ расщепляет бета-пептид. На эту тему ведутся исследования [96].

Таким образом, Фосиноприл является ярким подтверждением эффективной физиологической активности фосфиновых пептидов в качестве ингибиторов различных групп ферментов.

ГЛАВА 2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

2.1 Синтез фосфиновых кислых аналогов дипептидных составляющих IGL

Нами были синтезированы фосфиновые аналоги природных дипептидов – составляющих IGL с различным расположением фосфорильной функции Ile-[P]-Gly и Gly-[P]-Leu (здесь и далее [P]=ψP(O)(OH)CH₂).

Как было показано в литературном обзоре, построение молекулы фосфинового псевдопептида базируется на методологии синтеза фосфонистых (P^{III}) структурных изостеров аминокислот, разработанной компанией Ciba-Geigy [88,89]. Реакция Кабачника-Филдса используется на первоначальном этапе процесса для построения α-аминофосфорильной функции NP-дизащищенной компоненты синтеза. В присоединении последней к соответствующим образом α-замещенным акрилатам заключается NP+C подход, наиболее распространенный в литературе.

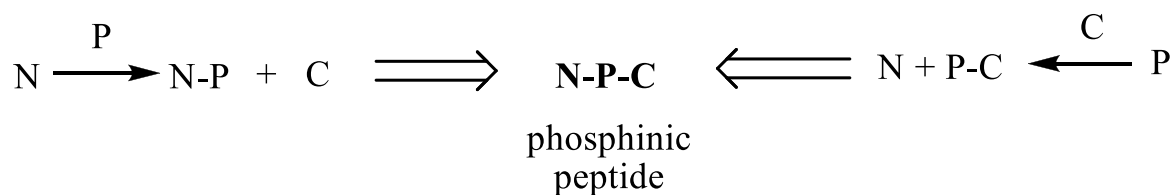


Схема 20. Две методологии синтеза фосфиновых пептидов

Развиваемая в последнее время N+PC методология синтеза фосфиновых пептидов заключается в обратном построении искомой молекулы и включает реакцию Кабачника-Филдса на заключительной стадии процесса для построения α-аминофосфорильной функции псевдопептида с участием фосфонистой PC - компоненты синтеза, содержащей структурный изостер соответствующей аминокислоты.

Данная работа посвящена развитию N+PC методологии синтеза фосфиновых кислых структурных изостеров природных пептидов.

2.1.1. Синтез фосфиновых изостеров лейцил- и изолейцилглицинов

Для получения псевдолейцил-ψ[P(O)(OH)CH₂]-глицина **4a** и псевдоизолейцил-ψ[P(O)(OH)CH₂]-глицина **4b** нами получена (3-бензилокси-3-оксипропил)фосфонистая кислота **1**, включающая структурный изостер глицина (X = H, Y = Bn), которая использовалась в качестве РС-компоненты синтеза.

Фосфонистая кислота **1** получается путем присоединения, генерированного *in situ* (из солей гипофосфористой кислоты) бис(триметилсилил)гипофосфита к соответствующим образом α-X-замещенному акрилату. Заместитель в α-положении акриловой системы определяет, структурный фрагмент какой аминокислоты будет имитировать полученная фосфонистая кислота (схема 21).

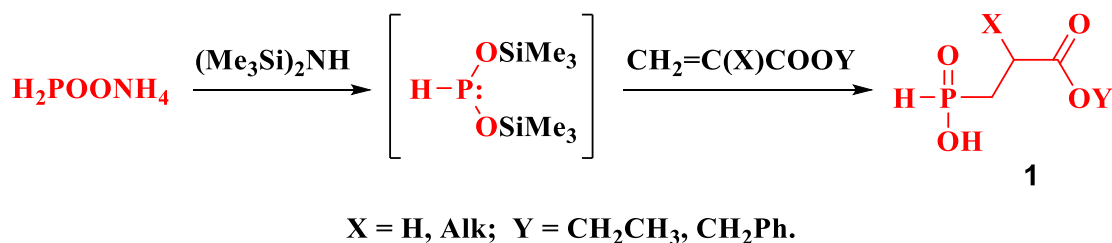


Схема 21. Получение фосфонистых кислот

Реакцию амидоалкилирования проводили в среде ацетила хлористого или в его смеси с уксусной кислотой или абсолютным толуолом при разных соотношениях. Реакция амидоалкилирования протекает достаточно быстро, в течение 1-3 часов в зависимости от среды.

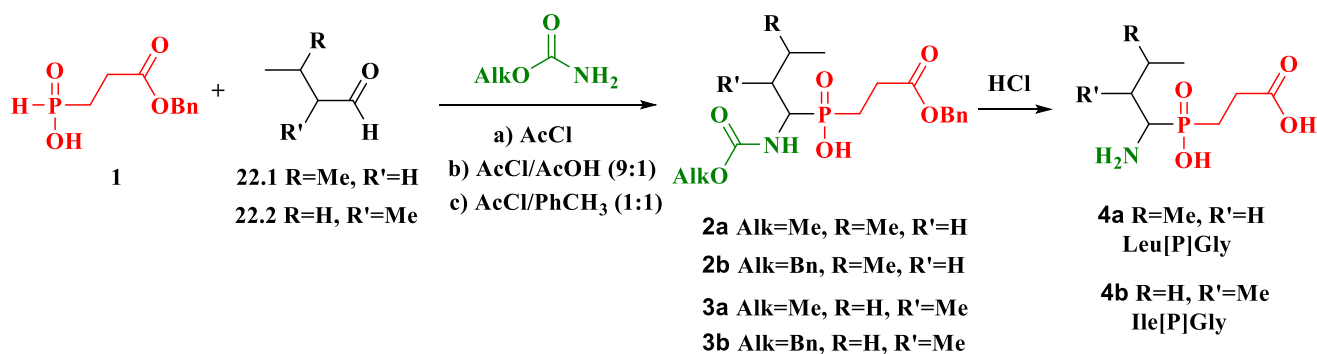


Схема 22. Синтез фосфиновых изостеров лейцил- и изолейцилглицина

Об окончании реакции судили по исчезновению сигнала исходного фосфорного соединения в районе 30÷40 м.д. в спектре ЯМР ^{31}P 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 **23.1**, который, непосредственно участвует в образовании РС-связи путем нуклеофильной атаки на положительно заряженный углерод ацилиминиевого катиона **23.2**. Последний в свою очередь генерируется *in situ* из алкилиденбискарбамата **23.3**, стабильного интермедиата реакции (схема 23) [79].

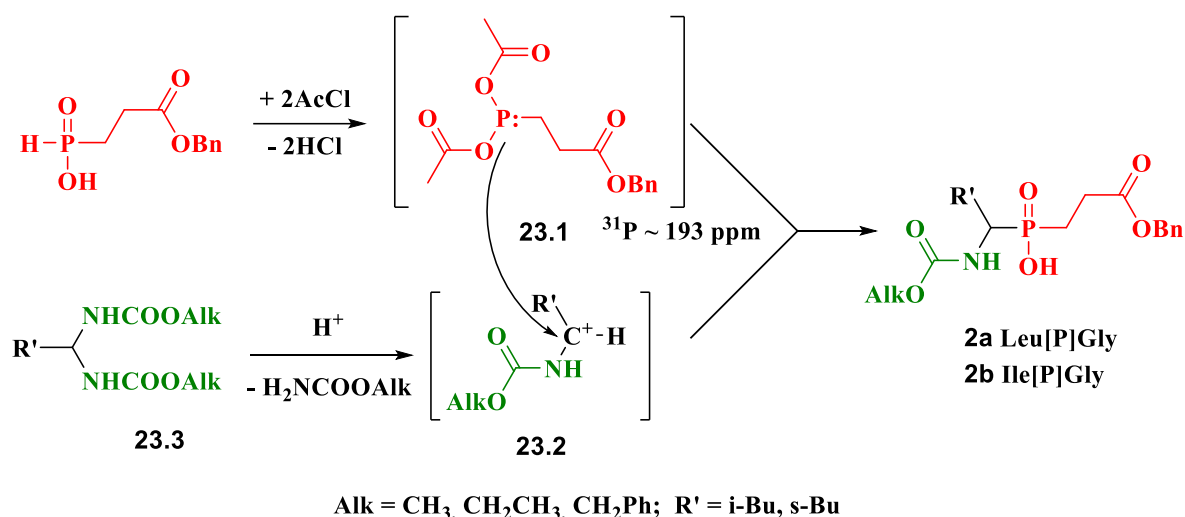


Схема 23. Механизм образования Р-С связи

2.1.2. Синтез фосфинового аналога аланиллейцина

Фосфиновые глицил-содержащие пептиды являются труднодоступными соединениями, и разработка общего метода синтеза этих соединений выделена в отдельную главу – общая процедура синтеза N-защищенных глицил-содержащих фосфиновых пептидов (см. ниже).

Поэтому нами было принято решение осуществить синтез фосфиновой кислоты, представляющей собой этиловый эфир N-защищенного фосфинового кислого псевдоаланил-лейцина – ближайшего гомолога псевдоглицил-лейцина **7**

(схема 24). Его получение было обеспечено процессом амидоалкилирования фосфонистой кислоты, содержащей структурный изостер лейцина **5**, с использованием бензилкарбамата и уксусного альдегида в среде ацетилхлорида и (или) уксусного ангидрида, как трехкомпонентный вариант карбаматной версии реакции Кабачника–Филдса.

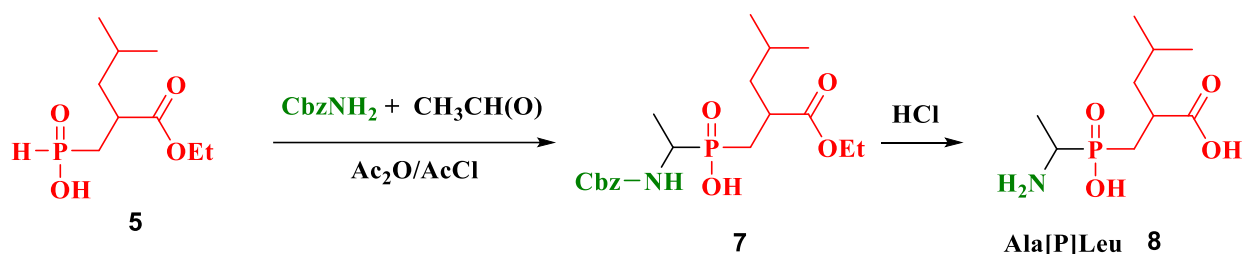


Схема 24. Трехкомпонентный вариант карбаматной версии реакции Кабачника–Филдса

Установлено, что процесс амидоалкилирования фосфонистой кислоты достаточно быстро протекает в среде ацетилхлорида или в смеси с уксусным ангидридом. Однако в этом случае наблюдается частичное дезалкилирование эфирного фрагмента молекулы и образование фосфиновой карбоновой кислоты (от 5 до 20%). Кроме того, протекают побочные реакции с участием ацетальдегида и образованием несодержащих фосфор соединений, что заметно снижает выход целевого соединения.

В связи с этим нами был исследован более мягкий кислотный катализ посредством *p*-толуолсульфокислоты в среде уксусного ангидрида. Побочный процесс дезалкилирования эфирных фрагментов в этом случае отсутствует, однако скорость реакции амидоалкилирования заметно снижается.

В качестве альтернативного метода был изучен двухкомпонентный вариант синтеза взаимодействием фосфонистой компоненты **5** с предварительно синтезированным *N,N*-этилиденбис(бензилкарбаматом) **6**, который позволил добиться высокого выхода *N*-Cbz-защищенного фосфинового аланиллейцина **7** (83%) и свободного пептида **8** (схема 25).

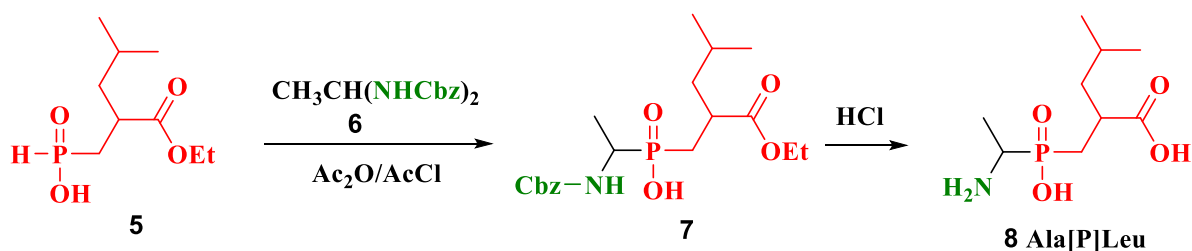


Схема 25. Двухкомпонентный вариант карбаматной версии реакции Кабачника–Филдса

N,N'-этилиденбис(бензилкарбамат) **6** совмещает в себе карбонильный и карбаматный компоненты, что позволило избежать побочных процессов с участием ацетальдегида и достигнуть высокого выхода целевой молекулы **7**.

2.2 Общая процедура синтеза N-защищенных глицил-содержащих фосфиновых пептидов

Как уже сообщалось ранее, наиболее эффективным в качестве растворителя проявил себя ацетил хлористый, однако в этом случае наблюдается частичное дезалкилирование сложноэфирной функции фосфонистых кислот. В этой связи при разработке процедуры синтеза глицил-содержащих фосфиновых пептидов – в качестве нуклеофильной компоненты мы заменили фосфонистые карбоновые эфиры фосфонистыми карбоновыми кислотами.

Построение аминфосфорильной функции молекулы псевдоглицилпептида, то есть N-терминального компонента пептида, имитирующего глицин, осложняется трудностью использования формальдегида, существующего в полимерной форме или в виде водного раствора, что обычно несовместимо с используемой синтетической процедурой.

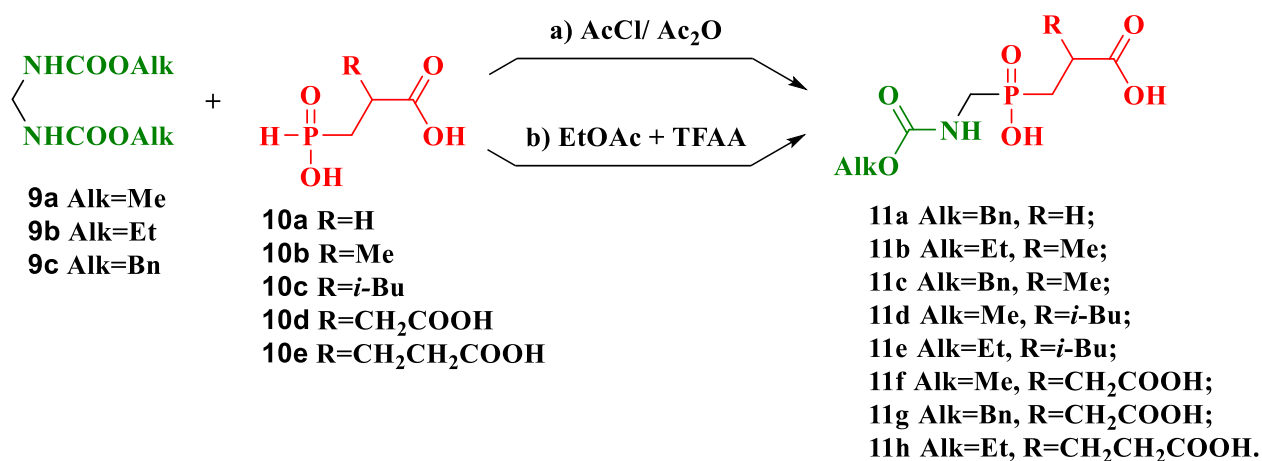


Схема 26. Синтез глицил-содержащих фосфиновых псевдопептидов

Для решения проблемы введения в молекулу псевдопептида *N*-терминального изостера глицина, нами была разработана общая процедура синтеза фосфиновых *N*-защищенных глицил-содержащих дипептидов. Мы предлагаем использование *N,N'*-метиленисалкилкарбаматов **9** в качестве электрофила, содержащего глициновый компонент пептида (схема 26).

Синтез метиленискалкарбаматов **9** был осуществлен путем взаимодействия диэтилоксиметана, который является ацеталем формальдегида, с двумя эквивалентами соответствующего алкилкарбамата в среде уксусного ангидрида (схема 27).

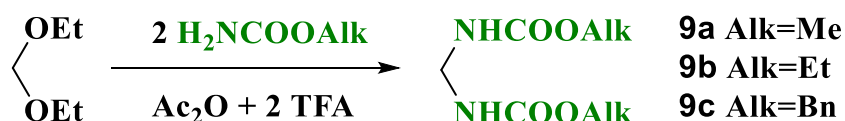


Схема 27. Синтез метиленискалкарбаматов

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 образованием соответствующего *N,N'*-метиленискалкарбамата **9a**, **9b**, **9c**. Полученные метиленискалкарбаты не являются кислотоустойчивыми, поэтому реакцию следует проводить:

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

Был успешно получен ряд *N*-защищенных фосфиновых глицил-содержащих пептидов в соответствии со схемой 26. При этом были исследованы две реакционных среды – в этилацетате с добавлением трифторуксусного ангидрида (TFAA) в качестве дегидратирующего и ацилирующего агента, а также в более жестких условиях в смеси AcCl/Ac₂O (1/1). В среде этилацетата выходы *N*-защищенных глицил-содержащих фосфиновых пептидов были удовлетворительные (29-58%), но лучшие результаты (51-76%) были получены при проведении синтеза в среде AcCl/Ac₂O, что продемонстрировано данными таблицы 1.

Таблица 1. Выходы глицил-содержащих фосфиновых псевдопептидов в зависимости от реакционной среды

№	R	Alk	Выход 11(a-h), %	
			EtOAc+TFAA	AcCl/Ac ₂ O
11a	H	Bn	43	76
11b	Me	Et	-	63
11c	Me	Bn	29	67
11d	<i>i</i> -Bu	Me	46	71
11e	<i>i</i> -Bu	Et	58	68
11f	CH ₂ COOH	Me	-	51
11g	CH ₂ COOH	Bn	42	-
11h	CH ₂ CH ₂ COOH	Et	-	55

Нами были синтезированы фосфиновые псевдопептиды **11 (a-h)**, содержащие структурные изостеры глицина (**11a**, R=H), аланина (**11b-c**, R=Me), лейцина (**11d-e**, R=*i*-Bu), аспарагиновой (**11f-g**, R=CH₂COOH) и глутаминовой (**11h**, R=CH₂CH₂COOH) кислот (схема 26).

2.3 Изучение реакционной способности фосфонистых карбоновых кислот и механизма образования Р-С связи в процессе амидоалкилирования

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

Мы провели сравнительное изучение реакционной способности РС компоненты на примере фосфонистой пропионовой кислоты **10a** в сравнении с ее этиловым **10a'** и бензиловым **10a''** эфирами. В качестве модельных реакций были выбраны синтез фосфиновых N-Cbz-защищенных псевдопептидов валилглицина **15** и лейцилглицина **16** в двух- и трехкомпонентной версиях амидоалкилирования в смеси AcCl/Ac₂O = 1:4÷7 (схема 28).

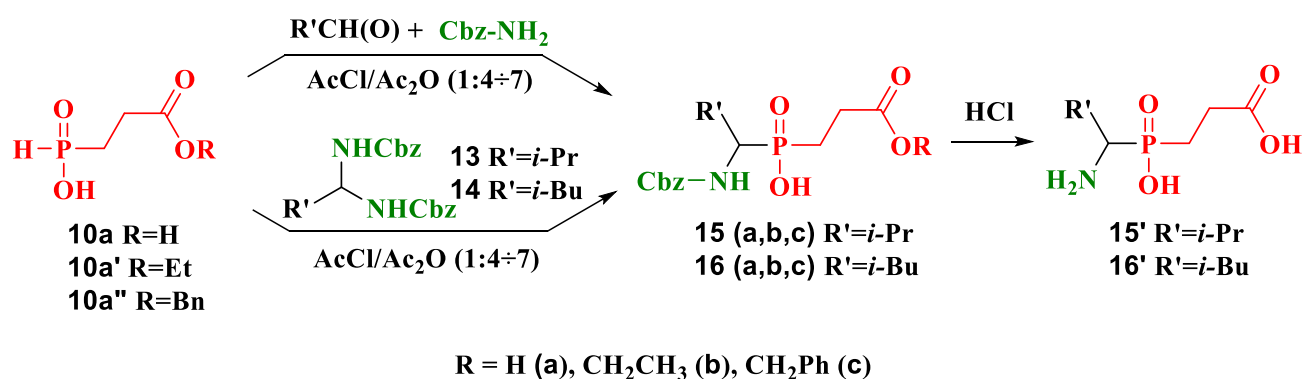


Схема 28. Двух- и трехкомпонентная версии синтеза фосфиновых валилглицил- и лейцилглицил псевдопептидов

Было найдено, что в этой среде образование целевых N-защищенных фосфиновых пептидов **15** и **16** с участием фосфонистой пропионовой кислоты **10a** протекает в течение 1 часа, с участием этилового **10a'** или бензилового **10a''** эфиров в течение более длительного времени - от нескольких часов до суток. Превращение фосфонистых кислот **10** в соответствующие фосфиновые пептиды **15** (a,b,c) и **16** (a,b,c) регистрировали по соотношению интегральной интенсивности сигналов фосфинового пептида к сумме интегральных интенсивностей пептида и исходной РС-компоненты в спектре ³¹P ЯМР реакционной массы (таблица 2).

Таблица 2. Изучение реакционной способности РС-компоненты на примере фосфонистой пропионовой кислоты в сравнении с ее этиловым и бензиловым эфирами

№	AcCl/ Ac ₂ O	Электрофильная компонента	РС компонента	Время, час	Содержание продукта в реакц. смеси, % (³¹ P ЯМР)
1	1:4	i-Pr-CH(O)	HP(O)(OH)CH ₂ CH ₂ COOH	1.0	77
2	1:4	i-Pr-CH(O)	HP(O)(OH)CH ₂ CH ₂ COOEt	2.0	46
3	1:7	i-Pr-CH(O)	HP(O)(OH)CH ₂ CH ₂ COOEt	2.0	7
4	1:7	i-Pr-CH(NHCbz) ₂	HP(O)(OH)CH ₂ CH ₂ COOH	2.0	85
5	1:7	i-Pr-CH(NHCbz) ₂	HP(O)(OH)CH ₂ CH ₂ COOEt	2.0	16
6	1:6	i-Bu-CH(O)	HP(O)(OH)CH ₂ CH ₂ COOH	3.0	70
7	1:6	i-Bu-CH(O)	HP(O)(OH)CH ₂ CH ₂ COOEt	3.0	26
8	1:6	i-Bu-CH(O)	HP(O)(OH)CH ₂ CH ₂ COOBn	3.0	14
9	1:4	i-Bu-CH(NHCbz) ₂	HP(O)(OH)CH ₂ CH ₂ COOH	0.7	98
10	1:4	i-Bu-CH(NHCbz) ₂	HP(O)(OH)CH ₂ CH ₂ COOBn	0.7	76
11	1:6	i-Bu-CH(NHCbz) ₂	HP(O)(OH)CH ₂ CH ₂ COOH	3.0	94
12	1:6	i-Bu-CH(NHCbz) ₂	HP(O)(OH)CH ₂ CH ₂ COOBn	3.0	59

Замена смеси альдегида и бензилкарбамата предварительно синтезированным алкилиденбискарбаматом, а также замена радикала R' в молекуле альдегида значительно не влияют на полученный результат, заключающийся в фундаментальном различии реакционной способности фосфонистой карбоновой кислоты и ее эфиров.

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

Нижe представлены спектры ^{31}P ЯМР фосфонистой пропионовой кислоты и ее бензильного эфира в смеси $\text{AcCl}/\text{Ac}_2\text{O}$, содержащие сигналы генерируемых *in situ* POAc-производных трехкоординированного фосфора.

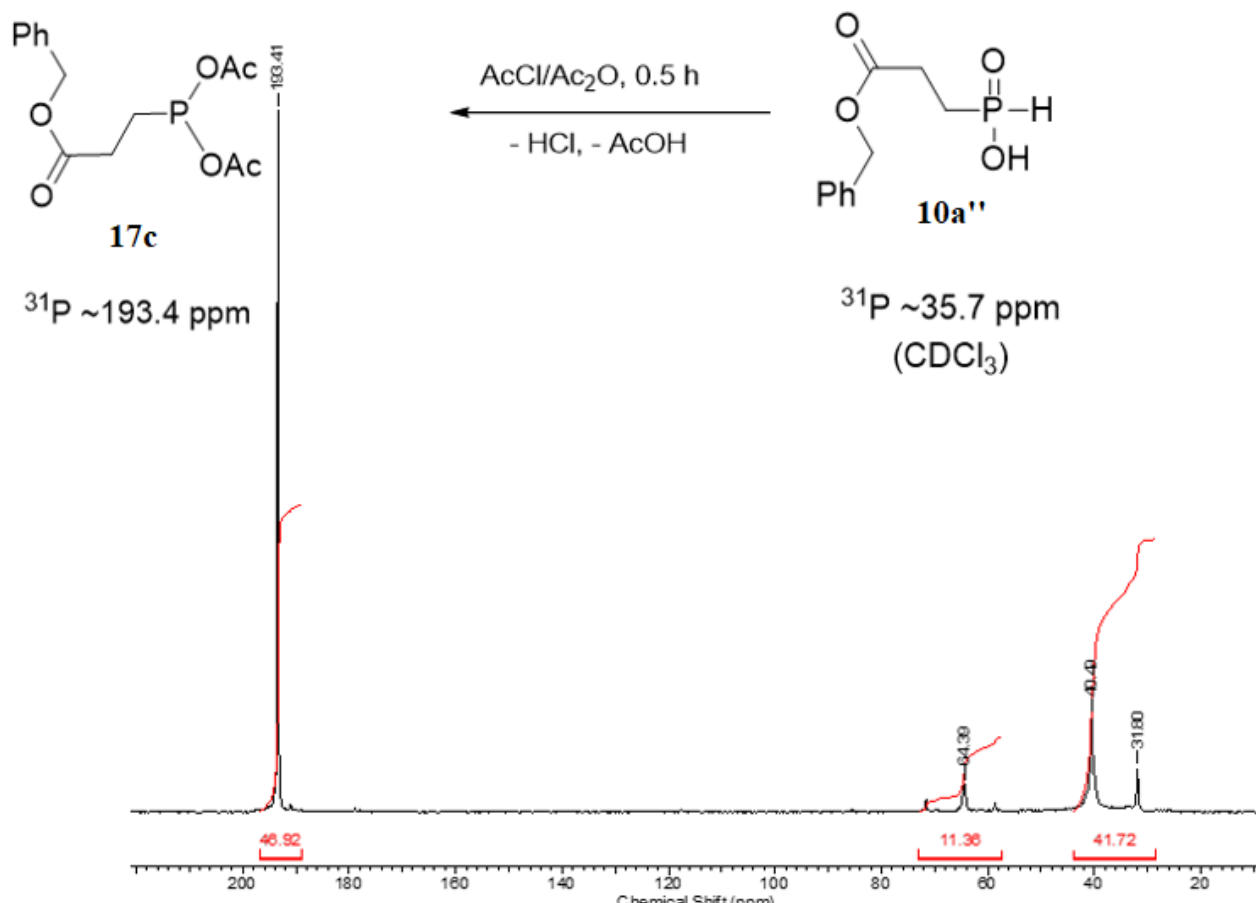


Рисунок 5. ЯМР ^{31}P спектр бензильного эфира фосфонистой пропионовой кислоты в присутствии смеси ацетила хлористого и уксусного ангидрида

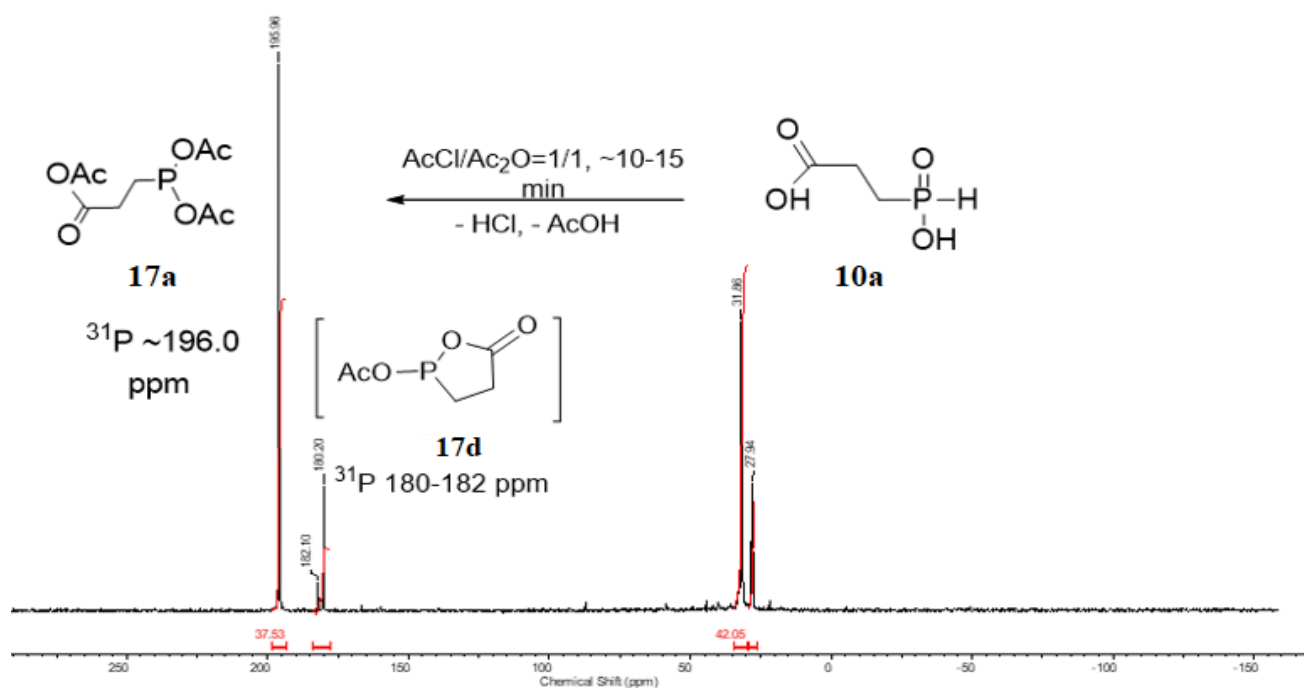


Рисунок 6. ^{31}P ЯМР спектр фосфонистой пропионовой кислоты через 10-15 минут после добавления смеси ацетила хлористого и уксусного ангидрида

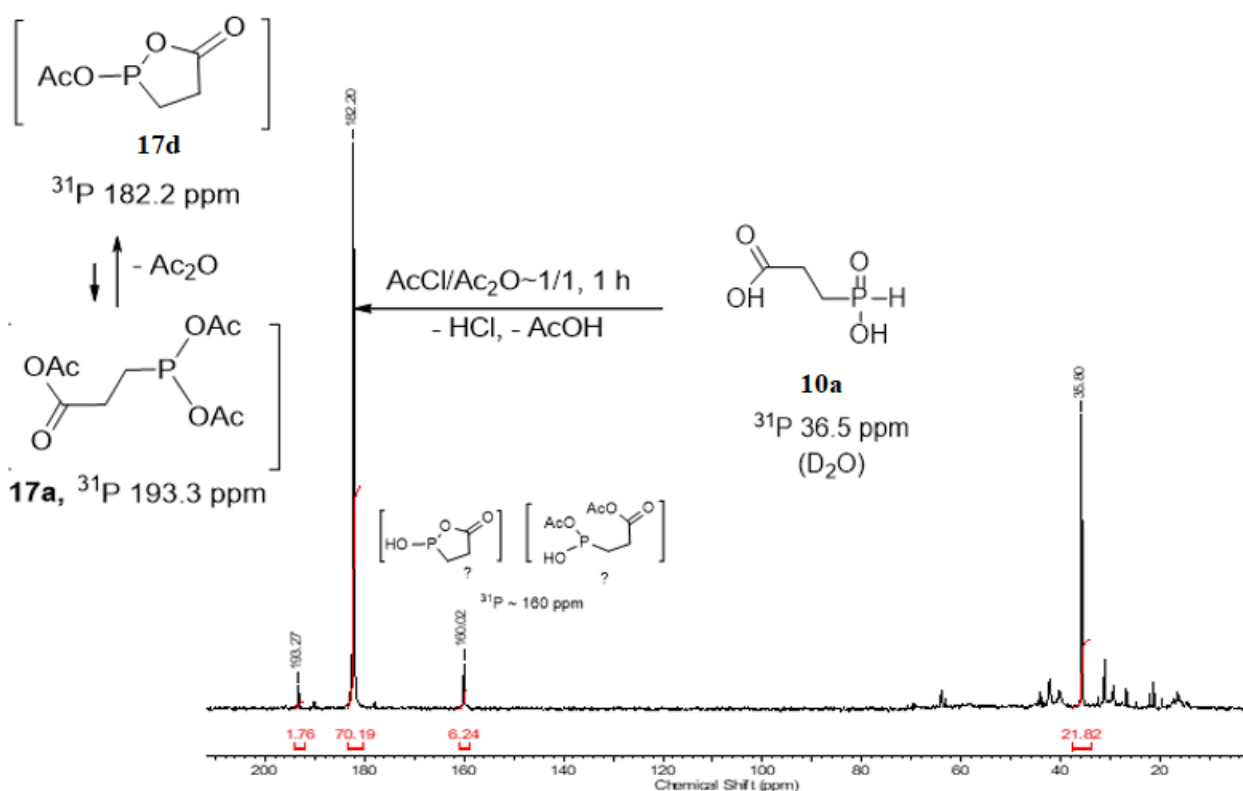


Рисунок 7. ^{31}P ЯМР спектр фосфонистой пропионовой кислоты через час после добавления смеси ацетила хлористого и уксусного ангидрида

Методом ^{31}P ЯМР спектроскопии удалось обнаружить соединения трехкоординированного фосфора, диацетилфосфониты **17 (a,b,c)** (схема 29), с

синглетами в области δ_P 193-196 м.д., генерируемые *in situ* в условиях амидоалкилирования в смеси уксусный ангидрид / ацетилхлорид.

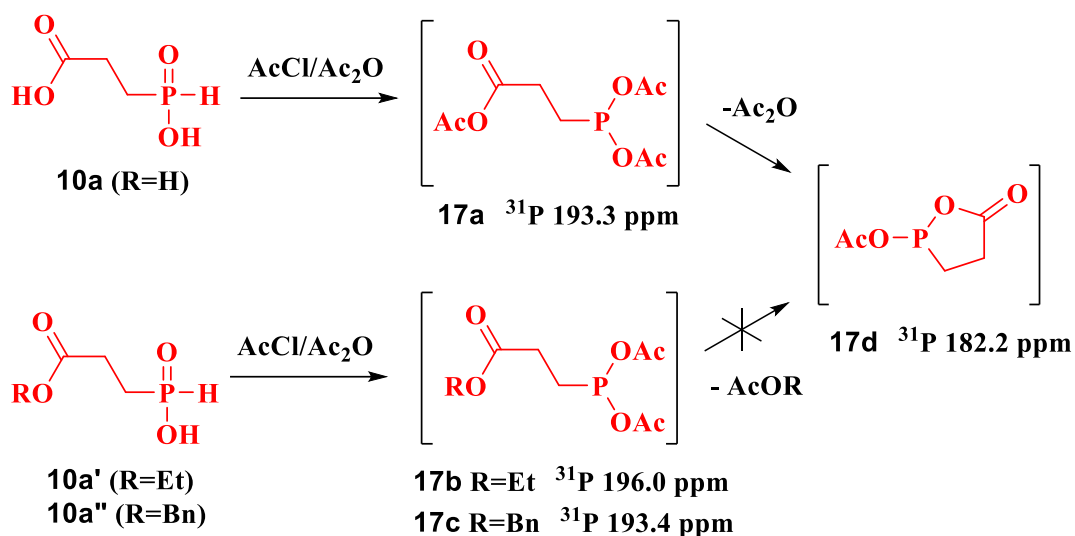


Схема 29. Предполагаемая схема генерирования *in situ* в реакционной среде соединений трехкоординированного фосфора – фосфонитов **17 (a,b,c) и циклического смешанного ангидрида – фосфолактона **17 d****

Только в случае фосфонистой карбоновой кислоты **17a** 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 фосфо-карбонового циклического ангидрида с трехкоординированным атомом фосфора - фосфолактона **17 d** (схема 29, рис.8-9).

Мы предположили, что циклический интермедиат, фосфолактон **17d** может быть ответственным за необычно высокую реакционную способность фосфонистых карбоновых кислот по сравнению с их эфирами в исследуемой реакции. Однако, сравнение строения циклического интермедиата, смешанного фосфо-карбонового ангидрида **17d** со строением интермедиата **17a** линейного строения не дает оснований для объяснения `большей реакционной способности ангидрида **17d** (схема 29), рассматривая ближайшее окружение атома фосфора с двумя электроноакцепторными фрагментами {OC(O)} в обоих случаях.

В литературе имеются данные о положительном влиянии N-алкилоксикарбонильной функции в α-аминофосфорильных соединениях на гидролиз эфирной группы у атома фосфора. Авторы работы объяснили наблюдаемый эффект образованием *in situ* своеобразного P,N-содержащего пятичленного цикла [97]. Кроме того, известно легко протекающее 1,4-циклоприсоединение циклических эфиров трехвалентного фосфора к α,β-непредельным альдегидам и кетонам с образованием спиробициклических производных пятикоординированного фосфора (схема 30) [98-99].

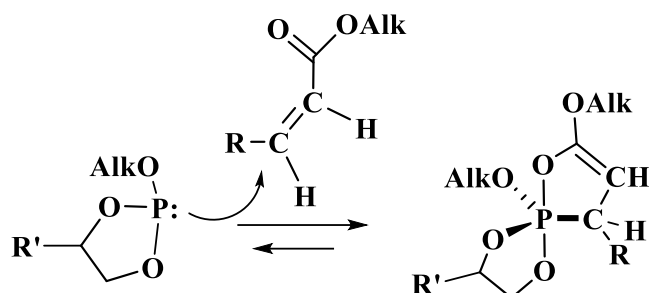


Схема 30. Один из известных в литературе примеров образования спирофосфорана [98,99]

Привлекая эти данные, мы предполагаем, что фосфолактон **31.2** (схема 31), генерируемый в условиях исследуемой реакции из ацетилированного фосфонита **31.1** может взаимодействовать с иминиевым шиффовым катионом **31.3**, генерируемым в реакционных условиях из алкилиденбискарбамата, по схеме известного для соединений трехкоординированного фосфора 1,4-циклоприсоединения с образованием малостабильных спиробициклических соединений пятикоординированного фосфора – спирофосфоранов **31.4**, что способствует наблюдаемому ускорению реакции амидоалкилирования фосфонистых карбоновых кислот.

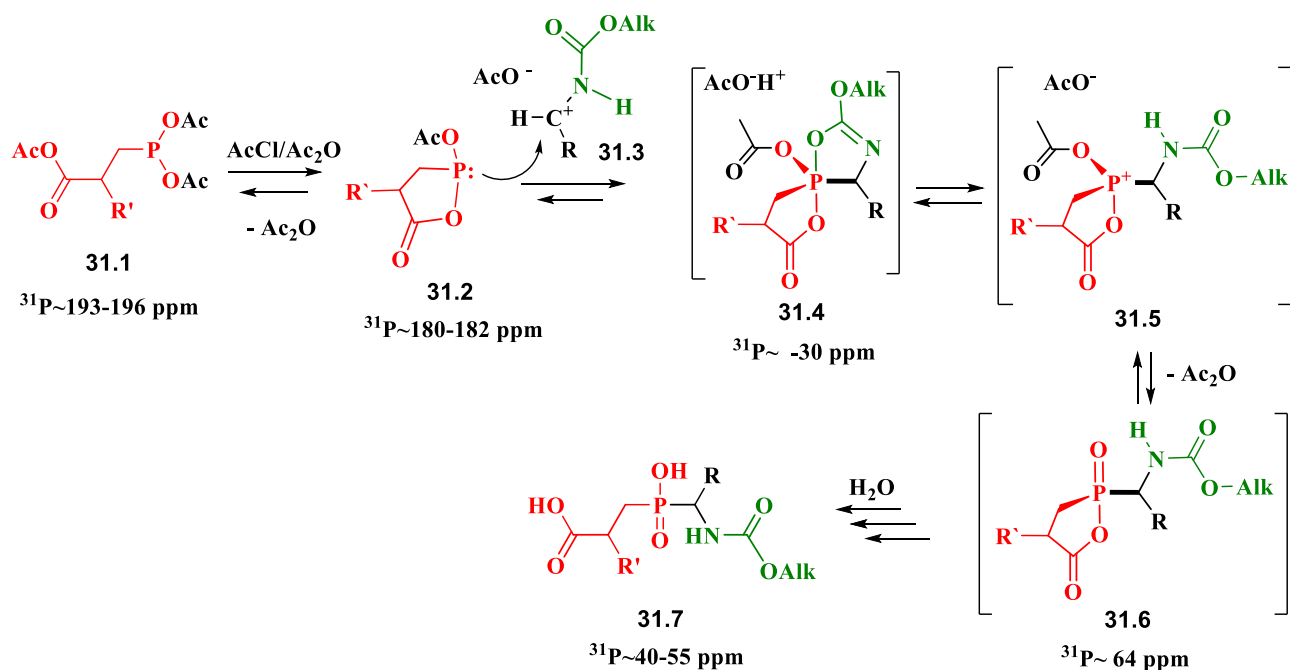


Схема 31. Механизм образования Р-С связи в амидоалкилировании фосфонистых карбоновых кислот

Таким образом, предложена гипотеза генерирования *in situ* спирофосфоранов для объяснения механизма образования фосфор-углеродной связи в исследуемой карбаматной версии реакции Кабачника-Филдса.

На рисунке 8 представлен характерный ^{31}P ЯМР спектр реакционной массы в момент реакции, когда удалось зафиксировать все предполагаемые интермедиаты реакции. На этом спектре мы можем наблюдать группу сигналов, которые соответствуют исходному соединению фосфора – фосфонистой кислоте в интервале 30-40 м.д., и сигналы продукта реакции – фосфинового кислого пептида в районе 50-59 м.д. Нам удалось зафиксировать появление сигналов циклического фосфолактона и фосфонита с трехкоординированным атомом фосфора (188 и 192 м.д.).

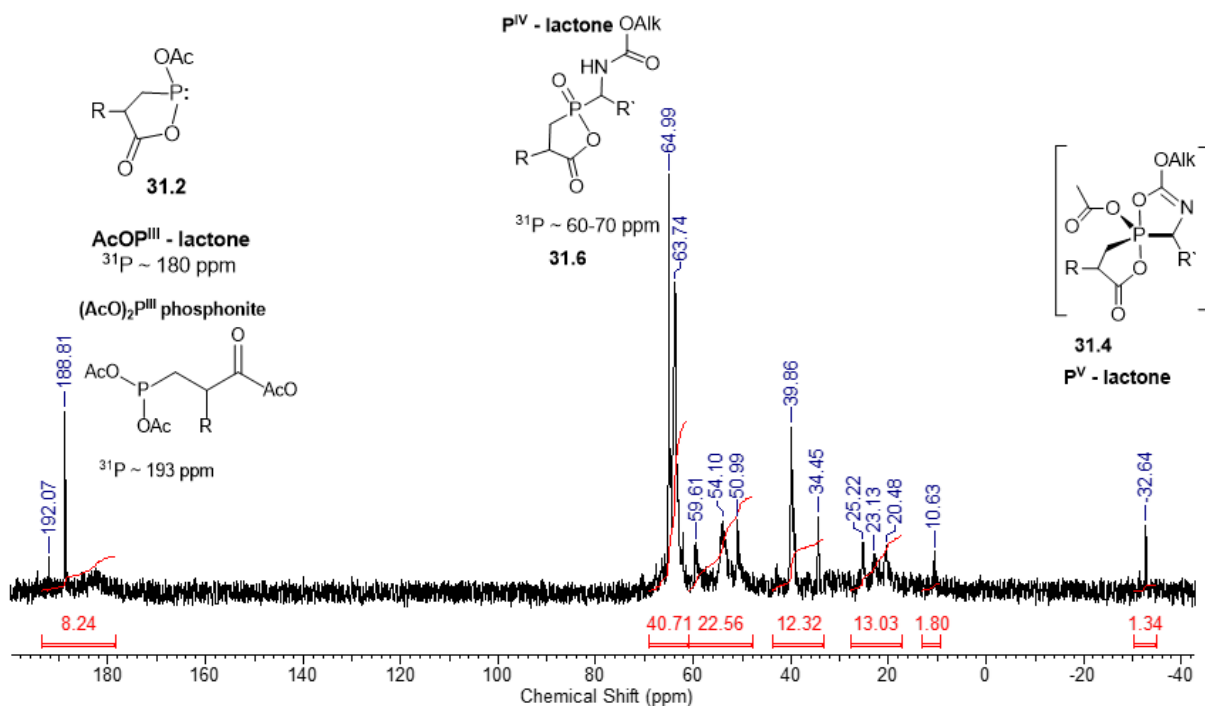


Рисунок 8. Характерный спектр ^{31}P ЯМР реакционной массы с фиксацией интермедиатов реакции амидоалкилирования фосфониных кислот

Также нам удалось зафиксировать сигнал в отрицательной части спектра – в области ~ -30 м.д., характерной для соединений пятикоординированного фосфора, что является положительным аргументом в пользу предложенной спирофосфорановой гипотезы. Кроме того, были замечены сигналы в области 63–64 м.д., появление которых мы связываем с образованием промежуточной циклической структуры **31.6** (рис. 8) при преобразовании фосфорана **31.4** в пептид линейного строения **31.7**.

Мы предположили, что процесс превращения спиробициклического интермедиата, спирофосфорана **31.4** в целевой продукт реакции, фосфиновый пептид **31.7** может претерпевать образование промежуточно образующегося относительно стабильного соединения с сохранением фосфо-карбонового ангидридного цикла **31.6** по причине сохранения дегидратирующих свойств реакционной среды.

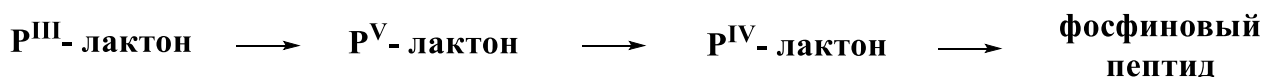
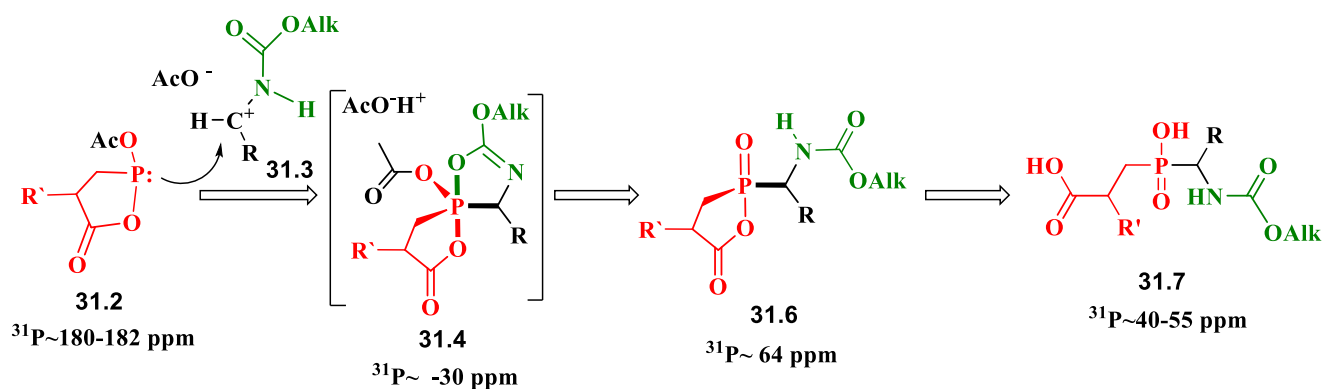


Рисунок 9. Сохранение фосфолактонового структурного мотива в строении интермедиатов амидоалкилирования фосфонистых кислот

Для доказательства образования циклического пятичленного лактонового цикла **31.6** (P^{IV} -lactone) (рис.9) в качестве интермедиата реакции превращения спирофосфорана в линейный пептид **31.5**, мы предположили, что процесс может быть обратимым в определенных условиях, и воздействие на фосфиновый пептид дегидратирующего агента может привести к образованию относительно стабильного продукта с вероятным сохранением смешанного фосфо-карбонового ангидридного (фосфолактонового) цикла (схема 32). Таким образом, дегидратирующий агент может обеспечивать эффективную активацию карбоновой функции для перспективного последующего присоединения аминокислотной или амино-компоненты (схема 32). Этот момент является важным для перспективного развития исследований в плане последующего пептидного синтеза, например, как в схеме 32.

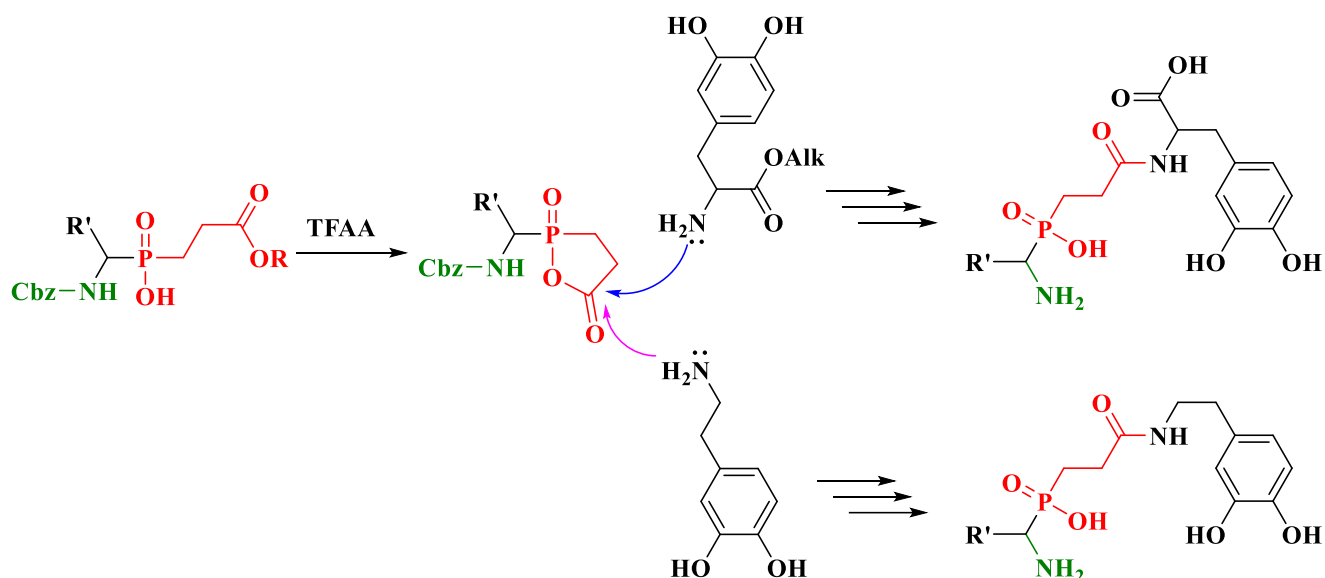


Схема 32. Активация карбоновой функции для потенциального последующего пептидного построения

Для доказательства обратимости процесса были проведены ЯМР исследования, которые заключаются в регистрации процесса дегидратации пептидов. В качестве дегидратирующих агентов мы использовали трифторуксусный ангидрид TFAA и дициклогексилкарбодиимид DCC.

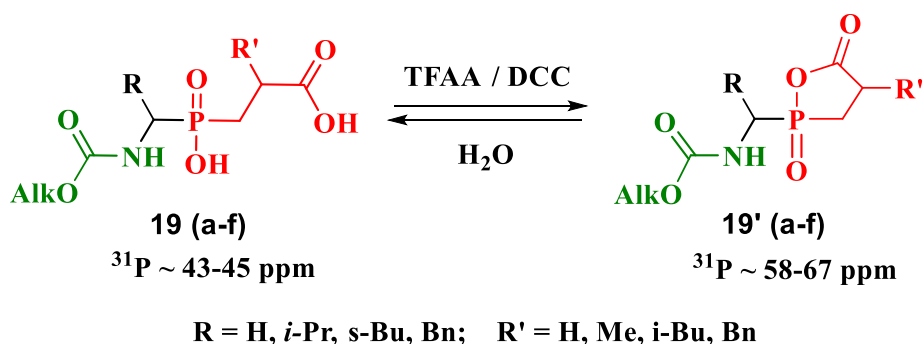


Схема 33. Обратимый характер превращения: фосфиновый пептид - фосфолактон

Мы обнаружили, что при использовании DCC в качестве дегидратирующего агента получается смесь фосфолактона **19'** и линейной формы псевдопептида **19**. В то время как использование TFAA обеспечило значительно более успешные результаты, и пептиды нацело преобразовались в циклическую форму. При этом добавление воды в реакционную сферу смещает равновесие в сторону линейной формы пептида (схема 33).

Нам удалось обнаружить, что добавление трифторуксусного ангидрида (ТФАА) к суспензии кислых пептидов **19 (a-f)** в CDCl_3 также улучшает растворение, что можно объяснить образованием более растворимых нейтральных фосфолактонов **19' (a-f)** с сигналами в спектре ЯМР ^{31}P при 60 м.д. и более. В связи с преимуществом трифторуксусного ангидрида (ТФАА) по сравнению с дициклогесилкарбодиимидом (DCC) – мы провели более полное ЯМР исследование на ядрах углерода $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ фосфиновых изостеров дипептидных составляющих бета-амилоида **19(a-f)**.

В этом плане фосфиновый Cbz-Gly-[P]-Gly-пептид **19e**, который не содержит хиральные углеродные центры, является наиболее простым объектом для изучения структуры образующегося циклического ангидрида **19'e** с хиральным атомом фосфора. С помощью ЯМР спектроскопии на ядрах ^1H , ^{13}C , ^{31}P и привлечением методов двумерного ЯМР было убедительно доказано образование фосфинового лактона **19'e**.

При образовании фосфинового лактона наиболее характерные изменения наблюдаются у углерода PCH_2 , непосредственно связанного с фосфором, а также углерода $\text{C}(\text{O})$ карбоновой функции. Сравнительно высокое значение константы спин-спинового взаимодействия с атомом фосфора $^{2+3}J_{\text{PC}} = 11,8 \div 17,6$ Гц наблюдается для всей серии *in situ* генерируемых фосфолактонов **19' (a-f)** (табл. 3). Мы полагаем, что это связано с аддитивным взаимодействием ядер фосфора и углерода $\{\text{POC}(\text{O})\}$ -фрагмента как через 2 связи, так и через 3 связи с константой $^{2+3}J_{\text{PC}}$. Это может проявиться только в циклической структуре.

Обнаружено, что химические сдвиги ЯМР ^{13}C атомов углерода, непосредственно связанных с атомом фосфора (фрагмент PCH_2 С-концевой части пептида), заметно не изменяются при образовании фосфолактонного цикла, но при этом существенно уменьшаются константы спин-спинового взаимодействия с ядром атома фосфора ($^1J_{\text{PC}}$). (Таблица 3). В ряду фосфиновых пептидов **19 (a-f)** значения константы $^1J_{\text{PC}}$ находятся в диапазоне 85-93 Гц (табл. 3). Для генерируемых *in situ* фосфолактонов **19'(a-f)** эта константа фиксируется в

диапазоне 61–73 Гц (табл. 3). Столь заметное уменьшение константы $^1J_{PC\alpha}$ может служить своеобразным индикатором наличия фосфолактонного цикла.

Таким образом, данные табл. 3 подтверждают образование фосфолактона **19'** в результате дегидратирующего воздействия TFAA на фосфиновый пептид **19**.

Таблица 3. Результаты исследования реакции циклизации псевдопептидов, данные фрагментов ^{13}C ЯМР спектров

№	Фосфиновый пептид 19			Фосфиновый лактон 19'			
	COO	PCH ₂		POC=O		PCH ₂	
	s, δ_C , ppm	δ_C , ppm	d, $^1J_{PC}$ Гц	δ_C , ppm	d, $^{2+3}J_{PC\Gamma C}$	δ_C , ppm	d, $^1J_{PC}$ Гц
(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

Кроме того, образование фосфолактона сопровождается усложнением спектров ЯМР 1H , ^{13}C , ^{31}P , что можно объяснить появлением фрагмента P(O)OC(O) с хиральным центром при атоме фосфора 1,2-оксафосфоланового цикла, придающего молекуле фосфинового лактона **19'** стереохимическую жесткость.

Можно наблюдать образование смешанного ангидрида (фосфолактона), регистрируя изменения в углеродных спектрах псевдо-глицил-лейцина (Gly-[P]-Leu) (рис. 10-11), где наблюдается появление двух дублетов в области 170-171 м.д.,

которые мы относим к углероду лактонового цикла **19d'**, в то время как сигнал 180-181 м.д., характерный для углерода карбоксильной группы уменьшается (рис. 11).

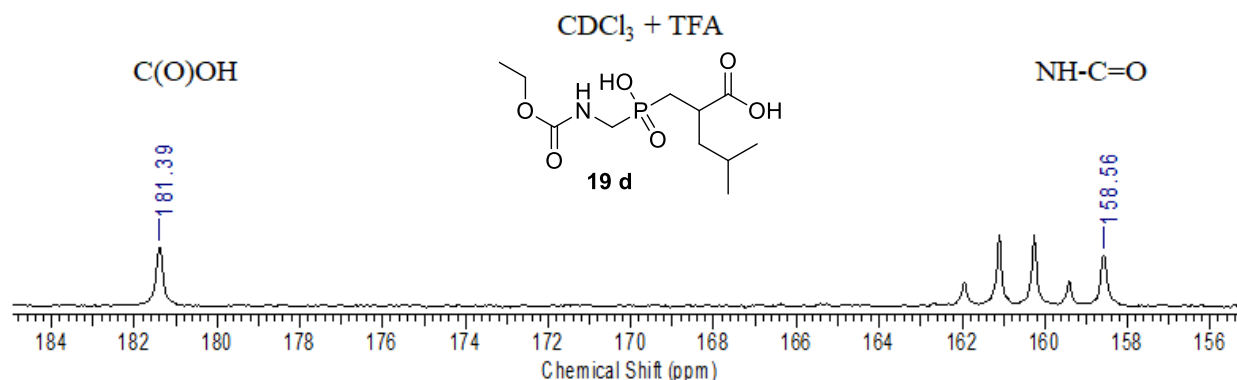


Рисунок 10. Фрагмент $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР спектра исходного псевдо-глицил-лейцина **19d**

Таким образом, сравнение фрагментов $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР спектров Gly-[P]-Leu (рис. 10 и 11), показывает, что удалось зарегистрировать одновременное наличие линейной формы пептида и циклической формы смешанного ангидрида (фосфолактона) (рис.11).

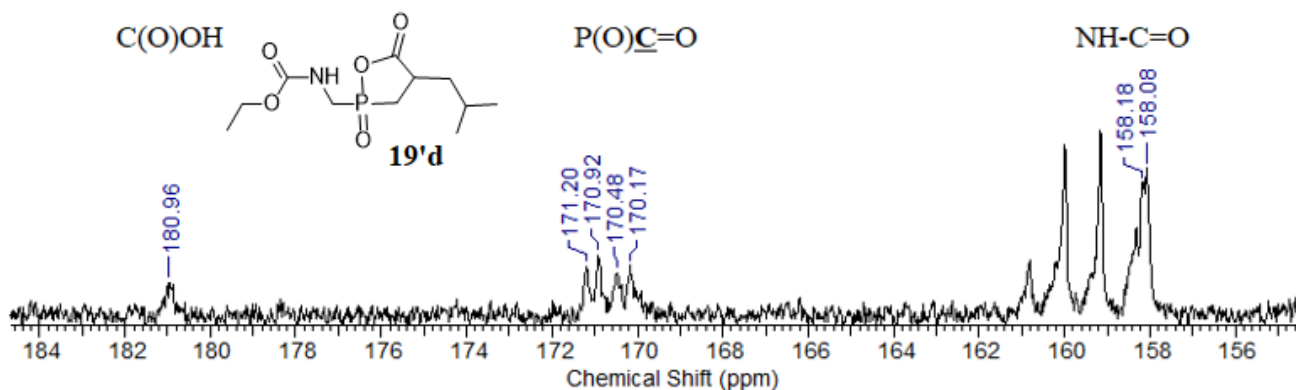


Рисунок 11. Фрагмент $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР спектра ($\text{CDCl}_3 + \text{TFAA}$) генерируемого *in situ* фосфолактона **19d'** в результате дегидратации псевдо-глицил-лейцина **19d**

Дальнейшее добавление TFAA приводит к окончательному исчезновению сигнала углерода карбоксильной группы, что наглядно показано на рис. 12 и 13 для фрагментов $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР спектров псевдо-фенилаланил-аланина **19b**, а также данными таблицы 3 для всего ряда исследуемых фосфиновых пептидов.

Сигнал углерода NC=O защитной группы при атоме азота обычно с образованием фосфолактонового цикла заметно 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.

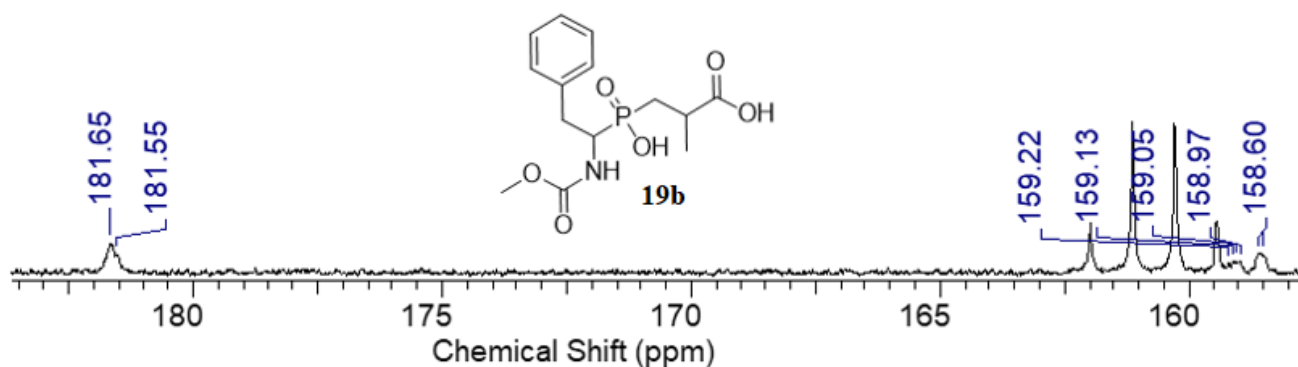


Рисунок 12. Фрагмент $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР спектра ($\text{CDCl}_3 + \text{TFA}$) исходного псевдо-фенилаланил-аланина **19b**

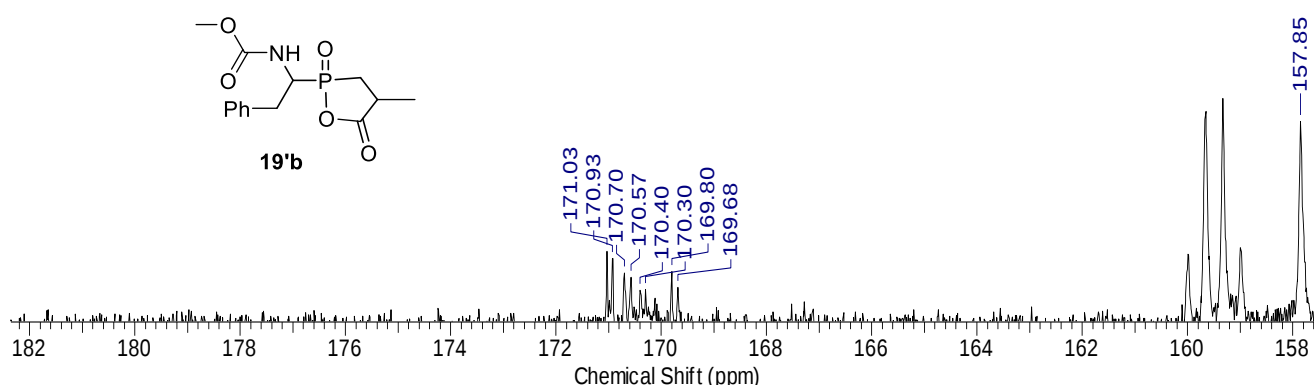


Рисунок 13. Фрагмент $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР спектра ($\text{CDCl}_3 + \text{TFAA}$) генерируемого *in situ* фосфолактона **19'b** в результате дегидратации псевдо-фенилаланил-аланина **19b**

В этой главе приведены фрагменты спектров, наиболее наглядно показывающие образование лактонов в результате дегидратации фосфиновых пептидов. Фрагменты углеродных спектров остальных соединений, представленных в таблице 3 приведены в экспериментальной части (глава 3.5 Исследование обратимого превращения фосфиновый пептид – фосфолактон).

Важным результатом этого эксперимента является возможность активации карбоновой функции фосфинового пептида для последующего образования

классической пептидной связи и образования фосфиновых трипептидов путем нуклеофильной атаки атома азота третьей аминокислотной компоненты на электрофильный карбоновый углерод лактонового цикла.

Таким образом, этот результат может быть основой для последующего развития синтеза и исследования свойств коротких фосфиновых три- и тетрапептидов.

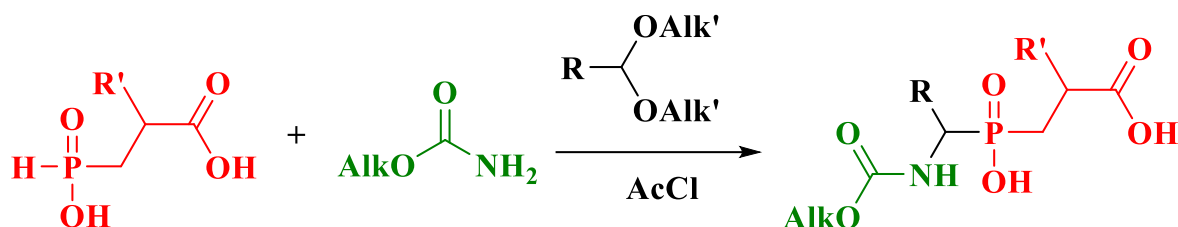
2.4 Ацетали в A+N+PC процедуре синтеза фосфиновых пептидов

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 PC компоненты при образовании интермедиатов с трехкоординированным фосфором образуется сухой хлористый водород. Последний участвует в эффективном генерировании электрофильной компоненты синтеза, иминиевого катиона, и может участвовать в генерировании альдегидов из соответствующих ацеталей. Это позволяет использовать некоторые альдегиды, стабильные только в виде ацеталей, что открывает возможность получения некоторых труднодоступных фосфиновых пептидов, например, аспартил-содержащих пептидов.

Мы предлагаем использование ацеталей в трехкомпонентной A+N+PC процедуре соответствии со схемой 34. В этой реакции были исследованы диэтилацеталь уксусного альдегида и диметилацеталь фенилуksусного альдегида. Надо отметить, что уксусный и фенилуksусный альдегиды являются относительно неудобными карбонильными компонентами при непосредственном их введении в реакционную сферу, вероятно, по причине побочных процессов, обусловленных повышенной C-H кислотностью, а также летучестью (уксусный альдегид).

Мы нашли, что введение этих альдегидов в реакционную сферу в виде ацеталей дает удовлетворительные результаты.

Эти данные позволили использовать в исследуемой реакции этоксикарбонилуксусный альдегид в виде диэтилацетала, что дает возможность получить ранее неизвестные производные аспартил-содержащих фосфиновых пептидов ($R = \text{EtOC(O)CH}_2$) (схема 34).



$R = \text{Me}, \text{PhCH}_2, \text{EtOC(O)CH}_2$; $R' = \text{H}, \text{Me}, i\text{-Bu}, \text{PhCH}_2, \text{CH}_2\text{COOH}, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$

$\text{Alk} = \text{Me}, \text{Et}, \text{PhCH}_2$; $\text{Alk}' = \text{Me}, \text{Et}$

Схема 34. Ацетали в N+PC процедуре синтеза фосфиновых пептидов

Этот подход позволяет использовать некоторые малостабильные альдегиды, что открывает возможность относительно легкой структурной модификации *N*-терминальной компоненты ранее труднодоступных фосфиновых пептидов.

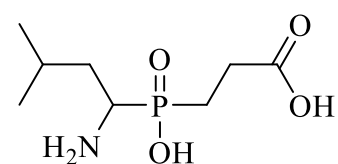
Таким образом, развитие N+PC методологии синтеза фосфиновых кислых пептидов позволило обнаружить ряд положительных моментов по сравнению с более изученной NP+C методологией синтеза и открывает возможности для синтеза новых фосфиновых пептидов и поиска эффективных ингибиторов Zn-металлопротеиназ.

2.5 Исследование протеолиза семакса в присутствии лейцинаминопептидазы и фосфиновых пептидов

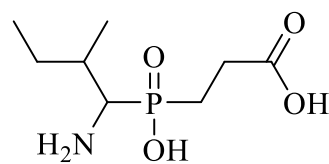
Для изучения ингибирующей активности ряда фосфиновых псевдодипептидов нами было проведено исследование, в котором в качестве модельного образца мы использовали известный лекарственный препарат – «Семакс», который обладает ноотропными свойствами. Однако «Семакс» подвергается воздействию различных пептидаз, в том числе лейцинаминопептидазы, что заметно снижает его физиологическую активность [39-40].

Поэтому мы провели серию экспериментов, результаты которых позволили нам сделать выводы об устойчивости семакса в смеси с фосфиновыми пептидами в присутствии лейцинаминопептидазы.

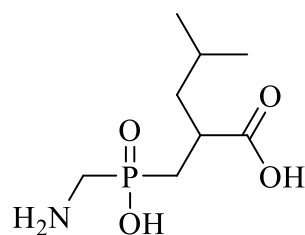
В качестве объектов исследования потенциальных ингибиторов лейцинаминопептидазы были взяты свободные фосфиновые дипептиды – фосфоизостеры IGL (изолейцил-глицил-лейцина), трипептидного (Abeta 32-34) компонента бета-амилоида, и его структурные аналоги: псевдо-изолейцин-глицин **4a** (Abeta 32-33) и его структурный аналог псевдо-лейцил-глицин **4a**, а также псевдо-глицил-лейцин **11** (Abeta 33-34) и псевдо-валил-глицин **15'** (Abeta 36-37).



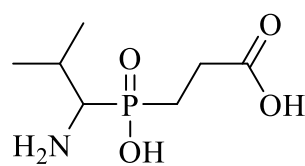
4a H₂N-Leu-[P]-Gly-OH



4b H₂N-Ile-[P]-Gly-OH



11 H₂N-Gly-[P]-Leu-OH



15' H₂N-Val-[P]-Gly-OH

Рисунок 14. Фосфиновые аналоги дипептидных составляющих бета-амилоида

Исследуемые нами свободные пептиды были получены путем гидролиза соответствующих N-защищенных фосфиновых дипептидов **2a**, **3a**, **11e**, **13** в 6N соляной кислоте. Последующая обработка избытком окиси пропилена в водном спирте приводит к получению свободных фосфиновых кислых пептидов (схема 35).

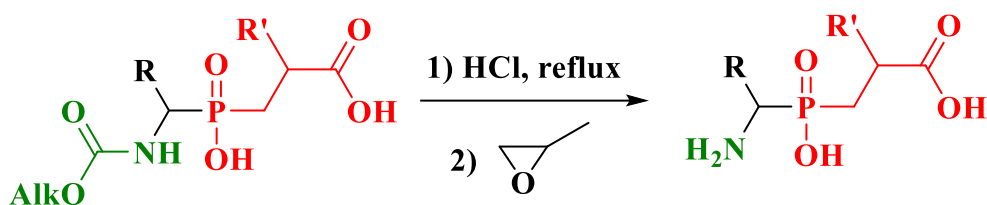


Схема 35. Общая схема гидролиза N-защищенных фосфиновых пептидов

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

На графике, изображенном на рисунке 15, соотношение Семакса к фосфиновым кислым пептидам составляет 1:1. Мы можем наблюдать, что с течением времени концентрация Семакса в присутствии псевдо-пептидов снижается незначительно. В то время как основная часть Семакса без добавления фосфиновых пептидов (кривая черного цвета) была гидролизована уже через 30 минут после начала эксперимента (рис. 15).

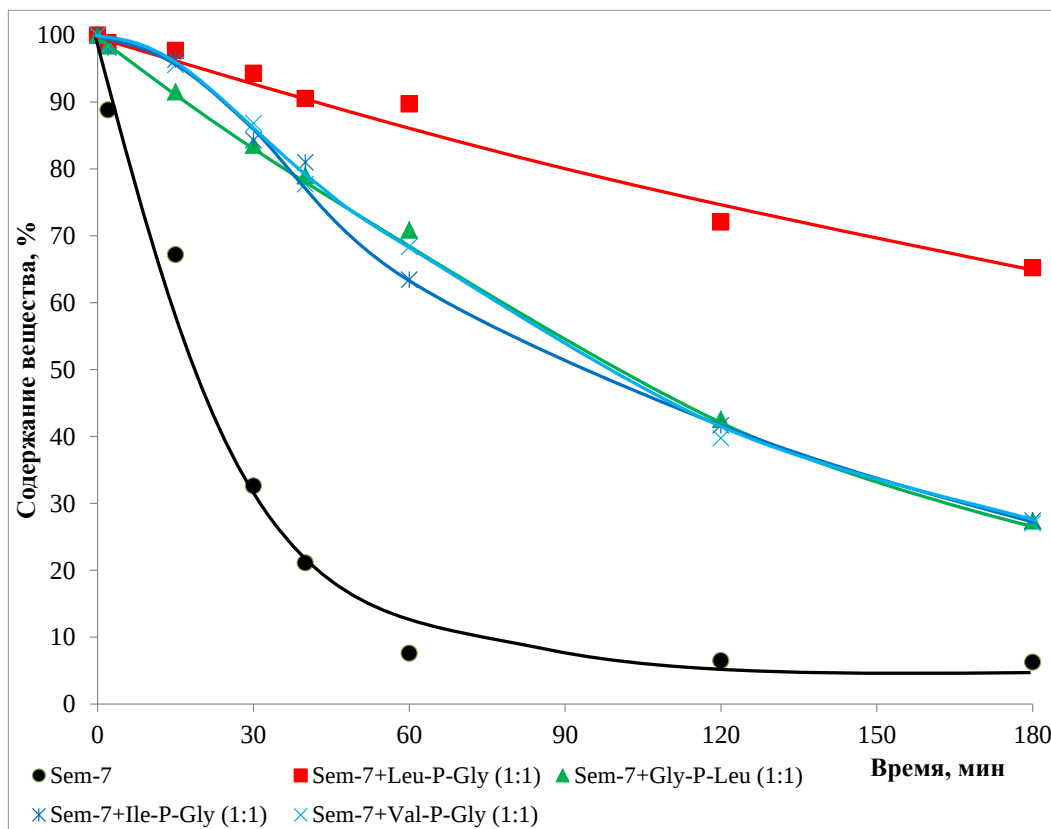


Рисунок 15. График устойчивости Семакса в присутствии лейцинаминопептидазы при соотношении Семакс-пептиды 1:1

Этот эффект, по-видимому, связан с ингибированием лейцинаминопептидазы фосфиновыми псевдопептидами, что привело 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 (4a, 4b и 11), изостеров и аналогов IGL, почти уравнивается (рис. 16).

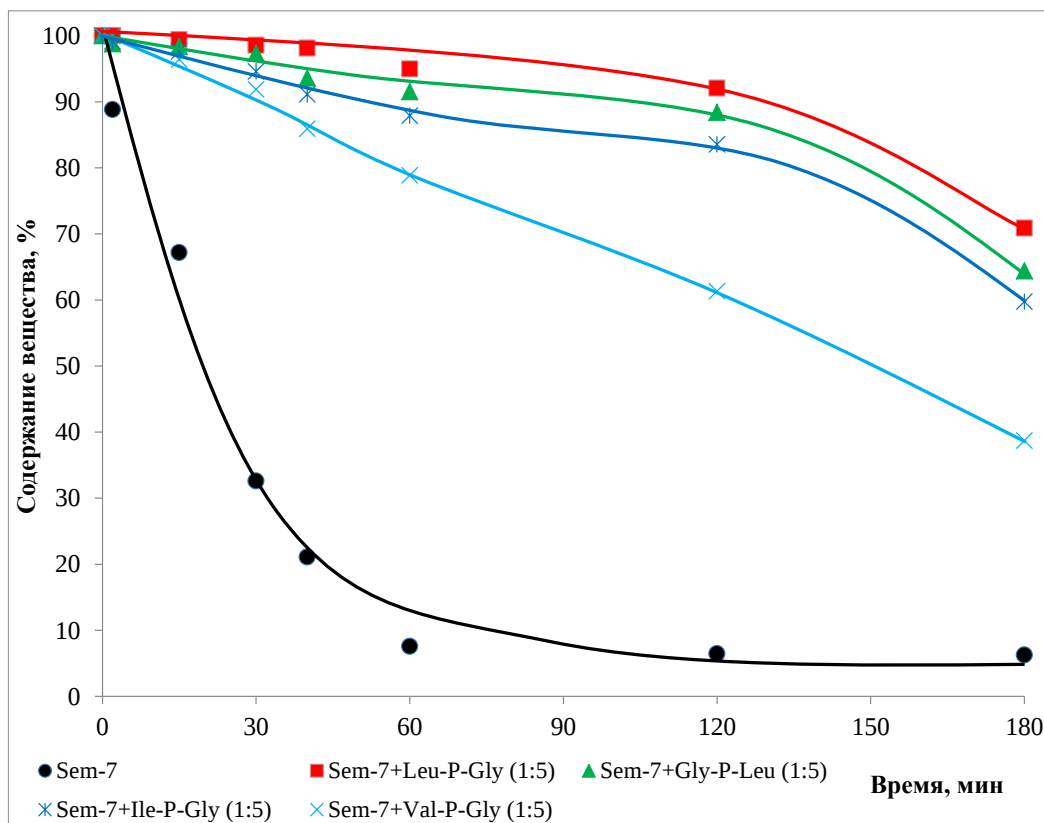


Рисунок 16. Данные устойчивости Семакса в присутствии лейцинаминопептидазы при соотношении Семакс-пептиды 1:5

Таким образом, есть основание считать, что синтезированные фосфиновые пептиды могут значительно замедлять гидролиз Семакса и, возможно, других пептидов за счет ингибирования лейцинаминопептидазы и, возможно, других аминопептидаз, и, следовательно, эти соединения имеют перспективы для контроля ферментативной активности в живых организмах.

ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.

Общая экспериментальная часть

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 (ИФАВ РАН), а также на приборе Advance 500 аналитического центра ФИЦ проблем химической физики и медицинской химии РАН. Химические сдвиги приведены в миллионных долях: для ядер ^1H относительно ТМС как внутреннего стандарта; для ядер ^{31}P относительно 85%-ной H_3PO_4 как внешнего стандарта. Во всех случаях слабопольные сдвиги считались положительными. Константы спин-спинового взаимодействия выражены в герцах (Гц).

ТСХ-анализ индивидуальных соединений и реакционных масс проводили на пластинках Silufol, на стеклянных пластинках фирмы Merck с толщиной слоя силикагеля UV-254 0.2 мм, а также на пластинках Alufol (Kavalier) (нейтральная окись алюминия на алюминиевой фольге) с проявлением пятен в парах йода или в УФ-свете, или с помощью раствора нингидрина для анализа аминокислот.

Для ионообменной хроматографии использовали катионит Purolite C100E (H^+) или Dowex WX (H^+). Температуры плавления определяли в блоке в открытом капилляре. Хроматографический анализ проводили на LC/MSD системе Agilent 1100 серии с DAD, ELSD и одноквадрупольным масс-селективным детектором с ионизацией электроспреем.

Масс-спектры высокого разрешения (HRMS) были получены на Orbitrap Exactive (Termofisher Scientific, Bremen) масс-спектрометре (НМИЦ эндокринологии Минздрава России).

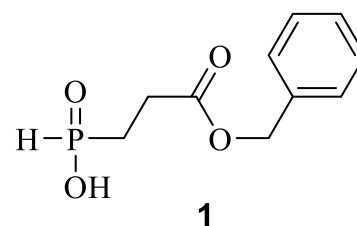
Методики синтеза и спектральные данные.

3.1 Фосфиновые изостеры лейцил- и изолейцилглицинов

(3-Бензилокси-3-оксопропил)фосфонистая кислота (1) получена присоединением генерированного *in situ* из гипофосфита аммония бис-(триметилсилил)гипофосфита к бензиловому эфиру акриловой кислоты [67-69].

Выход 67%, температура плавления 36-37°C.

Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м. д.: 1.95–2.20 м (2H, PCH_2), 2.55–2.75 м (2H, $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 5.12 с (2H, CH_2O), 7.17 д (1H, PH , $^1J_{\text{PH}} = 561.2$ Гц), 7.34 с 7.20–7.45 м (5H, Ph), 11.71 уш. с (1H, POOH).



Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3), δC , м. д.: 24.12 д ($^1J_{\text{PC}} = 95.5$ Гц), 25.83 д ($^2J_{\text{PC}} = 2.2$ Гц), 66.53, 127.99, 128.09, 128.32, 135.29, 171.48 д ($^3J_{\text{PC}} = 13.3$ Гц).

Спектр ЯМР ^{31}P (CDCl_3): δP 35.7 м. д.

{1-[(Алкоксикарбонил)амино]алкил}(3-бензилокси-3-оксопропил) фосфиновые кислоты (общая методика)

К охлажденному до $\sim 5^\circ\text{C}$ раствору 10 ммоль кислоты **1** и 10 ммоль алкилкарбамата в 10 мл реакционной среды [AcCl , $\text{AcCl}-\text{AcOH}$, 9:1 (мл), или $\text{AcCl}-\text{PhMe}$, 1:1 (мл)] добавляли по каплям 11–12 ммоль альдегида **22.1**, **22.2**. Образовавшуюся смесь перемешивали при саморазогревании до комнатной температуры и затем несколько часов до исчезновения сигнала ядра фосфора исходной фосфонистой кислоты в спектре ЯМР ^{31}P реакционной смеси. Образовавшуюся массу без нагревания упаривали с толуолом (2×20 мл) и хлороформом (2×20 мл), остаток растворяли в 20 мл хлороформа и промывали ледяной водой (2×5 мл). Органическую фазу сушили сульфатом натрия и упаривали в вакууме. Остаток кристаллизовался после обработки диэтиловым или

петролеинным эфиром (40/70). Фосфиновые кислоты **2a**, **2b**, **3a**, **3b** выделяли после дополнительной кристаллизации из диэтилового эфира.

По данной методике получены:

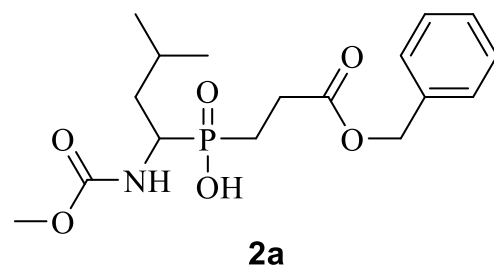
(3-Бензилокси-3-оксопропил){3-метил-1-[(метоксикарбонил)амино]бутил}фосфиновая кислота (2a**)**

Выход 57%, температура плавления 153–154°C

R_f ~0.20 [CHCl₃–Me₂C(O), 5:1].

Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃), δ, м. д.: 0.89 д (3H, CH₃, ³J_{HH} = 5.3 Гц), 0.93 д (3H, CH₃, ³J_{HH} = 5.9 Гц), 1.40–

1.80 м (3H, CH₂ + CH), 1.95–2.20 м (2H, PCH₂), 2.55–2.80 м [2H, CH₂C(O)], 3.66 с (3H, CH₃O), 3.90–4.10 м (1H, PCH), 5.04 д (1H, NH, ³J_{HH} = 10 Гц), 5.11 уш. с (2H, CH₂O), 5.86 уш. с (1H, POOH), 7.33 уш. с (5H, Ph).



Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃ + 1–2 капли TFA), δ, м. д.: 0.88 д (3H, CH₃, ³J_{HH} = 6.5 Гц), 0.96 д (3H, CH₃, ³J_{HH} = 6.5 Гц), 1.25–1.85 м (3H, CH₂ + CH), 2.24 д. т (2H, PCH₂, ²J_{PH} = 11.8, ³J_{HH} = 7.1 Гц), 2.86 д. т [2H, CH₂C(O), ²J_{PH} = 15.9, ³J_{HH} = 7.1 Гц], 3.74 с и 3.81* с (3H, CH₃O), 4.05–4.30 м (1H, PCH), 5.18 уш. с (2H, CH₂O), 5.70 д (NH, ³J_{HH} = 9.4 Гц), 6.41* д (NH, ³J_{HH} = 11.2 Гц), 7.25–7.50 уш. с (5H, Ph).

Здесь и далее звездочкой обозначены сигналы минорной формы – диастереомера или конформера.

Спектр ЯМР ¹H (DMCO-*d*₆), δ, м. д.: 0.80 д (3H, CH₃, ³J_{HH} = 6.4 Гц), 0.87 д (3H, CH₃, ³J_{HH} = 6.4 Гц), 1.25–1.65 м (3H, CH₂ + CH), 1.82 д. т (2H, PCH₂, ²J_{PH} = 12.2, ³J_{HH} = 8.3 Гц), 2.40–2.65 м [2H, CH₂C(O)], 3.51 с (3H, CH₃O), 3.55–3.80 м (1H, PCH), 5.09 уш. с (2H, CH₂O), 7.35 уш. с (5H, Ph).

Спектр ЯМР ¹³C (CDCl₃), δС, м. д.: 11.45* и 11.59, 14.88, 16.52 д (³J_{PC} = 9.6 Гц), 22.66 д (¹J_{PC} = 91.8 Гц) и 22.94*д (¹J_{PC} = 93.3 Гц), 24.63, 26.31, 27.40 д (²J_{PC} = 11.8 Гц),

34.03 и 34.92*, 51.69 д ($^1J_{PC} = 101.7$ Гц) и 54.03* ($^1J_{PC} = 98.4$ Гц), 66.83, 128.22, 128.28, 128.51, 135.52, 157.14 д ($^3J_{PC} = 5.5$ Гц), 172.07 д ($^3J_{PC} = 15.1$ Гц).

Спектр ^{31}P ЯМР (CDCl_3), δP , м. д.: 54.6* (11%), 56.1 (89%).

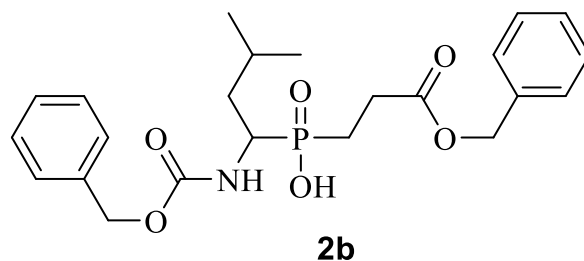
Спектр ^{31}P ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$), δ , м. д.: 46.7* (7%), 47.2 (93%).

Масс-спектр (ESI), m/z : 372.5 $[\text{M} + \text{H}^+]$. Найдено, %: С 54.80; Н 7.18. $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{NO}_6\text{P}$.
Вычислено, %: С 54.98; Н 7.06. $M_{\text{выч}}$ 371.4

(3-Бензилокси-3-оксопропил){1-[(бензилоксикарбонил)амино]-3-метилбутил}фосфиновая кислота (2b)

Выход 64%, температура плавления 105–107°C

Rf 0.25 (CHCl_3 –MeOH–AcOH, 10:2:1).



Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м. д.: 0.88 д (3H, CH_3 , $^3J_{\text{HH}} = 6.1$ Гц), 0.91 д (3H, CH_3 , $^3J_{\text{HH}} = 5.6$ Гц), 1.40–1.80 м (3H, $\text{CH}_2 + \text{CH}$), 1.90–2.20 м (2H, PCH_2), 2.50–2.75 м [2H, $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$], 3.95–4.15 м (1H, PCH), 4.95–5.25 уш. м (5H, $\text{NH} + 2\text{CH}_2\text{O}$), 7.15–7.45 м (10H, 2Ph), 10.26 уш. с (1H, POOH).

Спектр ЯМР ^1H ($\text{CDCl}_3 + 1$ –2 капли CF_3COOH), δ , м. д.: 0.80* д (3H, CH_3 , $^3J_{\text{HH}} = 6.7$ Гц), ~0.86* д (сигнал дублета второй группы CH_3 минорной формы перекрыт сигналами двух групп CH_3 основной формы), 0.88 д (3H, CH_3 , $^3J_{\text{HH}} = 6.7$ Гц), 0.95 д (3H, CH_3 , $^3J_{\text{HH}} = 6.7$ Гц), 1.45–1.85 м (3H, $\text{CH}_2 + \text{CH}$), 2.05–2.30 м (2H, PCH_2), 2.65–2.92 м [2H, $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$], 4.10–4.30 м (1H, PCH), 5.05–5.25 м (4H, $2\text{CH}_2\text{O}$), 5.72 д и 6.47* д (1H, NH , $^3J_{\text{HH}} = 9.7$), 7.20–7.50 м (10H, 2Ph).

Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3), δC , м. д.: 20.64*и 21.00, 23.40, 23.45 д ($^1J_{PC} = 97.0$ Гц), 24.19, 26.29, 36.12 и 36.76, 47.68 д ($^1J_{PC} = 106.5$ Гц) и 48.77 д ($^1J_{PC} = 105.0$ Гц), 67.24, 66.73 и 67.67*, 127.97, 128.21, 128.50, 135.61, 136.12, 156.08 д ($^3J_{PC} = 3.7$ Гц), 171.94 д ($^3J_{PC} = 15.7$ Гц).

Спектр ^{31}P ЯМР (CDCl_3), δP , м. д.: 53.8* (7%), 55.8 (93%).

Масс-спектр (ESI), m/z : 448.6 $[M + H^+]$. Найдено, %: P 7.18. $C_{23}H_{30}NO_6P$.
Вычислено, %: P 6.92. $M_{\text{выч}}$ 447.5.

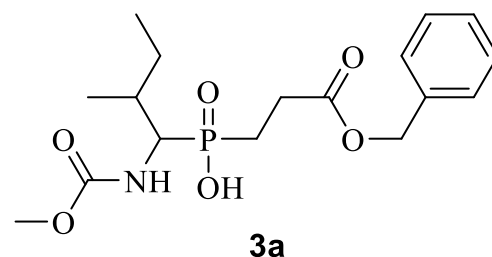
(3-Бензилокси-3-оксопропил)-{2-метил-1-[(метоксикарбонил)амино]бутил}фосфиновая кислота (3a)

Выход 53%, температура плавления 128–130°C

$R_f \sim 0.20$ [$CHCl_3$ – $Me_2C(O)$, 5:1].

Спектр ЯМР 1H ($CDCl_3$), δ , м. д.: 0.88* т (3H, CH_3 , $^3J_{HH} = 7.1$ Гц), 0.90 т (3H, CH_3 , $^3J_{HH} = 7.3$ Гц), 0.98

д (3H, CH_3 , $^3J_{HH} = 6.9$ Гц), 1.01* д (3H, CH_3 , $^3J_{HH} = 7.8$ Гц), 1.15–1.47 м (2H, CH_2), 1.92–2.18 м (3H, $POCH_2 + CH$), 2.56–2.74 м [2H, $CH_2C(O)$], 3.67 с (3H, CH_3O), 3.89* д. д. д (1H, $POCH$, $^2J_{PH} = 10.8$, $^3J_{HH} = 9.8$, $^3J_{HH} = 4.9$ Гц), 4.03 д. д. д (1H, $POCH$, $^2J_{PH} = 10.8$, $^3J_{HH} = 10.2$, $^3J_{HH} = 2.9$ Гц), 5.10 с (2H, CH_2O), 5.16 уш. с (1H, NH), 7.32 уш. с (5H, Ph), 8.42 уш. с (1H, $POOH$).



Спектр ЯМР 1H ($DMCO-d_6$), δ , м. д.: 0.78* т (3H, CH_3 , $^3J_{HH} = 7.3$ Гц), 0.82 т (3H, CH_3 , $^3J_{HH} = 7.3$ Гц), 0.92 д (3H, CH_3 , $^3J_{HH} = 6.8$ Гц), 0.95* д (3H, CH_3 , $^3J_{HH} = 6.3$ Гц), 1.15–1.47 м (2H, CH_2), 1.02–1.22 м (1H, CH_2CH), 1.22–1.45 м (1H, CH_2CH), 1.70–1.97 м (3H, $POCH_2 + CH$), 2.45–2.56 м [2H, $CH_2C(O)$], 3.52* с и 3.53 с (3H, CH_3O), 3.59* д. д. д и 3.75 д. д. д (1H, $POCH$, $^2J_{PH} = 12.2$, $^3J_{HH} = 10.7$, $^3J_{HH} = 3.9$ Гц), 5.09 с (2H, CH_2O), 7.20–7.45 м (5H, Ph).

Спектр ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$), δ_C , м. д.: 11.48* и 11.59, 14.64* д ($^3J_{PC} = 2.9$ Гц), 14.87 д ($^3J_{PC} = 2.6$ Гц) и 16.53* д ($^3J_{PC} = 9.6$ Гц), 22.72 д ($^1J_{PC} = 92.2$ Гц) и 22.99* д ($^1J_{PC} = 92.5$ Гц), 24.60* д ($^2J_{PC} = 3.7$ Гц) и 26.28 д ($^2J_{PC} = 3.3$ Гц), 27.41 ($^3J_{PC} = 11.8$ Гц), 34.00 и 34.90*, 51.62 д ($^1J_{PC} = 103.6$ Гц) и 53.88* д ($^1J_{PC} = 104.3$ Гц), 52.65, 66.73, 128.20, 128.24, 128.49, 135.58, 157.05 д ($^3J_{PC} = 5.9$ Гц), 171.92 д ($^3J_{PC} = 16.2$ Гц).

Спектр ^{31}P ЯМР ($CDCl_3$), δ_P , м. д.: 54.8* (10%), 56.1 (90%).

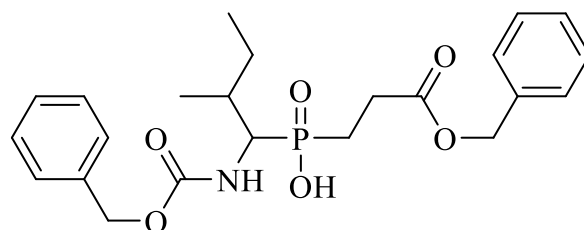
Спектр ^{31}P ЯМР ($DMCO-d_6$), δ_P , м. д.: 46.4* (5%), 46.9 (75%), 47.4* (20%).

Масс-спектр (ESI), m/z : 372.4 $[M + H^+]$. Найдено, %: P 8.45. $C_{17}H_{26}NO_6P$.
Вычислено, %: P 8.34. $M_{\text{выч}}$ 371.4.

(3-Бензилокси-3-оксопропил){1-[(бензилоксикарбонил)амино]-2-метилбутил}фосфиновая кислота (3b)

Выход 47%, температура плавления 118–120°C

R_f 0.25 ($CHCl_3$ –MeOH–AcOH, 10:2:1).



3b

Спектр ЯМР 1H ($CDCl_3$), δ , м. д.: 0.86* т

(3H, CH_3 , $^3J_{HH} = 7.3$ Гц), 0.89 т (3H, CH_3 , $^3J_{HH} = 6.9$ Гц), 0.96 д (3H, CH_3 , $^3J_{HH} = 6.9$ Гц), 1.01* д (3H, CH_3 , $^3J_{HH} = 7.3$ Гц), 1.12–1.47 м (CH_2 , 2H), 1.92–2.15 м (3H, $PCH_2 + CH$), 2.52–2.72 м [2H, $CH_2C(O)$], 3.90* д. д. д (1H, PCH , $^2J_{PH} = 10.8$, $^3J_{HH} = 9.7$, $^3J_{HH} = 4.4$ Гц), 4.04 д. д. д (1H, PCH , $^2J_{PH} = 10.8$, $^3J_{HH} = 10.2$, $^3J_{HH} = 2.9$ Гц), 5.09 с (4H, $2CH_2$), 5.19 уш. д (1H, NH , $^3J_{HH} = 9.7$ Гц), 7.32 уш. с (5H, Ph), 8.69 уш. с (1H, $POOH$).

Спектр ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$), δC , м. д.: 11.46* и 11.58, 14.57* д ($^3J_{PC} = 2.2$ Гц) и 14.87 д ($^3J_{PC} = 2.2$ Гц) и 16.53* д ($^3J_{PC} = 9.2$ Гц), 22.81 д ($^1J_{PC} = 92.2$ Гц) и 23.07* д ($^1J_{PC} = 92.6$ Гц), 24.61* д ($^2J_{PC} = 3.3$ Гц) и 26.32 д ($^2J_{PC} = 2.6$ Гц), 27.42 ($^3J_{PC} = 11.7$ Гц), 33.96 и 34.90*, 51.66 д ($^1J_{PC} = 105.8$ Гц) и 53.86* д ($^1J_{PC} = 105.4$ Гц), 66.72, 67.34, 128.00, 128.20, 128.50, 135.60, 136.05*, 156.37* д ($^3J_{PC} = 5.9$ Гц) и 156.42 д ($^3J_{PC} = 5.9$ Гц), 171.78* д ($^3J_{PC} = 15.2$ Гц) и 171.88 д ($^3J_{PC} = 16.7$ Гц).

Спектр ^{31}P ЯМР ($CDCl_3$), δP , м. д.: 54.6* (9%), 55.9 (55%), 56.0* (36%).

Массспектр (ESI), m/z : 448.5 $[M + H^+]$. Найдено, %: C 61.53; H 6.90; P 7.08. $C_{23}H_{30}NO_6P$. Вычислено, %: C 61.74, H 6.76, P 6.92. $M_{\text{выч}}$ 447.5.

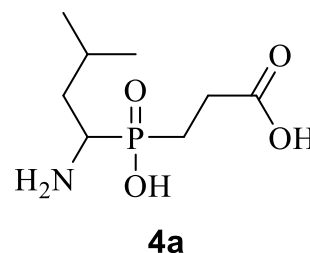
Соединения **4a**, **4b** получали гидролизом фосфиновых кислот **2a**, **2b**, **3a**, **3b** в кипящей 6 н. соляной кислоте. После упаривания реакционной массы в вакууме остаток смешивали с водой, упаривали и хроматографировали на катионите (элюент – 0.5 н. HCl). Фракции с положительной реакцией на нингидрин

упаривали, смешивали с водой и упаривали, остаток обрабатывали окисью пропилена в водном спирте (1:4–7). Продукт реакции кристаллизовали из водного спирта (1:4), и выделяли (67–83%) псевдодипептиды.

3-[(1-Амино-3-метилбутил)(гидрокси)фосфорил]пропановая кислота (псевдолейцилглицин) (4a)

Температура плавления 177–179°C.

Спектр ЯМР ^1H (D_2O), δ , м. д.: 0.81 д (3H, CH_3 , $^3J_{\text{HH}} = 6.5$ Гц), 0.86 д (3H, CH_3 , $^3J_{\text{HH}} = 5.9$ Гц), 1.43–1.66 м (3H, $\text{CH}_2 + \text{CH}$), 1.70–1.92 м (2H, PCH_2), 2.40–2.60 м (2H, CH_2CO), 3.16 д. т (1H, PCHN , $^2J_{\text{PH}} = 7.6$, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Гц).



Спектр ЯМР ^{13}C (D_2O), δC , м. д.: 19.97, 22.31, 22.55 д ($^1J_{\text{PC}} = 95.5$ Гц), 24.00 д ($^3J_{\text{PC}} = 8.9$ Гц), 26.50 д ($^2J_{\text{PC}} = 3.7$ Гц), 36.08, 48.27 д ($^1J^{\text{PC}} = 92.9$ Гц), 177.22 д ($^3J_{\text{PC}} = 14.4$ Гц).

Спектр ЯМР ^{31}P (D_2O): δP 35.9 м. д.

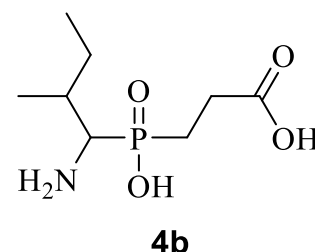
Найдено, %: С 42.68; Н 8.32; N 6.33. $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{NO}_4$. Вычислено, %: С 43.05; Н 8.13; N 6.28.

3-[(1-Амино-2-метилбутил)(гидрокси)фосфорил]пропановая кислота (псевдо-изолейцилглицин) (4b)

Точка плавления 174–176°C

Rf 0.15 ($\text{BuOH} : \text{AcOH} : \text{H}_2\text{O} = 20 : 5 : 2$).

Спектр ЯМР ^1H (D_2O), δ , м.д.: 0.86 т (3H, CH_3 , $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Гц), 0.99 д (3H, CH_3 , $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Гц), 1.04* д (3H, CH_3 , $^3J_{\text{HH}} = 6.0$ Гц), 1.39 м (2H, CH_2CH), 1.60* м (2H, CH_2CH), 1.87 м (2H, PCH_2), 2.01 м (1H, CHCHN), 2.55 м (2H, CH_2CO), 3.08* д.д (1H, * PCHN , $^2J_{\text{PH}} = 8.8$, $^3J_{\text{HH}} = 5.9$ Гц), 3.16 д.д (1H, PCHN , $^2J_{\text{PH}} = 8.4$, $^3J_{\text{HH}} = 4.0$ Гц).



Спектр ЯМР ^{13}C (D_2O), δC , м.д.: 10.4*, 10.8 (CH_3), 14.2 д (CH_3 , $^3J_{\text{PC}} = 3.3$ Гц), 15.8* д (CH_3 , $^3J_{\text{PC}} = 5.9$ Гц), 24.3 д (PCH_2 , $^1J_{\text{PC}} = 95.9$ Гц), 24.5* д (PCH_2 , $^1J_{\text{PC}} = 95.5$ Гц), 24.6 д (CH , $^2J_{\text{PC}} = 4.8$ Гц), 26.7 д (CH_2 , $^3J_{\text{PC}} = 4.0$ Гц), 26.8* д (CH_2 , $^3J_{\text{PC}} = 5.9$ Гц), 32.9 (CH_2CO), 33.5* (CH_2CO), 53.3 д (PCN , $^1J_{\text{PC}} = 91.8$ Гц), 54.8* д (PCN , $^1J_{\text{PC}} = 91.1$ Гц), 177.4 д (CO , $^3J_{\text{PC}} = 15.0$ Гц).

Спектр ЯМР ^{31}P (D_2O): δP 44.40 м.д..

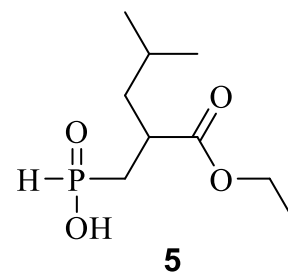
Найдено: С 42.76, 42.57; Н 8.20, 8.34; N 6.17, 6.23. $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{NO}_4\text{P}$. Рассчитано, %: С 43.05; Н 8.13; N 6.28.

3.2 Фосфиновый аналог аланиллейцина

2-(Этоксикарбонил)-4-метиламилфосфонистая кислота (5)

Выход 81%, маслообразное вещество.

Спектр ЯМР ^1H ($\text{CCl}_4\text{--CD}_3\text{OD}$), δ , м. д.: 0.97–1.05 уш. т (3H, CH_3), 1.35 д (6H, CH_3 , $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Гц), 1.48 м (1H, CH), 1.65 м (2H, CH_2CH), 2.10 м (2H, CH_2P), 2.83 м [1H, CHC(O)], 4.17 м (2H, CH_2O), 7.05 д (1H, PH, $^1J_{\text{PH}} = 560.0$ Гц), 12.68 уш. с (1H, POOH).



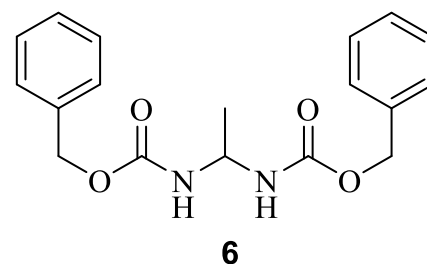
Спектр ЯМР ^{31}P ($\text{CCl}_4\text{--CD}_3\text{OD}$): δP 31.1 м. д.

Масс-спектр (ESI), m/z : 223.4 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (вычислено для $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{O}_4\text{P}$: 223.2). Найдено Р, %: 13.63, 13.43. $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{O}_4\text{P}$. Вычислено Р, %: 13.94.

Дибензил N,N'-Этилиденбискарбамат (6)

Выход 64%, т. пл. 203–204°C.

Спектр ЯМР ^1H ($\text{DMSO-d}_6\text{:CCl}_4 = 1\text{:}3$), δ , м.д.: 1.23 д (3H, CH_3 , $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Гц), 5.00 с. уш. (4H, $2\text{CH}_2\text{O}$), 5.14 м (1H, CHN), 7.34 м (10H, 2Ph), 7.61 д (2H, 2NH, $^3J_{\text{HH}} = 5.0$ Гц).

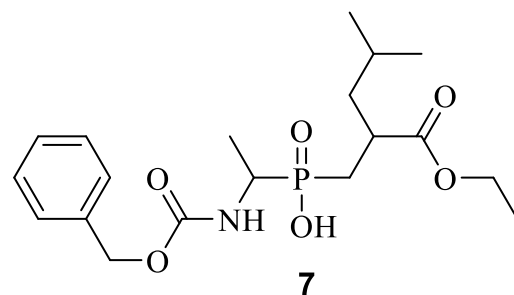


Спектр ЯМР ^{13}C (DMSO-d_6), δC , м.д.: 21.2 (CH_3), 56.1 (CHN), 65.2 ($2\text{CH}_2\text{O}$), (127.6, 127.7, 127.8, 128.4, 137.1) (12C , Ph), 154.6 (C=O).

Найдено, %: С 65.57, 65.71; Н 6.21, 6.27; N 8.61, 8.66. $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4$. Вычислено, %: С 65.84; Н 6.14; N 8.53

2-(Этилоксикарбонил)-4-метиламил-1'-{(N-бензилоксикарбонил)амино}-аминоэтилфосфиновая кислота (7)

а. К охлажденной до 5°C смеси 4.4 г (20 ммоль) предварительно высушенной фосфонистой кислоты **5** и 3.0 г (20 ммоль) бензилкарбамата в 25 мл ацетилхлорида добавляли порциями 1.4 мл (25 ммоль) ацетальдегида. Полученную смесь перемешивали при комнатной



температуре в течение нескольких часов, затем выливали в 70 мл воды со льдом, и упаривали в вакууме при температуре бани не выше 35°C . Остаток обрабатывали 70 мл насыщенного раствора бикарбоната натрия. Водную фазу промывали диэтиловым эфиром (2×10 мл), осторожно подкисляли раствором 1 н. HCl до $\text{pH} \sim 2$ и затем экстрагировали хлороформом (3×10 мл) или этилацетатом. Объединенный органический экстракт сушили сульфатом магния и упаривали в вакууме. Остаток хроматографировали на силикагеле [элюент – хлороформ, хлороформ–изопропанол (5–7%)]. Элюат упаривали в вакууме, остаток кристаллизовался самопроизвольно, а также после обработки диэтиловым или петролевым эфиром (40/70). Фосфиновая кислота **7** была выделена после дополнительной кристаллизации из петролевого эфира. Выход 4.1 г (51%), т. пл. $74\text{--}77^\circ\text{C}$.

б. Амидоалкилирование фосфонистой кислоты **5** в смеси ацетилхлорида и уксусного ангидрида позволила выделить целевой продукт **7** с выходом 58%, т. пл. $77\text{--}78^\circ\text{C}$.

в. Синтез в среде уксусного ангидрида с добавлением п-толуолсульфокислоты (3 мол%) позволил получить кислоту **7** с выходом 71%, т. пл. $78\text{--}80^\circ\text{C}$.

г. Двухкомпонентный вариант синтеза был проведен с использованием предварительно синтезированного N,N'-этилиденбис(бензилкарбамата) **6** также при использовании п-толуолсульфокислоты (3 мол%). К перемешиваемой смеси 2.2 г (10 ммоль) безводной фосфонистой кислоты **5** и 3.3 г (10 ммоль) N,N'-этилиденбис(бензилкарбамата) **6** в 20 мл уксусного ангидрида добавляли 0.05 г (0.3 ммоль) п-толуолсульфокислоты. Реакционную массу перемешивали при комнатной температуре, наблюдая за ходом реакции с помощью ЯМР ^{31}P . По завершении реакции смесь фильтровали, фильтрат обрабатывали аналогично методике а. Выход 3.3 г (83%), т. пл. 80–81°C, Rf ~ 0.20–0.35 ($\text{CHCl}_3:\text{EtOH} = 5:1$) (двойное пятно, что обусловлено наличием диастереомеров).

Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м. д.: 0.84 д (3H, CH_3 , $^3J_{\text{HH}} = 6.4$ Гц), 0.88 д (3H, CH_3 , $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Гц), 1.21 т (3H, CH_3 , $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Гц), 1.34 д. д (3H, CH_3CH , $^3J_{\text{HH}} = 6.5$, $^3J_{\text{PH}} = 14.5$ Гц), 1.45–1.80 м (4H, $\text{PCH}_2 + \text{CHCH}_2\text{CH}$), 2.00–2.27 м (1H, CHCH_3), 2.70–2.92 м [1H, $\text{CHC}(\text{O})$], 3.90–4.05 м (1H, PCHN), 4.11 к (2H, CH_2O , $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Гц), 5.10 уш. с (2H, OCH_2Ph), 5.38 уш. д (1H, NH , $^3J_{\text{HH}} = 8.6$ Гц), 6.50 уш. с (1H, POOH), 7.33 с (5H, Ph).

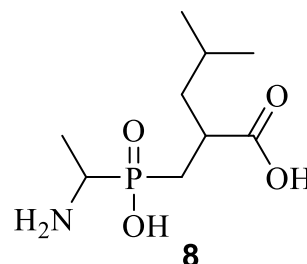
Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3), δC , м. д.: 13.84* (здесь и далее звездочкой отмечен сигнал минорного диастереомера), 14.05, 20.88*, 21.84, 22.32*, 22.67, 25.06*, 25.73, 28.67 д ($^1J_{\text{PC}} = 95.1$ Гц), 28.96* д ($^1J_{\text{PC}} = 91.6$ Гц), 37.12, 43.17* д ($^3J_{\text{PC}} = 8.8$ Гц), 43.37 д ($^3J_{\text{PC}} = 11.1$ Гц), 45.10* д ($^1J_{\text{PC}} = 103.5$ Гц), 45.85 д ($^1J_{\text{PC}} = 104.3$ Гц), 60.71, 67.04, 127.97, 128.09, 128.44, 136.18, 155.86 д ($^3J_{\text{PC}} = 5.0$ Гц), 175.1.

Спектр ЯМР ^{31}P (CDCl_3), δP , м. д.: 54.7*, 55.0.

Масс-спектр (ESI), m/z: 400.5 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (вычислено для $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{NO}_6\text{P}$: 400.4). Найдено, %: C 56.68, 56.92; H 7.78, 7.87. $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{NO}_6\text{P}$. Вычислено, %: C 57.13; H 7.57.

2-(Гидроксикарбонил)-4-метиламил-1-аминоэтилфосфиновая кислота (псевдоаланиллейцин) (8)

Фосфиновую кислоту **7** (1.1 г, 2.8 ммоль) кипятили в 15 мл 6 н. HCl в течение 17 ч. Охлажденный раствор обрабатывали хлороформом (2×5 мл). Водную фазу упаривали в вакууме и остаток хроматографировали на катионите (элюент – H₂O, затем 0.5 н. HCl). Элюат, имеющий положительную реакцию



на нингидрин, упаривали в вакууме. Остаток (~0.6 г) растворяли в 5.5 мл водного спирта (~1:10), обрабатывали 0.5 мл (7 ммоль) окиси пропилена и выделяли 0.4 г (62%) аминокислоты **8**, которая представляет собой кристаллический порошок, ограниченно растворимый в воде при собственном pH. Поэтому ниже приведены спектральные данные в кислой и щелочной среде, в последнем случае наличие диастереомеров проявляется в большей степени. Выход 62%, т. пл. 197–199°C (разл.).

Спектр ЯМР ¹H (D₂O–DCl, pH = 1), δ, м. д.: 0.48 д (3H, CH₃CHC, ³J_{HH} = 5.9 Гц), 0.52 д (3H, CH₃CHC, ³J_{HH} = 6.5 Гц), 1.08 д. д (3H, CH₃CHP, ³J_{PH} = 14.7, ³J_{HH} = 7.1 Гц), 1.14–1.32 м [3H, CH₂CH(CH₃)₂], 1.56–1.74 м (1H, PCH₂), 1.78–1.98 м (1H, PCH₂), 2.35–2.57 м [1H, CHC(O)], 3.10–3.30 м (1H, CHN).

Спектр ЯМР ¹H (D₂O–NaOD, pH ~9), δ, м. д.: 0.78 д (3H, CH₃CHC, ³J_{HH} = 5.9 Гц), 0.82 д (3H, CH₃CHC, ³J_{HH} = 5.3 Гц), 1.12 д. д (3H, CH₃CHP, ³J_{PH} = 14.7, ³J_{HH} = 7.1 Гц), 1.14* д. д (3H, CH₃CHP, ³J_{PH} = 13.5, ³J_{HH} = 7.1 Гц), 1.25–1.60 м [4H, PCH₂ + CH₂CH(CH₃)₂], 1.71–1.99 м (1H, PCH₂), 2.42–2.60 м [1H, CHC(O)], 2.68–2.87 м (1H, CHN).

Спектр ЯМР ¹³C (D₂O–DCl, pH = 1), δC, м. д.: 12.24*, 12.30, 21.29, 21.86*, 21.93, 25.3, 28.50* д (¹J_{PC} = 92.7 Гц), 28.64 д (¹J_{PC} = 93.1 Гц), 37.20 д (²J_{PC} = 4.8 Гц), 42.61 д (³J_{PC} = 11.6 Гц), 45.28* д (¹J_{PC} = 97.0 Гц), 45.35 д (¹J_{PC} = 96.6 Гц), 179.44 д (³J_{PC} = 5.2 Гц).

Спектр ЯМР ^{13}C (D_2O – NaOD , $\text{pH} \sim 9$), δC , м. д.: 13.18*, 14.24, 21.41, 21.60*, 22.62*, 22.86, 25.94*, 26.10, 31.16* д ($^1J_{\text{PC}} = 90.9$ Гц), 31.56 д ($^1J_{\text{PC}} = 90.9$ Гц), 41.42 д ($^2J_{\text{PC}} = 2.7$ Гц), 43.74 д ($^3J_{\text{PC}} = 7.7$ Гц), 43.91 д ($^3J_{\text{PC}} = 9.6$ Гц), 45.66* д ($^1J_{\text{PC}} = 93.2$ Гц), 46.16 д ($^1J_{\text{PC}} = 92.8$ Гц), 184.92 д ($^3J_{\text{PC}} = 8.4$ Гц), 185.02* д ($^3J_{\text{PC}} = 6.5$ Гц).

Спектр ЯМР ^{31}P (D_2O – DCI , $\text{pH} = 1$): δP 44.3 м. д.

Спектр ЯМР ^{31}P (D_2O – NaOD , $\text{pH} \sim 9$), δP , м. д.: 43.1, 43.5*.

Найдено, %: С 45.35, 45.26; Н 9.02, 9.17; N 6.04, 6.13. $\text{C}_9\text{H}_{20}\text{NO}_4\text{P}$. Вычислено, %: С 45.57; Н 8.50; N 5.90.

3.3 Синтез N-защищенных глицил-содержащих фосфиновых пептидов

3.3.1 Фосфонистые карбоновые кислоты

Общая методика синтеза фосфонистых карбоновых эфиров и кислот

Гипофосфит аммония (24,9 г, 0,3 моль) и гексаметилдисулазан (96,8 г, 0,6 моль) перемешивали в течение 2 часов при $\sim 140^\circ\text{C}$. К предварительно охлажденной в токе аргона смеси медленно по каплям добавляли соответствующий α -замещенный акрилат (0,1 моль) при $10\text{--}30^\circ\text{C}$ в течение 1 часа. Реакционную смесь перемешивали при $10\text{--}30^\circ\text{C}$ в течение 1 часа, а затем 6 часов при комнатной температуре. Затем реакционную смесь охлаждали до $5\text{--}10^\circ\text{C}$ и к образовавшемуся раствору медленно по каплям добавляли водно-диоксановый раствор (25 мл, 1,4 моль H_2O /10 мл диоксана) и реакционную смесь упаривали в вакууме. Остаток распределяли между хлороформом (120 мл) и 0,5 н. раствором HCl (40 мл, $\text{pH} \sim 1$). Водную фазу дополнительно дважды экстрагировали хлороформом (100 мл). Органические экстракты объединяли, сушили над сульфатом натрия и упаривали в вакууме. Остаток представлял собой сложные эфиры и выделялся в виде бесцветного масла. Гидролиз эфиров (60 ммоль) с 60 мл 3 н. HCl после 4-часового кипячения с обратным холодильником дает свободные фосфонистые карбоновые кислоты с выходами 90-95%.

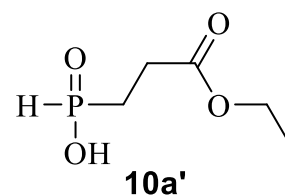
2-Этилоксикарбонил-этилфосфонистая кислота (10a')

Выход: 47%, бесцветное масло.

Спектр ЯМР ^1H (200 МГц, CDCl_3) δ , м.д.: 1.22 т (3H, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Гц, CH_3), 1.90-2.15 м (2H, $\text{P}(\text{O})\text{CH}_2$), 2.45-2.70 м (2H, CH_2CO), 4.11 кв (2H, OCH_2), 7.15 д ($^1J_{\text{PH}} = 561.2$ Гц, 1H, $\text{P}(\text{O})\text{H}$), 12.02 с (1H, $\text{P}(\text{O})\text{OH}$),

Спектр ЯМР ^{31}P (81 МГц, CDCl_3) δ , м.д.: 35.9.

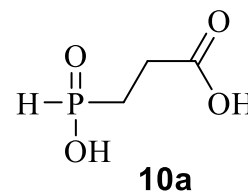
Рассчитано для $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{O}_4\text{P}$; %: P, 18.65. Найдено, %: P, 18.37.



2-гидроксикарбонил-этилфосфонистая кислота (10a)

Выход: 91%, бесцветное очень вязкое масло.

Спектр ЯМР ^1H (200 МГц, D_2O) δ , м.д.: 1.75-2.00 м (2H, $\text{P}(\text{O})\text{CH}_2$), 2.35-2.60 м (2H, CH_2CO), 6.95 д (1H, $^1J_{\text{PH}} = 558.6$ Гц, $\text{P}(\text{O})\text{H}$).



Спектр ЯМР ^{31}P (81 МГц, D_2O) δ , м.д.: 36.80.

Рассчитано для $\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_4\text{P}$; %: P, 22.43. Найдено, %: P, 22.17.

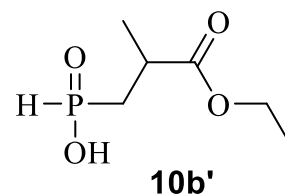
2-Этилоксикарбонил-пропилфосфонистая кислота (10b')

Выход = 76%, бесцветное масло.

Спектр ЯМР ^1H (200 МГц, CDCl_3) δ , м.д.: 1.18 т (3H, $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Гц, CH_3CH_2), 1.22 д (3H, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Гц, CH_3CH), 1.70 м (1H, один из CH_2P), 2.04 м (1H, другой из CH_2P), 2.73 м {1H, $\text{CHC}(\text{O})$ }, 4.03 кв (2H, OCH_2), 7.05 д (1H, $^1J_{\text{PH}} = 561.8$ Гц, $\text{P}(\text{O})\text{H}$), 12.71 уш. С (1H, $\text{P}(\text{O})\text{OH}$).

Спектр ЯМР ^{31}P (81 МГц, CDCl_3) δ , м.д.: 35.84.

Рассчитано для $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_4\text{P}$; %: С, 40.01, Н 7.27. Найдено, %: С, 40.83, 40.87; Н 7.53, 7.63.



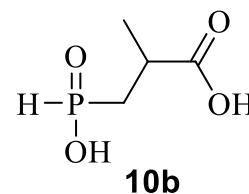
2-(Гидроксикарбонил)-пропилфосфонистая кислота (10b)

Выход = 93%, бесцветное масло.

Спектр ЯМР ^1H (200 МГц, D_2O) δ , м.д.: 1.10 д (3H, $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Гц, CH_3), 1.72 м (1H, один из CH_2P), 1.98 м (1H, другой из CH_2P), 2.67 м {1H, $\text{CHC}(\text{O})$ }, 6.96 д (1H, $^1J_{\text{PH}} = 560.0$ Гц, PH).

Спектр ЯМР ^{31}P (81 МГц, D_2O) δ , м.д.: 34.50.

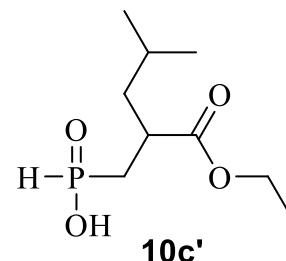
Рассчитано для $\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_4\text{P}$; %: P, 20.37. Найдено, %: P, 19.90, 19.84.



2-(Этилоксикарбонил)-4-метиламилфосфонистая кислота (10c')

Выход = 68%, бесцветное масло.

Спектр ^1H (200 МГц, CDCl_3): $\delta = 0.87$ (д, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 6.2$ Гц, CHCH_3), 0.91 (д, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 6.2$ Гц, CHCH_3), 1.25 (т, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Гц, CH_3), 1.25-1.45 {м, 1H, $\text{CH}(i\text{-Bu})$ }, 1.47-1.70 {м, 2H, $\text{CH}_2(i\text{-Bu})$ }, 1.73-1.92 (м, 1H, один из CH_2P), 1.95-2.25 (м, 1H, другой из CH_2P), 2.82 м {1H, $\text{CHC}(\text{O})$ }, 4.14 (кв., 2H, OCH_2 , $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Гц), 7.16 (д, $^1J_{\text{PH}} = 558.3$ Гц, 1H, PH), 10.36 (уш.с., 1H, $\text{P}(\text{O})\text{OH}$),



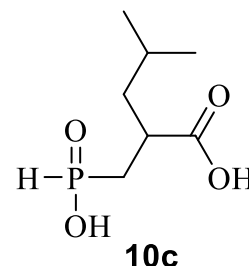
Спектр ЯМР ^{31}P (81 МГц, CDCl_3): $\delta = 36.70$.

Рассчитано $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{O}_4\text{P}$; %: P, 13.94. Найдено, %: P, 14.04, 14.14.

2-(Гидроксикарбонил)-4- метиламилфосфонистая кислота (10c)

Выход = 97%, бесцветное масло

Спектр ЯМР ^1H (200 МГц, D_2O) δ , м.д.: 0.79 д (3H, $^3J_{\text{HH}} = 5.4$ Гц, CH_3), 0.82 д (3H, $^3J_{\text{HH}} = 5.4$ Гц, CH_3), 1.25-1.65 м {3H, $\text{CH}_2 + \text{CH}(i\text{-Bu})$ }, 1.70-2.05 м (2H, CH_2P), 2.73 м { $\text{CHC}(\text{O})$, 1H}, 7.00 д ($^1J_{\text{PH}} = 547.5$ Гц, 1H, PH).



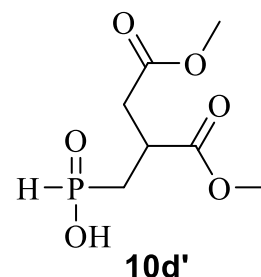
Спектр ЯМР ^{31}P (81 МГц, D_2O) δ , м.д.: 33.50 (рН собственный (~1), 27,4 (рН~9).

Вычислено для $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{O}_4\text{P}$; %: P, 15.95. Найдено, %: P, 20.07, 20.04.

2,3-Бис(метилоксикарбонил)-пропилфосфонистая кислота (10d')

Выход=73%, бесцветное масло.

Спектр ЯМР ^1H (200 МГц, CDCl_3) δ , м.д.: 1.80-2.10 м (1H, один из CH_2P), 2.12-2.37 м (1H, другой из CH_2P), 2.78 д {2H, $^3J_{\text{HH}} = 6.2$ Гц, $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$ }, 3.22 м {1H, $\text{CHC}(\text{O})$ }, 3.68 с (3H, OCH_3), 3.72 с (3H, OCH_3), 7.25 д ($^1J_{\text{PH}} = 570.5$ Гц, 1H, PH), 10.57 уш.с (1H, $\text{P}(\text{O})\text{OH}$).



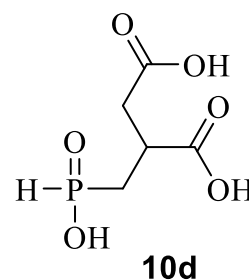
Спектр ЯМР ^{31}P (81 МГц, CDCl_3) δ , м.д.: 35.90.

Рассчитано $\text{C}_7\text{H}_{13}\text{O}_6\text{P}$ %: P, 13,82. Найдено, %: P, 14.05, 14.12

2,3-Бис(гидроксикарбонил)-пропилфосфонистая кислота (10d)

Выход = 97%, точка плавления 112-114°C.

Спектр ЯМР ^1H (200 МГц, D_2O): $\delta = 1.70$ -1.95 (м, 1H, один из CH_2P), 1.97-2.40 (м, 1H, другой из CH_2P), 2.68 {д, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 6.2$ Гц, $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$ }, 3.04 {м, 1H, $\text{CHC}(\text{O})$ }, 7.04 (д, $^1J_{\text{PH}} = 558.2$ Гц, 1H, PH).



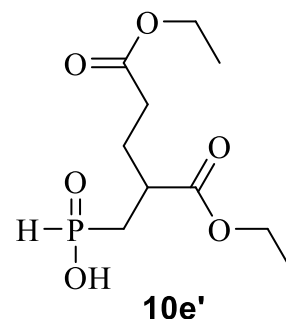
Спектр ЯМР ^{31}P (81 МГц, D_2O): $\delta = 33.10$ (рН собственный ~1).

Рассчитано $\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_6\text{P}$; %: P, 15.80. Найдено, %: P, 16.02, 18.94.

2,4-Бис(этилоксикарбонил)-бутилфосфонистая кислота (10e')

Выход = 67%, бесцветное масло.

Спектр ЯМР ^1H (200 МГц, CDCl_3): $\delta = 1.17$ (т, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Гц, CH_3), 1.21 (т, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Гц, CH_3), 1.75-2.10 {м, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$ }, 1.96 (м, 2H, CH_2P), 2.68 {м, 1H, $\text{CHC}(\text{O})$ }, 3.98 (кв., 2H, OCH_2), 4.05 (кв., 2H, OCH_2), 6.97 (д, $^1J_{\text{PH}} = 560.3$ Гц, 1H, PH), 12.65 (уш. с., 1H, $\text{P}(\text{O})\text{OH}$).



Спектр ЯМР ^{31}P (81 МГц, CDCl_3): $\delta = 33.90$.

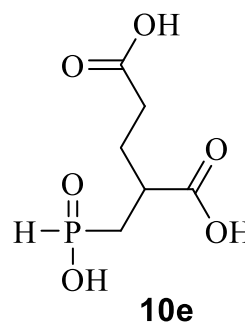
Рассчитано $\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{O}_6\text{P}$; %: P, 11.63. Найдено, %: P, 11.75, 11.82.

2,4-Бис(гидроксикарбонил)-бутилфосфонистая кислота (10e)

Выход = 94%, бесцветное масло.

Спектр ЯМР ^1H (200 МГц, D_2O) δ , м.д.: 1.65-2.30 м (2H, $\text{CH}_2\text{P}+\text{CH}_2\text{C}$), 2.33 уш. Т { 2H, $^3\text{J}_{\text{HH}} = 7.5$ Гц, $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$ }, 2.69 м {1H, $\text{CHC}(\text{O})$ }, 6.99 д (1H, $^1\text{J}_{\text{PH}} = 558.2$ Гц, PH).

Спектр ЯМР ^{31}P (81 МГц, D_2O) δ , м.д.: 34.60 (рН собственный (~1).



Рассчитано для $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_6\text{P}$; %: P, 14.74. Найдено, %: P, 14.92, 15.04.

3.3.2 Синтез N,N'- Метилен-бис(алкилкарбаматов)

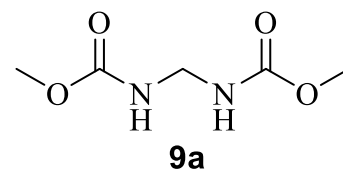
Общая методика:

Трифторуксусную кислоты (0,10-0,11 ммоль) медленно по каплям добавляли к перемешиваемой смеси диэтилоксиметана (0,05 моля) и соответствующего алкилкарбамата (0,10 моля) в уксусном ангидриде (10-17 мл) при комнатной температуре или слегка охлаждая реакционную смесь. За ходом реакции следили с помощью ТСХ. Реакционную смесь перемешивали 3–5 ч и разбавляли 15–20 мл толуола. Полученную массу упаривали в вакууме и остаток распределяли между хлороформом (30 мл) и водой (10 мл). Органическую фазу дополнительно промывали водой (10 мл), сушили над сульфатом натрия и упаривали в вакууме. Остаток кристаллизовали из эфира.

N,N'-метилен-бис(метилкарбамат) (9a)

Выход 3.48 г, 43%, белое твердое вещество, точка плавления 113-115°C.

Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м. д.: 3.66 с (6H, 2CH_3), 4.48 т (2H, NCH_2), 5.40-6.05 м (2H, 2NH),

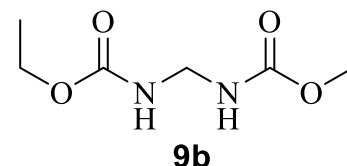


Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3): δC , м.д.: = 48.0 (NCH_2), 52.2 (OCH_3), 157.3 (C=O)
Рассчитано, %: C, 37.04; H, 6.22; N, 17.28. Найдено, %: C, 36.90, 36.80; H, 6.44, 6.37;
N, 17.26, 17.23. $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_4$.

N,N'-Метилен-бис(этилкарбамат) (9b)

Выход 5.33 г, 56%, белое твердое вещество, т.пл. 122-123°C.

Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м. д.: 4.47 т (2H, NCH_2), 1.22 т (6H, 2 CH_3), 4.10 кв. (4H, 2 CH_2O), 5.40-5.95 м (2H, 2NH).



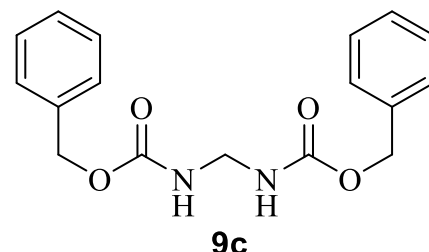
Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3): δC , м.д.: 14.4 (CH_3), 47.9 (NCH_2), 61.0 (OCH_2), 156.9 (C=O).

Рассчитано для $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4$; %: C, 44.20; H, 7.42; N, 14.73. Найдено: C, 43.92, 44.08;
H, 7.56, 7.70; N, 14.66, 14.53.

N,N'-метилен-бис(бензилкарбамат) (9c)

Выход 9.58 г, 61%, белое твердое вещество, т.пл. 139-140°C.

Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м. д.: 4.53 т (2H, NCH_2), 5.09 с (4H, 2 CH_2O), 5.72-5.92 м (2H, 2NH), 7.33 м (10H, 2Ph).



Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3): δC , м.д.: 48.1 (NCH_2), 66.9 (CH_2O), 128.1, 128.2(2C) (все ароматические), 128.5(2C), 136.0, 156.6 (C=O).

Рассчитано для $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4$; %: C, 64.96; H, 5.77; N, 8.91. Найдено: C, 64.72, 64.68;
H, 5.96, 5.90; N, 8.76, 8.63.

3.3.3 Амидоалкилирование фосфонистых карбоновых кислот с использованием метиленбискарбаматов

Метод А. Фосфонистые кислоты **10 (a-e)** (1,0 ммоль) перемешивали 0,5 ч в этилацетате (3–4 мл) при комнатной температуре, а соответствующий диалкил-

N,N'-метиленбискарбамат **9 (a-c)** (1,0 ммоль) добавляли порциями к перемешиваемому раствору. К полученной смеси медленно добавляли 2 ммоль трифторуксусного ангидрида (TFAA) (3-4 ммоль TFAA для дикарбоновых кислот), затем перемешивали при комнатной температуре в течение 15-20 часов. За ходом реакции следили с помощью ^{31}P ЯМР-спектроскопии. После завершения реакции смесь упаривали в вакууме и остаток распределяли между хлороформом и водой (1:3). Полученную массу фильтровали, фильтрат упаривали в вакууме. Остаток очищали хроматографией на колонке с силикагелем {элюент: хлороформ-2-пропанол (от 2 до 10%)}. Элюат упаривали в вакууме, остаток кристаллизовался самопроизвольно или после обработки эфиром. Выход фосфиновых пептидов составлял 29-58%.

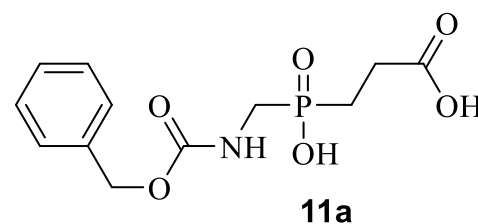
Метод Б. Соответствующий диалкил N,N'-метиленбискарбамат **9 (a-c)** (1,0 ммоль) одной порцией добавляли к перемешиваемому раствору фосфонистой карбоновой кислоты **10 (a-e)** или суспензии соответствующей дикарбоновой кислоты **10 (f-g)** (1,0 ммоль) в смеси ацетилхлорид/уксусный ангидрид (2:1, 3 мл) при $\sim 5^\circ\text{C}$. Полученную смесь перемешивали от 3 до 20 часов, за ходом реакции следили с помощью спектроскопии ЯМР ^{31}P . После завершения реакции реакционную массу разбавили хлороформом (5 мл), смесь упаривали в вакууме и дважды соупаривали с хлороформом (5 мл). Остаток распределяли между хлороформом и водой (1:3). Осажденный алкилкарбамат (обычно бензилкарбамат) отфильтровывали и отбрасывали, а водную часть фильтрата дополнительно промывали эфиром или бензолом и упаривали в вакууме. Остаток очищали хроматографией на колонке с силикагелем, аналогично методике А. Некоторые фосфиновые пептиды получали в виде бесцветного или бледно-желтого цвета воска. Выходы фосфиновых пептидов составили 51-76%.

(N-Бензилоксикарбонил-аминометил)(2-карбоксиэтил)фосфиновая кислота (11a)

Выход: 0.13 г, 43% (процедура А), 0.23 г, 76% (методика Б);

Белые кристаллы, т.пл. 137-138°C.

TLC R_f (CHCl₃/i-PrOH: 4/1) = 0.30.



Спектр ЯМР ¹H (200 МГц, d₆-DMSO) δ 2.12-2.41 дт (2H, ³J_{HH} = 7.5 Гц, ²J_{PH} = 12.8 Гц, CH₂P), 2.27-2.45 м {2H, CH₂C(O)}, 3.29 дд (2H, ³J_{HH} = 7.0 Гц, ²J_{PH} = 7.5 Гц, PCH₂N), 5.03 с (2H, CH₂O), 7.22-7.44 м (5H, Ph), 7.61 м (1H, NH).

Спектр ЯМР ¹H (200 МГц, CDCl₃ + капля ТФА) δ 2.12-2.41 м (2H, CH₂P), 2.65-2.95 м {2H, CH₂C(O)}, 3.83 уш.д (2H, ³J_{HH} = 6.9 Гц, PCH₂N), 5.10-5.27 м (2H, CH₂O), 5.73-5.97 м (1H, NH), 6.62-6.83* м (1H, NH), 7.36 уш.м (5H, Ph).

* Здесь и далее сигналы, отмеченные звездочкой, относятся к минорным конформерным формам.

Спектр ЯМР ¹³C {¹H} (50 МГц, CDCl₃ + капля ТФА) δC, м.д: 21.5 д (¹J_{PC} = 92.6 Гц, PCH₂C), 26.0 {CH₂C(O)}, 39.6 (¹J_{PC} = 102.8 Гц, NCH₂P), 40.1* (¹J_{PC} = 99.2 Гц, NCH₂P), 69.2*, 68.6 (CH₂O), 128.1, 128.7(4C), 134.9 (все ароматические), 158.0 (C=O), 177.5 д (³J_{PC} = 8.8 Гц, C=O).

Спектр ЯМР ³¹P {¹H} (81 МГц, d₆-DMSO): δ 44.33.

Спектр ЯМР ³¹P {¹H} (81 МГц, CDCl₃ + капля TFA) δ 58.01.

Вычислено C₁₂H₁₆NO₆P; %: C, 47.85; H, 5.35; N, 4.65. Найдено: C, 47.52, 47.40; H, 5.62, 5.53; N, 4.46, 4.33.

HRMS (NSI/Q-TOF) m/z: [M-H]⁻ Вычислено для C₁₂H₁₅NO₆P - 300.0637, найдено 300.0642.

(N-Этоксикарбонил-аминометил)(2-гидроксикарбонил-пропил)

фосфиновая кислота (11b)

Выход 0.16 г, 63% (Процедура Б). Бесцветный воск.

TLC R_f (CHCl₃/i-PrOH:4/1) ~ 0.25.

Спектр ЯМР ¹H (200 МГц, D₂O) δ 1.13 уш.т (3H, ³J_{HH} = 6.6 Гц, CH₃), 1.19 уш.д (3H, ³J_{HH} = 6.8 Гц, CH₃), 1.65-

1.93 м (1H, один из CH₂P), 1.98-2.80 м (1H, другой из CH₂P), 2.63-2.87 м (1H, CHC(O)), 3.41 уш.д (2H, ²J_{PH} = 7.3 Гц CH₂P), 4.01 уш.кв (2H, ³J_{HH} = 6.8 Гц CH₂O).

Спектр ЯМР ¹³C {¹H} (200 МГц, D₂O) δ 13.7* (CH₃CH₂), 14.2 (CH₃CH₂), 18.5* д (³J_{PC} = 11.4 Гц, CH₃CH), 18.8 д (³J_{PC} = 9.5 Гц, CH₃CH), 30.6 д (¹J_{PC} = 90.4 Гц, PCH₂C), 30.8* д (¹J_{PC} = 88.6 Гц, PCH₂C), 34.1 д {²J_{PC} = 2.9 Гц, CHC(O)}, 35.1* д {²J_{PC} = 2.9 Гц, CHC(O)}, 40.1 д (¹J_{PC} = 102.8 Гц, NCH₂P), 40.8* д (¹J_{PC} = 106.1 Гц, NCH₂P), 62.7, 63.5*, 63.7* (CH₂O), 158.8 (³J_{PC} = 8.4 Гц, NC=O), 180.2 (C=O).

Спектр ЯМР ³¹P {¹H} (81 МГц, D₂O) δ 47.34.

Вычислено %: C, 37.95; H, 6.37; P, 12.23. C₈H₁₆NO₆P; Найдено: C, 38.02, 37.83; H, 6.50, 6.63; P, 12.06, 11.87.

HRMS (ESI/Q-TOF) m/z: [M-H]⁻ Вычислено для C₈H₁₅NO₆P⁻ 252.0637, найдено 252.0644.

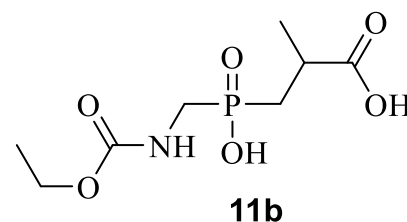
(N-Бензилоксикарбонил-аминометил)-(2'-гидроксикарбонил-пропил)

фосфиновая кислота (11c)

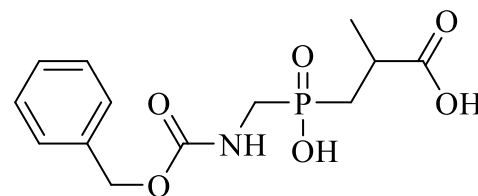
Выход: 0.09 г, 29% (процедура А), 0.21 г, 67% (процедура Б);

Белые кристаллы. Точка плавления 142-143°C.

TLC R_f (CHCl₃/i-PrOH: 4/1) ~ 0.35.



11b



11c

Спектр ЯМР ^1H (200 МГц, CDCl_3 + капля TFA) δ 1.37 уш.д (3H, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Гц, CH_3), 1.41* уш.д (3H, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Гц, CH_3), 1.83-2.23 м (1H, один из CH_2P), 2.25-2.60 м (1H, другой из CH_2P), 2.80-3.20 м (1H, $\text{CHC}(\text{O})$), 3.60-3.95 м (2H, PCH_2N), 5.15 с (2H, CH_2O), 5.21* с (2H, CH_2O), 5.62-6.00 м (1H, NH), 6.52-6.85* м (1H, NH), 7.36 уш.м (5H, Ph).

Спектр ЯМР ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ (81 МГц, CDCl_3 + капля TFA) δ 56.46.

Вычислено %: C, 49.53; H, 5.75; N, 4.44. $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{NO}_6\text{P}$. Найдено: C, 49.27, 49.16; H, 6.05, 5.94; N, 4.75, 4.30.

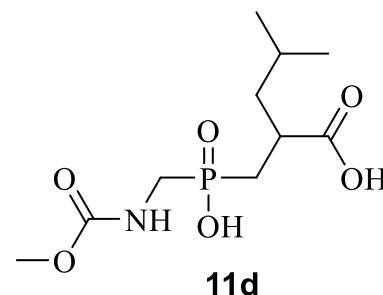
HRMS (NSI/Q-TOF) m/z : $[\text{M}-\text{H}]^-$. Вычислено для $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NO}_6\text{P}^-$ 314.0793, найдено 314.0796.

N-Метилоксикарбониламинометил-2'-гидроксикарбонил-4'-метиламилфосфиновая кислота (11d)

Выход 0.13 г, 46% (процедура А), 0.20 г, 71% (процедура Б).

Белые кристаллы. Т. пл. 95-97°C.

ТСХ R_f ($\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$:4/1) $\sim$ 0.25-0.30.



Спектр ЯМР ^1H (200 МГц, CDCl_3 + капля TFA) δ 0.90 д (3H, $^3J_{\text{HH}} = 6.5$ Гц, Me), 0.94 д (3H, $^3J_{\text{HH}} = 6.5$ Гц, Me), 1.33-1.78 м (3H, CH_2+CH), 1.90-2.15 м (1H, один из CH_2P), 2.20-2.45 м (1H, другой из CH_2P), 2.80-3.05 м (1H, CHCOO), 3.55 м {5H (3H, MeO + 2H, NCH_2P)}, 5.65-6.05 м (1H, NH), 6.50-6.80* м (1H*, NH).

Спектр ЯМР ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ (50 МГц, CDCl_3 + капля TFA) δ 21.8, 22.1, 25.6, 28.9, 37.2 д ($^1J_{\text{PC}} = 88.8$ Гц, PCH_2), 40.2 д ($^1J_{\text{PC}} = 102.5$ Гц, NCH_2), 40.5* д ($^1J_{\text{PC}} = 105.4$ Гц, NCH_2), 42.9 д ($^3J_{\text{PC}} = 12.9$ Гц), 53.7 (MeO), 54.1*, 158.8 (MeO), 180.9 д ($^3J_{\text{PC}} = 2.6$ Гц, $\text{NC}=\text{O}$).

Спектр ЯМР ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ (81 МГц, CDCl_3 + капля TFA) δ 56.04.

Вычислено %: С, 42.71, Н, 7.17, Р, 11.01. $C_{10}H_{20}O_6P$; Найдено, %: С, 42.47, 42.38; Н, 7.33, 7.38; Р, 10.92, 11.02.

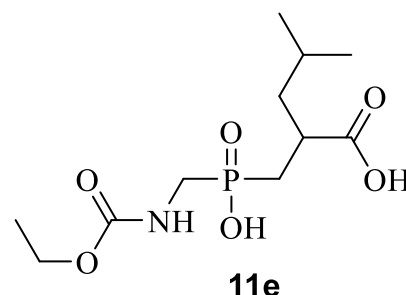
HRMS (NSI/Q-TOF) m/z : $[M-H]^-$ вычислено для $C_{10}H_{19}NO_6P^-$ 280.0950, найдено 280.0953.

N-Этилоксикарбониламинометил-2'-гидроксикарбонил-4'-метил-амилфосфиновая кислота (11e)

Выход 0.17 г, 58% (процедура А), 0.20 г, 68% (процедура Б).

Белые кристаллы. Т. пл. 122-123°C.

TLC R_f ($CHCl_3/EtOH$:4/1) $\sim$ 0.25-0.30.



Спектр ЯМР 1H (200 МГц, $CDCl_3$ + капля ТФА) δ 0.89 д (3H, $^3J_{HH} = 6.4$ Гц, CH_3), 0.92 д (3H, $^3J_{HH} = 6.4$ Гц, CH_3), 1.26 уш.т (3H, $^3J_{HH} = 6.9$ Гц, CH_3), 1.33-1.47 м {1H, $CH(i-Bu)$ }, 1.55-1.70 м {2H, $CH_2(i-Bu)$ }, 1.88-2.11 м (1H, один из CH_2P), 2.15-2.43 м (1H, другой из CH_2P), 2.77-3.03 м {1H, $CHC(O)$ }, 3.70 уш.д (2H, $^2J_{PH} = 6.4$ Гц, CH_2P), 4.15 уш.кв (2H, $^3J_{HH} = 6.9$ Гц, CH_2O), 5.35-5.95 (~60%) (m, 1H, NH), 6.45-6.70*(~40%) м (1H, NH).

Спектр ЯМР ^{13}C { 1H } (50 МГц, $CDCl_3$ + капля ТФА) δ 13.6* ($\underline{CH_3CH_2}$), 14.0, 21.8, 22.0, 25.6 ($\underline{CH_3CH_2}$), 28.7, 37.1 д ($^1J_{PC} = 90.8$ Гц, $PCCH_2$), 40.1 д ($^1J_{PC} = 100.3$ Гц, NCH_2), 40.6* д ($^1J_{PC} = 100.3$ Гц, NCH_2), 42.9 д ($^3J_{PC} = 12.8$ Гц), 63.4 (CH_2O), 64.0* (CH_2O), 158.6 ($NC=O$), 181.4 ($CC=O$).

Спектр ЯМР ^{31}P { 1H } NMR (81 МГц, $CDCl_3$ + капля ТФА) δ 54.51, 53.72*.

Вычислено %: С, 44.75, Н, 7.51, Р, 10.49. $C_{11}H_{22}NO_6P$; Найдено, %: С, 44.43, 44.53; Н, 7.73, 7.67; Р, 10.35, 10.22.

HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : $[M-H]^-$ вычислено для $C_{11}H_{21}NO_6P^-$ 294.1107, найдено 294.1113.

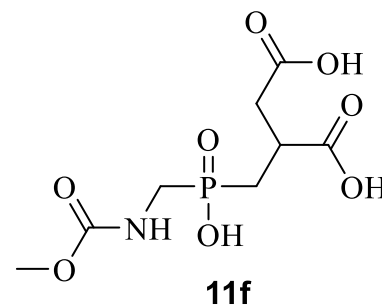
N-Метилоксикарбонил-аминометил-2,3-Бис(гидроксикарбонил)пропил-фосфиновая кислота (11f)

Выход 0.14 г, 51% (процедура Б).

Бесцветный воск

TLC R_f (CHCl₃/i-PrOH: 4/1) ~ 0.20.

Спектр ЯМР ¹H (200 МГц, D₂O): δ 1.37-1.65 м (1H, один



из CH₂P), 1.77-2.02 м (1H, другой из CH₂P), 2.23-2.50 м {2H, CH₂C(O)}, 2.61-2.86 м {1H, CHC(O)}, 3.18* д (²J_{PH} = 6.9 Гц, 2H, NCH₂P), 3.21 д (²J_{PH} = 9.2 Гц, 2H, NCH₂P), 3.60 уш.с (3H, OCH₃).

Спектр ЯМР ¹³C {1H} (50 МГц, D₂O, δC, м.д.): 28.5 д (¹J_{PC} = 90.8 Гц, 2H, PCH₂C), 35.6 д {²J_{PC} = 2.9 Гц, 1H, CHC(O)}, 36.4* д {³J_{PC} = 9.5 Гц, 2H, CH₂C(O)}, 36.8 д {³J_{PC} = 8.0 Гц, 2H, CH₂C(O)}, 40.2 д (¹J_{PC} = 103.9 Гц, 2H, NCH₂P), 40.6* д (¹J_{PC} = 107.6 Гц, 2H, NCH₂P), 53.2 (CH₃O), 159.2 (NC=O), 175.7 (OC=O), 177.8 (OC=O) д (³J_{PC} = 7.7 Гц).

Спектр ЯМР ³¹P {1H} (81 МГц, D₂O, pH~1): 54.60.

Вычислено %: C, 33.93, H, 4.98, P, 10.94. C₈H₁₄NO₈P; Найдено, %: C, 33.67, 33.73; H, 5.03, 5.11; P, 10.76, 10.61.

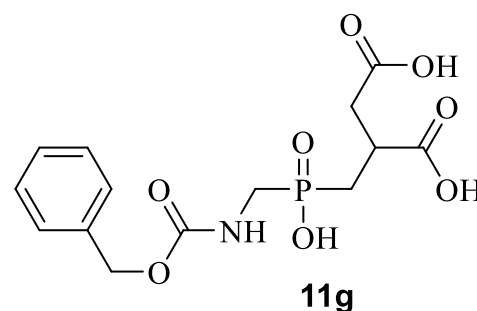
HRMS (ESI/Q-TOF) m/z: [M-H]⁻ Вычислено для C₈H₁₃NO₈P⁻ 282.0379, Найдено 282.0385.

N-Бензилоксикарбонил-аминометил-2,3-бис(гидроксикарбонил)пропил-фосфиновая кислота (11g)

Выход 0.15 г, 42% (процедура А).

Белые кристаллы. Т. пл. 167-169°C.

TLC R_f (CHCl₃/i-PrOH: 4/1) = 0.30.



Спектр ЯМР ^1H (200 МГц, $\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ 1.63-1.85 м (1H, один из PCH_2), 1.92-2.13 м (1H, другой из PCH_2), 2.53-2.78 м (2H, $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$), 2.82-3.04 м {1H, $\text{CHC}(\text{O})$ }, 3.29 дд (2H, $^3\text{J}_{\text{HH}} = 6.7$ Гц, $^2\text{J}_{\text{PH}} = 7.1$ Гц, PCH_2N), 5.02 уш.с (2H, CH_2O), 7.15-7.45 м (5H, Ph), 7.61 м (1H, NH).

Спектр ЯМР ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ (50 МГц, $\text{d}_6\text{-DMSO}$, δC , м.д.): 28.5 д ($^1\text{J}_{\text{PC}} = 89.3$ Гц, 2H, PCH_2C), 34.8 д ($^2\text{J}_{\text{PC}} = 2.9$ Гц, 1H, $\text{CHC}(\text{O})$), 35.7 д ($^3\text{J}_{\text{PC}} = 3.0$ Гц, 2H, $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$), 41.6 д. - половина дублета закрыта растворителем $\text{d}_6\text{-DMSO}$ (NCH_2P), 65.6 (CH_2O), 127.7(3C), 128.3(2C), 136.9 (все ароматические), 156.2 ($\text{NC}=\text{O}$), 172.8 ($\text{CC}=\text{O}$), 175.1 ($\text{OC}=\text{O}$) д ($^3\text{J}_{\text{PC}} = 13.2$ Гц),

Спектр ЯМР ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ (81 МГц, $\text{d}_6\text{-DMSO}$): δ 43.51.

Вычислено $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{NO}_8\text{P}\cdot\text{H}_2\text{O}$; %: С, 44.57, Н, 5.34, Р, 8.21. Найдено, %: С, 44.33, 44.20; Н, 5.46, 5.51; Р, 8.26, 8.21.

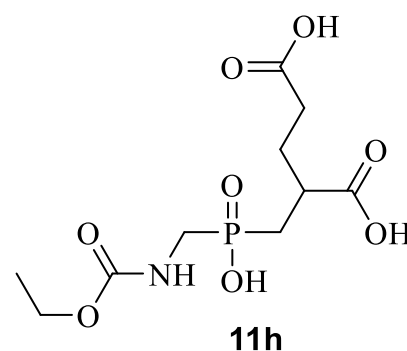
HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : $[\text{M}-\text{H}]^-$ вычислено для $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{NO}_8\text{P}^-$ 358.0692, Найдено 358.0699.

N-Этилоксикарбонил-аминометил-2,4-бис(гидроксикарбонил)-бутилфосфиновая кислота (11h)

Выход 0.17 г, 55% (процедура Б).

Бесцветный воск.

TLC R_f ($\text{CHCl}_3/\text{i-PrOH}$: 4/1) ~ 0.25 .



Спектр ЯМР ^1H (200 МГц, D_2O): δ 1.16 т (3H, $^3\text{J}_{\text{HH}} \sim 7.0$ Гц, 3H) + 1.21* т (3H*, $^3\text{J}_{\text{HH}} \sim 7.0$ Гц, 3H) + 1.25* т (3H*, $^3\text{J}_{\text{HH}} \sim 7.0$ Гц, 3H), 1.65-2.25 м (4H, $\text{CH}_2\text{P} + \text{CH}_2\text{CH}$), 2.28-2.48 м {2H, $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$ }, 2.60-2.84 м {1H, $\text{CHC}(\text{O})$ }, 3.32-3.50 уш.д (2H, $^2\text{J}_{\text{HH}} \sim 6\div 7$ Гц, один из NCH_2P), 3.60-3.74* м (2H, другой из NCH_2P), 3.95-4.17 уш.кв (2H, $^3\text{J}_{\text{HH}} = 7.0$ Гц, OCH_2), 4.17-4.33* уш.кв (2H, $^3\text{J}_{\text{HH}} = 7.0$ Гц, OCH_2).

Спектр ЯМР ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ (81 МГц, D_2O) : δ 45.86, 45.23*, 44.17*.

Спектр ЯМР ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ (81 МГц, $\text{d}_6\text{-DMSO} + \text{капля TFA}$): δ 48.12*, 44.29, 41.59*.

Вычислено %: С, 38.59, Н, 5.83, Р, 9.95. $C_{10}H_{18}NO_8P$; Найдено, %: С, 38.33, 38.18; Н, 6.23, 6.11; Р, 9.55, 9.43.

HRMS (NSI/Q-TOF) m/z : $[M-H]^-$ Вычислено для $C_{10}H_{17}NO_8P^-$ 310.0692, найдено 310.0699.

3.4 Изучение реакционной способности фосфонистых карбоновых кислот и механизма реакции

Синтез исходных соединений

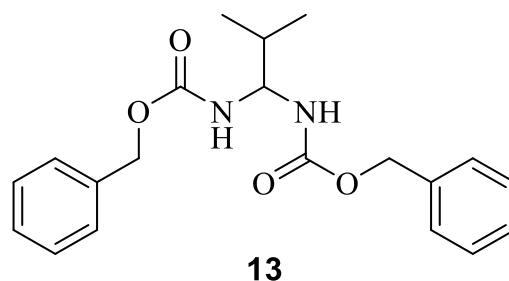
Синтез N,N' -алкилиден-бискарбаматов (общая методика)

Трифторуксусную кислоту (TFA) (0,05 ммоль) и затем медленно по каплям соответствующий альдегид (2,5 ммоль) при перемешивании добавляли к раствору бензилкарбамата (5,0 ммоль) в уксусном ангидриде (5 мл) при комнатной температуре. Перемешивание продолжали в течение 3–10 ч. За ходом реакции следили с помощью ТСХ. Выпавшие кристаллы отфильтровывали и промывали уксусным ангидридом (1 мл) и петролейным эфиром (2 мл). Фильтрат концентрировали в вакууме. Остаток растворяли в хлороформе (20 мл) и разбавляли водой (20 мл). Водный слой (20 мл) нейтрализовали до pH 6–7. Органический слой отделяли, сушили над $MgSO_4$ и концентрировали. Остаток кристаллизовали из диэтилового эфира или гексана и перекристаллизовывали из смеси диэтиловый эфир – этанол.

N,N' -Изобутилиден-бис(бензилкарбамат) (13)

Выход = 77%, белые кристаллы, т.пл. = 152–154°C.

Спектр ЯМР 1H (200 МГц, $CDCl_3$): δ = 0.89 (д, $^3J_{HH}$ = 6.7 Гц, 6H, 2CH₃), 2.00–2.35 (уш. с, 1H, CHCH₃), 4.65–4.90 (уш.с, 1H, CHN), 5.08 (уш.с, 4H, 2CH₂O), 5.40–5.65 (уш.с, 2H, 2NH), 7.25–7.40 (м, 10H, 2Ph).



Спектр ЯМР ^1H (200 МГц, $\text{d}_6\text{-DMSO}$): $\delta = 0.84$ (д, $^3J_{\text{HH}} = 6.7$ Гц, 6H, CH_3), 1.70-1.95 (уш.с, 1H, CH), 4.70-4.90 (уш.с, 1H, CH), 5.01 (уш.с, 4H, CH_2), 7.25-7.55 (м, 12H, 2Ph+2NH).

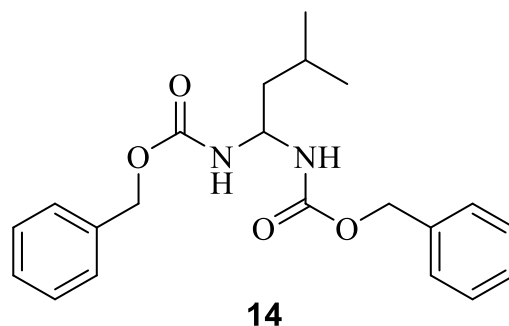
Спектр ЯМР ^{13}C (50 МГц, $\text{d}_6\text{-DMSO}$), δ_{C} , м.д.: 18.4 (2CH^3), 32.0 (CHCHN), 64.8 (CHN), 65.2 ($2\text{CH}_2\text{O}$), 127.7, 128.3, 137.1 (12C , Ph), 155.3 (C=O).

Вычислено для $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$; %: C, 67.40; H, 6.79; N, 7.86. Найдено: C, 67.37, 67.31; H, 6.94, 6.87; N, 7.76, 7.63.

***N,N'*-изоамилиден-бис(бензилкарбамат) (14)**

Выход = 68%, белые кристаллы, т.пл. = 97-98°C.

Спектр ЯМР ^1H (200 МГц, CDCl_3): $\delta = 0.89$ (д, $^3J_{\text{HH}} = 6.7$ Гц, 6H, 2CH_3), 2.00-2.35 (уш.с., 1H, CHCHCH_3), 4.65-4.90 (уш.с., 1H, CHN), 5.08 (уш.с., 4H, $2\text{CH}_2\text{O}$), 5.40-5.65 (уш.с., 2H, 2NH), 7.25-7.40 (м, 10H, 2Ph).



Спектр ЯМР ^1H (200 МГц, $\text{d}_6\text{-DMSO}$): $\delta = 0.84$ (д, $^3J_{\text{HH}} = 6.7$ Гц, 6H, CH_3), 1.70-1.95 (уш.с., 1H, CH), 4.70-4.90 (уш.с., 1H, CH), 5.01 (уш.с., 4H, CH_2), 7.25-7.55 (м, 12H, 2Ph+2NH).

Спектр ЯМР ^{13}C (50 МГц, $\text{d}_6\text{-DMSO}$), δ_{C} , м.д.: 18.4 (2CH_3), 32.0 (CHCHN), 64.8 (CHN), 65.2 ($2\text{CH}_2\text{O}$), (127.7, 128.3, 137.1) (12C , Ph), 155.3 (C=O).

Вычислено для $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$; %: C, 67.40; H, 6.79; N, 7.86. Найдено: C, 67.37, 67.31; H, 6.94, 6.87; N, 7.76, 7.63.

Амидоалкилирование фосфонистой карбоновой кислоты **10a** и ее этилового эфира **10a'** и бензилового эфира **10a''**

Процедуры синтеза фосфиновых псевдопептидов

- *Общая процедура А (двухкомпонентная версия реакции)*

К перемешиваемой смеси фосфонистой пропионовой кислоты (**10a**) (1,5 ммоль) или раствора этилового (**10a'**) (1,5 ммоль) или бензилового (**10a''**) (1,5 ммоль) эфиров добавляли 4÷7 мл уксусного ангидрида при комнатной температуре. Полученную смесь перемешивали 1-2 часа (в случае кислоты **10a**) или ~20 часов (в случае эфиров **10a'** и **10a''**), за ходом реакции следили методом ЯМР ³¹P-спектроскопии. После завершения реакции к реакционной массе добавляли 10 мл воды, полученную смесь перемешивали в течение часа и экстрагировали этилацетатом (3×10 мл). Органическую фазу сушили над сульфатом натрия и упаривали в вакууме. Остаток очищали хроматографией на силикагеле (элюент: петролейный эфир - этилацетат, от 10:1 до 1:2).

- *Общая процедура В (трехкомпонентная версия реакции)*

К перемешиваемой смеси добавляли соответствующий альдегид (1,65 ммоль, 1,1 экв) в одну-две порции и сразу затем ацетилхлорид (1÷4 мл) и фосфонистую пропионовую кислоту (**10a**) или этиловый эфир (**10a'**) (1,5 ммоль) или бензиловый эфир (**10a''**) (1,5 ммоль) фосфонистой пропионовой кислоты и бензилкарбамата (1,5 ммоль) в уксусном ангидриде (4÷7 мл).

Полученную смесь перемешивали в течение 1-2 часов (в случае кислоты **10a**) или ~20 часов (в случае эфиров **10a'** и **10a''**) и контролировали ход реакции методом ЯМР ³¹P-спектроскопии. После завершения реакции к реакционной массе добавляли 10 мл воды, полученную смесь перемешивали в течение часа и экстрагировали этилацетатом (3×10 мл). Органическую фазу сушили над сульфатом натрия и упаривали в вакууме. Остаток очищали хроматографией на силикагеле (элюент: петролейный эфир - этилацетат, от 10:1 до 1:2).

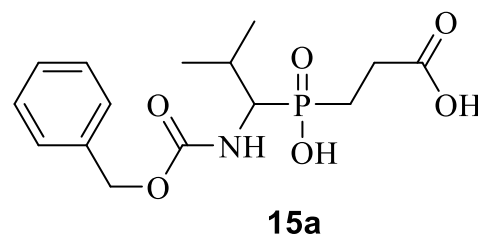
1-(Бензилоксикарбониламино)-2-метил-пропил-2'-(гидроксикарбонил)-этилфосфиновая кислота (15a)

Выход 0.23 г, 44% (*процедура А*),

0.32 г, 63% (*процедура В*);

Белые кристаллы, точка плавления 164–167 °С;

$R_f = 0.10-0.15$ ($\text{CHCl}_3 : \text{EtOH} \sim 95:5$).



Спектр ЯМР ^1H (200 МГц, $\text{d}^6\text{-DMSO}$) δ 0.85-1.00 (2д, $J = 4.4$ Гц, 6H), 1.65-1.95 (м, 2H), 2.0-2.25 (м, 1H), 2.25-2.50 (м, 2H), 3.45-3.70 (м, 1H), 5.06 (AB – система, 2H), 7.20-7.50 (м, 5H), 7.48 (д, $J = 10.2$ Гц, 1H).

Спектр ЯМР $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (81 МГц, $\text{d}^6\text{-DMSO}$) δ 46.64*, 46.90*, 47.26.

Спектр ЯМР $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (50 МГц, $\text{d}^6\text{-DMSO}$) δ 18.7 (д, $J = 5.1$ Гц), 20.8 (д, $J = 8.1$ Гц), 22.9, 26.4, 27.5 (д, $J = 90.4$ Гц), 55.0, 65.5, 127.4, 127.7, 128.4, 137.2 (д, $J = 104.7$ Гц), 156.7 (д, $J = 5.5$ Гц), 173.6 (д, $J = 16.1$ Гц).

Спектр ЯМР ^1H (200 МГц, $\text{CDCl}_3 + \text{капля TFA}$) δ 1.00 (д, $J = 5.9$ Гц, 3H), 1.03 (д, $J = 6.4$ Гц, 3H), 1.90-2.45 (м, 3H), 2.50-2.90 (м, 2H), 3.90-4.25 (м, 1H), 5.16 (с, 2H), 5.21* (с, 2H), 5.77 (~70%) (д, $J = 10.3$ Гц, 1H), 6.61*(~30%) (д, $J = 9.8$ Гц, 1H), 7.25-7.50 (м, 5 H).

Спектр ЯМР $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (81 МГц, $\text{CDCl}_3 + \text{капля TFA}$) δ 58.15*(~30%), 59.03(~70%).

Спектр ЯМР $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (50 МГц, $\text{CDCl}_3 + \text{капля TFA}$) δ 17.3* (д, $J = 1.9$ Гц), 17.5 (д, $J = 2.2$ Гц), 20.4 (д, $J = 10.3$ Гц), 20.5* (д, $J = 10.1$ Гц), 21.8* (д, $J = 89.7$ Гц), 22.0, 25.9*, 26.1, 27.8, 27.9* (д, $J = 89.3$ Гц), 54.5 (д, $J = 105.4$ Гц), 55.6*, 68.4, 69.1*, 127.9, 128.5, 128.6, 128.8, 129.0, 134.6*, 135.2 (д, $J = 103.2$ Гц), 157.7 (д, $J = 2.9$ Гц), 158.3* (д, $J = 2.4$ Гц), 177.8 (д, $J = 7.7$ Гц).

Вычислено $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{NO}_6\text{P}$; %: С, 52.48; Н, 6.46; Р, 9.02 Найдено: С, 52.18; Н, 6.58; Р, 8.70.

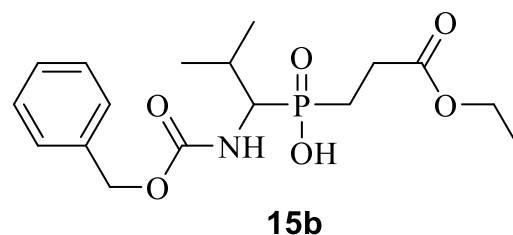
1-(Бензилоксикарбониламино)-2-метил-пропил-2'-(этилоксикарбонил)-этилфосфиновая кислота (15b)

Выход 0.30 г, 54% (*процедура А*), 0.41 г,

73% (*процедура В*);

Белые кристаллы, точка плавления 86-88°C;

$R_f = 0.15$ ($\text{CHCl}_3/\text{C}(\text{O})(\text{CH}_3)_2$ 4:1).



Спектр ЯМР ^1H (200 МГц, CD_3OD) δ 1.00 (д, $J =$

4.7 Гц, 3H), 1.02 (д, $J = 4.2$ Гц, 3H), 1.24 (т, $J = 7.0$ Гц, 3H), 1.85-2.10 (м, 2H), 2.15-2.35 (м, 1H), 2.45-2.65 (м, 2H), 3.79 (дд, $J = 5.1$ Гц, 1H), 4.12 (кв, 2H), 5.12 (AB – система, 2H), 7.20-7.45 (м, 5H).

Спектр ЯМР $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (81 МГц, CD_3OD) δ 48.43*, 49.22.

Спектр ЯМР $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (50 МГц, CD_3OD) δ 18.8 (д, $J = 5.1$ Гц), 21.2 (д, $J = 9.1$ Гц), 23.9 (д, $J = 91.5$ Гц), 27.6 (д, $J = 2.6$ Гц), 29.2 (д, $J = 1.5$ Гц), 56.1, 62.0, 67.9, 128.8, 129.0, 129.5, 138.2 (д, $J = 106.1$ Гц), 159.0 (д, $J = 5.5$ Гц), 173.9 (д, $J = 15.7$ Гц).

Спектр ЯМР ^1H (200 МГц, $\text{CDCl}_3 +$ капля TFA) δ 1.00 (д, $J = 5.3$ Гц, 3H), 1.03 (д, $J = 4.1$ Гц, 3H), 1.28 (т, $J = 7.0$ Гц, 3H), 1.95-2.45 (м, 3H), 2.00-2.50 (м, 3H), 2.55-2.90 (м, 2H), 3.90-4.30 (м, 3H), 5.15 (с, 2H), 5.21* (с, 2H), 5.89 (~65%) (д, $J = 10.6$ Гц, 1H), 6.59*(~35%) (д, $J = 10.0$ Гц, 1H, NH), 7.25-7.45 (м, 5H, Ph).

Спектр ЯМР $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ δ (81 МГц, $\text{CDCl}_3 +$ капля TFA) δ 56.96*(~35%), 57.32(~65%).

Спектр ЯМР $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (50 МГц, $\text{CDCl}_3 +$ капля TFA) δ 13.7, 17.3* (д, $J = 4.1$ Гц), 17.5 (д, $J = 4.1$ Гц), 20.4 (д, $J = 10.7$ Гц), 20.5* (д, $J = 11.1$ Гц), 21.7* (д, $J = 88.5$ Гц), 22.0 (д, $J = 87.7$ Гц), 26.3* (д, $J = 5.5$ Гц), 26.4 (д, $J = 5.5$ Гц), 27.8 (д, $J = 1.5$ Гц), 27.9* (д, $J = 1.4$ Гц), 54.4 (д, $J = 105.8$ Гц), 55.5*, 62.5*, 62.6, 68.4, 69.2*, 127.9, 128.5, 128.6, 128.8, 128.9, 134.6*, 135.1 (д, $J = 104.7$ Гц), 157.8 (д, $J = 5.9$ Гц), 158.4* (д, $J = 5.2$ Гц), 174.5*(35%) (д, $J = 9.9$ Гц), 175.0 (д, $J = 9.2$ Гц).

Вычислено для $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{NO}_6\text{P}$; %: С, 54.98; Н, 7.06; Р, 8.34. Найдено: С, 54.80; Н 7.23; Р, 8.17.

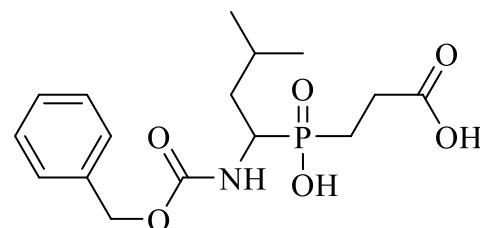
1-(Бензилоксикарбониламино)-3-метил-бутил-2'-(гидроксикарбонил)-этилфосфиновая кислота (16a)

Выход 0.28 г, 53% (*процедура А*),

0.38 г, 71% (*процедура В*);

Белые кристаллы, т.пл. 183–185 °С;

$R_f = 0.15$ ($\text{CHCl}_3:\text{EtOH} \sim 95:5$).



Спектр ЯМР ^1H (200 МГц, d^6 -DMSO) δ 0.80 (д, $J =$

6.1 Гц, 3H), 0.87 (д, $J = 6.1$ Гц, 3H), 1.30-1.70 (м, 3H), 1.65-1.90 (м, 2H), 2.25-2.55 (м, 2H), 3.55-3.85 (м, 1H), 5.04 (AB – система, 2H), 7.20-7.40 (м, 5H), 7.52 (д, $J = 9.1$ Гц, 1H, NH),

Спектр ЯМР $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (81 МГц, d^6 -DMSO) δ 46.72*, 47.40.

Спектр ЯМР $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (50 МГц, d^6 -DMSO) δ 20.8, 21.7, 23.3, (д, $J = 86.0$ Гц), 24.0, 26.4, 35.6 (д, $J = 11.3$ Гц), 48.2, 65.5, 127.5, 127.8, 128.4, 137.2 (д, $J = 106.5$ Гц), 156.2 (д, $J = 4.0$ Гц), 173.6 (д, $J = 15.7$ Гц).

Спектр ЯМР ^1H (200 МГц, CD_3OD) δ 0.89 (д, $J = 6.1$ Гц, 3H), 0.95 (д, $J = 6.1$ Гц, 3H), 1.45-1.80 (м, 3H), 1.85-2.10 (м, 2H), 2.45-2.70 (м, 2H), 3.90-4.10 (м, 1H), 5.10 (AB – система, 2H), 7.20-7.45 (м, 5H).

Спектр ЯМР $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (81 МГц, CD_3OD) δ 50.54*, 51.54.

Спектр ЯМР ^1H (200 МГц, CDCl_3 + капля TFA) $\delta =$ 0.81* (д, $J = 6.1$ Гц, 3H), 0.88 (д, $J = 6.1$ Гц, 3H), 0.93* (д, $J = 6.1$ Гц, 3H), 0.96 (д, $J = 6.1$ Гц, 3H), 1.40-1.85 (м, 3H), 2.00-2.35 (м, 2H), 2.60-2.90 (м, 2H), 4.10-4.35 (м, 1H), 5.15 (с, 2H), 5.23* (с, 2H), 5.61 (~65%) (д, $J = 9.8$ Гц, 1H), 6.47* (~35%) (д, $J = 9.8$ Гц, 1H), 7.20-7.45 (м, 5H).

Спектр ЯМР $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (81 МГц, CDCl_3 + капля TFA) δ 60.47* (~35%), 61.03.

Спектр ЯМР $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (50 МГц, CDCl_3 + капля TFA) δ 20.47*, 20.59, 20.5* (д, $J = 90.0$ Гц), 20.8, 23.0*, 23.1 (д, $J = 91.1$ Гц), 24.3, 25.85*, 26.0, 35.7, 36.0* (д, $J = 10.6$ Гц), 48.3 (д, $J = 103.5$ Гц), 49.2*, 68.5, 69.3*, 128.0, 128.7, 129.1, 134.4*, 135.1, 157.4, 158.1*, 178.0 (д, $J = 105.8$ Гц), 178.8* (~35%),

Вычислено для $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{NO}_6\text{P}$; %: С, 53.78; Н, 6.77; Р, 8.67. Найдено: С, 53.56; Н 6.95; Р, 8.49.

HRMS (ESI) вычислено $C_{16}H_{23}NO_6P$ m/z : $[M - H]^-$ 356.1258, найдено 356.1248.

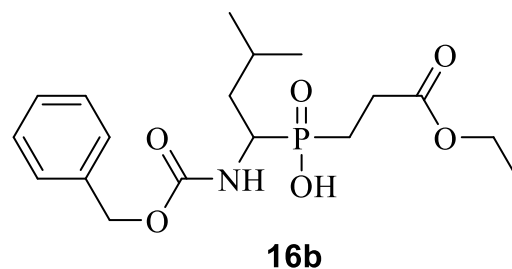
1-(Бензилоксикарбониламино)-3-метил-бутил-2'-(этоксикарбонил)-этилфосфиновая кислота (16b)

Выход 0.32 г, 55% (*процедура А*);

0.36 г 63% (*процедура В*);

Белые кристаллы; т.пл. 110-112°C;

$R_f = 0.2$ ($CHCl_3/C(O)(CH_3)_2$ 4:1).



Спектр ЯМР 1H (200 МГц, $CDCl_3$) δ 0.90 (д, $J = 5.9$ Гц, 3H), 0.93 (д, $J = 5.9$ Гц, 3H), 1.22 (т, 3H), 1.40-1.80 (м, 3H), 1.90-2.15 (м, 2H), 2.45-2.70 (м, 2H), 3.95-4.20 (м, 1H), 4.12 (кв, 2H), 5.10 (с, 2H), 5.16 (д, $J = 11.0$ Гц, 1H), 7.20-7.40 (м, 5H), 9.69 (уш.с., 1H).

Спектр ЯМР $^{31}P\{^1H\}$ (81 МГц, $CDCl_3$) δ 54.33*, 55.68.

Спектр ЯМР $^{13}C\{^1H\}$ (50 МГц, $CDCl_3$) δ 172.2 (д, $J = 15.4$ Гц), 156.1 (д, $J = 4.4$ Гц), 136.2, 128.5, 128.2, 128.0, 67.3, 61.0, 47.7 (д, $J = 106.5$ Гц), 36.2, 26.3 (д, $J = 2.6$ Гц), 24.3 (д, $J = 11.3$ Гц), 23.4, 21.6 (д, $J = 92.6$ Гц), 21.04, 14.14.

Вычислено $C_{18}H_{28}NO_6P$; %: С, 56.10; Н, 7.32; Р 8.04. Найдено: С, 55.83, 55.70; Н, 7.54, 7.58; Р 7.78, 7.74.

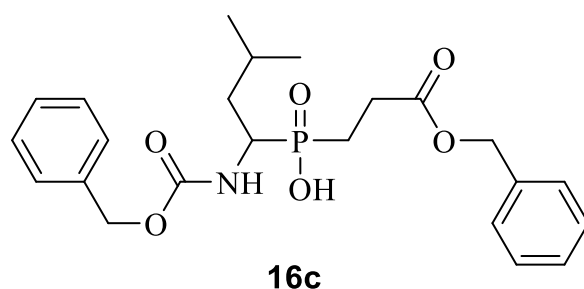
1-(Бензилоксикарбониламино)-3-метил-бутил-2'-(бензилоксикарбонил)-этилфосфиновая кислота (16c)

Выход: 0.34 г, 51% (*процедура А*); 0.45 г,

67% (*процедура В*);

Белые кристаллы, т.пл. 105-107 °С;

$R_f = 0.2$ ($CHCl_3/C(O)(CH_3)_2$ 4:1).



Спектр ЯМР 1H (200 МГц, $CDCl_3$) δ 0.89 (д, $J = 6.1$ Гц, 3H), 0.91 (д, $J = 5.5$ Гц, 3H), 1.35-1.80 (м, 3H), 1.90-2.20 (м, 2H), 2.50-2.80 (м, 2H), 3.85-4.20 (м, 1H), 5.00-5.15 (м, 5H, 2CH₂), 7.20-7.40 (м, 10H), 10.19 (уш.с., 1H).

Спектр ЯМР $^{31}P\{^1H\}$ (81 МГц, $CDCl_3$): $\delta = 54.58^*$, 55.91.

Спектр ЯМР $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (50 МГц, CDCl_3) δ 21.0, 21.5, 23.4 (д, $J = 92.8$ Гц), 24.3 (д, $J = 11.1$ Гц), 26.3, 36.1 (д, $J = 2.3$ Гц), 47.7, 66.7, 67.2, 128.0, 128.2, 128.5, 128.7, 135.6, 136.1 (д, $J = 106.6$ Гц), 156.1 (д, $J = 4.6$ Гц), 171.9 (д, $J = 16.1$ Гц).

Спектр ЯМР ^{13}C (50 МГц, CDCl_3 , DEPT) δ 21.5, 23.9, 22.0 (д, $J = 92.3$ Гц), 24.8 (д, $J = 11.5$ Гц), 26.8, 36.5 (д, $J = 2.7$ Гц), 48.1, 67.2, 67.7, 128.4, 128.7, 129.0, 129.2 (д, $J = 106.5$ Гц),

Спектр ЯМР ^1H (200 МГц, CDCl_3 + капля TFA) δ 0.80* (д, $J = 6.7$ Гц, 3H), 0.89 (д, $J = 6.7$ Гц, 3H), 0.93* (д, $J = 5.7$ Гц, 3H), 0.95 (д, $J = 6.1$ Гц, 3H), 1.45-1.85 (м, 3H), 2.0-2.35 (м, 2H), 2.65-3.00 (м, 2H), 4.05-4.35 (м, 1H), 5.05-5.25* (м, 4H), 5.72 (~70%) (д, $J = 9.8$ Гц, 1H), 6.47*(~30%) (д, $J = 9.8$ Гц, 1H), 7.20-7.45 (м, 10H, Ph).

Спектр ЯМР $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (81 МГц, CDCl_3 +капля TFA) δ 58.81*, 59.17*, 59.91.

Вычислено $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{NO}_6\text{P}$; %: C, 61.74; H, 6.76; P 6.92. Найдено: C, 61.39; H, 6.91; P 6.98.

HRMS (ESI) вычислено $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{NO}_6\text{P}$ m/z : $[\text{M} - \text{H}]^-$ 446.1727, найдено 446.1706.

Кислотный гидролиз соответствующих N-защищенных аминфосфиновых кислот **15**, **16** (1 ммоль) проводили при кипячении с 5 мл 6 н. HCl в течение 7-10 часов. Последующее упаривание реакционной смеси и обработка остатка избытком пропиленоксида в водном этаноле позволили выделить аминфосфиновые кислоты - псевдодипептиды **15'**, **16'** в свободной форме.

1-Амино-2-метилпропил-2'-(гидроксикарбонил)-этилфосфонистая кислота (**15'**)

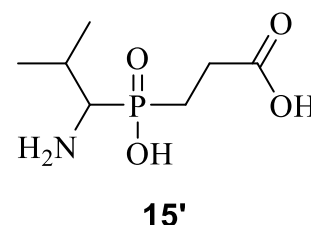
Выход: 0.16 г, 76%;

Белые кристаллы; т.пл. 184-186 °С.

Спектр ЯМР ^1H (200 МГц, D_2O) δ 0.99 (д, $J = 7.9$ Гц, 3H), 1.03 (д, $J = 7.3$ Гц, 3H), 1.75-2.00 (м, 2H), 2.10-2.30 (м, 1H), 2.40-2.65 (м, 2H), 2.80-3.20 (м, 1H).

Спектр ЯМР $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (81 МГц, D_2O) δ 34.73.

Спектр ЯМР $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (50 МГц, D_2O) δ 17.9 (д, $J = 5.1$ Гц), 20.1 (д, $J = 6.2$ Гц), 24.4, 26.8, 26.9 (д, $J = 95.9$ Гц), 55.7 (д, $J = 91.5$ Гц), 177.5 (д, $J = 15.0$ Гц).



Вычислено $C_7H_{16}NO_4P$; %: C, 40.19; H, 7.71; N, 6.70. Найдено: C, 39.84; H, 7.99; N, 6.55.

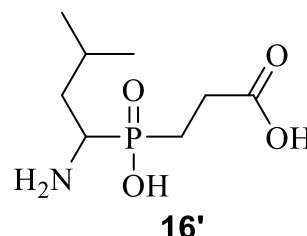
HRMS (ESI) вычислено $C_7H_{15}NO_4P$ m/z : $[M - H]^-$ 208.0733, найдено 208.0730.

1-Амино-3-метилбутил-2'-гидроксикарбонил-этилфосфиновая кислота (16')

Выход: 0.18 г, 81%,

Белые кристаллы; т.пл. 179-181 °С.

Спектр ЯМР 1H (200 МГц, D_2O) δ 0.81 (д, $J = 6.5$ Гц, 3H), 0.86 (д, $J = 5.9$ Гц, 3H), 1.40-1.70 (м, 3H), 1.70-1.95 (м, 2H), 2.40-2.60 (м, 2H), 3.05-3.25 (м, 1H).



Спектр ЯМР $^{31}P\{^1H\}$ (81 МГц, D_2O) δ 35.93.

Спектр ЯМР $^{13}C\{^1H\}$ (50 МГц, D_2O) δ 20.0, 22.3, 22.6 (д, $J = 95.5$ Гц), 24.0 (д, $J = 8.9$ Гц), 26.5, 36.1 (д, $J = 3.7$ Гц), 48.3 (д, $J = 92.9$ Гц), 177.2 (д, $J = 14.4$ Гц).

Вычислено $C_8H_{18}NO_4P$; %: C, 43.05; H, 8.13; N, 6.28. Найдено: C, 42.90; H, 8.33; N, 6.14.

HRMS (ESI) вычислено $C_8H_{17}NO_4P$ m/z : $[M - H]^-$ 222.0890, найдено 222.0886.

3.5. Исследование обратимого превращения фосфиновый пептид – фосфолактон

Дегидратацию фосфиновых пептидов с образованием фосфиновых лактонов наблюдали в стандартных ЯМР пробирках в растворах $CDCl_3$ или ацетон- D_6 . Соответствующий N-защищенный фосфиновый пептид (20-40 мг, 0.1-0.2 ммоль) растворяли в ~ 0.5 мл дейтерорастворителя и добавляли 0.07-0.15 мл DCC или TFAA (более эффективен).

Синтез и характеристика N-защищенных фосфиновых пептидов - структурных изостеров дипептидных компонент амилоида 42 (19a-f).

Методика А (синтез фосфиновых псевдопептидов 19a-с, 19f). Соответствующий альдегид (1,1 ммоль) добавляли к перемешиваемому раствору или суспензии соответствующей фосфонистой пропионовой кислоты (1,0 ммоль) и алкилкарбамат

(1,0 ммоль) в 4 мл к смеси ацетилхлорид/уксусный ангидрид (1:1) при температуре $\sim 5^{\circ}\text{C}$.

Полученную смесь перемешивали от 3 до 20 часов, за ходом реакции следили с помощью ^{31}P ЯМР-спектроскопии. После завершения реакции добавляли 5 мл метилендихлорида и смесь упаривали в вакууме. Остаток распределяли между этилацетатом и водой (4 : 1), полученную смесь отфильтровывали, органическую фазу дополнительно промывали водой и упаривали в вакууме. Остаток кристаллизовался самопроизвольно или после обработки эфиром. Выходы фосфиновых пептидов составили 51-64%.

Методика В (синтез фосфиновых псевдопептидов 19d и 19e). Диэтиловый (19d) или дибензиловый (19e) N,N' -метиленбискарбамат ($R'=H$) (1,0 ммоль) одной порцией добавляли к перемешиваемому раствору соответствующей фосфонистой пропионовой кислоты (1,0 ммоль) в 4 мл смеси ацетилхлорид/уксусный ангидрид (3:1) при $\sim 5^{\circ}\text{C}$.

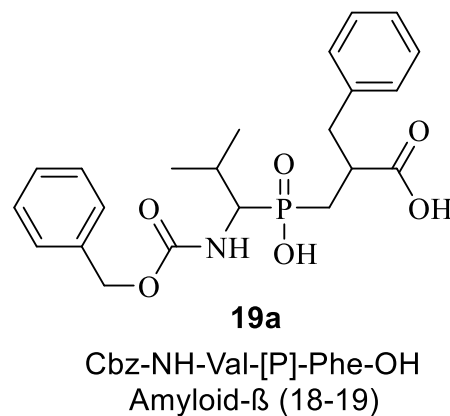
Полученную смесь перемешивали ~ 15 часов, за ходом реакции следили методом ЯМР ^{31}P -спектроскопии. По завершении реакции добавляли 5 мл метиленхлорида и образовавшуюся смесь упаривали в вакууме. Остаток распределяли между бензолом и водой (1:3), полученную смесь отфильтровывали и водную фазу промывали бензолом, упаривали в вакууме, влажный остаток обрабатывали эфиром и оставляли на некоторое время. Эфир декантировали над полутвердым полумаслянистым осадком, который повторно обрабатывали свежим сухим эфиром и выделяли фосфиновые пептиды в виде белых твердых веществ. Выходы фосфиновых пептидов составили 51% (19d) и 46% (19e).

1-(N -Бензилоксикарбониламино)-2-метил-пропил-2'-гидроксикарбонил-2'-бензил-этилфосфиновая кислота (19a)

Выход 0.25г, 58% (*методика А*).

Белые кристаллы. Т.пл. $137-138^{\circ}\text{C}$.

TLC R_f ($\text{CHCl}_3/\text{i-PrOH} \sim 4/1$) ~ 0.30 .



Спектр ЯМР ^1H (200 МГц, $\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ 0.84* (д, 6H, 2CH_3 , $^3J_{\text{HH}} = 6.5$ Гц), 0.91 (д, 6H, 2CH_3 , $^3J_{\text{HH}} = 6.5$ Гц), 1.53-1.76 (м, 1H, один из CH_2P), 1.77-1.97 (м, 1H, другой из CH_2P), 2.00-2.22 {м, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ }, 2.73-2.97 (м, 2H, CH_2Ph), 3.45-3.75 (м, 1H, CHCOOH), 4.80* и 4.90-5.00 (закрытые) (дд, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Гц, $^2J_{\text{PH}} = 8.1$ Гц, PCHN), 5.03 (ав, 2H, CH_2O), 7.40-7.60 (м, 11H, $2\text{Ph}+\text{NH}$).

*В дальнейшем сигналы, отмеченные звездочкой, относятся к незначительным диастереомерам или конформерам (ротамерам).

Спектр ЯМР ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ (50 МГц, CDCl_3 + капля TFA) δ 17.3*, 17.5 (CH_3CH), 20.4 (д, $^3J_{\text{PC}} = 7.3$ Гц, CH_3CH), 28.3 (д, $^1J_{\text{PC}} = 89.2$ Гц, PCH_2), 27.5, 27.8, 29.7* $\{\text{CH}(\text{CH}_3)_2\}$, 39.1*, 39.4, 39.7* (все CH_2Ph), 41.1 (CHCOOH), 54.4* (д, $^1J_{\text{PC}} = 106.2$ Гц, NCHP), 54.9 (д, $^1J_{\text{PC}} = 103.6$ Гц, NCHP), 56.0* (д, $^1J_{\text{PC}} = 100.3$ Гц, NCHP), 68.0, 68.2*, 68.8* (PhCH_2O), 127.1, 127.9, 128.4, 128.6, 128.7, 128.9, 134.8, 135.1*, 135.4, 135.5*, 136.9 (все аром.), 157.4 (д, $^3J_{\text{PC}} = 4.4$ Гц, NC=O), 158.2* (д, $^3J_{\text{PC}} = 3.0$ Гц, NC=O), 179.5 ($\text{C}\equiv\text{O}$).

Спектр ЯМР ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ (125.78 МГц, CDCl_3 + капля TFA) δ 179.1, 178.9* ($\text{C}\equiv\text{O}$), 159.3, 157.3* (NC=O), 136.9, 135.6, 135.5, 135.2, 134.9, 129.0, 128.9, 128.8, 128.7, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 127.9, 127.1 (all arom.), 68.7*, 68.1, 68.0* (PhCH_2O), 55.8* (д, $^1J_{\text{PC}} 98.6$ Гц, NCHP), 54.6 (д, $^1J_{\text{PC}} 104.3$ Гц, NCHP), 41.1, 40.9* (CHCOOH), 39.7, 39.6, 39.5* (all CH_2Ph), 29.7 27.8* and 27.7 $\{\text{CH}(\text{CH}_3)_2\}$, 28.4 (д, $^1J_{\text{PC}} 88.9$ Гц, PCH_2), 20.5 (д, $^3J_{\text{PC}} 9.7$ Гц, CH_3CH), 17.5, 17.4*, 17.3* (CH_3CH).

Спектр ЯМР ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ (81 МГц, $\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ 45.77*, 46.45.

Спектр ЯМР ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ (81 МГц, CDCl_3 + капля TFA) δ 58.2*, 58.7, 59.4*.

Спектр ЯМР ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ (202.48 МГц, CDCl_3 + капля TFA) δ 51.8*, 53.4*, 53.7.

Вычислено для $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{NO}_6\text{P}$; %: С, 60.96, Н, 6.51, Р, 7.15. Найдено, %: С, 60.53, 60.67; Н, 6.70, 6.67; Р, 7.32, 7.20.

HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : $[\text{M}-\text{H}]^-$ вычислено $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{NO}_6\text{P}^-$ 432.1581, найдено 432.1584

1-(N-Метилоксикарбониламино)-2-фенил-этил-2'-гидроксикарбонил-пропил-фосфиновая кислота (19b)

Выход 0.17 г, 52% (*методика А*).

Белые кристаллы. Т.пл. 129-131°C.

TLC R_f ($\text{CHCl}_3/\text{i-PrOH} \sim 4/1$) ~ 0.20 .

Спектр ЯМР ^1H (200 МГц, CDCl_3 + капля TFA) δ

1.24*, 1.28*, 1.38 (3d, $^3J_{\text{HH}} = 6.1$ Гц, $^3J_{\text{HH}} = 7.2$ Гц и $^3J_{\text{HH}} = 7.2$ Гц, CHCH_3), 1.60-2.15 (м, 1H, один из

CH_2P), 2.25-2.55 (м, 1H, другой из CH_2P), 2.70-3.12 (м, 2H, CH_2Ph), 3.12-3.33 (м, 1H, CHCOOH), 3.51*, 3.63, 3.69*, 3.73*, 3.76* (все с., 3H, CH_3O), 4.20-4.55 (м, 1H, NCHP), 5.65-5.90 и 6.40-6.60* (2м, 1H, NH), 7.20-7.70 (м, 5H, Ph).

Спектр ЯМР ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ (50 МГц, CDCl_3 + капля TFA) δ 18.7 (д, $^3J_{\text{PC}} = 10.7$ Гц, CH_3C), 18.9 (д, $^3J_{\text{PC}} = 11.4$ Гц, CH_3C), 29.2 (д, $^1J_{\text{PC}} = 87.8$ Гц, CH_2P), 29.5 (д, $^1J_{\text{PC}} = 88.1$ Гц, CH_2P), 33.8, 34.5* (CHCOOH), 51.9 (д, $^1J_{\text{PC}} = 102.8$ Гц, NCHP), 52.9* (д, $^1J_{\text{PC}} = 102.1$ Гц, NCHP), 53.8 и 54.0* (CH_3O), 127.3, 127.6, 128.9, 129.0, 130.1 (все ароматические CH), 134.9 (д, $^3J_{\text{PC}} = 11.4$ Гц, C аром.), 135.2* (д, $^3J_{\text{PC}} = 11.1$ Гц, C аром.), 158.6, 159.0*, 159.2* (3д, $^3J_{\text{PC}} = 4.8, 4.4$ и 4.1 Гц, NC=O), 181.6*, 181.7 (CC=O).

Спектр ЯМР ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ (81 МГц, CDCl_3 + капля TFA) δ 57.16*, 57.43*, 57.85, 58.08.

Спектр ЯМР ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ (81 МГц, $\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ 45.54*, 45.80*, 46.26, 46.32.

Вычислено для $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{NO}_6\text{P}$; %: C, 51.07, H, 6.12, P, 9.41. Найдено, %: C, 50.80, 50.67; H, 6.07, 6.23; P, 9.35, 9.20.

HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : $[\text{M-H}]^-$ вычислено $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}_6\text{P}^-$ 328.0953, найдено 328.0959

1-(N-Бензилоксикарбониламино)-2-метил-бутил-2'-гидроксикарбонил-этилфосфиновая кислота (19c)

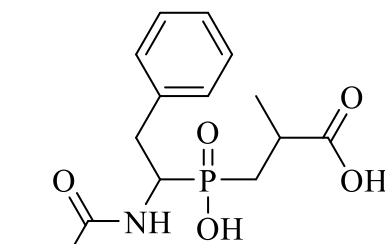
Выход 0.23 г, 64% (*методика А*).

Белые кристаллы. Т.пл. 151-153°C.

TLC R_f ($\text{CHCl}_3/\text{i-PrOH} \sim 4/1$) ~ 0.25 .

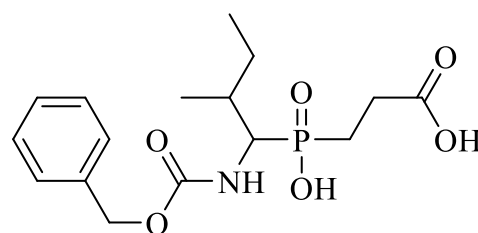
Спектр ЯМР ^1H (200 МГц, CDCl_3 + капля TFA)

δ 0.85-0.92 (м, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Гц и $^3J_{\text{HH}} = 6.7$ Гц, CH_3CH_2), 1.02 (2 уш. д., 3H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Гц,



19b

MeOC(O)-NH-Val-[P]-Phe-OH
Amyloid- β (20-21)



19c

Cbz-NH-Ile-[P]-Gly-OH
Amyloid- β (32-33)

CHCH₃), 1.20-1.70 (м, 2H, CH₂P), 1.85-2.10 (м, 1H, CHCH₃), 2.10-2.33 (м, 2H, CH₂CH₃), 2.60-2.90 (м, 2H, CH₂COOH), 4.00-4.35 (м, 1H, NCHP), 5.16 и 5.23*{2с (уш), 2H, CH₂O}, 5.70-5.88 и 6.50-6.67* (2м, 1H, NH), 7.20-7.50 (м, 5H, Ph).

Спектр ЯМР ¹³C {¹H} (50 МГц, CDCl₃ + капля TFA) δ 10.9* и 11.2 (CH₂CH₃), 14.4*, 14.5, 16.0*, 16.3 (все CHCH₃), 21.6* (д, ¹J_{PC} = 89.6 Гц, CH₂P), 21.8 (д, ¹J_{PC} = 89.2 Гц, CH₂P), 22.0* (д, ¹J_{PC} = 89.9 Гц, CH₂P), 24.6* и 25.9 (CHCH₃), 27.2 (д, ³J_{PC} = 11.8 Гц, CH₂CH₃), 34.1, 34.2*, 34.8, 35.0* (CHCOOH), 52.6 (д, ¹J_{PC} = 105.0 Гц, NCHP), 53.3* (д, ¹J_{PC} = 103.6 Гц, NCHP), 54.8 (д, ¹J_{PC} = 104.3 Гц, NCHP), 55.7* (д, ¹J_{PC} = 103.9 Гц, NCHP), 68.8 и 69.6* (CH₂O), 128.0, 128.7, 128.8, 129.2, 134.3, 134.8 (все ароматические.), 158.1 (д, ³J_{PC} = 4.8 Гц, NC=O), 158.4* (д, ³J_{PC} = 1.8 Гц, NC=O), 178.2* и 178.5 (C=O).

Спектр ЯМР ³¹P {¹H} (81 МГц, d₆-DMSO) δ 47.14*, 47.67.

Спектр ЯМР ³¹P {¹H} (81 МГц, CDCl₃+drops of TFA) δ 60.17*, 60.82.

Вычислено для C₁₆H₂₄NO₆P; %: С, 53.78, Н, 6.77, Р, 8.67. Найдено, %: С, 53.44, 53.57; Н, 6.93, 7.03; Р, 8.55, 8.32.

HRMS (ESI/Q-TOF) m/z: вычислено C₁₆H₂₃NO₆P⁻ 356.1268, найдено 356.1266.

N-Этоксикарбонил-аминометил-2'-гидроксикарбонил-4'-метил-амилфосфиновая кислота (19d)

Выход 0.15 г, 51% (*методика В*).

Белые кристаллы. Т.пл. 125-126.

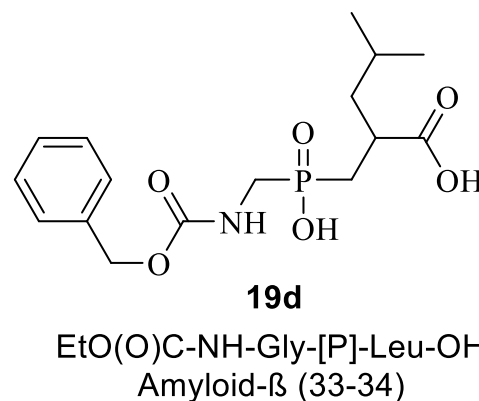
TLC R_f (CHCl₃/EtOH~4/1) ~ 0.25-0.30.

Спектр ЯМР ¹H (200 МГц, CDCl₃ + капля TFA) δ

0.89 (д, 3H, ³J_{HH} = 6.4 Гц, CH₃), 0.92 (д, 3H, ³J_{HH} = 6.4 Гц, CH₃), 1.26 (уш. т. 3H, ³J_{HH} = 6.9 Гц, CH₃),

1.33-1.47 {м, 1H, CH(из i-Bu)}, 1.55-1.70 {м, 2H, CH₂(из i-Bu)}, 1.88-2.11 (м, 1H, один из CH₂P), 2.15-2.43 (м, 1H, другой из CH₂P), 2.77-3.03 {м, 1H, CHC(O)}, 3.70 (уш.д., 2H, ²J_{PH} = 6.4 Гц, NCH₂P), 4.15 (уш. кв., 2H, ³J_{HH} = 6.9 Гц, CH₂O), 5.35-5.95 и 6.45-6.70* (2м, 1H, NH).

Спектр ЯМР ¹³C {¹H} (50 МГц, CDCl₃ + капля TFA) δ 13.6* (CH₃CH₂), 14.0, 21.8, 22.0, 25.6 (CH₃CH₂), 28.7, 37.1 (д, ¹J_{PC} = 90.8 Гц, PCH₂), 40.1 (д, ¹J_{PC} = 100.3 Гц,



NCH₂), 40.6* (д, ¹J_{PC} = 100.3 Гц, NCH₂), 42.9 (д, ³J_{PC} = 12.8 Гц), 63.4 (CH₂O), 64.0* (CH₂O), 158.6 (NC=O), 181.4 (C=C=O).

Спектр ЯМР ³¹P {¹H} (81 МГц, CDCl₃ + капля TFA) δ 53.72*, 54.51.

Вычислено для C₁₁H₂₂NO₆P; %: С, 44.75, Н, 7.51, Р, 10.49. Найдено, %: С, 44.43, 44.53; Н, 7.73, 7.67; Р, 10.35, 10.22.

HRMS (ESI/Q-TOF) m/z: [M-H]⁻ вычислено C₁₁H₂₁NO₆P⁻ 294.1107, найдено 294.1113.

N-Бензилоксикарбонил-аминометил-2'-

гидроксикарбонил-этилфосфиновая кислота (19e)

Выход: 0.14 г, 46% (**методика В**).

Белые кристаллы. Т.пл.. 134-135.

TLC R_f (CHCl₃/i-PrOH~4/1) = 0.30.

Спектр ЯМР ¹H (200 МГц, d₆-DMSO) δ 2.12-2.41 (дт, 2H, ³J_{HH} = 7.5 Гц, ²J_{PH} = 12.8 Гц, CH₂P), 2.27-2.45 {м, 2H, CH₂C(O)}, 3.29 (дд, 2H, ³J_{HH} = 7.0 Гц, ²J_{PH} = 7.5 Гц, PCH₂N), 5.03 (с, 2H, CH₂O), 7.22-7.44 (м, 5H, Ph), 7.61 (м, 1H, NH).

Спектр ЯМР ¹H (200 МГц, CDCl₃ + капля TFA) δ 2.12-2.41 (м, 2H, CH₂P), 2.65-2.95 {м, 2H, CH₂C(O)}, 3.83 (д. уш., 2H, ²J_{PH} = 6.9 Гц, PCH₂N), 5.10-5.27 (м, 2H, CH₂O), 5.73-5.97 (м, 1H, NH), 6.62-6.83* (м, 1H, NH), 7.36 (м. уш., 5H, Ph).

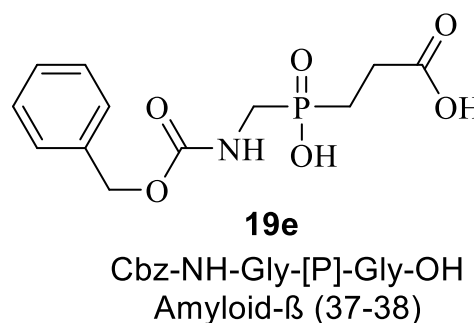
Спектр ЯМР ¹³C {¹H} (50 МГц, CDCl₃ + капля TFA) δ_C, ppm: 21.5 (д, ¹J_{PC} = 92.6 Гц, PCH₂C), 26.0 {CH₂C(O)}, 39.6 (д, ¹J_{PC} = 102.8 Гц, NCH₂P), 40.1* (д, ¹J_{PC} = 99.2 Гц, NCH₂P), 68.6, 69.2* (CH₂O), 128.1, 128.7(4C), 134.9 (все аром.), 158.0 (NC=O), 177.4*, 177.6 (C=C=O).

Спектр ЯМР ³¹P {¹H} (81 МГц, CDCl₃ + капля TFA) δ 58.01.

Спектр ЯМР ³¹P {¹H} (81 МГц, d₆-DMSO): δ 44.33.

Вычислено для C₁₂H₁₆NO₆P; %: С, 47.85; Н, 5.35; N, 4.65. Найдено: С, 47.52, 47.40; Н, 5.62, 5.53; N, 4.46, 4.33.

HRMS (NSI/Q-TOF) m/z: [M-H]⁻ вычислено C₁₂H₁₅NO₆P⁻ 300.0637, найдено 300.0642.



1-(N-Бензилоксикарбониламино)-2-метил-бутил-2'-гидроксикарбонил-пропилфосфиновая кислота (19f)

Выход 0.19 г, 51% (*методика А*).

Белые кристаллы. Т.пл. 166-167°C.

TLC R_f ($\text{CHCl}_3/\text{i-PrOH} \sim 4/1$) ~ 0.35 .

Спектр ЯМР ^1H (200 МГц, CDCl_3 + капля TFA)

δ 0.85*, 0.92 (2д, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Гц и $^3J_{\text{HH}} = 6.6$

Гц, CHCH_3), 1.01 (т, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Гц,

CH_2CH_3), 1.20-1.70 (м, 2H, CH_2P), 1.28* и 1.34 (2д, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Гц и $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Гц,

HOOCCHCH_3), 1.80-2.12 (м, 2H, CH_2CH_3), 2.20-2.50 (м, 1H, CHCH_3), 2.84-3.11 (м,

1H, CHCOOH), 3.90-4.30 (м, 1H, NCHP), 5.16, 5.24*, 5.22* {3с (уш), 2H, CH_2O }, 5.70-

5.87 и 6.52-6.67* (2м, 1H, NH), 7.15-7.50 (м, 5H, Ph).

Спектр ЯМР ^{13}C { ^1H } (50 МГц, CDCl_3 + капля TFA) δ 11.0*, 11.2 (CH_2CH_3), 14.4*,

14.6, 16.3*, 18.8 (все CHCH_3), 24.4* и 24.6 (CHCH_3), 27.2 (д, $^3J_{\text{PC}} = 10.7$ Гц, CH_2CH_3),

29.9* (д, $^1J_{\text{PC}} = 84.4$ Гц, CH_2P), 30.1 (д, $^1J_{\text{PC}} = 89.6$ Гц, CH_2P), 30.4* (д, $^1J_{\text{PC}} = 89.6$ Гц,

CH_2P), 30.6* (д, $^1J_{\text{PC}} = 85.5$ Гц, CH_2P), 33.7 (уш) (все CHCOOH), 33.9 (д, $^2J_{\text{PC}} = 5.5$

Гц), 34.1 (д, $^2J_{\text{PC}} = 3.7$ Гц), 34.8* (д, $^2J_{\text{PC}} = 5.5$ Гц), 34.9* (д, $^2J_{\text{PC}} = 4.8$ Гц), 53.0 (д, $^1J_{\text{PC}}$

$= 97.7$ Гц, NCHP), 53.1* (д, $^1J_{\text{PC}} = 95.8$ Гц, NCHP), 53.2* (д, $^1J_{\text{PC}} = 96.9$ Гц, NCHP),

68.5*, 68.8, 69.5* (все CH_2O), 128.0, 128.7, 128.8, 129.2, 134.3, 134.8 (все аром.),

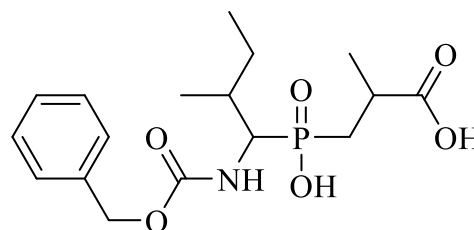
158.0 и 158.5* (NC=O), 181.8 и 181.9* (CC=O).

Спектр ЯМР ^{31}P { ^1H } (81 МГц, CDCl_3 + капля TFA) δ 59.7, 60.12, 60.44.

Вычислено для $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{NO}_6\text{P}$; %: С, 54.98, Н, 7.06, Р, 8.34. Найдено, %: С, 54.64,

54.47; Н, 7.33, 7.40; Р, 8.45, 8.32.

HRMS (NSI/Q-TOF) m/z : $[\text{M-H}]^-$ вычислено $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{NO}_6\text{P}^-$ 370.1420, найдено 370.1429



19f

Cbz-NH-Ile-[P]-Ala-OH
Amyloid- β (41-42)

Фрагменты спектров ^{13}C ЯМР при превращении: пептид 19-лактон 19'

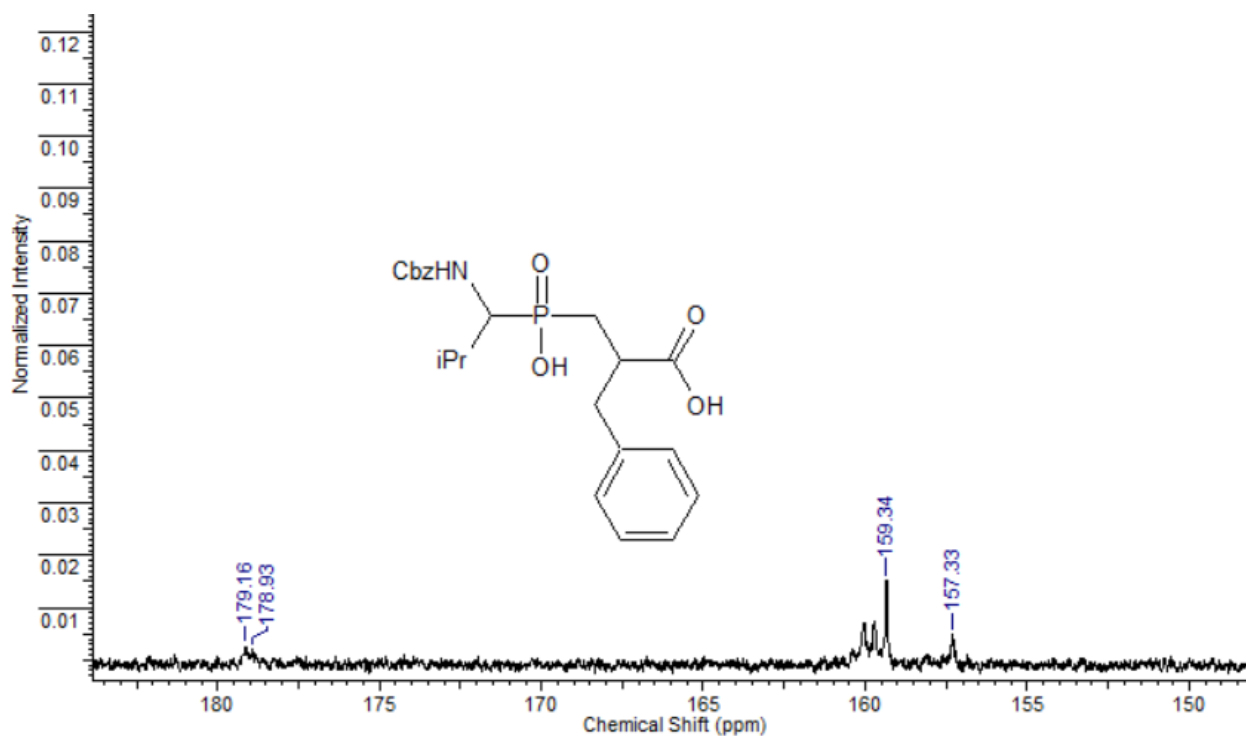


Рисунок 17. Фрагмент $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР спектра исходного псевдо-валил-фенилаланина 19а

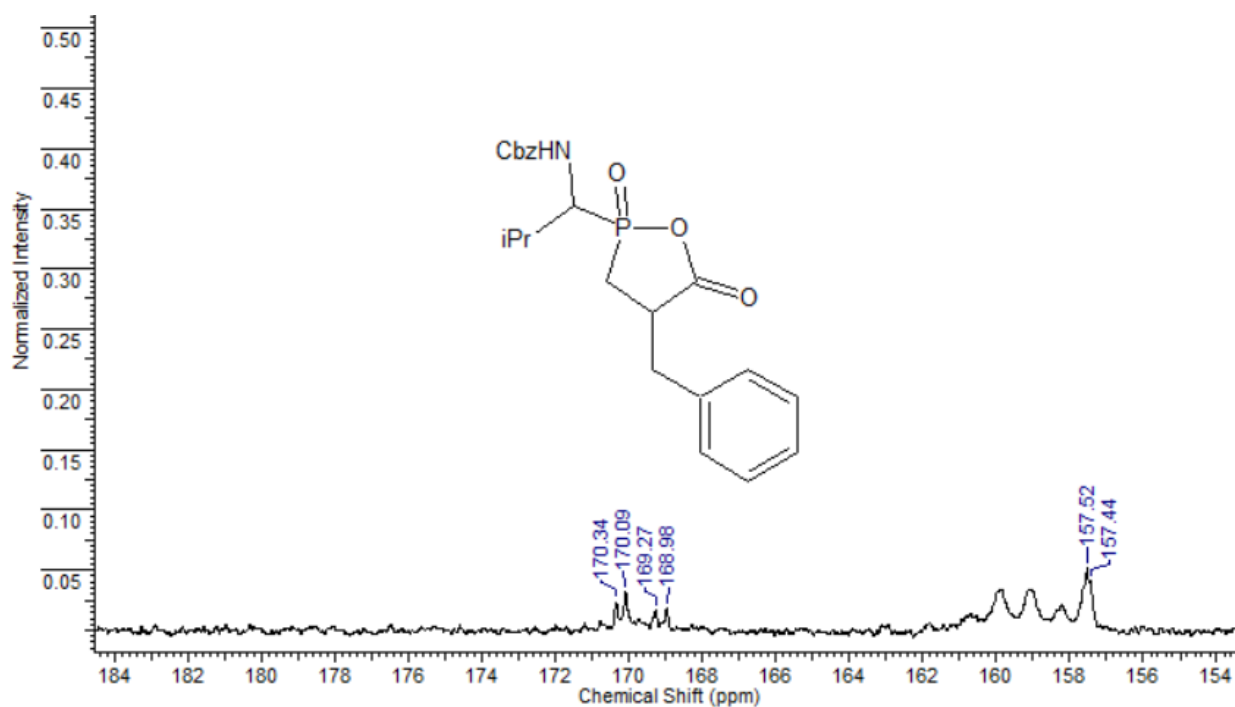


Рисунок 18. Фрагмент $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР спектра ($\text{CDCl}_3 + \text{TFAA}$) генерируемого *in situ* фосфолактона 19а' в результате дегидратации псевдо-валил-фенилаланина 19а

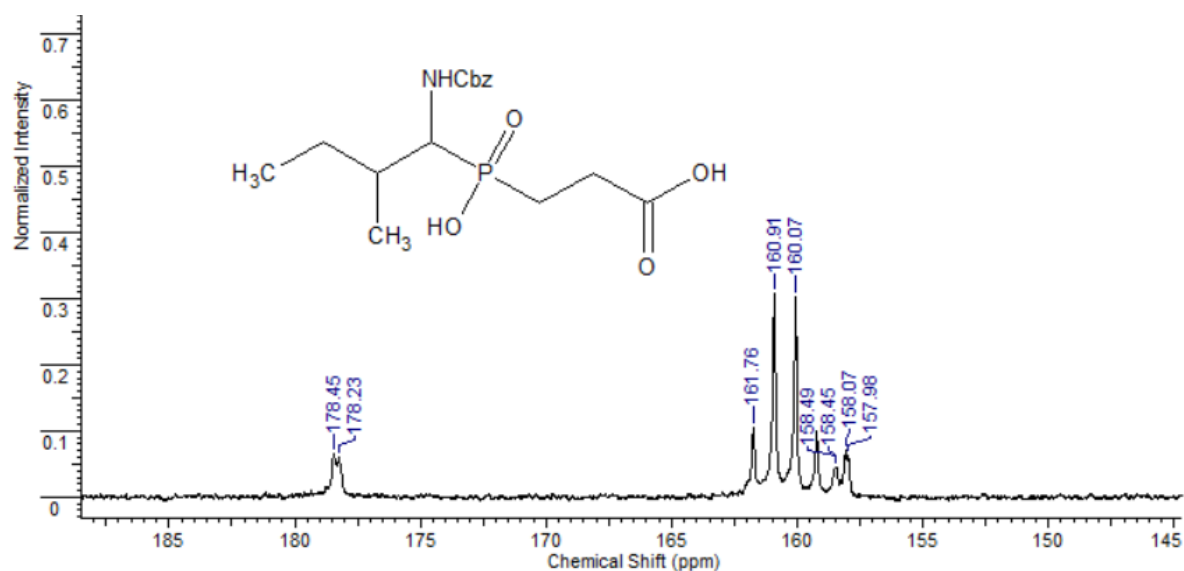


Рисунок 19. Фрагмент $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР спектра исходного псевдо-изолейцил-глицина 19с

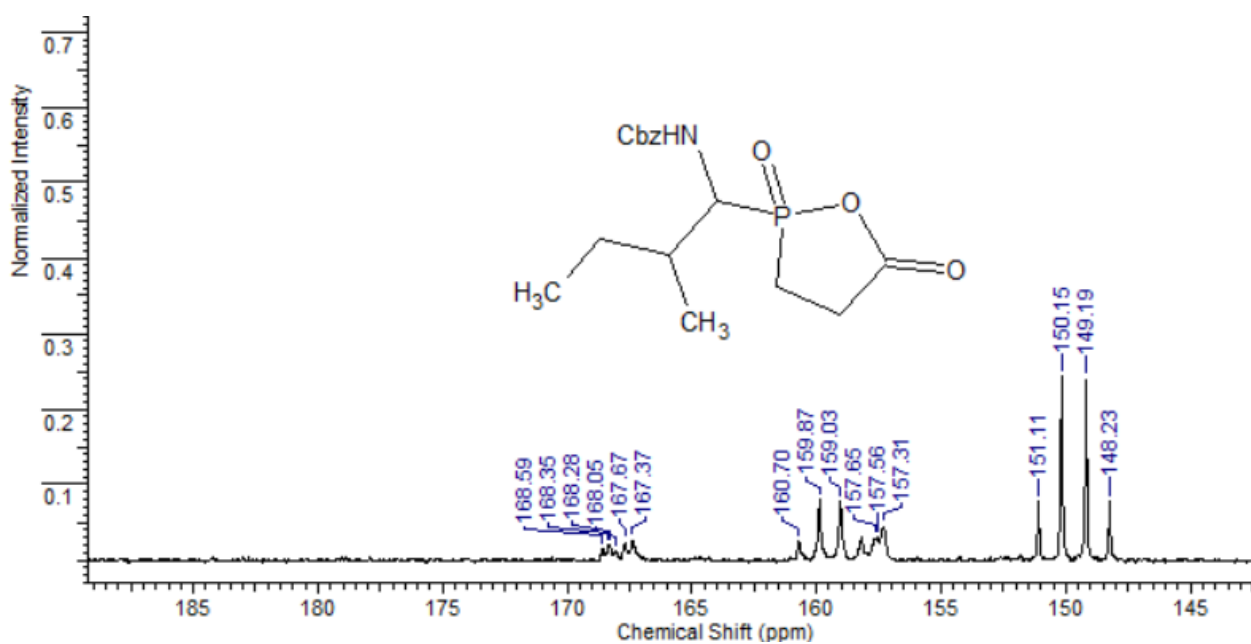


Рисунок 20. Фрагмент $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР спектра ($\text{CDCl}_3 + \text{TFAA}$) генерируемого *in situ* фосфолактона 19с' в результате дегидратации псевдо-изолейцил-глицина 19с

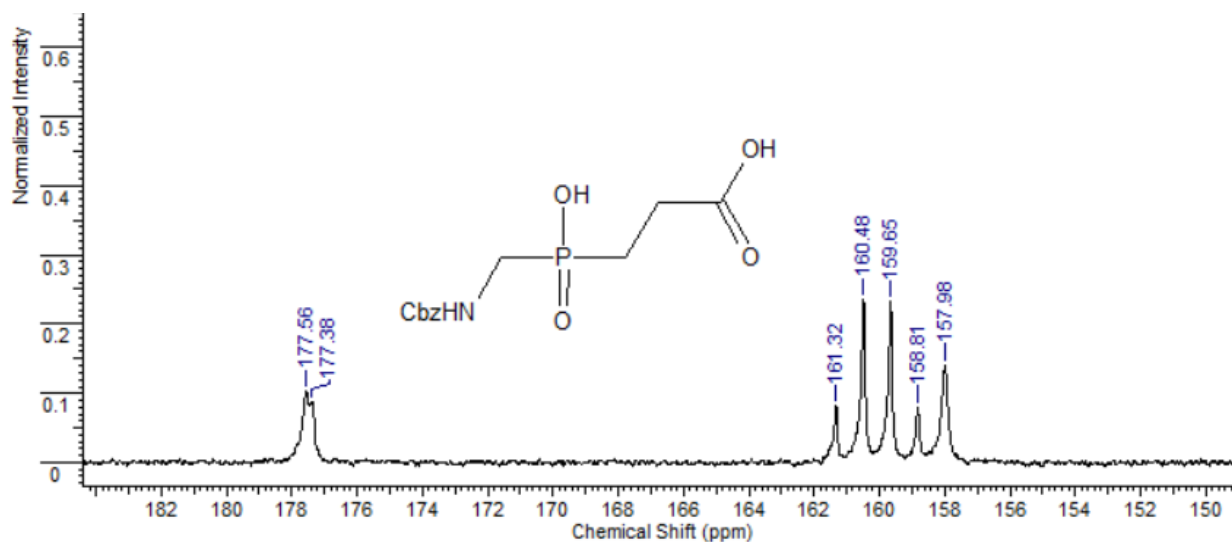


Рисунок 21. Фрагмент $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР спектра исходного псевдо-глицил-глицина 19e

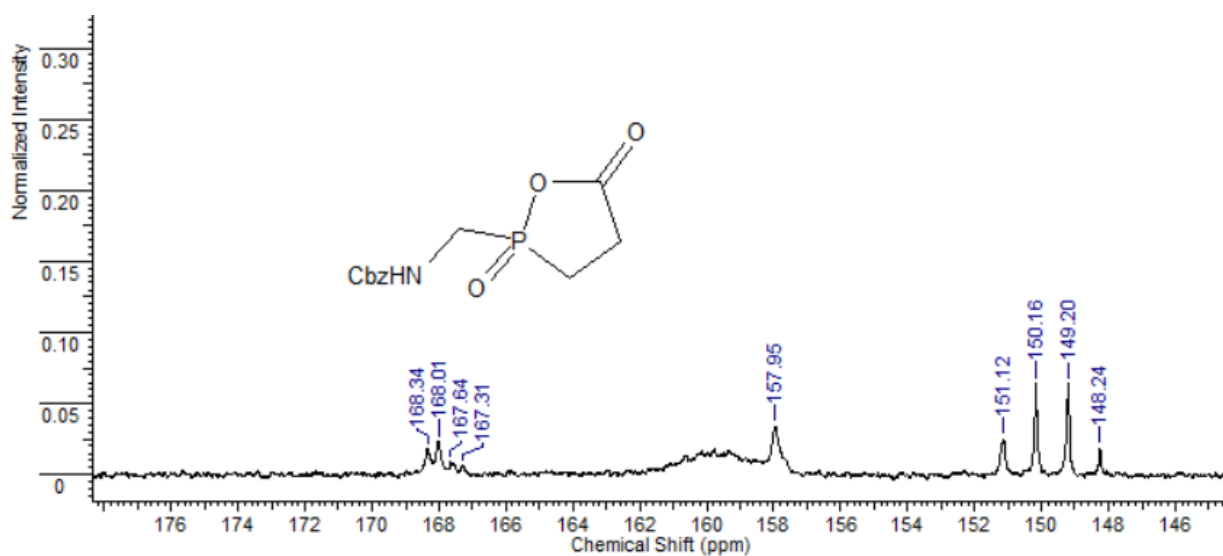


Рисунок 22. Фрагмент $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР спектра ($\text{CDCl}_3 + \text{TFAA}$) генерируемого *in situ* фосфолактона 19e' в результате дегидратации псевдо-глицил-глицина 19e

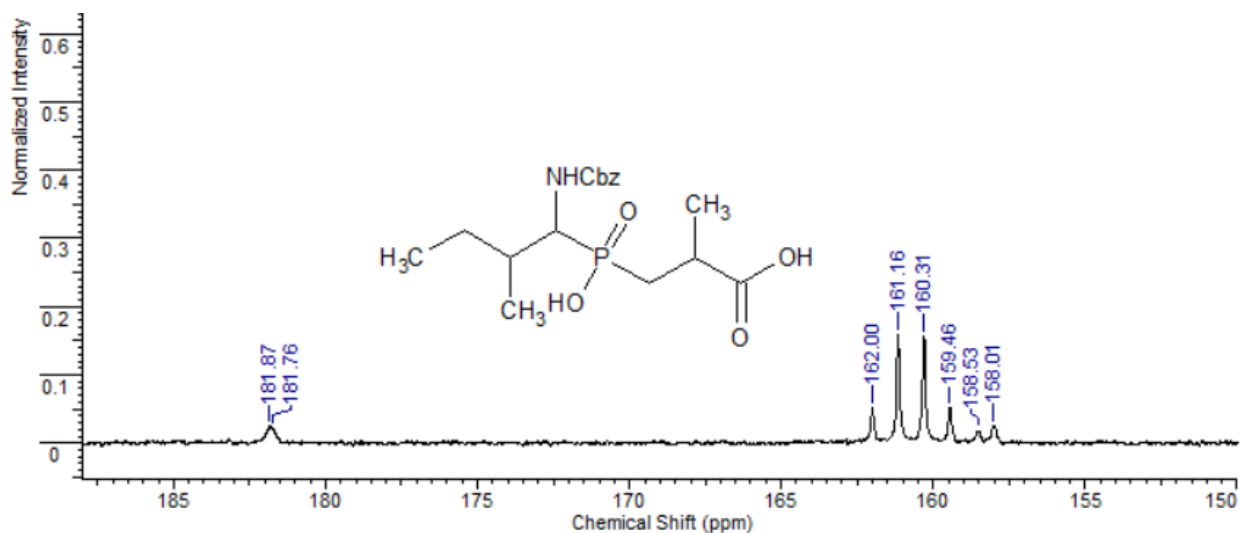


Рисунок 23. Фрагмент $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР спектра исходного псевдо-изолейцил-аланина 19f

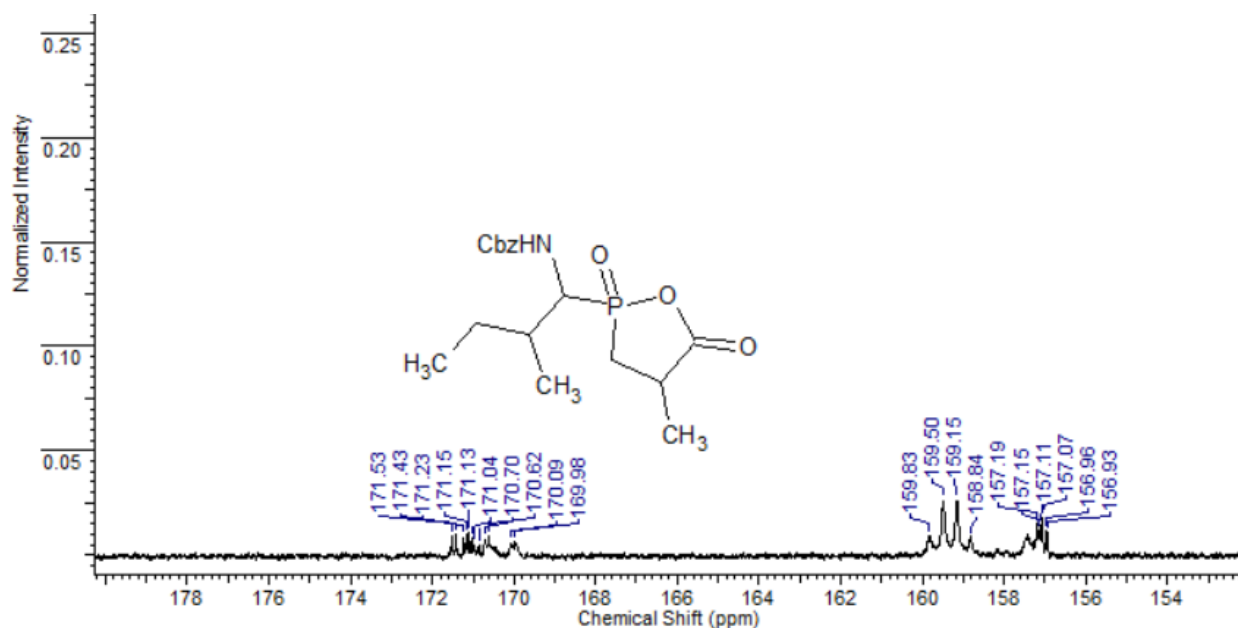


Рисунок 24. Фрагмент $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ЯМР спектра ($\text{CDCl}_3 + \text{TFAA}$) генерируемого *in situ* фосфолактона 19 f' в результате дегидратации псевдо-изолейцил-аланина 19f

3.6 Ацетали в А+N+РС процедуре синтеза фосфиновых пептидов

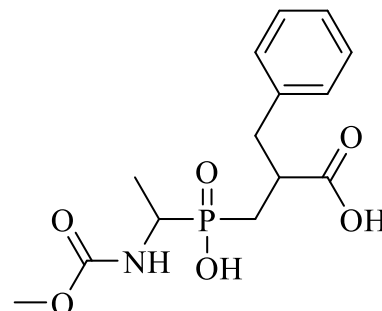
1-(N-Метилоксикарбониламино)-этил-2'-гидроксикарбонил-2'-бензилэтилфосфиновая кислота (20)

Аналог аланил-фенилаланина (Ala-P-Phe) получен из диэтилацетала уксусного альдегида $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OEt})_2$.

Выход = 58%. Белые кристаллы.

Температура плавления 146-148°C.

ТСХ Rf (CHCl_3 / i-PrOH ~4/1) ~ 0.30.



Спектр ЯМР ^1H (200 МГц, d_6 -DMSO+капля TFA) δ =

20

1.16 (дд, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Гц, $^3J_{\text{PH}} = 13.2$ Гц, CH_3CH), 1.55-1.80 (м, 1H, один из PCH_2), 1.80-2.05 (м, 1H, другой из PCH_2), 2.73-3.03 {м, 3H, $\text{CH}_2\text{Ph} + \text{CHC}(\text{O})\text{OH}$ }, 3.52 {уш.с., CH_3O }, 3.60-3.75 (м, 1H, PCHN), 7.10-7.45 (м, 6H, $\text{Ph} + \text{NH}$).

Спектр ЯМР ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ (50 МГц, d_6 -DMSO) δ = 14.0 (CH_3C), 27.4* (д, $^1J_{\text{PC}} = 87.8$ Гц, PCH_2), 27.8 (д, $^1J_{\text{PC}} = 84.9$ Гц, PCH_2), 38.5 (д, $^3J_{\text{PC}} = 20.9$ Гц, CH_2Ph), 40.7 ($\text{CHC}=\text{O}$), 45.6* (д, $^1J_{\text{PC}} = 106.5$ Гц, PCHN), 46.1 (д, $^1J_{\text{PC}} = 105.4$ Гц, PCHN), 51.6 (CH_3O), 126.2, 128.2, 129.0 (все ароматические), 156.4 ($\text{NC}=\text{O}$), 175.3 (д, $^3J_{\text{PC}} = 5.9$ Гц, $\text{CHC}=\text{O}$).

Спектр ЯМР ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ (81 МГц, d_6 -DMSO + капля TFA) δ 44.7.

Вычислено $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{NO}_6\text{P}$; %: С, 51.07, Н, 6.12, Р, 9.41. Найдено, %: С, 50.83, 50.67; Н, 6.30, 6.27; Р, 9.32, 9.20.

HRMS (ESI/Q-TOF) m/z: $[\text{M}-\text{H}]^-$ вычислено для $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}_6\text{P}^-$ 328.0955, найдено 328.0960.

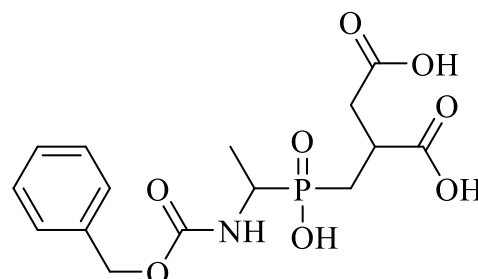
1-(N-Бензилоксикарбониламино)-этил-2',3'-дигидроксикарбонил-пропилфосфиновая кислота (21)

Аналог аланил-аспартата (Ala-P-Asp) получен из диэтилацеталь уксусного альдегида $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OEt})_2$

Выход = 43%. Белые кристаллы.

Температура плавления 154-156°C.

ТСХ R_f (CHCl_3 / i-PrOH ~4/1) ~ 0.30.



21

Спектр ЯМР ^1H (200 МГц, d_6 -DMSO + капля TFA)

δ ~1.08* (частично закрыт, CH_3CH), 1.16 (дд, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 5.3$ Гц, $^3J_{\text{PH}} = 13.7$ Гц, CH_3CH), 1.55-1.85 (м, 1H, один из PCH_2), 1.80-2.15 (м, 1H, другой из PCH_2), 2.55-2.80 (м, 2H, CH_2COOH), 2.80-3.12 (м, 1H, CHCOOH), 3.60-3.85 (м, 1H, PCHN), 3.85-4.10* (м, 1H, PCHN), 4.85-5.15 {уш.с., 2H, OCH_2Ph }, 7.10-7.65 (м, 6H, $\text{Ph}+\text{NH}$).

Спектр ЯМР ^1H (200 МГц, d_6 -ацетон + капля TFA) $\delta = 1.23^*$ (дд, $^3J_{\text{HH}} = 5.3$ Гц, $^3J_{\text{PH}} = 16.8$ Гц, CH_3CH), 1.42 (дд, $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Гц, $^3J_{\text{PH}} = 15.4$ Гц, CH_3CH), 1.53* (д, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Гц, часть дд частично закрыта, CH_3CH) (в сумме все 3H), 2.10-2.32 (м, 1H, один из PCH_2), 2.40-2.60 (м, 1H, другой из PCH_2), 2.83 {уш.д., 2H, $^3J_{\text{HH}} = 5.3$ Гц, CH_2COOH }, 3.14-3.34 (м, 1H, CHCOOH), 4.10-4.35 (м, 1H, PCHN), 4.90-5.20 {уш.с., 2H, OCH_2Ph }, 6.65-6.80 и 6.85-7.00* (м, 1H, NH), 7.20-7.40 (м, 5H, Ph).

Спектр ЯМР ^{13}C {1H} (50 МГц, d_6 -DMSO) $\delta = 14.0$ и 15.2^* (CH_3), 24.6^* (д, $^1J_{\text{PC}} = 82.9$ Гц, PCH_2), 26.9^* (д, $^1J_{\text{PC}} = 89.2$ Гц, PCH_2), 27.0 (д, $^1J_{\text{PC}} = 88.1$ Гц, PCH_2), 34.8 и 34.9^* (CHC=O), 35.7^* и 35.9 ($\text{CH}_2\text{C=O}$), 46.0^* (д, $^1J_{\text{PC}} = 105.8$ Гц, PCHN), 46.2 (д, $^1J_{\text{PC}} = 105.4$ Гц, PCHN), 65.7 (CH_2Ph), 127.8 , 127.9 , 128.5 , 137.1 (все ароматические), 155.9 (д, $^3J_{\text{PC}} = 4.8$ Гц, NC=O), 173.0 ($\text{CH}_2\text{C=O}$), 175.3 (д, $^3J_{\text{PC}} = 12.9$ Гц, CHC=O).

Спектр ЯМР ^{31}P {1H} (81 МГц, d_6 -DMSO + капля TFA) $\delta = 46.1^*$, 46.5^* , 47.2 , 47.5 , 52.7^* , 53.3^* , 53.8^* .

Вычислено $C_{15}H_{20}NO_8P$; %: С, 48.26, Н, 5.40, Р, 8.30. Найдено, %: С, 47.86, 47.96; Н, 5.52, 5.60; Р, 8.42, 8.52.

HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : $[M-H]^-$ вычислено для $C_{15}H_{19}NO_8P^-$ 372.0848, найдено 372.0855.

1-(N-Метилкарбониламино)-2-фенил-этил-2'-гидроксикарбонил-пропилфосфиновая кислота (22)

Аналог фенилаланил-аланина (Phe-P-Ala) получен из диметилацетата фенилуксусного альдегида $PhCH_2CH(OMe)_2$

Выход 52%. Белый порошок. Т.пл. 129-131°C.

ТСХ R_f ($CHCl_3$ / i-PrOH ~4/1) ~ 0.20.

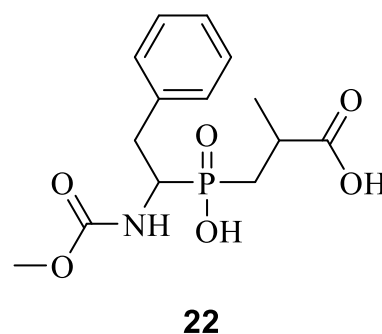
Спектр ЯМР 1H (200 МГц, $CDCl_3$ + капля TFA) δ 1.24*, 1.28*, 1.38 (3д, $^3J_{HH} = 6.1$ Гц, $^3J_{HH} = 7.2$ Гц и $^3J_{HH} = 7.2$ Гц, $CHCH_3$), 1.60-2.15 (м, 1Н, один из CH_2P), 2.25-2.55

(м, 1Н, другой из CH_2P), 2.70-3.12 (м, 2Н, CH_2Ph), 3.12-3.33 (м, 1Н, $CHCOOH$), 3.51*, 3.63, 3.69*, 3.73*, 3.76* (все с, 3Н, CH_3O), 4.20-4.55 (м, 1Н, $NCHP$), 6.40-6.60* и 5.65-5.90 (2м, 1Н, NH), 7.20-7.70 (м, 5Н, Ph).

Спектр ЯМР ^{13}C { 1H } (50 МГц, $CDCl_3$ + капля TFA) δ 18.7 (д, $^3J_{PC} = 10.7$ Гц, CH_3C), 18.9 (д, $^3J_{PC} = 11.4$ Гц, CH_3C), 29.2 (д, $^1J_{PC} = 87.8$ Гц, CH_2P), 29.5 (д, $^1J_{PC} = 88.1$ Гц, CH_2P), 33.8, 34.5* ($CHCOOH$), 51.9 (д, $^1J_{PC} = 102.8$ Гц, $NCHP$), 52.9* (д, $^1J_{PC} = 102.1$ Гц, $NCHP$), 53.8 и 54.0* (CH_3O), 127.3, 127.6, 128.9, 129.0, 130.1 (все аром. CH), 134.9 (д, $^3J_{PC} = 11.4$ Гц, С аром.), 135.2* (д, $^3J_{PC} = 11.1$ Гц, С аром.), 158.6, 159.0*, 159.2* (3д, $^3J_{PC} = 4.8, 4.4$ и 4.1 Гц, $NC=O$), 181.6*, 181.7 ($CC=O$).

Спектр ЯМР ^{31}P { 1H } (81 МГц, $CDCl_3$ + капля TFA) δ 57.16*, 57.43*, 57.85, 58.08.

Спектр ЯМР ^{31}P { 1H } (81 МГц, d_6 -DMSO) δ 45.54*, 45.80*, 46.26, 46.32.



Вычислено для $C_{14}H_{20}NO_6P$; %: С, 51.07, Н, 6.12, Р, 9.41. Найдено, %: С, 50.67; Н, 6.07, 6.23; Р, 9.20, 9.35.

HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : $[M-H]^-$ вычислено для $C_{14}H_{19}NO_6P^-$ 328.0953, найдено 328.0959

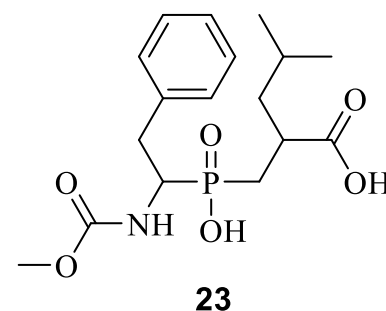
1-(N-Метилоксикарбониламино)-2-фенил-этил-2'-гидроксикарбонил-4'-метил-амилфосфиновая кислота (23)

Аналог фенилаланил-лейцина (Phe-P-Leu) получен из диметилацетата фенилуксусного альдегида $PhCH_2CH(OMe)_2$

Выход = 51%. Белые кристаллы.

Т. пл. 200-202°C.

ТСХ ($CHCl_3$ / i-PrOH~4/1) ~ 0.30.



Спектр ЯМР 1H (200 МГц, $CDCl_3$ + капля TFA) δ = 0.89

(д, 3H, $^3J_{HH} = 6.1$ Гц, $CHMe$), 0.92 (д, 3H, $^3J_{HH} = 6.1$ Гц, $CHMe$), 1.27-1.47 (м, 1H, $CHMe_2$), 1.45-1.75 (м, 2H, CH_2CHMe_2), 1.83-2.13 (м, 1H, один из PCl_2), 2.15-2.45 (м, 1H, другой из PCl_2), 2.70-3.05 (м, 2H, CH_2Ph), 3.10-3.30 (м, 1H, $CHCOOH$), 3.50* и 3.62 (с, 3H, CH_3O), 4.15-4.53 (м, 1H, PCl_2), 5.62-5.86 и 6.45-6.65* (м, 1H, NH), 7.10-7.45 (м, 5H, Ph).

Спектр ЯМР ^{13}C { 1H } (50 МГц, d_6 -DMSO) δ = 21.9 ($CHCH_3$), 23.0* ($CHCH_3$), 25.7 { $CH(CH_3)_2$ }, 28.9* (д, $^1J_{PC} = 88.2$ Гц, PCl_2), 29.1 (д, $^1J_{PC} = 88.6$ Гц, PCl_2), 33.0, 33.4*, 33.7* (CH_2Ph), 37.1 ($CHCOOH$), 42.9 (д, $^3J_{PC} = 8.8$ Гц, $CH_2CHCOOH$), 43.2* (д, $^3J_{PC} = 10.2$ Гц, $CH_2CHCOOH$), 51.7 (CH_3O), 52.1* (д, $^1J_{PC} = 103.6$ Гц, PCl_2), 52.5 (д, $^1J_{PC} = 104.4$ Гц, PCl_2), 126.4, 128.3, 129.1 (все ароматические), 138.6 (д, $^3J_{PC} = 13.9$ Гц, С аром.), 156.8 ($NC=O$), 176.5 (д, $^3J_{PC} = 7.3$ Гц, $CHC=O$).

Спектр ЯМР ^{31}P { 1H } (81 МГц, d_6 -DMSO) δ 45.7.

Спектр ЯМР ^{31}P { 1H } (81 МГц, $CDCl_3$ + капля TFA) δ 58.5.

Вычислено для $C_{17}H_{26}NO_6P$; %: С, 54.98, Н, 7.06, Р, 8.34. Найдено, %: С, 54.66, 54.72; Н, 7.22, 7.30; Р, 8.40, 8.23.

HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : $[M-H]^-$ вычислено для $C_{17}H_{25}NO_6P^-$ 370.1425, найдено 370.1426.

Аналог фенилаланил-фенилаланина (Phe-P-Phe) получен из диметилацетала фенилуксусного альдегида $PhCH_2CH(OMe)_2$

1-(N-Этилоксикарбониламино)-2-фенил-этил-2'-гидроксикарбонил-2'-бензил-этилфосфиновая кислота (24)

Выход = 47%. Белые кристаллы.

Т. пл. 97-100°C.

TLC R_f ($CHCl_3$ / i-PrOH~4/1) ~ 0.25.

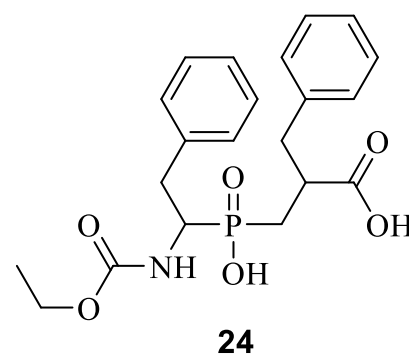
Спектр ЯМР 1H (200 МГц, d_6 -ацетон + капля TFA) δ = 1.04 (т, 3H, $^3J_{HH} = 6.9$ Гц, $CH_3+м$, CH_3^*), 1.10-1.40 (м, 1H, один из $РCH_2$), 1.40-1.75 (м, 1H, другой из $РCH_2$), 2.20-2.55 (м, 1H, $CHCOOH$), 2.75-3.40 (м, 4H, $2CH_2Ph$), 3.80-4.40 (м, 3H, $CH_2O+PCHN$), 6.90-7.55 (м, 11H, $2Ph+NH$).

Спектр ЯМР ^{31}P $\{^1H\}$ (81 МГц, d_6 -ацетон) δ 50.1*, 50.6*, 51.8.

Спектр ЯМР ^{31}P $\{^1H\}$ (81 МГц, d_6 -ацетон + капля D_2O) δ 47.3*, 48.3.

Вычислено %: С, 60.14, Н, 6.25, Р, 7.38. $C_{21}H_{26}NO_6P$; Найдено, %: С, 59.67, 59.76; Н, 6.42, 6.50; Р, 7.40, 7.25.

HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : $[M-H]^-$ вычислено для $C_{21}H_{25}NO_6P^-$ 418.1425, найдено 418.1427.



1-(N-Бензилоксикарбонил)амино-2-фенил-этил-2'--гидроксикарбонил-2'-бензил-этилфосфиновая кислота (25)

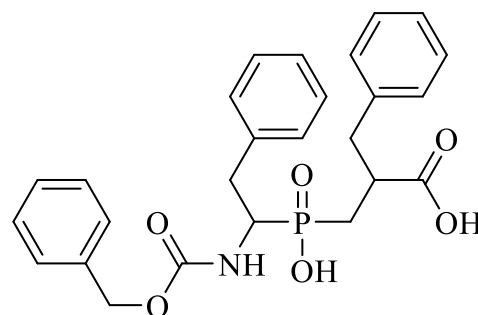
Аналог фенилаланил-фенилаланина (**Cbz-NH-Phe-[P]-Phe-OH**) получен из диметилацетала фенилуксусного альдегида $\text{PhCH}_2\text{CH}(\text{OMe})_2$

Выход 57%. Т. пл. 147-150 °С. Белый порошок.

ТСХ: $R_f \sim 0.20$ (CHCl_3 -i-PrOH-АсОН, 10:1:1).

Спектр ЯМР ^1H ($\text{DMCO-d}_6 + 1 \div 2$ капли TFA), δ , м.

д.: 1.00-1.25 м (1H, один из PCH_2), 1.65-2.00 м (1H, второй из PCH_2), 2.60-3.15 м (4H, 2PhCH_2), 3.35-3.70 м (1H, CHCOOH), 3.75-4.10 (1H, PCHN), 4.76-5.17 м (CH_2O), 6.82-7.77 м (16H, $3\text{Ph} + \text{NH}$).



25

Спектр ЯМР ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ ($\text{DMCO-d}_6 + 1 \div 2$ капли TFA, δ , м. д.): 24.5 (CH_2), 24.8* д (PCH_2 , $^1J_{\text{PC}} = 88.9$ Гц), 28.2 д (PCH_2 , $^1J_{\text{PC}} = 88.6$ Гц), 33.1 (PhCH_2), 41.7 42.0* (PCH_2CH), 52.2* д (PCHN , $^1J_{\text{PC}} = 104.7$ Гц), 52.8 д (PCHN , $^1J_{\text{PC}} = 104.7$ Гц), 65.3*, 65.5 (PhCH_2O), 126.6, 127.4, 128.0, 128.5, 129.3, 137.5, 138.5, 139.0 (все аром.), 156.3 (NCO), 157.0* (NCO), 175.1* д (COO , $^3J_{\text{PC}} = 9.5$ Гц), 175.5 д (COO , $^3J_{\text{PC}} = 7.3$ Гц).

Спектр ЯМР ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ (DMCO-d_6 , δ , м. д.): 45.8, 51.7*, 52.5*.

Найдено, %: С 64.33; Н 6.08; Р 6.65. $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{NO}_6\text{P}$. Вычислено, %: С 64.86; Н 5.86; Р 6.43.

HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : $[\text{M-H}]^-$ вычислено для $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{NO}_6\text{P}^-$ 480.1581, найдено 480.1580.

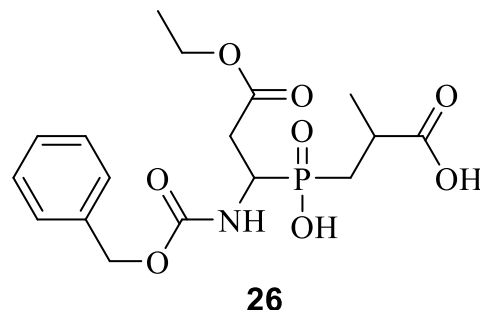
Далее представлены данные псевдопептидов, содержащих изостер N-защищенного N-терминального аспартата (в виде этилового эфира), которые были получены из диэтилацетала этилоксикарбонилуксусного альдегида $\text{EtOC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}(\text{OEt})_2$

**1-(N-Бензилоксикарбонил)амино-2-этилоксикарбонил-этил-2'-
гидроксикарбонил-пропилфосфиновая кислота (Cbz-NH-Asp(OEt)-[P]-Ala-
OH) (26)**

Выход = 47%. Белые кристаллы.

Т. пл. 127-130°C.

TLC R_f (CHCl₃ / i-PrOH~4/1) ~ 0.30.



Спектр ЯМР ¹H (200 МГц, CDCl₃ + капля TFA) δ
= 1.22 (т, 3H, ³J_{HH} = 6.6 Гц, CH₂CH₃), 1.31 (д, 3H,
³J_{HH} = 5.7 Гц, CHCH₃), 1.80-2.10 (м, 1H, один из PCH₂), 2.20-2.50 (м, 1H, другой из
PCH₂), 2.67-3.13 {м, 3H, CHC(O) + CH₂C(O)}, 4.15 {уш.кв, ³J_{HH} = 6.6 Гц, CH₂O},
4.40-4.70 (м, 1H, PCHN), 5.13 и 5.24* {уш.с., 2H, PhCH₂O}, 5.95-6.25 и 6.55-6.75* (м,
1H, NH),

Спектр ЯМР ¹³C {¹H} (50 МГц, CDCl₃ + капля TFA) δ = 13.5 и 13.9* (CH₃CH₂), 18.7
(д, ³J_{PC} = 11.4 Гц, CH₃CH), 18.9* (д, ³J_{PC} = 11.4 Гц, CH₃CH), 29.1* (д, ¹J_{PC} = 90.7 Гц,
PCH₂), 29.2 (д, ¹J_{PC} = 91.0 Гц, PCH₂), 29.4* (д, ¹J_{PC} = 91.8 Гц, PCH₂), 33.7 (CHC=O),
46.9 (д, ¹J_{PC} = 105.4 Гц, PCHN), 47.1 (д, ¹J_{PC} = 103.2 Гц, PCHN), 61.2*, 62.8*, 63.0
(все OCH₂CH₃), 68.5*, 68.8, 69.5* (все OCH₂Ph), 128.1, 128.3*, 128.5*, 128.7, 129.1*,
129.2, 134.3*, 134.8 (все ароматические), 157.3 (д, ³J_{PC} = 3.3 Гц, NC=O), 157.6* (д,
³J_{PC} = 4.1 Гц, NC=O), 172.6* (д, ³J_{PC} = 4.1 Гц, CH₂C=O), 172.8 (д, ³J_{PC} = 4.1 Гц,
CH₂C=O), 181.4 (д, ³J_{PC} = 5.2 Гц, CHC=O).

Спектр ЯМР ³¹P {¹H} (81 МГц, CD₃CN + капля TFA) δ 51.7*, 52.8, 54.5*.

Спектр ЯМР ³¹P {¹H} (81 МГц, CDCl₃ + капля TFA) δ 53.6*, 54.6.

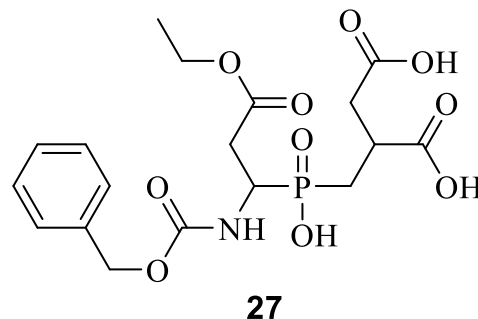
Вычислено %: C, 50.87, H, 6.03, P, 7.72. C₁₇H₂₄NO₈P; Найдено, %: C, 50.55, 50.70; H,
6.24, 6.30; P, 7.37, 7.54.

HRMS (ESI/Q-TOF) m/z: [M-H]⁻ вычислено для C₁₇H₂₃NO₈P⁻ 400.1161, найдено
400.1168.

**1-(N-Бензилоксикарбонил)амино-2-этилоксикарбонил-этил-
2',3'-дигидроксикарбонил-пропил фосфиновая кислота (Cbz-NH-Asp(OEt)-
[P]-Asp'-OH) (27)**

Выход 67%. Т. Пл. 63-66°C. ТСХ: R_f (CHCl_3 / i -
 $\text{PrOH} \sim 4/1$) ~ 0.20 .

Спектр ЯМР ^1H (200 МГц, d_6 -DMSO + капля TFA)
 $\delta = 0.79$ t (br.) и 1.11 {уш.т (3H, CH_3)}, 1.65-1.85
(м, 1H, один из PCH_2), 1.90-2.20 (м, 1H, другой из
 PCH_2), 2.55-2.80 (м, 2H, CH_2COOH), 2.85-3.10 (м,
1H, CHCOOH), 3.75-4.35 (м, 3H, $\text{PCHN}+\text{CH}_2\text{O}$), 5.01 {уш.с, 2H, PhCH_2O }, δ 7.10-
7.50 (м, 5H, Ph), 7.65 и 8.23* {2 уш.с., 1H, NH}.



Спектр ЯМР ^{13}C { ^1H } (50 МГц, CDCl_3 + капля TFA) $\delta = 14.2$, 16.6* (CH_3CH_2), 27.3
(д, $^1J_{\text{PC}} = 91.1$ Гц, PCH_2), 27.5* (д, $^1J_{\text{PC}} = 90.0$ Гц, PCH_2), 33.4 (CH_2COOEt), 35.3
(CH_2COOH), 36.1 (д, $^3J_{\text{PC}} = 13.2$ Гц, CH_2COOH), 48.2 (д, $^1J_{\text{PC}} = 106.5$ Гц, PCHN),
48.3* (д, $^1J_{\text{PC}} = 107.2$ Гц, PCHN), 60.4*, 60.7*, 61.2 (все OCH_2CH_3), 65.3*, 66.1 (all
 OCH_2Ph), 128.0, 128.2, 128.7, 137.4 (все ароматические), 156.3 (NC=O), 170.7 (д, $^3J_{\text{PC}}$
 $= 16.5$ Гц, CH_2COOEt), 171.7*, 172.9*, 173.3 (CH_2COOH), 175.3* (д, $^3J_{\text{PC}} = 12.4$ Гц,
 CHC=O), 175.5 (д, $^3J_{\text{PC}} = 12.8$ Гц, CHC=O).

Спектр ЯМР ^{31}P { ^1H } (81 МГц, d_6 -DMSO + капля TFA) δ 46.2*, 46.5, 51.9*.

Рассчитано для $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{NO}_{10}\text{P}$; %: С, 48.54, Н, 5.43, Р, 6.95. Найдено, %: С, 48.45,
48.37; Н, 5.64, 5.73; Р, 7.14, 7.37.

HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : $[\text{M}-\text{H}]^-$ вычислено для $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{NO}_{10}\text{P}^-$ 444.1060, найдено
444.1067.

3.7. Исследование протеолиза семакса в присутствии лейцинаминопептидазы и фосфиновых пептидов

Методика проведения эксперимента:

Лейцинаминопептидаза (К.Ф. 3.4.11.2, Sigma-Aldrich (США), Тип VI, микросомальная из почки свиньи, 9.2 ед.акт./мг), необходимые реактивы – коммерческие препараты. Эксперименты проводили, используя соотношения субстрат-ферментных систем, при которой гептапептид семакс за 60 мин деградировал не менее чем на 90%. Оптимальное субстрат-ферментное соотношение составило 10 мкмоль / 1 ед. акт.

Протеолиз семакса и смеси его со свободными фосфиновыми пептидами {структурными изостерами, аналогами и гомологами IGL (Ile-Gly-Leu)} при агрессивном воздействии Лейциламинопептидазы проводили по следующей методике. К раствору 0.5 мкмоль семакса в 250 мкл фосфатно-солевого буфера (27.4 mM NaCl, 0.4 mM KCl, 2 mM Na₃PO₄, pH 7.4) добавляли 0.05 ед. акт. лейцинаминопептидазы в этом же буфере. В случае смеси семакса с фосфиновыми пептидами в инкубационную смесь добавляли 0.5 мкмоль (1:1) или 2.5 (1:5) мкмоль фосфинового кислого пептида в свободной водорастворимой форме. Инкубационную смесь перемешивали и термостатировали при 30°C, отбирая аликвоты по 25 мкл через определенные промежутки времени. Остановка протеолиза осуществлялась добавлением к отбираемым пробам равного объема метанола. Пробы, отобранные через заданные промежутки времени, анализировали на хроматографе Милихром А-02 (табл. 4).

Анализ реакционных смесей проводили на хроматографе Милихром-А02 с использованием колонки ProntoSIL-120-5-C18 AQ (2x75 мм, размер частиц 5 мкм), элюент А – 0.2 M LiClO₄ + 0.005 M HClO₄ (pH 2.24), элюент Б – метанол, линейный градиент Б от 5 до 100% за 12 мин. Скорость подачи элюента – 0.2 мл/мин. Температура колонки 35°C. Длина волны 210 нм. Время удерживания Семакса – 7.21 мин.

Данные исследования оформлены в таблице 4, представленной ниже:

Таблица 4. Зависимость содержания Семакса в водном растворе (в % от исходного количества) с добавлением соответствующего фосфинового пептида в свободной форме (1:1 или 1:5) от времени (мин.) агрессивного воздействия Лейциламинопептидазы.

Время, мин	2	15	30	40	60	120	180
Sem-7+Leu-P-Gly (1:5)	100.00	99.37	98.53	98.11	94.97	92.03	70.86
Sem-7+Leu-P-Gly (1:1)	98.86	97.71	94.28	90.52	89.71	72.06	65.20
Sem-7+Gly-P-Leu (1:5)	98.76	98.34	97.31	93.58	91.51	88.41	64.39
Sem-7+Gly-P-Leu (1:1)	98.41	91.52	83.57	78.98	70.85	42.58	27.39
Sem-7+Ile-P-Gly (1:5)	99.13	97.62	94.59	91.13	87.88	83.55	59.74
Sem-7+Ile-P-Gly (1:1)	98.17	96.34	84.28	80.99	63.44	41.68	27.42
Sem-7+Val-P-Gly (1:5)	100.00	96.38	91.86	85.90	78.84	61.30	38.70
Sem-7+Val-P-Gly (1:1)	98.25	95.55	86.80	77.74	68.36	39.75	27.03
Sem-7	88.80	67.18	32.60	21.08	7.57	6.48	6.26

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, Абета 32-34) могут значительно замедлять ферментативный гидролиз Семакса и, возможно, других пептидов в результате ингибирования лейцинаминопептидазы.

Список литературы

1. Barnes D. E., Yaffe K. The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence // *Lancet Neurol.* – 2011. – Т. 10, № 9. – С. 819-828.
2. Котор А. С., Елисеев Ю. В., Семенова Е. И. Болезнь Альцгеймера: от теории к практике // *Медицинский совет.* – 2015. – № 18. – С. 41-45.
3. Brookmeyer R., Gray S., Kawas C. Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset // *American Journal of Public Health.* – 1988. – Т. 9. – С. 1337-1342.
4. World health statistics 2024: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. – 2024. – С. 12.
5. Reitz C. Alzheimer's disease and the amyloid cascade hypothesis: a critical review // *International Journal of Alzheimer's Disease.* – 2012. – С. 1-11.
6. Науменко Д. Е. Является ли бета-амилоид причиной болезни Альцгеймера? // *Наука и образование сегодня.* – 2019. – № 9 (44). – С. 67-74.
7. Головки Ю. С., Ивашкевич О. А., Головки А. С. Современные методы поиска новых лекарственных средств // *Вестник БГУ: Естественные и точные науки: Химия.* – 2012. – № 1. – С. 7-15.
8. Verkman A. S. Drug discovery in academia // *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* – 2004. – Т. 286, № 3. – С. 465.
9. Zheng-Mei Xiong, Kaori Kitagawa, Yuji Nishiuchi, Terutoshi Kimura, Tomoyuki Nakamura, Chiyoko Inagaki. Acetyl-Ile-Gly-Leu protects neurons from A β 1–42 induced toxicity in vitro and in V337M human tau-expressing mice // *Life Sciences.* – 2009. – Т. 84, № 5-6. – С. 132-138.
10. Yang H. D., Kim D. H., Lee S. B., Young L. D. History of Alzheimer's Disease // *Dementia and Neurocognitive Disorders.* – 2016. – Т. 15, № 4. – С. 115-121.
11. Boller F., Forbes M. M. History of dementia and dementia in history: an overview // *Journal of Neurological Sciences.* – 1998. – Т. 158, № 2. – С. 125-133.
12. Maurer K., Volk S., Gerbaldo H. Auguste D and Alzheimer's disease // *Lancet.* – 1997. – Т. 349. – С. 1546-1549.

13. Lee S. B. Historical sketch of dementia concept // *Dementia and Neurocognitive Disorders*. – 2002. – № 1. – С. 1-2.
14. Hippus H., Neundörfer G. The discovery of Alzheimer's disease // *Dialogues in Clinical Neuroscience*. – 2003. – Т. 5, № 1. – С. 101-108.
15. Weber M. M. Aloys Alzheimer, a coworker of Emil Kraepelin // *Journal of Psychiatric Research*. – 1997. – С. 31. – С. 635-643.
16. Kraepelin E., Diefendorf A. R. (переводчик). *Clinical Psychiatry: A Textbook For Students And Physicians*. – Kessinger Publishing, 2007. – С. 568.
17. Silva M. V. F., Loures C. M. G., Alves L. C. V., de Souza L. C., Borges K. B. G., Carvalho M. D. G. Alzheimer's disease: risk factors and potentially protective measures // *Journal of Biomedical Science*. – 2019. – Т. 26, № 1. – С. 33.
18. Кичерова О. А., Рейхерт Л. И. Болезнь Альцгеймера // *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова*. – 2018. – Т. 118, № 1. – С. 77-81.
19. Tiantian Guo, Denghong Zhang, Yuzhe Zeng, Timothy Yu Huang, Huaxi Xu, Yingjun Zhao. Molecular and cellular mechanisms underlying the pathogenesis of Alzheimer's disease // *Molecular Neurodegeneration*. – 2020. – Т. 15, № 40.
20. Yiannopoulou K. G., Papageorgiou. Current Alzheimer's Treatments // *International Journal of Alzheimer's Disease*. – 2013. – Т. 6, № 1. – С. 19-33.
21. Herrman N., Chau S. A., Kircanski I., Lanctot K. L. Current and emerging drug treatment options for Alzheimer disease: a systematic review // *Drugs*. – 2011. – Т. 71, № 15. – С. 2031-2065.
22. Nadeem M., Dr. Ivan Samuel Suneel. Development of the Forman Alzheimer's disease scale // *Heliyon*. – 2023. – Т. 9, № 12. – С. 246.
23. Tariot P. N., Farlow M. R., Grossberg G. T., Graham S. M., McDonald S., Gergel I. Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving donepezil: a randomized controlled trial // *Journal of the American Medical Association*. – 2004. – Т. 291, № 3. – С. 317-324.
24. Chin J. H., Ma L., MacTavish D., Jhamandas J. H. Amyloid beta protein modulates glutamate-mediated neurotransmission in the rat basal forebrain: involvement of

- presynaptic neuronal nicotinic acetylcholine and metabotropic glutamate receptors // *The Journal of Neuroscience*. – 2007. – T. 27, № 35. – C. 9262-9269.
25. Selkoe D. J. Alzheimer's disease: genes, proteins and therapy // *Physiological Reviews*. – 2001. – T. 81, № 2. – C. 741-766.
26. Tanzi R. E. The synaptic A β hypothesis of Alzheimer disease // *Nature Neuroscience*. – 2005. – T. 8, № 8. – C. 977-979.
27. Lehtonen J. Y., Holopainen J. M., Kinnunen P. K. Activation of Phospholipase A2 by amyloid beta-peptides in vitro // *Biochemistry*. – 1996. – T. 35, № 29. – C. 9407-9414.
28. Li X. D., Arias E., Jonnala R. R., Mruthinti S., Buccafusco J. J. Effect of amyloid peptides on the increase in TrkA receptor expression induced by nicotine in vitro and in vivo // *Journal of Molecular Neuroscience*. – 2005. – T. 27, № 3. – C. 325-336.
29. Nimmrich T., Grimm C., Draguhn A., Barghorn S., Lehmann J., Schoemaker H., Hillen H., Gross G. et al. Amyloid β oligomers (A β 1-42 Globulomer) suppress spontaneous synaptic activity by inhibition of P/Q-type calcium currents // *The Journal of Neuroscience*. – 2008. – T. 28, № 4. – C. 788-797.
30. Padhi A., Sengupta M., Sengupta S., Roehm K. H., Sonawane A. Antimicrobial peptides and proteins in mycobacterial therapy: current status and future prospects // *Tuberculosis*. – 2014. – T. 94, № 4. – C. 363-373.
31. Wu B., Kitagawa K., Yagyu K., Zhang N. Y., Hattori N., Inagaki C. Phosphatidylinositol and PI-4-monophosphate recover amyloid beta protein-induced inhibition of Cl⁻-ATPase activity // *Life Science*. – 2002. – T. 72, № 4-5. – C. 455-463.
32. Wu B., Kitagawa K., Zhang N. Y., Liu B., Inagaki C. Pathophysiological concentrations of amyloid beta proteins directly inhibit rat brain and recombinant human type II phosphatidylinositol 4-kinase activity // *Journal of Neurochemistry*. – 2004. – T. 91, № 5. – C. 1164-1170.
33. Xiong Z. M., Kitagawa K., Nishiuchi Y., Kimura T., Inagaki C. Protective effects of Abeta-derived tripeptide, Abeta (32-34), on Abeta (1-42)-induced phosphatidylinositol 4-kinase inhibition and neurotoxicity // *Neuroscience Letters*. – 2007. – T. 419, № 3. – C. 247-252.

34. Wang L., Wang N., Zhang W. et al. Therapeutic peptides: current applications and future directions // *Signal Transduction Targeted Therapy*. – 2022. – Т. 7, № 48. – С. 1-27.
35. Turk B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2006. – Т. 5, № 9. – С. 785-799.
36. Georgiadis X. S., Sánchez L. M., Overall C. M., López-Otín C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach // *Nature Reviews Genetics*. – 2003. – Т. 4, № 7. – С. 544-558.
37. Miranda L. P., Holder J. R., Shi L., Bennett B., Aral J., Gegg C. V., Wright M., Walker K., Doellgast G., Rogers R., Li H., Valladares V., Salyers K., Johnson E., Wild K. Identification of potent, selective, and metabolically stable peptide antagonists to the calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptor // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2008. – Т. 51, № 24. – С. 7889-7897.
38. Ашмарин И. П., Алфеева Л. Ю., Андреева Л. А., Гривенников И. А., Дубынин В. А., Каменский А. А., Козловская М. М., Левицкая Н. Г., Мясоедов Н. Ф., Незавибатько В. Н., Середенин С. Б. Институт молекулярной генетики РАН. Семейство пептидов, обладающих нейротропными свойствами. – 2003. – Патент № RU2206573C1 РФ, МПК С 07 К 7/06, А 61 К 38/08, А 61 Р 25/00.
39. Шевченко К. В., Нагаев И. Ю., Андреева Л. А., Шевченко В. П., Мясоедов Н. Ф. Устойчивость пролинсодержащих пептидов в биологических средах // *Биомедицинская химия*. – 2019. – Т. 65, № 3. – С. 180-201.
40. Ашмарин И. П., Незавибатько В. Н., Мясоедов Н. Ф., Каменский А. А., Гривенников И. А., Пономарева-Степная М. Я., Андреева Л. А., Каплан А. Я., Кошелев В. Б., Рясина Т. В. Ноотропный аналог адренокортикотропина 4-10 – семакс (15-летний опыт разработки и изучения) // *Журнал высшей нервной деятельности*. – 1997. – Т. 47, № 2. – С. 420-430.
41. Кост Н. В., Соколов О. Ю., Габаева М. В., Гривенников И. А., Андреева Л. А., Мясоедов Н. Ф., Зозуля А. А. Ингибирующее действие семакса и селанка на энкефалиндеградирующие ферменты сыворотки крови человека // *Биоорганическая химия*. – 2001. – Т. 27, № 3. – С. 180-183.

42. Amino Y., Nakazawa M., Kaneko M., Miyaki T., Miyamura N., Maruyama Y., Eto Y. Structure–CaSR–Activity Relation of Kokumi γ -Glutamyl Peptides // *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. – 2016. – Т. 64. – С. 1181-1189.
43. Шевченко К. В., Дмитриев М. Э., Винюков А. В., Шевченко В. П., Калашникова И. П., Нагаев И. Ю., Рагулин В. В., Мясоедов Н. Ф. Синтез и изучение свойств фосфинового псевдопролилглицилпролина // *Доклады Российской академии наук. Химия, науки о материалах*. – 2021. – Т. 498, № 1. – С. 30-33.
44. Collinsova M., Jiracek J. Phosphinic acid compounds in biochemistry, biology and medicine // *Current Medicinal Chemistry*. – 2000. – Т. 7. – С. 629-647.
45. Zaman M. A., Oparil S., Calhoun D. A. Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2002. – Т. 1. – С. 621–636.
46. Peyman A., Stahl W., Wagner K., Ruppert D., Budt K.-H. Non-Peptide-Based Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus-1 Protease // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. – 1994. – Т. 4, № 21. – С. 2601-2604.
47. Takubumi Inagawa, Hideki Nakashima, Boleslaw Karwowski, Piotr Guga, Wojciech J. Stec, Hiroaki Takeuchi, Hiroshi Takaku. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by P-stereodefined oligo-(nucleoside phosphorothioate)s in a long-term infection model // *FEBS Letters*. – 2002. – Т. 528, № 1-3. – С. 48-52.
48. Sheng X. C., Casarez A., Cai R., Clarke M. O., Chen X., Cho A., Delaney W. E. IV, Doerffler E., Ji M., Mertzman M., Pakdaman R., Pyun H. J., Rowe T., Wu Q., Xu J., Kim C. U. Discovery of GS-9256: a novel phosphinic acid derived inhibitor of the hepatitis C virus NS3/4A protease with potent clinical activity // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2012. – Т. 22. – С. 1394–1396.
49. Holmes M. A., Matthews B. W. Binding of hydroxamic acid inhibitors to crystalline thermolysin suggests a pentacoordinate zinc intermediate in catalysis // *Biochemistry*. – 1981. – Т. 20, № 24. – С. 6912 – 6920.
50. Christianson D. W., Lipscomb W. N. Comparison of carboxypeptidase A and thermolysin: inhibition by phosphonamidates // *Journal of the American Chemical Society*. – 1988. – Т. 110. – С. 5560–5565.

51. Holden H. M., Tronrud D. E., Monzingo A. F., Weaver L. H., Matthews B. W. Slow- and fast-binding inhibitors of thermolysin display different modes of binding: crystallographic analysis of extended phosphoramidate transition-state analogues // *Biochemistry*. – 1987. – T. 26, № 26. – С. 8542–8553.
52. Mookhtiar K. A., Marlowe C. K., Bartlett P. A., Van Wart H. E. Phosphoramidate inhibitors of human neutrophil collagenase // *Biochemistry*. – 1987. – T. 26. – С. 1962–1965.
53. Hanson J. E., Kaplan A. P., Bartlett P. A. Phosphonate analogues of carboxypeptidase A substrates are potent transition-state analogue inhibitors // *Biochemistry*. – 1989. – T. 28. – С. 6294–6305.
54. Dive V., Yiotakis A., Nicolaou A., Toma F. Inhibition of *Clostridium histolyticum* collagenases by phosphonamide peptide inhibitors // *Eur J Biochem*. – 1990. – T. 191. – С. 685–693.
55. Merz K. M. Jr, Kollman P. A. Free energy perturbation simulations of the inhibition of thermolysin: prediction of the free energy of binding of a new inhibitor // *Journal of the American Chemical Society*. – 1989. – T. 111. – С. 5649–5658.
56. Dorff P. H., Chu G., Goldstein S. W., Morgan B. P. Solid phase synthesis of phosphinopeptoids as transition state analog inhibitors // *Tetrahedron Letters*. – 1998. – № 39. – С. 3375-3378.
57. Yiotakis A., Lecoq A., Nicolaou A., Labadie J., Dive V. Phosphinic peptide analogues as potent inhibitors of *Corynebacterium rathayii* bacterial collagenase // *Biochemical Journal*. – 1994. – T. 303. – С. 323–327.
58. Кабачник М. И., Медведь Т. Я. Новый метод синтеза α -аминофосфиновых кислот // *Доклады АН СССР*. – 1952. – Т. 83, № 45. – С. 689-682.
59. Fields E. K. The synthesis of esters of substituted amino phosphonic acids // *Journal of the American Chemical Society*. – 1952. – Т. 74. – С. 1528-1538.
60. Cherkasov R. A., Galkin V. I. The Kabachnik-Fields reaction: synthetic potential and the problem of the mechanism // *Russian Chemical Reviews*. – 1998. – Т. 67, № 10. – С. 857-882.

61. Keglevich G., Balint E. The Kabachnik-Fields reaction: mechanism and synthetic use // *Molecules*. – 2012. – T. 17, № 11. – C. 12821–12835.
62. Krutikov V. I., Lavrent'ev E. V., Sukhanovskaya E. V. *Russ. J. Gen. Chem.* – 1991. – T. 61. – C. 1321.
63. Mannich C., Krösche W. Ueber ein Kondensationsprodukt aus Formaldehyd, Ammoniak und Antipyrin // *Archiv der Pharmazie* (на немецком). – 1912. – T. 250, № 1. – C. 647–667.
64. Blicke F. F. The Mannich Reaction // *Organic Reactions*. – 2011. – T. 1, № 10. – C. 303–341.
65. Smith M. B., March J. *March's Advanced Organic Chemistry* (6th ed.). – John Wiley & Sons, 2007. – C. 1292–1295.
66. Zefirov N. S., Matveeva E. D. Catalytic Kabachnik-Fields reaction: New horizons for old reaction // *Arkivoc*. – 2008. – C. 1–17.
67. Dmitriev M. E., Ragulin V. V. Arbuzov-type reaction of acylphosphonites and N-alkoxycarbonylimine cations generated in situ with trifluoroacetic anhydride // *Tetrahedron Letters*. – 2012. – T. 53, № 13. – C. 1634–1636.
68. Dmitriev M. E., Rossinets E. A., Ragulin V. V. Amidoalkylation of Hydrophosphorylic Compounds // *Russian Journal of General Chemistry*. – 2011. – T. 81, № 6. – C. 1092–1104.
69. Dmitriev M. E., Golovash S. R., Borodachev A. V., Ragulin V. V. Mechanism of Phosphorus–Carbon Bond Formation in the Amidoalkylation of Phosphonous Carboxylic Acids // *The Journal of Organic Chemistry*. – 2021. – T. 86. – C. 593–600.
70. Michaelis A., Kaehne R. Ueber das Verhalten der Jodalkyle gegen die sogen. Phosphorigsäureester oder O-Phosphine // *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*. – 1898. – T. 31, № 1. – C. 1048–1055.
71. Lewis D. E., A. Y. E. ARBUZOV: FATHER OF ORGANOPHOSPHORUS CHEMISTRY IN RUSSIA // *Bull. Hist. Chem.* – 2017. – T. 42, № 2.
72. Huber J. W., Middlebrooks M. Synthesis of aminoalkanephosphonic acids from ureidoalkanephosphonates // *Synthesis*. – 1977. – № 12. – C. 883–884.

73. Oleksyszyn J., Gruszecka E., Kafarski P., Masalerz P. New phosphonic analogs of aspartic and glutamic acid by amidoalkylation of trivalent phosphorus chlorides with ethyl acetoacetate or ethyl levulinate and ethyl carbamate // *Monatshefte für Chemie*. – 1982. – T. 113, № 59. – C. 59-71.
74. Oleksyszyn J., Subotkowska L. Aminomethanephosphonic acid and its diphenyl ester // *Synthesis*. – 1980. – № 11. – C. 906.
75. Yuan C., Chen S., Wang G. Studies on organophosphorus compounds XLVII: Acetyl chloride – a versatile reagent for the synthesis of 1-aminoalkyl- and amino(aryl)methylphosphonic acid derivatives C // *Synthesis*. – 1991. – № 6. – C. 490-493.
76. Yuan C., Wang G., Chen S. Studies on organophosphorus compounds; XLVI. A facile and direct route to dialkyl 1-(benzyloxy-carbonylamino)-alkylphosphonates and dialkyl or diphenyl α -(benzyloxy-carbonylamino)-benzylphosphonates // *Synthesis*. – 1990. – № 6. – C. 522-524.
77. Chen C., Coward J. K. A general method for the synthesis of N-protected α -aminoalkylphosphonic acids // *Tetrahedron Letters*. – 1996. – T. 37, № 25. – C. 4335-4338.
78. Chen H., Noble F., Mothé A., Meudal H., Coric P., Danascimento S., Roques B. P., George P., Fournié-Zaluski M.-C. Phosphinic derivatives as new dual enkephalin-degrading enzyme inhibitors: synthesis, biological properties, and antinociceptive activities // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2000. – T. 43, № 7. – C. 1398-1408.
79. Dmitriev M. E., Ragulin V. V. New opinions on the amidoalkylation of hydrophosphorylic compounds // *Tetrahedron Letters*. – 2010. – C. 2613–2616.
80. Ragulin V. V. Synthesis of Phosphinic Analog of Glutamylglycine // *Russian Journal of General Chemistry*. – 2001. – T. 71. – C. 1823-1824.
81. Dmitriev M. E., Ragulin V. V. Method of synthesis of phosphinic acids based on hypophosphites: VIII. Synthesis of α -aminoalkylphenethylphosphonic acids // *Russian Journal of General Chemistry*. – 2011. – T. 81. – C. 1786-1793.

82. Dmitriev M. E., Ragulin V. V. Synthesis of phosphorus isosters of β -amyloid peptides fragments // Russian Journal of General Chemistry. – 2015. – T. 85. – C. 2091–2098.
83. Ragulin V. V. A method of synthesis of phosphinic acids on the basis of hypophosphites: VII. Synthesis of pseudo- γ -aminobutanoyl peptides and other phosphinic analogs of γ -aminobutyric acid // Russian Journal of General Chemistry. – 2008. – T. 78. – C. 1655–1661.
84. Pauling L. Molecular Architecture and Biological Reactions // Chem. Eng. News. – 1946.
85. Matziari M., Bauer M., Dive V., Yiotakis A. Synthesis of the Phosphinic Analogue of Thyrotropin Releasing Hormone // The Journal of Organic Chemistry. – 2008. – T. 73, № 21. – C. 8591-8593.
86. Matziari M., Yiotakis A. Shortcut to Fmoc-Protected Phosphinic Pseudodipeptidic Blocks // Organic Letters. – 2005. – T. 7, № 18. – C. 4049-4052.
87. Soroka M. The synthesis of 1-aminoalkylphosphonic acids. A revised mechanism of the reaction of phosphorus trichloride, amides and aldehydes or ketones in acetic acid (Oleksyszyn reaction) // Liebigs Annalen der Chemie. – 1990. – № 4. – C. 331-334.
88. Baylis E. K., Campbell C. D., Dingwall J. G. 1-Aminoalkylphosphonous acids. Part 1. Isosteres of the protein amino acids // Journal of the Chemical Society, Perkin Trans. – 1984. – № 1. – C. 2845-2853.
89. Kukhar V. P., Hudson H. R. Aminophosphonic and aminophosphinic acids // Chemistry and biological activity. – J. Wiley & Sons Ltd., 2000.
90. Maier L. Advances in the chemistry of aminophosphinic acids // Phosphorus and Sulfur. – 1983. – № 14 (3). – C. 295-392.
91. Mucha A. Synthesis and Modifications of Phosphinic Dipeptide // Molecules. – 2012. – № 17. – C. 13530-13568.
92. Yiotakis A., Georgiadis D., Matziari M., Makaritis A., Dive V. Phosphinic peptides: Synthetic approaches and biochemical evaluation as Zn-metalloprotease inhibitors // Current Organic Chemistry. – 2004. – T. 8. – C. 1135–1158.

93. Mucha A. Synthesis and Modifications of Phosphinic Dipeptide Analogues // *Molecules*. – 2012. – Т. 17, № 11. – С. 13530–13568.
94. Фозиноприл. Wikipedia. URL: <https://ru.wikipedia.org/wiki/Фозиноприл> (дата обращения: 3 сентября 2025).
95. Wang W., McKinnie S. M., Farhan M., Paul M., McDonald T., McLean B., et al. Angiotensin-Converting Enzyme 2 Metabolizes and Partially Inactivates Pyr-Apelin-13 and Apelin-17: Physiological Effects in the Cardiovascular System // *Hypertension*. – 2016. – Т. 68, № 2. – С. 365—377.
96. Hemming M. L., Selkoe D. J. Amyloid beta-protein is degraded by cellular angiotensin-converting enzyme (ACE) and elevated by an ACE inhibitor // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Т. 280, № 45. – С. 37644-37650.
97. Nasopoulou M., Matziari M., Dive V., Yiotakis A. Chemoselective Protection of Solid-Phase Compatible Fmoc-Phosphinic Building Blocks // *J. Org. Chem.* – 2006. – Т. 71. – С. 9525-9531.
98. Ramirez F., Pilot J. F., Madan O. P., Smith C. P. Stereoisomerism at phosphorus in cyclic oxyphosphoranes. Reaction of phosphonite and phosphinite esters with 3-benzylidene-2,4-pentanedione // *Am. Chem. Soc.* – 1968. – Т. 90. – С. 1275-1280.
99. Рагулин В. В., Петров А. А., Есаков С. М., Захаров В. И. О строении спиро-1,2-оксафосфол-4-енов // *Доклады Академии наук СССР*. – 1981. – № 2. – С. 379-382.