

Х.-Д. Якубке  
Х. Ешкайт

---

# АМИНОКИСЛОТЫ ПЕПТИДЫ БЕЛКИ

Перевод с немецкого  
канд. хим. наук Н. П. Запеваловой  
и канд. хим. наук Е. Е. Максимова  
под редакцией  
д-ра хим. наук, проф. Ю. В. Митина

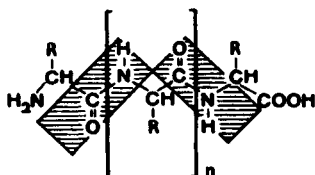
Москва «Мир» 1985

# 2. Пептиды

## 2.1. Общие свойства пептидов

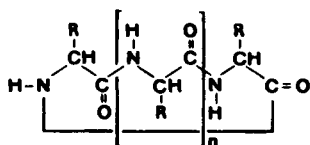
### 2.1.1. Что такое пептиды? Их строение

Пептиды — это цепочечные молекулы, содержащие от двух до ста остатков аминокислот, соединенных между собой *амидными (пептидными) связями*.



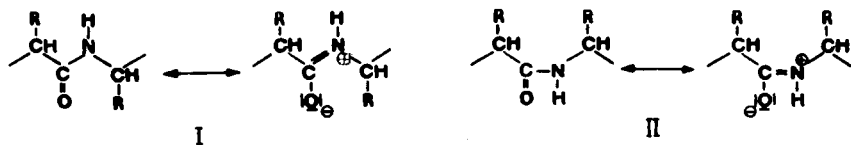
Термин «пептиды» был предложен известным химиком Эмилем Фишером (1852—1919 гг.). Слово образовано из первых четырех букв названия *пептоны* (продукты расщепления белков пепсином) и конечных букв названия углеводов *полисахариды*.

По размеру молекулы и своим свойствам пептиды стоят между высокомолекулярными белками и аминокислотами. Наиболее распространены линейные пептиды, однако известны также циклические пептиды, молекулы которых могут иметь различные размеры. Циклические пептиды образуются из линейных, когда пептидная связь связывает amino- и карбоксильную функцию N- и C-концевых аминокислот.



Полинг и Кори в 1951 г. показали с помощью рентгеноструктурного анализа аминокислот, амидов аминокислот и простых линейных пептидов, что пептидная связь C—N укорочена по сравнению с нормальной простой связью (рис. 2-1).

Вследствие мезомерии получаются две устойчивые плоские конформации, *транс* (I) и *цис* (II), при затрудненном свободном вращении около связи C—N:



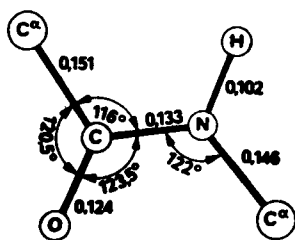


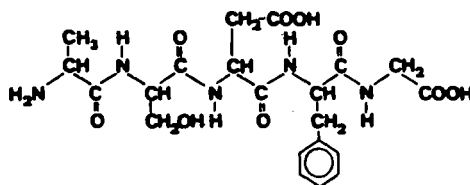
Рис. 2-1. Средние расстояния между атомами (нм), образующими пептидную связь и углы между связями.

В 2,5-дикетопиперазинах, простейших циклических пептидах, построенных из двух аминокислот, имеются *цис*-пептидные связи. Циклические трипептиды могут существовать без напряжения также только с тремя *цис*-пептидными связями. Поскольку пролин и саркозин не обладают возможностью стабилизации *транс*-пептидной связи, то можно легко синтезировать циклический трипептид — циклотрипролил (рис. 2-26). В нативных пептидах и белках преобладает *транс*-пептидная связь. В некоторых белках были найдены также и *цис*-пептидные связи, при этом в образовании пептидной связи всегда участвовал пролин.

### 2.1.2. Классификация и номенклатура

По числу аминокислот, содержащихся в пептиде, различают ди-, три-, тетра-, пента-, ..., окта-, нона-, декапептиды и т. д. Чтобы избежать проблемы, связанной с греческой нумерацией длинноцепочечных пептидов, Бодански предложил количество аминокислотных остатков пептида обозначать арабской цифрой и помещать перед словом «пептид». Например, 7-пептид вместо гептапептид, 10-пептид вместо декапептид. Пептиды, в молекулах которых меньше десяти аминокислотных остатков, формально относятся к *олигопептидам*, пептиды, построенные из большого числа аминокислотных остатков (до ~100), — к *полипептидам*. Различие между полипептидами и белками (макропептидами) чрезвычайно проблематично. Исторически сложилось так, что границей между полипептидами и белками считают соединения с молекулярной массой ~10 000, т. е. состоящие примерно из 100 остатков аминокислот. Такой принцип классификации основан на способности к диализу через природные мембраны.

Согласно принципам рациональной номенклатуры, пептиды рассматривают формально как ациламинокислоты, причем аминокислоте, карбоксил которой участвует в пептидной связи, придается окончание-ил. Поэтому только С-конечная аминокислота сохраняет свое первоначальное тривиальное название:

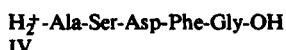
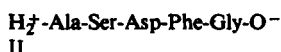


аланил-серил-аспарагил-фенилаланил-глицин

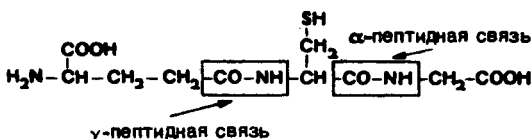


По предложению Бейли, в формулах линейных пептидов аминокислота со свободной аминогруппой называется *N-концевой аминокислотой*, в горизонтально изображенной пептидной цепи она стоит слева. Аминокислота со свободной карбоксильной группой обозначается как *C-концевая аминокислота*. В соответствии с этим в приведенном выше примере аланин — *N-концевая*, а глицин — *C-концевая* аминокислота. Фромажо предложил остаток, несущий свободную  $\alpha$ -аминогруппу, называть начальной аминокислотой, а соответствующий остаток со свободной карбоксильной группой — конечной аминокислотой. Хотя это предложение кажется более простым, широкое признание получила рекомендация Бейли.

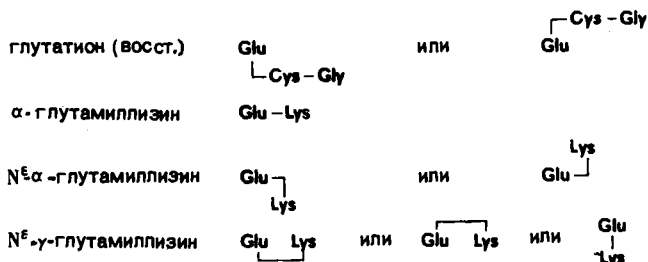
Краткая формула Ala-Ser-Asp-Phe-Gly соответствует пентапептиду независимо от состояния ионизации. При желании особо подчеркнуть, что данный пептид находится в незамещенной форме, можно, по предложению Гришштейна и Виница, в упрощенной формуле при amino- и карбоксильной группах указывать наличие протона и гидроксильной группы с помощью соответствующих символов, например для цвиттер-иона (II), аниона (III) и катиона (IV) рассматриваемого здесь пентапептида:



При общепринятом способе написания формул исходят из того, что аминокислоты с тремя функциями, имеющие дополнительные amino- или карбоксильные функции (Lys, Orn, Gln, Asp), связаны  $\alpha$ -пептидными связями. Для  $\omega$ -пептидного связывания при такой записи требуются особые обозначения. Например, в биохимически важном трипептиде глутатионе наряду с  $\alpha$ -пептидной связью имеется также  $\gamma$ -пептидная связь:

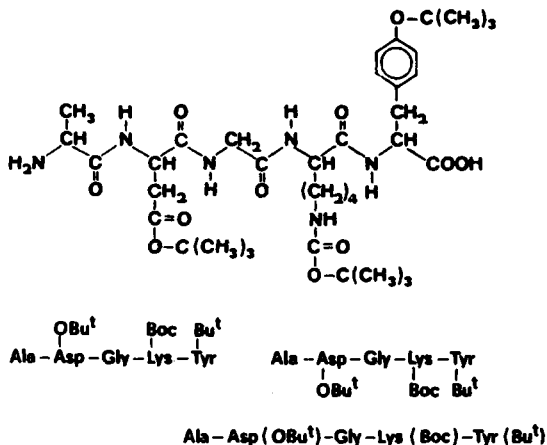


Способ обозначения  $\gamma$ -пептидного связывания в глутатионе и других  $\omega$ -пептидах ясен из следующих примеров:

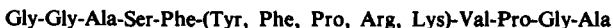


Пептидная связь между  $\epsilon$ -аминогруппой лизина и  $\gamma$ -карбоксилем глутаминовой кислоты ( $\beta$ -карбоксилем аспарагиновой кислоты) называется *изо-пептидной связью* (такая связь имеется, например, в  $N^{\epsilon}$ - $\gamma$ -глутамиллизине).

При сокращенной записи замещение боковой цепи обозначают, помещая аббревиатуру этого заместителя выше или ниже символа соответствующей аминокислоты или же в скобках непосредственно после него, например для пентапептида L-аланил-L-аспарагил-( $\beta$ -*трет*-бутиловый эфир)глицил- $N^{\epsilon}$ -*трет*-бутилоксикарбонил-L-лизил-O-*трет*-бутил-L-тирозина:

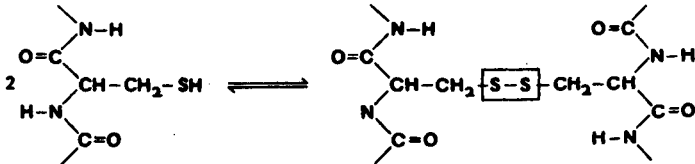


Число и последовательность связанных в пептид аминокислот называют *первичной структурой*. Для пептида с известной последовательностью формулу записывают, соединяя символы аминокислотных остатков черточками. Наконец, различают собственно пептид, например Ala-Ser-Asp-Phe-Gly и фрагмент -Ala-Ser-Asp-Phe-Gly- (с черточками при концевых аминокислотах). Если часть последовательности пептида еще не известна, то аббревиатуры соответствующих аминокислот, разделенные (запятыеми) указывают в скобках:

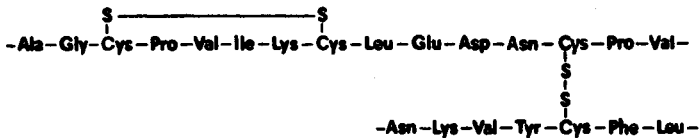


Итак, в соответствии с приведенным выше определенным природные пептиды построены из аминокислотных остатков, которые связаны, как правило,  $\alpha$ -пептидными связями.

Протеиногенная аминокислота цистеин имеет дополнительные возможности соединения аминокислотных остатков, так как при окислении тиольной функции могут образовываться *дисульфидные связи*:



Различают *внутримолекулярное дисульфидное связывание* в пределах одной пептидной цепи и *межмолекулярное дисульфидное связывание* между различными пептидными цепями:



Внутримолекулярные дисульфидные связи имеются, например, в окситоцине, вазопрессине, в А-цепи инсулина и в рибонуклеазе. Межмолекулярные дисульфидные связи соединяют между собой цепи пептидов, причем ковалентно связанными могут быть как идентичные цепи, как в окисленной форме глутатиона, так и различные цепи, как в инсулине. Дисульфидные связи имеют большое значение для образования и стабилизации определенных пептидных и белковых структур.

В природе встречаются пептидные вещества, построенные не только из аминокислот, но содержащие также оксикислоты, длинные остатки жирных кислот и др. компоненты; кроме того, в образовании связей между боковыми цепями могут принимать участие не только тиольные функции, но также и гидроксильные группы боковых цепей протеиногенных кислот. С учетом всех этих фактов данное в разд. 2.1.1 определение пептидов представляется не совсем корректным. Следует различать *гомомерные пептиды*, состоящие исключительно из аминокислот, и *гетеромерные пептиды*, которые кроме аминокислот содержат также небелковые компоненты.

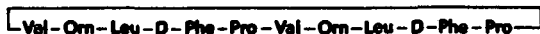
Известны также *гомодетные* и *гетеродетные пептиды*; первые содержат только пептидные связи, во вторых наряду с пептидным связыванием могут встречаться эфирные, дисульфидные или тиоэфирные связи.

Последовательность циклического гомодетного гомомерного пептида можно изобразить с помощью символических формул (в качестве примера выбран грамицидин S):

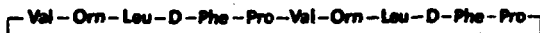
1. Закрывают последовательность в скобки, а перед ними пишут цикло.



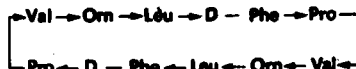
2. Можно написать аминокислотную последовательность пептида и затем соединить первую и последнюю аминокислоты длинной линией выше или ниже последовательности:



или



3. При записи в две строки нужно с помощью стрелки указать атом азота пептидной связи ( $-\text{CO}-\text{NH}-$ ):



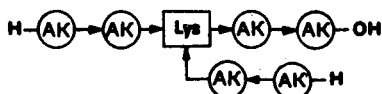
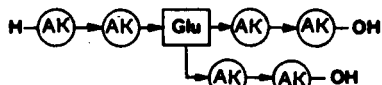
Циклические гетеродетногомерные пептиды при сокращенной записи изображаются аналогично замещенным аминокислотам.

Гомодетные — гомомерные пептиды

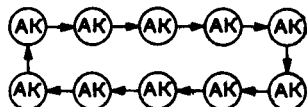
1. Линейный пептид



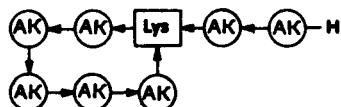
2. Разветвленный пептид



3. Циклический пептид

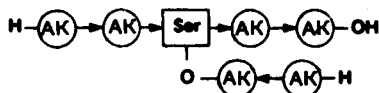


4. Циклический разветвленный пептид

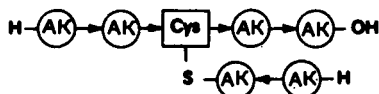


Гетеродетные — гомомерные пептиды

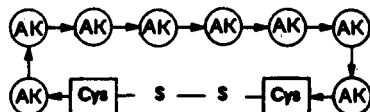
1. Линейный O-пептид



2. Линейный S-пептид



3. Циклический пептид (дисульфид)



4. Циклический разветвленный пептид (пептидлактон)

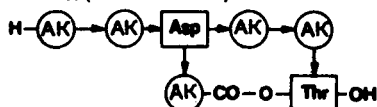


Рис. 2-2. Схема построения гомомерных пептидов. АК — аминокислотный остаток.

На рис. 2-2 приведены структуры важнейших гомомерных пептидов. Для единообразия направление пептидной связи обозначено стрелками, хотя, как уже указывалось, это необходимо делать только в случае изображения кольцевых пептидов в две строчки.

К *гетеромерным пептидам* относятся депсипептиды и пептоиды. Под депсипептидами понимают, согласно Шемякину, все пептиды, которые наряду с пептидными связями содержат также и эфирные, т. е. депсипептидами следует считать гомомерные О-пептиды и пептидлактоны оксиаминокислот серина и треонина. Для пептидов с встроенными в цепь оксиаминокислотами введено понятие *пептолиды*. Большинство пептолидов — это циклические соединения (известные как пептидные антибиотики). Любке и Шрёдер предложили название *пептоиды* для сложных белков, построенных из гетеромерных пептидов. Важными представителями этого ряда являются липо-, глико-, фосфо- и хромопептиды, в которых гетеросоставляющие ковалентно связаны с пептидом посредством amino- и или карбоксильных групп или же за счет функциональных групп боковых цепей.

### 2.1.3. Нахождение пептидов в природе и их значение

Пептиды широко распространены в природе. Они присутствуют во всех клеточных организмах (пептидный пул). В настоящее время трудно систематически классифицировать пептиды по химическим и физическим критериям, поэтому обычно за основу берут их физиологическое действие.

Из природных пептидных веществ наиболее изучены по своему действию пептидные гормоны, они имеют и наиболее известную структуру. Важные пептидные гормоны образуются в гипоталамусе (окситоцин и вазопрессин, гормоны гипоталамуса, стимулирующие освобождение и биосинтез других гормонов), в поджелудочной железе (инсулин, глюкагон), в гипофизе (адренокортикотропин, меланоцитстимулирующий гормон), в щитовидной железе (тирокальцитонин), в паращитовидной железе (паратгормон), в желудочно-кишечном тракте (гастрин, секретин, холецистокининпанкреозимин). Пептидные гормоны желудочно-кишечного тракта не вырабатываются специальной железой, так что их, так же как ангиотензин и плазмакинин, относят к тканевым пептидным гормонам (тканевым гормонам). В некоторых случаях бывает трудно отнести гормоны к какому-то определенному виду в связи с их неоднозначными физиологическими функциями, например пептиды амфибий и головоногих (эледоизин, физалемин, церулин, ранатензин, алитензин, бомбезин).

Большое значение приобретают пептиды из животных и растительных ядов, а также пептидные антибиотики из микроорганизмов.

В последнее время все больший интерес вызывают биологически активные пептиды, действующие на центральную нервную систему. В центре внимания находятся нейропептиды (разд. 2.3.3), в особенности нейромедиа-



торы, модуляторы нервной активности, эндогенные пептиды наркотического действия и многие другие. Влияние нейропептидов на центральную нервную систему очень многообразно. Так, известны пептиды, которые контролируют физиологический сон, другие действуют как обезболивающие препараты; есть даже такие, которые вызывают сексуальное возбуждение у кроликов, крыс и кошек [определенные фрагменты аденозинкортикотропного гормона (АКТГ),  $\beta$ -меланоцитстимулирующего гормона ( $\beta$ -МСГ)]. Нейрогипофизарные гормоны играют роль в процессах переработки информации. Многие пептиды следует отнести к особой группе лекарственных веществ (новая интересная область пептидной химии).

Определенные циклические пептиды, такие, как фитотоксичный *ментоксин*, цикло-(L-MeAla-L-Leu-MePhe(Z) $\Delta$ )-Gly-) или продуцируемый *Diheterospora chlamydosporia* *хламидоцин* (циклический тетрапептид цитостатического действия), расширяют область применения пептидов.

Сладкие пептиды, такие, как дипептидный эфир *аспартам* (разд. 2.3.1.12.1), горькие пептиды из продуктов ферментации (соевый соус, сыр и т. д.), а также пептиды из белков рыбы или говядины, улучшают вкус пищи, как изолированный в 1978 г. Ямасаки и Маекава из мясного сока октапептид Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala, широко используются в пищевой промышленности.

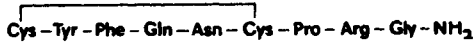
Методы выделения, очистки и аналитические характеристики пептидов описаны подробно в разд. 3.3. Изучение связи между строением и биологической функцией пептидов ведет к познанию молекулярного механизма их действия. При этом главное внимание обращается на выяснение активного центра и определение аминокислотной последовательности, которая ответственна за рецепторное связывание, транспорт и иммунологическое поведение. Большой практический интерес имеет также модификация природных пептидов для пролонгирования их действия и расширения практического применения. Такого рода исследования можно проводить только тогда, когда соответствующий природный пептид имеется в достаточном количестве. Необходимые для изучения пептиды можно получать путем частичного ферментативного расщепления экзопептидазами или эндопептидазами или же с помощью специфических химических методов расщепления (бромцианом или N-бромсукцинимидом); можно также использовать замещение, элиминирование или превращение функциональных групп соответствующих пептидов. Возможности модификации природных пептидов ограничены тем, что часто исследователь располагает лишь нанограммовыми количествами этих веществ.

Большой выбор возможностей для модификации предоставляет химический синтез пептидных аналогов. Для их получения производят систематические замены аминокислот в пептидах. Математический подход дает огромное число возможных вариантов последовательности:

$$P = \frac{n!}{x!y!z!}$$

где  $P$  — число возможных аналогов пептида,  $n$  — общее число аминокислотных остатков,  $x, y, z$  — число повторяющихся аминокислотных остатков.

Пептидный гормон [8-аргинин]вазопрессин, например, включает 9 аминокислот, две из которых одинаковые (Cys):



При систематических заменах аминокислот

$$P = \frac{9!}{2!} = \frac{362880}{2} = 181440$$

т. е. данному пептиду соответствует 181 440 аналогов. Нет необходимости доказывать, что такой путь не реален при выяснении связи между строением и активностью вазопрессина. Большое число аналогов биологически активных пептидов было синтезировано, исходя из каких-то определенных предположений. В связи с большим числом биологически активных аналогов оказалось необходимым ввести правила для наименования синтетических аналогов природных пептидов, которые и были предложены Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB [Hoppe-Syler's Z. Physiol. Chem. 348, 262—265 (1967)]. Некоторые правила можно проиллюстрировать на примере гипотетического пентапептида "Iupaciubin" Ala-Lys-Gly-Tyr-Leu, название которого должно символизировать объединение символов IUPAC и IUB.

1. При замене *аминокислотного остатка* в пептиде название аминокислоты, которая замещает другую, а также положение замены указывают в квадратных скобках перед тривиальным названием соответствующего пептида. В краткой форме, которую применяют только в таблицах, место замены указывается цифрой, стоящей сверху у символа заменяющей аминокислоты. Аналогично поступают при многократных заменах

[4-фенилаланин]Iupaciubin      Ala-Lys-Glu-Phe-Leu

[Phe<sup>4</sup>]Iupaciubin                      1 2 3 4 5

2. *Наращивание* пептида может происходить как с N-конца (а), так и с C-конца (б). При этом придерживаются принятой номенклатуры (разд. 2.1.2).

а) Аргинил-Iupaciubin      Arg-Ala-Lys-Glu-Tyr-Leu

Arg-Iupaciubin                      1 2 3 4 5

б) Iupaciubyl-метионин      Ala-Lys-Glu-Tyr-Leu-Met

Iupaciubyl-Met                      1 2 3 4 5

3. *Введение добавочного аминокислотного остатка* обозначают префиксом *эндо* с указанием положения:

Эндо-2а-треонин-Iupaciubin      Ala-Lys-Thr-Glu-Tyr-Leu

Эндо-Thr<sup>2а</sup>-Iupaciubin                      1 2 2а 3 4 5

4. Пропуск аминокислотного остатка указывают префиксом дез:

Дез-3-глутаминовая кислота — Iupaciubin Ala-Lys-Tyr-Leu

Дез-Glu<sup>3</sup>-Iupaciubin 1 2 4 5

5. Замещения в боковых цепях аминогруппы (α) или же карбоксильной группы (β) обозначают в соответствии с принятой номенклатурой (разд. 2.1.2):

а) N<sup>ε</sup>-Валил-Iupaciubin Val-<sub>ε</sub>  
N<sup>ε</sup>-Val-Iupaciubin Ala-Lys-Glu-Tyr-Leu  
2

б) C<sup>γ</sup>-Iupaciubyl-валин γ-Val  
C<sup>γ</sup>-Iupaciubyl-Val Ala-Lys-Glu-Tyr-Leu  
3

6. Частичные последовательности, произведенные от целого пептида с известным тривиальным названием, записывают следующим образом: после тривиального названия пептида приводят цифры, показывающие положения первой и последней аминокислот в данной частичной последовательности, далее следует греческое числительное для указания числа аминокислотных остатков, из которых построена частичная последовательность.

Iupaciubin-(2—4)-трипептид Lys-Glu-Tyr

2 3 4

Химический синтез пептидов чрезвычайно важен, тем более что разработанные для этого методы могут быть применены также для синтеза белков. Между первым получением пептида Фишером и Фурне (глицилглицин, 1901 г.) и автоматическим синтезом полипептидов и белков в наше время лежит три четверти века интенсивного развития органической химии. Разработаны многочисленные методы направленного синтеза пептидов. Важнейшие из этих методов рассмотрены в этой главе (наряду с методами защиты amino- и карбоксильных групп и функций боковых цепей). Обсуждаются также проблемы рацемизации, стратегии и тактики пептидного синтеза, принципы образования циклических пептидов. В конце главы помещен обстоятельный обзор важнейших пептидов, встречающихся в природе, причем наряду с описанием соединений и получением их с помощью химического синтеза уделяется внимание связи строения и действия.

## 2.2. Пептидный синтез

### 2.2.1. Основные положения

В организме белки образуются за секунды или минуты, химический синтез пептидов и белков в лаборатории в сравнении с естественными процессами очень малоэффективен. Так, например, для первого химического синтеза инсулина понадобилось около двух лет. Несмотря на то что конкуренция с

природой кажется бессмысленной, имеются весьма веские основания для оправдания работы по синтезу и химической модификации таких веществ.

Во-первых, это *подтверждение предполагаемой первичной структуры с помощью химического синтеза*. Общепринято, что полный синтез — надежное доказательство строения. Несмотря на применение новейших методов исследования, при выяснении первичной структуры могут быть допущены ошибки, что ведет к неправильным выводам. Так случилось при изучении АКТГ, соматотропина человека, мотилина. При сравнении синтетического и природного материалов можно выявить ошибочные последовательности.

Более того, в некоторых случаях окончательные доказательства структуры сумели получить только с помощью химического синтеза. В этой связи стоит напомнить о выяснении последовательностей гормонов скотофобина и тиреолиберина.

Во-вторых, *с помощью синтетических аналогов изучается связь между структурой и активностью*.

Для того чтобы выяснить структурные параметры, ответственные за биологическое действие пептидов, были синтезированы многие тысячи аналогов. Например, в случае окситоцина заменой глутамина в положении 4 на треонин удалось синтезировать аналог, который обладает более высокой биологической активностью, чем нативный гормон. Считают, что [4-треонин]окситоцин связывается с рецептором лучше природного гормона. Преимущество синтетического аналога доказано, и возможно, что в далеком будущем подобная мутация осуществится. Изменением длины цепи и другими манипуляциями можно выяснить расположение активных центров, области рецепторного связывания и т. д.

В этой связи представляет интерес также изучение конформаций природных веществ путем сравнения с аналогами различной структуры. Наконец, следует напомнить о возможности получать синтетическим путем радиоактивно меченные аналоги для изучения их связывания и радиоиммунологических исследований.

В-третьих, *химический синтез преследует цель изменить пептиды для модификации фармакологического действия*. Эта задача тесно связана с предыдущей, так как при исследовании связи между строением и активностью неизбежно выявляются новые аспекты для фармацевтического использования. Можно осуществлять различные модификации природной аминокислотной последовательности для получения веществ с улучшенными свойствами. Особый интерес обращается на пролонгирование или усиление биологического действия. В случае пептидов, проявляющих несколько эффектов, важно бывает выделить определенные из них. Путем модификации конечных амино- или карбоксильных групп можно повысить устойчивость пептида к ферментативному расщеплению. При этом следует учитывать, что не все пептиды можно одинаково подвергать химическим изменениям в связи с опасностью частичного или полного инактивирования. В то время как в случае, например, вазопрессина и окситоцина замещение в N-концевой аминокислотной функции ведет к снижению биологического дей-

ствия, полное удаление этой аминокислотной группы вызывает резкий подъем активности. Другие варианты модификации заключаются в изменении длины цепи пептида (при этом из экономических соображений обычно стремятся к уменьшению цепи, если это не сопровождается потерей активности). Окситоцин, вазопрессин, кальцитонин и брадикинин являются такими пептидами, которые для проявления своего биологического действия требуют полной аминокислотной последовательности. В случае многих других пептидов биологической активностью обладают частичные последовательности N-концевой области цепи (АКТГ, паратгормон) или С-концевые фрагменты (ангиотензин, секретин, гастрин, элдоизин, вещество Р, физалемин, холецистокининпанкреозимин и др.). В случае состоящего из 17 аминокислот желудочно-кишечного гормона гастрина уже С-концевой тетрапептид обладает полным спектром биологического действия, причем в количественном отношении оно соответствует примерно десятой части биологической активности целого гормона. С-Концевой додекапептид холецистокининпанкреозимин, состоящий из 33 аминокислот, показывает в 2,5 раза большую активность (вызывает сокращение желчного пузыря) по сравнению с нативным гормоном.

Наращивание цепи — это легкий, а часто и единственный путь к получению меченых пептидов. Большой практический интерес имеют также конкурентные ингибиторы биологически активных пептидов, которые, не обладая активностью пептида, имеют похожую структуру и, присоединяясь к соответствующему рецептору, вытесняют природный активный пептид.

*В-четвертых, химический синтез иногда проводят из экономических соображений.* Например, применяемый для терапевтических целей окситоцин в настоящее время по этой причине получается исключительно химическим синтезом. Это же относится и к некоторым другим пептидам, как, например, к АКТГ и секретину. Синтетический секретин в десять раз дешевле природного продукта, изолированного из свиных кишок. Также обстоит дело и со многими другими активными пептидами. Наряду с вопросами стоимости важную роль играет здесь также доступность пептидов, получаемых химическим синтезом, так как некоторые активные пептиды, как уже упоминалось, встречаются в природе только в нанограммовых количествах. В случае же специфических пептидов человека их получение возможно только синтетическим путем. На примере синтезов АКТГ, глюкагона и секретина можно показать, что синтетические продукты имеют более высокую степень чистоты, чем пептиды, изолированные из природных источников. Полное разделение родственных по аминокислотной последовательности пептидов с противоположным или другого рода действием часто не всегда возможно с помощью применяемых в настоящее время методов изолирования и очистки.

*И наконец, в-пятых, химический синтез дает модельные пептиды* для изучения конформационных закономерностей с помощью физико-химических методов. Синтетические модели применяют также для исследования антигенного действия полипептидов и белков. Большой интерес представляют также синтетические субстраты для энзимологических исследований.

## 2.2.2. Основной принцип пептидного синтеза

Образование пептидной связи в случае дипептида является простым химическим процессом. Дипептид формально получается при отщеплении молекулы воды от amino- и карбоксильной групп двух аминокислот (рис. 2-3). Последовательное повторение этого процесса, казалось бы, должно привести к длинным пептидам и даже к белкам. Однако реализация этого принципа возможна только в жестких условиях неконтролируемой реакции. Основатель пептидной и белковой химии Э. Фишер в 1906 г. писал:

«Если бы сегодня по счастливой случайности с помощью какой-то жесткой реакции, например при сплавлении аминокислот в присутствии водоотнимающих средств, удалось получить настоящий белок и если бы, что еще менее вероятно, можно было искусственно созданный продукт идентифицировать с естественным, то это ничего не дало бы ни для химии белков, ни для биологии».

Образование пептидной связи в мягких условиях удается лишь при активировании карбоксильного компонента одной из аминокислот, вступающей в реакцию (рис. 2-4).

Вторая аминокислота Б (аминокомпонент) атакует активированный карбоксильный компонент аминогруппой с образованием пептидной связи. Незащищенная аминофункция карбоксильного компонента А тоже может реагировать, что приводит (рис. 2-4) к нежелательным побочным продуктам — линейным и циклическим пептидам. Из этого следует вывод, что для однозначного течения пептидного синтеза следует временно блокировать все функциональные группы, не участвующие в образовании пептидной связи.

Пептидный синтез, т. е. образование каждой пептидной связи, является поэтому многоступенчатым процессом (рис. 2-5).

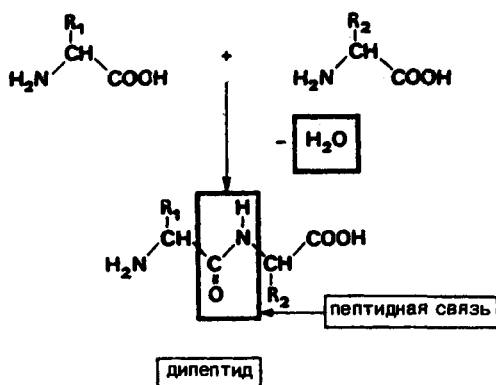


Рис. 2-3. Основной принцип пептидного синтеза.

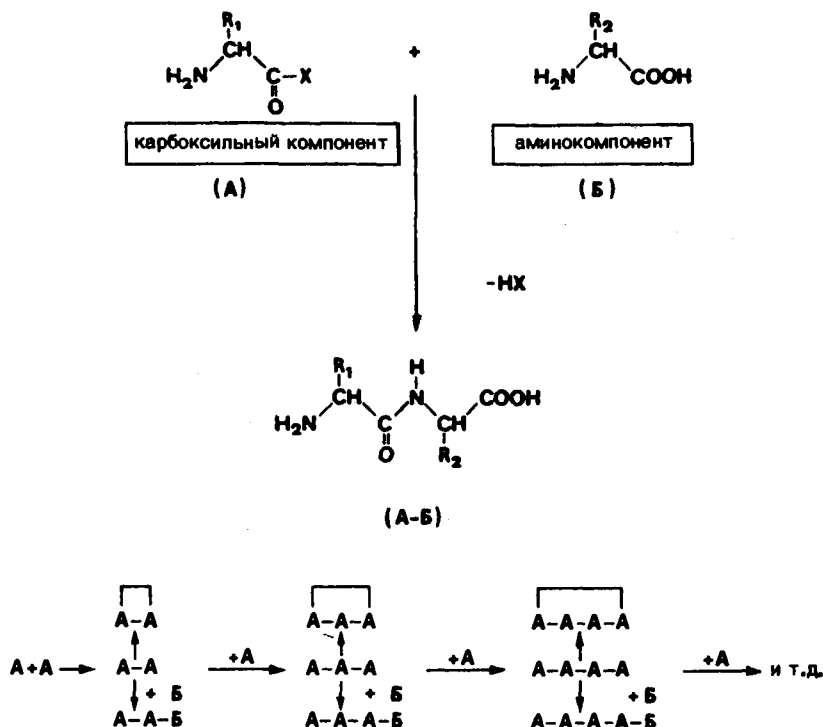


Рис. 2-4. Схема образования пептидной связи без защиты не участвующих в реакции функциональных групп. X — активирующая группа.

В первую очередь получают частично замещенные аминокислоты, при этом они одновременно теряют цвиттер-ионную структуру. Вторая ступень, собственно образование пептидной связи, протекает в две стадии. Сначала нужно активировать N-защищенный карбоксильный компонент. Затем происходит собственно образование пептидной связи, которое протекает либо одноступенчато (вместе с активированием), либо последовательно в следующую стадию. На третьей ступени защитные группы селективно отщепляются, причем полученные частично защищенные производные дипептидов могут использоваться для дальнейших синтезов как карбоксильные или аминокислоты. Само собой разумеется, что в случае синтеза дипептида обе защитные группы удаляются одновременно.

Пептидный синтез, далее, усложняется еще и тем, что из 20 протеиногенных аминокислот 9 обладают еще третьей функциональной группой, которая также требует селективной защиты. Это Ser, Thr, Tyr, Asp, Glu, Lys, Arg, His и Cys. Следует различать *временные* и *постоянные* защитные группы. Временные защитные группы служат для защиты концевых

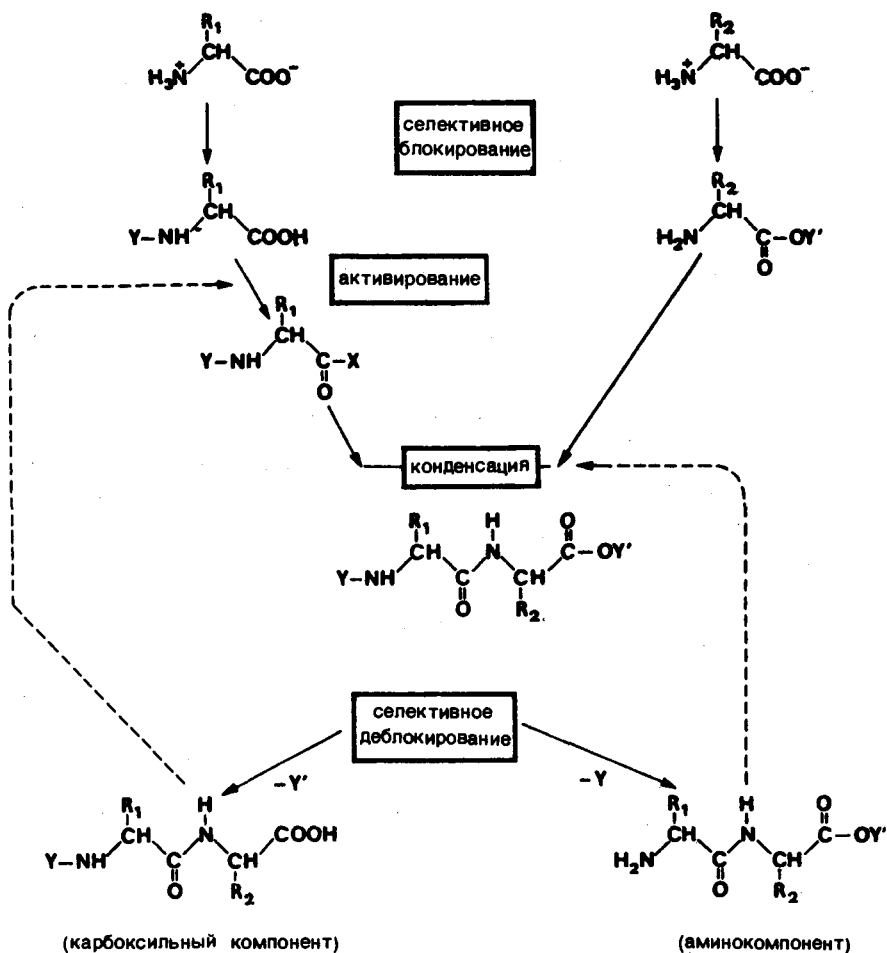


Рис. 2-5. Трехступенчатый процесс пептидного синтеза. Y — защита аминогруппы, X — активирующая группа, Y' — защита карбоксильной группы, R — остаток боковой цепи.

амино- и карбоксильных групп и должны поэтому селективно отщепляться в присутствии постоянных защитных групп. Постоянные защитные группы удаляются обычно только после окончания синтеза пептида или же иногда на стадии промежуточного продукта. Проблема защиты функциональных групп во время пептидного синтеза подробно рассматривается в разд. 2.2.4 и 2.2.10.2.



*Активирование карбоксильного компонента* и следующее за ним образование пептидной связи, т. е. так называемая *реакция конденсации*, в идеальных условиях должны протекать с высокой скоростью без рацемизации, без побочных реакций и с высоким выходом при соединении эквимольных количеств карбокси- и аминокомпонентов. К сожалению, в настоящее время еще неизвестно такого метода конденсации, который удовлетворял бы всем этим требованиям. Приходится выбирать из относительно большого набора методов подходящие варианты в соответствии со специфическими целями синтеза. Решение зависит в каждом случае от выбранной тактики синтеза, в соответствии с которой для каждого отрезка синтезируемой последовательности подбираются оптимальные методы конденсации. Набор методов, которые применяются для практического проведения синтеза пептидов, относительно мал по сравнению с примерно 130 описанными методами синтеза.

Поскольку при пептидном синтезе реакции протекают по группировке, связанной с асимметрическим центром, то существует опасность рацемизации. В связи с важностью этого вопроса для получения стереически однородных продуктов с полной биологической активностью изложение этой проблемы необходимо выделить в особый раздел.

На последней ступени пептидного синтеза происходит *отщепление защитных групп*. Поскольку синтез дипептида с полным удалением защитных групп проводится довольно редко, гораздо большее значение имеет селективное деблокирование, т. е. выборочное отщепление защитных групп N-концевой аминофункции или же C-концевой карбоксильной группы. Этот вопрос находится в тесной связи с общим планом синтеза (разд. 2.2.10).

Под *стратегией* понимают последовательность связывания аминокислотных компонентов в пептид, причем следует различать постепенное наращивание и фрагментную конденсацию. Получение полипептидов путем постепенного наращивания цепи трудноосуществимо при больших размерах целевой молекулы. В этих случаях большое значение приобретает разделение объекта синтеза на отдельные фрагменты с последующим соединением их в полипептид. Оптимальный выбор комбинации защитных групп и применение подходящего метода конденсации для каждого отрезка составляет предмет *тактики* пептидного синтеза.

Стратегическую модификацию постепенного наращивания пептидов или белков представляет разработанный в 1963 г. Меррифилдом пептидный синтез на полимерных носителях. Несмотря на сенсационный успех этого метода (синтез протекает в двухфазной системе и есть возможность его автоматизации), возлагаемые на него большие ожидания до сих пор полностью не исполнились.

### 2.2.3. История развития пептидного синтеза

Первый пептидный синтез был проведен в Лейпциге в 1881 г. Теодором Курциусом (1857—1928 гг.). При попытке получить гипсуровую кислоту бензоилированием глицина наряду с желаемым продуктом были получены Bz-Gly-Gly и так называемая  $\gamma$ -

кислота, состав которой был установлен только 21 год спустя Курциусом и Бенратом. Это был бензоилгексаглицин. Выяснить его строение удалось постепенным наращиванием бензоилированного пептида глицина до гексапептида с применением азидного метода. В 1883 г. при сплавлении эфира гиппуровой кислоты и глицина Курциус также получил  $\gamma$ -кислоту. Хотя Курциусу и не удалось синтезировать свободные пептиды, его вклад в пептидный синтез очень существен; именно ему принадлежит

введение азидного метода, который до сих пор считается одним из самых полезных методов соединения фрагментов, так как практически не сопровождается рацемизацией;

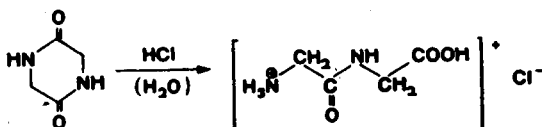
доказательство пригодности эфиров аминокислот для использования в пептидном синтезе;

понимание необходимости введения защитных групп, хотя в то время еще отсутствовала возможность селективного отщепления бензоильного остатка (разд. 2.2.4.1.1.2).

Пионер пептидной и белковой химии Эмиль Фишер в 1892 г. принял после Гофмана кафедру в Берлинском университете. Его выдающиеся работы в области углеводов и пуринов отмечены в 1902 г. Нобелевской премией по химии. В 1900 г. этот замечательный ученый обратился к химии белка. Результаты, полученные им всего за 5 лет в этой новой области, до сих пор считаются пионерскими. В докладе Химическому обществу 6 января 1906 г. Фишер обобщил результаты своей работы в области химии аминокислот, пептидов и белков [1]. Доклад Фишера привлек пристальное внимание исследователей, поскольку в нем были развиты основные принципы синтеза пептидов и белков, которые продолжают работать и сегодня.

«Чтобы получить надежные результаты в этой трудной области, необходимо сначала найти метод, который позволяет последовательно, ступенчато присоединять молекулы аминокислот одну за другой». И далее: «Я вижу счастье в том, что синтез заставляет создавать новые и новые методы конденсации, идентификации и выделения и подробно изучать сотни промежуточных продуктов, прежде чем удастся подойти к белкам».

Это предсказание подтвердилось, хотя сам Фишер успел получить по разработанным им методам только олигопептиды. Тогдашнее состояние препаративной и аналитической химии не позволяло достигнуть больших успехов в области синтеза. Первый свободный пептид глицилглицин Фишер и Фурне получили в 1901 г. омылением диоксиопиперазина крепкой соляной кислотой:



Немного позже Фишер нашел, что подходящими исходными продуктами для целенаправленного синтеза пептидов могут служить хлорангидриды  $\alpha$ -галогенкарбоновых кислот.

Эти соединения без труда реагируют с эфирами аминокислот, давая после омыления и аминирования дипептиды. Пропустив стадию аминирования, можно перевести галогенациламиную кислоту в хлорангидрид и затем ввести в реакцию с эфиром аминокислоты (или также с аминокислотой или пептидом) в водно-щелочном растворе. Достигнув желаемой длины цепи, можно заместить галоген на аминогруппу обработкой аммиаком.

В 1905 г. был разработан хлорангидридный метод: солянокислые соли хлорангидридов аминокислот или пептидов взаимодействовали с эфирами аминокислот, давая соответствующие производные пептидов.

С помощью этих методов Фишер и сотр. синтезировали почти 70 небольших пептидов. Фишер понимал необходимость введения обратимо снимаемой защитной группы и работал в этом направлении, но ему так и не удалось селективно отщепить ни хлорацетильную, ни предложенную позднее карбэтоксигруппы.

Лишь в 1971 г. Штеглих и др. нашли, что хлорацетильный остаток можно селективно удалять с помощью амида 1-пиперидинтиокарбонной кислоты.

Хотя надежды Фишера отщепить карбэтоксильный остаток в мягких условиях и не осуществились, он интуитивно стремился работать с ацильными группами уретанового типа. В настоящее время защиты уретанового типа являются самыми распространенными.

После этих основополагающих работ начала века в области пептидного синтеза больше 20 лет не было существенных успехов. В 1926 г. Шёнхеймер [2] применил при синтезе простых пептидов 4-толуолсульфонильный остаток для защиты аминокислотной группы. Эту защиту можно селективно удалить обработкой в течение нескольких часов иодоводородной кислотой в присутствии нодида фосфония при 50—65 °С. Ученики Фишера Макс Бергман, Эмиль Абдергальден и Герман Лейкс продолжали работать в области химии пептидов и белков. Особенно заметный вклад внесли в науку работы Бергмана.

В 1932 г. Бергман вместе с Л. Зервасом ввели в пептидную химию бензилоксикарбонильную группу. С этого времени начался новый этап развития современной пептидной химии. Во время фашистской диктатуры многие ученые, в том числе Бергман и Зервас, были вынуждены эмигрировать в США.

Бергман и сотр. использовали новую аминокислотную группу для получения различных пептидов [4]. Были синтезированы первые пептиды, встречающиеся в природе, — глутатион, карнозин и др.

В период между 1944 и 1954 гг. развивались аналитические исследования по выделению, очистке и определению строения пептидов с высокой биологической активностью, а также методические разработки в области синтеза, например в 1950 г. был разработан метод смешанных ангидридов (Виланд, Буассона, Воган). Эти успехи сделали возможным химический синтез природных пептидов, обладающих биологической активностью. В 1953 г. дю Виньо удалось синтезировать первый пептидный гормон — окситоцин. Эта работа была удостоена Нобелевской премии за 1955 г. В следующие годы наступило бурное развитие синтетической пептидной химии, было предложено несколько новых защитных групп, эффективные методы конденсации и новые методические варианты, такие, как разработанный Мерриффилдом в 1962 г. пептидный синтез на полимерных носителях. Химический синтез инсулина и рибонуклеазы ознаменовал переход к белковому синтезу.

Более подробные сведения о синтезе важнейших пептидов приведены в обзорах [5—22], монографиях [23—31] и трудах европейских [32—46], американских [47—52] и японских пептидных симпозиумов [53—58].

## 2.2.4. Защитные группы

Разработанные еще Фишером и Курциусом методы образования пептидной связи не нашли широкого применения из-за отсутствия селективно отщепляемых защитных групп. Необходимость обратимого блокирования

всех функциональных групп, не участвующих в образовании пептидной связи, уже была разъяснена в разд. 2.2.2.

Исходя из требований селективности, следует различать *временные* и *постоянные защитные группы*. При введении временных защитных групп должны выполняться следующие условия:

- 1) аминокислоты не должны иметь цвиттер-ионную структуру;
- 2) отщепление временных защитных групп не должно затрагивать постоянных защитных групп и пептидных связей;
- 3) исключение рацемизации как при введении и отщеплении защиты, а также при образовании пептидной связи;
- 4) защищенные промежуточные продукты должны быть достаточно устойчивыми и легко идентифицироваться;
- 5) карбоксильная группа должна легко активироваться в случае защиты аминокислоты, а при защите С-концевой карбоксильной группы нуклеофильность соответствующей аминогруппы должна быть достаточно высокой;
- 6) растворимость защищенных продуктов должна быть хорошей.

Для известных в настоящее время временных защитных групп эти критерии не всегда выполняются.

В соответствии с названием постоянные защитные группы отщепляются после заключительной стадии синтеза, при этом следует исключать воздействия на пептидные связи и функциональные группы. На постоянные защитные группы также распространяются некоторые вышеизложенные условия (четвертое и шестое).

Выбор защитных групп определяется стратегией синтеза. Подчиненная стратегия тактика защитных групп подробнее обсуждается в разд. 2.2.10.2.

Классификация защитных групп зависит от природы блокируемой функции. В то время как защитные группы для тирольной, гидроксильной, гуанидиновой и имидазольной групп естественно относятся к постоянным блокирующим группам, защиты для амино- и карбоксильной функций могут быть как временными, так и постоянными.

#### 2.2.4.1. *Защитные группы для аминной функции*

Защитные группы для аминной функции используются для N-концевых аминокислот и для  $\omega$ -аминокислот лизина и орнитина. Защитные группы этого типа применяются также и для временного блокирования гидразидов ациламинокислот, которые представляют собой промежуточные вещества при получении азидов (разд. 2.2.5.1). Солеобразование у аминной функции не является действенной защитой в синтезе пептидов.

В принципе аминная функция может обратимо блокироваться путем ацилирования и алкилирования. Наибольшее значение на практике имеют ацильные защитные группы, хотя для временной защиты аминокислоты применяются и некоторые алкильные производные.

## 2.2.4.1.1. Защитные группы ацильного типа

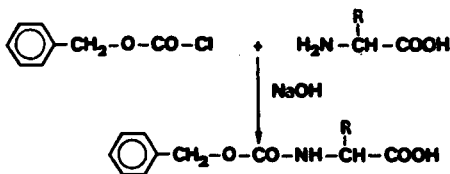
Уже Бергман и др. интенсивно применяли N-ацетиламино кислоты для целенаправленного синтеза пептидов. Оптически активные исходные продукты для образования пептидной связи они получали ацетилированием эфиров аминокислот уксусным ангидридом и последующим омылением. Амидная группировка, выступающая в этом случае как защитная группа, структурно аналогична пептидной связи. Поэтому не было неожиданным, что селективное отщепление этого ацильного остатка не удавалось. Подобные эксперименты проводили еще Курциус с бензоильной группой и Фишер с хлорацетильной группой.

В дальнейшем удалось достигнуть надежного различия в реакционной способности между N-концевой ацильной группой и пептидной связью благодаря модификации ацильного остатка. Это сделало возможным селективное отщепление ацильной защиты. Большой практический интерес представляют защиты амидного типа, получаемые на основе карбоновых и неорганических кислот, а также защитные группы на основе эфиров карбамидной кислоты, названные позднее защитными группами уретанового типа.

## 2.2.4.1.1.1. Защитные группы уретанового типа

Решающий перелом в развитии современной пептидной химии наступил с введением Бергманом и Зервасом [3] бензилоксикарбонильной группы (Z)\*. Исходя из того факта, что N-бензильная группа сравнительно легко отщепляется при каталитическом гидрировании, они заменили этильную группу на бензильную в остатке карбамидной кислоты и получили защитную группу, которую можно удалить при гидрогенолизе. Бензилоксикарбонильная группа Z относится к наиболее часто используемым защитным группам для аминной функции. (В литературе часто та же самая группа называется карбобензоксигруппой Cbo- или Cbz-.)

Введение бензилоксикарбонильной группы в аминокислоты проводится по Шоттен-Бауману реакцией с бензиловым эфиром хлоругольной кислоты в присутствии едкого натра, гидрокарбоната натрия или оксида магния.



Для введения бензилоксикарбонильной группы можно применять также бензил-4-нитрофенилкарбонат и подобные активированные эфиры, особен-

\* Принятое для этой группы сокращение происходит от фамилии Зервас (Zervas).

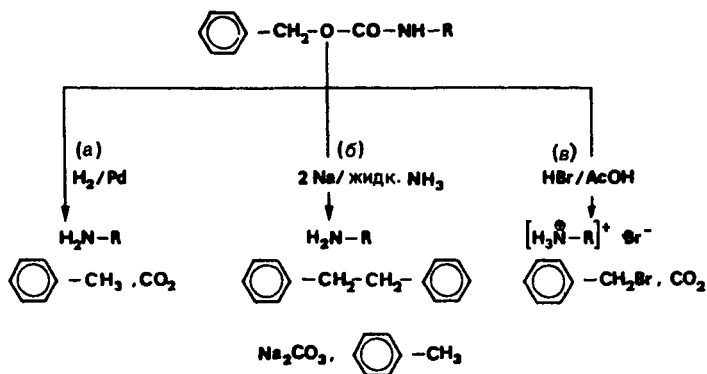


Рис. 2-6. Важнейшие реакции отщепления бензилоксикарбонильной группы. R — остаток аминокислоты или пептида.

но при бензилоксикарбонильном блокировании  $N^\omega$ -лизина или орнитина после защиты  $\alpha$ -аминной функции.

Отщепление бензилоксикарбонильной группы (рис. 2-6) можно проводить каталитическим гидрированием (а), восстановлением натрием в жидком аммиаке (б), а также ацидолизом с помощью бромоводорода в уксусной кислоте (в).

При каталитическом гидрировании в органических растворителях (уксусная кислота, спирты, ДМФ и др.) или в водно-органической фазе с катализаторами (палладиевая чернь, палладий на угле или палладий на сульфате бария) наряду со свободным пептидом получают не мешающие выделению толуол и диоксид углерода. Окончание выделения  $\text{CO}_2$  означает одновременно завершение процесса отщепления. В том случае, если в пептиде присутствуют остатки цистеина или цистина, гидрогенолитического отщепления не происходит, но его можно проводить в присутствии эфира трифторида бора [59] или 4 г-экв. циклогексилamina [60]. Такие же условия нужно соблюдать и при деблокировании в присутствии метионина. При восстановительном расщеплении натрием в жидком аммиаке [61] наряду с желаемым пептидом образуются 1,2-дифенилэтан и небольшие количества толуола; углекислота же связывается в карбонат натрия. При работе по этому методу одновременно с бензилоксикарбонильным остатком отщепляются  $N$ -тозилная,  $N$ -тритильная,  $N^{\text{lm}}$ -,  $S$ - и  $O$ -бензильные группы, а метиловые и этиловые эфиры частично переводятся в амиды. В качестве побочных реакций наблюдается частичное разрушение треонина, частичное деметилирование метионина, а также расщепление некоторых пептидных связей, например  $-\text{Lis-Pro-}$  и  $-\text{Cys-Pro-}$ .

Ацидолитическое расщепление проводят предпочтительно действием бромоводорода в ледяной уксусной кислоте (2 н. раствор); предлагались

также хлороводород, иодоводород в различных растворителях (в диоксане, нитрометане, трифторуксусной кислоте). При ацидолитическом расщеплении наблюдаются, однако, побочные реакции. Например, в случае треонина и серина идет O-ацетилрование, в случае метионина — S-перезтерификация, разрушаются триптофан и нитроаргинин, расщепляются бензильные эфиры и амидные группы, а также происходит Perezтерификация метиловых и этиловых эфиров. Можно значительно снизить степень протекания этих нежелательных реакций, меняя условия реакции [62]. Бензилоксикарбонильная группа может отщепляться также под действием безводного жидкого фтороводорода [63]. С помощью жидкого HF можно удалить почти все известные защитные группы, за исключением N-тозилных, N-формильных, N-фталильных, N-бензильных и N-4-метоксibenзильных остатков, а также метиловых и этиловых эфиров. Введением различных заместителей в бензилоксикарбонильную группу удается улучшить способность производных к кристаллизации, а также ступенчато изменять их чувствительность к действию отщепляющих агентов. Такими преимуществами обладает 4-метоксibenзилоксикарбонильный остаток [64], который легко вводится при использовании кристаллического азида  $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{OCON}_3$  и селективно удаляется безводной трифторуксусной кислотой при температуре  $< 0^\circ\text{C}$ ; бензилоксикарбонильная группа при этом не затрагивается [65]. Для исключения побочных реакций 4-метоксibenзильного катиона, получающегося при ацидолитическом отщеплении, требуются добавки анизол или резорцина.

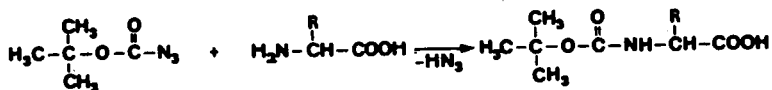
Швицер [66] предложил окрашенные 4-замещенные бензилоксикарбонильные защиты (как, например, 4-фенилазобензилоксикарбонил), которые облегчают аналитический контроль при операциях очистки. 4-Нитробензилоксикарбонильная группа [67] отщепляется гидрогенолизом легче незамещенной бензилоксикарбонильной группы, однако в качестве побочного продукта получается *n*-толуидин, который трудно отделить от продукта.

Представляют определенный интерес 3- и 4-галогензамещенные бензилоксикарбонильные защиты, а также 3-нитро- и 4-цианбензилоксикарбонильные группировки. Эти соединения отличаются повышенной стабильностью при селективном отщеплении ацидолизом *трет*-бутилоксикарбонильных групп от производных диаминокислоты. Наряду с уже известной фоточувствительной 3,5-диметоксibenзилоксикарбонильной группой [68] были предложены другие защитные группы, отщепляемые фотохимически: 6-нитровератрилоксикарбонильная, 2-нитробензилоксикарбонильная [69], а также  $\alpha,\alpha$ -диметил-3,5-диметоксibenзилоксикарбонильная [70]; последняя может сниматься при обработке 5%-ным раствором трифторуксусной кислоты в дихлорметане.

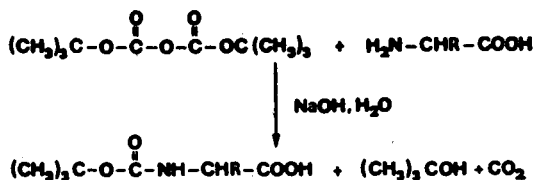
*трет*-Бутилоксикарбонильная группа [71] наряду с бензилоксикарбонильной является наиболее важной аминокзащитной группой. Особенное значение имеет тот факт, что ацильные защитные группы уретанового типа при постепенном наращивании пептидной цепи с C-конца предохраняют соответствующую аминокислоту от рацемизации (разд. 2.2.6). *трет*-

Бутилоксикарбонильная группа устойчива к каталитическому гидрированию, восстановлению натрием в жидком аммиаке и к щелочному гидролизу. Ее можно отщепить ацидолизом в очень мягких условиях.

Через два года после введения в пептидную химию (Альбертсон и др.) *трет*-бутилоксикарбонильной группы Швицер и сотр. [72] описали превосходный ацилирующий агент — *трет*-бутилоксикарбонилазид:



Он реагирует с солью аминокислоты в водно-диоксановой смеси в присутствии триэтиламина или оксида магния; pH можно также поддерживать с помощью 2—4 н. NaOH. Можно вести реакцию и с эфиром аминокислоты в пиридине. Шнабель предложил для введения Вос-группы методику с использованием pH-стата [73, 74]. Естественно, что для введения этой важной защиты было предложено много вариантов, из которых не все здесь могут быть рассмотрены. Несмотря на большие преимущества описанного метода ацилирования с помощью *трет*-бутилоксикарбонилзида, интересны и другие варианты введения этой группы, так как при перегонке *трет*-бутилоксикарбонилзида может произойти разложение со взрывом, а выделяющаяся во время реакции ацилирования азотистоводородная кислота очень токсична. Особое значение приобрел *трет*-бутилоксикарбонилфторид, который образуется из хлорфторфосгена и *трет*-бутанола при температурах около  $-25^\circ\text{C}$  и дает при строгом контроле pH *трет*-бутилоксикарбониламинокислоты с выходом  $> 90\%$  [75]. *трет*-Бутил-S-[4,6-диметилпиримидил-2-тио]карбонат [76] тоже является хорошим реагентом для введения *трет*-бутилоксикарбонильной группы. Превосходным агентом для этой цели оказался ди-*трет*-бутилпирокарбонат  $(\text{Вос})_2\text{O}$  [77—79]:

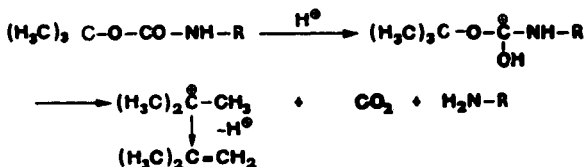


Реакцию ведут с солями аминокислот в водном растворе с добавками диоксана, тетрагидрофурана и других растворителей.

Аминокислоты и пептиды, защищенные по аминогруппе *трет*-бутилоксикарбониллом, можно активировать всеми обычными методами кроме хлорангидридного, если получение хлорангидрида сопровождается выделением хлороводорода (синтез с помощью  $\text{PCl}_5$ ,  $\text{SOCl}_2$  и др.). В других случаях синтеза хлорангидридов, не сопровождающихся выделением HCl, можно использовать Вос-аминокислоты [79a].



Важнейшим отщепляющим реагентом для этой группы является хлороводород в ледяной уксусной кислоте, диоксане, эфире, нитрометане, этилацетате и др. Ацидолитическое деблокирование протекает по следующему механизму:



*трет*-Бутилоксикарбонильная группа гладко отщепляется также трифторуксусной кислотой в дихлорметане или безводной трифторуксусной кислотой при температурах  $< 0^\circ\text{C}$  (последнему методу часто отдается предпочтение). Во время реакции отщепления может протекать *трет*-бутилирование индольного кольца триптофана или тиозфирной группировки метионина.

Уже упомянутые различия в селективности между *трет*-бутилоксикарбонильной и бензилоксикарбонильной группами позволяют комбинировать защиты на  $\alpha$ - и  $\omega$ -аминных функциях.

Правда, в некоторых работах сообщалось о частичном деблокировании  $\omega$ -аминогрупп, защищенных бензилоксикарбонилем, при ацидолитическом отщеплении *трет*-бутилоксикарбонила. Поэтому были предложены другие деблокирующие реагенты, такие, как эфират трехфторида бора, 2-меркаптоэтансульфокислота, водная трифторуксусная кислота и 98%-ная муравьиная кислота, которые, однако, не всегда гарантируют успешное проведение процесса. Предпринимались попытки использовать различные замещенные бензилоксикарбонильные остатки с целью повышения устойчивости к применяемым отщепляющим реагентам. Все это, однако, никоим образом не снижает большого значения *трет*-бутилоксикарбонильной группы в пептидном синтезе.

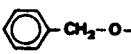
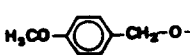
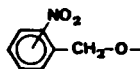
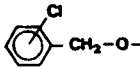
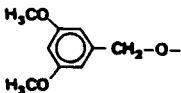
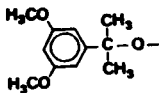
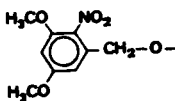
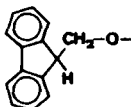
Наряду с упомянутыми предлагались и другие защитные группы уретанового типа (табл. 2-1).

Интересными свойствами обладает 2-[бифенилил-(4)]пропил-2-оксикарбонильная группа как защитная. Благодаря высокой селективности отщепления присоединение этой группы можно комбинировать с защитами  $\omega$ -аминной, гидроксильной и карбоксильной функций на основе *трет*-бутильного остатка. К сожалению, здесь не рассматриваются в подробностях отщепления всех защит, представленных в табл. 2-1. (Желающие могут ознакомиться с этой проблемой по оригинальной литературе.)

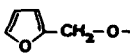
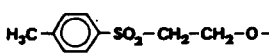
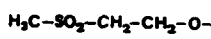
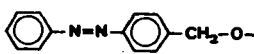
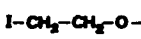
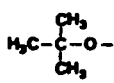
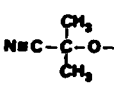
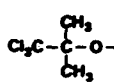

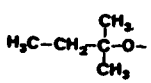
#### 2.2.4.1.1.2. Защитные группы амидного типа

Аминозащитные группы этого типа (табл. 2-2) являются производными карбоновых кислот или замещенных неорганических кислот, они играют второстепенную роль по сравнению с защитными группами уретанового типа.

Таблица 2-1. N-Защитные группы уретанового типа  $Y-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-R$   
 ( $R$ —остаток аминокислоты или же пептида)

Защитная группа $R$	Сокращенное обозначение защитной группы $R$	$Y$	Снятие защиты -
Бензилоксикарбонил- [3]	Z		$\text{H}_2/\text{Pd}$ ; $\text{HBr}/\text{CH}_3\text{COOH}$ ; $\text{Na}/\text{жидк. NH}_3$
4-Метоксибензилоксикарбонил- [64, 65]	Z(OMe)		$\text{CF}_3\text{COOH}$ ; $\text{H}_2/\text{Pd}$ ; $\text{Na}/\text{жидк. NH}_3$
Нитробензилоксикарбонил-	Z(2-NO <sub>2</sub> ) [67] Z(3-NO <sub>2</sub> ) [80] Z(2-NO <sub>2</sub> ) [69]		$\text{H}_2/\text{Pd}$ (легко); $\text{HBr}/\text{AcOH}$ (затруднено по ср. с Z) Дополнительно фотолиз
Хлорбензилоксикарбонил-	Z(4-Cl) [81, 82] Z(3-Cl) [83, 84] Z(2-Cl) [80] Z(2, 4-Cl) [85]		Аналогично Z, но под действием $\text{H}_2/\text{Pd}$ или $\text{HBr}/\text{AcOH}$ (труднее) $\text{CF}_3\text{COOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1:1)
3,5-Диметоксибензилоксикарбонил- [68]	Z(OMe) <sub>2</sub>		Фотолиз
$\alpha,\alpha$ -Диметил-3,5-диметоксибензилоксикарбонил- [86]	Ddz		Фотолиз, 5%-ная $\text{CF}_3\text{COOH}$ в $\text{CH}_2\text{Cl}_2$
2-Нитро-4,5-диметоксибензилоксикарбонил-(6-нитрове-ратрилоксикарбонил-)	Ndz (Nvoc)		Аналогично Z; фотолиз
Флуоренил-9-метоксикарбонил- [87]	Fmoc		Жидк. $\text{NH}_3$ ; 2-аминозтанол; морфолин

Продолжение табл. 2.1

Защитная группа R	Сокращенное обозначение защитной группы R	Y	Снятие защиты
Фурил-2-метоксикарбонил- (фурфурилоксикарбонил-) [88]	Foc		CF <sub>3</sub> COOH; HCl/AcOH; H <sub>2</sub> /Pd
2-(4-Толилсульфонил)-этоксикарбонил- [89]	Tsoc		C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ONa в этаноле
Метилсульфонилэтоксикарбонил- [383]	Msc		Катализируемое основаниями β-элиминирование
4-Фенилазобензилоксикарбонил- [90]	Paz		Аналогично Z
2-Иодэтоксикарбонил- [92]	Ioc		Zn/метанол; электролиз
<i>трет</i> -Бутилоксикарбонил- [71]	Voc		CF <sub>3</sub> COOH; CF <sub>3</sub> COOH/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ; HCl в органических растворителях
2-Циан- <i>трет</i> -бутилоксикарбонил- [93]	Suoc		Слабоосновные реагенты (водный K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ; триэтиламин)
2,2,2-Трихлор- <i>трет</i> -бутилоксикарбонил- [94]	Tsvoc		Кобальт(II)-фталоцианиновый анион в метаноле; Zn/AcOH
Изоникотиноил- [95]	iNoc		Zn/AcOH; H <sub>2</sub> /Pd; устойчив к кислотам
<i>трет</i> -Амилоксикарбонил- [96]	Aoc		CF <sub>3</sub> COOH(анизол); CF <sub>3</sub> COOH/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (1:1)

Продолжение табл. 2.1


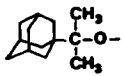

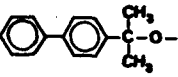


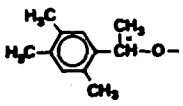
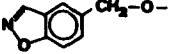
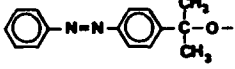
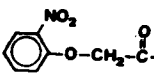

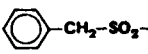
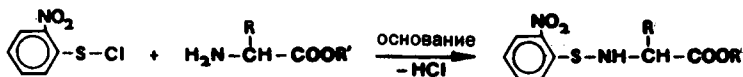
Защитная группа R	Сокращенное обозначение защитной группы R	Y	Снятие защиты
Адамантил-1-оксикарбонил- [97]	Adoc		$\text{CF}_3\text{COOH}$
1-[1-Адамантил]-1-метил-этоксикарбонил- [91]	Adroc		3%-ная $\text{CF}_3\text{COOH}$ в $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; устойчив к гидрогенализу
Изоборнил-оксикарбонил- [98]	Iboc		$\text{CF}_3\text{COOH}$ ; устойчив к $\text{H}_2/\text{Pd}$ и основным реагентам
2-[Бифенил-(4)]пропил-2-оксикарбонил- [99]	Broc		80%-ная $\text{AcOH}$
Пиперидин-оксикарбонил- [100]	Pipoc		Электродлитическое восстановление; $\text{H}_2/\text{Pd}$
Циклопентилоксикарбонил- [101]	cPoc		$\text{HBr}/\text{AcOH}$ ; $\text{Na}/\text{жидк. NH}_3$ ; устойчив к гидрогенализу ( $\text{H}_2/\text{Pd}$ )
$\alpha$ -Метил-2,4,5-триметил-бензилоксикарбонил- [102]	Tmz		3%-ная (по объему) $\text{CF}_3\text{COOH}$ в $\text{CHCl}_3$ ; отщепляется легче, чем Boc, медленнее, чем Broc
Бензилизоксазол-5-метилен-оксикарбонил- [103]	Bic		Изомеризация в присутствии 3 экв. триэтиламина в ДМФ и сольволиз в водном буфере (pH 7)
(4-Фенилазо-фенил)изопропилоксикарбонил- [104]	Azoc		Аналогично Broc

Таблица 2-2. Аминозащитные группы ацильного типа Y—NH—R (R — остаток аминокислоты или пептида)<sup>a</sup>

Защитная группа	Сокращенное обозначение защитной группы	Y	Снятие защиты
Формил- [112, 113]	For	$\text{H}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-$	Сольволиз; окисление, гидразинолиз
Трифторацетил- [111]	Tfa	$\text{CF}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-$	Разб. NaOH; Ba(OH) <sub>2</sub> ; раствор аммиака
Ацетоацетил- [114]	Aca	$\text{H}_3\text{C}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-$	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -NH-NH <sub>2</sub> или же H <sub>2</sub> N-OH в растворе уксусной кислоты
2-Нитрофеноксиацетил- [115]	Npa		Восстановление и последующее нагревание в H <sub>2</sub> O до 100°C
Монохлорацетил- [116]	Mca	$\text{Cl}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-$	Амид пиперидин-1-тиокарбоновой кислоты
2-Нитрофенилтио- [105, 106]	Nps		Хлороводород в инертных растворителях, никель Ренея, тиольные реагенты; дибензолсульфимид
4-Толуолсульфонил- [107]	Tos	$\text{H}_3\text{C}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2-$	Na/жидк. NH <sub>3</sub> ; HBr/AcOH (фенол); водородная кислота/иодид фосфония
Бензилсульфонил- [108]	Bes		Na/жидк. NH <sub>3</sub> ; гидрогенолиз
4-Толуилметилсульфонил- [117]	Tms	$\text{H}_3\text{C}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{SO}_2-$	HF/анизол (0°C, 60 мин)

<sup>a</sup> Фталильная группа не включена в таблицу по структурным соображениям.

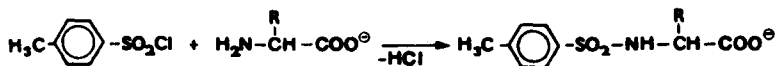
**2-Нитрофенилтиогруппа**, впервые описанная в работе [105], была более подробно изучена применительно к пептидной химии Зервасом и др. [106]. Эта группа, часто называемая по рекомендации IUPAC — IUB **2-нитрофенилсульфенильной группой**, представляет большой практический интерес. Она вводится сравнительно просто при действии на натриевые соли аминокислот ( $R' = Na$ ) или на эфиры аминокислот ( $R' = \text{алкил}$ ) 2-нитрофенилсульфенилхлорида в присутствии эквивалентного количества NaOH или триэтиламина:



Отщепление этой группы можно проводить мягким ацидолизом под действием 2 экв. хлороводорода в эфире, этилацетате и т. п. или же 1+1,1 экв. хлороводорода в метаноле или других спиртах (в последнем случае получается легко удаляемый 2-нитрофенилсульфениловый эфир). Кроме того, нитрофенилсульфенильную группу можно удалять с помощью никеля Ренея (Майенхофер, 1965 г.), меркаптанами (Фонтана и др., 1966 г.), нуклеофильными тиольными реагентами (Кеслер и Изелин, 1966 г.), дибензолсульфидом (Подушка, 1968 г.) и т. д. Отмечалось, что при десульфенилировании пептидов с С-концевым (или расположенным в середине цепи) триптофаном почти количественно образуется 2-(2-нитрофенилтио)индолное производное. Этой побочной реакции можно в значительной степени избежать, если, согласно рекомендации Вюнша и сотр., добавлять производные индола (10—20 экв.).

**4-Толуолсульфонильная группа**, называемая также **тозилъной**, впервые была применена для пептидных синтезов в 1926 г. [107]. Фишер уже в 1915 г. сообщал о возможности отщепления этой группы от N-тозиламинокислот обработкой смесью иодоводородной кислоты с иодидом фосфония.

Получение N-тозиламинокислот проводят взаимодействием толуолсульфохлорида (тозилхлорида) с солями аминокислот, причем, согласно д-ру Виньо и Катсоянису (1954 г.), реакция ацилирования протекает особенно хорошо при pH 9.



Отщепление тозилъной группы [108] производится восстановлением натрием в жидком аммиаке. Более удобным является экстракционный метод, разработанный позднее [109]. Механизм реакции деблокирования не совсем ясен, несмотря на многочисленные исследования (в особенности Рудингера и сотр.). При деблокировании наблюдались различные побочные реакции: расщепление связи Lys — Pro, деметилирование метионина, частичное разрушение треонина и триптофана и др.

Хорнер в 1965 г. описал метод восстановительного расщепления с помощью тетраметиламинильного радикала, образующегося при разрядке тетраметиламмония на ртутном катоде. Этим методом можно удалять также и N-бензоильный остаток [110], так что предложенная еще в начале века Курциусом аминокзащитная группа теперь тоже может относиться к селективно удаляемым.

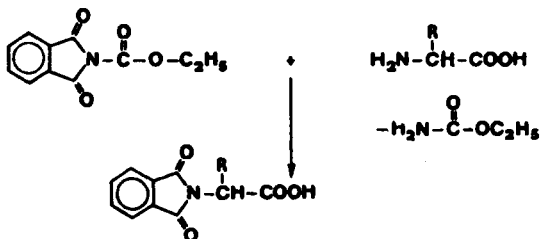
На возможность детоцилирования по Фишеру (иодоводород + иодид фосфония в уксусной кислоте) при 60 °С уже указывалось. Деблокирование проходит также с HBr/AcOH в присутствии фенола в течение 16 ч при комнатной температуре (Рудингер и сотр., 1959 г.).

Благодаря высокой стабильности тозилъного остатка в условиях отщепления защитных групп уретанового типа эта защитная группа часто применяется для блокирования N<sup>ω</sup>-аминофункций, как, например, гуанидиновой группы аргинина. Проблема детоцилирования еще ждет своего окончательного решения.

**Трифторацетильная группа** впервые применена в пептидной химии в 1952 г. [111]. Она вводится без рацемизации при реакциях с ангидридом трифторуксусной кислоты в безводной трифторуксусной кислоте, с тноэтиловым эфиром трифторуксусной кислоты или же с фениловым эфиром трифторуксусной кислоты. Деблокирование проходит при комнатной температуре под действием 0,01—0,02 н. NaOH, разбавленных растворов аммиака или гидроксида бария. Для присоединения N-трифторацетил-аминокислот неприемлем метод смешанных ангидридов.

При щелочном отщеплении этой защитной группы наблюдались различные побочные реакции. Как альтернатива в качестве отщепляющего реагента был предложен боргидрид натрия в этаноле, причем в качестве защиты карбоксила в этом случае должен быть использован *трет*-бутиловый эфир. При этих условиях бензилоксикарбонил-, *трет*-бутилоксикарбонил- и *трет*-бутилэфирные группы устойчивы. При активировании трифторацетил-аминокислот существует опасность рацемизации, благодаря чему значение этой защитной группы для целей синтеза не столь велико. Широкое распространение получили эфиры N-трифторацетил-аминокислот и эфиры пептидов; благодаря высокой летучести эти производные используются в газовой хроматографии.

**Фталильная группа** [118] редко употребляется для пептидных синтезов из-за ее чувствительности к щелочам. Фталиламино кислоты получают при реакции с N-этоксикарбонилфталымидом [119] в мягких условиях с высокой степенью аналитической и оптической чистоты:



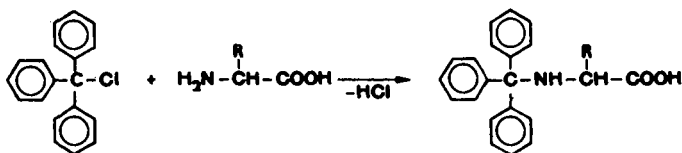
Отщепление фталильной группы [120] производится ацетатом гидразина в метаноле. Этот мягкий метод деблокирования, протекающий при кажущемся рН 6,5 в случае щелочелавильных пептидных производных следует предпочесть обычным методам гидразинолитического расщепления.

Устойчивость фталильной группы в условиях деблокирования многих других защитных групп должна была бы способствовать ее широкому применению. Однако фталильная защита лишь иногда используется в определенных синтезах; ее применение ограничено трудностями отделения получаемого во время гидразинолитического расщепления фталилгидразида от производного пептида, а также уже упоминавшейся неустойчивостью защитной группы в щелочных условиях.

#### 2.2.4.1.1.3, Защитные группы алкильного типа

N-Бензильная и N,N-дибензильная защитные группы не представляют большого интереса для пептидного синтеза. Деблокирование таких защит возможно лишь при каталитическом гидрировании в присутствии палладиевой черни при 70—80 °С.

Большой интерес представляет *трифенилметильная группа* [121, 122], известная также как *тритильная группа* (Trt). Согласно Тамаки и сотр. [123], прямое тритилирование свободных аминокислот (2 экв. тритилхлорида) в присутствии триэтиламина в апротонном растворителе приводит к высоким выходам тритильных производных:



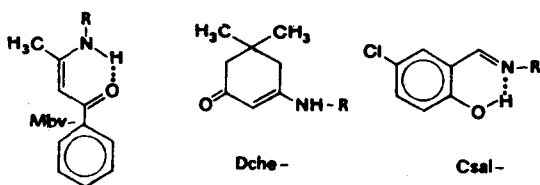
Можно исходить также из эфиров аминокислот и удалять эфирную группу после тритилирования. Однако омыление часто бывает затруднительным. Встречаются сложности и при селективном гидрогенолитическом отщеплении бензильной группы от соответствующих тритилированных бензиловых эфиров аминокислот. При применении в качестве растворителя дноксана удаляется только бензильная эфирная группировка. Активированию карбоксильной группы тритилированных аминокислот мешают стерические препятствия, создаваемые тремя объемными фенильными остатками. Наилучшие результаты дает применение карбодимидного метода (разд. 2.2.5.4). Кроме того, хорошие результаты получаются с N-гидроксисукцинимидными эфирами [124]. Отрицательное стерическое влияние тритильной группы меньше сказывается на поведении карбоксильной функции пептидов, поэтому в случае пептидов омыление и активирование протекают без особых трудностей. Можно использовать преимущество тритильной защиты, заменив ею другую защитную группу на какой-то стадии синтеза пептида. Тритильная группа может отщепляться в мягких ус-



ловиях при ацидолизе хлороводородом (соляной кислотой) в различных органических растворителях, трифторуксусной кислотой (можно использовать также водную трифторуксусную кислоту или трифторуксусную кислоту в водной уксусной кислоте) при  $0 \div -10^\circ\text{C}$ , кратковременным нагреванием с ледяной уксусной кислотой или многочасовой обработкой 70—80%‑ной уксусной кислотой. Удаляется тритильный остаток и при каталитическом гидрировании, причем отщепление идет медленнее, чем удаление в тех же условиях бензилоксикарбонильной группы. Все эти методы отщепления позволяют селективно удалять тритильные остатки в присутствии бензилоксикарбонильной, *трет*-бутилоксикарбонильной, *О*-бензильной, *О*-*трет*-бутильной и *S*-бензильной групп. Были предложены и такие методики детритилирования, когда  $\text{N}^\alpha$ -тритильный остаток селективно удаляется в присутствии  $\text{N}^\omega$ -,  $\text{N}^{\text{im}}$ -, *О*- и *S*-тритильных групп. Несмотря на столь многочисленные возможности комбинаций, значение тритильной защиты ограничено ее высокой лабильностью к кислотам и уже упомянутыми проявлениями стерического эффекта.

Далее следует упомянуть защитные группы, которые представляют только теоретический интерес и были до сих пор использованы в особых случаях.

*1-Метил-2-бензоилвинильная группа (Mbv)* получается при взаимодействии бензоиллактона с калиевыми солями аминокислот и отщепляется при кратковременной обработке разбавленной соляной кислотой или уксусной кислотой (Дане и сотр., 1962 г.):



R — остаток аминокислоты или пептида

*5,5-Диметил-3-оксоциклогексен-1-ильная группа (Dche)* вводится при реакции эфиров аминокислот с димедоном (Гальперн и сотр., 1964 г.). Она устойчива к кислотам и каталитическому гидрированию. Для активирования *N*-[5,5-диметил-3-оксоциклогексен-1-ил]аминокислот подходят карбодимидный и азидный методы, а также метод Вудварда. Можно применять также тио- и 4-нитрофениловые эфиры. Отщепление этой защитной группы производится бромной водой или нитритом натрия в уксуснокислом растворе.

Макинтайр (1947 г.) описал блокирование аминофункции аминокислоты 2-гидроксизамещенными ароматическими альдегидами. Получающиеся шиффовы основания хорошо кристаллизуются и являются очень устойчивыми соединениями благодаря внутримолекулярным водородным связям.

*N-(5-хлорсалицилал)-группа (Csal)* была предложена в 1962 г. Шиханом и др. для защиты *N*-концевых аминокислот и последующего связывания их в дипептиды карбодимидным методом. Деблокируют их при комнатной температуре с помощью 1 н. HCl.

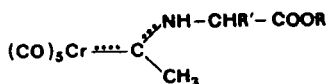
Растущий интерес вызывают защитные группы, такие, как введенная Тессером Msc-группа (табл. 2-1), которые могут быть отщеплены основаниями.

В 1976 г. Кунц предложил 2-(метилтио)этоксикарбонил  $\text{CH}_3\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CO-NH-R}$  (Mtc) как защитную группу. Такие соединения можно сделать более лабильными посредством метилирования или окисления в сульфон и отщеплять  $\beta$ -элиминированием по аналогии с методом Тессера. Такие же свойства должны иметь и фосфониевые соединения, такие, как *фосфонийэтоксикарбонильные производные*  $(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{P}^+\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CO-NH-R}$ .

*Дифенилтиофосфонил-группа*  $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{PS-NH-R}$  (Ptr), согласно Уги и Икеда (1976 г.), устойчива к трифторуксусной кислоте и отщепляется под действием 1 н. HCl в уксусной кислоте, 4 н. HCl в диоксане, а также трифенилфосфиндигидрохлоридом.

*Тозиламинокарбонил-группа* (4-тозилсульфонилкарбамоильная группа)  $\text{H}_3\text{C-C}_6\text{H}_4\text{-SO}_2\text{-NH-CO-NH-R}$  (Tas) вводится с помощью 4-тозилизоцианата. Отщепление Tas происходит при нагревании с различными 95%-ными спиртами (85—105 °C).

Теоретический интерес имеет предложенный Вайсом и Фишером комплекс хрома следующего состава:



#### 2.2.4.2. Защитные группы для карбоксильных и амидных функций

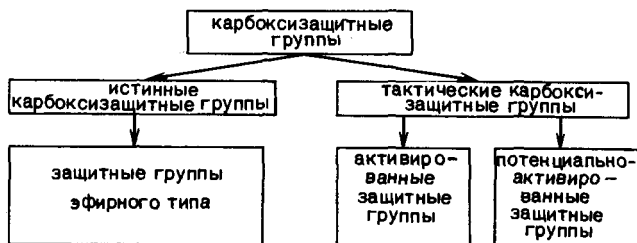
При пептидном синтезе, как уже указывалось в разд. 2.2.2, карбоксильная функция аминок компонента тоже должна быть защищена.

Проще всего защита карбоксильной группы достигается *солеобразованием*. Соли аминокислот со щелочными и щелочноземельными металлами обычно реагируют в воде или в водном диоксане с соответствующим образом активированным карбоксикомпонентом. Большое значение имеют также соли пептидов с третичными основаниями (триэтиламин, трибутиламин, N-метилморфолин, N-этилпиперидин, 1,1,3,3-тетраметилгуанидин и др.). Эти соли позволяют вести пептидный синтез в органических растворителях, главным образом в диметилформамиде. Для конденсации подходят методы активированных эфиров, галогенангидридов, смешанных ангидридов и азидный. Преимущество такого пути в том, что по окончании реакции карбоксильная функция освобождается подкислением. При синтезе дипептидных производных из солей аминокислот встречаются и с затруднениями. Например, при частичном омылении активированного эфира получают смесь N-защищенного дипептида и N-защищенного карбоксильного компонента. Разделение этих продуктов крайне затруднительно. Поэтому более выгодно вводить в реакцию соли ди- или трипептидов, так как здесь возможно разделение на основе различий в растворимости исходного и конечного продуктов.

Кроме того, в случае использования активированных эфиров возможна перэтерификация с образованием активированного эфира конечного продук-

та. Этот активированный эфир может вступать в реакцию с еще не прореагировавшим аминокислотным компонентом, что приводит к появлению пептидов с большой молекулярной массой.

Описанный способ не является универсально применимым, поэтому для защиты карбоксильной функции аминокислоты (или пептида), подлежащей ацилированию, необходимо применять обратимо отщепляемые группировки. Для этой цели в первую очередь подходят различного типа эфиры. Амидные группы служат, как правило, достаточной защитой, если входят в состав растущего пептида. Для улучшения растворимости амидов пептидов в органических растворителях нужно блокировать амидную группу. Следует различать карбоксизащитные группы, которые по окончании синтеза пептида или пептидного фрагмента снимаются с регенерацией свободной карбоксильной группы и такие, которые после получения фрагмента либо прямо, либо после соответствующей обработки превращаются в группы, способные к дальнейшему аминолизу. Эти защиты названы Вюншем [125] как *истинные*, или *потенциально активные, карбоксизащитные группы*. Принята следующая классификация защитных групп:



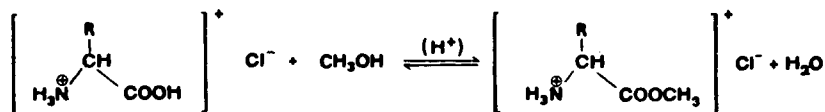
#### 2.2.4.2.1. Истинные карбоксизащитные группы

Под истинными защитными группами понимают соответственно определению такие, которые после синтеза пептида или пептидного фрагмента отщепляются с регенерацией исходной карбоксильной группы.

##### 2.2.4.2.1.1. Защитные группы эфирного типа

Преобладающее число карбоксизащитных групп производится на основе первичных, вторичных и третичных спиртов. Для приготовления эфиров аминокислот служат методы, известные из органической химии, причем исходят либо из свободной аминокислоты, либо из N-замещенного производного аминокислоты.

По классическому методу этерификации (метод Фишера) проводят реакцию гидрохлорида аминокислоты с соответствующим спиртом в присутствии хлороводорода как катализатора [126]:



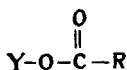
Согласно закону действующих масс, количественный перевод аминокислоты в соответствующий эфир достигается тем, что спирт берут в большом избытке, а образующуюся воду удаляют из сферы реакции, например, азеотропной отгонкой. Наряду с хлороводородом в качестве катализаторов были предложены эфират трифторида бора, уксусный ангидрид, ацетилхлорид, тионилхлорид и др. (в последнем случае образование эфира протекает по другому механизму). Этерификация с тионилхлоридом предложена Бреннером и др. [127]. При этом в качестве промежуточного продукта реакции из  $\text{SOCl}_2$  и  $\text{CH}_3\text{OH}$  образуется, вероятно, метиловый эфир хлорсульфиновой кислоты  $\text{H}_3\text{CO-SO-Cl}$ , который реагирует с аминокислотой с выделением  $\text{SO}_2$  и образованием метилового эфира. По этому методу можно получать также этиловые и бензиловые эфиры. Эфиры из свободных аминокислот можно получать и другими способами, например перэтерификацией или реакцией с олефинами (последнюю используют для синтеза *трет*-бутиловых эфиров).

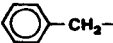
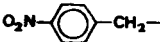


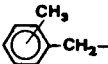
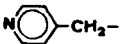
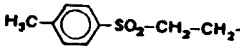
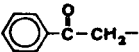
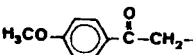
N-Защищенные аминокислоты этерифицируют реакцией с алкилгалогенидами в присутствии третичных аминов или с диазометаном или производными диазометана и т. д. N-Защищенные аминокислоты и пептиды можно превращать в соответствующие эфиры в очень мягких условиях при реакции их цезиевых солей с алкилгалогенидами [128]. В табл. 2-3 приведены некоторые важные карбоксизащитные группы; наибольшее практическое значение имеют метиловые, этиловые, бензиловые, 4-нитробензиловые и *трет*-бутиловые эфиры.

*Метиловые эфиры* (-OMe) и *этиловые эфиры* (-OEt) применялись в пептидном синтезе уже Фишером и Курциусом. Снятие этих защит по окончании пептидного синтеза проводят мягким щелочным гидролизом в диоксане, метаноле (этанол), ацетоне, ДМФ с добавлением различных количеств воды. Названные алкиловые эфиры следует применять для синтеза коротких пептидов, так как с ростом цепи гидролитическое расщепление затрудняется, а применение жестких условий гидролиза повышает опасность побочных реакций. Следует избегать избытка щелочи, в противном случае может произойти рацемизация и другие побочные реакции. Оба алкильных эфира устойчивы к гидрогенализу и мягкому ацидолизу. При гидронолизе они переходят в гидразиды, что можно использовать для дальнейшей конденсации фрагментов с помощью азидного метода. При аммонолизе метиловые и этиловые эфиры дают амиды. Это применяют в тех случаях, когда C-концевая аминокислота должна нести амидную группу.


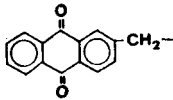
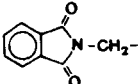

*Бензиловые эфиры* (-OBzl) [129] свободных аминокислот получают при прямой этерификации бензиловым спиртом в присутствии кислых катализаторов (4-толуолсульфокислота, хлороводород, бензосульфокислота, полифосфорная кислота и др.). Образующаяся при этерификации вода уда-

Таблица 2-3. Карбоксизащитные группы эфирного типа



Эфир аминокислоты	Y	Снятие защиты
Метилловый Этиловый	CH <sub>3</sub> - H <sub>3</sub> C-CH <sub>2</sub> -	Щелочной гидролиз; ферментативные методы (трипсин или химотрипсин); с 0,1 н. NaOH, pH 7,0
Бензиловый [129]		H <sub>2</sub> /Pd; насыщ. HBr/AcOH; Na/жидк. NH <sub>3</sub> ; жидк. HF; щелочной гидролиз
4-Нитробензиловый		H <sub>2</sub> /Pd; щелочной гидролиз; Na/жидк. NH <sub>3</sub> ; устойчив против HBr/AcOH
<i>трет</i> -Бутиловый [130, 131]		CF <sub>3</sub> COOH; насыщ. HCl/AcOH; 2 н. HBr/AcOH; эфират трифторида бора/AcOH
4-Метоксибензиловый [132, 133]		CF <sub>3</sub> COOH(анизол) при 0°C; HCl/нитрометан; H <sub>2</sub> /Pd; жидк. HF; щелочной гидролиз
Метилзамещенный бензиловый [134]	 (2,4,6-триметил- и пентаметилбензиловый)	CF <sub>3</sub> COOH при 20°C; 2 н. HBr/AcOH
Пиридил-4-метилловый (4-пиколиловый) [135]		H <sub>2</sub> /Pd; Na/жидк. NH <sub>3</sub> ; щелочной гидролиз; электролитическое восстановление
2-(Толуол-4-сульфонил)-этиловый [136]		β-Элиминирование в смеси вода/диоксан с раствором Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> при 20°C
Фенациловый [137]		Тиофенолят натрия; H <sub>2</sub> /Pd; Zn/AcOH; фотолиз
4-Метоксифенациловый [138]		Фотолиз при УФ-облучении при 20°C

Продолжение таблицы 2-3.

Эфир аминокислоты	У	Снятие защиты
Дифенилметилловый (бензгидриловый) [139]		$H_2/Pd$ ; $CF_3COOH$ при $0^\circ C$ ; разб. $HCl/AcOH$ ; эфират три- фторида бора/ $AcOH$ (1:6) при $25^\circ C$
Антрахинон-2-метило- вый [140]		$H_2/Pd$ ; $Na_2S_2O_4$ в водно-ди- оксановом растворе, pH 7—8; фотолиз
Фталымидометилловый [141]		Тиофенолят натрия; $Zn/AcOH$ ; $N_2H_4$ ; $HCl/орг.$ рас- творитель; $(CH_3)_2NH/этанол$
Фениловый [142]		Омыление, pH 10,5 (0,8 экв. $H_2O_2$ )
Триметилсилиловый [143, 144]	$(CH_3)_3Si-$	Сольволиз водой или спиртом
2-Триметилсилилэти- ловый [145]	$(CH_3)_3Si-CH_2-CH_2-$	$F^-$

ляется азеотропной отгонкой с подходящим растворителем (бензол, толуол, тетрагидрид углерода). Для получения бензиловых эфиров пригоден также и тионилхлоридный метод [127]. Синтезы бензиловых эфиров N-замещенных аминокислот проводят с использованием дициклогексилкарбодимиды, тионилхлорида и сульфурилхлорида, а также методами перэтерификации. Для расщепления бензиловых эфиров применяют каталитическое гидрирование и ацидолиз насыщенным раствором бромоводорода в уксусной кислоте (12 ч при комнатной температуре или 1-2 ч при  $50-60^\circ C$ ). Используют также натрий в жидком аммиаке, жидкий фтороводород и щелочной гидролиз. Ацидолитическое расщепление в названных условиях может иногда задевать и пептидные связи.

**4-Нитробензиловые эфиры** ( $-ONb$ ) получают, используя те же методы, что и для незамещенных бензиловых эфиров. N-Замещенные аминокислоты и пептиды легко реагируют с 4-нитробензилгалогенидами в присутствии третичных оснований, превращаясь в соответствующие эфиры. 4-Нит-

робензиловые эфиры устойчивы к бромоводороду в уксусной кислоте и даже жидким фтороводородом отщепляются не полностью. Снятие этой защиты легко проходит при гидрогенолизе, щелочном гидролизе и восстановлении натрием в жидком аммиаке.

*трет-Бутиловые эфиры* (-OBu<sup>t</sup>) [130, 131] имеют чрезвычайно большое значение для синтеза пептидов. *трет-Бутилэфирная* группа очень легко отщепляется при ацидолизе, но она устойчива к гидрогенолизу и заметно устойчива в условиях щелочного гидролиза, гидразиолиза и аммонолиза. Далее следует отметить ее устойчивость в условиях кислотного отщепления 2-нитрофенилтио-, тритильной и 2-[бифенил-(4)]пропил-2-оксикарбонильной групп. Эфират трифторида бора в уксусной кислоте селективно отщепляет *трет-бутилэфирную* группу в присутствии бензилоксикарбонильной группы. Дифференцированный ацидолиз *трет-бутилоксикарбонильной* группы удается лишь в очень редких случаях. *трет-Бутиловые эфиры* аминокислот можно получать присоединением изобутилена к аминокислоте при катализе кислотами или перэтерификацией с *трет-бутиловым* эфиром уксусной кислоты. В этих условиях гидроксильные группы серина и треонина также переводятся в *трет-бутилэфирные*. Разумеется, что N-защищенные аминокислоты (бензилоксикарбониламинокислоты) тоже можно превращать в эфиры при реакции с изобутиленом в присутствии серной кислоты или перэтерификацией с *трет-бутиловым* эфиром уксусной кислоты в присутствии хлорной кислоты. Этот путь можно рекомендовать и в том случае, если по причине плохой растворимости некоторые аминокислоты не удастся этерифицировать другим способом.

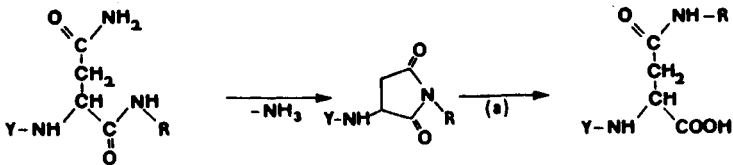
*Пиридил-4-метиловый эфир* [135] благодаря основным свойствам позволяет обратимо фиксировать пептиды на катионообменниках после каждой ступени синтеза. Таким путем можно отделять пептиды от побочных продуктов. Преимущество этого метода состоит в том, что в противоположность твердофазному синтезу здесь все реакции протекают в гомогенной фазе. Похожий метод с применением 4-диметиламинобензилового эфира описан в работе [146].

*Нерастворимые полимерные эфиры* являются чрезвычайно интересным классом карбоксизащитных групп, из которых полимерный бензиловый эфир является прототипом разработанного Меррифилдом твердофазного синтеза пептидов. Проблема синтеза на полимерных носителях излагается (разд. 2.2.7).

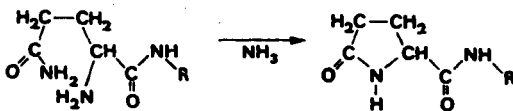
Карбоксизащитные группы в случае аминокислот могут применяться как для  $\alpha$ -, так и для  $\omega$ -карбоксильной функции. Относительно просто можно получать пептиды с С-концевыми аминокислотами. Пептиды с аминокислотами в середине цепи или с N-концевыми аминокислотами нельзя получить без специального блокирования. Поэтому для наращивания пептидов с  $\alpha$ - или  $\omega$ -аминокислотами требуется селективное блокирование одной карбоксильной группы.

### 2.2.4.2.1.2. Защитные группы для амидной функции

Амид карбоновой кислоты представляет собой нейтральную функциональную группу, которая блокирует карбоксильную функцию и поэтому не нуждается в дополнительной защите. Это верно также и для концевой  $\alpha$ -амидной функции в условиях обычных реакций конденсации и деблокирования, если не считать иногда наблюдающейся дегидратации с образованием нитрила. Гораздо чаще побочные реакции происходят у  $\omega$ -амидных групп аспарагина и глутамина. Дегидратация амидной группы до нитрила может происходить при применении дициклогексилкарбодиимида и, кроме того, при гидразинолизе, если он необходим в ходе пептидного синтеза;  $\omega$ -амидные группы могут переводиться в гидразидные. Отщепление защитных групп в спиртовых растворах может приводить к алкоголизу амидных группировок. Образование сукцинимидных производных в случае пептидов, содержащих аспарагин с незамещенной амидной функцией, влечет за собой нежелательную транспептидацию (а):



Пептиды, имеющие N-концевой глутамин с незащищенной аминной функцией, легко превращаются в пироглутамилпептиды:

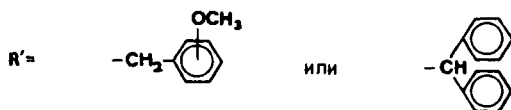
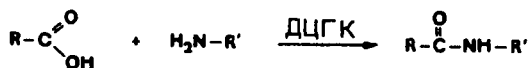


Для исключения описанных побочных реакций и особенно для улучшения растворимости в органических растворителях пептидов, имеющих амидные группы, большое значение имеет обратимое блокирование амидных функций. Как известно, незамещенные амидные функции склонны к образованию внутри- или же межмолекулярных водородных связей. При этом растворимость в органических растворителях ухудшается и одновременно повышается растворимость таких производных в воде, что нежелательно при синтезе пептидов.

Из множества теоретически возможных вариантов блокирования в практических условиях пептидного синтеза особенно пригодными оказались замещенные бензильные группы. Они могут легко отщепляться ацидолизом. Для введения метоксизамещенного бензильного остатка или же незамещенного дифенилметильного остатка N-защищенное производное аминокислоты (R) со свободной карбоксильной функцией конденсируют с соот-

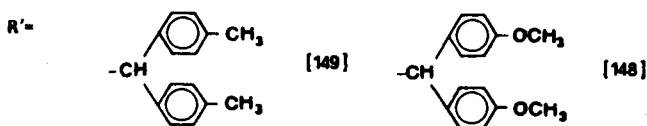
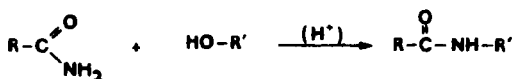


ветствующим амином ( $R'$ ) с помощью дициклогексилкарбодиимида [147]:



4-метоксibenзил-                      дифенилметил-  
2,4-диметоксibenзил-  
2, 4, 6-триметоксibenзил-

Метил-или метоксизамещенные дифенилметильные группы вводятся реакцией N-защищенных амидов аминокислот с соответствующим карбинолом в присутствии кислот [148]:



4,4'-диметилдифенилметил-      4,4'-диметоксибифенилметил-

Все амидозащитные группы могут отщепляться жидким фтороводородом [149]. За исключением 4-метоксibenзильной и дифенилметильной групп, удаление защитных групп удается уже при обработке трифторуксусной кислотой при 20 °С. Добавка анизол способствует реакции отщепления.

#### 2.2.4.2.2. Тактические карбоксизащитные группы

Для специальных синтетических целей вводятся карбоксизащитные группы, которые после получения пептидного фрагмента не отщепляются с освобождением карбоксильной функции как истинные защитные группы, а непосредственно или после химического превращения выступают в роли активированных производных, пригодных для соединения фрагментов.

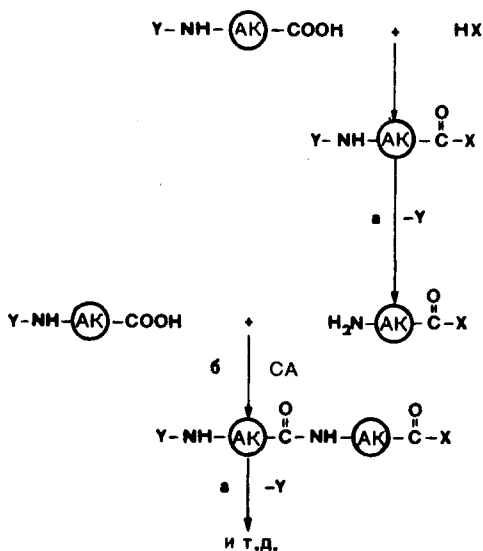
2.2.4.2.2.1. *Активированные карбоксизащитные группы*

Карбоксизащитные группы этого типа могут применяться для пептидных синтезов только в определенных условиях, так как аминокомпоненты с активированными карбоксильными группами могут вступать в реакцию не только с карбоксильными компонентами, но и давать нежелательные побочные продукты в результате внутрн- и межмолекулярной самоконденсации. Для того чтобы обеспечить однозначное течение реакции, в пептидном синтезе применяют карбоксильные компоненты, имеющие более высокий потенциал ацилирования, чем активированная карбоксизащитная группа аминокомпонента.

Такой подход был введен в пептидную химию в 1959 г. Гудманом и Стьюбеном [150] (в мировой литературе известен как *backing-off-метод*).

В качестве активированных карбоксизащитных групп применяют, как правило, различные активированные эфиры (разд. 2.2.5.3). В принципе к ним следовало бы отнести также метиловые и этиловые эфиры, так как они обладают неким потенциалом ацилирования (образование диоксопиперазинов) и могут аммонолизом превращаться в амиды. Однако из-за слишком низкой (для пептидного синтеза) активности названные эфиры здесь не рассматриваются.

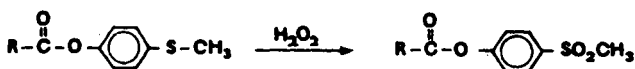
В случае *backing-off-метода* N-защищенная аминокислота (для предотвращения рацемизации предпочтительны защитные группы уретанового типа) переводится в активированный эфир (X — активирующий компонент) и после этого деблокируется. Полученный аминокомпонент связывается с другой N-защищенной аминокислотой (карбоксильный компонент) преимущественно методом смешанных ангидридов (CA), давая защищенное производное дипептида. Последовательным повторением стадий *a* и *b* можно получить желаемый фрагмент:



Разумеется, не все известные активированные эфиры подходят для этих целей. Подходящие активированные эфиры подбираются опытным путем.

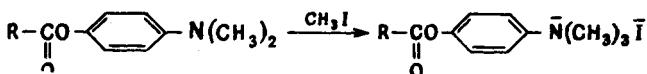
2.2.4.2.2.2. *Потенциально активируемые карбоксизащитные группы*

В отличие от уже рассмотренных тактических защитных групп потенциально активируемые карбоксизащитные группы ведут себя во время пептидного синтеза как настоящие защитные группы. Другими словами, в этом случае можно пренебречь опасностью побочных реакций самоконденсации. В качестве прототипа таких защитных групп можно назвать 4-метилтиофениловый эфир [151]. Получение его проводится по *backing-off*-методу. Перед конденсацией фрагментов проводят активирование окислением пероксидом водорода или 3-хлорпербензойной кислотой:



Полученный 4-метилсульфонилфениловый эфир обладает свойствами активированного эфира и может использоваться для дальнейших синтезов в качестве карбоксильного компонента (R—N-замещенный остаток пептида).

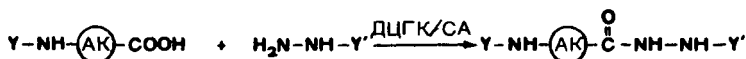
Другим примером эфиров с переменной активностью служат N,N-диметиламинофениловые эфиры. Такие эфиры неактивны, они не взаимодействуют с аминами. Однако после метилирования с помощью метилиодида образующаяся четвертичная аммониевая группа вызывает значительную активацию эфира [151a]:



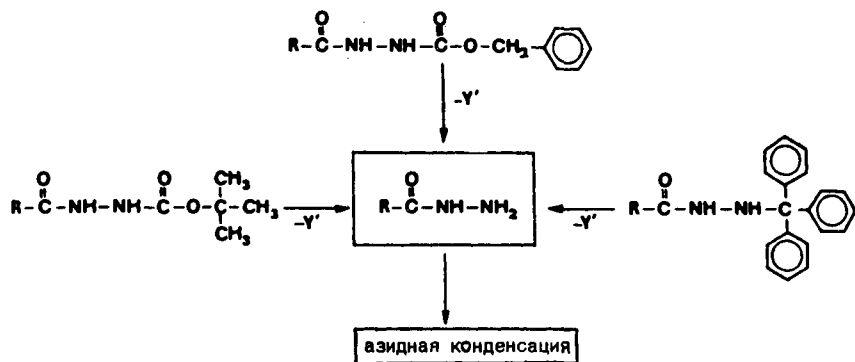
По своей активности они близки к *p*-нитрофениловым эфирам и могут быть использованы для образования новых пептидных связей.

Еще большее значение имеют N'-замещенные гидразиды, которые после получения фрагментов селективно деблокируются и далее могут вводиться в азидную конденсацию. Для N'-замещения в гидразиде подходят с небольшими исключениями практически все аминокислотные группы, из которых важнейшими являются бензилкарбонил [152], *трет*-бутилоксикарбонил [153] и тритил [154].

N'-Замещенные гидразиды получают при реакции N-защищенных аминокислот с частично защищенными гидразинами с помощью дициклогексилкарбодиимида (ДЦГК) или по методу смешанных ангидридов (СА):



После отщепления Y соответствующее производное используется для синтеза фрагмента, а по окончании синтеза производят селективное деблокирование Y' (Y' = Z-, Вос- или Трт-). N-Защищенный гидразид пептида можно после перевода в азид использовать далее в качестве карбоксильного компонента (R—N-защищенный остаток пептида):

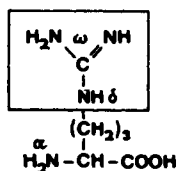


4-Метилтиофениловый эфир нельзя использовать для синтеза фрагментов, содержащих серусодержащие остатки аминокислот, из-за необходимости окислительного активирования. Применение N'-замещенных гидразидов N-ациламинокислот не лимитировано и позволяет планировать самые разнообразные синтезы, разумно комбинируя защитные группы для α-аминофункции, гидразида и функциональных групп боковых цепей.

### 2.2.4.3. ω-Защитные группы трифункциональных аминокислот

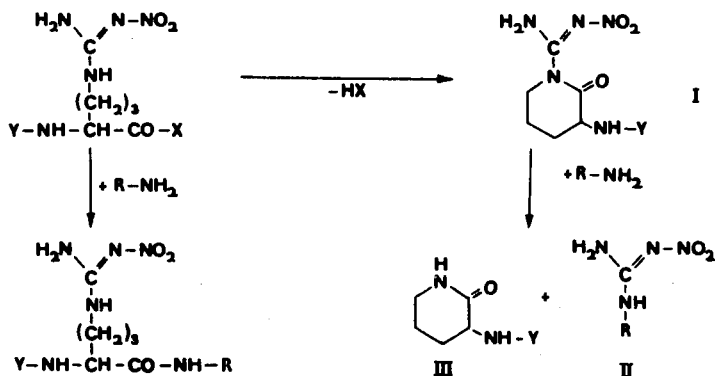
Если в пептидном синтезе используют полифункциональные аминокислоты, такие, как глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, лизин, аргинин, серин, тирозин и т. д., то функциональная группа их боковой цепи должна быть селективно блокирована. Нужные для этого защитные группы не отличаются от тех, которые применяются для блокирования α-амино- или α-карбоксильных групп. Собственно, проблему представляет собой селективное блокирование, в то время как выбор комбинаций защитных групп является вопросом тактики. Точно так же требуется блокировать тиольные и гуанидиновые группы. В других случаях можно предотвратить или свести к минимуму побочные реакции, обусловленные третьей функцией, поддерживая специфические условия при конденсации. Несмотря на эти возможности, на практике предпочитают варианты с максимальной защитой.

#### 2.2.4.3.1. Защита гуанидиновой функции аргинина



Несмотря на большое число описанных возможностей блокирования сильноосновной гуанидиновой функции, идеальной защитной группы для нее до сих пор не найдено. Применяют в основном нитрование, N<sup>ω</sup>-моно- или же N<sup>ω</sup>, N<sup>δ</sup>-диацилирование или протонирование. Можно избежать защиты гуанидиновой группы, если вводить ее реакцией амидинирования в пептиды, содержащие орнитин.

Применение нитрогруппы для защиты гуанидиновой функции предложено в работе [155]. В случае применения нитрогруппы как защиты гуанидиновой функции встречаются трудности при активировании таких производных. В качестве побочной реакции происходит образование лактама:



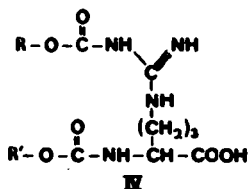
Полученный как побочный продукт лактам (I) дает при аминолизе производное замещенного нитрогуанидина (II) и лактам орнитина (III) [156]. Нитрогруппа отщепляется удобнее всего гидрированием в присутствии палладия или никеля Ренея или же в случае серусодержащих остатков аминокислот гидрированием с палладиевым катализатором при добавке эфира трифторида бора, хотя этот метод деблокирования не свободен от побочных реакций. Успешно применялся также метод расщепления с помощью HF [63].

Для  $N^\omega$ -моноацилирования была предложена *тозилльная группа*, которая, однако, тоже не полностью исключает образование лактама. Для дотозилирования подходит обработка натрием в жидком аммиаке, также сопровождающаяся побочными реакциями или же жидким фтороводородом.

*Мезитилен-2-сульфонильная группа* (Mts), которую можно вводить при аналогичных условиях, снимается HF и, кроме того, метансульфонокислотой или трифторметансульфонокислотой (Йаджима и др., 1978 г.).

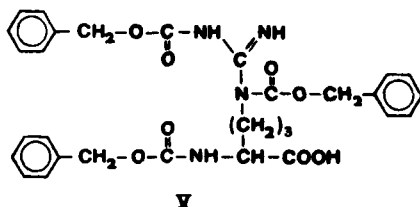
*4-Метоксibenзолсульфонильная группа* [165]  $\text{H}_3\text{C}-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2-$  в противоположность тозилльной группе может отщепляться легко и полностью метансульфонокислотой или бортрис(трифторацетатом). Однако она устойчива к трифтороскислоте и гидрогенолизу.

Для  $N^\omega$ -моноацилирования можно успешно применять защитные группы уретанового типа, причем проще всего удается готовить  $N^\alpha, N^\omega$ -дзащищенные производные ( $\text{R} = \text{R}'$ ) (IV):



Z-Arg-(Z)-OH ( $R = R' = -CH_2C_6H_5$ ) может образовывать дипептиды только с гидрохлоридами аминокомпонента, что обеспечивает дополнительное протонирование гуанидиновой функции. В противном случае образуется лактам. В случае  $N^\alpha$ ,  $N^\omega$ -диацилпроизводных с разными заместителями, таких, как Z-Arg-[Z(-4NO<sub>2</sub>)]-OH ( $R' = -CH_2C_6H_5$ ;  $R = -CH_2C_6H_4NO_2$ ) [158] или Z-Arg-(Boc)-OH [ $R' = -CH_2C_6H_5$ ;  $R = -C(CH_3)_3$ ] [159], наблюдалось лишь незначительное образование лактама. Различия селективности деблокирования (4-нитробензилоксикарбонильная группа устойчива против смеси НВг/уксусная кислота) позволяют применять такие производные в многочисленных синтезах пептидов.

Зервас и др. [160], которые провели детальные исследования ацилирования гуанидиновой функции аргинина, смогли в конце концов приготовить  $\delta,\omega$ -диацилированное производное аргинина; реакция проходила в сильнощелочных условиях с большим избытком бензилового эфира хлормуравьиной кислоты. В работе [160] приведены доказательства предполагаемой структуры (V). Z-Arg-( $\omega,\delta$ -Z<sub>2</sub>)-OH и особенно соответствующие 4-нитрофениловый или N-гидроксисукцинимидный эфиры — превосходные исходные соединения для получения аргининовых пептидов [161]. Исходя из Z-Arg-OH, можно с помощью 1-адамантилового эфира хлормуравьиной



кислоты получить соответствующее  $N^\omega, N^\delta$ -диадамантильное производное [162]. После отщепления бензилоксикарбонильной группы гидрогенолизом от  $\alpha$ -аминой функции можно получать различные замещенные.

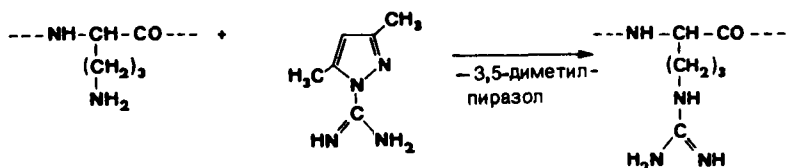
В работе [166] показано, что защищенное по  $N^\alpha$ -и карбоксилу производное аргинина со свободной (непротонированной) гуанидиновой группой дает с активированным эфиром бензилоксикарбонилглицина  $N^\omega, N^\delta$ -диацильное производное, которое может дальше перацилироваться с Z-Phe-OH/ДЦГК.

Блокирование гуанидиновой функции *протонированием* [163] вполне пригодно при синтезах пептидов.

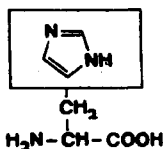
Бензилоксикарбониларгинингидробромид получают очень просто из Z-Arg-OH обработкой 1,4 н. НВг в метаноле и высаживанием продукта абсолютным эфиром. Производное гидробромид аргинина со свободной  $\alpha$ -аминогруппой можно использовать в синтезах в качестве аминокомпонента.

Интересную возможность обойти сложную проблему защиты аргининовой функции представляет введение гуанидиновой группы в орнитинсодер-

жашие пептиды путем амидинирования (гуанилирования). Подходящим реагентом для этого оказался 1-амидино-3,5-диметилпиразол [164]:



#### 2.2.4.3.2. Защита имидазольной функции гистидина

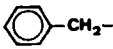
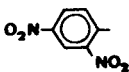
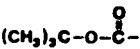
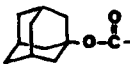

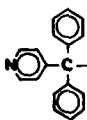
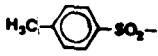


При пептидных синтезах с незащищенной имидазольной функцией могут встречаться трудности, связанные с возможностью ацилирования имидазольного остатка, его слабой основностью, а также часто с низкой растворимостью таких пептидов. Эти трудности можно уменьшить блокированием имидазольной функции. Некоторые синтезы с незамещенной имидазольной функцией тем не менее были описаны, причем остаток гистидина был аминокислотным компонентом. Только после того, как в 1954 г. получили *tert*-бутилоксикарбонилгистидиназид (*Z*-His-ОН практически нерастворим в применяемых для пептидного синтеза растворителях), были проведены синтезы с не замещенными по имидазолу азидами гистидина [167]. Вообще же более разумнее применять для пептидных синтезов гистидин с блокированной имидазольной функцией. Долгое время существовала только одна возможность блокирования азота имидазола бензильным остатком [168]. Приведенные в табл. 2-4  $N^{\text{im}}$ -защитные группы довольно часто применяются в настоящее время в синтезе пептидов; тем не менее трудная проблема защиты имидазольной функции все еще не решена.

Основываясь на новых возможностях получения *Z*-His-ОН [169] и *Woc*-His-ОН [170], можно синтезировать важные исходные продукты с *Z*-His(Tos)-ОН, *Z*-His(Adoc)-ОН и *Z*-His(Woc)-ОН. Разумеется, можно исследовать возможность получения еще и других защитных групп уретанового типа, например  $N^{\text{im}}$ -бензилоксикарбонильной и др. Блокированные ацильной группой производные гистидина могут как ацилимидазолиды вызывать нежелательные ацилирования. Кроме того, будучи лабильными к аминолизу и гидролизу, они потенциально опасны при последующих стадиях омыления эфиров или их гидролиза.

Хотя производные  $N^{\text{im}}$ -тозилгистидина до сих пор применялись главным образом в твердофазном синтезе пептидов, интерес к этой защитной группе растет и при осуществлении синтезов в растворе. Нуклеофильные соединения (1-гидроксibenзотриазол, аммиак и др.) способны вызывать от-

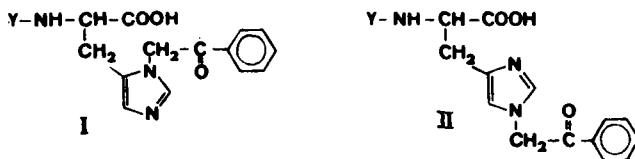
Таблица 2-4. Защитные группы для имидазольной функции гистидина

$N^{lm}$ -Защитная группа	Формула	Деблокирование
Бензил [168]		Na/жидк. $NH_3$
2,4-Динитрофенил [171]		2-Меркаптоэтанол (pH 8; 1 ч); устойчив при ацидолизе
1-Бензилоксикарбонил-амино-2,2,2-трифторэтил [172]	$F_3C-CH-Z-NH$	$H_2/Pd$ ; устойчив в условиях отщепления Вос-остатков и алкиловых эфиров
<i>трет</i> -Бутилоксикарбонил [173]		$NBt/AcOH$ ; $NBt/CF_3COOH$ ; $HF$ ; устойчив к $HCl$ в диоксане
Адамантил-1-оксикарбонил [174, 175]		$CF_3COOH$
Пиперидинокарбонил [176]		$N_2H_4 \cdot H_2O$ ; 2 н. $NaOH$ в диоксане
Дифенилметил [177]	$(C_6H_5)_2CH-$	6 н. $NBt/AcOH$ (3 ч); $HCOOH$ (10 мин); $CF_3COOH$ (1 ч)
Пиридилдифенилметил [178]		Каталитическое или электролитическое восстановление; $Zn/AcOH$
4-Толуолсульфонил [179]		Гидроксибензотриазол (НОВт) [180]; $HF$ ; щелочное омыление

щепление этой группы [180], поэтому следует проявлять осторожность при получении некоторых активированных эфиров. К тому же существует опасность, что частичное детозилирование при нуклеофильном воздействии аминок компонента приведет к образованию  $N^\alpha$ -тозилпроизводного пептида. Пиридилдифенилметильная группа [178] аналогично давно известной  $N^{lm}$ -трифтильной группе [181] может отщепляться гидрогенолизом или ацидолизом. Комбинация  $N^{lm}$ -тозилной защиты с  $N^\alpha$ -Вос-группой из-за недоста-

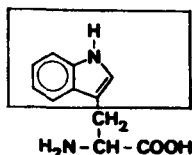


точной селективности отщепления является неудобной. По исследованиям Джонса и Рамаджа [182] изомеры  $N^{\alpha}$ -Z- $N^{lm}$ -фенацил-L-гистидина при соединении с пролинамидом карбодимидным способом (разд. 2.2.5.4) ведут себя по-разному в отношении рацемизации. В то время как превращение  $N^{\alpha}$ -Z- $N^{lm}$ -( $\pi$ )-фенацил-L-гистидина ( $Y = Z$ ) (I) дало оптически чистый амид дипептида, такая же реакция с применением  $\tau$ -изомера ( $Y = Z$ ) (II) привела к сильно рацемизованному продукту (содержащему 35% D-His).



$N^{lm}$ -фенацильная группа приобрела практическое значение также для твердофазного синтеза, после того как было описано приготовление I ( $Y = \text{Woc}$ ) [183]. Деблокирование с цинковой пылью в водной уксусной кислоте проходит быстро и количественно.

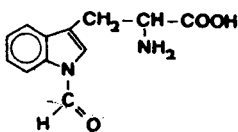
#### 2.2.4.3.3. Защита индольной функции триптофана



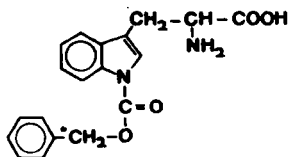
До сих пор в подавляющем большинстве случаев индольная функция триптофана не защищалась. Обычные методы образования пептидной связи позволяют вводить триптофан без особых проблем как в качестве аминокомпонента, так и в качестве карбоксильного компонента. Однако при неточном соблюдении стехиометрических соотношений в случае получения азида из гидрида возможно N-нитрозирование индольного кольца. Производные триптофана, защищенные по N- и C-концам, получают вообще легко. Исключение составляет введение фталильного остатка [184]. Различные побочные реакции наблюдались при отщеплении защитных групп. Индольное кольцо очень чувствительно к окислителям. Поэтому при некоторых операциях целесообразны применение абсолютных (не содержащих воды) и свободных от пероксидов растворителей и работа без доступа кислорода воздуха. При ацидолитическом отщеплении защитных групп *tert*-бутильного типа случается  $N^{lm}$ -*tert*-бутирование [185]. Наряду с N-алкилированием может происходить также и C-алкилирование индольной группы [186]. При удалении Nps-группы с помощью хлороводорода в спирте получается S-(2-нитрофенил)тиоиндольное производное (I). Эту побочную реакцию можно в значительной степени подавить добавлением избытка метилindoла (10—20 экв.) [187].



I



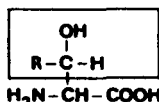
II



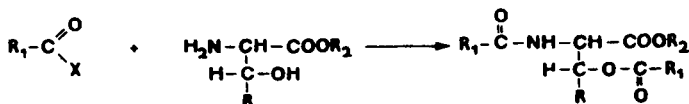
III

Возможности блокирования индольной функции сравнительно невелики. Первой защитной группой, использованной в пептидном синтезе, был предложенный Изумия и др. [188] N<sup>In</sup>-формильный остаток (II). Отщепление происходит при 2-часовом воздействии пиперидина. Возможна комбинация N<sup>In</sup>-For-защиты с N<sup>α</sup>-Woc-группой, которую можно селективно отщепить действием 1 н. хлороводорода в уксусной кислоте или 0,1 н. хлороводорода в муравьиной кислоте. Была показана также возможность защиты с помощью N-бензилоксикарбонильной группы (III) [189]. Исходя из Woc-Trp-OEt, удалось ацилировать индольный азот с помощью бензил-(4-нитрофенил)карбоната в ацетонитриле в присутствии диизопропилэтиламина и фторида калия. N<sup>In</sup>-Z-Группа устойчива в условиях отщепления Woc-группы и может деблокироваться при гидрогенолизе, гидразинолизе или под действием жидкого фтороводорода.

#### 2.2.4.3.4. Защита алифатической гидроксильной функции



Вообще говоря, спиртовой гидроксил можно не защищать, если серин (R = H), треонин (R = CH<sub>3</sub>) или гидроксипролин является составной частью аминок компонента. Нужно только не применять избыток ацилирующего средства, так как иначе может пройти частичное O-ацилирование:

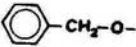

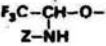


Эта опасность существует в основном в случае синтезов на твердых носителях по Меррифилду (разд. 2.2.7.1), где, как правило, вводятся большие избытки активированных карбоксикомпонентов.

Для присоединения С-концевых карбоксикомпонентов, содержащих гидроксиминокислоты, вначале использовали только азидный метод. Позднее появились работы, в которых указывалось, что для активирования не защищенных по гидроксилу производных можно применять также ангидридные и карбодимидный методы. Применение активированных эфиров вначале терпело неудачу, потому что не удавалось получить чистый N-защищенный эфир гидроксиминокислоты с неболокированной оксигруппой. Исключение составлял только 2,4-динитрофениловый эфир [190]. Позднее и другие активированные эфиры были получены в чистом виде, как, например, Z-Ser-OPcp [191] или Boc-Thr-ONSu [192].

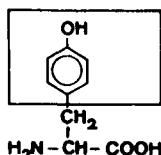
При синтезе пептидов с O-незащищенными гидроксиминокислотами все-таки часто наблюдаются нежелательные побочные реакции. Так, в кислых условиях может происходить N → O-аминоацильная миграция [193] с последующими нежелательными реакциями. При деблокировании N<sup>α</sup>-аминозащитной группы посредством HCl в уксусной кислоте существует опасность O-ацетилирования. В основной среде, как, например, при гидразинолизе, была отмечена рацемизация гидроксиминокислот. По этим причинам блокирование гидроксильной функции представляется целесообразным. Некоторые защитные группы приведены в табл. 2-5.

Таблица 2-5. Защитные группы для гидроксильной функции

O-защитная группа	Формула	Снятие защиты
Бензил [194]		Гидрогенолиз; HF; Na/жидк. NH <sub>3</sub> ; HBr/диоксан
<i>трет</i> -Бутил [195]	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> C-O-	CF <sub>3</sub> COOH; HCl/CF <sub>3</sub> COOH; конц. HCl (0°C, 10 мин)
Тетрагидропиранил [196]		Ацидолиз
1-Бензилоксикарбонил-амино-2,2,2-трифторэтил [197]		Гидрогенолиз; ацидолиз
Дифенилметил [198]	(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> CH-O-	Гидрогенолиз; нагревание с безводной CF <sub>3</sub> COOH при температуре кипения
Триметилсилил [199]	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Si-O-	Гидролиз
Метилтиометил [200]	H <sub>3</sub> C-S-CH <sub>2</sub> -O-	CH <sub>3</sub> I во влажном ацетоне (NaHCO <sub>3</sub> )

На практике используют прежде всего *O*-бензильный и *O*-*трет*-бутильный остатки. *O*-Бензил-*L*-треонин получают одновременной этерификацией карбоксильной и гидроксильной групп *L*-треонина бензиловым спиртом в присутствии 4-толуолсульфокислоты и последующим щелочным омылением *N*-Thr(Bzl)-OBzl [201]. В свою очередь *O*-эфирную группу можно удалить обработкой подтриметилсиланом [202].

#### 2.2.4.3.5. Защита ароматической гидроксильной функции



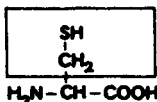
Фенольный гидроксил имеет более кислый характер по сравнению со спиртовыми функциями серина, треонина и гидроксипролина. Поэтому требования к защите этой группы повышаются. Можно, конечно, проводить пептидные синтезы и с незащищенным гидроксилом тирозина. Однако при этом получаются более низкие выходы, и, кроме того, для образования пептидной связи можно применять уже не все методы активирования (нельзя применять например, хлорангидридный, фосфоразометод и др.). При азидном методе наблюдалось нитрозирование ядра, а также другие побочные реакции, которые можно объяснить перегруппировкой Курциуса. При введении карбоксикомпонентов с *C*-концевым тирозином существует повышенная опасность рацемизации. Довольно много исследований проводилось с *O*-ацилированными производными тирозина, при этом оказалось, что устойчивость *O*-ацильной группы к нуклеофильным воздействиям недостаточна и нельзя полностью исключить ацильную миграцию *O*→*N*. В старых синтезах вазопрессина применяли тозилую группу [203]. Введение *O*-алкоксикарбонильных групп (*Z*, *Wos* и др.) не привело к желаемому успеху, тем более что алкилфенилкарбонатная группировка могла реагировать с аминогруппой аминоконцентра, тем самым блокируя ее.

Для защиты ароматических гидроксифункций предлагались в основном те же *O*-алкилпроизводные, которые уже обсуждались для алифатических гидроксикарбоновых кислот (табл. 2-5). *O*-Тирозинбензиловые эфиры [204] можно получать прямым алкилированием медного комплекса тирозина бензилом [204]. Отщепление этой защитной группы можно проводить при гидрогенолизе, под действием жидкого фтороводорода, а также при ацидолизе действием бромоводорода в уксусной кислоте или бромоводорода в трифторуксусной кислоте. В последних случаях, однако, возможны как неполное расщепление, так и побочные реакции. При ацидолизе существует опасность *C*-бензилирования, поэтому рекомендуется добавлять «ловушки» катионов (анизол, резорцин и др.).

Вторым важным производным является *тирозин-O-трет-бутиловый эфир*, который может получаться различными путями [205, 206]. Деблокирование может происходить при обработке трифторуксусной кислотой

(1—2 ч, комнатная температура) или концентрированной соляной кислотой при 0 °С без доступа кислорода воздуха (8—10 мин). Для защиты ароматических гидроксифункций была предложена также метилтиометильная группа [207]. Интерес представляют методы расщепления простых и сложных эфиров под действием иодтриметилсилана [202].

### 2.2.4.3.6. Защита тиольной функции цистеина



Сильная нуклеофильность, легкая окисляемость и кислый характер тиольной группы цистеина требуют селективного блокирования на всех стадиях синтеза. Еще в 1930 г. дю Виньо [208] впервые применил S-бензильный остаток для защиты тиольной функции. Получение окситоцина в лаборатории открыло путь для всех дальнейших синтезов с использованием цистеина и цистина. S-Бензильная группа снимается только натрием в жидком аммиаке; в некоторых случаях, в особенности при синтезах инсулина, применение этого метода сопровождалось повреждением пептидных цепей. Поэтому были разработаны другие методы эффективного блокирования тиольной функции (некоторые примеры приведены в табл. 2-6).

S-Ацилзащитные группы в последнее время применяются очень мало из-за опасности S—N-миграции ацила. Поэтому этот тип защит не обсуждается. Между тем все большее значение приобретают такие группы, которые могут приводить прямо к дисульфидному связыванию с образованием цистина без предшествующего деблокирования (разд. 2.2.8.2). Для образования дисульфидных мостиков служат методы иодолиза [209], роданолиза (диродановый метод или метод Хиски) [210] или метод Камбера (посредством метоксикарбонилсульфенилхлорида Cl-S-CO-OCH<sub>3</sub>) [211].

Наиболее употребительные тиолацетатные группы (табл. 2-6) представляют собой ациламинометилполутиоацеталы (S,N-ацеталы), тиоацеталы, тиоуретаны и несимметричные дисульфиды. Описанные в литературе тиоэфиры (S-ацильная защитная группа), как уже указывалось, не рассматриваются.

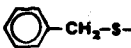
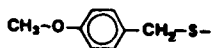
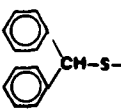
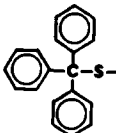
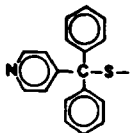
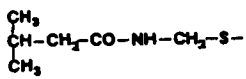

В случае S-этилтио- и S-*tert*-бутилтиотнолацетатных групп речь идет о несимметричных дисульфидах цистеина. Они могут быть селективно восстановлены тиолизом под действием избытка различных тиолов [224]:



Здесь речь идет о тиодисульфидном обмене. Сдвиг равновесия в желаемую сторону достигается применением избытка тиольного соединения R'SH. Этот вариант подходит для селективного образования цистиндисульфидных мостиков в пептиде. Таким образом можно селективно деблокировать S-алкилтиолацетатные группы, тогда как другие защитные группы, в том числе и тиолацетатные группы другого типа, устойчивы к тиолизу.

Следует упомянуть защиту тиольной функции S-сульфо группой [225].

Таблица 2-б. Защитные группы тиольной функции

S-Защитная группа	Формула	Снятие защиты (превращение в пептиды цистина по методам А, Б, В <sup>а</sup> )
Бензил [208]		Na/жидк. NH <sub>3</sub>
4-Метоксибензил [212]		HF; кипящая CF <sub>3</sub> COOH; Na/жидк. NH <sub>3</sub> ; соли Hg(II) [213]
Дифенилметил [214]		HBr/AcOH; CF <sub>3</sub> COOH; Na/жидк. NH <sub>3</sub> ; Nps-Cl и последующее восстановление (Б/В)
Тритил [215]		HF/CF <sub>3</sub> COOH; HF; CF <sub>3</sub> COOH; HBr/AcOH; водн. HCl/AcOH; соли Hg(II), Nps-Cl и последующее восстановление (А/Б/В)
Пиридилдифенилметил [216]		Соли Hg(II) (рН 4); Zn/AcOH; электролитическое восстановление (А)
Ацетидамидометил [217]	$\text{CH}_3\text{-CO-NH-CH}_2\text{-S-}$	Соли Hg(II) (рН 4); Nps-Cl с последующим восстановлением (А/Б/В)
Хлорацетидамидометил [218]	$\text{Cl-CH}_2\text{-CO-NH-CH}_2\text{-S-}$	1-Пиперидинтиокарбоксамид
Изобутириламидометил [219]		Соли Hg(II) (рН 4) (Б)
Тетрагидропиранил [220]		HBr или CF <sub>3</sub> COOH; разб. кислоты; AgNO <sub>3</sub> ; Na/жидк. NH <sub>3</sub> (Б)
Этилкарбамоил [221]	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-NH-C(=O)-S-}$	Щелочная среда (NH <sub>3</sub> , NaOCH <sub>3</sub> , NaOH); соли Ag и Hg(II) (рН 7)

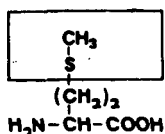
S-Защитная группа	Формула	Снятие защиты (превращение в пептиды цистина по методам А, Б, В <sup>а</sup> )
Этилтио [222]	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-S-S-}$	Тиолиз (тиофенол, тиогликолевая кислота и др.)
<i>трет</i> -Бутилтио [223]	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{S-S-} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Тиолиз [тиофенолят натрия, тиофенол, 1,4-дитиотрейтол (реагент Клееланда)]

<sup>а</sup> А — нодолиз, Б — роданолиз, В — метод Камбера.

Производное S-сульфоцистеина  $\text{R-S-SO}_3^-$ , полученное окислительным сульфитолизом из цистеина или S-алкил(арил)-тиоцистеиновых соединений, обладает достаточной для некоторых пептидосинтетических операций устойчивостью. Снятие этой защиты возможно при восстановлении тиогликолевой кислотой при pH 5.

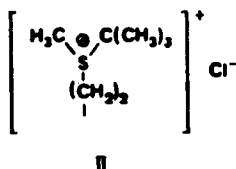
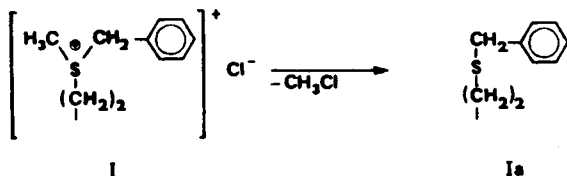
В заключение следует еще раз указать, что защита тиольной функции вызывает большие затруднения и из описанных (более 50) возможных защит тиольной группы трудно остановиться на удовлетворяющем различным требованиям варианте.

#### 2.2.4.3.7. Защита тиоэфирной функции метионина



Тиоэфирная группа метионина, собственно говоря, не должна вызывать чрезвычайных затруднений при синтезе пептидов. Введение amino- и карбоксизащитных групп в производные метионина также протекает гладко. Гораздо больше проблем связано с удалением защитных групп в случае метионинсодержащих пептидов. Так, при обработке натрием в жидком аммиаке наблюдалось частичное S-деметилирование с образованием производных гомоцистеина. Отщепление бензилоксикарбонильных групп каталитическим гидрированием из-за присутствия серы метионина возможно только при добавлении оснований [226] или эфирата трифторида бора [227]. При ацидолизном отщеплении защитных групп на основе бензила и *трет*-бутила тоже идут побочные реакции, так как в результате взаимодействия сульфидной группы с бензил-(I) или же *трет*-бутил-катионами (II) образу-

ются сульфониевые соли. В случае сульфониевых солей I происходит S-деметилирование с образованием производных S-бензилгомоцистеина (Ia).



Сульфониевая соль II идентифицирована Зибером и сотр. [228]. Специальными приемами [229] она может быть превращена вновь в производное метионина. Полностью предотвратить образование сульфониевых солей добавками «ловушек» катионов (метилэтилсульфид, анизол и др.) не всегда возможно.

Другая причина нежелательных побочных реакций — чувствительность тиозфирной группы к окислению. Пероксиды и другие окислители (например, при определенных условиях кислород воздуха и даже диметилсульфоксид, часто применяемый в пептидных синтезах) ведут к образованию метионин-S-оксида. В подавляющем большинстве случаев пептиды лишаются из-за этого своей биологической активности. Добавлением метилэтилсульфида или метионина можно воспрепятствовать или в значительной степени снизить образование сульфоксидов, так как эти добавки исключают окисление при различных операциях.

В то же время сульфоксидные группы были предложены для защиты тиозфирной функции [230]. При образовании S-оксидов возникает второй центр хиральности. Полученную смесь диастереомеров можно разделить, переводя в соли пикриновой кислоты. Сульфоксидная группа удаляется восстановлением тиогликолевой кислотой или тиогликолем.

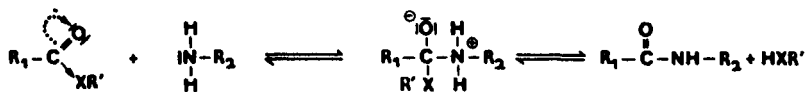
Простой метод получения производных метионинсульфоксида описан в работе [231].

### 2.2.5. Методы образования пептидной связи

Образование пептидной связи можно рассматривать как нуклеофильную реакцию полярной двойной связи. Из органической химии известно, что карбоновые кислоты не вступают в реакцию с аммиаком или аминами на хо-



луду. Образование пептидной связи, как уже указывалось (разд. 2.2.2), должно протекать в мягких реакционных условиях, поэтому необходимо активировать карбоксильную группу ( $R_1$  — остаток карбоксильного компонента). Повышение электрофильных потенциалов достигается введением электроаффинных  $-I$  или  $-M$  (индуктивных или мезомерных) заместителей ( $XR'$ ), которые снижают электронную плотность как на карбонильном углероде, так и на карбонильном кислороде. Благодаря этому повышается чувствительность к нуклеофильному воздействию аминок компонента ( $R_2$  — остаток аминок компонента).



Нуклеофильный аминок компонент воздействует на углеродный атом карбоксила свободной парой электронов; при этом происходит перераспределение электронов с образованием промежуточного продукта, который, обладая повышенной реакционной способностью, расщепляется с выделением  $R'X^-$ .

Изменение активирующей группы неограниченно расширяет возможности синтеза пептидной связи. (Однако в рамках данной книги подробно останавливаться на них не представляется возможным.) Различные способы активирования карбоксильной группы, описанные к началу 70-х годов, собраны в прекрасной монографии Вюнша [29]. Методы, которые появились позже, можно отнести к уже известным типам активирования.

Обсуждение всех теоретически возможных вариантов следует ограничить еще и потому, что лишь немногие методы синтеза пептидов имеют практическое значение [28].

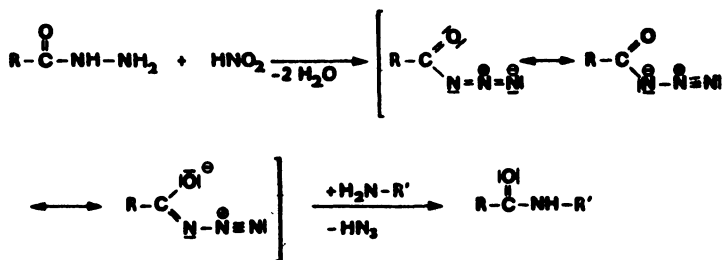
Из наиболее употребительных методов надо назвать азидный метод, метод смешанных ангидридов карбоновых и алкилугольных кислот, метод активированных эфиров и, наконец, карбодимидный метод, который в своей модифицированной форме (карбодимид с добавками) наиболее широко используется в синтезах. Именно эти методы подробно обсуждаются ниже. Будут упомянуты еще некоторые методы, имеющие теоретический интерес, а также методы, которые употребляются только в особых случаях.

### 2.2.5.1. Азидный метод

Азидный метод [232], введенный в пептидную химию Курциусом в 1902 г., до сих пор является одним из наиболее широко применяемых способов образования пептидной связи. С помощью этого метода Курциус синтезировал ряд *N*-бензоилированных пептидов, содержащих от двух до шести аминокислот. В качестве аминок компонентов он использовал как аминокислоты и пептиды в водно-щелочной среде, так и эфиры аминокислот в органической фазе. С введением селективно отщепляемых *N*-защитных групп азид-

ный метод, который долгое время являлся единственным методом, свободным от рацемизации, пережил настоящий расцвет.

Исходными веществами для азидной конденсации служат хорошо кристаллизующиеся гидразиды N-защищенных аминокислот или пептидов, которые получают из соответствующих эфиров гидразинолизом. Для превращения в азид соответствующий гидразид в солянокислом растворе смешивают при  $-10^{\circ}\text{C}$  с рассчитанным количеством нитрита натрия. В качестве растворителя годятся также смеси уксусной кислоты, тетрагидрофурана или диметилформамида с соляной кислотой. Полученный азид экстрагируют на холоду этилацетатом, промывают, высушивают и вводят в реакцию с аминокомпонентом:

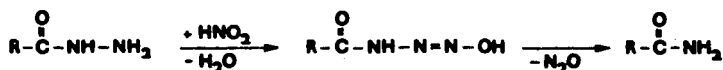


Некоторые азиды могут быть выделены путем осаждения при добавлении ледяной воды и затем, после растворения в подходящем растворителе, введены в реакцию с аминокомпонентом. Эти операции следует проводить при низких температурах ввиду нестабильности азидов и связанной с этим опасности взрыва.

По методу Хонцля и Рудингера [233] можно проводить азидную конденсацию прямо в органическом растворителе, используя для этого *трет*-бутилнитрит. Гидразинолиз эфирных групп более длинных N-защищенных пептидов часто бывает трудным. Можно использовать N-замещенные гидразиды (разд. 2.2.4.2.2.). Соответствующий пептидный фрагмент, полученный по одному из известных методов синтеза, вводят в азидную конденсацию после селективного удаления защитной группы гидразида. Хотя азидный метод относят к методам, свободным от рацемизации, в некоторых случаях все-таки наблюдалась заметная рацемизация [234]. Поскольку азиды ациламино кислот легко рацемизируются при катализе основаниями [235], при азидных конденсациях следует избегать контакта с основаниями. Для нейтрализации солей аминокомпонентов вместо триэтиламина целесообразно применять N,N-диизопропилэтиламин и N-алкилморфолин.

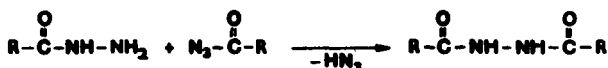
При количественном протекании азидной конденсации единственным побочным продуктом является азотистоводородная кислота, обработка реакционной смеси не вызывает затруднений. К сожалению, однако, синтез усложняется нежелательными побочными реакциями, хотя при тщательном соблюдении условий многие конкурентные реакции в значительной степени подавляются.

Так, уже при переводе гидразида в азид может произойти образование амида:

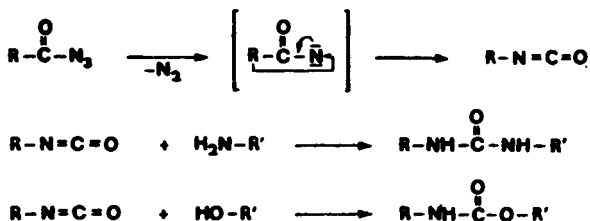


Согласно Рудингеру, можно в значительной степени избежать этой побочной реакции, проводя процесс в безводной среде с алкилнитритами (например, *трет*-бутилнитритом) в присутствии хлороводорода [233].

При взаимодействии еще не вступившего в реакцию гидразида с уже образованным азидом может легко получаться 1,2-бисацилгидразин:



Другие побочные реакции можно интерпретировать как перегруппировку Курциуса, причем промежуточно образующийся изоцианат, реагируя с аминогруппой, дает производное мочевины, а с гидроксилом — соответствующие уретаны:



Защищенный по азоту изоцианат серина с незащищенным гидроксилом дает производное оксазолинона-2:



Кроме того, при азидной конденсации наблюдались и другие побочные реакции: нитрование фенольного ядра тирозина, окисление производных S-бензилцистеина до сульфоксидов, образование N-нитрозосоединений триптофана, а также разложение азидов  $\alpha$ -тозиламинокислот. Побочные реакции, возможные при азидном синтезе, обстоятельно рассмотрены в обзоре Шнабеля [236].

Хотя при точном соблюдении условий реакции можно в значительной степени избежать образования побочных продуктов, все же, как уже указывалось, это значительно затрудняет обработку и очистку полученных пептидов. В зависимости от синтезируемого объекта проведение азидной конденсации (включая приготовление гидразида) требует 2—6 рабочих дней. Выходы составляют 30—70%.

Азидный метод и в настоящее время имеет большое практическое значение благодаря ряду преимуществ: это малая степень рацемизации, возможность введения в реакцию серина и треонина без защиты гидроксильной функции, а также разнообразные возможности, открываемые применением N-защищенных гидразидов.

### 2.2.5.2. Ангидридный метод

Большое значение для развития метода ангидридов и применения его в пептидном синтезе имела работа Курциуса и результаты, полученные в 1881 г. Получая бензоилглицин (гиппуровую кислоту) из серебряной соли глицина и бензоилхлорида в кипящем бензоле, Курциус выделил также бензоилдиглицин и бензоилгексаглицин. Уже тогда предполагали, что ангидрид N-бензоилированной аминокислоты или пептида образует с бензойной кислотой реакционноспособный промежуточный продукт. Основываясь на этих данных, Виланд и сотр. спустя 70 лет применили метод смешанных ангидридов для целенаправленного синтеза пептидов. Для синтеза пептидов наряду с асимметричными ангидридами можно применять симметричные ангидриды и внутримолекулярные ангидриды карбаминовой кислоты (N-карбоксиянгидриды).

#### 2.2.5.2.1. Метод смешанных ангидридов

Для получения смешанных ангидридов (СА) пригодны как карбоновые, так и неорганические кислоты. Многочисленные методические разработки и применяемые кислоты можно найти в обзоре [237]. Большая часть теоретически и методически очень интересных разработок (в силу различных причин) не нашла практического применения. Наиболее часто используют алкиловые эфиры хлормуравьиной (хлоругольной) кислоты, особенно предложенный Виландом и Бернардом [238] и независимо от них Буассона [239] этиловый эфир хлормуравьиной кислоты, а также изобутиловый эфир хлормуравьиной кислоты [240]. Взаимодействие несимметричного смешанного ангидрида, полученного из карбоксикомпонента и алкилового эфира хлормуравьиной кислоты (рис. 2-7), с аминокислотой зависит от электронной плотности на обоих конкурирующих С-атомах карбонильных групп, а также от стерических эффектов и, как правило, проходит по карбонилу ациламинокислоты с образованием желаемого пептидного производного и освобождением второй кислоты (алкилугольной) (путь *a*). Последняя при использовании алкилхлорформатов (R — этил или изобутил) очень неустойчива и сразу разлагается на CO<sub>2</sub> и соответствующий спирт. Правда, известны также примеры воздействия аминокислоты на карбонил угольной кислоты [241, 242], причем освобождается ациламинокислота и в качестве побочного продукта получается уретан (путь *b*). Как показал Виланд, эту побочную реакцию нельзя полностью исключить даже при температуре реакции — 15 °С. Указанная побочная реакция протекает обычно при использовании N-тозил-, N-третил- и N-трифтораце-

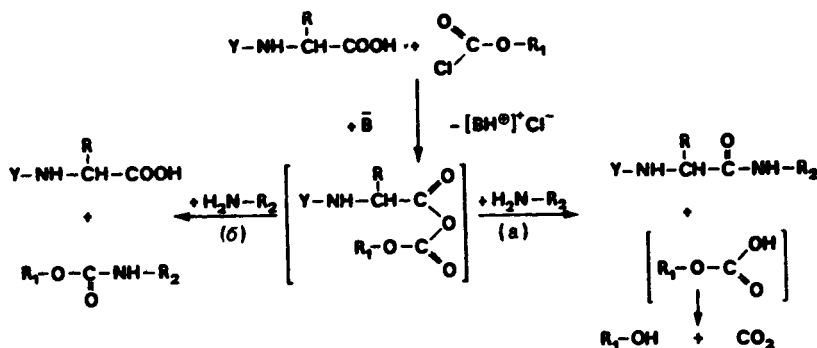


Рис. 2-7. Синтез по методу смешанных ангидридов. Y — N-защитная группа, R — остаток боковой цепи, B — третичное основание, R<sub>1</sub> — радикал алкилугольной кислоты, R<sub>2</sub> — остаток аминокомпонента.

тиламинокислот. В случае N-ациласпарагина для получения смешанного ангидрида целесообразно использовать хлорангидрид триметилуксусной (пивалиновой) кислоты.

Для приготовления смешанных ангидридов N-замещенные аминокислоты или пептиды растворяют в тетрагидрофуране, диоксане, ацетонитриле, этилацетате или диметилформамиде, смешивают с эквивалентным количеством третичного основания (N-метилморфолин, трибутиламин, N-этилпиперидин) и при охлаждении до  $-5$  +  $-15$  °C добавляют соответствующий алкилхлорформат.

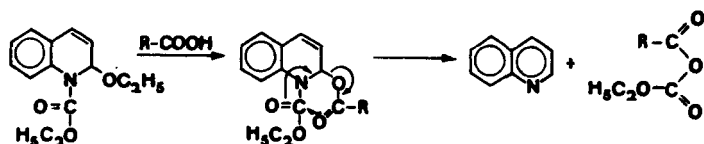
Андерсон и сотр. [243] предложили условия, при которых можно полностью избежать рацемизации при использовании изобутилхлорформата: в качестве основания применяют N-метилморфолин, время образования ангидрида—30 с и низкая температура (от  $-5$  до  $-15$  °C). Эти данные были подтверждены Кемпом с помощью чувствительного метода изотопного разбавления. Тест на рацемизацию по Изумия неожиданно показал 2,4% рацемата. Добавлением N-гидроксисукцинимиды можно снизить ее до 0,2% [244]. При соблюдении предложенных Андерсоном условий и отсутствии избытка основания метод смешанных ангидридов практически не дает рацемического продукта. В то время как приготовление несимметричных ангидридов требует исключения следов воды, собственно реакцию ацилирования можно проводить в водно-органической среде. Несмотря на то что иногда наблюдалось в небольшой степени O-ацилирование, гидроксисукцинимиды, как правило, не требуют защиты гидроксила.

Аналогичным путем можно приготовить асимметричный ангидрид из ациламинокислоты и триметилуксусной (пивалиновой) кислоты и получать хорошие результаты при конденсации его с аминокомпонентами [245]. Благодаря сильному положительному индуктивному эффекту *трет*-бутильной

группы электрофильный потенциал углеродного атома карбоксила вспомогательной кислоты снижается и это наряду со стерическими препятствиями подавляет реакцию «неправильного» аминоллиза.

Тилак [246] описал ускоренный вариант синтеза без очистки промежуточных продуктов, так называемый метод последовательных избытков (ПСА-метод)\*. Если для приготовления ангидрида используют реакцию с изобутилхлорформиаом в присутствии N-метилморфолина в диметилформамиде при  $-15^{\circ}\text{C}$ , то необходим 6%-ный избыток бензилоксикарбонил-аминокислоты, а полученный ангидрид вводится в реакцию с аминокомпонентом в 50%-ном избытке. Непрореагировавший смешанный ангидрид можно гидролизовать насыщенным раствором  $\text{KHCO}_3$  при  $0^{\circ}\text{C}$  (30 мин, pH 8).

В одном из вариантов метода смешанных ангидридов предложено заменить конденсирующий агент 1-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолин (ЭЭДХ) [247]. Это соединение образует промежуточный смешанный ангидрид, который быстро вступает в реакцию конденсации, причем полностью исключается нежелательная побочная реакция:



Рекомендован также аналогичный реагент — 1-изобутилоксикарбонил-2-изобутилокси-1,2-дигидрохинолин (ИИДХ) [248]. С обоими этими реагентами получены хорошие результаты, причем гидроксикарбоновые кислоты можно вводить в реакцию без специальной защиты гидроксила. Отметим, что ациласпарагин при этом реагирует без побочных реакций.

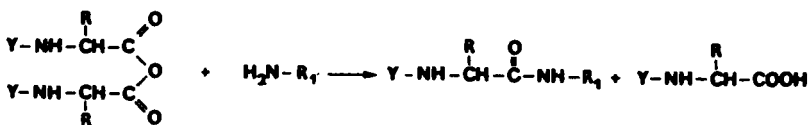
Возвращаясь к механизму реакции, следует допустить, что предполагаемый промежуточный продукт — 1-этоксикарбонил-2-ацилокси-1,2-дигидрохинолин, будучи активированным эфиром, может также реагировать с аминокомпонентами по аналогии с эфирами 8-оксихинолина (разд. 2.2.6.1.1) [249].

### 2.2.5.2.2. Метод симметричных ангидридов

В случае смешанных ангидридов опасность диспропорционирования можно почти полностью подавить, подбирая подходящие условия реакции. В случае же симметричных ангидридов такой опасности, равно как и опасности неправильного аминоллиза, вообще не существует. Правда, выход пептида не может превышать 50%. Большую часть ациламиноокислоты, образуя-

\* В иностранной литературе известен как REMA-метод (Repetitive Excess Mixed Anhydride). — *Прим. ред.*

шейся в результате аминолиза симметричного ангидрида, можно вернуть, экстрагируя ее раствором бикарбоната натрия.



Симметричные ангидриды ациламино кислот можно легко синтезировать, используя дициклогексилкарбодимид (ДЦГК), этоксиацетилен, инамины, а также получить в результате диспропорционирования несимметричных ангидридов. Поскольку при синтезе симметричных ангидридов из Вос-аминокислот и ДЦГК возможны побочные реакции, то в качестве альтернативы было предложено вводить в реакцию 2 г-экв. натриевой соли Вос-аминокислоты и 1 г-экв. фосгена; реакцию проводят в тетрагидрофуране при  $-40^\circ\text{C}$  [250].

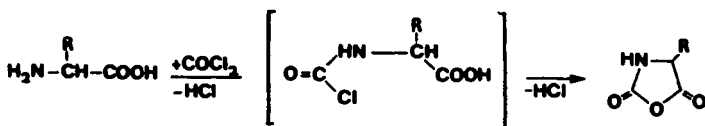
### 2.2.5.2.3. N-Карбоксиангидриды (НКА)

В N-карбоксиангидридах карбоксильная группа находится в активированном состоянии, в то время как аминогруппа блокирована. Такие производные аминокислот могут служить прекрасными исходными соединениями для синтеза пептидов.

Этот класс соединений был открыт в 1906 г. Лейксом [251], одним из учеников Эмиля Фишера. Первые N-карбоксиангидриды (1,3-оксазолидиндионы-2,5) были получены термическим отщеплением этилхлорида от хлорангидридов N-этоксикарбониламино кислот:

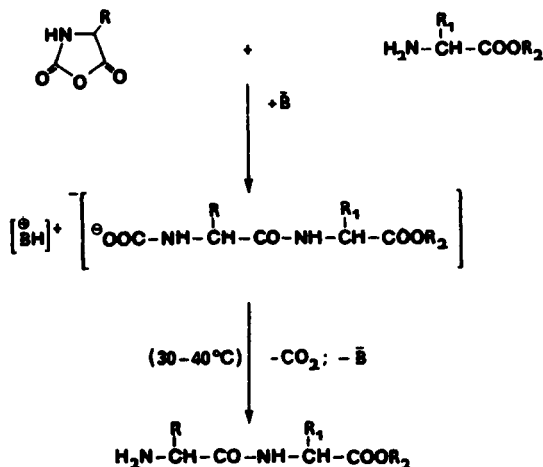


При получении N-карбоксиангидридов в качестве исходных соединений наиболее подходят хлорангидриды N-бензилоксикарбониламино кислот. Очень удобный способ синтеза N-карбоксиангидридов состоит во взаимодействии свободных аминокислот с фосгеном, при этом в качестве промежуточных продуктов образуются соответствующие карбамоилхлориды:

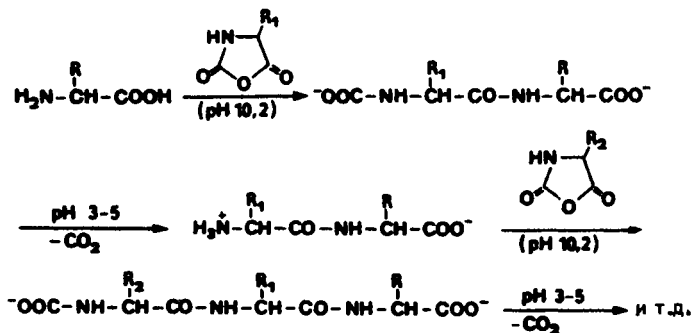


Поскольку даже следы воды вызывают полимеризацию N-карбоксиангидридов в полипептиды, то применение N-карбоксиангидридов для контролируемого синтеза пептидов сопряжено с большими трудностями.

ми. В 1949 г. Бейли удалось осуществить направленный синтез пептидов, введя одновременно эфир аминокислот и триэтиламин в реакцию с N-карбоксиангидридом. Реакция идет через образование соли соответствующей карбаминной кислоты, которая при осторожном нагревании разлагается на эфир пептида,  $\text{CO}_2$  и основание:



В качестве основания Лангебек предложил использовать трибензиламин, так как соответствующая соль карбаминной кислоты хуже растворима. Однако, несмотря на кажущиеся преимущества, N-карбоксиангидриды не получили широкого применения для направленного синтеза пептидов. Только в 1966 г. Хиршман и сотр. [252] разработали основы *контролируемого синтеза пептидов* этим методом в водной среде: аминокислоты или пептиды быстро ацилируются на холоду кристаллическими N-карбоксиангидридами при pH 10,2. При понижении pH до 3—5 полученные карбаматы пептидов декарбоксилируются. После повышения pH до 10 и добавления следующего N-карбоксиангидрида начинается новый цикл. Выход после трех циклов > 50%.





Чтобы избежать опасности нежелательного обмена карбоксильными группами между промежуточными карбаматами пептидов и аминокомпонентом, необходима высокая скорость перемешивания. Столь же существенно для гладкого протекания реакции ацилирования точное контролирование pH (pH 10,2—10,5 для аминокислот или pH 10,2 для пептидов; при pH > 10,5 в качестве побочных продуктов в результате частичного гидролиза образуются гидантоиновые кислоты). Для пептидного синтеза были применены также тиоаналоги N-карбоксиангидридов — ангидриды N-тиокарбоновых кислот (НТА; 1,3-тиазолидиндионы-2,5); интересно, что соответствующие тиокарбаматные соли отличаются высокой стабильностью. Ацилирование этими соединениями может происходить уже при pH 9—9,5, а опасность гидролитического превращения в гидантоиновые кислоты снижается [253, 254].

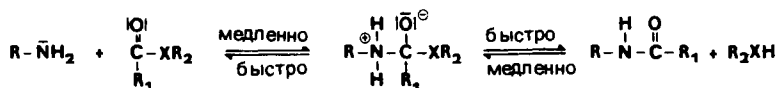
Применение НКА и НТА особенно удобно для осуществления свободно от рацемизации синтеза пептидных фрагментов без выделения промежуточных продуктов, причем трифункциональные аминокислоты, за исключением лизина и цистеина, не требуют специальной защиты. Хиршману и Денкевальтеру [255] удалось синтезировать большое число фрагментов S-белка рибонуклеазы, которые затем были соединены в S-белок азидным методом (разд. 3.8.1.1). Согласно исследованиям Ивакура с сотр. [256], применение N-карбоксиангидридов позволяет проводить синтез без точного контроля pH в некоторых гетерогенных системах растворителей. В системе ацетонитрил — водный раствор  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (60:50) реакция идет на границе раздела фаз, причем НКА не дает побочных реакций в органической фазе, а полученный карбамат стабилизируется в щелочной водной фазе. Эта методика также свободна от рацемизации.

### 2.2.5.3. *Метод активированных эфиров*

Уже при зарождении синтетической пептидной химии для образования пептидной связи использовалась ацилирующая способность метиловых и этиловых эфиров аминокислот. Первые работы, проведенные Курциусом и Фишером, хотя и не получили практического применения, однако способствовали пониманию того, что эфиры ацилированных аминокислот и пептидов являются активированными соединениями. Спустя примерно 80 лет Виланд и сотр. [257], применив для образования пептидной связи тиоэфир N-замещенных аминокислот, сделали метод активированных эфиров достоянием современной пептидной химии. Немного позже Швицеру и сотр. [258] удалось путем введения в эфирный остаток —I-заместителей превратить недостаточно реакционноспособные метиловые эфиры ациламинокислот в достаточно активные для образования пептидной связи промежуточные продукты. В настоящее время очень многие активированные эфиры успешно применяются в пептидной химии.

Образование пептидной связи при аминолитическом расщеплении эфира классифицируется по аналогии с омылением эфира как катализируемое основанием бимолеку-

лярное расщепление эфирной группы между ацильным остатком и кислородом ( $V_{Ac} 2$ ):



где  $X = O, S$  или  $Se$ ;  $R$  — остаток аминокомпонента;  $R_1$  — остаток карбоксильного компонента;  $R_2$  — замещенный или незамещенный алкиловый или ариловый эфир.

Нуклеофильная атака аминокомпонента на углеродный атом карбоксила является стадией, определяющей скорость реакции, она приводит к тетраэдрическому комплексу — реально существующему промежуточному продукту, образованию которого способствует присутствие электроноакцепторной группы —  $XR_2$ . Образование пептидной связи будет проходить быстрее, если  $R_2XH$  — слабое основание, т. е. если  $R_2XH$  — сопряженное основание относительно сильной кислоты. Причина высокой активности промежуточного соединения — сдвиг электронной плотности в анионе, облегчающем расщепление связи  $C - XR_2$ .

По Менгеру и Смиту (1972 г.), при аминоллизе фениловых эфиров в органических растворителях определяющей скоростью стадией следует считать не образование тетраэдрических аддуктов, а скорее их разложение.

В противоположность замещенным алкиловым, незамещенным или замещенным ариловым эфирам ( $X = O$ ), а также изоэлектрическим тимо- ( $X = S$ ) и селеновым эфирам ( $X = Se$ ), аминоллиз которых протекает по классическому механизму  $V_{Ac} 2$ , Юнг [259] и Якубке [260] в 1965 г. предложили новый тип активированных эфиров. Речь идет о гидроксипиперидиновых [259] и 8-оксихинолиновых эфирах [260]. Во время аминоллиза этих эфиров образуется циклическое переходное состояние, стабилизированное водородными связями, которые в свою очередь обусловлены наличием подходящих протоноакцепторных групп (рис. 2-8). В результате этого аминоллиз протекает с высокой скоростью, и в то же время исключается образование оксазолонов, ведущее к рацемизации (разд. 2.2.6.1.1).

В случае аминоллиза эфиров по механизму  $V_{Ac} 2$  к сильным активированным эфирам относятся только такие соединения, чувствительность которых к нуклеофильному воздействию является результатом повышения электрофильного потенциала на  $C$ -атоме карбоксила, благодаря сильному электромерному эффекту (так, для  $p$ -нитрофенола  $pK_a = 7,21$ ). Этим объясняется сильное активирование  $C$ -атома карбоксила, так как и ацильное расщепление, и стабилизация отщепляемого при аминоллизе аниона обусловлены тем же самым электронным взаимодействием. Высокие  $pK_a$  гидроксипиперидинов (12—13) и 8-оксихинолина (9,89) позволяют ожидать лишь слабого активирования  $C$ -атома карбоксила соответствующих эфиров. Механизм, сначала постулированный [259], а затем доказанный кинетически на примере аминоллиза 8-оксихинолиловых эфиров [261, 262], привел к новому принципу

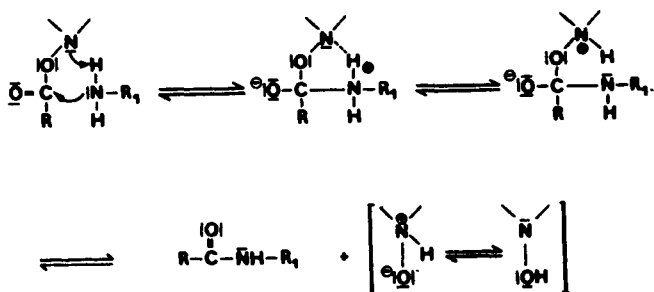


Рис. 2-8. Активирование карбоксила по механизму внутримолекулярного основного катализа при образовании циклического переходного состояния. R — остаток карбоксикомпонента, R<sub>1</sub> — остаток аминокомпонента.

активирования, который имеет большое практическое значение, особенно благодаря возможности избежать рацемизации. Возможно, этот механизм следует распространить на стадию связывания пептидов в белковом синтезе *in vivo*.

Некоторые активированные эфиры представлены в табл. 2-7. Другие сведения можно получить из литературы [63, 288—290].

Интересный новый реагент для пептидного синтеза — 4,6-дифенилтиено-[3,4-d] [1,3]-диоксол-2-он-5,5-диоксид (I) был предложен Штеглихом [291]. Этот циклический эфир угольной кислоты I реагирует с

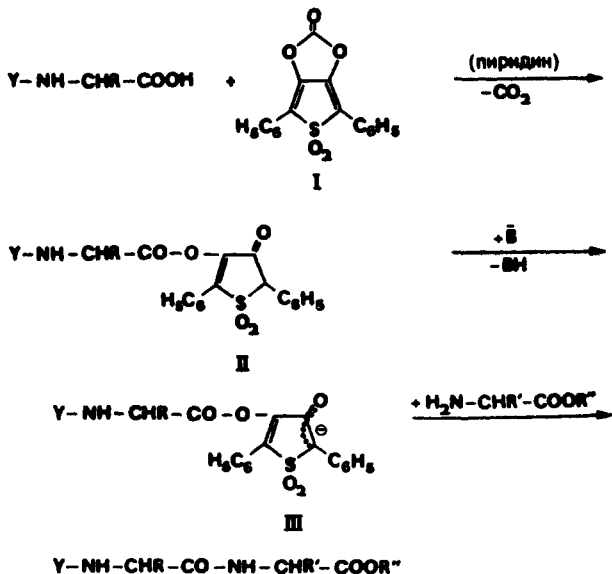


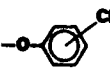
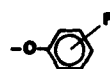
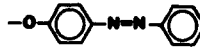
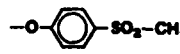
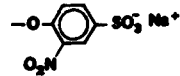
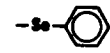
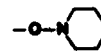
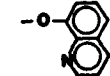
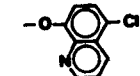
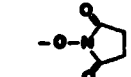
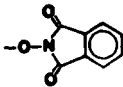

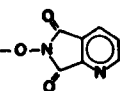
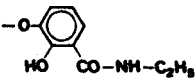
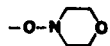
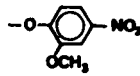

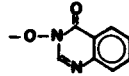


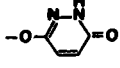
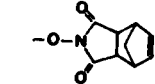


Таблица 2-7. Активированные эфиры  $\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{A}$

(R — остаток аминокислоты, A — активирующий компонент)

№ п/п	Эфир	Сокращение	Формула А	Литература
1	Тиофениловый	SPh		257
2	Цианометилловый	OCm	$-\text{O}-\text{CH}_2\text{CN}$	258
3	Нитрофениловые:			
	4-нитро-	ONp		263
	2-нитро-	O2, Np		263, 265
	2,4-динитро-	2,4Np		263, 265
	2,4,5-тринитро-	OTcp		266
4	Хлорфениловые:			
	пента-	OPcp		267
	три-	OTcp		267
5	Пентафторфениловый	OPfp		268
6	Фенилазофениловый	OPap		269, 270
7	4-Метилсульфонилфениловый			271
8	2-Нитро-4-сульфофениловый	ONs		272
9	Селенофениловый	SePh		273
10	Виниловый	OVi	$-\text{O}-\text{CH}=\text{CH}_2$	274
11	N-Гидроксипиперидиновый	OPip		259
12	8-Хинолиловый	OQ		260, 262
13	5-Хлор-8-хинолиловый	OQCl		261
14	N-Гидроксиукцинимидный	ONSu		275

№ п/п	Эфир	Сокращение	Формула А	Литература
15	N-Гидроксифтальимидный	ONPh		276
16	N-Гидроксиглутаримидный	ONGl		277
17	N-Гидроксиуретановый	ONU <sub>r</sub>	-O-NH-COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	278
18	N-Гидроксипиридин-2,3-дикарбоксимидный			279
19	2-Гидрокси-3-этиламинокарбонилфениловый			280
20	N-Гидроксиморфолиновый	ONMor		281
21	2-Метокси-4-нитрофениловый			282
22	2-Гидроксифениловый			283
23	3-Гидрокси-4-оксо-3,4-дигидрохиназолиновый	OOCh		284
24	1-Гидроксибензотриазоловый	OBt		285
25	2-Тиопиридиловый	SPyr		286
26	3-Гидроксипиридазон-6-овый	OPn		287
27	N-Гидрокси-5-норборнен-2,3-дикарбоксимидный	ONB		316, 317

<sup>a</sup> Аминолиз эфиров 1—10 протекает по механизму В<sub>Ac</sub>2, в то время как для эфиров 11—27 активирование карбоксила осуществляется по механизму внутримолекулярного основного катализа с образованием циклического промежуточного состояния (аналогично эфирам N-окси-пиридина и 8-окси-хинолина)

N-защищенными аминокислотами в протонных растворителях с образованием соответствующих активированных эфиров (II). Как видно из приведенной схемы, активированный эфир реагирует с аминокислотой, давая защищенный дипептид. Реакцию можно вести как с выделением активированного эфира, так и не делая этого. Высокая активность III по отношению к аминам объясняется внутримолекулярным основным катализом, вызываемым енольной группировкой в окрашенном анионе III. Ацилирующая способность таких соединений выше, чем у 4- или 2-нитрофениловых эфиров.

Для синтеза пептидных и белковоподобных веществ до сих пор применяли преимущественно 4-нитрофениловые, N-гидроксисукцинимидные и галогензамещенные фениловые эфиры. Для приготовления 4-нитрофениловых эфиров (впервые описаны Бодански) пригодны метод смешанных ангидридов, дициклогексилкарбодимидный (см. ниже) и карбонатный методы [292].

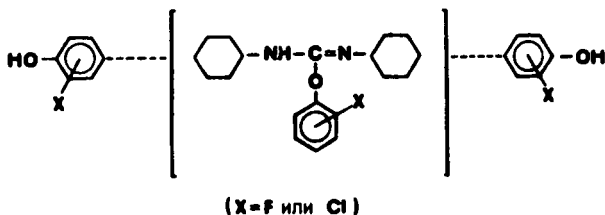
Большой экономический интерес представляет разработанный Вольманом [293] вариант их приготовления. При реакции бензил-(4-нитрофенил)-карбоната с солью аминокислоты получают соответствующую соль бензилоксикарбониламинокислоты, которая после подкисления и добавления ДЦГК образует с освободившимся 4-нитрофенолом замещенный активированный эфир с выходами 65—80%. Если исходить из *трет*-бутил-(4-нитрофенил)-карбоната, то можно получить 4-нитрофениловые эфиры Восаминокислот. Подбирая соответствующие карбонаты, можно по такому «одностадийному» методу получить и другие активированные эфиры.

Хорошо кристаллизующиеся и устойчивые при комнатной температуре (в темноте) 4-нитрофениловые эфиры отличаются высокой активностью в реакциях аминолитиза в диметилформамиде, N,N-диметилацетамиде и диметилсульфоксиде. Каталитические добавки уксусной кислоты, пивалиновой кислоты, азолов и N-гидроксисоединений ускоряют реакцию аминолитиза. Отделение освобождающегося во время аминолитиза 4-нитрофенола часто бывает трудным. Удаление побочных продуктов, особенно нежелательных при последующем гидрогенолизе, осуществляется обычно пересаживанием в системах диметилформамид — вода или диметилформамид — эфир, адсорбцией на нейтральном оксиде алюминия или образованием комплексов с пиридином (рН 6,5).

*N*-Гидроксисукцинимидные эфиры, предложенные впервые Андерсоном и сотр., отличаются хорошей способностью к кристаллизации и высокой активностью при аминолитизе. При этом следует особенно подчеркнуть низкую чувствительность этих эфиров к гидролизу и алкоголизу, так что пептидный синтез можно проводить даже в воде. Соли аминокислот или пептидов, растворимые в системах этанол—вода, диоксан—вода или тетрагидрофуран—вода, можно сочетать с гидроксисукцинимидными эфирами N-замещенных аминокислот, получая пептиды с хорошими выходами. Преимуществом является также то, что освобождающийся при аминолитизе N-гидроксисукцинимид растворим в воде.

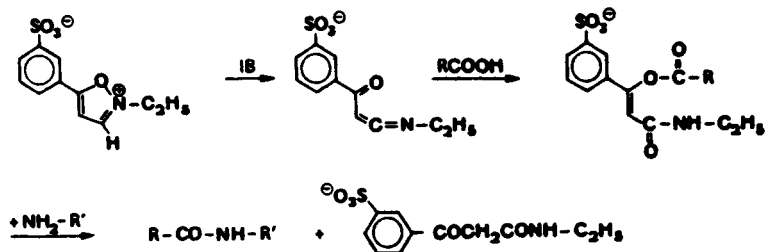
Большое практическое значение имеют также *галогензамещенные феноловые эфиры N-замещенных аминокислот*, которые были введены в синтетическую пептидную химию Купришевски и сотр. По скорости аминолиза они сравнимы с 4-нитрофениловыми эфирами, но имеют преимущество, так как удаление освобождающегося при аминолизе замещенного фенола осуществляется с меньшими трудностями. Кроме того, трихлорфеноловые эфиры очень устойчивы к щелочному гидролизу. 2,4,5- и 2,4,6-Трихлорфеноловые эфиры нашли широкое применение при синтезе различных пептидов.

Особого внимания заслуживают хорошо кристаллизующиеся и очень устойчивые *пентахлорфеноловые эфиры*, которые отличаются высокой активностью при аминолизе. Их можно легко готовить карбодимидным методом. Для синтеза оптически чистых пентахлорфеноловых эфиров N-ацилпептидов можно использовать полученный из пентахлорфенола и ДЦГК комплекс *изомочевины и пентахлорфенола* [294] ( $X = Cl$ ).



Перечисленные методы получения пригодны и для *пентафторфеноловых эфиров*, которые оказались превосходными ацилирующими агентами для синтеза различных пептидов. *Комплекс пентафторфенола с производными изомочевины (F-комплекс)*, который имеет строение, аналогичное комплексу пентахлорфенола с карбодимидом ( $X = F$ ), можно использовать для конденсации фрагментов.

Метод *изоксазолиевых солей*, предложенный для образования пептидной связи Вудвардом и Олофсоном [295], формально можно рассматривать в этой главе, поскольку 3'-сульфонат N-этил-5-фенилизоксазолия (К-реагент Вудварда) образует с N-защищенными аминокислотами и пептидами в присутствии мягких оснований реакционноспособный эфир енола, который далее без выделения можно вводить в реакцию с аминокислотным компонентом:



Образующееся производное ацилацетамида хорошо растворяется в воде, поэтому его можно легко удалить. Кроме того, были изучены другие соединения изоксазолия на предмет применения их в пептидном синтезе [296].

Предложенные для синтеза пептидов так называемые «пушпул»-ацетилены также следует упомянуть в этой главе, так как они реагируют с образованием промежуточных енольных эфиров [297].

### 2.2.5.4. Карбодимидный метод

Пригодность карбодимидов для образования пептидной связи впервые продемонстрирована Шиханом и Гессом [298]. В результате обширных исследований, проведенных различными лабораториями, предложен механизм реакции (рис. 2-9).

К протонированному карбодимиду присоединяется анион карбоксильного компонента с образованием ацилуреида I (O-ациллактим, производное изомочевины),

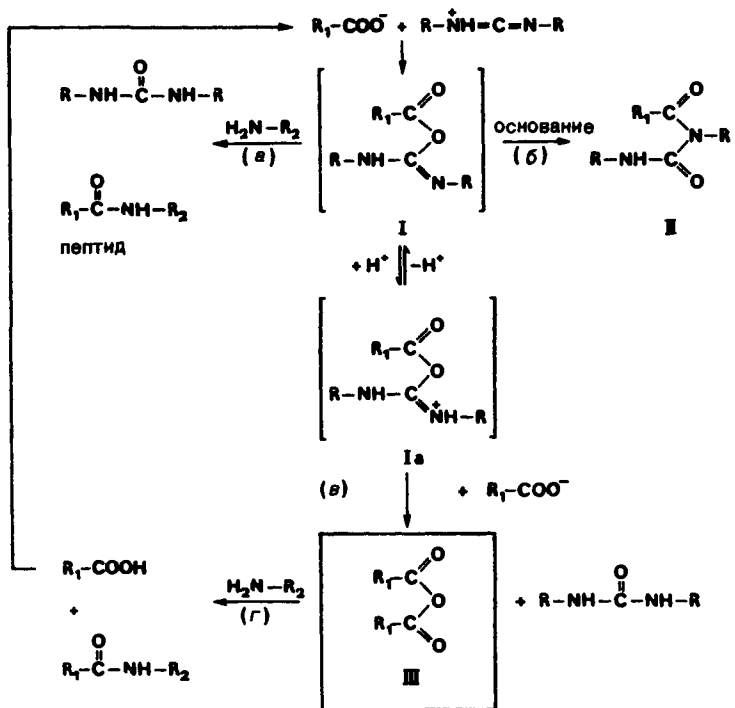


Рис. 2-9. Механизм образования пептидной связи с помощью ДЦК. R — циклогексил,  $R_1$  — остаток N-защищенной аминокислоты или пептида,  $R_2$  — остаток C-защищенной аминокислоты или пептида.



который с аминокомпонентом образует пептид с отщеплением замещенной мочевины (путь *a*). Протонированная форма ацилизомочевины Ia может реагировать со следующей молекулой ациламинокислоты с образованием симметричного ангидрида III и N,N'-дизамещенной мочевины (путь *в*). Симметричный ангидрид может реагировать с аминокомпонентом, образуя пептид и одну молекулу ациламинокислоты (путь *г*).

Катализируемая основаниями перегруппировка O-ациллактама I в производное ацилмочевины (путь *б*) является нежелательной реакцией, так как приводит к неактивному соединению II. Эта реакция (O — N-миграция ацильной группы) катализируется не только избытком третичных оснований, катализ вызывается также аминокомпонентом и самим карбодимидом, которые обладают достаточной основностью для этого.

#### 2.2.5.4.1. Применение дициклогексилкарбодимида

N,N'-Дициклогексилкарбодимид (R — циклогексил) особенно пригоден в качестве конденсирующего реагента в тех случаях, когда продукт относительно дешев и хорошо растворим в растворителях, обычно применяемых для пептидных синтезов. Образующаяся при проведении синтезов дициклогексилкарбодимидным методом N,N'-дициклогексилмочевина выпадает из реакционной смеси. Дициклогексилкарбодимидные сочетания можно проводить в присутствии воды, так как скорости гидролитического и амидолитического расщепления O-ациллактама заметно различаются.

ДЦГК-метод особенно пригоден при ступенчатом синтезе пептидных фрагментов. Этим методом можно соединять без рацемизации пептидные фрагменты, имеющие на C-конце пролин или глицин. Во всех других случаях существует опасность рацемизации. Другим недостатком является уже упоминавшееся образование ацилмочевины. Этой побочной реакции можно в какой-то степени избежать, поддерживая низкую температуру и применяя неполярные растворители. Применение в качестве растворителей диметилформамида и N,N-диметилацетамида приводит к образованию производных ацилмочевины. Эти растворители даже при высокой степени чистоты содержат небольшие количества диметиламина, способствующего O — N-миграции ацильной группы. Далее, ДЦГК-активирование незащищенных остатков аспарагина и глутамина приводит к соответствующим нитрилам вследствие дегидратации амидных групп. Поэтому целесообразно при конденсациях с карбодимидом использовать производные аминокислот, полностью защищенные по боковым функциям.

#### 2.2.5.4.2. Применение модифицированных карбодимидов

В то время как при синтезе коротких пептидов отделение N,N'-дициклогексилмочевины не составляет больших трудностей, при получении более крупных фрагментов это становится такой же проблемой, как и очистка от N-ацилмочевины. Чтобы избежать этих трудностей, были разработаны различные замещенные карбодимиды с третичноаминными или четвертичноаммонийными группами. Побочные соединения, которые полу-

чаются с такими карбодимидами, легче удалить благодаря их растворимости в воде или в кислотах. Такие соединения, как 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодимидгидрохлорид [299] или 1-циклогексил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодимидметиллюид [300], делают возможным проведение реакций в водных растворах; их используют также для циклизации пептидов и в реакциях с белками.

Дальнейшее развитие этого класса соединений связано с полимерными карбодимидами. Вольман и сотр. [301] синтезировали полигексаметиленкарбодимид  $-(\text{CH}_2)_6-\text{N}=\text{C}=\text{N}-[(\text{CH}_2)_6-\text{N}=\text{C}=\text{N}]_n-(\text{CH}_2)_6-$ . Полимерная мочеви́на, получающаяся в результате реакции, легко удаляется. Ито и др. [302] предложили *несимметричные карбодимиды*, N-атомы которых имеют различную электронную плотность, и поэтому при пептидном синтезе снижается нежелательная O — N-миграция ацильной группы, ведущая к N-ацилмочевине. При применении 1-бензил-3-этилкарбодимида заметно снижается образование N-ацилмочевины. Кроме того, следует указать на гораздо меньшую по сравнению с ДЦГК степень рацемизации, определенную по тесту Янга (разд. 2.2.6.2).

#### 2.2.5.4.3. Применение карбодимидов с добавками

Несмотря на указанные ограничения, ДЦГК-метод оказался наиболее продуктивным для образования пептидной связи. Поэтому внимание исследователей было направлено на исключение или хотя бы снижение образования N-ацилмочевины и опасности рацемизации при конденсации фрагментов.

В 1966 г. Вюнш и Дресс [303], а также Вейганд и др. [304] нашли, что при одновременном введении 1 г-экв. ДЦГК и 2 г-экв. N-гидроксисукцинимидов образование пептидной связи протекает практически без рацемизации и без образования ацилмочевины. Метод Вюнша — Вейганда стал теперь конкурентно способным азидному методу для случаев конденсации фрагментов.

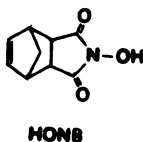
С помощью этого комбинированного ДЦГК-метода были успешно проведены фрагментные конденсации и циклизация фрагментов. Метод имеет, однако, недостаток: может протекать конкурентная реакция между ДЦГК и N-гидроксисукцинимидом, особенно заметная в случае стерически затрудненных пептидов. Согласно исследованиям Гросса и Билка [305], эта побочная реакция ведет к размыканию кольца O-ациллактама, образованного из эквимольных количеств ДЦГК и N-гидроксисукцинимидов, под действием второго моля N-гидроксисукцинимидов. При этом отщепляется дициклогексилмочевина. Промежуточный продукт — ацилнитрен перегруппировывается в изоцианат, который в свою очередь присоединяет третий моль N-гидроксисукцинимидов с образованием N-гидроксисукцинимидного эфира сукцинимидоксикарбонил-β-аланина. Этот активированный эфир может выступать в качестве конкурирующего ацилирующего реагента, вследствие чего происходит неконтролируемое встраивание β-аланина в пептидную цепь. (Механизм был установлен Ешкайтом [306], который исследовал вза-

имодействие ДЦГК с N-гидроксиглутаримидом.) Аналогичным путем образуется производное  $\gamma$ -аминомасляной кислоты.

Далее, естественно, начались поиски 1,2-динуклеофилов, которые благодаря своим структурным особенностям должны были предотвращать побочные реакции такого рода. В качестве добавок для карбодимидного метода были предложены гидроксикарбонаты [278], 1-гидроксибензотриазолы [308], 3-гидрокси-4-оксо-3,4-дигидрохиназолин [309], этиловый эфир 2-гидрооксимино-2-циануксусной кислоты (изонитрозоциануксусный эфир) [310], 4-нитро- или 4-хлор-бензолсульфгидроксамовая кислота [311], динитрил изонитрозомаляновой кислоты  $\text{HO-N}=\text{C}(\text{CN})_2$  [312]. Предлагались также другие изонитрозопроизводные [313], 5,7-дихлор-8-гидроксихинолин [307], а также N-гидрокси-5-нонборнен-2,3-дикарбоксиимид [314, 315].

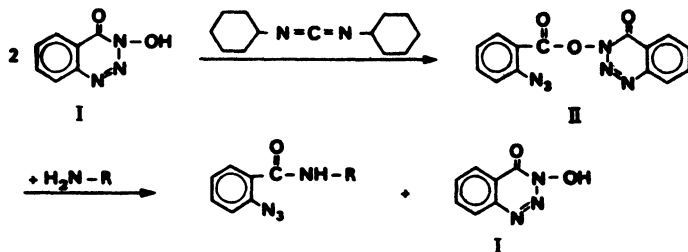
Долгое время методы Вюнша — Вейганда и Гейгера — Кёнига считались наиболее пригодными для синтеза пептидов. Что касается безопасности в отношении рацемизации, то, как показано новыми исследованиями [310, 312, 316, 317], имеются ограничения и при работе с ДЦГК-гидроксибензотриазолом.

Большое практическое значение приобретает *N*-гидрокси-5-нонборнен-2,3-дикарбоксиимид (HONB).



Эта добавка, предложенная Фуджино и сотр. [314, 315], вызывала лишь незначительную рацемизацию. Она была испытана на примерах синтеза некоторых важных пептидов (АКТГ, люлиберина и др.). Можно вести реакцию также с выделением соответствующего эфира.

3-Гидроокси-4-оксо-3,4-дигидро-1,2,3-бензотриазин (I) — прекрасная добавка в ДЦГК-методе [309], однако применение его сильно ограничено из-за нежелательной побочной реакции между триазином и ДЦГК. При этом образуется 3-(2-азидобензоилокси)-4-оксо-3,4-дигидро-1,2,3-бензотриазин (II), который в конце концов ацилирует аминокомпонент (R — остаток аминокомпонента):



На различных примерах было показано, что *3-гидрокси-4-оксо-3,4-дигидрохиназолин* можно применять в качестве добавки как для ступенчатого синтеза, так и для фрагментной конденсации [284].

Кислые добавки (*N*-гидроксисбензотриазол) могут катализировать димеризацию ДЦГК в *1,3-дициклогексил-2,4-бис-(циклогексилимино)-1,3-диазетидин* [318].

Для интерпретации влияния 1,2-динуклеофильных добавок на течение реакции по модифицированному ДЦГК-методу исходят из допущения [319], что вначале из карбоксикомпонента и ДЦГК получается очень реакционноспособное *O*-ацилпроизводное изомочевины (III) (рис. 2-10). Оно

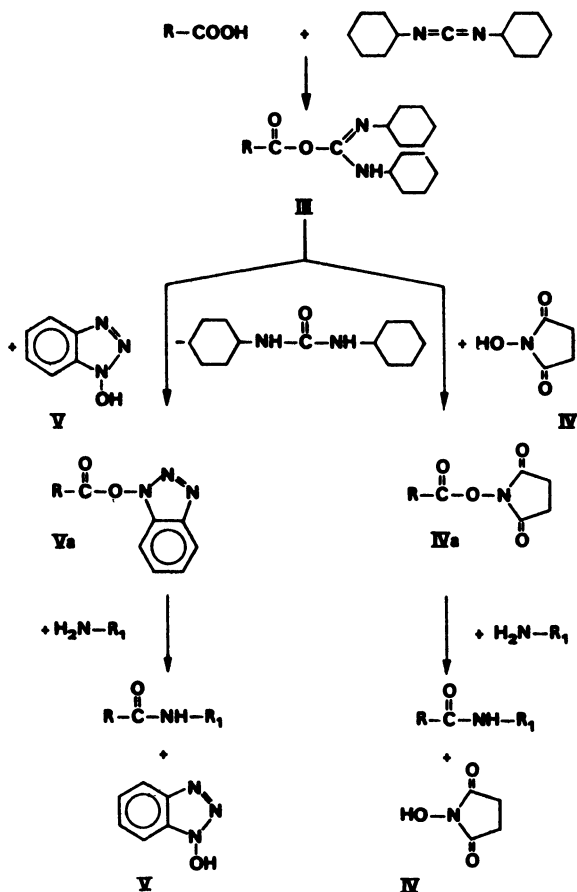


Рис. 2-10. Реакции, протекающие при синтезе по ДЦГК-методу с добавками *N*-гидроксисоединений. R — остаток карбоксикомпонента, R<sub>1</sub> — остаток аминоконпонента.

очень быстро реагирует с добавленным N-гидроксисоединением, как, например, N-гидроксисукцинимидом (IV) или N-гидроксибензотриазолом (V), и превращается в соответствующие активированные эфиры IVa или Va. В противоположность склонным к рацемизации производным O-ацилмочевины аминолиз промежуточных активированных эфиров протекает без рацемизации.

Исключение образования N-ацилмочевины объясняется относительно высокой кислотностью N-гидроксисоединений IV и V.

По Пшибыльски и сотр. [313] димерный азлактонный комплекс, способствующий рацемизации в полярных растворителях, в присутствии добавки переходит в комплекс азлактон — добавка, благодаря чему снижается опасность рацемизации. Вероятно, ход реакции в ДЦГК-методе с добавками гораздо сложнее, чем это представлено на схеме.

При использовании в качестве добавок к ДЦГК кислот Льюиса [320] было продемонстрировано, что для снижения рацемизации образование активированного промежуточного продукта с участием добавки не является обязательным. Синтез Tfa-Pro-Val-Pro-OMe с ДЦГК и  $SbCl_3$  или  $AlCl_3$  в качестве добавок прошел практически без рацемизации. Значение кислот Льюиса в практике пептидного синтеза сравнительно невелико, так как при этом получают низкие выходы пептидов. Между тем  $ZnCl_2$  хорошо подходит в качестве добавки: рацемизация снижается так же, как в случае N-гидроксибензотриазола; эту добавку можно применять в препаративных синтезах. На примере оптически активного 1,3-оксазолин-5-она, а именно 2-(1'-бензилоксикарбонилпирролидин-2-ил)-L-4-изопропил-5-оксо-4,5-дигидрооксазола, который соответствует карбоксильному компоненту модельного пептида Вейганда, впервые удалось доказать, что раскрытие кольца оксазола метиловым эфиром пролина катализируется кислотами Льюиса [321]. При этом одновременно снижается рацемизация и увеличивается скорость реакции размыкания кольца. Сообразно с этим размыкание оксазолонового кольца с сохранением оптической активности достигается не только с помощью N-гидроксисоединений, но и с электрофильными добавками, которые ускоряют размыкание оксазолонового кольца и снижают основность среды.

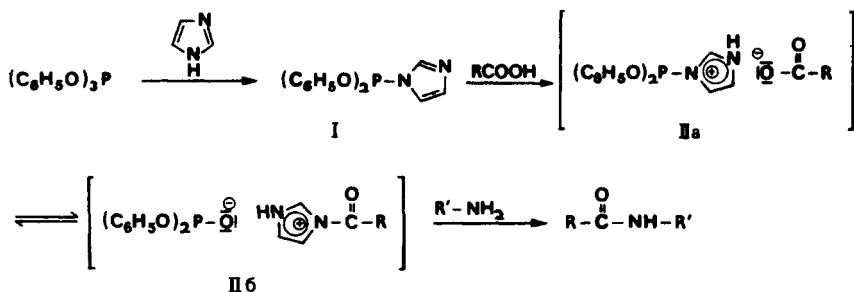
#### 2.2.5.5. Пептидные синтезы с применением соединений фосфора

Применение соединений фосфора для образования пептидной связи кажется обоснованным уже потому, что при биосинтезе белка активирование аминокислот происходит при реакции с аденозинтрифосфатом. При этом в качестве промежуточного соединения образуется ангидрид аминокислоты и адениловой кислоты с элиминированием пирофосфата.

Наряду с классическим *фосфоразо-методом* [322] было описано большое число методов конденсации с участием соединений фосфора. В подавляющем большинстве случаев речь идет об ангидридах с кислотами фосфора. Ниже рассматриваются только некоторые интересные методы.

## 2.2.5.5.1. Метод Митина

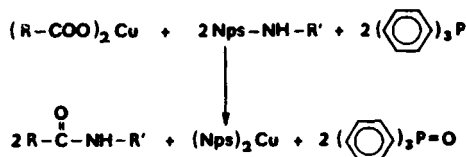
Митин и сотр. [323, 324] предложили проводить конденсацию N-ациламинокислоты с эфирами аминокислот в присутствии трифенилфосфита и 2 г-экв. имидазола при 40 °С. В качестве растворителей используют ацетонитрил, диоксан или диметилформамид. Соответствующие эфиры N-ацилпептидов получают с хорошими выходами в одну стадию, без выделения промежуточных продуктов. Предложен следующий механизм реакции:



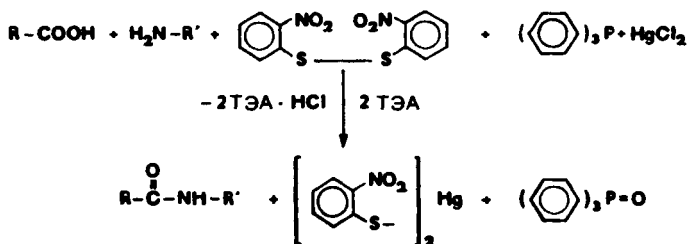
Хотя допустимы и другие промежуточные ступени, реакция, вероятно, идет прямо через N-ацилимидазолиум-(дифенил)-фосфит (IIб), который образуется из имидазолил-(дифенил)-фосфита (I) и карбоксильного компонента. В качестве N-защитных групп используют бензилоксикарбонильный или *трет*-бутилоксикарбонильный остаток, тогда как, например, арилсульфенильные группы приводят к побочным реакциям.

## 2.2.5.5.2. Метод Мукаяма

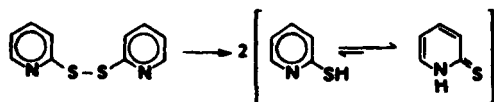
Мукаяма и сотр. [325] предложили методику синтеза, названного окислительно-восстановительной конденсацией. Медная соль ациламинокислоты и эфир 2-нитрофенилсульфениламинокислоты реагируют с трифенилфосфиним, причем  $\text{Cu}^{2+}$  выступает как тиольная «ловушка»:



Точно так же могут реагировать с трифенилфосфиним свободная N-ациламинокислота и эфир аминокислоты, если в реакцию добавить ди-(2-нитрофенил)-дисульфид, хлорид ртути(II) (как тиольную «ловушку») и триэтиламин для связывания хлороводорода:

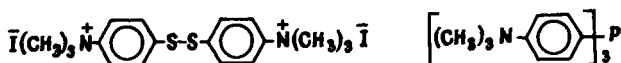


Еще лучше в качестве дисульфидного компонента вводить дипиридил-2-дисульфид [326]. Добавка тиольной «ловушки» не нужна, так как образующийся во время реакции пиридин-2-тиол перегруппировывается в более устойчивый тион:



Метод Мукаяма пригоден и для реакций конденсации на полимерных носителях.

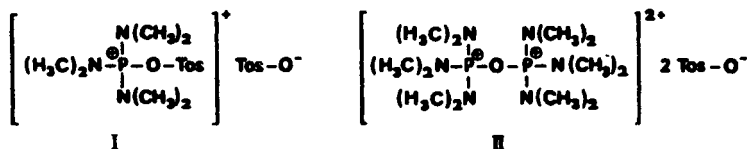
Интерес представляет использование для окислительно-восстановительной конденсации водорастворимых производных диарилдисульфида и триарилфосфина [326a]:



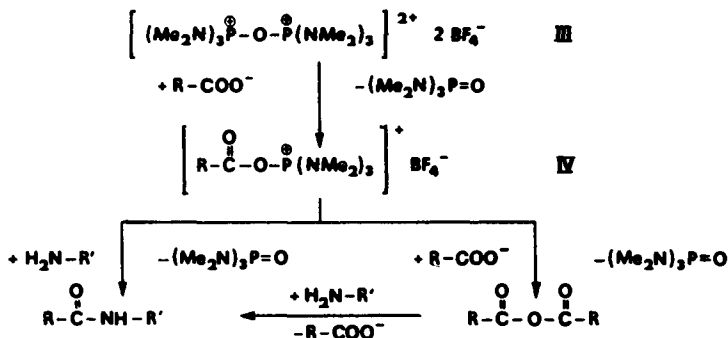
Применение этих реагентов значительно облегчает выделение синтезированного пептида, так как все побочные продукты реакции легко удаляются водой.

### 2.2.5.5.3. Применение других производных фосфора

Кеннер, Шепард и др. [421] разработали метод конденсации с применением гексаметильтриамида фосфорной кислоты (ГМТАФ) и ангидрида 4-толуолсульфокислоты. Промежуточные продукты, образование которых вначале было постулировано, в конце концов удалось выделить [328]. При добавлении ангидрида 4-толуолсульфокислоты к ГМТАФ сначала при 20 °C за 5–20 мин образуется тозилат монокатиона (I), который при нагревании до 55 °C переходит в дитозилат (II).

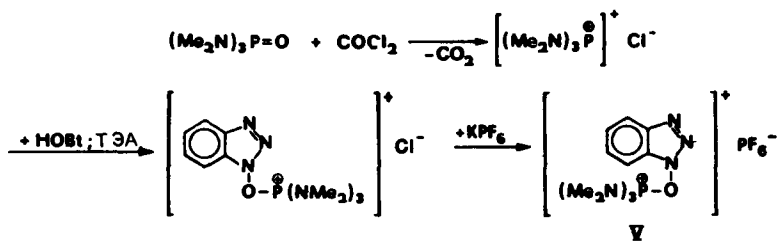


Очень гигроскопичный дитозилят II может быть переведен в сухом ацетонитриле с тетрафторборатом натрия в кристаллический негигроскопичный бис-(тетрафторборат) III, который известен как *реактив Бейтса*. При его использовании дипептиды получают с высоким выходом. Правда, этот метод не вполне надежен в отношении рацемизации, поэтому рекомендуется применять добавки, снижающие рацемизацию [328]. В качестве промежуточного продукта образуется ацилоксифос-



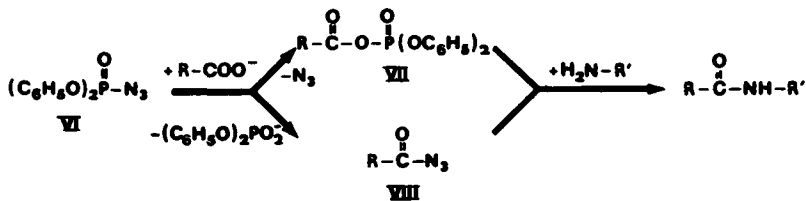
фониевая соль (IV), с которой реагирует аминокомпонент. Наряду с этим возможен также путь через симметричный ангидрид.

Структурно аналогичный реагент *гексафторфосфат бензотриазолилокситрис-(диметиламино)-фосфония* (V) может быть приготовлен сравнительно просто [329]:



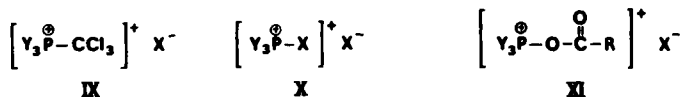
При конденсации с помощью V амидная группа аспарагина не дегидратируется в нитрил. Но этот вариант синтеза также не свободен от рацемизации [330].

Практический интерес в качестве реагента конденсации представляет *фосфорил-азид* (VI) [331]. В этом случае наряду с несимметричным ангидридом VII в качестве промежуточного продукта может получаться также ацилазид (VIII).

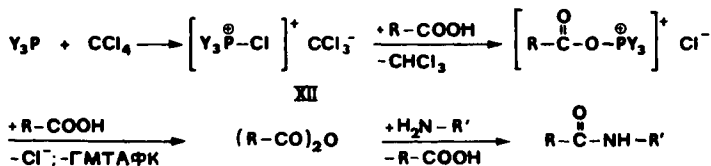




При взаимодействии триарил(триалкил)фосфина с тетрагалогенметанами или же с галогенами ( $X = Cl, Br$ ) получают аддукты IX [332] или X [333, 334], которые при взаимодействии с ациламинокислотами образуют активированные ацилокситриарил(триалкил)-фосфониевые соли (XI).



В работе [335] предложено другое строение для продукта XII реакции между трис-(диметиламино)-фосфином [ $Y = N(CH_3)_2$ ] и тетрахлоридом углерода, который при пептидных синтезах реагирует по следующему механизму:

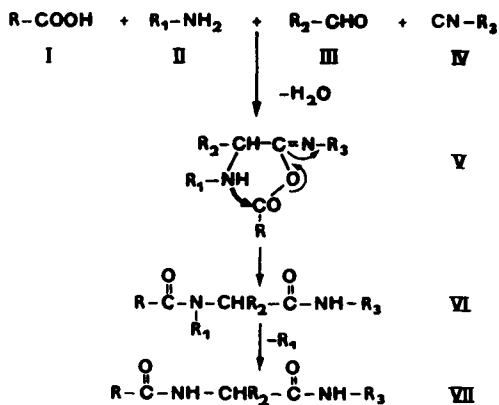


Ямада и Такеучи [336] получили с трис-(диэтиламидом) фосфористой кислоты, а также с трибутилфосфином и трис-(4-метил-пиперазино)фосфином лучшие результаты, чем с триметилфосфитом ( $Y = OCH_3$ ). Надежность этих методов в отношении рацемизации спорна.

### 2.2.5.6. Методы конденсации, представляющие теоретический интерес

Методы образования пептидной связи, рассматриваемые ниже, отличаются оригинальными подходами. До сих пор они не получили широкого практического применения, но все же представляют потенциальные возможности для развития пептидной химии.

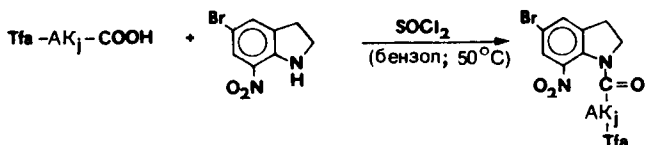
Уги и сотр. [338] разработали метод, отличающийся от классического пептидного синтеза, который пригоден как для получения пептидных фрагментов, так и для конденсации фрагментов.



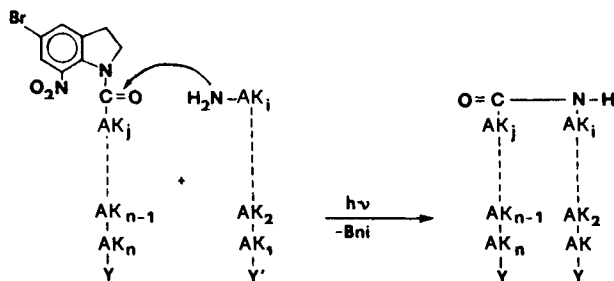
Метод Уги можно рассматривать как комбинацию реакции Пассерини с конденсацией Манниха. Для получения пептидных фрагментов проводят в одну стадию, без выделения промежуточных продуктов, взаимодействие N-ациламино кислоты (I), замещенного амина (II), альдегида (III) и изонитрила (IV) (производного аминокислоты или пептида). Сначала из четырех компонентов образуется неустойчивый продукт присоединения V, который спонтанно и очень быстро перегруппировывается внутримолекулярно по реакции 1-го порядка через пятичленный промежуточный цикл в N-замещенное производное пептида VI. После отщепления R<sub>1</sub> получают желаемый пептид VII.

Принципиальная пригодность четырехкомпонентной конденсации для синтеза пептидных фрагментов с 3—5 остатками аминокислот была показана Уги и сотр. [340] на примере синтеза производного тетравалина.

*Фотохимический метод конденсации* для связывания пептидных фрагментов был разработан Пачорником и сотр. [343] на основе 5-бром-7-нитроиндолинил-группы (БНИ-группа), которая прежде была описана как карбоксизащитная группа. БНИ-группа сравнительно устойчива и может отщепляться в присутствии воды при облучении ( $\lambda < 400$  нм). В неводных растворах 1-ацил-5-бром-7-нитроиндолин фотохимически ацилирует также и другие нуклеофильные соединения (амины, спирты, фенолы, тиолы и т. д.). Это и навело на мысль применить БНИ-группу для фотохимической конденсации фрагментов. При построении пептидного фрагмента С-конец защищают БНИ-остатком:



Затем обычным путем синтезируют нужный фрагмент. Фотохимическая реакция конденсации происходит со вторым фрагментом, имеющим свободную аминофункцию:



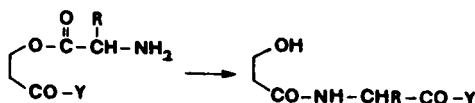
Таким путем можно получить пентапептид по схемам 2 + 3 или же 4 + 1.

Главная трудность при обычном пептидном синтезе в растворе заключается в соединении больших фрагментов, состоящих из 50 и более остатков аминокислот. Так как реакция конденсации протекает как реакция 2-го порядка, для быстрого соединения фрагментов нужны высокие концентрации реагирующих партнеров. Защищенные длинноцепочечные пептиды часто плохо растворяются в используемых для

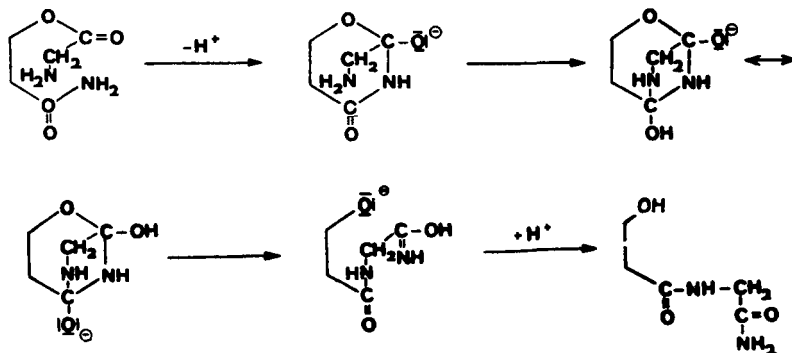
конденсации растворителях. При низкой концентрации реагентов реакции конденсации идут очень медленно. В этих условиях могут идти необратимые внутримолекулярные побочные реакции или обменные взаимодействия с растворителем. Не спасает положения и более энергичное активирование карбоксила, так как при этом повышается опасность рацемизации. Здесь могли бы помочь некие «молекулярные шипцы», с помощью которых активные группы связывающихся фрагментов приводятся в тесное соседство, и образование пептидной связи идет независимо от концентрации. Принципиальную возможность этого дает метод Уги, который, однако, еще не получил широкого практического применения.

В этой связи следует сказать о классических исследованиях групп Т. Виланда и М. Бреннера, которые теоретически и экспериментально занимались этой сложной проблемой.

По реакции Бреннера, пептиды получают с помощью внутримолекулярной перегруппировки, известной как *аминоацильная перегруппировка*. Предварительным условием такого превращения является наличие гидроксильной группы в  $\beta$ -положении к карбоксилу.

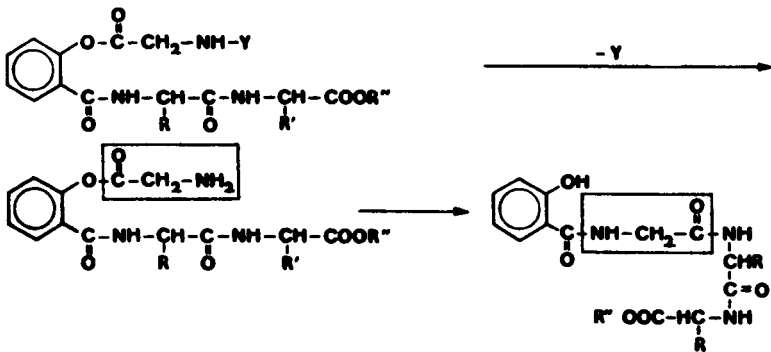


Для таких реакций подходят свободные карбоновые кислоты ( $\text{Y} = \text{OH}$ ), эфиры ( $\text{Y} = \text{OR}$ ), амиды ( $\text{Y} = \text{NH}_2$ ), а также замещенные амиды ( $\text{Y} = \text{NH}-\text{CHR}-\text{COY}'$ ), то повторением реакции можно синтезировать пептиды. Бреннер и сотр. [344] предложили следующий механизм реакции:



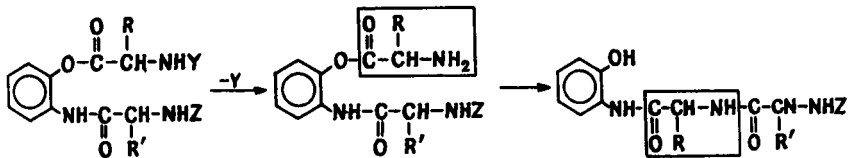
Превращение очень легко протекает с салициловой кислотой в качестве гидроксилсодержащего компонента:





После введения O-аминоацильного остатка и последующего отщепления аминозащитной группы Y происходит спонтанная перегруппировка с образованием эфира салицилоилтрипептида. Широкое применение этого метода ограничено тем, что очень трудно осуществить отщепление остатка салициловой кислоты после завершения синтеза. Один из диациламидов, полученный при такого рода перегруппировке, описан Виландом и сотр. в 1956 г.

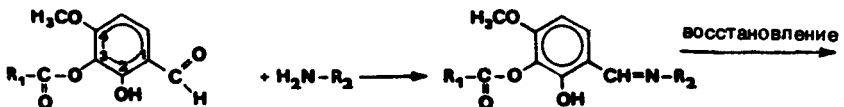
Интерес представляет внутримолекулярная перегруппировка производных o-аминофенола, также приводящая к образованию пептидной связи [344a]:

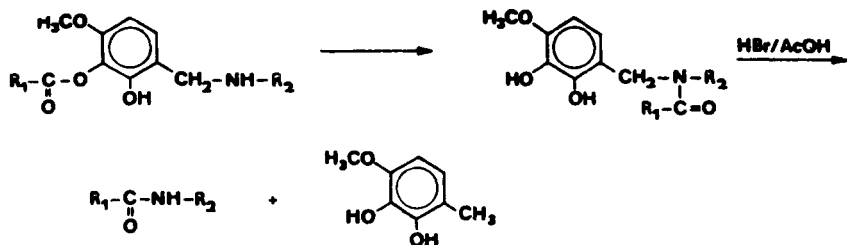


В отличие от перегруппировки Бреннера наращивание пептидной цепи здесь идет от C- к N-концу.

Кемп и сотр. [345] описали метод *аминной «ловушки»*. При этом используют соединения, в которых аминокомпонент ковалентно привязан к некоему электрофильному центру в непосредственной близости от эфирной функции активированного ацильного производного. Образование пептидной связи происходит в результате внутримолекулярной перегруппировки.

В качестве системы, фиксирующей аминокомпонент, оказался пригодным 4-метокси-3-ацилокси-2-гидроксibenзальдегид. В ацетонитриле этот альдегид с эфирами аминокислот очень быстро образует шиффовы основания, которые легко восстанавливаются в соответствующие производные бензиламина. Далее внутримолекулярная O - N-перегруппировка дает N-бензиламид, из которого пептидное производное освобождается при обработке HBr/AcOH:





Исходя из 4-метокси-3-бензилоксикарбонилглицил-2-гидроксibenзальдегида, после его взаимодействия с тетраметилгуанидиновой солью дипептида H-Leu-Gly-OH, восстановления и перегруппировки, получили с 92%-ным выходом Z-Gly-Leu-Gly-OH с 4-метокси-2,3-дигидроксibenзильным остатком у азота лейцина.

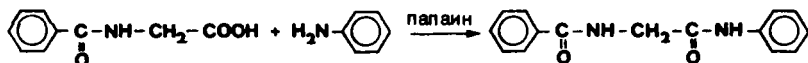
Все эти методы, так же как и метод Уги, могут иметь определенные перспективы в трудной проблеме соединений больших пептидных фрагментов.

### 2.2.5.7. Ферментативный синтез пептидов

Еще до первого химического образования пептидной связи делалась попытка получить белок с помощью ферментов. В 1886 г. Данилевский показал, что при инкубации продуктов расщепления белка с неочищенной смесью ферментов желудочного сока выпадает белковоподобный осадок. Завьялов и сотр. в 1901 г. назвали продукт такого синтеза пластеином. Впоследствии многие исследователи занимались синтезами высокомолекулярных пластеинов при воздействии протеолитических ферментов на концентрированные растворы подходящих олигопептидов (ср. разд. 2.2.9.2.)

Использованию ферментов в качестве катализаторов для реакции соединения пептидов и в настоящее время уделяется большое внимание. Катализ образования пептидов при биосинтезе белка осуществляет фермент пептидилтрансфераза. Так как этот фермент взаимодействует с протениогенными аминокислотами независимо от природы боковой цепи, теоретически он представляет собой идеальный катализатор для реакций целенаправленного синтеза пептидов. Пептидилтрансфераза в сложной рибосомной системе структурно тесно связана со всеми другими составляющими, кроме того, на стадии элонгации во время биосинтеза белка одновременно действуют также другие факторы. Поэтому вероятность того, что выделенный из естественной среды фермент вообще будет способен к катализу реакции синтеза пептидов, очень мала. Никакого выхода в практику пептидного синтеза не получил также изученный Липманном механизм биосинтеза пептидных антибиотиков, который проходит с участием определенных ферментов.

Первое использование гидролазы для реакции синтеза осуществлено Хиллом в 1898 г. на примере мальтазы. Только 40 лет спустя Бергман и Френкель-Конрат [346] осуществили первое ферментативное образование амидной связи. Действуя папаином на гиппуровую кислоту и анилин, они получили анирид гиппуровой кислоты:



Этим было показано, что протеазы принципиально могут катализировать также и синтетические реакции, если:

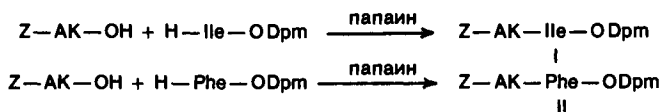
используют производные аминокислот или пептидов и продукт выпадает в осадок, благодаря чему равновесие сдвигается в сторону образования пептида.

На основе классических работ по обратимости реакций, катализируемых протеазами [384], а также исследований Фрутона, Бендера, Эпанда, Фастре и Фершта в середине семидесятых годов было однозначно доказано, что протеазы могут применяться в качестве биокатализаторов для синтеза пептидов в препаративных масштабах. Таким образом, ферментативный синтез приобретает практическое значение для получения биологически активных пептидных веществ.

После работ исследовательских групп Исова (Исследовательский центр по химии в Сагами) и Морихара (Исследовательская лаборатория в Синюги) в Японии и Луизи и сотр. в Швейцарии на ферментативном пептидном синтезе сосредоточились интересы исследователей, работающих в области пептидной химии. В результате дальнейшей интенсивной разработки методик ферментативного синтеза намечается многообещающая фаза развития этого метода в качестве дополнения к классическим химическим методам конденсации, а также для решения полусинтетических задач.

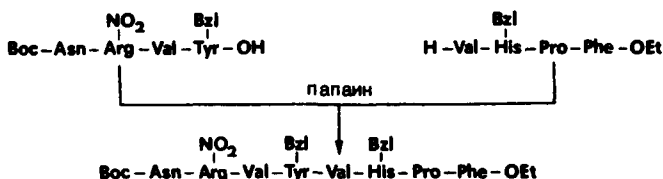
В качестве ферментов использовались протеазы животного, растительного и микробного происхождения. Исова и сотр. [347] применяли в качестве катализаторов для образования пептидной связи папаин, пепсин, субтилизин BPN' (иагароза), а также бактериальные металлопротеазы пролизин (*Bacillus subtilis var. amyloliquefaciens*), тациназу N (*Streptomyces caespitosus*), термоллизин и термоазу (*Bacillus thermoproteoliticus*).

Особенно хорошими свойствами как катализатор для синтеза пептидов обладает растительная тиольная протеаза папаин (*Carica papaya*) благодаря малой субстратной специфичности при расщеплении. Это показано на примерах двух модельных реакций [347]:



Выход, %			Выход, %		
АК	I	II	АК	I	II
Gly	53	77	Gln	55	98
Ala	92	89	Arg(NO <sub>2</sub> )	73	96
Leu	59	92	Lys(Z)	100	80
Phe	37	95	Glu	71	—
Ser	21	72	Met	—	96
Thr	73	78	His(Bzl)	—	97

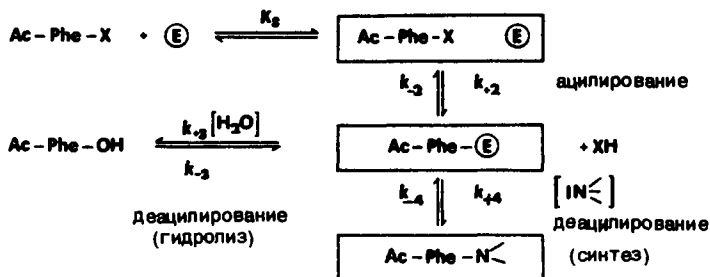
С другими названными выше протеазами также получены многообещающие результаты при реакциях конденсации. Исова и сотр. показали применимость ферментативного синтеза для получения небольших биологически активных пептидов, таких, как, например, [1-аспарагин, 5-валин]-ангиотензин (II):



Выход аналога ангиотензина в смеси буфера (рН 5,5) и метанола (1:1 по объему) составил 78%.

Большого внимания заслуживает описанный Кульманом [348] ферментативный синтез Leu- и Met-энкефалинов (ср. разд. 2.3.3.2) с использованием только катализируемой протеазами конденсации, причем из семи ферментативных реакций пять было проведено с папаином. Скорость катализируемого папаином пептидного синтеза существенно повышается при применении в качестве карбоксильного компонента алкиловых эфиров вместо N-замещенных аминокислот или пептидов (Якубке и др., 1981 г.).

Обширные экспериментальные данные по применению  $\alpha$ -химотрипсина и трипсина как катализаторов образования пептидной связи получены в работах Морихара и Ока [350]. Карбоксикомпонент Ac-Phe-OEt (X = OEt) реагирует с химотрипсином и после образования фермент-субстратного комплекса дает ацилфермент, который может реагировать либо с аминокислотным компонентом (|N=) с образованием пептида, либо с водой, давая продукт гидролиза:



Поскольку в случае пептидного синтеза из эфирного субстрата и производного аминокислоты или пептида  $k_4 > k_3$ , идет преимущественно кинетически контролируемый синтез пептида до тех пор, пока в реакционной смеси есть эфирный субстрат. Луизи и сотр. [353, 354] применяли субстраты со свободной карбоксильной функцией, а в качестве аминокислотных компонентов вводили амиды или алкиловые эфиры аминокислот, причем последние всегда давали худшие выходы.

На основании того, что добавки органических растворителей сдвигают равновесие катализируемых протеазами реакций в сторону синтеза (Ласковски и др., 1978 г.), а также для улучшения растворимости реагентов в реакционную смесь часто добавляются смешивающиеся с водой органические растворители.

Куль и сотр. [356] и Мартинек и сотр. [356a] исследовали катализируемое ферментами образование пептидной связи в двухфазных водно-органических системах. Преимущество такой методики состоит в том, что функционирующая как катализатор протеаза не повреждается органическим растворителем, что гарантирует более высокие выходы, кроме того, можно вернуть обратно биокатализатор после разделения фаз. Далее Кёнек и сотр. [386] впервые провели успешные пептидные синтезы с иммобилизованным химотрипсином. Наряду с иммобилизованными ферментами можно также использовать ферменты, адсорбционно фиксированные на силикагеле, что было продемонстрировано на примере синтеза пептидов с помощью химотрипсина, фиксированного на силикагеле [443].

Ока и Морихара [352], а также Семенов и Мартинек [466] описали синтезы с применением растворимых протеаз, при этом продукты синтеза не выпадали в осадок. В качестве катализатора для синтезов пептидов применялась также термитаза (Кёнек, Якубке [443]), хотя из-за высокой эстеразной активности фермента выходы бывали не всегда удовлетворительны.

Очень хороша для ферментативного пептидного синтеза карбоксипептидаза Y (CPD-Y) из пекарских дрожжей, синтетические возможности которой тщательно изучены группой Йохансена [349]. Авторы применяли CPD-Y для получения различных синтетических объектов, в том числе энкефалина. Большие ожидания возлагаются на CPD-Y в области семисинтеза, в особенности для превращения инсулина свиньи в человеческий (такое превращение было описано также с применением других протеаз [351]). О значении протеаз для семисинтеза [540] см. разд. 2.2.10.1.3.

Из аспартатпротеаз наибольший интерес для катализа синтеза пептидов представляет пепсин [355].

Реакции конденсации, катализируемые протеазами, обладают по сравнению с химическими методами следующими преимуществами; полное исключение рацемизации, простота проведения процесса, минимальные требования к защите функций боковых цепей и др. Недостатком является, однако, невозможность универсального применения протеаз из-за их высокой специфичности. Кроме того, иногда бывает трудно предсказать ход реакции. После дальнейших методических усовершенствований ферментативная каталитическая конденсация может стать еще одним полезным методом в пептидной синтетической химии.

## 2.2.6. Проблемы рацемизации при пептидных синтезах

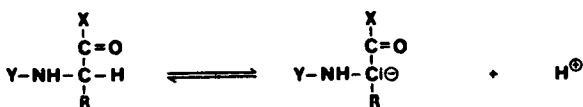
Все операции при синтезе пептидов, которые проводятся по функциональным группам, связанным с асимметрическим центром, тают в себе опасность рацемизации.



При синтезе длинноцепочечных оптически активных пептидов отсутствие рацемизации в ходе конденсации имеет решающее значение, так как стереоизомеры крупных фрагментов почти невозможно разделить с помощью таких операций очистки, как кристаллизация, ионообменная хроматография и др. Оптическая чистота синтетических пептидов зависит от степени рацемизации на каждой стадии конденсации. Если представить себе, что на каждой стадии синтеза рацемизация составляет только 1%, то после 100 конденсаций продукт будет содержать всего 61% желаемого стереоизомера. Этот пример показывает, какое огромное значение имеет проблема рацемизации при пептидных синтезах. Поскольку целью пептидных синтезов является получение биологически активных пептидных и белковоподобных веществ, биологическая активность которых зависит от оптической чистоты, то следует уделять особое внимание вопросам снижения рацемизации при пептидных синтезах.

### 2.2.6.1 Механизмы рацемизации

Свободные аминокислоты имеют сравнительно стабильную стерическую конфигурацию. У активированных по карбоксилу N-ациламино кислот, применяемых для пептидного синтеза, опасность рацемизации гораздо больше. Рацемизация может происходить при обратимом отщеплении протона от  $\alpha$ -углеродного атома:



У образующегося при отщеплении протона карбаниона все заместители расположены в одной плоскости. Присоединяющийся обратно протон с равной вероятностью может подходить с одной и с другой стороны этой плоскости, при этом образуется рацемат. Устойчивость связи C—H сильно зависит от природы заместителей. Рацемизация может катализироваться и основаниями, и кислотами, причем этому благоприятствуют высокие температуры и полярные растворители. В условиях конденсации решающую роль играет рацемизация, катализируемая основаниями. Ниже обсуждаются два основных механизма рацемизации.

#### 2.2.6.1.1. Азлактонный механизм

Рацемизация, происходящая в условиях конденсации, вызывается главным образом промежуточным образованием «оптически лабильного» азлактона (1,3-оксазолин-5-она). При активировании N-ациламино кислоты I (рис. 2-11) может с отщеплением HX образоваться азлактон, который, как известно, очень легко рацемизуется [357]. Скорость образования азлактона II зависит от различных факторов. Благодаря электрофильному заместителю X

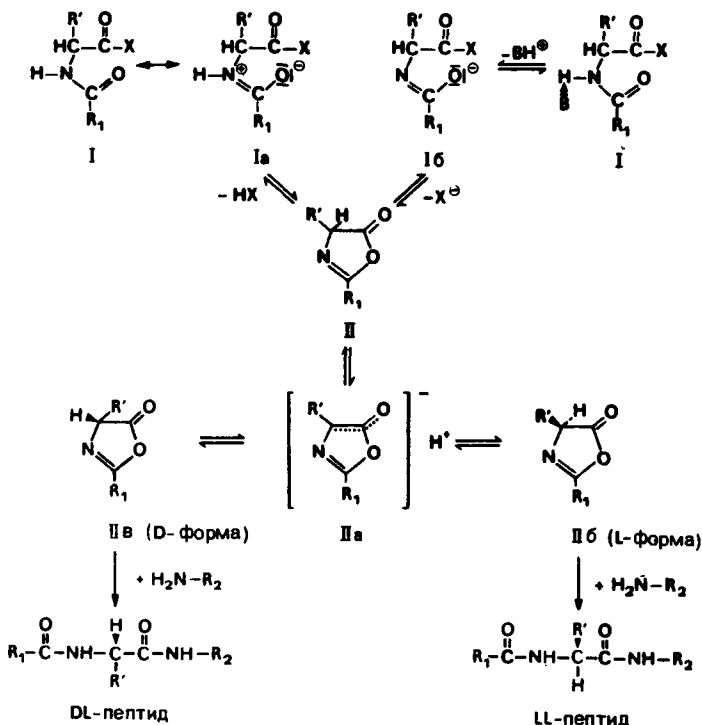


Рис. 2-11. Азлактонный механизм рацемизации. R' — остаток С-концевой аминокислоты, R<sub>1</sub> — остаток пептида, X — активирующая группа, R<sub>2</sub> — остаток аминоконцепента, B<sup>+</sup> — основание.

углеродный атом карбоксила получает положительный заряд, что способствует внутримолекулярной нуклеофильной атаке на кислород карбонила ацильной группы RCO; такие N-ацильные группы, как ацетил, бензоил, трифторацетил, аминоацил и др., облегчают образование азлактона, потому что они усиливают нуклеофильность кислорода карбонила амидной группы (Ia). На образование азлактона влияют, далее, основность среды, вид растворителя и температура. Так, при действии основания может отщепляться амидный протон (быстрая реакция). В полученном амид-анионе Iб благодаря нуклеофильному кислороду идет замыкание кольца и получается азлактон II. Циклизация является стадией, определяющей скорость процесса. Полярный растворитель способствует образованию амид-аниона [358, 359].

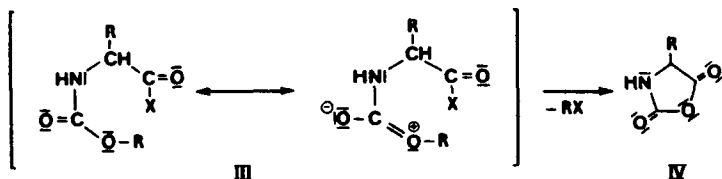
Полученный азлактон II может легко рацемизоваться в условиях конденсации (аминоконцепент, основные активирующие средства и др.). При

этом благодаря псевдоароматическому промежуточному IIa устанавливается катализируемое основанием равновесие между обоими энантиомерами IIб и IIв. Наряду с аминолизом активированного карбоксикомпонента I (аминолиз на рис. 2-11 не показан) оптически активный аминокомпонент реагирует с энантиомерами азлактона с образованием LL- и DL-пептидных производных.

Раскрытие кольца происходит с различной скоростью [360]. Соотношение полученных диастереомеров определяется принципом Куртина — Гаммета. При размыкании азлактонного кольца эфирами L-аминокислот доминирует образование DL-пептида. При образовании пептидной связи по азлактонному механизму степень рацемизации зависит как от тенденции образования азлактона, так и от скорости размыкания азлактонного кольца аминокомпонентом. Важную роль играет при этом нуклеофильность аминокомпонента.

Для исключения или снижения рацемизации, протекающей по азлактонному механизму, существуют различные возможности. Лучше всего выбирать такие условия для образования пептидной связи, при которых азлактоны не могут образоваться.

1. *Постепенное наращивание пептидной цепи с применением N-защитных групп уретанового типа.* Аминокислоты и пептиды с такими защитами (см. разд. 2.2.4.1.1.1.) не образуют азлактонов в активированном состоянии. Алкоксикарбониламинокислоты III могут, правда в активированной форме ( $X = Cl$ ), давать N-карбоксиангидриды [1,3-оксазолидин-2,5-дионы] IV, однако алкоксигруппы препятствуют образованию азлактонного кольца.



Бенуатон и Чен сообщили [361], что при определенных условиях из Вос-аминокислот и карбодимида вопреки существовавшему мнению образуются 2-алкоксиоксазоны. Последние, однако, в противоположность оптически лабильным 2-алкилоксазолам гораздо более устойчивы и конденсируются с аминокомпонентами без рацемизации.

2. *Активирование N-защищенных фрагментов пептидов с C-концевым пролином.* При введении карбоксикомпонента с C-концевым пролином образование азлактона невозможно, так что такие пептиды можно активировать, не опасаясь рацемизации. Нет опасности рацемизации также при активировании фрагментов с C-концевым глицином из-за отсутствия хиральности у этой аминокислоты.

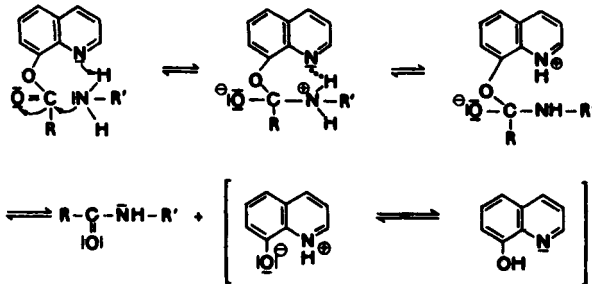
3. *Использование азидного метода.* Азидная конденсация безопасна в отношении рацемизации при условии отсутствия избытков трет-основания

и поддержания низких температур реакции (разд. 2.2.5.1). Отсутствие рацемизации объясняется электростатической стабилизацией азидной группировки N-ациламинокислоты.

4. *Применение метода Уги.* Преимущество метода четырехкомпонентной конденсации (разд. 2.2.5.6) состоит в том, что в отличие от обычных методов конденсации активированные производные пептидов не рацемизируются.

5. *Применение активированных эфиров, амиолиз которых протекает через переходное состояние, стабилизированное водородными мостиками.* Хотя в этом случае при реакциях конденсации нет полной гарантии отсутствия азлактонов, рацемизация либо не идет, либо идет в ничтожной степени.

В 1965 г. были предложены для пептидного синтеза N-гидроксипиперидиновые и 8-хинолиловые эфиры (разд. 2.2.5.3). Это активированные эфиры с новым механизмом действия, который показан на примере 8-хинолилового эфира [262]:



Благодаря слабому активированию С-атома карбоксила образование азлактона исключено или сильно затруднено. Повышенная скорость амиолиза объясняется промежуточным образованием циклического переходного состояния. Аналогичный реакционный механизм предлагается [362] также в случае активирования реагентом Кемпа [7-гидрокси-2-этил-(бензо-1,2-оксазолиний)-тетрафтороборат]. 2-Гидроксиэтиламинокарбонилфениловый эфир N-ациламинокислоты получается с этим реагентом без рацемизации.

6. *Карбодимидный метод с добавками* (разд. 2.2.5.4.3) принадлежит к наиболее часто применяемым методам конденсации. Гудман и сотр. [363, 364] провели исследование N-гидроксисоединений на снижение степени рацемизации в случае оптически активных пептидазлактонов, полученных при действии ДЦГК. Согласно этим исследованиям, азлактонное кольцо может размыкаться без рацемизации при действии вицинальных бифункциональных нуклеофилов (так называемых α-нуклеофилов или 1,2-динуклеофилов), в особенности производных гидросиламина или гидразина, при условии, если:

- 1) их нуклеофильность больше, чем их основность;

- 2) при присоединении к азлактону может образоваться дополнительная циклическая система с водородным мостиком у O-атома карбонила;
- 3) нуклеофильный центр располагает отщепляемым протоном.

Стабилизация азлактона и последующее размыкание кольца без рацемизации с образованием N-гидроксисукцинимидного эфира ациламинокислоты демонстрируется на примере гидроксисукцинимида:



Относительно кислые гидроксисоединения оказывают влияние на основность реакционной среды, препятствуя образованию N-ацилмочевины, а также снижают тенденцию к рацемизации образующегося азлактонного кольца. Хорошо действуют в качестве добавок кислоты Льюиса, в особенности хлорид цинка [320], хотя они не могут образовывать способный к аминолиту промежуточный продукт, как в случае производных N-гидроксиламина. Все эти добавки существенно снижают рацемизацию при размыкании азлактонного кольца эфиром аминокислоты. Это было показано на примере синтеза Z-Pro-Val-Pro-OMe из соответствующего оптически активного азлактона и Pro-OMe. Наблюдаемый эффект объясняется как каталитическим влиянием на скорость размыкания кольца, так и понижением рацемизации азлактона вследствие снижения основности реакционной среды.

Наряду с приведенными возможностями снижения рацемизации, вызванной образованием кольца азлактона, известны также методы конденсации, такие, как метод смешанных ангидридов (разд. 2.2.5.2.1), которые при соблюдении определенных условий реакции проходят практически без рацемизации.

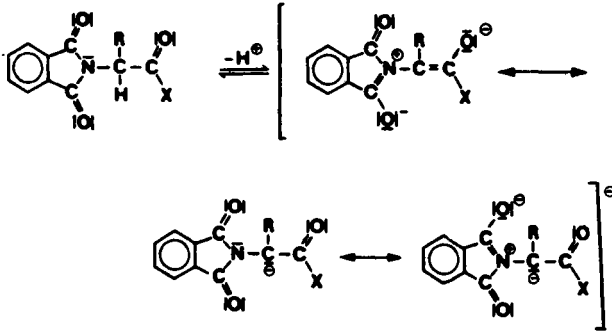
Подробно ознакомиться с проблемой рацемизации можно по прекрасным обзорам Янга [365] и Гудмана [357].

### 2.2.6.1.2. Рацемизация при прямом $\alpha$ -депротонировании

На устойчивость  $\alpha$ -C—H-связи аминокислот сильно влияет характер заместителей. Особенно легко при катализе основаниями рацемизируются активированные эфиры N <sup>$\alpha$</sup> -бензилоксикарбониламинокислот, имеющие  $\beta$ -заместители, оттягивающие электроны. Рацемизация через азлактоны в этом случае исключена. Предполагается [366], что в таких случаях рацемизация протекает путем прямого  $\alpha$ -депротонирования, причем возникающий карбанион мезомерно стабилизируется. Механизм  $\beta$ -элиминирования и обратного присоединения, который первоначально постулирован для рацемизации 4-нитрофенилового эфира N-бензилоксикарбонил-S-бензил-L-цистеина, был опровергнут исследованиями Ковача и др. [367]. Изучение

других активированных эфиров этой замещенной аминокислоты привело к гипотезе [369], что в данном случае следует говорить об изорацемизации [368].

Рацемизация активированных эфиров N-фталиламино кислот также объясняется прямым отрывом протона [370]:



Вызываемая основаниями рацемизация азидов N-ацилпептидов протекает по аналогичному механизму [357].

### 2.2.6.2. Определение степени рацемизации

Степень рацемизации при конденсации и стерическую однородность полученного пептида нельзя ставить в непосредственную связь друг с другом. Так, к примеру, считают, что процесс протекает без рацемизации, если в результате операций очистки происходит более или менее полное разделение стереоизомеров. Из большого числа описанных тестов рацемизации ясно, что идеального метода определения рацемизации нет. Все химические тесты испытываются на модельных пептидах. Поэтому распространение полученных результатов на огромное множество пептидных последовательностей, полученных из 20 протеиногенных аминокислот, по меньшей мере спорно. За неимением лучших методов новые методы сочетания следует испытывать на нескольких различных модельных системах.

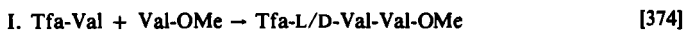
1. *Тест Андерсона — Каллагана* [371]. В случае модельного пептида Z-Gly-Phe-Gly-OEt (пептид Андерсона), полученного из Z-Gly-Phe-OH и Gly-OEt, можно разделить стереоизомеры образовавшегося рацемата фракционной кристаллизацией. Чувствительность определения степени рацемизации 1—2%.

2. *Тест Янга* [372]. Для этого поляриметрического метода в качестве модельного пептида вначале использовался Ac-Leu-Gly-OEt. Лучшими свойствами обладает эфир дипептида Bz-Leu-Gly-OEt, полученный из Bz-Leu-OH с Gly-OEt. Долю оптически чистого соединения можно рассчитать из значений удельного вращения неочищенного продукта реакции. После омыления эфира можно дополнительно определить количество DL-пептида фракционной кристаллизацией. Чувствительность также 1—2%,

причем, однако, по сравнению с тестовым пептидом Андерсона—Каллага на склонность к рацемизации у этого пептида в десять раз выше.

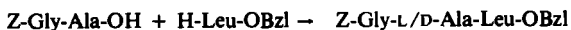
3. *Тест Кемпа* [373] разработан на основе тестовых систем Андерсона или Янга Кемпом и сотр. Благодаря применению техники изотопного разбавления чувствительность определения степени рацемизации намного повышена и составляет  $\sim 0,001$ —1%.

4. *Тест Вейганда* [374], основанный на газохроматографическом разделении стереоизомеров метилового эфира N-трифторацетилдипептида, разработан в трех вариантах, которые различаются модельными пептидами:



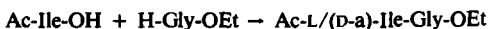
Согласно второму варианту, после отщепления защитных групп трифторуксусной кислотой в анизоле при частичном гидролизе трипептида получают Phe-Val. Его этерифицируют (HCl/метанол), затем получают трифторацетильное производное с помощью метилового эфира трифторуксусной кислоты. Соотношение диастереоизомеров Tfa-L/D-Phe-Val-OMe, определенное газохроматографическим анализом, дает степень рацемизации. Вариант III подкупает простотой исполнения. Чувствительность  $\sim 0,1$ —1%.

5. *Тест Изумия* [377]. Для этого теста используется модельная система:



Диастереоизомеры, полученные при отщеплении защитной группы гидролизом, разделяются ионообменной хроматографией и после окрашивания нингидрином определяются количественно. Чувствительность  $\sim 0,1$ —1%.

6. *Тест Бодански* [378]. Модельной реакцией для этого метода служит



После полного гидролиза полученного дипептида количественно определяют D-алло-изолейцин и изолейцин на автоматическом анализаторе. Чувствительность  $\sim 0,1$ —2%.

7. *Тест Гальперна — Вайнштейна* [379]. С помощью сигналов метильной группы аланина в спектре ЯМР можно провести определение степени рацемизации без разделения стереоизомеров:



Различный химический сдвиг метильной группы аланина у LL-пептида по сравнению с LD-изомером делает возможным определение DL-пептида. Чувствительность  $\sim 3\%$ .

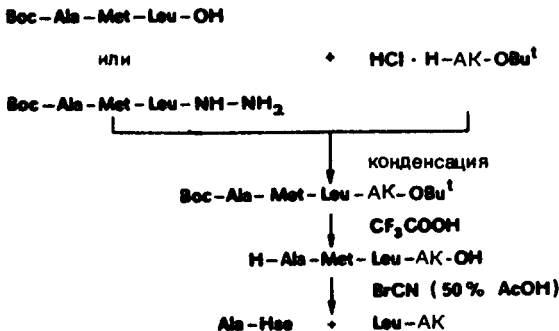
Используя сателлитный сигнал  $^{13}\text{C}$ -H LL-пептида в качестве внутреннего стандарта, можно при низком содержании DL-изомера повысить чувствительность в 10 раз [380].

8. Тест Бергера — Шехтера — Босхарда [381, 382]. После синтеза тестового пептида



и отщепления защитных групп гидролизом получается изомерная смесь LDLL/LLLL. При инкубации с лейцинаминопептидазой энзиматически расщепляются полностью только L-изомеры. L-Аланин определяется количественным аминокислотным анализом и соответствует учетверенному значению степени рацемизации, происшедшей у C-концевого D-аланина карбоксикомпонента. Этот тест относится к наиболее чувствительным методам определения рацемизации.

9. Тест Фуджино [387]. Тестовая система основана на взаимодействии Вос-Ala-Met-Leu-OH с *трет*-бутиловыми эфирами лейцина, изолейцина или же с  $\beta$ -*трет*-бутиловым эфиром аспарагиновой кислоты с последующим расщеплением бромцианом и определением соотношения диастереомеров при помощи аминокислотного анализатора:



Таким образом, можно разделить L- и D-изомеры H-Leu-AK-OH (AK = Leu, Ile, Asp). С помощью этой тестовой системы можно изучать влияние аминоконента на степень рацемизации. Оказалось, что Asp(OBu<sup>t</sup>) способствует рацемизации сильнее, чем Leu или Ile, даже в отсутствие гидрохлорида триэтиламина. Результаты представлены в табл. 2-8.

На примере карбодимидного метода с добавкой N-гидрокси-5-нонборнен-2,3-дикарбоксимида, было изучено влияние различных растворителей при конденсации фрагментов. Результаты этого исследования показали, что системы ДМФ — ДМСО (1:1), N-метилпирролидон (НМП) — пиридин и ДМФ — H<sub>2</sub>O (7:3) не подходят для фрагментной конденсации. Предпочтительной по сравнению с другими растворителями оказалась система ДМФ — НМП (1:1).

Наряду с приведенными методами определения рацемизации в литературе описаны другие тестовые системы, на которых, однако, нет возможности останавливаться. В заключение можно только добавить, что недопу-



Таблица 2-8. Степень рацемизации, определенная с помощью различных тестов [387]

Метод (в ДМФ)	Температура, °C	Степень рацемизации (%) на различных модельных системах <sup>a</sup>		
		Leu-Ile	Leu-Leu	Leu-Asp
ДЦГК/HONB	0	0,7	1,5	3,42(6,0)
ДЦГК/HONSu	0	1,6	2,9	9,24
ДЦГК/HOVi	0	0,7	1,9	9,1
ДЦГК	0	8,7(8,0)	9,3(4,6)	14,8(20,1)
ЭЭДХ	0	0,7	1,2	9,1
Мухаяма	0	19,8(9,6)	26,5(13,5)	11,7
Азидный (Рудингер)	-30	1,3	2,3	8,03
Азидный (без выделения)	-15	4,2	4,5	7,02
Азидный (с выделением)	-15	1,6	2,7	5,5
СА	-20	3,9	—	—
С пепсином (в 30%-ном MeOH)		1,6	—	—
Ступенчатое наращивание		0,8	—	—

<sup>a</sup> В присутствии 1 г-экв. гидрохлорида триэтиламина; в скобках приведены данные, когда аминокомпонент вводился в виде свободного основания.

стимо обобщать результаты, полученные с помощью только одной тестовой системы. Это подтверждают исследования Фуджино и сотр. с различными аминокомпонентами. Бенойтон и сотр. [388] исследовали зависимость рацемизации от последовательности фрагмента с помощью серии модельных пептидов. Им удалось показать, что степень рацемизации определяется не только характером активированной С-концевой аминокислоты. Аминокислотный остаток, стоящий перед ней, а также, как было установлено еще Фуджино, N-концевая аминокислота аминокомпонента оказывают решающее влияние на рацемизацию.

### 2.2.7. Пептидные синтезы на полимерных носителях

В 1962 г. Меррифилд [389] разработал новую стратегию химического синтеза пептидов и белков, которая, как и биосинтез белка, протекает на второй фазе. Правда, еще в 1955 г. Николс [390] сообщил о методе, согласно которому аминокислота, фиксированная на ионообменнике посредством четвертичных аммониевых групп, соединяется после смены растворителя со второй аминокислотой, находящейся в растворе, образуя производное дипептида. Все же следует признать огромную важность открытия Мерри-

филдом пептидного синтеза на полимерных носителях с ковалентным присоединением.

Удивительно простая идея этого нового метода синтеза состоит в том, что аминокислота закрепляется через свою карбоксильную группу на нерастворимом легко фильтруемом полимере, и затем пептидная цепь постепенно наращивается с С-конца. Для этой цели N-замещенные аминокислоты вводят в реакцию с реакционноспособными группами полимерной смолы. С аминокислоты, ковалентно соединенной с полимерной частицей, удаляется N-защитная группа, и полученный аминоацильный полимер реагирует со следующей N-защищенной аминокислотой. Пептидная цепь ступенчато наращивается на полимерной матрице. На последней стадии синтеза Меррифилда расщепляется ковалентная связь между С-концевой аминокислотой построенной полипептидной цепи и якорной группировкой полимерного носителя. Нерастворимый носитель может быть отделен от находящегося в растворе полипептида простым фильтрованием. Решающее преимущество метода Меррифилда состоит в том, что избегают трудоемких и требующих много времени операций по очистке промежуточных продуктов. Ценный продукт реакции все время остается прикрепленным к полимерному носителю, в то время как избытки реагентов и побочные продукты удаляются фильтрованием. Простота эксперимента и возможность автоматизации привели сначала даже к мнению, что благодаря этой новой синтетической концепции будет, наконец, решена проблема химического синтеза ферментов и других белков. Однако после подробного изучения и интенсивной разработки этой новой техники синтеза были выявлены серьезные лимитирующие факторы, которые впоследствии привели к реалистической оценке этого метода. Конечно, сведение трудных стадий высаживания и очистки при обычных методах в растворе к простому процессу фильтрования в твердофазном синтезе уже означает неоспоримое преимущество.

Однородные продукты реакции получают только в том случае, если как конденсация, так и деблокирование протекают практически количественно. Так как эти требования не всегда выполнимы, то на носителе накапливаются примеси. Поэтому после снятия пептида с носителя требуется тщательная очистка конечного продукта. Отмена очистки промежуточных продуктов в случае синтеза Меррифилда, декларированная вначале как удобства, оказалась впоследствии сомнительным преимуществом.

Дальше наряду с методом Меррифилда будут обсуждаться некоторые методы на основе этой же концепции.

#### 2.2.7.1. *Синтез пептидов на твердой фазе (синтез Меррифилда)*

Хотя все описанные методы пептидного синтеза с применением нерастворимых или растворимых полимерных носителей основаны на главном принципе, введенном Меррифилдом, понятие «синтез Меррифилда» следует употреблять специально для пептидного синтеза с твердыми носителями. По причине громадного количества работ, появившихся с 1963 г., полный

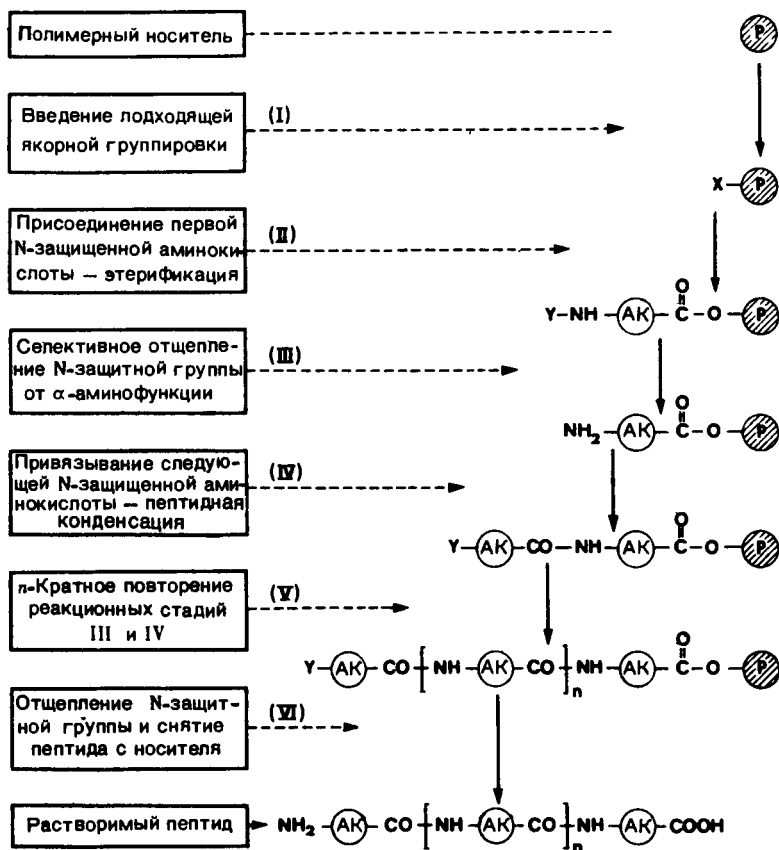


Рис. 2-12. Схема синтеза Меррифилда.

обзор литературы в рамках этой книги невозможен. Поэтому следует указать на обзоры [391—395] и специальную монографию [396], в которых подробно описана техника работы. Правда, в этой литературе отсутствует критическая оценка метода [397, 398]. Принцип метода Меррифилда схематически приведен на рис. 2-12.

В качестве полимерного носителя наиболее подходит сополимер полистирола с 2% дивинилбензола (ДВБ), хотя предлагались и другие. Сшивка с 1% ДВБ благодаря более высокой набухаемости особенно подходит для синтеза длинноцепочечных полипептидов.

Шарики смолы, полученные бисерной полимеризацией, имеют диаметр 20—100 мкм. После набухания в органических растворителях, применяемых для пептидного синтеза, они становятся проницаемы для реагентов.

Авторадиографические исследования показали, что образующиеся полипептидные цепи равномерно распределяются внутри полимерных зерен (рис. 2-14). Эти данные противоречат мнению, по которому реакции должны протекать только на поверхности носителя. Вычислено, например, что в зернышке полистирол/1% ДВБ диаметром 50 мкм при степени замещения 0,3 ммоль/г могут разместиться  $\sim 10^{12}$  пептидных цепей небольшого белка.

Полимерный носитель должен быть химически инертен, совершенно нерастворим в применяемых растворителях и легко фильтруем. Этим требованиям удовлетворяет классический носитель Меррифилда. Несмотря на это, были испробованы многие другие типы носителей. Недостатки большинства носителей — недостаточная механическая прочность, низкая емкость, значительная сольватация самого носителя и растущей цепи пептида и др. Появились модифицированные полистирол/ДВБ-носители, кроме того, изучались также и другие полимеры.

Для того чтобы в значительной мере исключить влияние диффузии при гетерогенных реакциях на полимерном носителе, предлагались разные типы носителей, которые допускают только реакции на поверхности, например ненабухающий сополимер стирола и дивинилбензола с высокой степенью сшивки и макропористый носитель с твердой матрицей, но большой внутренней поверхностью — так называемые «пленочные» или «щеточные» смолы.

Пленочный, или пелликулярный, носитель [399] был получен полимеризацией тонкого слоя смолы на поверхности инертных стеклянных шариков. Такой носитель имеет низкую механическую прочность и поэтому применим только для колоночных

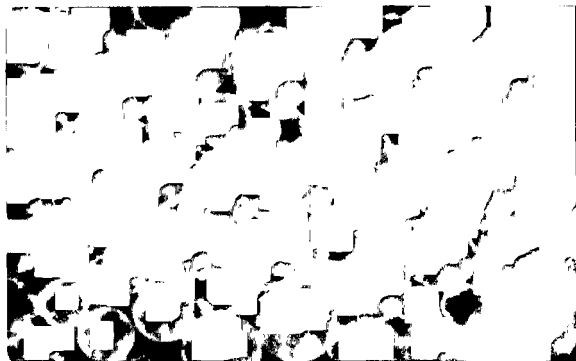


Рис. 2-13. Фотография зерен полистирола с 1% ДВБ [467].

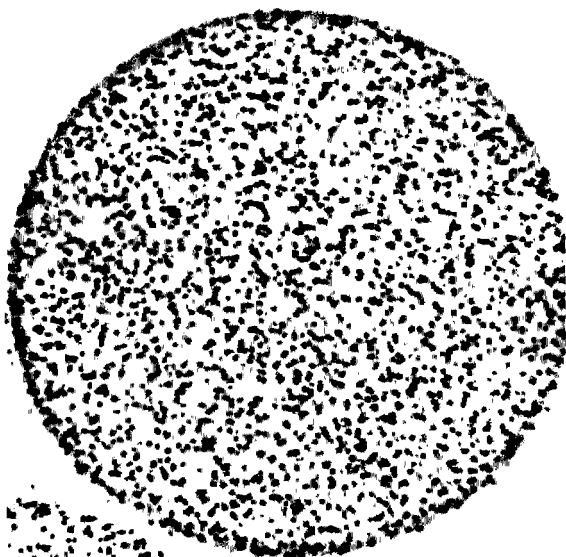
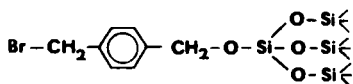


Рис. 2-14. Автодиаграмма пептидов, меченных  $H^3$ , в зернах полистирола с 1% ДВБ [467].

методов. Для последних предложены также щеточные смолы, у которых функциональные группы «торчат» наружу, как щетина у щетки [400].



Пробовали применять также полимеры в форме лент, пленки, волокна (особенно для автоматических методов). Недостатком носителей такого типа является их низкая емкость.

Согласно Шеппарду [401], различные лимитирующие факторы синтеза Меррифила можно объяснить различием полярностей углеводородной основы полимерной матрицы и растущей на носителе пептидной цепи (рис. 2-15).

На рис. 2-15, *a* схематически изображается идеальное расположение. Обычно применяемая полистирольная матрица неполярна и набухает в неполярных растворителях ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  и др.), в то время как полярная пептидная цепь в этих условиях сжимается (*b*). В полярных растворителях (в ледяной уксусной кислоте, ДМФ, спир-

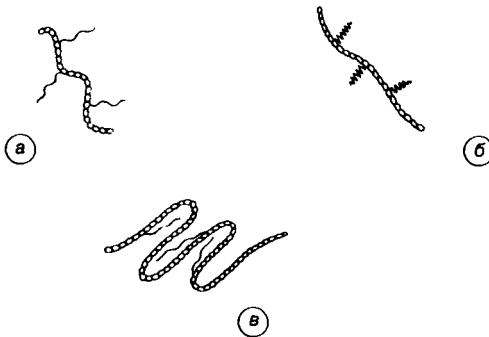


Рис. 2-15. Поведение привязанной к носителю полипептидной цепи в растворителях различной полярности [401].

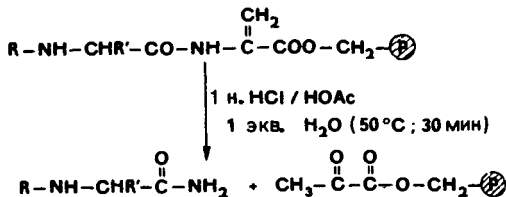
тах и др.) матрица носителя сжимается, причем сольватированные короткие пептидные цепи могут оказаться зажатыми (в).

Для разрешения этой проблемы был предложен сетчатый полиакриламидный носитель [402], и для синтезов применяли полярный растворитель.

Вообще свойства обычного полимера Меррифилда меняются с ростом пептидной цепи. При нормальной емкости 0,1—0,5 ммоль/г уже после присоединения 13 остатков аминокислот масса носителя повышается примерно в 2 раза. Более 50% пептидилсмолы состоит теперь из пептида, что заметно влияет на набухаемость в неполярных растворителях. Добавкой ДМФ или мочевины можно в некоторых случаях улучшить свойства системы.

*Введение подходящих «якорных» группировок* (1, рис. 2-12) в полимерный носитель нужно для ковалентного связывания первой аминокислоты. Классической якорной группой является хлорметильная, которая может сравнительно легко вводиться хлорметилированием полистирол/ДВБ-смолы по Фриделю — Крафтсу в присутствии хлорида олова(IV) [403]. Некоторые якорные группы приведены на рис. 2-16 [404]. (Выбраны группы, для которых достаточно исследовано отщепление защищенного фрагмента пептида от полимерного носителя.)

Наряду с этим развивались другие направления синтеза на полимерных носителях; приведем несколько примеров. Согласно Гроссу и сотр. [414], в качестве якорной группировки для синтеза пептидов с С-концевыми амидными группами годится дегидроаланин:



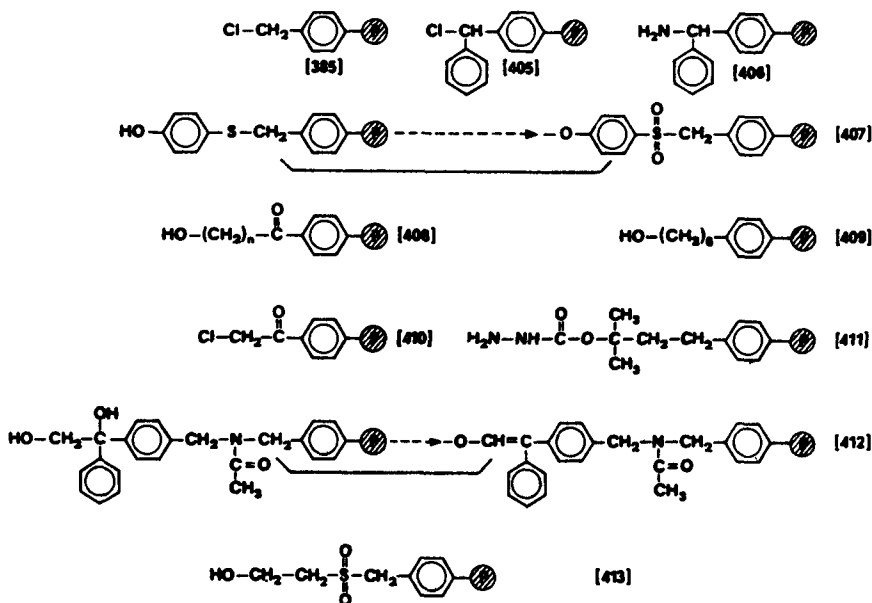
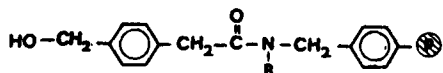
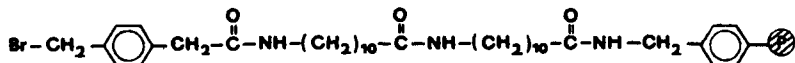


Рис. 2-16. Якорные группировки для синтеза Меррифилда [404].

Большое практическое значение имеют такие якорные группировки, которые снижают потери пептида при катализируемом кислотой отщеплении  $\text{N}^\alpha$ -защитных групп. Такими свойствами обладает 4-(гидрокси-метил)-фенилацетидамоалкильная группировка ( $\text{R} = \text{H}$  или  $n\text{-C}_6\text{H}_{13}$ ) [415, 416]:



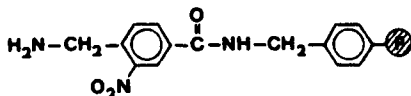
Однако отщепление пептида от носителя в этом случае возможно только с помощью  $\text{HF}$ . Что касается повышения выхода при твердофазном синтезе пептидов, то оказалось, что более длинные группировки между С-концевой аминокислотой и полимерным носителем оказывают положительное влияние, например [417]:



Многообразие якорных группировок объясняется постоянными усилиями исследователей разрешить проблемы твердофазного синтеза. Всеобъемлющий обзор даже только наиболее важных работ здесь едва ли возможен.

В заключение рассмотрим *фотолитическое отщепление* пептидов после синтеза; метод основан на использовании особых якорных группировок, а также так называемого принципа безопасной «ловушки».

Так, люлиберин был синтезирован аналитически чистым (выход 65%) на носителе с 3-нитро-4-аминометилбензоиламидной группой, которая делает возможным фотолитическое снятие пептида при 350 нм [418]:



Этот мягкий метод отщепления, который дает пептиды с С-концевыми амидными группами, приводит к высоким выходам также в случае пептидов со стерически затрудненными концевыми аминокислотными остатками. Фотолиз  $\alpha$ -метилфениловых эфиров был перенесен и на твердофазный синтез [419]. Фотолитические методы отщепления позволяют проводить снятие защищенных пептидных фрагментов.

Основываясь на фотолабильных якорных группировках, Меррифилд разработал так называемую «ортогональную» концепцию защит для твердофазного пептидного синтеза [420]. С этой целью вводятся защитные группы различных типов, которые могут селективно отщепляться при действии разных реагентов.

В условиях отщепления защитных групп одного класса остальные защитные группы совершенно устойчивы, так как их механизмы отщепления различны (рис. 2-17). В то время как защитные группы боковых цепей могут отщепляться ацидолизом, а якорная группа — фотолизом, устойчивая в этих условиях *дитиосульфонильная* группа (Dts) может отщепляться тиольным реагентом (мягкое восстановление).

Требование полной устойчивости во время пептидного синтеза и мягкого отщепления после его окончания практически трудновыполнимы для связи пептид-носитель. Теоретически кажется, что этим требованиям, скорее всего, может удовлетворить носитель с так называемой группой «безопасного захвата». При этом используют якорную связь, которая совершенно устойчива в условиях синтеза, а после него может легко отщепляться в

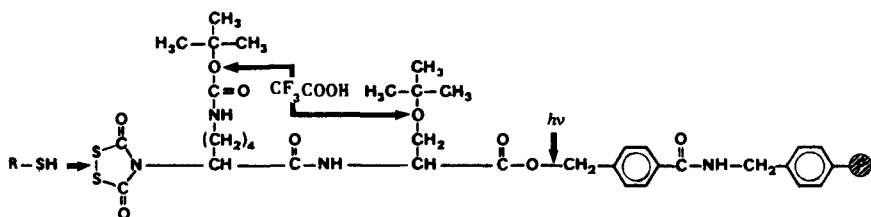
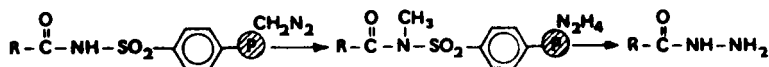


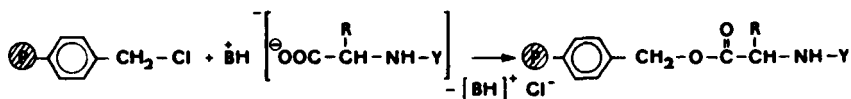
Рис. 2-17. Принцип ортогональных защит по Меррифилду [420].



мягких условиях. Так, например, ацилсульфонамидная связь совершенно устойчива к трифторуксусной кислоте или к НВг в уксусной кислоте, а после N-метилирования может отщепляться в мягких щелочных условиях ( $N_2H_4$ , NaOH,  $NH_3$ ) [421]. Этот принцип лежит в основе многих работ.

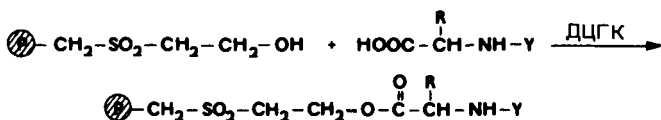


Присоединение первой аминокислоты (II, рис. 2-12) может происходить с образованием эфирной, гидразидной или амидной связи. В большинстве случаев используется образование эфирной связи:



Этерификация хлорметилированных смол происходит в этаноле, ТГФ, бензоле и др. при нагревании до кипения (24—50 ч), причем выходы невелики — 14—50%. Применение гидроксида тетраметиламмония вместо триэтиламина приводит к более высокой степени этерификации и, кроме того, препятствует образованию четвертичных аммониевых групп на носителе [422].

Гидроксиметилированный носитель дает возможность присоединять исходную N-замещенную аминокислоту с помощью N,N-карбонилдиимдазола [423]. 2-Гидроксиэтилсульфонилметилированный полимер («β-сульфовая смола»), предложенный Тессером и Элленброеком [424], позволяет присоединять первую аминокислоту с помощью мягких методов образования пептидной связи, как, например, посредством дициклогексилкарбодимида.



По окончании синтеза пептид снимается с носителя β-элиминированием в мягких щелочных условиях.

Наряду с приведенными примерами описаны многие другие варианты присоединения исходных аминокислот [391—396].

После присоединения к носителю первой N-защитенной аминокислоты все остальные операции проводятся в специальном стеклянном реакторе, снабженном пористой пластинкой, приспособлением для отсасывания и тубусом (рис. 2-18).

Для перемешивания предлагались различные способы встряхивания реакционного сосуда. Процесс можно вести и вручную, и автоматизировать, применяя доступный продажный «синтезатор» (см. ниже). Перед началом синтеза необходимо аналитически определить количество присоединенной аминокислоты. Практически достаточно содержания 0,1—0,5 ммоль ами-

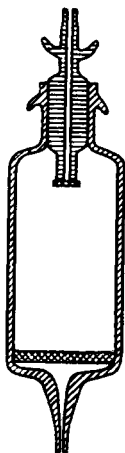


Рис. 2-18. Реакционный сосуд для синтеза Меррифилда.

нокислоты на грамм смолы. Данные по содержанию аминокислоты в смоле необходимы для дозирования реагентов, а также используются при определении выходов.

*Селективное отщепление  $N^\alpha$ -замещенной группы* (III, рис. 2-12) — следующая ступень синтеза Меррифилда. Выбор  $N^\alpha$ -аминозащитной группы зависит как от прочности связи между исходной аминокислотой и полимерным носителем, так и от защитных групп на функциях боковых цепей. Требования к защитным группам, применяемым в твердофазном синтезе, особенно велики в отношении селективности отщепления.

Приемлемой оказалась комбинация  $N^\alpha$ -*трет*-бутилоксикарбонильной группы с блокированием функций боковых цепей на основе бензильной группы. Для отщепления *Вос*-группы применяются 1 н. HCl в уксусной или в муравьиной кислоте, 4 н. HCl в диоксане и трифторуксусной кислоте, а также раствор трифторуксусной кислоты в дихлорметане, 98%-ная муравьиная кислота и т. д.

Ввиду опасности частичного деблокирования  $N^\omega$ -бензилоксикарбонильных групп лизина и орнитина или бензильного остатка тирозина комбинация их с  $N^\alpha$ -*Вос*-группой не рекомендуется.

Гораздо более устойчивы различные замещенные бензилоксикарбонильные остатки (разд. 2.2.4.1.1.1). В условиях деблокирования  $N^\alpha$ -*Вос*-группы с помощью трифторуксусной кислоты в дихлорметане (1:1) достаточно устойчивыми оказались  $\omega$ -бензиловые эфиры аспарагиновой и глутаминовой кислот, а также *О*-бензиловые эфиры треонина и серина. Еще более кислотолабильную  $N^\alpha$ -*Врос*-группу (табл. 2-1) можно применять для твердофазного синтеза в комбинации с защитными группами боковых функций на основе *трет*-бутиловых эфиров.

Само собой разумеется, можно использовать N<sup>α</sup>-аминозащитные группы, отщепляемые при фотолизе. Хорошей комбинацией защитных групп является Fmoc-группа для α-аминовой функции и защиты третичнобутильного типа для боковых цепей [425, 426]. Fmoc-группа отщепляется в мягких основных условиях, например, с помощью 50%-ного пиперидина в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

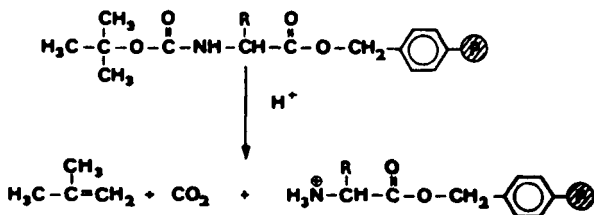
Защита имидазольного азота гистидина — так же как и при синтезе в растворе — представляет серьезную проблему. Применение N<sup>1m</sup> бензильной группы вызывает трудности при отщеплении, так как действие натрия в жидком аммиаке далеко не щадящий метод и может затрагивать также имидазольное кольцо. Другая возможность защиты — тозилльная группа, но она требует для отщепления обработки жидким фтороводородом.

Гуанидиновая группа аргинина может блокироваться нитрованием или тозилрованием. Последний метод, очевидно, предпочтительнее, так как тозилный остаток может быть удален как посредством HF, так и с помощью расщепления бортрис-(трифторацетата) [427]. В случае нитроаргинина существует опасность расщепления с образованием орнитина. Все еще недостаточно решена проблема защиты цистеина при твердофазном синтезе, хотя перепробовано множество вариантов. Амидные группы глутамина и аспарагина целесообразно защищать. Общеизвестные побочные реакции при применении многофункциональных аминокислот, такие, как, например, транспептидация в случае аспарагиновой кислоты или образование пирролидон-5-карбоновой-2 кислоты с глутамином, представляют опасность также и в случае синтезов Меррифилда.

Окислительная лабильность триптофана в условиях ацидолитического отщепления N<sup>α</sup>-аминозащитных групп требует добавки 2-меркаптоэтанола, дитиотрейтола или другого подходящего восстановителя. Требуются также новые защиты для тиозфирной функции метионина, так как применение в качестве защитного производного сульфоксида не представляет собой оптимального варианта.

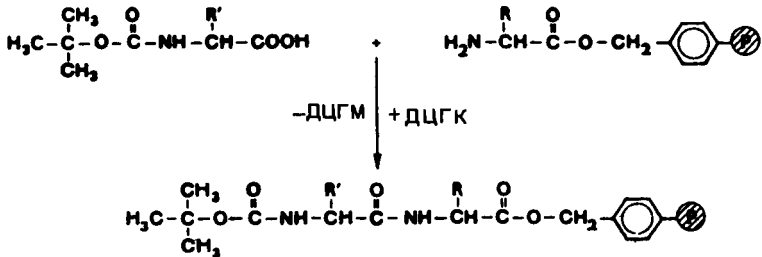
Описанная проблематика защитных групп при твердофазном пептидном синтезе показывает, что различные лимитирующие факторы метода Меррифилда тесно связаны с указанными неразрешенными (или же недостаточно разрешенными) вопросами. Совокупность этих проблем не может здесь подробно обсуждаться, поэтому желающие отсылаются к литературным источникам [391—396, 420].

После удаления ацидолизом наиболее часто используемой N<sup>α</sup>-Fmoc-группы получается протонированная аминная функция.



Аминогруппа освобождается с помощью триэтиламина в хлороформе, ДМФ или  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , и ее содержание определяется количественно титрованием элюированного с триэтиламином иона хлора.

Для присоединения следующей *N*-защищенной аминокислоты (IV, рис. 2-12) были испробованы почти все известные методы образования пептидной связи, исключая азидный. Наиболее применимым до сих пор оказался ДЦГК-метод (разд. 2.2.5.4).



Согласно Ребеку [428], ДЦГК-конденсация в условиях твердофазного синтеза протекает через стадию симметричного ангидрида, в то время как в гомогенной фазе в качестве промежуточного соединения доминирует *O*-ациллактим. Образующаяся дициклогексилмочевина препятствует диффузии внутрь набухшей смолы. Из этих соображений предложен метод Хагемейера [429], по которому сначала из Вос-аминокислоты и ДЦГК (в соотношении 2:1) получают активированное производное в растворе и после отделения дициклогексилмочевины вводят его в реактор.

Главная проблема синтеза Меррифилда состоит в том, чтобы все реакции ацилирования и деблокирования проводить количественно. Так как это требование при гетерогенных реакциях не всегда выполнимо, происходит образование *ошибочных последовательностей* или *неполных последовательностей* [430, 431] (рис. 2-19).

При синтезе пентапептида А—В—С—D—Е в случае неполной конденсации можно получить четыре неполные и три ошибочные последовательности. Последние получаются, если неполные последовательности ацилируются с пропуском одного или нескольких остатков аминокислот. Наряду с этим об *ошибочных пептидах* говорят и в случае, когда при правильной последовательности аминокислот происходит ацилирование по функциям боковых цепей (при частичном доблокировании третьей функции) или при других изменениях у третьих функций. Отделение этих загрязняющих пептидов после окончания твердофазного синтеза крайне затруднительно. Поэтому нужно использовать все возможности, чтобы реакции в гетерогенной фазе проходили количественно. Для этого вводят большие избытки ацилирующего средства, которые в случае стерически затрудненных аминокислот часто составляют 6 г-экв. В других случаях работают с 3—4 г-экв. и повторяют реакцию конденсации один-два раза. В таких условиях аминокислотное ацилирование проходит с высоким выходом [432].

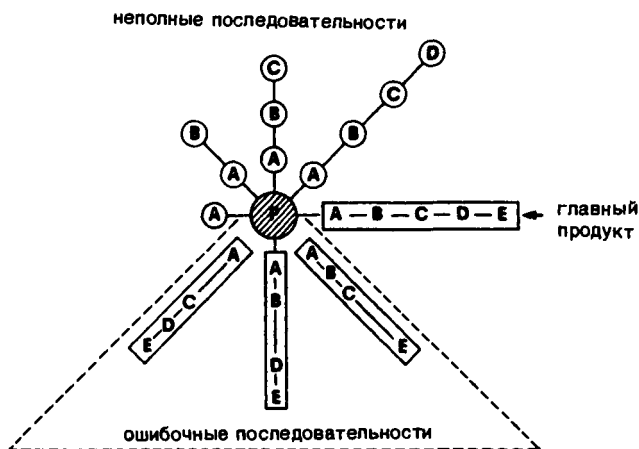


Рис. 2-19. Неполные и ошибочные последовательности.

При синтезе аналога цитохрома с (104 аминокислотных остатка) для присоединения последних 45 аминокислот избытки ацилирующих реагентов доходили до 30- и 70-кратных, а время конденсации увеличивали до 24 ч. В то же время Анфинсен и сотр. [433] описали синтез брадикинина с 10-кратным избытком ацилирующего агента, причем время реакции ограничивалось 3 мин, и для синтеза нонапептида понадобилось меньше 5 ч. Экономически такой избыток защищенной аминокислоты едва ли может быть оправдан, тем более что обратное получение ее в случае применения ДЦГК-метода затруднительно из-за образования N-ацилмочевины.

Чтобы обойти эти трудности, метод был модифицирован [434, 435]: N-защищенные аминокислоты ионогенно фиксируются на свободных аминогруппах носителя перед добавкой ДЦГК; избыток нефиксированных N-защищенных аминокислот можно вернуть промыванием дихлорметаном. Легко вымываются активированные эфиры. Для синтезов Меррифила применялись различные типы эфиров. Правда, они требуют значительно большего времени реакции, чем конденсация по ДЦГК-методу [436]. Другие методы активирования, включая их различные варианты, тоже не столь эффективны, как ДЦГК-метод.

*Определение степени превращения* в случае твердофазного пептидного синтеза имеет большое значение для ведения процесса. Сравнительно простые различные титриметрические методы, как, например, метод Дормана [437], согласно которому после предварительного протонирования непрореагировавших аминогрупп пиридин-гидрохлоридом или пиридин-гидробромидом [438] галогенид элюируется триэтиламином и определяется в элюате. Другой метод — прямое титрование непрореагировавших аминогрупп 0,1 н.  $\text{HClO}_4$  [439]. Наряду с этим разрабатывались различные цветные реакции (с нингидрином, флуорескамином и др.) для контроля полноты

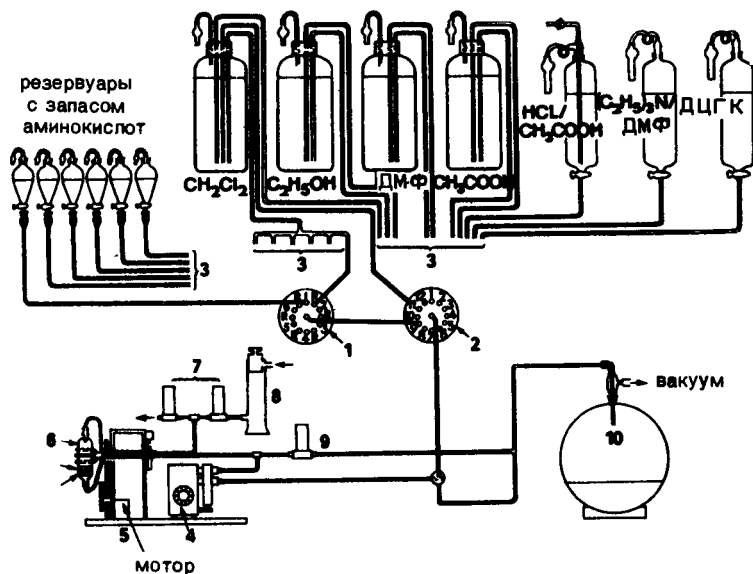


Рис. 2-20. Схема первого «синтезатора» Меррифилда [440].

протекания реакции конденсации. Было предложено относительно много аналитических методов [391—396], однако трудно указать среди них идеальный.

Если посредством названных аналитических методов установлено, что, несмотря на многократные повторения реакции конденсации, ацилирование протекает не полностью, то на следующих стадиях будут неизбежно получаться неполные и ошибочные последовательности. Чтобы сделать возможным более легкое отделение этих нежелательных пептидов, после реакции конденсации проводится ацилирование такими реагентами, как *N*-ацетилимидазол, ангидрид 3-нитрофталево́й кислоты и др. При этом, однако, количественное блокирование представляется едва ли возможным вследствие низкой диффузии реагентов.

После *n*-кратного повторения реакционных стадий III и IV (рис. 2-12) желаемая пептидная последовательность строится на полимерном носителе на стадии V. Несмотря на указанные недостатки, твердофазный пептидный синтез открыл новые возможности для автоматизации. Первый аппарат был сконструирован Меррифилдом и сотр. [440] (рис. 2-20).

Этот «синтезатор» состоит из двух главных частей: системы контроля и системы реактора. Система реактора включает реакционный сосуд, набор вентиляей для подачи растворителей и реагентов, а также резервуары для этих жидкостей. Встряхивающее устройство для реакционного сосуда, а также различные вентили и насосы управляются программирующим устройством.

Этот классический аппарат положен в основу улучшенных моделей с дальнейшей автоматизацией. Брунфельдт и сотр. [441] разработали прототип первой коммерческой модели компании Schwarz/Mann (Оранджберг, шт. Нью-Йорк). Теперь в продаже имеется много приборов различных компаний (Beckmann-Spinco Instruments, Inc., Palo Alto, Калифорния; Vega Engineering Comp., Аризона; Chemtrox Corporation, Рочестер, шт. Нью-Йорк и т.д.). Первая коммерческая модель «синтезатора» изображена на рис. 2-21. Следует отметить дальнейшее усовершенствование реакционного сосуда. Наряду с испытанной моделью с встряхиваемым сосудом описаны системы, в которых смола перемешивалась путем перекачивания реакционного раствора в неподвижном сосуде, путем пропускания инертного газа или с помощью механической мешалки. Интересен сконструированный Виландом и сотр. [442] центрифужный реактор.

*Отщепление синтезированного пептида от полимерного носителя* (VI, рис. 2-12) составляет последнюю стадию синтеза Меррифилда, а последующая очистка полученной смеси продуктов — самая трудная операция. Снятие полимера осуществляется с помощью реагентов, которые либо селективно расщепляют якорную связь между С-концевой аминокислотой и носителем, либо одновременно с этим позволяют частично или полностью деблокировать полипептид. Связь типа алкилзамещенного бензилового эфира лучше всего расщепляется ацидолизом. Для этого часто применяются растворы бромоводорода в трифторуксусной кислоте, уксусная кислота меньше подходит в качестве растворителя из-за опасности ацетилирования гидроксиминокислот. Описаны также многие отщепления при помощи безво-

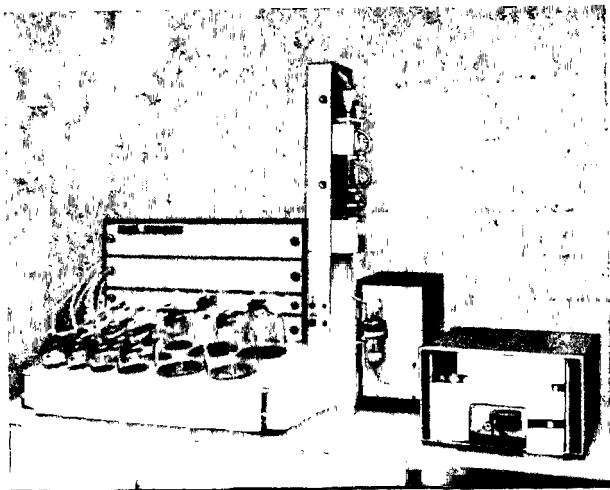


Рис. 2-21. Первая коммерческая модель «пептидного синтезатора» по Брунфельдту.

дногo жидкого фтороводорода [63] при 0 °С в присутствии анизолa в качестве «ловушки» катионов. При этом отщепляются также все N- и O-защитные группы на основе *трет*-бутильного и бензильного остатков, нитрогруппа аргинина и S-метоксibenзильная группа. К таким же результатам приводит метод Плесса и Бауэра [427] (отщепление с помощью бор-трифтороацетата). С помощью HF не отщепляются N<sup>Im</sup>-бензильный, S-алкилтио- и N<sup>Im</sup>-2,4-динитрофенильный остатки, а также 4-нитробензиловые эфиры.

При отщеплении с помощью щелочного гидролиза или катализируемых основаниями превращений в присутствии сильных ионообменников существует опасность рацемизации и возможность перезетерификации бензиловых эфиров боковых цепей. В принципе возможно также и аминолитическое и гидразинолитическое отщепление пептида. Для получения амидов и гидразидов следует использовать уже обсуждавшиеся модифицированные якорные группировки.

В заключение следует еще раз указать на то, что ацидолитическое расщепление, в особенности с помощью жидкого фтороводорода, может во многих случаях приводить к повреждению конечного продукта.

Метод Меррифилда позволил начиная с 1963 г. получить многие пептиды, важнейшие из которых приведены в табл. 2-9. Некоторые из них были, правда, получены не в очень чистом состоянии из-за уже упомянутых недостатков методики.

Если проанализировать все проведенные синтезы Меррифилда (табл. 2-9), то станет ясно, что это в основном работы в период между 1968 и 1972 гг. В это время во многих новых лабораториях — а их количество в США со времени опубликования концепции Меррифилда увеличилось в десять раз — начали проводить синтезы пептидов на носителях, чему в значительной степени способствовала коммерческая доступность синтезаторов. Очевидно, разочаровывающие результаты при попытках синтеза белков привели к реалистической оценке возможностей метода. Попытка синтеза лизоцима привела, например, к смеси полипептидов, которая обладала 0,5—1% специфической активности [455]. Гораздо успешнее был синтез рибонуклеазы А [449], хотя и в этом случае выход составлял всего 16%. На этом ферменте с помощью твердофазной техники проведено интересное изучение взаимосвязи строения и активности [467]. Несомненно, что биологическая активность не является критерием гладкого течения твердофазного синтеза. Синтез белка, состоящего из 188 аминокислот, который сначала считали гормоном роста человека, дал смесь белков с заметной биологической активностью. Несколько позднее было, однако, показано, что положенная в основу синтеза первичная структура не подтвердилась [453, 468]. Синтез длинноцепочечных пептидов и белков по методу Меррифилда в настоящее время и в обозримом будущем уже не может отвечать тем высоким требованиям, которые предъявляются к синтезу биологически активных соединений.

Несмотря на это, работы Меррифилда положили начало новому направлению пептидного синтеза, которое следует рассматривать не просто



Таблица 2-9. Некоторые пептиды, синтезированные по методу Мерриффилда

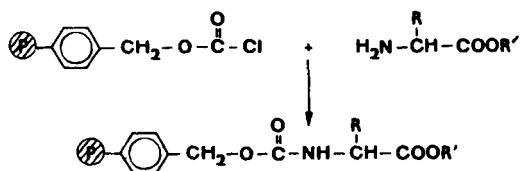
Пептид	Число аминокислот	Год	Литература
Брадикинин	9	1964	444
Ангиотензин II	8	1965	445
Цепи инсулина	21/30	1966	446
Ферредоксин	55	1968	447
Окситоцин	9	1968	448
Рибонуклеаза А	124	1969	449
Цитохром с	104	1969	450
Стафилококковая нуклеаза (6—47)	42	1969	451
Антаманид	10	1969	452
Гормон роста человека	188	1970	453
Паратгормон (1—34)	34	1971	454
Лизоцим	129	1971	455
Ацилпереносящий белок	74	1971	456
Трипсиновый ингибитор (быка)	58	1971	457, 458
Вещество Р	11	1971	459
Грамицидин S	10	1971	460
Люлиберин/фоллиберин	10	1971	461
Кобротоксин	62	1972	462
Рибонуклеаза T <sub>1</sub>	104	1972	463
Соматостатин	14	1973	464
АКТГ человека	39	1975	465
Глукагон	29	1978	420

как альтернативу обычным методам синтеза, а как попытку использовать преимущества обеих концепций для синтеза белков в лаборатории, что было предсказано Э. Фишером еще в первом десятилетии нашего века.

Используя несомненные преимущества метода Мерриффилда, уже сегодня можно сравнительно быстро синтезировать пептидные фрагменты, которые могут быть получены с высокой степенью чистоты при помощи имеющейся теперь техники фракционирования. Конденсация таких фрагментов с помощью обычных методов, позволяющих проводить тщательную очистку и анализ после каждой стадии, указывает путь на ближайшее будущее. Наряду с этим с помощью твердофазного синтеза следует получать короткие биологически активные пептиды и прежде всего многочисленные аналоги. Хотя трудно установить предел длины цепи, позволяющий использовать этот метод для успешного получения пептидов, но пептиды, включающие 10—15 аминокислот, — вот, по-видимому, предпочтительные объекты синтеза. Главные проблемы, решение которых позволит преодо-

леть существующие сегодня ограничения, — это разработка приемлемых полимерных носителей, эффективных методов конденсации (со средней степенью превращения выше 99%!), защитных групп высокой селективности, тщательные кинетические исследования всех реакций. Необходимо также повысить возможности аналитического контроля реакций в гетерогенной фазе и, кроме того, увеличить эффективность методов разделения и очистки пептидов.

В отличие от описанного стратегического варианта Меррифилда Летзингер и сотр. [469] предложили ступенчато наращивать пептидную цепь на полимерном носителе с N-конца. Для этой цели N-концевая исходная аминокислота привязывается к полимерному бензиловому эфиру хлоругольной кислоты:



После омыления можно присоединять следующий остаток аминокислоты ангидридным методом. Недосток этого подхода состоит в том, что, начиная со стадии дипептида, для всех последующих конденсаций можно применять только такие методы конденсации, которые обеспечивают отсутствие рацемизации. Кроме того, ощущается недостаток подходящих карбоксизащитных групп. Используя *трет*-бутилоксикарбонилгидразиды аминокислот, можно проводить наращивание цепи азидным методом [470].

Несмотря на разработку других модификаций, ступенчатое наращивание цепи с N-конца на полимерных носителях до сих пор не получило практического применения.

### 2.2.7.2. Жидкофазные методы

Уже в 1965 г. Шемякин и сотр. [471] предложили применять для пептидного синтеза жидкие полимерные носители, чтобы таким путем преодолеть некоторые недостатки твердофазного метода. В случае применения жидкого полимерного носителя реакция конденсации может проводиться в растворе. Правда, при этом отделение избыточных реагентов после каждой стадии конденсации возможно только с помощью сложной операции высаживания. Введением полиэтиленгликоля (ПЭГ) как C-концевой защитной группы растущей пептидной цепи и применением ультрафильтрации для отдельных низкомолекулярных реагентов Муттер и сотр. [472] решающим образом улучшили «жидкофазный» метод.

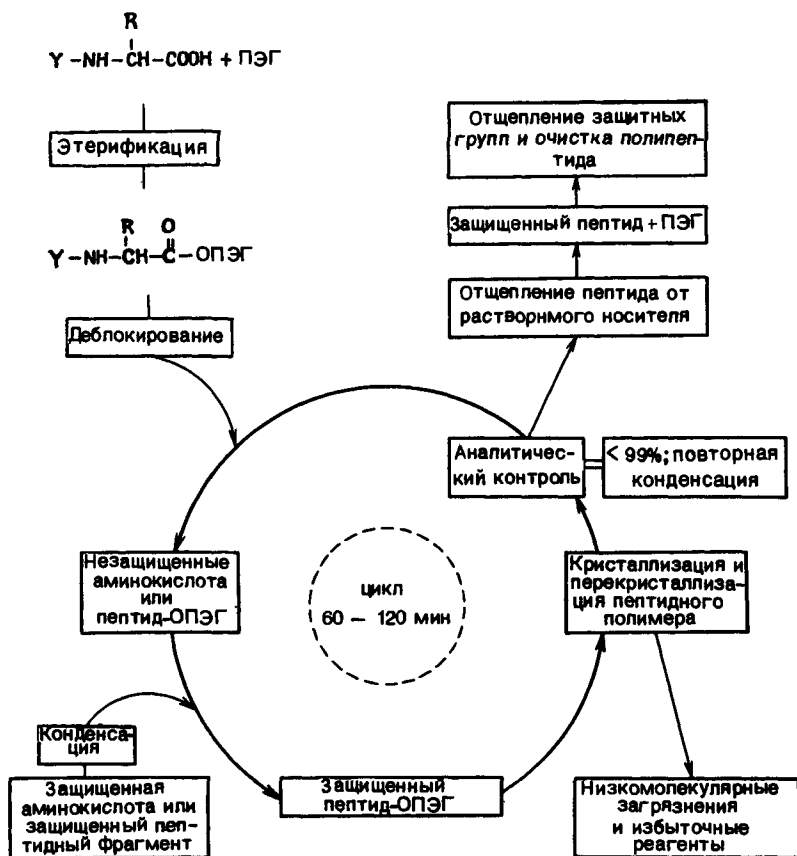


Рис. 2-22. Схема жидкофазного пептидного синтеза по Муттеру и Байеру [473].

Был предложен также «метод кристаллизации» [473]. Путем добавки подходящего органического растворителя (диэтиловый эфир) пептидил-ПЭГ быстро и количественно переводится в кристаллическую форму с образованием спиральной структуры, чем достигается простое отделение от низкомолекулярных компонентов и реагентов (рис. 2-22). Продолжительность реакции в этом методе такая же, как при обычном синтезе в растворе, но для получения оптимального превращения необходим избыток аци-

лирующего средства, а также повторная конденсация. С ростом пептидной цепи меняется растворимость, так что даже при применении ДМФ могут получиться вязкие растворы [474, 475].

Жидкофазный пептидный синтез, так же как и твердофазный, может быть автоматизирован.

Пфеидер и др. [476] описали вариант пептидного синтеза в водной среде, применяя НКА-метод (разд. 2.2.5.2.3) и полиэтилениминный носитель. Для этой цели был разработан автоматический пептидный синтезатор.

### 2.2.7.3. Чередующийся твердофазно-жидкофазный пептидный синтез

Чтобы избежать образования неполных и ошибочных последовательностей при пептидном синтезе на полимерных носителях, требуется по возможности полное превращение на каждой стадии. Несмотря на большие усилия, эта цель недостижима.

Франк и Хагенмейер [477] предложили вариант стратегии смешанного твердофазно-жидкофазного синтеза с применением полимерных носителей. При этом на каждой стадии возможно простое отделение как избытка аминокислоты, присоединяемой к растущей цепи, так и непрореагировавшей

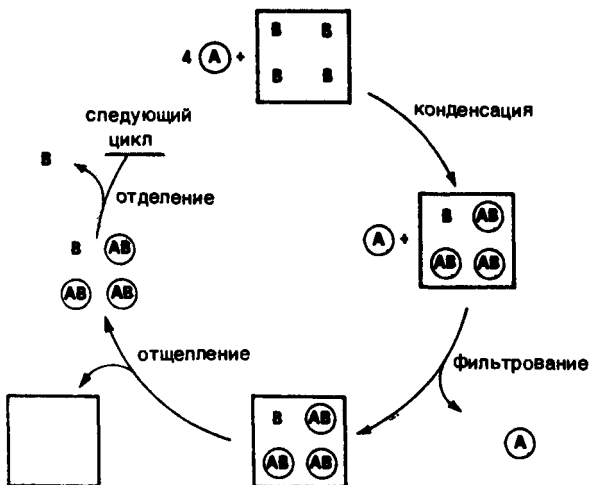
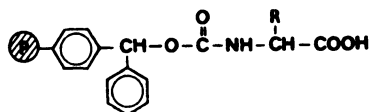


Рис. 2-23. Схема синтетического цикла чередующегося твердофазно-жидкофазного пептидного синтеза.

пептидной цепи от конечного пептида. Основная идея этого метода состоит в том, что наращиваемая пептидная цепь после одной конденсации так изменяется по физическим свойствам, что исходный продукт легко отделяется от конечного. Для этой цели наращиваемая аминокислота прикрепляется аминной функцией к селективно отщепляемой якорной группе нерастворимого полимерного носителя. Находящийся в растворе защищенный по карбоксилу аминокомпонент в результате реакции конденсации переходит на твердую фазу. Не вступивший в реакцию аминокомпонент отделяется с помощью простых операций фильтрации и промывания. Затем путем отщепления полимерной аминокзащитной группы пептид вместе с избытком аминокислоты (карбоксильный компонент) снова переводится в растворимую фазу. В зависимости от защитной группы карбоксила и от длины цепи пептида отделение аминокислоты от пептида производят с помощью ультрафильтрации, гель-хроматографии или высаживания. Дальше проводят новый цикл синтеза, присоединяя следующую N-полимер-блокированную аминокислоту.

Благодаря такой последовательности реакций, когда растущая полипептидная цепь находится попеременно то в твердой, то в жидкой фазе, можно на определенных этапах полностью удалить как непрореагировавший аминокомпонент, так и недеблокированный пептид. Метод можно комбинировать с другими стратегиями синтеза (кроме метода Меррифилда). В качестве карбоксизащитных групп предлагались такие монофункциональные полимеры, улучшающие растворимость, как моноалкиловый эфир полиэтиленгликоля. Ход реакции конденсации и деблокирования можно контролировать аналитически с помощью нингидрида или флуорескамина. Первой полимерной аминокзащитной группой был связанный носителем бензгидроксикарбонильный остаток, который позволяет освобождать пептид с помощью 10%-ной трифторуксусной кислоты в дихлорметане.



Что касается полимерного носителя и якорной группы, то здесь имеется много возможных вариантов. После широкого опробования на практике можно будет указать место этой синтетической концепции в ряду уже обсуждавшихся синтетических методов, основанных на применении полимерных носителей.

#### 2.2.7.4. Пептидный синтез с применением полимерных реагентов

Речь идет, собственно, не о синтезе на полимерном носителе, так как растущая пептидная цепь постоянно находится в растворе. В реакцию с аминоконпонентом вводится нерастворимое активированное полимером карбоксильное производное, причем образуется растворимый защищенный пептид и освобождается полимер. Преимущество этого метода состоит в том, что полимерные реагенты могут вводиться в избытке, а отделение синтезированного пептида от нерастворимого полимера не представляет трудностей. Для этой цели подходят разные типы полимерных активированных эфиров. Метод был разработан одновременно группами Пачорника [478] и Виланда [479]. Такие полимерные реагенты должны быть механически устойчивы, обладать хорошей набухаемостью и иметь высокую химическую активность и малую стерическую затрудненность. Виланд и сотр. предложили вести процесс непрерывно (рис. 2-24).

Для практической реализации этого процесса удачными оказались аминозащитные группы, отщепляемые фотолизом, так как при ацидолитическом деблокировании с последующей нейтрализацией в реакционном растворе постоянно растет концентрация солей.

Из большого числа уже описанных полимерных реагентов некоторые следует рассмотреть подробно.

С помощью активированного полимерного эфира, изготовленного на основе поли-[(4-гидрокси-3-нитробензил)-стирола] (I), синтезировали за-

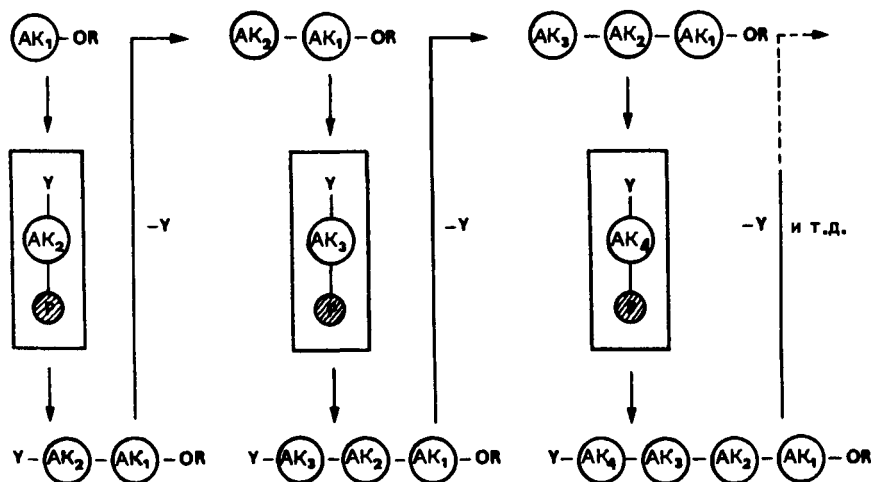
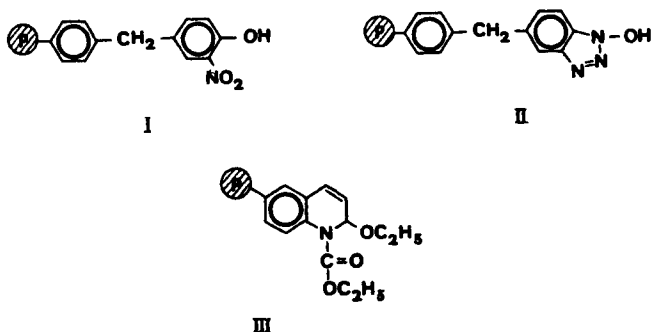


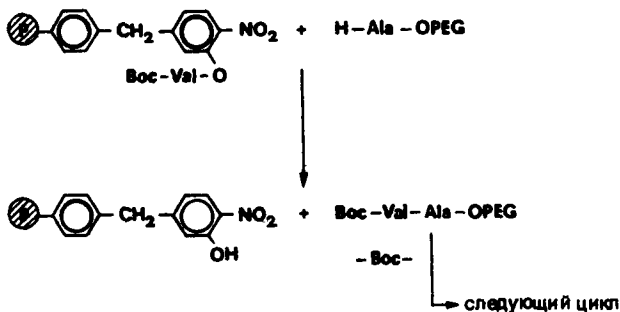
Рис. 2-24. Принцип непрерывного синтеза с полимерными реагентами [479].

щищенный фоллиберин с общим выходом 68,8% [480]. Превосходными свойствами обладает также поли-([1-оксисбензотриазол]-стирол) (II). Соответствующий полимерный активированный эфир получают ДЦГК-методом при 4 °С за 15—20 мин. Средняя емкость смолы 0,6—1,3 ммоль/г [481]. Полимерный 1-оксисбензотриазоловый эфир оказался пригодным для различных пептидных синтезов.



Для реакций конденсации могут с успехом применяться также полимерно связанный карбодимид [482, 483], полимерно связанный трифенилфосфин/2,2'-дипиридилсульфид [484] и поли-(1-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолин) (III). Последний может быть получен из 6-изопренилхинолина, стирола и дивинилбензола с последующим взаимодействием с этиловым эфиром хлормуравьиной кислоты и этанолом в присутствии триэтиламина [485]. С III можно проводить конденсацию фрагментов без рацемизации.

Комбинированное применение полимерных активированных эфиров и растворимых полимерных носителей в качестве защитных групп для карбоксила аминокомпонентов описано Юнгом и сотр. [486]:



Эффективность метода могла бы быть еще выше при наличии удовлетворительных методов получения полимерных активированных эфиров и якорных групп, позволяющих легко отщеплять полиэтиленгликолевую за-

шиту после окончания пептидного синтеза. При использовании для соединения с полиэтиленгликолем якорных групп на основе бензила получают связи, которые можно расщеплять гидролизом. Таким образом, можно добиться значительного улучшения жидкофазного метода, а также комбинированного метода, основанного на использовании полимерных реагентов [487].

## 2.2.8. Синтез циклических пептидов

Некоторые биологические активные пептиды, встречающиеся в природе, имеют циклическое строение, для их химического синтеза должны быть разработаны соответствующие методы. Сравнительно легко можно получить гомодетный циклический пептид. В этом случае одна пептидная связь образуется между карбоксильной и аминогруппами одной и той же пептидной единицы. В случае синтеза циклических гетеродетных гомомерных пептидов ситуация гораздо сложнее. У таких пептидов замыкание кольца происходит посредством образования связи дисульфидного или эфирного типа.

Циклическим пептидам с дисульфидными мостиками посвящены обширные систематические исследования. В настоящее время растущий интерес вызывают работы по образованию пептидлактонов (например, актиномицина). Эфирная связь имеет большое значение в случае гетеромерных пептидов, содержащих наряду с аминокислотами также гидроксикислоты. Большинство таких пептидов встречается в природе в виде циклических структур (циклические пептолиды).

### 2.2.8.1. Синтез гомодетных циклических пептидов

Реакция замыкания кольца происходит в подавляющем большинстве случаев посредством образования  $\alpha$ -пептидной связи. Бывают случаи построения циклических структур с включением  $\omega$ -пептидных связей. Последний вариант обычно используется для синтеза разветвленных циклических пептидов.

Для реакций циклизации в принципе подходят те же методы конденсации, которые используются и для синтеза линейных пептидов. Из линейного пептида с незащищенной аминофункцией при активировании карбоксила наряду с циклическим пептидом I могут получаться также линейные полимеры II (рис. 2-25).

Для того чтобы подавить легко идущую линейную конденсацию, реакцию проводят при большом разбавлении, в соответствии с принципом Руггли — Циглера. В этих условиях вероятность мономолекулярной реакции замыкания кольца не снижается, в то время как бимолекулярная поликонденсация заметно уменьшается. На практике циклизующиеся компоненты очень медленно вводят в реакционную среду. Активирование карбоксильной функции линейных пептидов можно проводить различными методами.



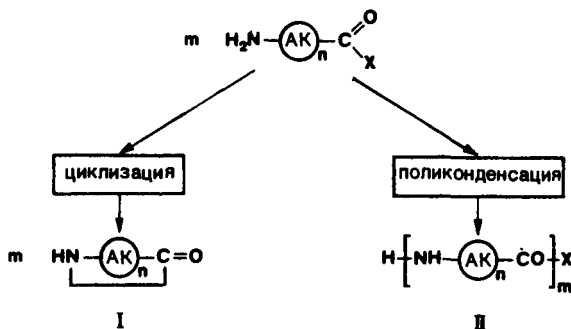


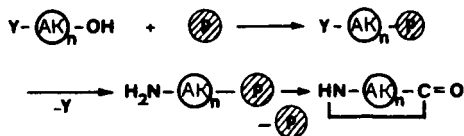
Рис. 2-25. Схематическое представление конкуренции между реакцией замыкания кольца и поликонденсацией.

1. **Активирование при блокированной аминofункции.** Этот метод основан на применении активированных эфиров N-защищенных пептидов. После отщепления N<sup>α</sup>-защитной группы происходит промежуточное блокирование солеобразованием, которое в нужное время снимается добавлением основания.

2. **Активирование незащищенных пептидов.** Применяется для циклизации пептидных фрагментов путем введения в реакционную среду дидцлогексилкарбодимида (также с добавками), водорастворимых карбодимидов или других активирующих средств.

3. **Активирование при протонированной аминofункции.** Аминofункция промежуточно блокируется солеобразованием. Активирование может производиться при образовании азида, смешанного ангидрида и т. д. Затем аминofункцию освобождают добавлением основания.

4. **Активирование в виде полимерных активированных эфиров.** Принцип активирования карбоксильной группы полимерным носителем для синтеза циклических пептидов был использован Фридкиным и сотр. [488]. N-Защищенная пептидная последовательность, подлежащая циклизации, присоединяется к подходящему полимерному активирующему реагенту. После деблокирования циклический пептид получается путем внутримолекулярно-аминолиза:



В случае применения принципа «безопасного захвата» вначале синтезируют линейные фрагменты на соответствующем носителе, затем якорная группировка активируется, и после отщепления N<sup>α</sup>-защитной группы активированная полимерная карбоксильная функция взаимодействует со свободной аминогруппой с образованием циклического пептида [489].

По стерическим и энергетическим соображениям не каждую произвольную взятую пептидную последовательность можно перевести в соответствующий циклопептид. Циклодипептид 2,5-диоксопиперазин образуется легко. Он содержит две *цис*-пептидные связи, причем затрата энергии на их образование компенсируется при получении энергетически выгодного 6-членного кольца. Диоксопиперазины легко образуются из алкиловых эфиров дипептидов, а также из эфиров аминокислот циклодимеризацией. По исследованиям Швица и сотр. [490, 491], линейные пептиды с нечетным числом аминокислотных остатков ( $n = 1, 3$  и  $5$ ) циклизуются с димеризацией в циклические ди-, гекса- и декапептиды. Однако при циклизации линейных пентапептидов образуются не только декапептиды (циклодимеризацией), но и циклопентапептид.

Изумия и сотр. при синтезе грамицидина S (рис. 2-50), исходя из линейного активированного производного пентапептида, получили наряду с желаемым циклическим декапептидом еще и циклопентапептид с выходом 34%.

Для циклотрипептида требуется, чтобы все три пептидные связи были в энергетически богатой *цис*-форме. Исходя из энергетических соображений, можно понять низкую тенденцию к образованию 9-членных циклотрипептидов, ибо в их модели имеется сильное напряжение кольца, которое может быть объяснено стерическим взаимодействием направленных внутрь трех  $\alpha$ -H-атомов (напряжение Прелога). Циклодимеризации, без сомнения, способствует антипараллельное взаимное расположение двух молекул трипептида с образованием водородных мостиков. Димеризация с образованием водородных связей невозможна, если в трипептид встроены пролин; кроме того, в этом случае *цис*- и *транс*-конфигурации пептидных связей практически равноценны энергетически. Роте и сотр. [492] описали в 1965 г. синтез циклотрипролила, единственного возможного циклотрипептида (рис. 2-26).

Небольшие циклические пептиды особенно годятся для изучения конформаций, поскольку ограниченная молекулярная подвижность позволяет существовать только некоторым конформациям. Циклотрипептиды в кристаллах обладают только конформацией короны. В растворе же дополнительно появляется асимметричная конформация ванны в том случае, если в трипептиде присутствует хотя бы одна нехиральная аминокислота (саркозин, N-бензилглутин) [492a].

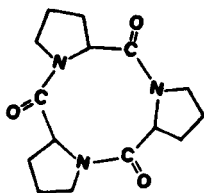


Рис. 2-26. Структура циклотрипролила.

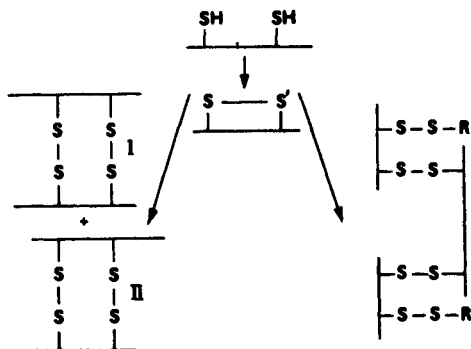
Для циклических тетрапептидов с 4-*транс*-пептидными связями нельзя построить модели, полностью свободные от напряжения. Однако это можно сделать при чередовании *цис*- и *транс*-конфигураций. Циклопентапептиды содержат только *транс*-пептидные связи, как и наиболее изученные циклогексапептиды.

### 2.2.8.2. Синтез гетеродетных циклических пептидов

Из имеющихся в циклических пептидах гетеросвязей дисульфидная связь чаще встречается в пептидах и белках, чем эфирная связь депсипептидов.

В одноцепочечных молекулах существуют внутрицепочечные дисульфидные связи. Если имеется только один внутрицепочечный дисульфидный мостик, как, например, в окситоцине, вазопрессине, соматостатине, то говорят о моноциклических одноцепочечных молекулах. Одноцепочечную молекулу, содержащую много внутрицепочечных дисульфидных мостиков (гормон роста, рибонуклеаза и др.), называют полициклической.

Синтез простых моноциклических цистеиновых пептидов не представляет трудностей. При получении исходной линейной пептидной последовательности блокируют обе тиольные функции одинаковыми защитными группами. После отщепления защитных групп внутримолекулярное дисульфидное кольцо может селективно замыкаться по принципу разбавления Рутгли — Циглера посредством окисления кислородом воздуха. При этом в качестве нежелательных побочных продуктов образуются циклические димеры с параллельной (I) или же антипараллельной (II) структурой, а также полимерные продукты.



Эта концепция синтеза была разработана дю Виньо и др. [493] для первого химического синтеза пептидного гормона окситоцина.

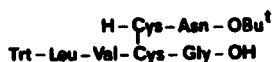
Значительно сложнее синтез пептидов, содержащих многие дисульфидные мостики, в особенности многоцепочечных молекул с добавочными междуцепочечными дисульфидными связями. Цистеиновые пептиды можно получать двумя путями:

1) когда исходной базой для получения пептида является производное цистина;

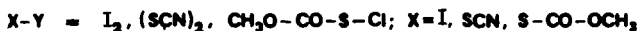
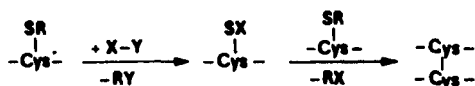
2) через S-защищенный цистеиновый пептид с последующим переводом в цистиновый.

Синтез симметричного цистинового пептида по первому пути не представляет трудностей, так как для этого не нужны отдельные тиольные защитные группы. Значительно сложнее получить таким путем несимметричный цистиновый пептид, так как здесь предъявляются высокие требования к селективности применяемых защит для амино- и карбоксильной групп.

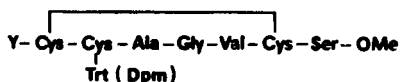
На основе полученного в 1973 г. Камбером [494] несимметричного цистинового пептида A(20-21)-B(17-20) Зибер [495] осуществил при последовательном образовании дисульфидных мостиков полный синтез инсулина человека.



Второй стратегический путь служит для селективного образования дисульфидных связей, причем соответствующие реагенты взаимодействуют с S-защищенным пептидом без предварительного деблокирования. При этом цистеин или блокированное производное цистеина с электрофильно-отщепляемой S-защитной группой сначала переводится иодом, дириоданом [496] или метоксикарбонилсульфенилхлоридом [494, 495] в активированное промежуточное соединение. Последнее реагирует со второй молекулой цистеина или S-блокированного цистеина (R = H или электрофильно-отщепляемая защитная группа, такая как Trt, Dpm, AcM, Thr и др.) и дает производное цистина:



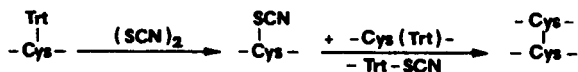
Применение селективно-отщепляемых S-защитных групп было впервые предложено Зервасом и сотр. [497]. Этим путем был получен гептапептидный фрагмент инсулина овцы с внутрипочечным дисульфидным мостиком, а также с блокированной Trt- или Dpm-остатком третьей тиольной функцией:



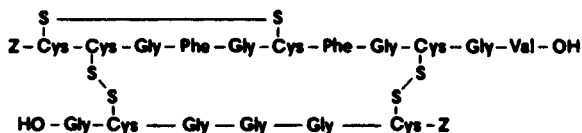
В качестве аминоксильной группы Y в случае Dpm-тиольной защиты применялись Z- или Вос-остатки, а также S-Trt-группа и Nps-остаток.

Хиски и сотр. [498] подробно исследовали целенаправленный синтез несимметричной дисульфидной связи. Как уже упоминалось, им удалось отщепить подходящие S-защитные группы путем ступенчатого изменения кислотности, причем промежуточный сульфенилтиоцианат, получающийся

с помощью дитродана, выступает в качестве активированной тиольной группировки:



При применении такого сульфенилтиоцианатного метода был получен инсулиноподобный модельный пептид:



На основе различной реакционной способности тритил- и дифенилметилтиолазтитных групп описано селективное образование также других цистеиновых пептидов [494].

Нежелательной побочной реакцией при синтезе несимметричного дисульфида является дисульфидный обмен:



Постепенное образование дисульфидных мостков с подавлением дисульфидного обмена — это критическая проблема этой стратегии, так как в большинстве случаев симметричный и несимметричный дисульфиды разделить трудно.

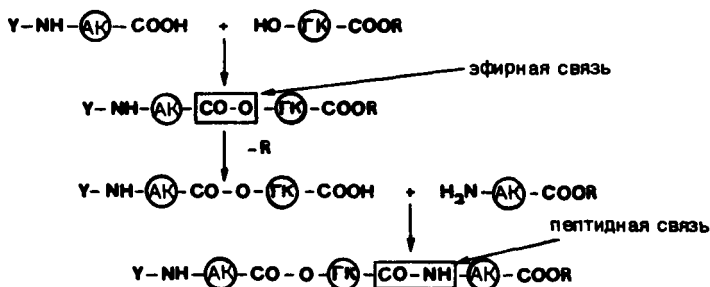
Нельзя не упомянуть, что при статистическом окислении двух различных цистеиновых пептидов также может получиться несимметричный цистиновый пептид. Этот путь был описан, например, при первом полном синтезе инсулина (разд. 2.3.1.8).

Во многих биологически активных пептидах циклического строения наряду с дисульфидными мостиками обнаруживают также эфирные связи. Этот тип связей преобладает в различных пептидных антибиотиках (разд. 2.3.5).

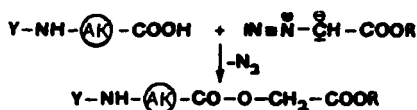
На специальной проблематике синтеза гомомерных пептидных лактонов не стоит останавливаться. Пептолиды являются гетеромерными пептидами, в которых аминокислоты заменены на  $\alpha$ -или  $\beta$ -гидроксикислоты (ГК); в большинстве случаев пептолиды обладают циклической структурой. Для реакции замыкания кольца пептолидов описаны два пути:

- 1) циклизация линейных пептолидов аналогична замыканию кольца у пептидов;
- 2) гидроксиацильная перегруппировка.

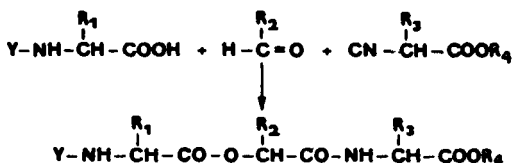
Стратегические и тактические вопросы синтеза пептолидов мало отличаются от тех же проблем пептидного синтеза. Пептолиды с периодической структурой, т. е. с повторяющимися единицами дипептолида, названы, по Лоссе и Бахману [500], регулярными пептолидами. Их синтез можно вести как ступенчато попеременным образованием эфирных и амидных связей, так и фрагментной конденсацией, причем в последнем случае в зависимости от выбора места соединения можно получать только амидные или только эфирные связи:



Третий путь исходит из соединений, которые приводят к получению гидроксикислотных или аминокислотных остатков в процессе реакции конденсации. Основываясь на исследованиях Курциуса, таким путем были получены пептолиды при взаимодействии бензилового [501] и 4-нитробензилового [502] эфиров диазоуксусной кислоты с N-замещенными аминокислотами:



В этом случае защитные эфирные группировки можно удалить гидролизом. При омылении эфиров появляется опасность расщепления эфирной связи. Применению реакции Пассерини ведет, по Уги и Фетцеру [503], к одновременному образованию пептидной и эфирной связей



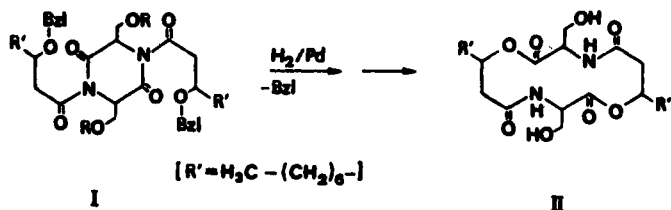
Фрагментную конденсацию, так же как и реакцию замыкания кольца, в предварительно полученном линейном пептолиде лучше проводить путем образования пептидной связи.

При циклизациях методом активированных эфиров имеется опасность аминолитического расщепления пептолид-эфирной связи. Как правило, применяют хлорангидридный метод, причем сначала незащищенный пептолид переводится обработкой пентахлоридом фосфора [504] или тионилхлоридом [505] в хлорангидрид солянокислого пептолида, а затем, при освобождении аминофункции с помощью третичного основания, проводится реакция замыкания кольца. Выходы циклических пептолидов невелики. Это объясняется конкурирующей реакцией поляконденсации, что, как и при нормальной пептидной циклизации, требует работы в разбавленных растворах. Причиной низких выходов являются также стерические препятствия в виде участвующих в реакции циклизации гидроксид- или аминокислот, а также циклоолигомеризация. Несмотря на трудности, связанные с циклоолигомеризацией [490, 506, 507], этот синтетический принцип используют для получения циклических пептолидов с

периодической структурой, так как при этом не нужны сложные синтезы исходных линейных соединений [508, 509].

Роте и Крейс [510] исследовали зависимость от растворителя в случае образования циклических гомологов валиномицина фосфитным методом. Исходя из линейной последовательности, они сумели получить додекадепептид в толуоле ( $c = 0,001$  моль/л) с выходом 56%.

Вводя в пептидную связь циклических гомомерных пептидов  $\beta$ -гидроксикислоты, можно получать циклические пептолиды с периодической структурой, т. е. с чередующимися  $\beta$ -гидроксикислотными и аминокислотными остатками. При реакции диоксопиперазина *о*-ацетилсерина с хлорангидридом *D*- $\beta$ -бензилоксидекановой кислоты Шемякин и сотр. [511] получили 1,4-(бис- $\beta$ -бензилоксидеканоил)-2,5-диоксопиперазин (I). По отщеплении *O*-бензильных групп гидрогенолизом полученное соединение перегруппировывалось в *O*-защищенное производное, которое после отщепления ацетильных остатков ( $R = -CO-CH_3$ ) дало *сerrатамолид* (II):



## 2.2.9. Синтез полиаминокислот и регулярных полипептидов

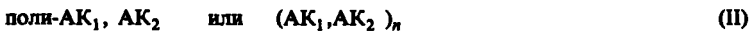
Полиаминокислоты и регулярные полипептиды — это синтетические полипептиды, которые получают при поликонденсации аминокислот или коротких пептидных последовательностей. В противоположность систематически построенным пептидам они представляют собой не отдельные соединения, а смесь гомологов макромолекул. Использование различных номенклатур вызывает затруднения при названии этих веществ. Комиссия IUPAC—IUB по биохимической номенклатуре предложила правила [512], которые и применяются при последующем изложении. Приравнивание таких синтетических полипептидов к полимеризованным аминокислотам или фрагментам находится в противоречии с обозначением, используемым в макромолекулярной химии. Для процесса многократного присоединения аминокислот или пептидных фрагментов вместо термина «полимеризация» следует применять термин «поликонденсация».

Полиаминокислоты и регулярные полипептиды имеют большое значение в качестве моделей белков для физических, химических и биологических исследований. Хотя такие соединения не встречаются в природе, они тем не менее очень интересны для исследования влияния различных воздействий на строение и свойства пептидных цепей. Столь же высок биохимиче-

ский интерес к соединениям такого рода, так как с их помощью получают новые важные результаты в энзимологии и иммунологии. В различных монографиях и обзорах [513—518] детально рассматриваются значение, получение и характеристики этих синтетических полипептидов.

### 2.2.9.1. Синтезы гомо- и гетерополиаминокислот

*Гомополиаминокислоты* (I), по определению Вюнша, построены из идентичных остатков аминокислот, в то время как *гетерополиаминокислоты* (II) содержат аминокислотные остатки нескольких видов, которые распределены в пептидной цепи статистически:

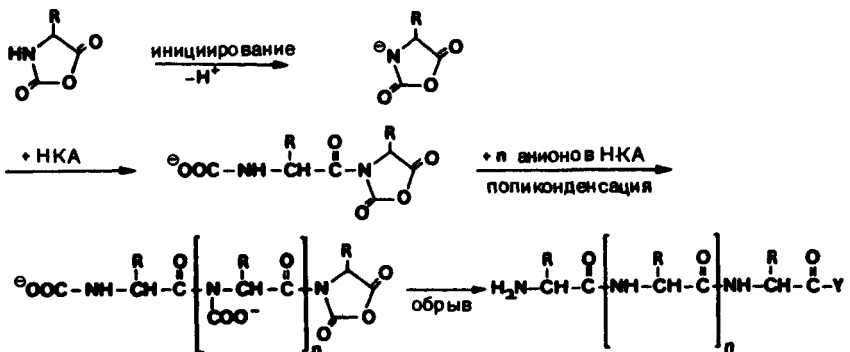


При всех методах поликонденсации предпочитают максимально защищать все третьи функции, причем применяемые защитные группы должны быть устойчивыми в условиях синтеза, а после поликонденсации полностью отщепляться от высокомолекулярных полипептидов.

Термическая поликонденсация свободных аминокислот успешно проходит с некоторыми аминокислотами (Asp, Asn, Gly, Lys и др.). Более успешно использование активированных производных аминокислот. Метод N-карбоксиянгидридов (разд. 2.2.5.2.3) дает возможность получать оптимальную степень поликонденсации ( $\bar{n} = 10^4$ ), а также регулировать ее в интервале  $\bar{n} = 10^2 + 10^3$ .

Для поликонденсации N-карбоксиянгидридов в растворе нужны инициаторы. Тип инициатора определяет механизм поликонденсации и молекулярную массу продукта. При помощи сильных оснований (третичные амины, алкоголяты щелочных металлов, алкилметаллические соединения) получают гомополиаминокислоты с узким молекулярномассовым распределением и высокой степенью поликонденсации ( $\bar{n} > 10^2$ ).

Сильное основание депротонирует N-карбоксиянгидрид у азота, причем полученный анион способствует присоединению второй молекулы N-карбоксиянгидрида с раскрытием ангидридного кольца:





Обрыв цепи вызывается гидроксилом ( $Y = OH$ ) или вторичным амином ( $Y = NR_2$ ). В случае применения спиртов, первичных или вторичных аминов и т. д. сначала образуется производное аминокислоты, свободная аминогруппа которого начинает следующую стадию конденсации. В результате получают гомополиаминокислоты с С-концевыми эфирными или амидными группировками ( $\bar{n} = 20 + 100$ ).

Сополиконденсацией можно готовить гетерополиаминокислоты, причем, как правило, получается полипептид со статистическим распределением аминокислотных остатков по всей цепи. Для этой цели подходит и метод термической полимеризации. Само собой разумеется, можно применять и активированные аминокислоты. Наилучшие результаты получаются при применении метода N-карбоксиянгидридов. Сокращенно можно записать состав поликонденсата с помощью формул:



что соответствует 56% Glu, 38% Tyr и 6% Ala.

Первоначальное соотношение мономеров в смеси не сохраняется в поликонденсате, потому что скорость реакции зависит от строения боковых цепей аминокислот и в процессе роста цепи активность концевых остатков аминокислот меняется.

*Разветвленные гетерополиаминокислоты* можно получать двумя принципиально различными путями, причем разветвления происходят за счет третьих функций, главным образом Lys, Glu и Asp. Чаще всего исходят из заранее построенных цепей, например полилизина или лизинсодержащего сополиконденсата, и разветвления получают при поликонденсации подходящих мономеров. В случае второго варианта сначала синтезируют полипептидную часть боковой цепи и потом привязывают ее к третьей функции основной цепи.

### 2.2.9.2. Синтез регулярных полипептидов

Первый регулярный полипептид был синтезирован уже в начале нашего века Фишером:



Лучшими свойствами для поликонденсации пептидных фрагментов обладают, без сомнения, активированные эфиры, из которых чаще всего применяются 4-нитрофениловые и пентахлорфениловые эфиры. Для конденсации — это касается и уже обсужденных синтезов полиаминокислот — должны применяться только очень чистые мономеры, лишь тогда могут достигаться высокие степени полимеризации. Высокие требования предъявляются также к стерической однородности исходных продуктов. Поликонденсация активированных эфиров обычно проводится в растворе; хорошие результаты были получены и в суспензии [519, 520], причем продукты поликонденсации были более высокомолекулярными. Эфиры дипептидов не очень удобны для поликонденсации из-за конкурирующей

реакции образования диоксопиперазинов. Поэтому применяют предпочтительно три-, тетра- и пентапептидные мономеры. По сравнению с полиаминокислотами при поликонденсации пептидов получают продукты с более короткими цепями (25-55 пептидных единиц).

Образование регулярных полипептидов имеет место также при *пластеиновой реакции* [521, 522], при которой под каталитическим воздействием различных протеаз (трипсин, химотрипсин, пепсин, катепсин и т. д.) из так называемых пластеинактивных пептидных мономеров получают продукты конденсации — пластеины. В качестве субстратов годятся продукты частичного ферментативного гидролиза белков (пептоны, альбумозы и др.). Первый пластеиноактивный синтетический пептид имел последовательность Tyr-Ile-Gly-Glu-Phe.

В случае синтетических субстратов получались пластеины с более низкими молекулярными массами, чем при работе с продуктами, полученными при ферментативном распаде белков. Хотя механизм пластеиновой реакции выяснен еще не полностью, формально речь здесь идет об обращении катализируемого протеазами расщепления пептидной связи (разд. 2.2.5.8).

## 2.2.10. Стратегия и тактика пептидного синтеза

В то время как синтез ди- и трипептидов по большей части не вызывает затруднений в отношении выбора защитных групп и методов активирования, при получении более длинных пептидных цепей необходимо точное планирование синтеза. Естественно, имеет значение и последовательность связывания аминокислотных составляющих в желаемый пептид. При этом статистические возможности здесь гораздо больше, чем число радикальных методов синтеза, которые можно принимать в расчет. Перед началом каждого синтеза нужно выбрать наиболее оптимальный путь синтеза. Успех пептидного синтеза зависит от избранных стратегии и тактики и требует наряду со значениями теоретических возможностей большого опыта экспериментатора.

### 2.2.10.1. Стратегия пептидного синтеза

Под стратегией понимают последовательность соединения аминокислотных составляющих в пептид. С введением твердофазного синтеза в 1962 г. появился дополнительный выбор методов, т. е. кроме традиционного синтеза в растворе можно получать пептиды на второй фазе. При этом синтез на второй фазе может протекать либо как гетерогенная реакция (твердофазный синтез), либо как гомогенная реакция при применении растворимых полимерных носителей (жидкофазный синтез), либо как одновременно гетерогенная, так и гомогенная реакция (чередующийся твердофазно-жидкофазный синтез). В связи с этим понятие стратегии несколько изменилось. Теперь под стратегией понимается только тип соединения аминокислот, причем различают *ступенчатое наращивание цепей* и *фрагментную конденсацию*. Особенности этих путей синтеза обсуждаются ниже.

## 2.2.10.1.1. Ступенчатое наращивание пептидной цепи

Применяя ступенчатый метод, принципиально цепь можно наращивать и с N-конца, и с C-конца (рис. 2-27). Хотя *ступенчатое удлинение цепи с N-конца* соответствует биосинтетическому пути, этот стратегический вариант в практике пептидного синтеза имеет подчиненное значение. Главная причина такого положения дел состоит в том, что при активировании, начиная со стадии дипептида, существует постоянная опасность рацемизации. Летзингер и сотр. [469] осуществили такой синтез на полимерном носителе (с. 195). Несмотря на новые методы конденсации, практически свободные от рацемизации, интерес к этому пути синтеза невелик.

*Ступенчатое наращивание цепи с C-конца* с применением N<sup>α</sup>-защитных групп уретанового типа (разд. 2.2.4.1.1.1) независимо от выбранного мето-

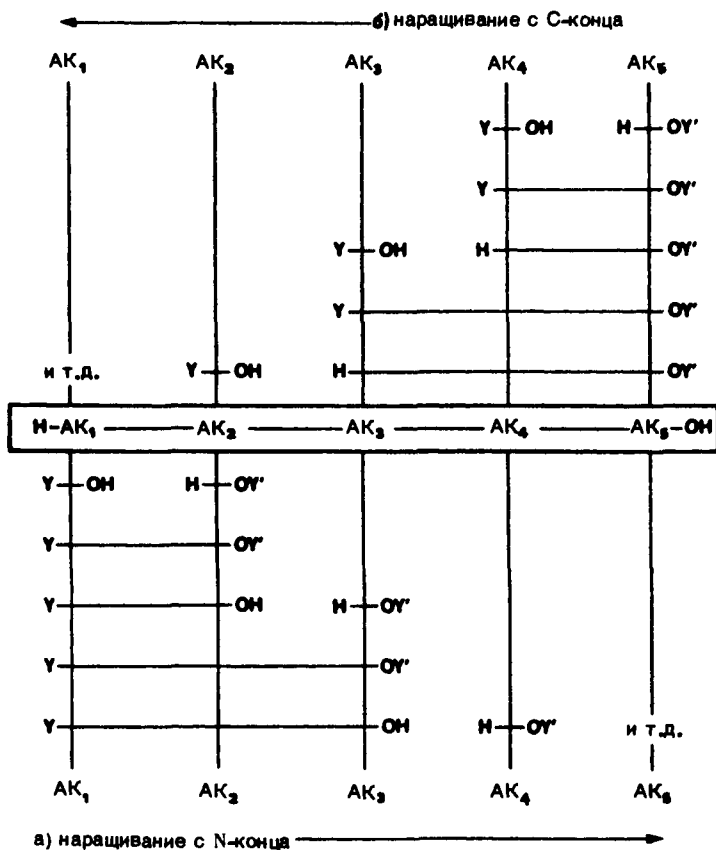


Рис. 2-27. Стратегия ступенчатого удлинения цепи.

да конденсации не сопровождается рацемизацией. Для получения по возможности количественного превращения активированный карбоксикомпонент вводится в избытке. Этот вариант стратегии был впервые применен Бодански в 1959 г. и теперь с успехом используется как при традиционных синтезах в растворе, так и в синтезах на носителях. Традиционный метод ступенчатого наращивания цепи с С-конца с тщательной очисткой и характеристикой промежуточных продуктов по-прежнему преобладает. Для конденсации используются преимущественно активированные эфиры. Очистка и характеристика промежуточных продуктов происходят обычно на стадии полностью защищенных соединений. После отщепления  $\alpha$ -аминозащитной группы полученное производное применяется прямо для следующей реакции конденсации. Получение биологически активных пептидов или крупных фрагментов этим путем является довольно трудной задачей, требующей больших экспериментальных затрат. Лимитирующий фактор этой стратегии — быстро уменьшающаяся растворимость растущей пептидной цепи в обычно применяемых органических растворителях. Бодански на примере полного синтеза амида гептакозапептида секретина (разд. 2.3.1.12.2) показал, что затруднения, обусловленные растворимостью пептидов или фрагментов, начинаются при 10—15 аминокислотных остатках. Средний выход на одну стадию ~94%.

Такая стратегия синтеза — в данном случае в сочетании с фрагментной конденсацией в растворе — единственный метод, который гарантирует надежный полный синтез изолированного природного продукта.

Группы Кнорре [523], Шихана [524] и Подушки [525] уже с середины шестидесятых годов изучали на различных объектах *ступенчатый синтез пептидов в гомогенном растворе без выделения промежуточных продуктов*, синтез *in situ*. Отменой утомительных операций очистки на отдельных стадиях синтеза достигается значительная экономия времени. Разработанный Тилаком ПСА-метод (разд. 2.2.5.2.1) и особенно НКА/НГА-метод (метод Хиршмана) (разд. 2.2.5.2.3), который позволяет получать фрагменты пептидов в водном растворе, открыли новые возможности для широкого применения синтезов *in situ*. Методы синтеза пептидов без выделения разрабатывались и позже.

Отделение побочного продукта может происходить

- 1) промыванием не смешивающейся с водой органической фазы или
- 2) высаживанием промежуточного продукта реакции с удалением побочных продуктов и загрязнений соответствующими операциями промывания.

Первый вариант очистки нашел применение, например, в случае так называемого *двухфазного метода* [526] и так называемого *метода удерживания в растворе* [527], а также отчасти при «быстром» методе пентафторфениловых эфиров Кишфалуди [528]. Второй метод очистки используется в методе Кишфалуди, а также ПСА-методе и методе с 2-нитрофениловыми эфирами *in situ* [529]. Предпосылкой для успешного использования техники *in situ* является знание свойств промежуточных продуктов реакции, чтобы суметь сделать правильный выбор растворителей или высаживающих средств. По исследованиям Бейермана и ван Зона [530] затрата времени на одну конденсацию в случае ПСА-метода составляет приблизительно один

день. Между тем октапептид по методу *in situ* с применением пентафторфениловых эфиров синтезирован за 10 ч [531]. Исследования Пенке и др. [532] привели к заключению, что метод быстрого синтеза с пентафторфениловыми эфирами наиболее удобен для синтеза коротких и средних пептидов.

Ступенчатое наращивание пептида с применением второй фазы впервые проведено Меррифилдом на примере твердофазного пептидного синтеза (разд. 2.2.7.1). При реакциях в гетерогенной фазе вероятность встречи реагирующих партнеров гораздо ниже, чем в гомогенном растворе. Для получения высокой степени превращения требуется значительный избыток ацилирующего средства. Преимуществом этой стратегии является простота технических операций и связанная с этим возможность автоматизации. Трудные операции очистки промежуточных веществ традиционного синтеза заменяются простыми процессами фильтрования и промывания. Однако на этом пути однородный продукт синтеза получается только в том случае, если каждая реакция в гетерогенной фазе протекает практически количественно. Несмотря на большие избытки карбоксикомпонента, использование которых чревато опасностью N-ацилирования пептидной связи, полное превращение на каждой стадии в настоящее время недостижимо. На практике средний выход на одну стадию 95—99%, что недостаточно для синтеза длинных пептидов или белков. Средние выходы на одну стадию и полные выходы (в зависимости от длины цепи) приведены в табл. 2-10. Как показывает практика, короткоцепочечные пептиды или их аналоги длиной до ~15 аминокислотных остатков могут быть получены твердофазным методом. Трудности при синтезе небольших белков наглядно демонстрируются данными табл. 2-10. Еще хуже сказывается накопление не-

Таблица 2-10. Выходы на одну конденсацию и общие выходы в зависимости от длины цепи при синтезах Меррифилда [533]

Объект синтеза	Число остатков	Общий выход (%) при выходе на одну конденсацию			
		95%	98%	99%	99,9%
Гормон роста	191	0,006	2,2	15,0	82,8
Рибонуклеаза А	124	0,2	8,3	29,1	88,4
Цитохром с	104	0,5	12,4	35,5	90,2
Трипсиновый ингибитор (быка)	58	5,4	31,6	56,4	94,5
Ферредоксин	55	6,3	33,6	58,1	94,7
В-Цепь (инсулин)	30	22,6	55,7	74,7	97,1
А-Цепь (инсулин)	21	35,8	66,8	81,8	98,0

<sup>a</sup> Расчет производили относительно С-концевых исходных аминокислот.

полных и ошибочных последовательностей в ходе твердофазного синтеза, так как очистка возможна только на стадии конечного продукта. Так, например, при синтезе АКТГ (39 аминокислотных остатков) при 98%-ном выходе на каждой стадии, что составляет общий выход 45%, получается 55% различных последовательностей. Последние состоят большей частью из  $n - 1$  (38) и  $n - 2$  (37) аминокислотных остатков и по причине большого сходства с АКТГ очень трудно отделяются. Более короткие последовательности, конечно, удалить легче. В случае рибонуклеазы при выходе на каждой стадии 98% получили всего 8,3% нужного фермента (табл. 2-10). 91,7% других последовательностей содержали 123 разные молекулы. Ситуация еще больше усложняется, если не вступившие в реакцию на какой-то стадии пептидные цепи (2% на стадию) реагируют в последующих реакционных циклах. В различных продуктах, составляющих 91,7%, получается тогда свыше 4 миллиардов неполных и ошибочных последовательностей.

Эти примерные расчеты ясно показывают, что для приемлемого синтеза белка выход на одну стадию должен быть по меньшей мере 99,9%.

Несмотря на большие усилия, до сих пор не удалось решающим образом улучшить твердофазный пептидный синтез. Наоборот, в последние годы выявлен целый ряд дополнительных побочных реакций [534].

Пытались обойти некоторые недостатки твердофазной техники введением растворимых полимерных носителей.

*Жидкофазный пептидный синтез*, хотя и не дает возможности разделения промежуточных продуктов, имеет, однако, преимущество: условия реакции гораздо ближе к условиям традиционных методов. Полного превращения здесь можно добиться тоже только с помощью больших избытков ацилирующего средства и многократного повторения стадий конденсации. Кроме того, растущие цепи пептидов — в большинстве случаев уже начиная с гептапептидов — влияют на растворимость полимерных носителей. Получающиеся при этом (даже при применении диметилформамида) вязкие растворы затрудняют дальнейшее течение синтеза. Хотя жидкофазный метод также может быть автоматизирован, он не получил такого широкого применения, как метод Меррифила.

Комбинацию обоих принципов синтеза представляет чередующийся твердофазно-жидкофазный пептидный синтез (разд. 2.2.7.3); большой интерес представляет принцип этого метода, однако еще многое предстоит сделать, чтобы его можно было использовать на практике.

*Синтез на твердом материале* (разд. 2.2.7.4) делает возможным ступенчатое наращивание на полимерном носителе с помощью полимерных активированных эфиров или других полимерных агентов. Растущие цепи пептида остаются постоянно в гомогенном растворе, так что возможна очистка промежуточных продуктов.

Исследованный Юнгом *метод обратимого фиксирования* использует карбокси-защитные группы с основным центром. После каждой стадии конденсации в гомогенном растворе растущая пептидная цепь может обратимо фиксироваться на ионообменной смоле с целью отделения избытка карбоксикомпонента, а также побочных продуктов и загрязнений. Этим путем можно синтезировать различные небольшие пептиды.

Применение в качестве твердого носителя силикагеля было предложено Запеваловой, Максимовым и Митиным [535]. С этой целью силикагель пропитывается полярным растворителем (ДФФ, ацетонитрил, гексаметиалтриамид фосфорной кислоты (ГМТАФ) и др.) и адсорбционно нагружается аминокомпонентом. Фиксированный на силикагеле аминокомпонент взаимодействует далее с пентафторфениловыми эфирами Вос-аминокислот, суспендированными в гексане или петролейном эфире. Пептидный синтез происходит в тонком слое полярного растворителя на поверхности силикагеля, в котором реакционные партнеры находятся в высокой концентрации. Избыток активированного эфира удаляют промыванием диэтиловым эфиром. После отщепления Вос-группы с помощью HCl в дибутиловом эфире проводят следующую стадию конденсации. Избытком полярного растворителя можно снять с силикагеля промежуточный продукт синтеза для очистки и идентификации. Этим методом синтезировали защищенный окситоцин, тетрапептид гастрин и другие короткие пептиды.

Названные ступенчатые методы построения пептидных цепей подчеркивают многообразие вариантов этой стратегии.

#### 2.2.10.1.2. Стратегия фрагментной конденсации

Упомянутые выше лимитирующие факторы ступенчатого метода в гомогенном растворе, а также недостатки ступенчатого удлинения цепей на второй фазе не позволяют получать длинноцепочечные полипептиды или белки. В качестве альтернативы служит фрагментная конденсация.

Обычное до сих пор в пептидной химии понятие *фрагментная конденсация* предложено [26] заменить на более точное выражение *сегментная конденсация*. При этом более понятно, что подразумевается не обломок последовательности, а отрезок ее, сегмент. Между тем при семисинтезе (разд. 2.2.10.1.3) употребляются преимущественно именно фрагменты белков в качестве промежуточных ступеней синтеза, так что в этой связи понятие фрагментной конденсации должно бы сохраниться. Следует упомянуть, однако, что фрагменты перед конденсацией часто модифицируются и, таким образом, теряют характер истинных фрагментов (обломков).

Решающее значение для успеха синтеза длинноцепочечных объектов имеет правильное разделение всей последовательности на фрагменты. Всеобъемлющих правил для расчленения на фрагменты не существует. Можно разделить последовательность на два приблизительно равных по размеру фрагмента, чем облегчается последующая очистка благодаря различию свойств исходных и конечных продуктов. Можно, напротив, соединять крупный фрагмент с короткими карбокси- или аминокомпонентами.

Длинные карбоксильные компоненты трудно активируются, и, кроме того, необходимые для реакции избытки едва ли оправданы с экономической точки зрения. В то же время при неполном превращении длинноцепочечные аминокомпоненты труднее отделять из-за плохой растворимости.

При разделении последовательности на отрезки следует учитывать опасность рацемизации при последующем их соединении. Кроме того, пеп-

тидная конденсация должна протекать по возможности без подобных реакций.

Разделение по связям у пролина или глицина допускает, например, любое активирование без риска рацемизации. Конечно, в пептидах и белках пролиновые и глициновые остатки не всегда удобно распределены по цепи. Кроме того, чтобы гарантировать возможно более высокий выход при реакции конденсации, нужно учитывать еще ряд факторов: С-концевой остаток аминокислоты в карбоксильном компоненте должен легко активироваться, N-концевая аминокислота аминоккомпонента должна быть стерически менее затрудненной и т. д. По-прежнему трудности связаны с проблемой рацемизации при конденсации фрагментов. Так, Риникер и сотр. [536] при конденсации фрагмента инсулина В(1—16), содержащего С-концевой тирозин, с фрагментом А(14—21)/В(17—30) по методу Гайгер — Кёнига наблюдали сильную рацемизацию остатка тирозина. Выход диастереомера D-Тур-В<sup>16</sup> 30%. При перенесении места соединения на связь Leu<sup>15</sup>-Тур<sup>16</sup> и применение ДЦГК-метода с добавкой гидроксibenзотриазола с 10%-ным выходом был получен нежелательный диастереомер D-Leu-В<sup>15</sup>. Оптическая чистота аминокислотных составляющих определялась газохроматографически (после проведения полного гидролиза и перевода в изопропиловые эфиры трифторацетиламинокислот) по методам Гил-Ав и Фейбуша [537] или же Кёнига и Николсона [538].

Из приведенных данных видно, что методы конденсации, практическая безопасность которых была установлена разными тестами на рацемизацию (разд. 2.2.6.2), дают неожиданные результаты при изменении условий. Может быть, при дальнейшем развитии ферментативного пептидного синтеза (разд. 2.2.5.8) удастся соединять особенно опасные в отношении рацемизации фрагменты с помощью фермента.

Следует, наконец, упомянуть и об обоюдной связи между стратегией и тактикой защитных групп, так как при определенных комбинациях защитных групп сужаются возможности стратегического варьирования.

Фрагментная конденсация проводится главным образом в гомогенных растворах, так что проблемы растворимости и способности к активированию могут быть лимитирующими факторами. Соединение двух фрагментов протекает по кинетики 2-го порядка, причем быстрая реакция возможна только при наличии достаточно высоких концентраций обоих реагирующих партнеров. Из-за снижающейся с ростом пептидной цепи растворимости достаточная концентрация партнеров реакции труднодостижима в случае фрагментов, имеющих более 50 аминокислотных остатков. Решением проблемы могло бы быть такое соединение фрагментов, которое основано на не зависящей от концентрации внутримолекулярной перегруппировке. Можно предположить, что эту проблему можно решить с помощью метода Уги и метода аминной «ловушки» (разд. 2.2.5.7).

*Фрагментная конденсация на второй фазе* тоже возможна. Этот принцип описан Вейгандом и Рагнарсоном [539] уже в 1966 г. На примере различных синтезов, однако, этот вариант не представляется решением проблемы, так как ему присущи все уже известные недостатки твердофазного метода.



### 2.2.10.1.3. Семисинтез [540, 541]

Из изложенного материала по стратегическим возможностям синтеза пептидов и белков можно сделать вывод, что в настоящее время химический синтез модифицированных пептидов ограничен примерно 100 аминокислотными остатками. В то же время значительно вырос интерес к модифицированным белкам для молекулярно-биологических и медицинских исследований. Хотя с помощью методов химического синтеза можно получать некоторые небольшие белки, необходимые для этого затраты не идут ни в какое сравнение с достигнутыми результатами. Кроме того, в настоящее время только очень немногие высокоспециализированные лаборатории в состоянии проводить такие синтезы.

В 60-е годы некоторые группы начали заниматься семисинтезом пептидов и белков. При семисинтезе фрагменты природных белков используются в качестве промежуточных продуктов для получения новых белков с измененной последовательностью. О теоретических и практических аспектах семисинтеза исчерпывающе сообщил пионер этой стратегии Оффорд [540].

Различают нековалентный и ковалентный семисинтез.

*Нековалентные семисинтезы* основаны на том факте, что различные белки после расщепления на фрагменты и их разделения при рекомбинации образуют биологически активные нековалентные комплексы. Классический пример — рибонуклеаза А из поджелудочной железы быка (рис. 3-24), которая расщепляется бактериальной протеазой субтилизинном на так называемые S-пептид (1—20) и S-белок (21—124), а после рекомбинации разделенных продуктов расщепления показывает полную ферментативную активность. Для рекомбинации с нативным S-белком использовались аналоги S-пептида, синтезированные химически, при этом были получены ценные данные по связи между структурой и функцией.

Другими подходящими для нековалентных семисинтетических операций белками являются стафилококковые нуклеазы, цитохром с, тиоредоксин и миоглобин. Цитохром с расщепляется бромцианом на фрагменты 1—65 и 66—104. Коррадин и Харбури в 1971 г. предположили образование при рекомбинации продуктов расщепления цитохрома с нековалентных комплексов. Однако позже они показали, что полученное при расщеплении бромцианом лактонное кольцо гомосерина-65 реагирует с  $\alpha$ -аминогруппой фрагмента 66—104 с образованием пептидной связи и получается [Hse<sup>65</sup>]-цитохром с. Семисинтетическое изучение цитохрома с описано Харбури, Валласом, Харрисом и Тессером [540].

*Ковалентные семисинтезы* осуществляются посредством образования дисульфидных мостиков или пептидных связей. Примеры соединения через дисульфидные мостики — многочисленные комбинации природных и синтезированных химически цепей инсулина в гибридные инсулины. Большая часть используемых на практике семисинтезов основана на образовании пептидной связи.

*Семисинтез с образованием пептидной связи* можно в свою очередь разделить на ступенчатый семисинтез и семисинтез посредством фрагментной конденсации.

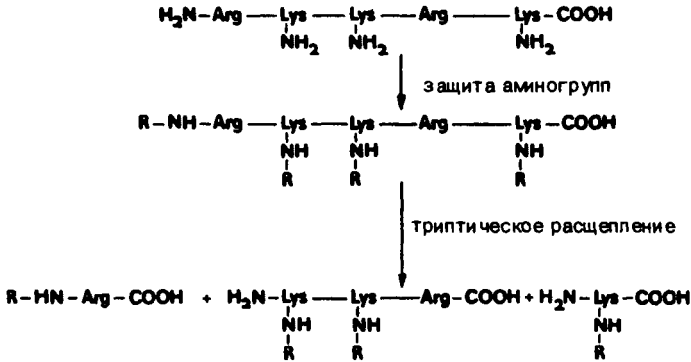
Для семисинтеза вообще необходимы следующие операции:

- обратимая защита перед расщеплением;
- расщепление и разделение фрагментов;
- обратимая защита после расщепления;
- модификация или замена одного фрагмента;
- конденсация фрагментов;
- деблокирование, очистка и идентификация аналога.

*Ступенчатый семисинтез* заключается в селективном отщеплении одного или нескольких аминокислотных остатков от одного конца цепи с по-

мощью метода Эдмана (разд. 3.6.1.2.2.1) с последующим замещением новыми остатками аминокислот. Инсулин особенно часто служил объектом таких семисинтезов. Ступенчатым семисинтезом от него произведено от 30 до 40 аналогов. Классический пример семисинтетической модификации N-конца В-цепи инсулина показан на рис. 2-28. Основные работы по инсулину проведены группами Бранденбурга, Крейля, Гейгер и Оффорда. Другие объекты семисинтеза — трипсин, ферредоксин, фосфолипаза А2', миоглобин, цитохром с.

**Фрагментные семисинтезы.** Семисинтезы с применением фрагментной конденсации гораздо сложнее ступенчатых семисинтезов. Трудную проблему представляет селективная защита концевых и находящихся в боковых цепях amino- и карбоксильных групп. Гольдбергер и Анфинсен в 1962 г. предложили следующий путь дифференцирования ε-аминогрупп и α-аминогрупп:



Для практического применения важно, чтобы при введении защитных групп растворимость не уменьшалась. К сожалению, большинство обратимых карбоксизащитных групп оказывает отрицательное влияние на растворимость. Для этерификации часто применяют 4-метоксифенилдиазометан.

Для фрагментирования наряду с трипсином часто применяется бромциановый метод (разд. 3.6.1.1). О бромциановом расщеплении цитохрома с уже сообщалось. Кроме того, фрагментно-синтетические работы проводились с лизоцимом (Рис и Оффорд, 1976 г.), карбоангидразой В (Фельш и сотр., 1974 г.), стафилококковой нуклеазой (Белло, 1975 г.), а также меланотропином (Буртон и Ланде, 1970 г.) и другими объектами.

Следует заметить, что стадия конденсации в случае фрагментных семисинтезов сопряжена с гораздо более значительными трудностями. Большое значение приобретает использование ферментов для соединения пептидов [540] (разд. 2.2.5.8).

Необходимы еще поиски лучших растворителей, активирующих реагентов и защитных групп. При этом учитывается интерес к таким защитным группам, которые не влияют на распределение заряда в защищенных фраг-

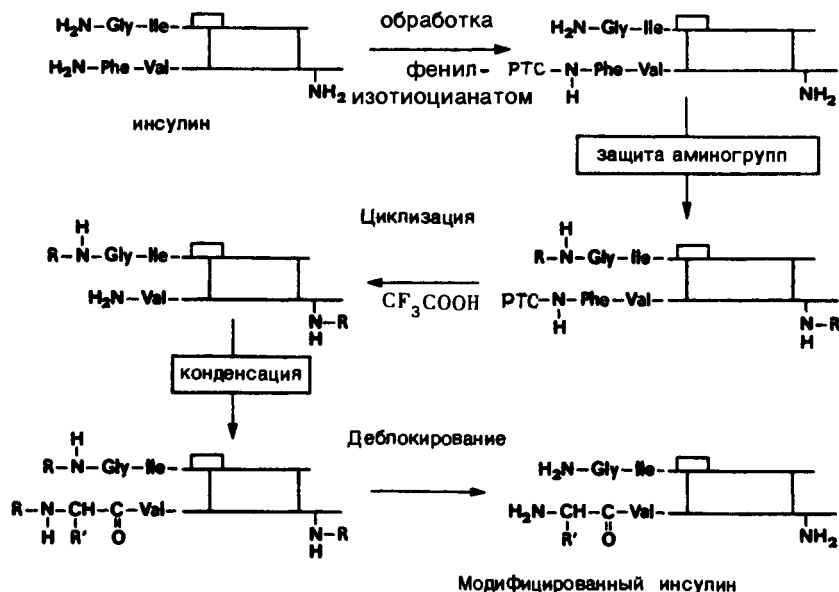


Рис. 2-28. Модификация N-конца В-цепи инсулина в семисинтезе [540].

ментах. В этой связи следует обратить внимание на изучение водных или водно-органических систем растворителей.

Итак, следует констатировать, что семисинтез не всегда легко осуществить. Здесь так же как и в случае химического синтеза, возможны методические улучшения, касающиеся универсальности метода. Оба этих метода должны способствовать разрешению насущных задач стратегии.

### 2.2.10.2. Тактика пептидного синтеза

В то время как последовательность соединения аминокислотных остатков в пептид определена стратегией пептидного синтеза, оптимальная комбинация защитных групп и метод конденсации для каждого случая образования пептидной связи выбираются тактикой.

#### 2.2.10.2.1. Выбор комбинации защитных групп

Для обратимого блокирования концевых и боковых основных, кислых и спиртовых групп аминокислот существует большое число защитных групп (разд. 2.2.4), выбор которых определяется стратегией синтеза и селективностью их отщепления. Небольшие пептиды, а также участки последовательностей для фрагментной конденсации лучше всего могут быть синтезированы ступенчато с С-конца. При обсуждении отдельных защитных групп

уже было показано, что одни функциональные группы должны быть защищены обязательно, в то время как другие могут быть защищены, но их защита не всегда необходима. Обязательна защита аминогрупп, не принимающих участия в образовании пептидной связи, а также тиольных групп цистеинов. Защита дополнительных карбоксильных групп не всегда необходима. Аргинин можно вводить в синтез с протонированной гуанидиновой группой. Степень защиты боковых групп трифункциональных аминокислот зависит от цели синтеза и от выбранного метода конденсации. Например, при классическом синтезе боковые функциональные группы серина, треонина, тирозина или гистидина могут оставаться незащищенными, если для конденсации используют азидный метод или некоторые активированные эфиры. В то же время при синтезе пептидов в двухфазной системе обычно берут большой избыток ацилирующего компонента, что приводит к ацилированию окси- и имидазольных групп. В этом случае защита этих групп имеет существенное значение.

Если для синтеза выбрана классическая методика, то в зависимости от стратегии возможна тактика максимальной или минимальной защиты.

*Тактика максимальной защиты* использована на практике Вюншем при полном синтезе глюкагона. Преимущества тактики полной защиты заключаются в максимальном предотвращении нежелательных побочных реакций и в гибкости выбора метода конденсации. Невозможная возникающая проблема растворимости ограничивает длину синтезируемого пептида до 30—50 аминокислотных остатков, что определяется конкретной последовательностью. Однако проведенный Ивановым и сотр. полный синтез  $\alpha$ -бунгаротоксина, содержащего 74 аминокислотных остатков, убеждает, что предполагаемую предельную длину пептида можно превзойти. Но в целом тактика максимальной защиты страдает одним недостатком: в процессе деблокирования выход продукта может снизиться.

*Тактика минимальной защиты* эффектно продемонстрирована Хиршманом при полном синтезе S-белка рибонуклеазы А. Пептидная цепь из 103 аминокислот содержит все трифункциональные аминокислоты, исключая триптофан, в которых были защищены только  $\epsilon$ -амино- и тиольные группы. Вследствие частичной защиты синтез фрагментов и последующая их конденсация (сборка) могли быть проведены лишь немногими методами (с применением НКА и НТА, N-гидроксисукцинимидных эфиров и азидным методом). Само собой разумеется, что опасность побочных реакций при минимальной защите велика, поэтому фрагменты после их синтеза должны быть очень тщательно очищены. Деблокирование защитных функций обычно протекает без осложнений.

Различие тактики максимальной и минимальной защиты продемонстрировано на трех напептидах (рис. 2-29).

На практике, однако, не всегда используют тактику защиты в экстремальных вариантах. Чаще синтез планируется в приближении к тому или иному варианту, что зависит от синтезируемой последовательности.

Классификация защитных групп на временные и постоянные и их роль подробно обсуждалась в разд. 2.2.2 и 2.2.4. Важнейшая проблема тактики

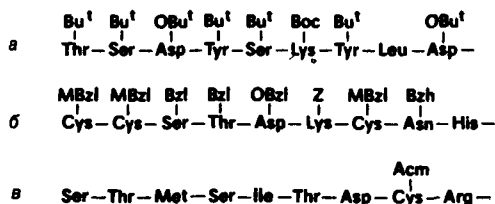


Рис. 2-29. Применение техники максимальной и минимальной защиты.

защитных групп состоит в селективности отщепления временных и постоянных групп. Деблокирование постоянных защитных групп должно протекать без побочных реакций и разрушений продукта. Реализация этих требований вызывает весьма большие затруднения. В настоящее время разработано еще очень мало универсальных методов деблокирования, поэтому для дифференцированного отщепления защитных групп должны быть использованы различные подходы. Селективность деблокирования должна быть обеспечена как при удалении временных защитных групп, так и постоянных.

В данной книге не представляется возможным изложить даже в общих чертах проблемы, связанные с деблокированием защитных групп. Остановимся лишь на некоторых из многих описанных в литературе методах селективного отщепления защитных групп.

Например, ставшие классическими синтезы окситоцина, вазопрессина и инсулина спланированы так, что временные защитные группы удалялись *ацидолизом*, постоянные — *восстановлением* после завершения синтеза. Защита  $\alpha$ -аминогрупп осуществлялась бензилоксикарбонильной группой, которая деблокировалась при обработке бромоводородом в уксусной кислоте, в то время как  $\epsilon$ -аминогруппы остатков лизина и гуанидиновые группы остатков аргинина были защищены тозилными группами, удаляемыми лишь восстановлением натрием в жидком аммиаке. Но, поскольку обработка натрием в жидком аммиаке ведет к различным повреждениям продукта, эту методику восстановительного отщепления применяют теперь редко.

При отсутствии в пептиде серусодержащих аминокислот бензилоксикарбонильные группы, используемые для промежуточного блокирования, могут быть отщеплены гидрогенолизом, тогда в качестве постоянных защитных групп можно применять группы *трет*-бутильного типа, устойчивые к восстановлению. В этом случае окончательное деблокирование осуществляют *ацидолизом*.

Большие усилия были предприняты с целью поиска лучших условий селективного отщепления кислотолабильных защитных групп. Основное внимание уделялось селективному отщеплению аминокислотных групп, особенно Boc-группы, в присутствии бензилоксикарбонильных остатков, так как при применении трифторуксусной кислоты и HCl в органических раствори-

телях селективность не всегда была удовлетворительной. Согласно Шнабелю [542], 70%-ная водная трифторуксусная кислота, а также смесь трифторуксусной кислоты (70%) и ледяной уксусной кислоты (30%) [543] обладают высокой селективностью действия при деблокировании. При наличии триптофана в объекте синтеза для ацидолитического отщепления более предпочтителен 0,1 н. HCl в муравьиной кислоте [544]. (Этот деблокирующий реагент предложен для твердофазного синтеза Оно с сотр.) В неполярных растворителях Вос-группу можно селективно удалить (в присутствии Z-группы) действием эквимольного количества триметилсилилперхлората [545]. Следует отметить успехи, достигнутые Риникером и сотр. [546]. При проведении *селективного ацидолиза* тритильную группу в присутствии других групп можно селективно отщеплять обработкой HCl в трифторэтанол. Кинетическими исследованиями показано, что в системе HCl/трифторэтанол при pH 1 Вос-группа в ~2500 раз стабильнее, чем Врос-группа, а при pH 0 ее устойчивость в 1500 раз больше, чем 2-фенилизопропилоксикарбонильной группы.

В последние годы отмечается повышенный интерес к кислотоустойчивым временным защитным группам, отщепляемым в слабощелочных условиях (разд. 2.2.4.1 и табл. 2-1). Такие группы можно использовать в комбинации с постоянными защитными группами *трет*-бутильного типа. Комбинация этих защитных групп была с успехом применена при синтезе пептидов по Меррифилду (разд. 2.2.7). Эта так называемая *ортогональная концепция защиты* для твердофазного синтеза очень интересна с тактической точки зрения (с. 185). И наконец, следует обратить внимание на уже обсуждавшуюся возможность фотолитического отщепления защитных групп, а также упомянуть защитные группы, которые можно удалить лишь в особых условиях (например, с помощью протеаз). Значение *ферментативного деблокирования* [476, 552—555] в будущем может возрасти.

Интересным также кажется путь *полного деблокирования* на конечной стадии синтеза с помощью таких сильноокислых реагентов, как HF [63],  $\text{BBr}_3$  в метиленхлориде [547], трифторацетат бора [427], трифторметансульфокислота  $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$  [548], метансульфокислота  $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$  [549], комплекс HF — пиридин [550] и др. И наконец, такие защитные группы, как тозилная, тритильная, дифенилметильная, бензильная и карбобензоксигруппа, удаляются электрохимически [551].

Для синтеза  $\alpha$ - и  $\epsilon$ -пептидов из аминокислотных кислот необходимо блокирование карбоксильной группы. Эта сложная проблема подробно рассмотрена в превосходной монографии Вюнша [29].

На рис. 2-30 приведены данные, характеризующие устойчивость некоторых защитных групп в стандартных условиях. Как показывает опыт, к подобным сведениям следует относиться с известной осторожностью, но общие рекомендации не всегда применимы. Способность к деблокированию или устойчивость в данных условиях зависит прежде всего от определенной системы, что трудно отразить в таблице. Первое систематическое исследование различных N-защитных групп в этом направлении предпринято уже сравнительно давно (в 1953 г.) Буассона и Прайтнером [556]. Скорость от-

Постоянные защитные группы	Временные защитные группы	для аминогруппы										для карбоксила					
		Z		Boc		Nps		Bpsc		Trt		OMe/OEt		OBzl		OtBu	
		s	g	s	g	s	g	s	g	s	g	s	g	s	g	s	g
для аминогруппы	Z	-	H <sub>2</sub> /NH <sub>3</sub> HBr	TFA	HBr	HCl	HBr	AcOH	HBr	AcOH	H <sub>2</sub> /NH <sub>3</sub> HBr	OH <sup>⊖</sup>	-	OH <sup>⊖</sup>	H <sub>2</sub> /NH <sub>3</sub> HBr	TFA	HBr
	Boc	H <sub>2</sub>	HBr	-	TFA	SH HCl	TFA	AcOH	TFA	AcOH	TFA	OH <sup>⊖</sup>	-	OH <sup>⊖</sup> H <sub>2</sub>	HF	-	TFA
	Toe	H <sub>2</sub> HBr	Na/ NH <sub>3</sub>	TFA	-	HCl		AcOH		AcOH	Na/ NH <sub>3</sub>	OH <sup>⊖</sup>	-	OH <sup>⊖</sup> H <sub>2</sub>	Na/ NH <sub>3</sub>	TFA	-
для карбоксила	OMe OEt	H <sub>2</sub> HBr	-	TFA	-	HCl	-	AcOH	-	AcOH	-	-	OH <sup>⊖</sup>	H <sub>2</sub>	OH <sup>⊖</sup>	TFA	-
	OtBu	H <sub>2</sub> Na/NH <sub>3</sub>	HBr	-	TFA	SH HCl	TFA	AcOH	TFA	AcOH	TFA	OH <sup>⊖</sup>	-	H <sub>2</sub> Na/NH <sub>3</sub>	HF	-	TFA
	OBzl	(HBr)	H <sub>2</sub> /NH <sub>3</sub> HF	TFA	HF	HCl	HF	AcOH		AcOH	H <sub>2</sub> /NH <sub>3</sub> HF	-	OH <sup>⊖</sup>	-	H <sub>2</sub> Na/NH <sub>3</sub> HF	TFA	HF (HBr)
для гидроксигруппы	Bzl		H <sub>2</sub> /NH <sub>3</sub> HF	TFA	HF	HCl	HF	AcOH	HF	AcOH	H <sub>2</sub> /NH <sub>3</sub> HF	OH <sup>⊖</sup>		OH <sup>⊖</sup>	H <sub>2</sub> /NH <sub>3</sub> HF	TFA	HF
	tBu	H <sub>2</sub> Na/NH <sub>3</sub>	HBr		TFA	SH HCl	TFA	AcOH	TFA	AcOH	TFA	OH <sup>⊖</sup>	-	OH <sup>⊖</sup> H <sub>2</sub>	HF		TFA
для гидроксидной группы	NO <sub>2</sub>	HBr	H <sub>2</sub> HF	TFA	HF	HCl	HF	AcOH	HF	AcOH	H <sub>2</sub> HF	OH <sup>⊖</sup>	-	OH <sup>⊖</sup>	H <sub>2</sub> HF	TFA	HF
	Toe	H <sub>2</sub> HBr	Na/NH <sub>3</sub> HF	TFA	HF	HCl	HF	AcOH	HF	AcOH	Na/NH <sub>3</sub> HF	OH <sup>⊖</sup>	-	H <sub>2</sub> OH <sup>⊖</sup>	Na/NH <sub>3</sub> HF	TFA	HF
для имидозола	Bzl	HBr (H <sub>2</sub> )	H <sub>2</sub> Na/NH <sub>3</sub>	TFA	-	HCl	-	AcOH	-	AcOH	Na/ NH <sub>3</sub>	OH <sup>⊖</sup>	-	OH <sup>⊖</sup>	H <sub>2</sub> Na/NH <sub>3</sub>	TFA	-
	Bzl	HBr	Na/ NH <sub>3</sub>	TFA	-	HCl		AcOH		AcOH	Na/ NH <sub>3</sub>	OH <sup>⊖</sup>	-	OH <sup>⊖</sup>	Na/ NH <sub>3</sub>	TFA	-
	BzlOMe	-	Na/NH <sub>3</sub> HF	TFA	HF	SH HCl	HF	AcOH	HF	AcOH	Na/NH <sub>3</sub> HF	OH <sup>⊖</sup>	-	OH <sup>⊖</sup>	Na/NH <sub>3</sub> HF	TFA	HF
	Trt	-	Na/NH <sub>3</sub> HF		HF	SH HCl	HF	AcOH	HF	AcOH	Na/NH <sub>3</sub> HF	OH <sup>⊖</sup>	-	OH <sup>⊖</sup>	Na/NH <sub>3</sub> HF		HF
	AcM	HBr		TFA	-	HCl	-	AcOH	-	AcOH	-	(OH <sup>⊖</sup> )	-	(OH <sup>⊖</sup> )		TFA	-
	S-tBu S-Et	HBr	Na/ NH <sub>3</sub>	TFA	-	HCl	-	AcOH	-	AcOH	Na/ NH <sub>3</sub>	-	-	-	-	Na/ NH <sub>3</sub>	TFA

Рис. 2-30. Возможные комбинации некоторых защитных групп [30].

Обозначения: s — селективное удаление временной защитной группы; g — удаление одновременно обеих групп.

щепления различных замещенных бензилоксикарбонильных остатков при действии НВг в уксусной кислоте изучали Блага и Рудингер [557], кроме того, Лоссе и др. [558] проводили кинетические исследования кислотности деблокирования N- и C-защитных групп. В последние годы появилось много новых возможностей для блокирования, поэтому подробное изучение селективности отщепления защитных групп в различных условиях — весьма трудоемкая задача.

К рис. 2-30 следует обращаться лишь для предварительного приблизительного выбора тактики защиты. Для того чтобы правильно остановиться на комбинации защитных групп, надо хорошо представлять процесс блокирования и обязательно учитывать экспериментаторский опыт.

#### 2.2.10.2.2. Метод конденсации

Располагая очень многими методами конденсации, на первый взгляд кажется очень трудным выбрать необходимую методику для конкретного синтеза. Однако установившиеся стратегия и тактика использования защитных групп существенно ограничивают число возможных вариантов. Кроме того, из более чем 130 известных методов конденсации, упоминавшихся в разд. 2.2.5, лишь немногие применяются на практике.

Образование пептидной связи может протекать как одно- или двухстадийный процесс (разд. 2.2.2).

При *одностадийном процессе* активация свободной карбоксильной группы идет в присутствии аминок компонента. Прототип этого варианта синтеза — конденсация с участием дициклогексилкарбодимида (все не участвующие в конденсации карбоксильные группы должны быть предварительно защищены). Только при эквимолярном количестве amino- и карбоксикомпонентов можно отказаться от защиты гидроксигрупп.

При *двухстадийном процессе* собственно реакции конденсации предшествует активация карбоксильного компонента. В качестве примера можно привести метод смешанных ангидридов. Чаще всего в многочисленных вариантах метода активированных эфиров для активации карбоксильной группы, т. е. для образования активированного эфира, используют какой-либо метод конденсации, обычно это ДЦГК- или ангидридный метод. Для самой реакции образования пептидной связи справедливы такие же требования к защите, как и при одноступенчатом процессе, за исключением того, что дополнительные карбоксигруппы аминок компонента могут оставаться незащищенными.

Особым случаем двухстадийного процесса, имеющим большое практическое значение, является азидная конденсация. В отличие от метода активированных эфиров, здесь активация протекает через промежуточную ступень образования гидразида. Другие чувствительные к гидразину группы в карбоксикомпоненте должны отсутствовать. Азидный метод позволяет осуществить тактику минимальной защиты. Синтезы с незащищенной гидроксигруппой наиболее важны с практической точки зрения; это же отно-



сится и к синтезам, в которых остаются незащищенными дополнительные карбоксильные группы, как в амино-, так и в карбоксикомпоненте.

Существенный момент при выборе метода конденсации — свобода от рацемизации. Возможности исключения или значительного снижения рацемизации подробно рассмотрены в разд. 2.2.6.1, а также совместно со стратегией фрагментной конденсации (разд. 2.2.10.1).

### 2.2.10.3. *Возможности и ограничения пептидного синтеза*

Кратко изложив стратегию и тактику пептидного синтеза, попробуем проанализировать его современное состояние. Методические возможности, которыми располагает исследователь, достаточны, чтобы осуществить синтез небольшого белка. Приведенные в табл. 2-9 данные по твердофазному пептидному синтезу убедительно показывают, что относительно быстро можно построить длинные пептидные цепи. Но так как в результате получаются, как правило, только трудно или вообще неочищаемые продукты, этим методом целесообразно синтезировать только короткие пептиды, а также аналоги и фрагменты с максимальным числом аминокислотных остатков от 10 до 15.

Применение современной техники разделения, особенно высокоэффективной жидкостной хроматографии, позволяет относительно хорошо очистить пептиды, содержащие 3—10 аминокислотных остатков. Для построения длинных полипептидов и небольших белковых молекул подходит только классический метод конденсации фрагментов. Синтез фрагментов производят либо в растворе путем ступенчатого удлинения пептидной цепи, либо

Таблица 2-11. Биологически активные пептиды и белки, синтезированные классическим методом в гомогенном растворе

Объект синтеза	Число аминокислотных остатков	Год синтеза	Литература
Лизоцим (аналог)	129	1979 <sup>a</sup>	559
Рибонуклеаза А	124	1981	560
S-Белок рибонуклеазы	104	1969	255
Проинсулин (человека)	86	1977	561, 561
Инсулин	51	1974	495
АКТГ (свиньи)	39	1963	563
АКТГ (человека)	39	1967	564
Бунгаротоксин	74	1979	565
Глюкагон	29	1967	566
Секретин	27	1966	567
Окситоцин	9	1953	493

<sup>a</sup> Синтез еще не завершен.

в определенных случаях методом Меррифилда. В табл. 2-11 приведены отдельные примеры пептидов и белков, полученных с помощью классического метода.

Данные, приведенные в табл. 2-11, хотя и не полностью демонстрируют все достижения, однако они отражают тенденцию применения классического метода синтеза для получения белков. В общем объекты такой величины демонстрируют границы современного химического синтеза, правда в отдельных случаях этот предел может быть преодолен. На причины этого здесь уже многократно указывали. Наибольшие трудности встречаются при конденсации фрагментов из 50 или более аминокислотных остатков.

Можно думать, что химики-синтетики найдут в будущем пути и средства для решения сегодняшних проблем. Химический синтез белков с аминокислотными заместителями в последующие десятилетия будет важным средством для выяснения вопросов,

<u>Лабораторный синтез</u>	
Boc-Ser-Tyr-Ser-Met-NH-NH <sub>2</sub>	1 - 4
$\begin{array}{c} \text{OBu}^t \qquad \qquad \text{NO}_2 \\   \qquad \qquad \qquad   \\ \text{Z-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH} \end{array}$	5 - 10
$\begin{array}{c} \text{Boc} \\   \\ \text{Pz-Lys-Pro-Val-Gly-NH-NH}_2 \end{array}$	11 - 14
$\begin{array}{c} \text{Boc} \quad \text{Boc} \quad \text{NO}_2 \quad \text{NO}_2 \\   \quad   \quad   \quad   \\ \text{Trt-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-OMe} \end{array}$	15 - 19
$\begin{array}{c} \text{Boc} \\   \\ \text{Z-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-OBu}^t \end{array}$	20 - 24
	$\left. \begin{array}{l} 1 - 4 \\ 5 - 10 \\ 11 - 14 \\ 15 - 19 \\ 20 - 24 \end{array} \right\} \begin{array}{l} 1 - 10 \\ 11 - 19 \\ 11 - 24 \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} 1 - 4 \\ 5 - 10 \\ 11 - 14 \\ 15 - 19 \\ 20 - 24 \end{array}} \right\} 1 - 24$
<u>Промышленный синтез</u>	
Boc-Ser-Tyr-Ser-Met-NH-NH <sub>2</sub>	1 - 4
$\begin{array}{c} \text{OBu}^t \\   \\ \text{Z-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH} \end{array}$	5 - 10
$\begin{array}{c} \text{Boc} \\   \\ \text{Z-Lys-Pro-Val-Gly-OH} \end{array}$	11 - 14
$\begin{array}{c} \text{Boc} \quad \text{Boc} \\   \quad   \\ \text{Z-Lys-Lys-OMe} \end{array}$	15 - 16
Z-Arg-Arg-Pro-OH	17 - 19
$\begin{array}{c} \text{Boc} \\   \\ \text{Z-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-OBu}^t \end{array}$	20 - 24
	$\left. \begin{array}{l} 1 - 4 \\ 5 - 10 \\ 11 - 14 \\ 15 - 16 \\ 17 - 19 \\ 20 - 24 \end{array} \right\} \begin{array}{l} 1 - 10 \\ 11 - 16 \\ 17 - 24 \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} 1 - 4 \\ 5 - 10 \\ 11 - 14 \\ 15 - 16 \\ 17 - 19 \\ 20 - 24 \end{array}} \right\} 1 - 24$

Рис. 2-31. Различные тактико-стратегические концепции синтеза АКГГ [1-24] [568].

возникающих в молекулярной биологии и энзимологии. Целесообразным может быть комбинированное применение химического синтеза и методов генной инженерии. Остается только ожидать, когда уже осуществленное в нескольких случаях введение синтетических генов в бактериальные хромосомы может быть использовано в синтезе биологически активных пептидов и белков в более крупных масштабах.

В заключение следует остановиться на потенциальных возможностях использования пептидного синтеза для *промышленного производства пептидов* и возникающих в связи с этим проблемах. По сравнению с большим числом доступных для химического синтеза пептидных препаратов доля их промышленного производства для нужд фармакологии очень мала. Причины такого несоответствия весьма многообразны. Во-первых, учреждения здравоохранения обладают правом предъявлять высокие требования к чистоте производимых пептидных препаратов. Биологические, фарма-

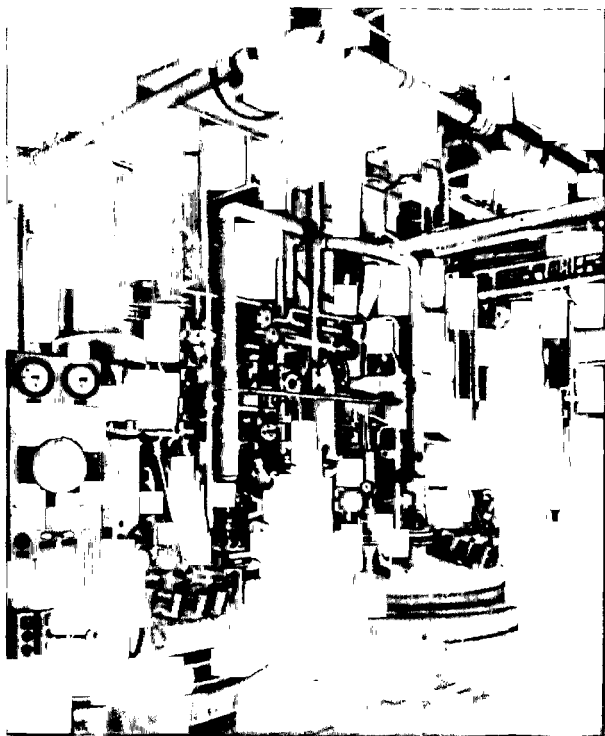


Рис. 2-32. Реактор для промышленного пептидного синтеза [568].

кологические и медицинские тесты, необходимые для допуска препарата в качестве лекарственного средства, составляют обширную, очень дорогостоящую программу исследований. До настоящего времени такие испытания проводились с относительно небольшим числом биологических активных пептидов. Во-вторых, высокая себестоимость промышленной пептидной продукции обусловлена помимо стоимости исходных веществ и вспомогательных материалов очень сложной и дорогостоящей методикой проведения процесса, где каждый промежуточный продукт многоступенчатого пептидного синтеза должен быть однозначно аналитически охарактеризован. Очень много внимания должно быть также посвящено очистке конечных продуктов промышленного производства.

Стратегия и тактика химического синтеза пептидных препаратов на стадии исследования, при препаративной наработке в лабораторных условиях и при промышленном производстве совершенно различны.

Лабораторный синтез служит для приготовления пептидов в небольших количествах, достаточных для получения их характеристики и первых фармакологических исследований. Для исключения фактора риска такой синтез в основном строится по принципу максимальной защиты. На следующих стадиях разработки технологии крупномасштабного синтеза уже необходи-

Таблица 2-12. Некоторые производимые в промышленности пептидные гормоны

Пептид	Число аминокислотных остатков	Торговое название	Фирма и год предложения
Окситоцин	9	Syntocinon	Sandoz (1956)
Метилнокситоцин	9	Remestyp	SPOFA (1967)
[Asn <sup>1</sup> , Val <sup>3</sup> ]ангиотензин II	8	Hypertensin	CIBA (1959)
[Lys <sup>8</sup> ]вазопрессин	9	Vasopressin Diapid (США)	Sandoz (1961) Sandoz (1970)
АКТГ (1—24)	24	Synacthen	CIBA (1967)
АКТГ (1—28) и (1—32)	28(32)	Humacthid	Gedeon-Richter (1970)
Пентагастрин	5	Peptavlon	ICI (1969)
Дезаминоокситоцин	9	Sandopart	Sandoz (1971)
Дезамино-D-Arg-вазопрессин	9	Minirin	Ferring (1973)
Тиреолиберин	3	TRF Tiregan	Roche (1974) Hoechst
Кальцитонин (лососевых)	32	Thypionone Calcitonin Calcimar	Abbott Sandoz (1974) Armour (1975)
Гонадолиберин	10	Relisorm L	Abbott (1975)
Кальцитонин (человека)	32	Cibacalcin	Ciba-Geigy (1977)
Триглицил[Lys <sup>8</sup> ]вазопрессин	12	Glypressin	Ferring (1977)
АКТГ (человека)	39		Armour (1977)

мо учитывать требования промышленного производства. Соединение разбивают на наиболее удачные фрагменты, используя принцип минимальных защит, и подбирают несложные методы конденсации и очистки.

Рис. 2-31 на примере АКТГ (1—24) [568] хорошо иллюстрирует различные подходы при осуществлении лабораторного и промышленного синтеза. Вообще говоря, крупнолабораторная пилотная и производственная установки по производительности различаются незначительно. Процесс протекает чаще всего в реакторах из нержавеющей стали или в эмалированных реакторах; реакторы снабжены обычными мешалками, паропроводами, холодильниками и сборниками. Типичный реактор на 200 галлонов ( $\sim 0,76 \text{ м}^3$ ) для производства пептидов изображен на рис. 2-32 [568]. Нагревающая и охлаждающая системы делают возможным терморегулирование в реакторе в интервале  $-20 + +70 \text{ }^\circ\text{C}$ .

При проведении гидролиза для сокращения времени реакции применяют специальные высокоскоростные мешалки. Очистка конечного продукта составляет отдельную стадию производства. Противоточное распределение, по-видимому, хорошо подходит для очистки синтетических пептидов в промышленных масштабах [568]. В табл. 2-12 приведены некоторые гормоны, производимые в промышленности.

### 2.3. Биологически активные пептиды

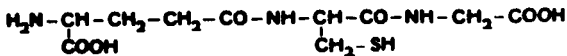
За последние годы число пептидов, найденных в живых системах, сильно возросло. В период 1944—1954 гг. были разработаны основные аналитические методы выделения, очистки и установления структуры пептидов. Однако исследования некоторых пептидов, особенно пептидов головного мозга, совершенно не развивались, так как были неизвестны соответствующие аналитические методы определения нанোগраммовых ( $10^{-9}$  г) или меньших количеств вещества. Лишь с развитием радиоиммунного анализа (RIA) (Р. С. Ялоу, лауреат Нобелевской премии 1977 г. по физиологии и медицине, и С. Берсон) стали возможны определения исключительно малых концентраций пептидов в соответствующих препаратах. Например, некоторые гормоны можно обнаружить при содержании  $10^{-12}$  г в 1 мл крови. Развитие радиоиммунного метода позволило начать исследование нейрогормонов гипоталамуса. Гийемен и Шалли (получившие вместе с Ялоу Нобелевскую премию по физиологии и медицине) смогли привести экспериментальные доказательства того, что центральная нервная система модулирует активность гипоталамуса путем выделения ничтожных количеств либеринов (факторы высвобождения гормонов, рилизинг-факторы); тем самым контролируется эндокринная регуляция. Оба исследователя (совершенно независимо друг от друга) установили последовательность первых гормонов гипоталамуса и синтезировали их в лаборатории.

С обнаружением в нервной системе стереоспецифических опитных рецепторов начались интенсивные поиски эндогенного субстрата для этих рецепторов. Сначала из экстракта головного мозга были выделены энкефалины — два пентапептида, последовательность которых отличается

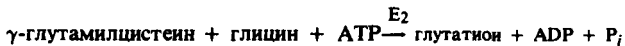
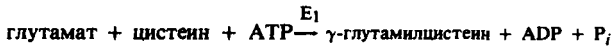
только на одну аминокислоту. Затем были найдены другие активные пептиды, такие, как  $\beta$ -эндорфин из гипофиза и  $\alpha$ - и  $\gamma$ -эндорфины из системы гипоталамус-нейтрогипофиз. Этот класс соединений, названный в совокупности эндорфинами, имеет огромное значение для физиологии и фармакологии в связи с новыми данными, полученными при исследовании болевых ощущений и подавлении боли, а также играет определенную роль в патогенезе психических расстройств. Исследования пептидов, влияющих на центральную нервную систему, находятся в начальной стадии.

Многие биологически активные пептиды природного происхождения отличаются структурно от пептидов, образующихся в результате процессинга белков. Зачастую в их составе находятся небелковые аминокислоты, такие, как  $\beta$ -аланин,  $\gamma$ -аминомасляная кислота, D-аминокислоты, N $^{\alpha}$ -алкилированные аминокислоты и др. Для многих низкомолекулярных пептидов также характерны  $\omega$ -пептидные связи и кольцевые структуры. Такие структурные особенности, а также остатки пироглутаминовой кислоты образуют действенную защиту против атаки протеаз, обладающих обычно субстратной специфичностью к пептидам из  $\alpha$ -аминокислот с нормальными пептидными связями.

*Глутатион*, присутствующий во всех клетках высших животных, представляет собой трипептид с N-концевым остатком глутаминовой кислоты, присоединенным  $\gamma$ -пептидной связью:



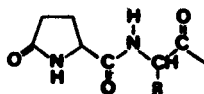
Биосинтез таких пептидов осуществляется не обычным путем при участии рибосом, а протекает в двухступенчатых катализируемых ферментами реакциях с использованием АТФ:



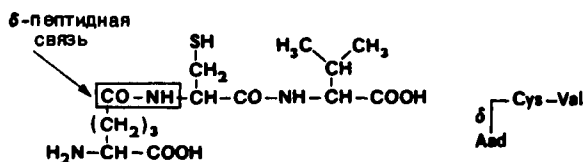
где  $\text{E}_1$  —  $\gamma$ -глутамилцистеинсинтетаза,  $\text{E}_2$  — глутатинсинтетаза.

Глутатион — биохимически важный активатор некоторых ферментов; он защищает липиды от аутоокисления и является составной частью системы транспорта аминокислот в отдельных тканях животных (цикл  $\gamma$ -глутаминовой кислоты). Другие  $\gamma$ -глутамилпептиды находят в растительных тканях, например в луке, чесноке и в семенах бобовых. Некоторые производные *птероилглутаминовой кислоты (фолиевая кислота)* также содержат дополнительные остатки глутаминовой кислоты, соединенные один с другим  $\gamma$ -пептидной связью.

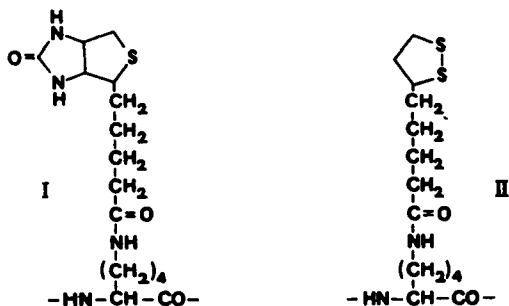
Действенной защитой против ферментативного расщепления аминоклотидазами служит пироглутаминовая кислота (пирролидонкарбоновая кислота) — N-концевой остаток в *пироглутамилпептидах*:



Представители таких пептидов, например *эйзенин* (Pyr-Gln-Ala) и *пельветин* (Pyr-Gln-Gln), были найдены в водорослях. Пироглутаминовая кислота присутствует также в различных либерилах. Кроме этой внутримолекулярной  $\gamma$ -связи между  $\alpha$ -аминогруппой и карбоксигруппой в боковой цепи в природных пептидах существует также другие  $\omega$ -пептидные связи аминокислот. Различные простые  $\beta$ -аспартилпептиды найдены в человеческой моче, в то время как в различных грибах рода *Penicillium* обнаружен  $\delta$ -аминоадипилцистеинилвалин — пример очень редко встречающейся  $\delta$ -пептидной связи:



Связь через  $\epsilon$ -аминогруппу лизина наблюдается реже, хотя различные ацилированные  $\text{N}^\epsilon$ -лизиновые производные, такие, как биотинильное (I) и  $\text{N}^\epsilon$ -липоильное (II), встречаются в ферментах и имеют биохимическое значение.



ние. В бацитрацине (разд. 2.3.5.1) имеется разветвленно-циклическая структура, присоединенная через  $\epsilon$ -аминогруппу лизина.

### 2.3.1. Пептидные и белковые гормоны

Гормоны — химические органические соединения, которые образуются в железах или специализированных клетках и переносятся по транспортной (кровеносной) системе к одному или нескольким местам воздействия, где проявляют специфическую к данным клеткам активность, связываясь с соответствующими рецепторами. Гормональное действие характеризуется передачей информации, причем в отличие от нервной системы в этом случае накопление информации невозможно.

Следует отметить, что физиологически обе системы развивались одновременно, причем с возникновением нейросекреции, появившейся уже у червей и членистоногих, была достигнута качественно более высокая ступень развития. У позвоночных наблюдается иерархическая организация эндокринной системы. Нервные раздражения с помощью преобразователей в нервносекреторных клетках трансформируются в гормональные сигналы (нейрогормоны), благодаря чему различные окружающие воздействия через нервную систему передаются на внутренние секреторные органы, которые затем соответствующим образом адаптируются. Гормональная и нервная системы, взаимодействуя, управляют и регулируют все жизненные процессы высоко развитых организмов.

Гормоны объединяют химически неоднородные регуляторы; к ним относятся стероиды, производные жирных кислот, аминокислоты, производные аминокислот, а также пептиды и белки (обстоятельно обсуждаются далее; рассмотрение белковых гормонов в главе «Белки» вряд ли уместно, так как разделение пептидов и белков имеет исторические корни и сегодня едва ли можно их четко разграничить).

По месту образования гормоны разделяют на нейрогормоны, гормоны, секретируемые специальными железами, и тканевые гормоны. Классификация часто затруднена, так как не во всех случаях точно определены места образования и воздействия. Согласно общепринятому определению гормонов, вещества, которые, диффундируя, действуют вблизи места образования, не должны называться гормонами, однако все же часто к гормонам относят нейротрансмиттеры (ацетилхолин, допамин, норадреналин, серотонин, гистамин, глутамат, глицин,  $\gamma$ -аминобутират, таурин, вещество Р и многие другие пептиды), а также модуляторы нейронной активности нейрогормонов [569]. Возможно, не будет ошибкой рассматривать классическую эндокринологию как одну из областей нейроэндокринологии. Мозг уже характеризуется как высокоспециализированная «эндокринная железа», ибо в общем нейротрансмиссия связана с секреторными процессами, в то время как электрическая передача нервных импульсов представляет собой исключительный случай. Несмотря на трудность четкого определения, все активные в отношении центральной нервной системы пептиды следует называть нейропептидами (разд. 2.3.3), при этом понятие «нейрогормоны» должно соответствовать действующей классификации гормонов.

Решающей предпосылкой для выполнения функции «первого курьера» является то, что гормон узнается в органе, на который он действует, дифференцированно от остальных соединений. Этот процесс узнавания характеризуется связыванием данного гормона со специфическим рецептором целевой клетки. Рецепторы гормонов — это белки, которые должны узнавать гормон, связывать его и отвечать следующим требованиям:

- иметь высокую рецепторную специфичность для того, чтобы обеспечить правильное соотношение между структурой гормона и его биологической активностью;
- проявлять сродство к гормону вследствие его очень низкой физиологической концентрации;
- иметь ограниченное число мест связывания гормона;



гарантировать обратимость связывания гормона (на рецепторе), так как окончание физиологического акта — предпосылка для новой стимуляции.

Принцип гормон-рецепторного комплекса был постулирован уже в начале столетия П. Эрлихом. Рецепторы гормона локализируются или на клеточной поверхности (клеточные мембраны), или в цитоплазме клетки. Интересующие нас пептидные или белковые гормоны вступают во взаимодействие с рецепторами, связанными с клеточными мембранами. Первое экспериментальное доказательство наличия связанного с мембраной рецептора удалось получить лишь в 1969—1970 гг. при использовании меченых пептидных гормонов (АКТГ, инсулин, ангиотензин) [571—573]. Затем были установлены специфические рецепторы всех гормонов, и гормон-рецепторная концепция стала быстро развиваться. Здесь нужно сослаться на прекрасный обзор Любке и сотр. [574], посвященный этому вопросу.

Если пептидный или белковый гормон вступает во взаимодействие с мембранными рецепторами, то циклический АМР, образующийся при активации аденилатциклазной системы, становится во многих случаях «вторым курьером», формирующим следующие стадии внутриклеточных реакций (рис. 2-33). сАМР был открыт Шутерландом в начале 50-х годов.

Иницированный таким образом внутриклеточный гормональный эффект определяется свойствами клетки. Адренокортикотропный гормон (АКТГ) и гормон, стимулирующий интерстициальные клетки, стимулируют, например, одинаковые реакции превращения холестерина в прегненолен. Это объясняется тем, что при различном наборе ферментов в клетке, в коре надпочечников из прегненолена образуются кортикостероиды (альдостерон, кортизол), а в половых железах — предпочтительно андрогены, гестагены и эстрогены. Инсулин связывается с рецепторами на мембране жировой клетки. Взаимодействие со специфическим рецептором повышает концентрацию сGMP, концентрация же сАМР понижается. Образование

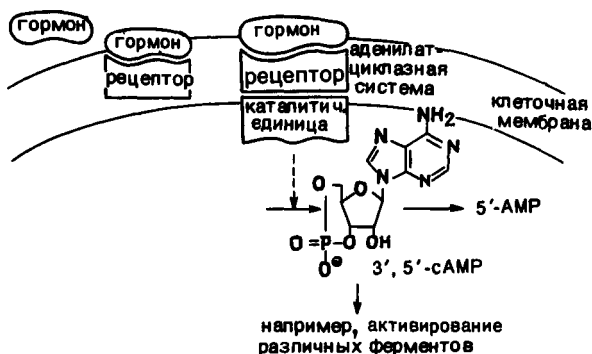


Рис. 2-33. Схематическое изображение действия гормона через рецептор, связанный с мембраной [574].

cGMP посредством активации гуанилатциклазы и стимулированные этим изменения мембраны в жировых клетках при связывании инсулина с рецептором ясно показывают, что cGMP также может служить в качестве «второго курьера». Адреналин и глюкагон, напротив, активируют аденилатциклязную систему. Отсюда следует, что cAMP и cGMP обладают взаимно противоположным действием (гипотеза "yin-yang"), т. е. антагонистическое действие гормонов инсулина и глюкагона проявляется в противоположных изменениях концентрации регуляторных циклических нуклеотидов. Для доказательства этой гипотезы необходимы дальнейшие исследования.

Предполагается, что пептидные гормоны (инсулин, пролактин, гормон роста, паратиреоидный гормон, гонадотропин, гормоноподобные факторы роста и др.) также могут проникать через клеточную мембрану внутри клетки [575]. Это предположение уже выдвигалось в 50-х годах двумя группами исследователей, но эндокринологи настаивали на концепции взаимодействия пептидных гормонов исключительно лишь со связанными с мембраной рецепторами. Согласно современным воззрениям, такие трудноинтерпретируемые долговременные эффекты, как, например, влияние на рост клетки и белковый синтез в случае инсулина, можно объяснить, лишь принимая возможность проникновения гормона в клетку. Кратковременные эффекты могут быть вызваны, по существующему представлению, обычным путем, т. е. взаимодействием с рецептором, связанным с мембраной. Относительно процесса входа в клетку существуют различные точки зрения, как, например, совместное действие высокомолекулярного белка-носителя ( $\alpha_2$ -макроглобулин для инсулина или эпидермального фактора роста) или совместное с рецептором клеточной стенки проникновение гормона в клетку. Но в общем случае ясность в вопросе о функциях полипептидного гормона в клетке пока отсутствует. Дискусируются следующие предположения:

после входа пептидного гормона в клетку он вступает во взаимодействие с внутриклеточными рецепторами и вызывает долговременные эффекты;

биологический эффект в клетке предполагает совместный транспорт гормона и рецептора клеточной стенки;

совместный перенос приводит к исчезновению рецептора;  
пептидный гормон затем расщепляется в клетке.

Секреция и снижение содержания гормона регулируются сложной системой контроля. Первые импульсы (электрические), вызванные внешним возбудителем, передаются нервной системой к ганглиозным клеткам гипоталамуса, где трансформируются в гормональные (химические) сигналы (либерины), которые в свою очередь по нервным волокнам идут в аденогипофиз и там индуцируют или, наоборот, останавливают выделение определенного гормона. Гормоны аденогипофиза затем по кровеносной системе транспортируются к другим эндокринным железам. Например, АКТГ идет к коре надпочечников, где вызывает выделение адренокортикоидов. Наряду с этим в гипоталамусе образуются как минимум еще два других нейрогормона — окситоцин и вазопрессин, связывающиеся затем с транс-

портными белками (нейрофизинами) и передаваемые в виде нейросекрета по паравентрикуло-гипофизарному или супраоптико-гипофизному тракту в нейрогипофиз. Из этого «аккумулятора» при необходимости они могут освобождаться в кровяное русло.

С помощью отрицательной обратной связи определенные продукты обмена веществ могут управлять секрецией или связыванием определенных гормонов (механизм обратной связи). После воздействия, вызванного определенным гормоном, идет очень быстрая инактивация или разрушение регулирующего вещества. Период полураспада для пептидных и белковых гормонов, как правило, составляет менее 30 мин. Быструю инактивацию обеспечивают различные эндо- и экзопептидазы. Многие известные к настоящему времени пептидные гормоны образуются в результате ферментативного расщепления неактивных белковых предшественников. Интересна также концепция, по которой определенные гормоны могут быть предшественниками совершенно других видов гормонов.

Обстоятельное изучение связей между структурой и активностью позволило выделить участок аминокислотной последовательности гормона, несущий информацию о биологическом эффекте, и назвать его *активным центром* или *информационным участком*, в то время как участок, ключевой для узнавания соответствующим рецептором, локализован в части аминокислотной последовательности, называемой *адресной* или *связывающей*.

Табл. 2-13 не исчерпывает все вещества пептидной природы из животного материала, имеющие гормоноподобное действие. Пептиды, воздействующие на центральную нервную систему (нейропептиды), активные вещества из амфибий и головоногих (эледонзин, физалаемин, филломедузин, упероленин, кассинин, церулеин, филлоцерулеин), а также интересная группа бомбезина (бомбезин, ранатензин, алитензин, литорин) рассмотрены особо.

В таблице приведены далеко не все секреторные и несекреторные пептидные и белковые гормоны. При их последующем рассмотрении также нельзя охватить всех их представителей и остановиться на всех аспектах их химии и эндокринологии. Почти невозможно включение в обсуждение многочисленных синтетических аналогов различных пептидных гормонов, а также проблематики, связанной с обширными исследованиями конформаций пептидных молекул. Многие монографии и обзоры могут дать обширную информацию об интересной области науки, относящейся к пептидным и белковым гормонам [581—590]. Уверенно идет установление структуры и изучение механизма действия новых природных соединений пептидной природы из головного мозга, внутренних органов, лимфоцитов, кожи амфибий и т. д., обладающих гормональным действием.

Существенную помощь при определении наличия пептидных гормонов оказывает *радиоиммунный метод*, отличающийся высокой чувствительностью и специфичностью. Для проведения радиоиммунного определения гормона необходимы следующие предпосылки:

Таблица 2-13. Пептидные и белковые гормоны

Название и синоним	Место образования	Действие	Химическая классификация
Тиреотропин (тиреостимулирующий гормон)	Гипофиз	Образование и выделение гормонов щитовидной железы	Гликопротеин, 2 субъединицы ( $\alpha$ : 96 аминокислот, $\beta$ : 113 аминокислот)
Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ, фоллиотропин) [577]	"	Способствует росту и созреванию фолликул; стимулирует сперматогенез	Гликопротеин, 2 субъединицы [576] Гонадотропин
Лютеинизирующий гормон (ЛГ, лютотропин, гормон, стимулирующий интерстициальные клетки)	"	Стимулирует образование эстрогена и тем самым окончательное созревание фолликул; вместе с ФСГ вызывает овуляцию	Гликопротеин, 2 субъединицы ( $\alpha$ : 96 аминокислот, $\beta$ : 120 аминокислот [578]) Гонадотропин
Пролактин (лютеотропный гормон, ЛТГ, люотропин)	"	Стимулирует рост молочных желез и секрецию молока (известен также ЛТГ человека [579])	Одноцепочечный белок (овца: 198 аминокислот, 3 S—S-связи)
Соматотропный гормон (СТГ, соматотропин, гормон роста)	"	Необходим для нормального роста, стимулирует рост костей в длину	Одноцепочечный белок (СТГ человека: 191 аминокислота)
Липотропный гормон (ЛТГ, липотропин)	"	Стимулирует образование свободных жирных кислот из триглицеридов	$\beta$ -ЛТГ: 91 аминокислота
Адренокортикотропный гормон (АКТГ, кортикотропин)	"	Стимулирует выделение корой надпочечников глюкокортикоидов	Линейный пептид: 39 аминокислот
Меланоцитстимулирующий гормон (МСГ, меланотропин)	"	У теплокровных способствует образованию меланофоров, у человека действие неизвестно	$\alpha$ -МСГ: 13 аминокислот, $\beta$ -МСГ: 18—22 аминокислоты ( $\beta$ -МСГ человека: 22 аминокислоты)
Окситоцин	Гипоталамус (образование), гипофиз (накопление)	Вызывает выделение молока и стимулирует сокращение матки	Гетеродетный циклический нонапептид

Продолжение таблицы 2-13

Название и синоним	Место образования	Действие	Химическая классификация
Вазопрессин	Гипоталамус (образование), гипофиз (накопление)	Повышает артериальное давление и действует антидиуретически	Гетеродетный циклический нонапептид
Тиреолиберин (релизинг-фактор тиреотропина)	Гипоталамус	Выделение тиреолиберина	Трипептид
Гонадолиберин (релизинг-фактор гонадотропина, люлиберин, фоллиберин)	"	Выделение ЛГ и ФСГ	Декапептид
Кортиколиберин (релизинг-фактор кортикотропина)	"	Выделение АКТГ	Пептид
Пролактолиберин (релизинг-фактор пролактина)	"	Выделение пролактина	"
Соматолиберин (релизинг-фактор соматотропина)	"	Выделение соматотропного гормона	"
Меланолиберин (релизинг-фактор меланотропина)	"	Выделение МСГ	"
Пролактостатин (гормон, ингибирующий выделение пролактина)	"	Подавление выделения пролактина	"
Соматостатин (гормон, ингибирующий выделение соматотропина)	"	Подавление выделения соматотропина	Гетеродетный циклический тетрадекапептид
Меланостатин (гормон, ингибирующий выделение меланотропина)	"	Подавление выделения МСГ	Пептид
Вещество Р	Гипоталамус, мышечные ткани тонкой кишки	Нейрональное действие, снижение артериального давления, стимуляция гладкой мускулатуры	Линейный ундекапептид
Нейротензин	Гипоталамус	Кининовая активность, регуляция обмена глицерона в печени	Линейный тридекапептид

Название и синоним	Место образования	Действие	Химическая классификация
Инсулин	Поджелудочная железа	Снижение уровня сахара в крови, регуляция углеводного обмена, влияние на белковый и липидный обмен	Гетеродетный циклический пептид (А-цепь: 21 аминокислота; В-цепь: 30 аминокислот)
Глюкагон	То же	Повышение уровня сахара в крови стимулирующей гликогенеза в печени	Линейный пептид: 29 аминокислот
Кальцитонин	Щитовидная железа	Снижение уровня кальция	Гетеродетный циклический пептид: 32 аминокислоты
Паратиреоидный гормон	Паратиреоидная железа	Поддержание нормального уровня кальция в крови	Линейный полипептид: 84 аминокислоты
Релаксин [580]	Желтые тела	Расширение шейки матки и расслабление связок между костями с целью облегчения родов	Гетеродетный циклический пептид (А-цепь : 22 аминокислоты; В-цепь: 26 аминокислот)
Хориогонадотропин человека	Плацента	Действие, подобное ЛГ	Гликопротеин, 2 субъединицы ( $\alpha$ : 92 аминокислоты, $\beta$ : 174 аминокислоты)
Хориосоматомаммотропин человека	"	Действие, подобное соматотропному гормону и пролактину	Одноцепочечный белок (190 аминокислот, 2 дисульфидные связи)
Гастрин	Слизистая желудка	Стимуляция секреции кислоты в желудке и образование ферментов в поджелудочной железе	Линейный гептадекапептид
Секретин	Слизистая двенадцатиперстной кишки	Стимуляция образования и выделения панкреатического сока, повышение отделения желчи	Линейный пептид: 27 аминокислот
Холецистокинин-панкреозимин	Слизистая двенадцатиперстной кишки	Сокращение желчного пузыря и секреция ферментов поджелудочной железы	Линейный пептид: 33 аминокислоты

Продолжение таблицы 2-13

Название и синоним	Место образования	Действие	Химическая классификация
Ангиотензин II	$\alpha_2$ -Глобулиновая фракция плазмы	Повышение артериального давления, стимуляция коры надпочечников к образованию альдостерона	Линейный октапептид
Брадикинин (кинин-9)	Плазма	Повышение артериального давления, сокращение гладкой мускулатуры	Линейный нонапептид
Каллидин (кинин-10)	"	Действие, подобное брадикинину	Линейный декапептид
Метиониллизил-брадикинин (кинин-11)	"	То же	Линейный ундекапептид

определяемый гормон доступен в возможно более чистом виде, и существует возможность введения радиоактивной метки (иод-125, тритий);

имеются в распоряжении специфические антитела к гормону. Такие антитела могут быть получены относительно несложно, так как пептидные и белковые гормоны из-за их видовой специфичности сами являются иммуногенами. Для этой цели подходящему подопытному животному (морская свинка, кролик) вводится определяемый гормон, действующий в крови данного животного как антиген и вызывающий образование антител.

Для определения концентрации гормона смешивают меченный, например иодом-125, гормон с антителами к данному гормону. Образуется комплекс  $^{125}\text{I}$ —гормон—антитело. При добавлении исследуемого экстракта немеченный гормон, находящийся в исследуемом растворе, конкурирует с меченым в реакции связывания с антителом, вытесняя последний из комплекса. Далее освобожденный гормон отделяют от связанного электрофорезом, хроматографией или осаждением и количественно определяют его, измеряя радиоактивность. Из полученных данных можно рассчитать количество исследуемого немеченого гормона, так как радиоактивность свободного гормона зависит от того, насколько много меченого гормона было вытеснено из комплекса антиген — антитело. Более подробно с этим вопросом можно ознакомиться по литературе [582, 591].

### 2.3.1.1. Кортикотропин

Кортикотропин (адренкортикотропин, адренкортикотропный гормон, АКТГ) представляет собой линейный полипептид, состоящий из 39 аминокислотных остатков [592, 593]. Проверка аминокислотных последователь-

ностей АКТГ человека, теленка и овцы [594, 595] показала лишь незначительное их отличие, касающееся аминокислотных остатков в положениях 31 и 33:

человек	Ser - Tyr - Ser - Met - Glu - His - Phe - Arg - Trp - Gly - Lys - Pro - Val - 1 5 10
	Gly - Lys - Lys - Arg - Arg - Pro - Val - Lys - Val - Tyr - Pro - Asn - Gly - 15 20 25
	Ala - Glu - Asp - Glu - Ser - Ala - Glu - Ala - Phe - Pro - Leu - Glu - Phe 30 35
свинья	- Leu - Ala - Glu -
теленка, овца	- Ser - Ala - Glu -

Первый полный синтез АКТГ свиньи с первоначально установленной и, как оказалось впоследствии, ошибочной аминокислотной последовательностью описан в 1963 г. Швицером и Зибером [596], первый синтез АКТГ человека — в 1967 г. Баюшем с сотр. После пересмотра аминокислотных последовательностей АКТГ обе исследовательские группы осуществили синтез АКТГ человека классическим методом, в то же время Ямациро и Ли синтезировали тот же пептид с использованием твердофазной техники. С 1956 г. в основном вышеназванные группы, а также группы Гейгера, Гофмана, Буассана и др. осуществили синтез отдельных участков последовательности АКТГ и получили ряд аналогов. Подводя итог обширным структурно-функциональным исследованиям этого гормона с некоторой долей упрощения (формально — в соответствии с ранее сказанным), можно выделить в последовательности АКТГ участки с различным биологическим значением. Но сначала необходимо сказать несколько слов о его биологическом действии.

Различные функциональные состояния организма, например стресс или пониженный уровень гормонов коры надпочечников в крови, побуждают переднюю долю гипофиза посредством гормона гипоталамуса кортиколиберина к секреции АКТГ. Образовавшийся гормон по кровяному руслу следует затем к клеткам-мишеням, а именно к клеткам коры надпочечников, вызывая синтез и секрецию стероидных гормонов кортизола, кортизона и кортикостерона. Как только содержание гормонов коры надпочечников в крови достигает необходимого уровня, механизм обратной связи ведет к снижению выделения АКТГ гипофизом. Посредством основного цикла регулирования гипофиз — кора надпочечников АКТГ оказывает также влияние на распад жировых клеток.

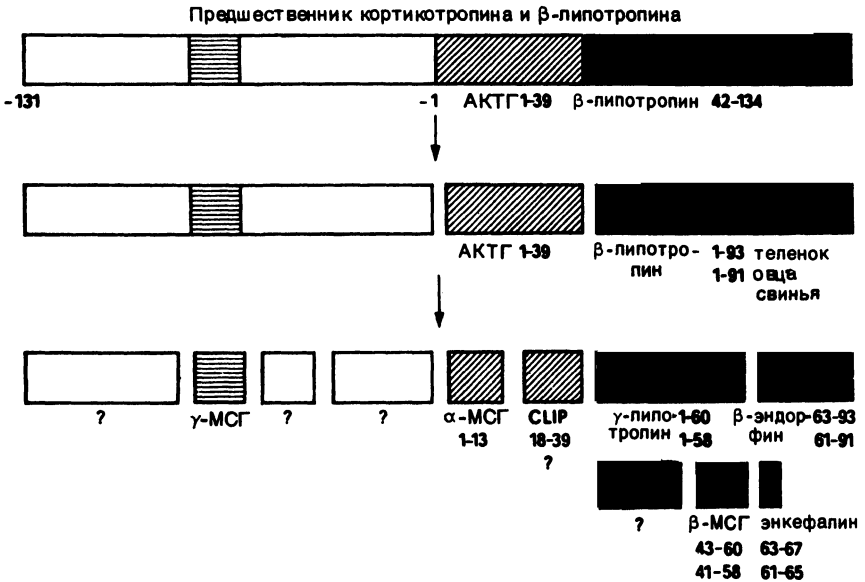
Связь хранимой биологической информации с аминокислотной последовательностью АКТГ интенсивно исследовалась в различных лабораториях, особенно группой Швицера. В N-концевом (1-18) участке молекулы содержится практически вся информация для коры надпочечников, для жировых и меланофорных клеток, причем процесс пигментации последних, вероят-



но, не представляет физиологическую функцию АКТГ, а является следствием содержащейся в АКТГ последовательности  $\alpha$ -МСГ. Участок последовательности 19—24 несколько усиливает стероидогенную активность гормона к клеткам коры надпочечников, но не оказывает никакого влияния на жировые и меланофорные клетки. Изучение гормон-рецепторных взаимодействий позволяет сделать вывод, что N-концевая (1-10) область, точнее, участок 5—10 представляет собой активный центр, рецепторсвязывающая же область представлена участком 11—18 (Гофман и сотр., 1972 г.). По Швицеру, информация о биологическом действии заключена в участке аминокислотной последовательности 5—10, а адрес ее реализации находится в участке 11—24. В C-концевой области содержится информация о видоспецифичности, антигенности и транспорте гормона. Препараты АКТГ, особенно синтетический АКТГ 1—24 (синактен), используют для лечения аллергии, при особых формах гипофизарной недостаточности, при артритах, а также для торможения воспалительных процессов и при других болезнях. Большое значение имеют также отдельные участки последовательности АКТГ, активные для центральной нервной системы (разд. 2.2.3).

В клетках АКТГ синтезируется в составе общего для нескольких пептидов предшественника — *проопиомеланокортин* [597, 598]. Так как из этого гликопротеина действием протеаз кроме АКТГ и  $\beta$ -липотропина образуются также эндорфины и меланоцитстимулирующий гормон, возникает проблема разграничения понятий «прогормон», «препрогормон» и т. д. На стр. 243 схематически представлен процесс последовательного расщепления предшественника АКТГ и липотропина.

Используя технику клонирования ДНК [599] и анализа нуклеотидных последовательностей [600], Наканиши и сотр. [601] установили нуклеотидную последовательность мРНК-предшественника. Нумерация аминокислотной последовательности положительная справа от N-концевой аминокислоты АКТГ, в левую сторону отсчет идет со знаком минус. Белок-предшественник содержит 8 пар основных аминокислот и одну двойную пару -Lys-Lys-Arg-Arg. В этих местах происходит ферментативное расщепление белка с образованием различных пептидов.  $\beta$ -Липотропин образует C-концевую область и, вероятно, отщепляется непосредственно от предшественника. Общая схема ферментативного расщепления и вид фрагментации к настоящему времени еще не установлены. В отличие от известных последовательностей  $\beta$ -липотропинов свиньи и овцы  $\beta$ -липотропин теленка содержит между 35 и 36 аминокислотными остатками два дополнительных (-Ala-Glu-); этим объясняются различные длины цепей липотропинов (см. схему). Анализ на ЭВМ аминокислотной последовательности «отрицательной» части предшественника дал интересный результат: между позициями —55 и —44 найдена аминокислотная последовательность -Tyr-Val-Met-Gly-His-Phe-Arg-Trp-Asn-Arg-Phe-Gly-, имеющая большое сходство с  $\alpha$ - и  $\beta$ -МСГ. Так как в области аминокислотной последовательности предшественника от —111 до —105 присутствует еще один участок, имеющий структурное сходство с МСГ-пептидами, предполагается существование серии дупликаций гена, аналогично имеющей место в случае иммуноглобулинов. О



роли β-липотропина и β-эндорфина, а также о метионинэнкефалине, сказано далее. (CLIP — сокращение для кортикотропиноподобного пептида из промежуточной доли гипофиза, последовательность которого наряду с α-МСГ содержится в АКТГ.)

### 2.3.1.2. Соматотропный гормон

Соматотропный гормон [602—604] (СТГ, соматотрофин, гормон роста) образуется в передней доле гипофиза под контролем соматолиберина. Название «соматотропин», т. е. «действующий на все тело», отражает его широкий спектр активностей, обусловленный анаболическим действием, хотя основная функция гормона — регуляция процесса роста. В частности, СТГ стимулирует рост эпифизарных хрящей и вследствие этого удлинение костей. В период половой зрелости андрогены вызывают сращивание эпифиза с диафизом, что приводит к прекращению роста.

СТГ человека представляет собой полипептидную цепь, содержащую 191 аминокислотный остаток. Молекулы гормона из других организмов отличаются от СТГ человека как длиной цепи, так и степенью гомологичности, поэтому на человека действует лишь СТГ приматов. Весьма незначительно различие аминокислотных последовательностей СТГ человека с хориосоматомаммотропина, действие которого подобно действию СТГ и пролактина.

СТГ человека был впервые выделен Ли с сотр. в 1956 г. Данные об аминокислотной последовательности в последующие годы много раз пересматривались. В 1970 г. Ли [605] сообщил о твердофазном синтезе этого

белка, показавшего в тесте на большой берцовой кости 10% ростовой активности и в тесте на зобе голубя 5% активности пролактина. Этот результат поразителен тем, что первичная структура, положенная в основу химического синтеза, немного позже подверглась пересмотру. Отсюда можно сделать однозначный вывод, что биологическая активность никогда не может быть использована в качестве критерия успешности химического синтеза. На поиск активного центра соматотропного гормона роста направлены усилия многих исследователей, так как длина полипептидной цепи слишком велика, чтобы использовать полный химический синтез в качестве источника этого терапевтически важного гормона. Предпринимаются попытки получения достаточно активных фрагментов путем ферментативного расщепления целой молекулы белка. Такие фрагменты уже могут быть доступны для химического синтеза в значительных количествах, достаточных для терапевтических целей.

В 1979 г. Гудман и Бакстер, а также Годдель с сотр. осуществили синтез СТГ человека методами геной инженерии. В то время как первая группа использовала соответствующий природный ген, вторая встраивала ген, синтезированный комбинацией химических и ферментативных методов. Учитывая существующие трудности химического пептидного синтеза, можно говорить о большом значении ДНК-рекомбинантной техники (разд. 2.3.1.7) для получения этого гормона.

Почти единственный случай применения СТГ человека — гипофизарная карликовость. Отсутствие или недостаточное количество СТГ ведет к карликовости, причем часто при достижении половой зрелости появляется инфантилизм. Слишком высокий уровень секреции гормона в период роста приводит к гигантизму, при передозировке в период роста появляются симптомы акромегалии (чрезмерное удлинение конечностей, носа, ушей, подбородка и др.). Кроме лечения карликовости СТГ используется при мышечной дистрофии, остеопорозе (недостаточное содержание кальция в костях), при желудочных кровотечениях и др.

Вообще аспекты участия СТГ вследствие его анаболического действия весьма многообразны: он способствует транспорту аминокислот в клетки, стимулирует усвоение жирных кислот, биосинтез белков. СТГ обладает также диабетогенным действием, повышенная его секреция может привести к сахарной болезни. Это объясняется торможением периферийного обмена глюкозы.

В определенных тканях, например в скелетных, действие СТГ передается посредством факторов плазмы, названных *соматомединами*.

Биологическая функция соматомедина В, аминокислотная последовательность которого установлена Фриклуном и Сивертсоном, еще не ясна. Его полипептидная цепь состоит из 44 аминокислотных остатков, включает N-концевую аспарагиновую кислоту, C-концевой треонин и 8 остатков цистеина [606]. Первичная структура пептида подобна структуре малого трипсिनного ингибитора. Соматомедин В ингибирует трипсин, однако не действует на плазмин, тромбин или калликреин.

### 2.3.1.3. Пролактин

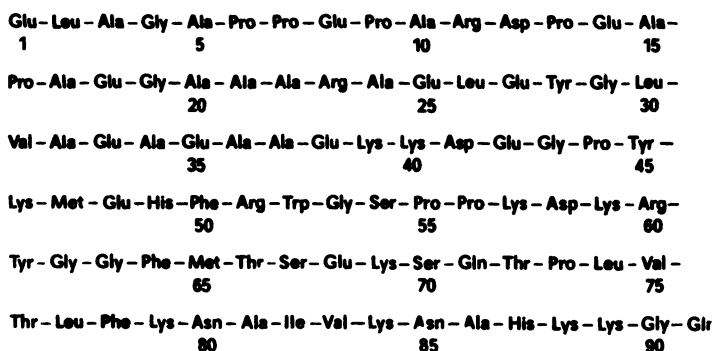
Образование пролактина (лютеотропный гормон, лактогенный гормон, лактотропин) в передней доле гипофиза регулируется соотношением содержания пролактолиберина и пролактостатина. Пролактин регулирует секрецию молока грудными железами, а также их рост. Во время беременности и в период кормления его количество увеличивается. Кроме того, он способствует процессу роста, влияет на обмен пигментов и регуляцию осмоса, подавляет инстинкт насиживания у птиц. Непосредственно в тканях биологический эффект вызывается воздействием на аденилатциклазную систему.

Первичная структура пролактина овцы установлена Ли с сотр. Этот белок состоит из одной полипептидной цепи, включающей 198 аминокислот и сшитой тремя внутренними дисульфидными мостиками. Из гипофиза теленка и овцы пролактин может быть выделен относительно легко и дифференцированно от соматотропного гормона. Аналогичные эксперименты с гипофизом человека долгое время оставались безуспешными, что вызвало сомнения в существовании человеческого пролактина. Лишь в 1973 г. человеческий пролактин был охарактеризован как гормон, отличающийся от СТГ [607]. Препролактин описан Маурером в 1977 г. [608].

### 2.3.1.4. Липотропин [598]

Липотропин (липотропный гормон) был открыт в 1964 г. Ли [609] при попытке улучшить процесс выделения АКТГ. Он назвал оба выделенных вещества  $\alpha$ - и  $\beta$ -липотропинами, так как они влияли на накопление жира в жировых тканях кроликов. Однако этот эффект наблюдался только на кроликах и не проявлялся на других видах животных, поэтому название «липотропин», по-видимому, неудачно.

По Графу [611],  $\beta$ -липотропин свиньи имеет следующую первичную структуру:



N-Концевая аминокислотная последовательность 1—58 соответствует первичной структуре  $\gamma$ -липотропина.  $\beta$ -Липотропин телянка отличается от  $\beta$ -липотропина свиньи больше всего в N-концевой области и состоит из 93 аминокислотных остатков [612], так как между позициями 35 и 36 приведенная здесь последовательность содержит дополнительный дипептид -Ala-Glu.

Как уже подробно отмечалось в разд. 2.3.1.1,  $\beta$ -липотропин, а следовательно, и эндорфины происходят от общего предшественника проопиомеланокортина [598]. Кроме того,  $\beta$ -липотропин содержит последовательности  $\gamma$ -липотропина и  $\beta$ -МСГ. Участки аминокислотной последовательности  $\beta$ -липотропина соответствуют определенному пептидному гормону:

Участок $\beta$ -липотропина	Пептидный гормон
1—58	$\gamma$ -Липотропин
41—58	$\beta$ -МСГ
61—91	$\beta$ -Эндорфин
61—76	$\alpha$ -Эндорфин
61—77	$\gamma$ -Эндорфин
61—79	$\delta$ -Эндорфин
61—65	Met-энкефалин

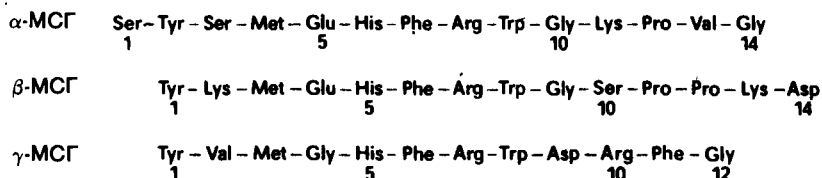
Собственно  $\beta$ -липотропин не обладает каким-либо гормональным действием на организм человека и может быть охарактеризован как прогормон  $\beta$ -эндорфина и  $\beta$ -МСГ. С помощью радиоиммунного анализа  $\beta$ -эндорфина Иосими с сотр. [613] смогли показать, что так называемый «биг»- $\beta$ -липотропин (названный также «биг-биг»- $\beta$ -эндорфином) с  $M$  37 000 присутствует в экстракте человеческих желез. В экстракте желез крысы присутствует тот же белок, но с  $M$  31 000, предположительно соответствующий описанному Майнсом и сотр. [597] предшественнику проопиомеланокортину.

### 2.3.1.5. Меланоцитстимулирующий гормон

Образование меланоцитстимулирующего гормона [617] (меланотропин, меланостимулирующий гормон, МСГ) протекает под контролем гормонов гипоталамуса меланолиберина и меланостатина в промежуточной доле гипофиза, а при их повреждении — в передней доле. Меланотропин стимулирует у теплокровных позвоночных увеличение образования пигментов в особых клетках, называемых меланофорами, чем достигается темная окраска и тем самым приспособление к окружающей среде. Биологическое значение меланотропина у птиц и млекопитающих еще недостаточно ясно, так, например,  $\alpha$ -меланотропин оказывает сильное действие на многие ткани животных и, в известной степени, человека [614].

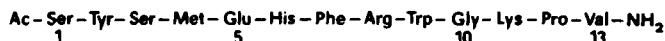
При описании биосинтеза кортикотропина и  $\beta$ -липотропина уже упоминалось, что МСГ образуется в составе общего предшественника проопиомеланокортина. Кроме известных ранее  $\alpha$ - и  $\beta$ -МСГ Наканиси и сотр. [601] нашли в составе этого пробелка третью последовательность меланотропи-

на, названную  $\gamma$ -МСГ. Для все трех меланотропинов теленка установлены следующие аминокислотные последовательности [610]:



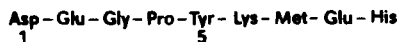
Существование в молекуле проопиомеланокортина четвертого участка с аминокислотной последовательности, имеющей структурную гомологию с тремя известными меланотропинами, позволяет предположить существование серии дубликаций гена.

Говоря о  $\alpha$ -МСГ, следует сказать об амиде  $N^{\alpha}$ -ацетилтридекапептида, аминокислотная последовательность которого совпадает с АКТГ 1—13 (Харрис и Лернер, 1957 г.):



Широкий спектр действия  $\alpha$ -МСГ, по-видимому, может быть объяснен тем, что в различных целевых клетках биологический эффект оказывают неидентичные активные центры гормонов [615]. Так, Эберли и сотр. [616] нашли, что рецептор  $\alpha$ -МСГ в меланофорах амфибий имеет две узнающих активный центр области: одна для -Glu-His-Phe-Arg-Trp-, другая — для -Gly-Lys-Pro-Val-NH<sub>2</sub>.

$\beta$ -Меланотропин ( $\beta$ -МСГ) из различных организмов имеет неодинаковую длину пептидной цепи. Для  $\beta$ -МСГ свиньи приводится следующая первичная структура, соответствующая участку 41—58  $\beta$ -липотропина:



Из различных исследований следует, что меланотропины образуются в различных областях центральной нервной системы. Им приписывается функция нейромодуляторов или нейротрансмиттеров. Учитывая существование в составе проопиомеланокортина нескольких последовательностей МСГ, не будет ошибкой сказать, что освобождающиеся при расщеплении предшественника пептиды включаются в работу нервной системы.

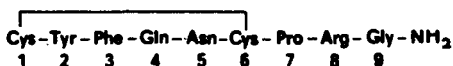
### 2.3.1.6. Окситоцин и вазопрессин [584, 618, 619]

Образование нейрогипофизарных гормонов окситоцина и вазопрессина протекает не в нейрогипофизе (задняя доля гипофиза), так как он не является

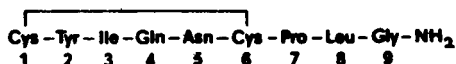
внутрисекреторным органом, а лишь выполняет функцию «депо» гормонов нейросекреторных клеток. Транспортными белками для нейрогипофизарных гормонов долгое время считались нейрофизины, образующиеся в гипоталамусе наряду с окситоцином и вазопрессинном. Нейрофизинами называют линейные, с высоким содержанием цистеина, белки, состоящие из 93—95 аминокислотных остатков. Как правило, каждый биологический вид имеет 2—3 нейрофизина, незначительно отличающихся длиной цепи и (или) аминокислотной последовательностью. Различные данные подтверждают гипотезу о том, что как окситоцин и один нейрофизин, так и вазопрессин и другой нейрофизин имеют общих предшественников в биосинтезе, полипептидные цепи которых образуются при расщеплении нейрофизины и гормоны [620].

Биосинтез вазопрессина идет через стадию образования белка-предшественника, состоящего из 166 аминокислотных остатков [620а]. В предшественнике после *N*-концевой сигнальной последовательности, состоящей из 19 аминокислотных остатков, следует последовательность [8-аргинин]вазопрессина. Затем следует остаток глицина, который при ферментативном отщеплении дает *C*-концевую амидную группу вазопрессина. Далее после пары основных аминокислот следует последовательность нейрофизина II, состоящего из 95 аминокислотных остатков, и затем после следующего остатка аргинина — 39-членный гликополипептид.

Структура окситоцина была установлена в 1953 г. дю Виньо с сотр. и независимо от него Таппи с сотр.



В то время как в гипофизе свиньи присутствует [Lys<sup>8</sup>]вазопрессин, у теленка и других млекопитающих найден [Arg<sup>8</sup>]вазопрессин:



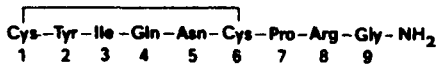
В противоположность этому окситоцин у всех млекопитающих идентичен.

Окситоцин действует на гладкую мускулатуру матки и стимулирует ее сокращение (действие, стимулирующее родовые схватки). Кроме того, окситоцин вызывает сокращение миоэпителиальных клеток молочных желез и тем самым выделение молока. В незначительной степени окситоцин проявляет биологическое действие вазопрессина.

Вазопрессин (антидиуретин, адииуретин) обладает антидиуретическим действием, т. е. вызывает обратное всасывание воды почками; под влиянием вазопрессина суточная первичная моча концентрируется (объем первичной мочи составляет 15 л, в то время как объем выделяемой организмом мочи только 1—1,5 л). В относительно больших дозах вазопрессин также повышает давление. Так как уже 2 нг этого гормона могут вызывать у человека заметный антидиуретический эффект, то по своему физиологическому действию и фармакологическим свойствам он принадлежит к

сильнодействующим веществом. При недостатке вазопрессина появляется картина болезни *Diabetes insipidus*, при которой ежедневно выделяется из-за недостаточного обратного всасывания до 20 л мочи. Вследствие близкого структурного родства с окситоцином вазопрессин проявляет слабую аффинность к окситоциновым рецепторам и тем самым некоторое окситоциноподобное действие. Обратный эффект, как уже отмечалось, наблюдается у окситоцина. Кроме того, вазопрессин физиологически участвует в процессах памяти [738].

С филогенетической стороны интересен вазотоцин, объединяющий в себе физиологическое действие как окситоцина, так и вазопрессина и могущий быть названным по этой причине гормоном-предшественником нейрогипофизарных гормонов:



*Вазотоцин* может быть рассмотрен как [Ile<sup>3</sup>, Arg<sup>8</sup>]вазопрессин или как [Arg<sup>8</sup>]окситоцин. Он найден у низших позвоночных, у которых он ответствен за регуляцию водно-солевого обмена. Дифференциация на ряд окситоцина и ряд вазопрессина, начиная от вазотоцина, может быть объяснена постепенной мутацией генов после предшествовавшей дупликации.

В нейрогипофизах различных классов позвоночных было показано существование 9 биологически активных пептидов (рис. 2-34).

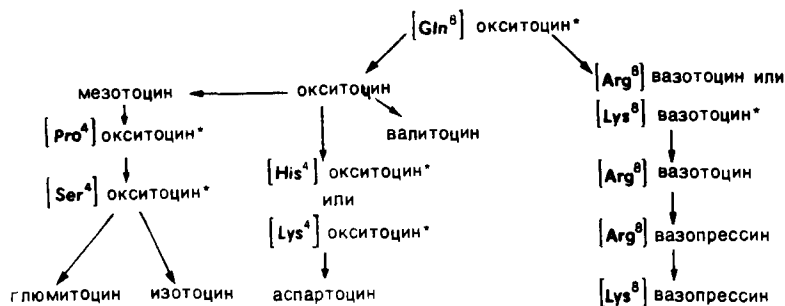
Различные гормоны отличаются лишь замещением в положениях 3, 4 и 8. Применяв ЭВМ, Плишка [621] построил филогенетическое дерево нейро-

	H-Cys-Tyr-X-Y-Asn-Cys-Pro-Z-Gly-NH <sub>2</sub>			
	X	Y	Z	Источник
Окситоцин	Ile	Gln	Leu	Млекопитающие
[Arg <sup>8</sup> ] вазопрессин	Phe	Gln	Arg	Млекопитающие
[Lys <sup>8</sup> ] вазопрессин	Phe	Gln	Lys	Млекопитающие
Вазотоцин	Ile	Gln	Arg	Птицы, рептилии, амфибии, рыбы
Изотоцин	Ile	Ser	Ile	Костистые рыбы
Мезотоцин	Ile	Gln	Ile	Птицы, рептилии, амфибии, морские животные
Глумитоцин	Ile	Ser	Gln	Хрящевые рыбы (скаты)
Валитоцин	Ile	Gln	Val	Хрящевые рыбы (акулы)
Аспартоцин	Ile	Asn	Leu	Хрящевые рыбы (акулы)

Рис. 2-34. Первичные структуры встречающихся в природе нейрогипофизарных гормонов.

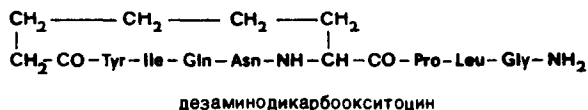
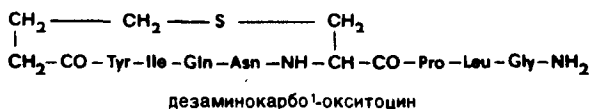


гипофизарных гормонов, согласно которому гормоном-предшественником позвоночных должен быть [Gln<sup>8</sup>]окситоцин вместо ранее принятого [Arg<sup>8</sup>]вазотоцина (еще не обнаруженные в природных источниках гормоны отмечены звездочкой):



Уже через год после установления структуры окситоцина д-р Виньо с сотр. [622] осуществил полный синтез этого гормона; таким образом, впервые был осуществлен химический синтез пептидного гормона. В 1955 г. по другой схеме синтез окситоцина был осуществлен группами Рудингера и Буассона. В последующее время были проведены различные усовершенствованные синтезы, имевшие целью получение как самого гормона, так и его аналогов.

Многие сотни аналогов нейрогипофизарного гормона были синтезированы для изучения связи между структурой и функцией. Цели таких исследований определяются различными мотивами: исследователей интересовали отдельные звенья эволюционного процесса, а также аналоги с улучшенными фармакологическими свойствами, как, например, аналоги с пролонгированным, разделенным действием и особенно аналоги со свойствами ингибиторов. Существенной для биологической активности является 20-членная кольцевая структура. Замещая один или оба атома дисульфидного мостика на CH<sub>2</sub>-группы, получают биологически активные карбоаналоги. Очень часто также удаляют α-аминогруппу, чем повышают уровень активности. Рудингер и Йошт синтезировали различные дезаминокарбоокситиновые аналоги:



Проверенная концепция была перенесена также на синтез вазопрессина и хорошо зарекомендовала себя при получении аналогов с различными фармакологическими свойствами. Особый интерес представляют аналоги с продолжительным раздельным действием на молочные железы или матку. Так, например, [2-О-метилтирозин]окситоцин проявляет специфическое действие на матку *in situ* (Рудингер, 1967 г.), в то время как дезамино-[4-глутамил- $\gamma$ -метиловый эфир, карбо<sup>1</sup>]окситоцин (Йошт и др.) действует преимущественно на молочные железы. Большой интерес вызывал синтезированный Маннингом [623] [Thr<sup>4</sup>]окситоцин, оказывающий более специфическое и более сильное действие, чем природный гормон. Повышенный биологический эффект в результате обычной замены аминокислоты без дальнейших структурных модификаций, как было сделано у многих активных аналогов, объясняется отличным от имеющего место в случае природного окситоцина и еще не полностью интерпретируемым механизмом гормон-рецепторного взаимодействия. Этот феномен был назван «химической» мутацией.

Большие усилия были предприняты для того, чтобы найти корреляцию между химическими и биологическими свойствами нейрогипофизарных гормонов, а также их аналогов и их конформацией в растворах. Вальтер и сотр. [625] на основании исследований ЯМР-спектров [624] предложили «биологически активную конформацию» для окситоцина (рис. 2-35). Это пространственное расположение отличается от модели Урри — Вальтера [626] тем, что боковая цепь тирозина расположена над 20-членным кольцом. Правда, существуют некоторые признаки, позволяющие говорить не о единственной «биологически активной конформации». Скорее всего, один из конформеров, находящихся в равновесии, предпочтительно вступает во взаимо-

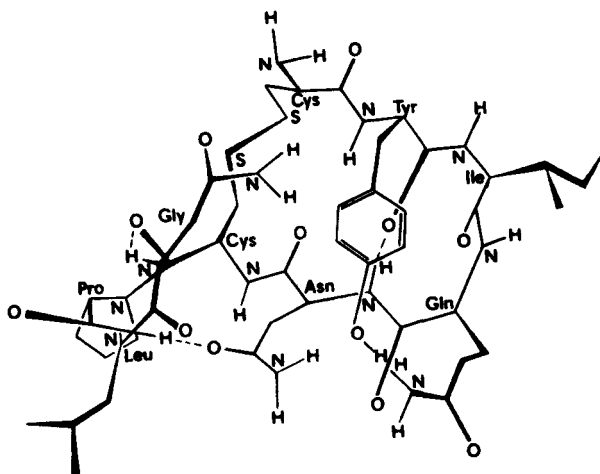


Рис. 2-35. Предположительная биологически активная конформация окситоцина [625].

действие с рецептором. На основе конформационных моделей Вальтер и сотр. [627] вывели определенные принципы для синтеза эффективных аналогов.

Практическое значение имеют также аналоги вазопрессинового ряда с пролонгированной и раздельной вазопрессорной и антидиуретической активностью. Из большого числа синтетических аналогов следует выделить лишь некоторые. Высокоактивные аналоги особенно удобны для введения через нос, так как слизистая оболочка носа способна ограниченно впитывать препарат.

Действие на почки производимого промышленностью 1-дезамино-[D-Arg<sup>8</sup>]вазопрессина увеличено в 400 раз по сравнению с природным вазопрессином, причем изменения давления крови практически не наблюдается. 1-Дезамино-[Val<sup>4</sup>,D-Arg<sup>8</sup>]вазопрессин [628] — синтетическое производное, показавшее отношение между уровнями антидиуретической и прессорной активностей > 125 000 (отношение соответствующих активностей для [Arg<sup>8</sup>]вазопрессина равно единице) и вследствие этого имеющее применение при лечении формы диабета *Diabetes insipidus*. В то же время аналоги вазопрессина со специфической прессорной активностью имеют значение в гинекологии для замены адреналина при местной анестезии. N<sup>α</sup>-Gly-Gly-Gly[Lys<sup>8</sup>]вазопрессин (глипрессин) *in vitro* обладает пролонгированным действием [631] и, как и [дез-Gly-NH<sub>2</sub><sup>9</sup>]вазопрессин, представляет практический интерес вследствие действия на центральную нервную систему. Значение нейрогипофизарных гормонов и некоторых их аналогов в связи с деятельностью центральной нервной системы обсуждается в разд. 2.3.3.

Большое внимание уделяется также синтезу специфических антагонистов. Так, в окситоциновом ряду заменой N-концевого цистеина на пеницилламин или β-меркапто-β,β-диметилпропионовую кислоту [629], а также определенными модификациями тирозина в положении 2 получают производные с ингибиторными к окситоциновым рецепторам свойствами. В качестве примера можно привести [о-нод-Туг<sup>2</sup>]окситоцин [630] или синтезированный Йоштом и др. N<sup>2</sup>-ацетил-[2-О-метил-Туг]окситоцин.

### 2.3.1.7. Гормоны гипоталамуса [632—638]

После рассмотрения нейрогормонов окситоцина и вазопрессина, образующихся в нейросекреторных клетках гипоталамуса, выглядит парадоксальным использование названия «гормоны гипоталамуса» для пептидных гормонов, образующихся в различных областях ядра гипоталамуса и действующих на переднюю долю гипофиза. Но за неизменением удовлетворительного названия для этой группы гормонов гипоталамуса следует это разграничение сохранить, тем более что в специальной литературе окситоцин и вазопрессин классифицируются как нейрогипофизарные гормоны.

Гипоталамус является частью промежуточного мозга и влияет на многие физиологические жизненно важные процессы в организмах млекопитающих. Он представляет собой важный преобразователь, в котором нервные импульсы трансформируются в гормональные сигналы и таким об-

разом осуществляется относительно быстрое приспособление внутрисекреторной системы к внешним изменениям. Существование гормонов гипоталамуса было постулировано Хинсеом, а также Грином и Харрисом (1937—1949 гг.). Многочисленные исследования за следующие двадцать лет привели к выводу, что существует семь освобождающих и три ингибирующих гормонов, которые в передней доле гипофиза либо вызывают выработку гормонов, либо его ингибируют. Согласно так называемой единой концепции, каждый гормон гипоталамуса всегда контролирует гормон аденогипофиза. Новые данные, полученные в 1969—1971 гг. привели к мнению, что как минимум в одном случае эта концепция нарушается. Выделение ЛГ и ФСГ индуцируется одним и тем же гормоном гипоталамуса. В табл. 2-14 приведены все известные к настоящему времени гормоны гипоталамуса.

В соответствии с рекомендациями комиссии ПУРАС—IUB по биохимической номенклатуре [639] следует называть рилизинг-факторы *либеринами*, а гормоны, ингибирующие выделение, — *статинами*. Рассматривая функциональное многообразие некоторых гормонов гипоталамуса, как, например, соматостатина (гормон гипоталамуса, тканевый гормон в желудочно-кишечном тракте и нейротрансмиттер в центральной нервной системе), сталкиваются с проблемой названия. Кроме того, не решена проблема названия всей группы гормонов. Нужно выждать, окажется ли более жизнеспособным название *цибернины*, предложенное Гийеменом, или предпочтение будет отдано обобщенному названию *гипофизотропные гормоны*.

Гормоны гипоталамуса образуются в определенных центральных областях гипоталамуса, следуют в *Eminentia mediana* и оттуда в систему воротной вены гипофиза. Обсуждается вопрос о нерибосомной системе синтеза

Таблица 2-14. Гормоны, обладающие подавляющим действием, и либерины из гипоталамуса

Гормон	Принятое в англосаксонской литературе сокращение	Название согласно номенклатуре, IUPAC—IUB
Гормон, ингибирующий выделение пролактина	PIH	Пролактостатин
Гормон, ингибирующий выделение соматотропина	SIH	Соматостатин
Гормон, ингибирующий выделение меланотропина	MIH	Меланостатин
Рилизинг-фактор тиреотропина	TRH	Тиреолиберин
Рилизинг-фактор гонадотропина	GRH	Гонадолиберин
Рилизинг-фактор ЛГ	LRH	Люлиберин
Рилизинг-фактор ФСГ	FSH-RH	Фоллиберин
Рилизинг-фактор кортикотропина	CRH	Кортиколиберин
Рилизинг-фактор пролактина	PRH	Пролактолиберин
Рилизинг-фактор соматотропина	SRH	Соматолиберин
Рилизинг-фактор меланотропина	MRH	Меланолиберин

этих веществ, но, вероятно, эта точка зрения не будет принята в дальнейшем, так как до сих пор известные гормоны гипоталамуса не имеют каких-либо необычных структурных особенностей ( $\omega$ -пептидная связь, D-аминокислоты, N-метиламинокислоты и др.). Предположение об образовании из прогормона, напротив, не выглядит ошибочным. В передней доли гипофиза путем гормон-рецепторного взаимодействия на рецепторах клеточных мембран, и затем через аденилатциклазную систему они стимулируют

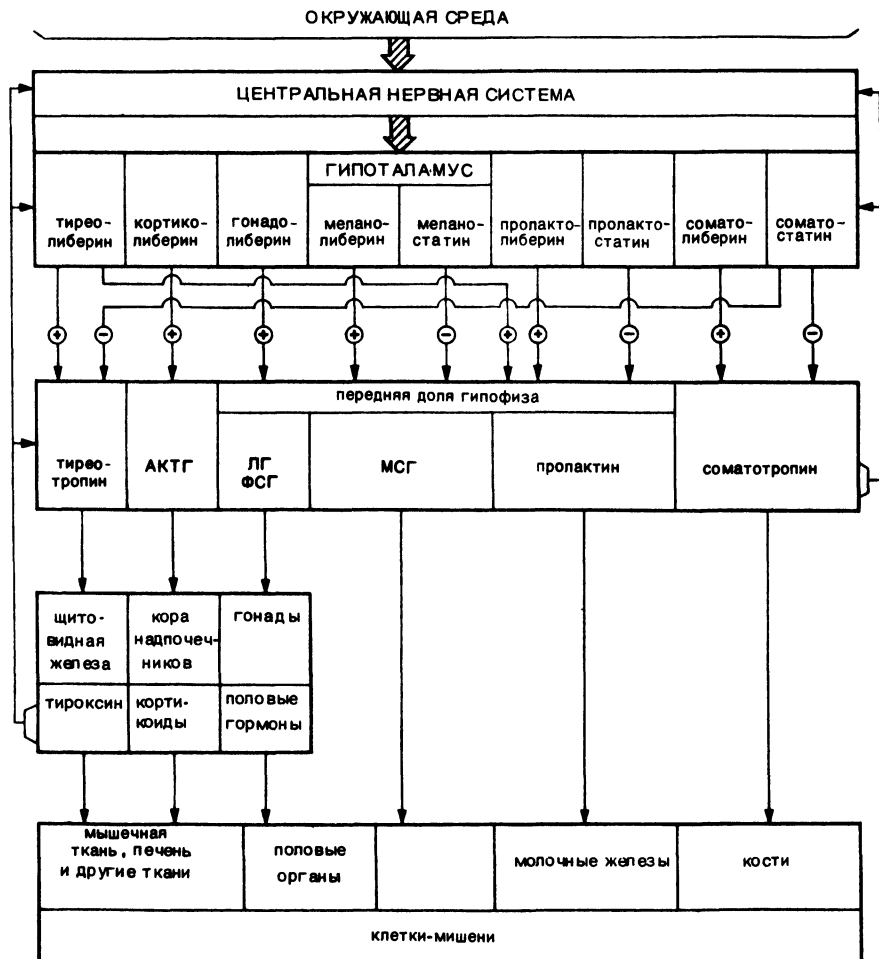


Рис. 2-36. Регуляция передней доли гипофиза гормонами гипоталамуса и действие гонадотропных гормонов [638].

ют выделение гормонов, действующих на секреторные железы. Затем следует быстрая их инактивация и разрушение находящимися вблизи протеолитическими ферментами. За регуляцию обмена гормональных веществ в гипоталамусе ответственна исключительно тонко настроенная гормональная и нервная система, состоящая из сети прямых и обратных связей между высшими мозговыми центрами, гипоталамусом, гипофизом и эндокринными железами. На рис. 2-36 представлены в упрощенной форме регуляция передней доли гипофиза и действие гормонов гипоталамуса, включая цепи обратной связи.

Гормоны гипоталамуса — в высшей степени активные химические соединения. Лишь с развитием радиоиммунного метода определения их содержания стало возможным продвинуться в этой новой области биологически активных пептидов. Небезынтересно упомянуть, что уже 1 нг тиреолиберина оказывает биологическое действие на мышцу, а на изолированном гипофизе исследование этого либерина проводится в пикограммовой области. Практическое значение гормонов гипоталамуса следует прежде всего искать в области диагностики для исследования функций гипофиза. Можно быть уверенным, что дальнейшие фундаментальные исследования в этой области откроют новые возможности терапевтического применения в медицине и ветеринарии.

После этих вводных замечаний о гормонах гипоталамуса, принимающих участие в регуляции аденогипофиза, следует еще раз настоятельно указать на то, что выбранное название «гормоны гипоталамуса» также не может быть удовлетворительным. Гипоталамус содержит и другие пептиды с высокой биологической активностью. Вещество Р и нейрогензин — наиболее известные примеры, причем в будущем число обнаруженных в гипоталамусе пептидов несомненно будет больше.

Литература о биохимии и физиологии гормонов гипоталамуса весьма обширна, поэтому для более детальной информации следует прежде всего ознакомиться с обзорными работами по этому вопросу [632—638].

### 2.3.1.7.1. Тиреолиберин

Выделение и установление структуры тиреолиберина (рилизинг-фактор тиреотропина) демонстрирует те трудности, с которыми приходится сталкиваться при работе с гормонами гипоталамуса. Во-первых, эти гормоны образуются в гипоталамусе в нанogramмовых количествах, и, во-вторых, масса гипоталамуса свиньи всего 500 мг, поэтому уже правильное взятие крошечных кусочков ткани (около 300 000 гипоталамусов), необходимых для структурных исследований, представляет проблему.

Высокие требования должны предъявляться к разработке и повышению чувствительности как тестовых систем *in vitro* или *in vivo* для биологического контроля процесса выделения, так и методов установления строения полученного в результате весьма незначительного количества чистого вещества. В результате многолетней работы группам Шалли [640] и Гийемена [641] удалось наконец выделить чистый тиреолиберин из тканей гипоталамуса свиньи и овцы соответственно. Последовательные стадии процесса выделения приведены в табл. 2-15.

Таблица 2-15. Стадии очистки при выделении тиреолиберина [642]

Исходный материал (лиофилизированная ткань, ~ 300 000 гипоталамусов овцы, 25 кг)

Стадии очистки	Масса биологически активного материала	Активность тиреолиберина, ед./мг
Экстракция (спирт/хлороформ)	294 г	1
Ультрафильтрация	71 г	3
Разделение на сефадексе G-25 (2 раза)	16 г	16
Распределительная хроматография (2 раза)	246 мг	800
Адсорбционная хроматография (2 раза)	4,2 мкг	30 500
Распределительная хроматография	2,0 мкг	58 500
Распределительная хроматография	1,0 мкг	57 000

Установление структуры гормона оказалось чрезвычайно сложным делом. Следующая аминокислотная последовательность тиреолиберина подтверждена химическим синтезом:



С 1969 г. описано большое число синтезов тиреолиберина; число его аналогов, синтезированных для изучения взаимосвязи структуры и функции, превышает 100. Почти все полученные аналоги имеют незначительную по сравнению с нативным гормоном биологическую активность. Более высокую активность (800% активности природного гормона) имеет Me-His<sup>2</sup>-тиреолиберин [643].

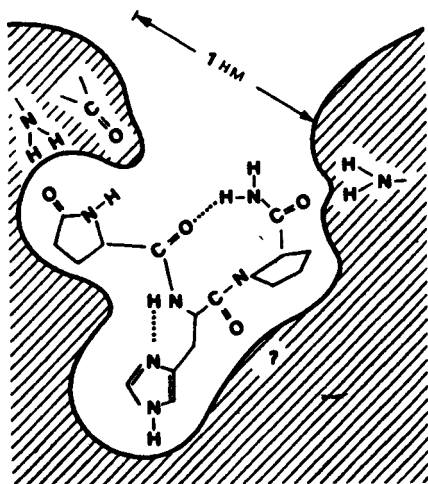


Рис. 2-37. Схема взаимодействия тиреолиберина с рецептором [644].

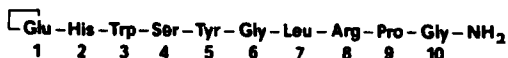
Тиреолиберин регулирует в аденогипофизе синтез и секрецию тиротропина — гормона, стимулирующего щитовидную железу (рис. 2-36). Вероятно, ему также свойствен эффект стимуляции выделения пролактина (окончательно в этом вопросе еще нет ясности). Исследования конформации и данные о биологической активности синтетических аналогов тиреолиберина позволили Петерсону и Гийемему [644] предложить трехмерную модель взаимодействия гормона с рецептором (рис. 2-37).

Тиреолиберин нетоксичен, он может быть введен внутривенно, внутримышечно, а также путем приема внутрь. Его применяют при диагностике и терапии заболеваний щитовидной железы. Наблюдаемое антидепрессивное действие на человеческий организм еще окончательно не объяснено. Кроме того, выявляются и другие области применения тиреолиберина в медицине. Вероятно, созданием подходящих аналогов удастся достичь избирательного действия гормона.

### 2.3.1.7.2. Гонадолиберин (релизинг-фактор гонадотропина) [647]

Релизинг-фактор гонадотропина удалось впервые (1971 г.) выделить из гипоталамуса свиньи и овцы группе Шалли [645], а тремя годами позднее также группе Гийемена [646]. Гонадолиберин рассматривается как исключение из так называемой единой концепции, поскольку он вызывает выделение как лютеинизирующего гормона (ЛГ), так и фолликулостимулирующего гормона (ФСГ). Антитела к синтетическому гормону одновременно тормозят выделение ЛГ и ФСГ. Но поиски второго гормона, стимулирующего выделение ЛГ и ФСГ, все-таки продолжаются.

По данным группы Шалли [648], занимающейся установлением первичной структуры, гонадолиберин имеет следующую последовательность:



К настоящему времени описаны различные варианты синтеза этого либерина, причем приведенный амид декапептида может быть относительно легко синтезирован на твердой фазе. Уже синтезировано очень большое число его аналогов. Исследованием взаимосвязи структуры и функции надеются получить представление о гормон-рецепторном взаимодействии и затем понять механизм связывания гормона с рецептором и проявления биологического эффекта. Кроме того, для разработки препаратов с пролонгированным действием интересны антагонисты гонадолиберина. Все еще не решенный вопрос о существовании, в соответствии с единой концепцией, двух различных гонадолиберинов мог бы получить более детальное объяснение в результате таких исследований. Повышение биологической активности показывают [D-Ala<sup>6</sup>MeLeu<sup>7</sup>, Des-Gly-NH<sub>2</sub><sup>10</sup>, Pro-этиламид<sup>9</sup>]гонадолиберин, [Phe<sup>5</sup>, D-Ala<sup>6</sup>, Des-Gly-NH<sub>2</sub><sup>10</sup>, Pro-этиламид<sup>9</sup>]гонадолиберин, [D-Ser<sup>4</sup>, D-Leu<sup>4</sup>, дез-Gly-NH<sub>2</sub><sup>10</sup>, Pro-этиламид<sup>9</sup>]гонадолиберин и др., причем последний аналог обнаруживает пролонгированное действие и, кроме того, может быть введен парэнтерально, путем приема внутрь или через нос. Полезными ингибиторными свойствами обладает [дез-His<sup>2</sup>, D-Ala<sup>6</sup>]гонадолиберин [649].

Гонадолиберин и его аналоги применяют при диагностике и терапии бесплодия у мужчин и женщин.

### 2.3.1.7.3. Кортиколиберин

В качестве кортиколиберина принимается 41-членный пептид амуниин, который, так же как 41-членный пептид уротензин или 40-членный пептид саувагин, как *in vivo*,



так и *in vitro* дает кортикотропин и  $\beta$ -эндорфин. Между этими тремя пептидами существует отчетливое сходство в первичной структуре.

#### 2.3.1.7.4. Пролактолиберин и пролактостатин (рилизинг-фактор пролактина и гормон, ингибирующий выделение пролактина) [650]

Эти гормоны регулируют образование и выделение пролактина в передней доле гипофиза. Несмотря на множество частично противоречащих друг другу данных, ясных представлений о структуре обоих постулированных гормонов пока нет, но предполагается, что аналогично известным либеринам они также могут быть пептидными гормонами или нейротрансмиттерами.

Исходя из различных данных о том, что тиреолиберин стимулирует путем повышения выделения пролактина секрецию молока у животных и человека, была постулирована идентичность тиреолиберина и пролактолиберина [652], но доказательства для этого еще должны быть получены. Вероятно, обнаружится структурное подобие между тиреолиберинном и до сих пор еще не известным пролактолиберинном.

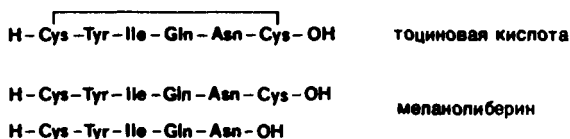
#### 2.3.1.7.5. Меланолиберин и меланостатин (рилизинг-фактор меланотропина и гормон, ингибирующий выделение меланотропина) [650]

Хотя физиологическая роль МСГ у человека еще неясна, интересен механизм регуляции его выделения в аденогипофизе. В качестве меланостатина были предложены пептиды, в значительной степени происходящие из окситоцина:



Меланостатин I [653, 654] образуется из окситоцина при ферментативном отщеплении С-концевого амида тетрапептида. Вальтером [655] было доказано существование соответствующей пептидазы, связанной с мембранами в *Eminentia mediana* гипоталамуса. Этим впервые было показано, что определенный гормон (окситоцин) может функционировать как предшественник нового гормона (меланостатина). Из «прогормона второго порядка» окситоцина образуется гормон с совершенно другим биологическим действием. Эта концепция была перенесена и на другие примеры [656]. Меланостатину II приведенной структуры, по-видимому, будет придаваться малое значение.

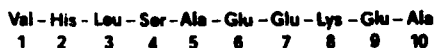
О меланолиберине известно намного меньше. Предположительно это открытое кольцо тоциновой кислоты или соответствующий пептапептид:



Фермент, образующий меланолиберин из окситоцина, был обнаружен в митохондриях *Eminentia mediana* и тканях гипоталамуса группой Вальтера. Но, несмотря на этот факт, общая проблематика регуляции выделения МСГ остается сложной, и факты трудно интерпретируемы. Меланостатин I рекомендован к применению при болезни Паркинсона.

### 2.3.1.7.6. Соматолиберин (рилизинг-фактор соматотропина)

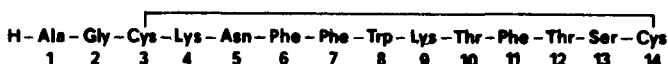
В 1969 г. Шалли и сотр. [657] из гипоталамуса свиньи выделили декапептид следующей структуры:



Он обнаруживает поразительное сходство с N-концевым участком  $\beta$ -цепи гемоглобина свиньи. Хотя выделенный природный пептид и пептид, синтезированный Вебером, как *in vitro*, так и *in vivo* стимулируют выделение соматотропного гормона, радиоиммунный тест дал отрицательный результат. Структура подлинного соматолиберина, вероятно, еще не установлена.

### 2.3.1.7.7. Соматостатин (гормон, ингибирующий выделение соматотропина) [658, 659]

В экспериментах по хроматографической очистке соматолиберина Гийемен обнаружил фракцию, показавшую ингибирующий эффект на секрецию СТГ. Этот поразительный факт привел к выделению чистого соматостатина. Для работы потребовалось использовать 490 000 лиофилизированных гипоталамусов овцы суммарной массой 36,8 кг. После 8 стадий очистки удалось выделить 8,5 мг чистого соматостатина, который, как было показано установлением первичной структуры, подтвержденной затем синтезом, является гетеродетным циклическим тетрадекапептидом [660]:



Тремя годами позднее Шалли и сотр. [661] описали выделение аналогичного гормона из гипоталамуса свиньи.

В 1978 г. из желудочно-кишечного тракта Прадайролом и в 1980 г. из гипоталамуса Гийеменом и Шалли был выделен так называемый *соматостатин-28* — прогормон соматостатина. В 1981 г. Вюнш подтвердил полным синтезом его структуру:



Биосинтез проходит через стадию образования препросоматостатина, состоящего из 121 аминокислотного остатка, в котором последовательность соматостатина является C-концевой [661a].

Соматостатин присутствует не только в гипоталамусе, но также и вне его, в центральной нервной системе и, кроме того, в желудочно-кишечном тракте и поджелудочной железе. Он не только тормозит выделение соматотропного гормона, но и влияет на выделение инсулина и его партнера — глюкагона и тем самым играет

важную роль в обмене углеводов. В аденогипофизе выделение соматотропина тормозится соматостатином как *in vitro*, так и *in vivo* и независимо от того, как была вызвана секреция. Он вмешивается также в регуляцию тиротропной системы и действует при этом как антагонист тиреолиберина. В экспериментах *in vitro* соматостатин ингибирует секрецию пролактина, хотя известны и противоположные результаты. Нет никаких указаний на то, что гормон влияет на выделение МСГ. Секреция АКТГ и гонадотропина соматостатином не подавляется. Соматостатин наряду с тиреолиберном обнаружен также в нейрогипофизе, где, вероятно, стимулирует выделение [Arg<sup>8</sup>]вазопрессина. Аналогично тиреолиберину, гонадолиберину и меланостатину I соматостатин действует вне гипоталамуса в качестве нейротрансмиттера и, вероятно, в качестве партнера тиреолиберина. Кроме того, соматостатин модулирует нейронную активность в центральной нервной системе. В желудке соматостатин вызывает снижение секреции гастрина, пепсина, соляной кислоты и, кроме того, замедляет моторику и кровоснабжение желудка, в то же время в тонкой кишке ингибируется выделение секретина и холецистокининапанкреозимина. Обнаружение соматостатина в D-клетках островков Лангерганса поджелудочной железы вызывает особый интерес в связи с влиянием на секрецию инсулина и глюкагона в B- или A-клетках. Большое значение имеет применение соматостатина для диагностики и терапии, причем кроме лечения диабета возможно также его применение при других заболеваниях, например при акромегалии (стр. 244), панкреатите, синдроме Цоллингера — Эллисона, при желудочных кровотечениях и др.

Таблица 2-16. Биологическая активность некоторых аналогов соматостатина (подавление секреции инсулина, глюкагона и соматотропина; активность соматостатина принята за 100%) [658]

Соматостатин и его производные	Активность (%) в отношении		
	инсу- лина	глюка- гона	сомато- тропи- на
Соматостатин	100	100	100
[D-Тгр <sup>8</sup> ]соматостатин	821	639	800
[дез-Asn <sup>5</sup> ]соматостатин	10	1	4
[дез-Ser <sup>13</sup> ]соматостатин	4	1	10
[дез-Asn <sup>5</sup> , D-Тгр <sup>8</sup> ]соматостатин	60	1	13
[дез-Asn <sup>5</sup> , D-Ser <sup>13</sup> ]соматостатин	481	1	1
[D-Тгр <sup>8</sup> , D-Ser <sup>13</sup> ]соматостатин	261	1	70
[дез-Asn <sup>5</sup> , D-Тгр <sup>8</sup> , D-Ser <sup>13</sup> ]соматостатин	1753	100	13
[дез-AK <sup>1,2,4,13</sup> , D-Тгр <sup>8</sup> ]соматостатин	75	8	8
[дез-AK <sup>1,2,4,12,13</sup> , D-Тгр <sup>8</sup> ]соматостатин	72	1	1
[дез-AK <sup>1,2,4,5,13</sup> , D-Тгр <sup>8</sup> ]соматостатин	36	7	25
[дез-AK <sup>1,2,4,5,12</sup> , D-Тгр <sup>8</sup> ]соматостатин	70	21	—
[дез-AK <sup>1,2,4,5,12,13</sup> , D-Тгр <sup>8</sup> ]соматостатин	45	7	9

AK — аминокислотный остаток.

Широта биологического эффекта ограничивает применение соматостатина в медицине. Практическое значение имеют синтетические производные природного гормона с целенаправленным действием и аналоги соматостатина, действующие при приеме внутрь. По имеющимся в настоящее время данным, соматостатин оказывает заметное побочное действие.

Структурно-функциональные исследования соматостатина показали, что N-концевой дипептид, вероятно, не имеет существенного значения для биологического действия. Соматостатин с заменой на D-Трп в восьмом положении обладает в восемь раз более высокой биологической активностью по сравнению с нативным гормоном. Чрезвычайно сильный интерес к аналогам с пролонгированным действием (время полураспада природного гормона в организме составляет лишь несколько

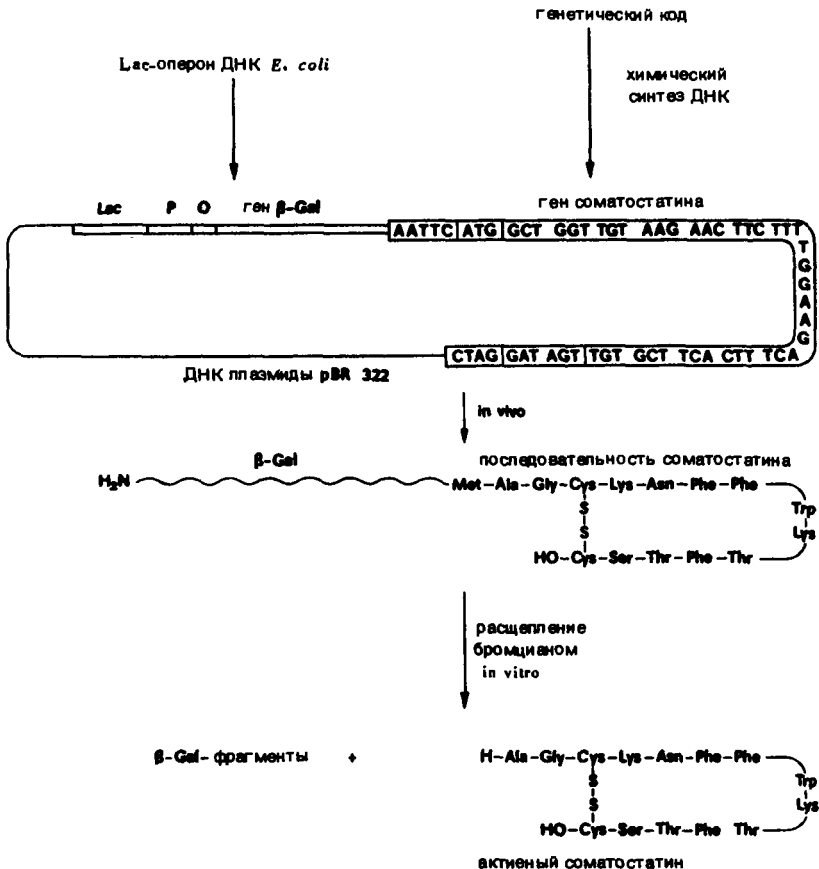


Рис. 2-38. Схема синтеза соматостатина соединением полностью синтетического гена с β-галактозидазным геном в плазмиде pBR 322 *E. coli* [666].

минут) и узконаправленной специфичностью объясняет то, что к настоящему времени синтезировано огромное количество производных соматостатина [662—664]. Относительно аналогов избирательного действия уже получены первые обнадеживающие результаты (табл. 2-16).

Особенно следует отметить результаты группы Вебера [663], проводящей систематические исследования с целью повышения метаболической стабильности соматостатина. Особенно действенными оказались циклические аналоги с укороченной цепью. В связи с избирательностью действия следует упомянуть синтетические аналоги, селективно ингибирующие секрецию гормона роста, гормона роста и глюкагона или гормона роста и инсулина, как, например, синтезированный Гарски [D-Trp<sup>5,8</sup>]соматостатин [665].

На примере соматостатина впервые был проведен синтез биологически активного пептида с помощью химически синтезированного гена [666]. Синтетический ген соматостатина удалось соединить с  $\beta$ -галактозидазным геном *E. coli* в плазмиде pBR 322. Затем этот ген включился в бактерию. С участием химерной ДНК плазмиды осуществлялся биосинтез полипептида, содержащего последовательность соматостатина. Затем *in vitro* с помощью бромциана от большого химерного полипептида селективно отщеплялся биологически активный соматостатин (рис. 2-38).

Эксперименты по переносу синтетического гена в бактериальную хромосому открывают новую возможность для синтеза биологически активных пептидов.

### 2.3.1.8. Инсулин [667—670]

Полипептидный гормон инсулин образуется в В-клетках островков Лангерганса. Физиологически недостаточность гормона проявляется в повышенном содержании глюкозы в крови (гипергликемия). Нормальное содержание глюкозы в крови человека ~ 100 мг-% (100 мг/100 мл), у жвачных животных ~ 50 мг-%, у птиц ~ 200 мг-%. Инсулин снижает содержание сахара в крови. В общем инсулин повышает проницаемость клеток для глюкозы, а также для аминокислот, липидов и ионов калия. Инсулин влияет как на активацию гликогенсинтетазы, так и на индукцию глюкокиназы и фосфофруктокиназы. Он стимулирует синтез гликогена и белков. Кроме снижения липолиза ингибируется образование пируваткарбоксилазы и фруктозодифосфатазы. Удовлетворительная интерпретация такого многостороннего действия на молекулярном уровне в настоящее время еще невозможна. Типичным симптомом инсулиновой недостаточности является развитие диабета *Diabetes mellitus*, о происхождении которого известно относительно мало. Эта болезнь объясняется понижением функции В-клеток, причина которого лежит на генетическом уровне. В основе другой формы диабета *juvenilen Diabetes* лежит вирусное заболевание. Известная также редкая форма диабета, при которой в организме присутствует достаточное количество или даже избыток инсулина. В этом случае, очевидно, блокируется необходимое для действия инсулина гормон-рецепторное взаимодействие. Невьясненная проблема диабета требует напряженных усилий исследователей, как медиков, так и фармакологов, тем более что в связи с повышающимся уровнем жизни и связанным с этим перееданием и малой подвижностью отмечается повышение частотности заболеваемости. Благодаря современной терапии продолжительность жизни больных диабетом увели-

чивается, однако приобретает все большее значение вопрос более поздних нарушений (ангио- и ретинопатии).

Инсулин открыт в 1921 г. Бантингом (лауреат Нобелевской премии 1923 г.) и др. как гормон поджелудочной железы, уменьшающий гипергликемию при диабете. Очистка и кристаллизация проведены в 1926 г. Абе-лем, а в 1955 г. Сенгер опубликовал полную структуру инсулина. (Это выдающееся достижение в 1958 г. также было отмечено Нобелевской преми-ей.) И наконец, в 1969 г. лауреат Нобелевской премии Кроуфут-Ходжкин с помощью рентгеноструктурного анализа установила пространственную структуру молекулы инсулина (рис. 2-42).

Инсулин состоит из двух полипептидных цепей (А-цепи и В-цепи) по 21 и 30 аминокислотных остатков соответственно, соединенных двумя дисульфидными мостиками в бициклическую систему. Кроме того, А-цепь имеет собственный дисульфидный мостик (рис. 2-40). Интересно, что инсулины из разных организмов, несмотря на различные аминокислотные последовательности, в стандартных тестах (спазмолитический тест на мышцах, окисление глюкозы в жировых тканях или в отдельных жировых клетках) показывают примерно равную биологическую активность. Так, инсулин морских свинок отличается от инсулина крысы не менее чем в 17 положениях. Обычно отличия в первичной структуре велики настолько, насколько далеко отстоят организмы друг от друга в филогенетическом раз-витии.

По молекулярной массе (~6000) и числу аминокислотных остатков в цепи инсулина формально можно отнести к полипептидам. Но зависящая от условий агрегация в димеры и гексамеры (с двумя координационно связан-ными атомами цинка), наблюдаемая в кристаллах, оправдывает отнесение инсулина к белкам. Далее следует упомянуть тенденцию к комплексообразованию с низкомолекулярными и высокомолекулярными лигандами. Так, например, терапевтическое значение имеет комплекс инсулина с цинком и протамином.

Инсулин промышленно производится преимущественно из экстрактов поджелудочной железы свиньи и телянка. В 1 кг поджелудочных желез те-ленка содержится ~2000 и.е. (27 и.е. = 1 мг) инсулина. Инсулин экстраги-руют 70%-ным этанолом, подкисленным HCl до pH 1—2; образовавшийся раствор инсулина быстро отделяют от нерастворимых протеаз (их содер-жание >40 г/кг). После дальнейшей очистки может быть получен кри-сталлический инсулин. Полученный кристаллический продукт не является чистым и не может быть далее очищен перекристаллизацией. Для тонкой очистки (отделение проинсулина, дезамидоинсулина и частично этерифици-рованного инсулина) используют хроматографию, противоточное распре-деление и в особых случаях (отделение высокомолекулярных, иммуногенных веществ) гель-хроматографию.

К началу 60-х годов пептидная химия получила такое развитие, что можно было приступать к синтезу цепей инсулина. Не менее 10 исследова-тельских групп взялись за выполнение этой задачи. но лишь группы Цана (в Ахене), Кацюяниса (в Питтсбурге) и Ванга (в Шанхае) после многолетней

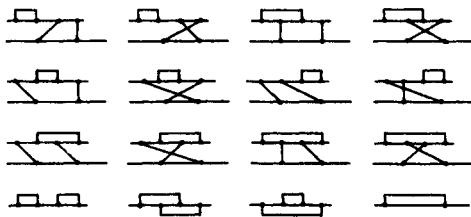


Рис. 2-39. Схема образования изомеров инсулина и мономерных А- и В-цепей с замкнутыми дисульфидными связями (по Цану).

работы достигли цели. Все три группы выбрали стратегическую концепцию раздельного построения цепей и затем статистического окисления в биологически активный инсулин. Сомнения в возможности получения инсулина этим путем были рассеяны работой Диксона и Вардлоу. Ими было проведено совместное окисление восстановленных А- и В-цепей природного инсулина и в результате получен продукт с 1—2%-ной инсулиновой активностью. Имея в виду, что в этих условиях может образоваться кроме 12 изомеров инсулина еще 4 мономера А- и В-цепей с внутренними дисульфидными мостиками и значительное число полимеров (рис. 2-39), результат можно считать обнадеживающим.

Используя улучшенную комбинированную методику (50%-ный избыток А-цепи, рН 10,6), был получен [671] продукт, имеющий 10—20% инсулиновой активности, и выделен инсулин в кристаллическом виде. Выбранные Цаном стратегическая и тактическая концепции для первого синтеза инсулина показаны на рис. 2-40. Схемы синтеза, использованные американскими и китайскими учеными, отличаются лишь в методических деталях.

Уже в середине 1963 г. Кацюянису с сотр. удалось закончить полный синтез А-цепи инсулина овцы, давшей при окислении с природной В-цепью по Диксону продукт с содержанием инсулина 0,26%. В том же году группа Цана [672] описала полный синтез обеих цепей инсулина с результирующей активностью ~1%. Полный выход защищенной А-цепи составил 2,9%, а В-цепи — 7%, причем синтез А-цепи включал 89, а В-цепи 132 стадии. К этому необходимо добавить 3 стадии конденсации.

В 1964 г. полный синтез обеих цепей опубликован также Кацюянисом с сотр. [673], и в 1965 г. группа Ванга закончила синтез инсулина телянка [674], причем в последнем случае был впервые получен, исходя из синтетических цепей, кристаллический инсулин, совпадающий с природным продуктом по всем свойствам. В последующее время были проведены более эффективные синтезы цепей и удалось повысить выходы при их сочетании [669].

Новый стратегический вариант синтеза инсулина появился как следствие открытия Штайнером [675] в 1967 г. проинсулина. При этом обнаружено, что биосинтез инсулина идет через одноцепочечный предшественник. В од-

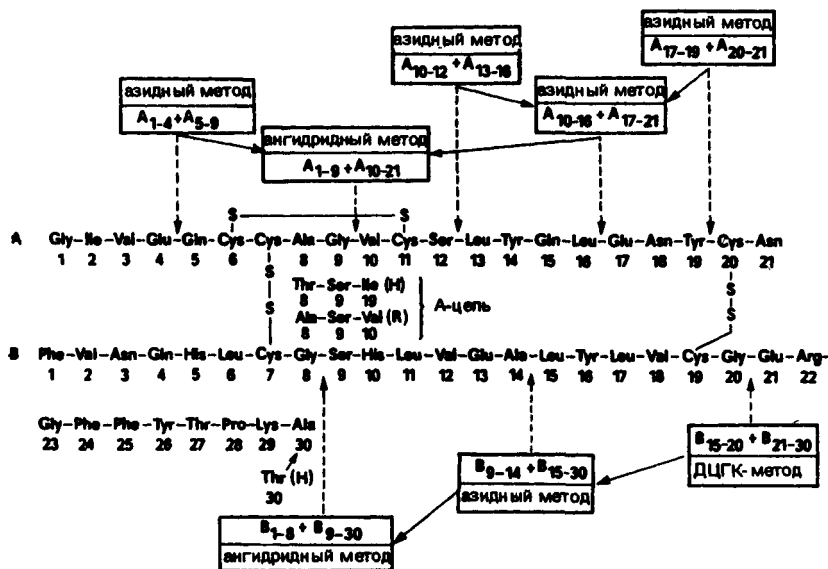


Рис. 2-40. Стратегия синтеза инсулина овцы по Цану [672]. Инсулины человека (H) и теленка (R) отличаются от инсулина овцы участком 8 — 10 А-цепи. Кроме того, инсулин человека имеет отличие в положении В-30.

нопочечном пептиде благодаря подходящему пространственному расположению возможно оптимальное замыкание дисульфидных мостиков. Восстановлением дисульфидных связей и их последующим реокислением был получен проинсулин с ~ 70%-ным выходом. На рис. 2-41 приведена первичная структура проинсулина свиньи, состоящего из 84 аминокислот. Однако первичный продукт биосинтеза инсулина не проинсулин, а *препроинсулин* [676]. В процессе биосинтеза на первом этапе образуется фрагмент, содержащий в соответствии с так называемой сигнальной гипотезой (разд. 3.7.3) N-концевую сигнальную последовательность с информацией о том, что последующая последовательность проинсулина строится прямо на мембране эндоплазматического ретикулума и что этот инсулиновый предшественник уже в процессе синтеза должен уходить через мембрану по внутренним каналам ЭР. Еще во время биосинтеза сигнальный пептид отщепляется особой «сигнальной» пептидазой. Проинсулин затем идет в аппарат Гольджи, где расщепляется на инсулин и С-пептид и в кристаллической форме в присутствии цинка накапливается в визикулах. При соответствующем физиологическом раздражении происходит экзоцитоз и содержимое визикул попадает в кровь.

Длина С-цепи неодинакова в различных организмах (у человека 35, свиньи 33 и теленка 30 аминокислотных остатков), кроме того, существуют значительные различия в аминокислотной последовательности, являющие-



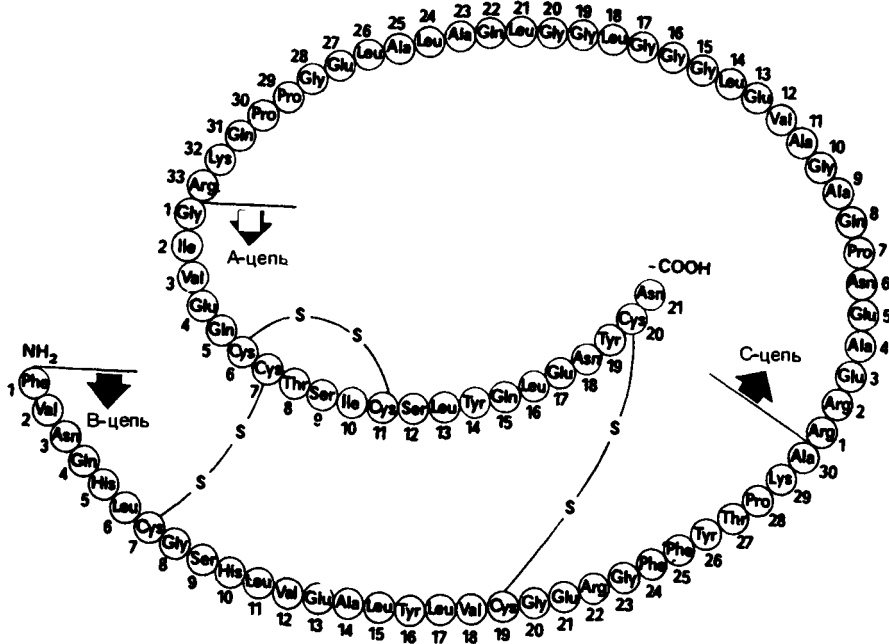
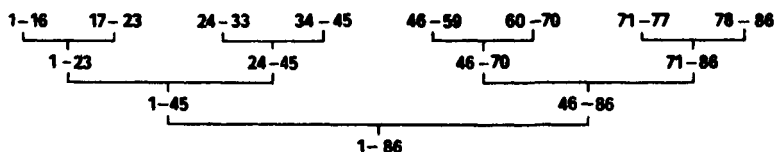


Рис. 2-41. Первичная структура проинсулина свиньи [675].

ся причиной иммуногенных свойств препаратов инсулина, содержащих обычно в незначительном количестве проинсулин.

Полный синтез человеческого проинсулина (86 аминокислотных остатков) описан в 1977 г. Янанхара с сотр. [677], а также начат Цаном [678]:



Не говоря о том, что этот подход сам по себе является заслуживающей внимания научной задачей, такой путь синтеза применим для производства гормона поджелудочной железы инсулина в больших масштабах.

Интересный новый подход к синтезу инсулина вытекает из его пространственной структуры (рис. 2-42). Модель молекулы инсулина можно расположить в пространстве таким образом, что N-конец А-цепи и С-конец В-цепи, т. е. места соединения с С-фрагментом, находятся друг от друга на расстоянии ~ 1 нм. Можно подобрать сшивающий реагент, который формально может взять на себя функцию С-цепи и фиксировать конформацию

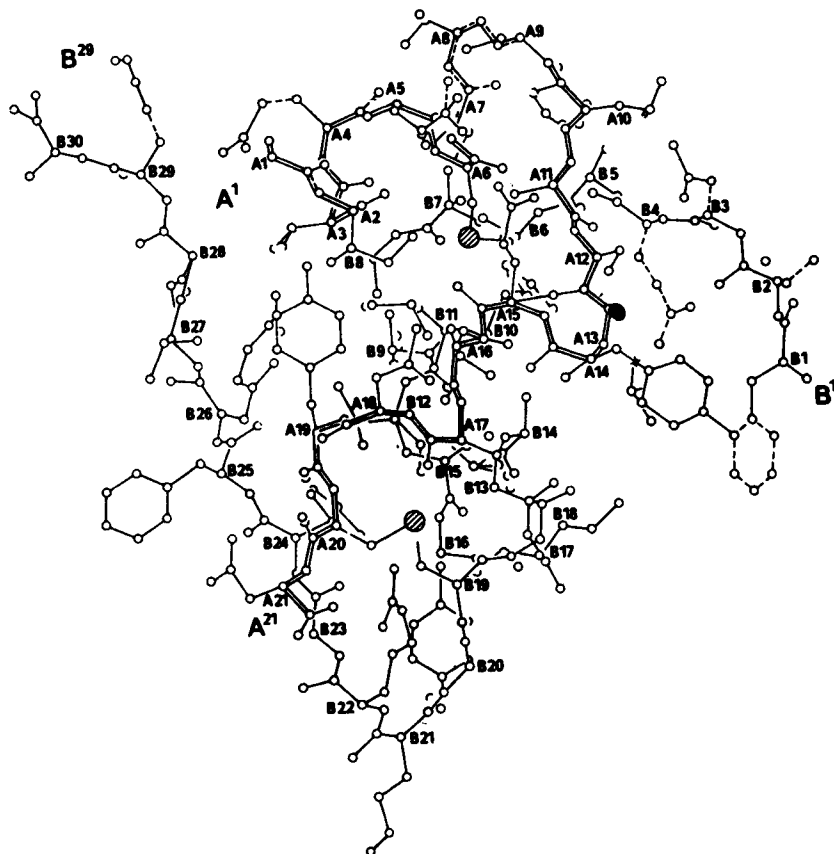


Рис. 2-42. Трехмерная модель мономера инсулина [679].

А- и В-цепей, необходимую для правильного образования дисульфидных мостиков. Систематическими исследованиями по рекомбинации сшитых А- и В-цепей занимались преимущественно Линдсей, Бранденбург и Цан, а также группа Гейгера. Причем использованием сшивающего реагента была продемонстрирована принципиальная возможность синтеза инсулина по такому пути (рис. 2-43).

Однозначное доказательство первичной структуры инсулина, предложенной Сенгером, может быть получено лишь в том случае, когда дисульфидные мостики замыкаются однозначным образом в процессе химического синтеза и дисульфидный обмен исключен. После предварительной работы, проведенной Зервасом и Фотаки, а также Хиски с сотр., это удалось в 1974 г. группе Риттеля [495], осуществившей по этому пути синтез инсулина человека. Исходя из описанного в 1973 г. этой группой цистинового пеп-

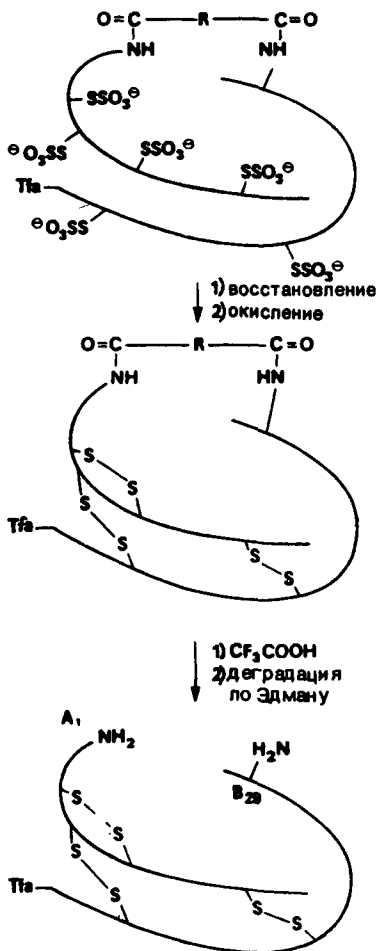
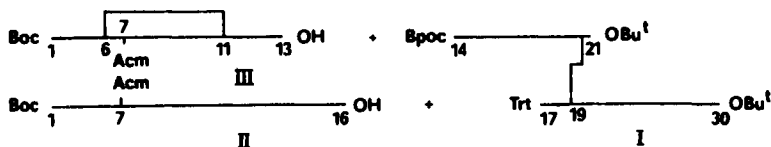


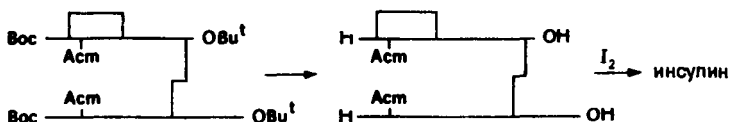
Рис. 2-43. Рекомбинация цепей инсулина с применением сшивающих реагентов [680].

тида А(20—21)-В(17—20) после присоединения к участку А-цепи Врос-А(14—19)-ОН и соответственно к участку В-цепи Н-В(21—30)- $\text{OBu}^t$  был получен большой асимметричный цистиновый сегмент I с дисульфидной связью между  $\text{A}^{20}$  и  $\text{B}^{19}$ :



Данная концепция синтеза предъявляет экстремально высокие требования к селективности защитных групп, причем должны были быть выработаны условия отщепления тритильной группы в присутствии в высшей степени кислотолabileй Врос-группы. Подходящим оказался ацидолиз тритильного остатка в трифторэтанол как растворителе при контроле pH. Затем сегмент II был сконденсирован с помощью ДЦГК/НОВt с частично защищенным сегментом I. Затем после селективного удаления Врос-группы последовала конденсация с сегментом III, -синтез которого также был сопряжен со значительными трудностями. Замыкание внутреннего дисульфидного мостика  $A^6 - A^{11}$  окислением иодом, исходя из соответствующих S-тритилцистеиновых остатков, требовало условий, в которых чувствительная к иодолизу S-Acm-группа не затрагивается.

После отщепления N- и C-концевых, а также боковых защитных групп *трет*-бутильного типа была замкнута дисульфидная связь  $A^7 - V^7$  окислением иодом и инсулин был очищен методом противоточного распределения:



В этом синтезе не было обнаружено нежелательного процесса дисульфидного обмена. Выход в расчете на чистый человеческий инсулин составил ~50%. Наряду с этим было выделено ~25% [D-Тур-В<sup>16</sup>]инсулина, что объясняется сильной рацемизацией при конденсации сегментов I и II по методу Гейгера — Кёнига. При исключении или снижении рацемизации в будущем может быть достигнуто дальнейшее повышение выхода при циклизации.

В заключение следует упомянуть, что для исследования взаимосвязи между структурой и биологическим действием было проведено значительное число синтезов цепей инсулина с различными последовательностями. После комбинирования таких аналогов с природными или синтетическими цепями определялся спектр их биологического действия. Так как природный инсулин относительно легко доступен, структурные изменения в молекуле могут быть проведены с помощью семисинтетических операций, причем такой частичный синтез возможен как исключительно химическим путем, так и с применением ферментативных методов. Подробности приведены в рекомендуемых обзорах. Поскольку инсулин, будучи макромолекулой, действует иммуногенно, для терапевтических целей очень важно, чтобы иммунный ответ в организме больных диабетом оставался на возможно низком уровне. Как правило, у большинства больных это так. В особых случаях применяют инсулин с измененными антигенными свойствами (имеется в виду инсулин из других видов и модифицированный инсулин с уменьшенными антигенными свойствами).

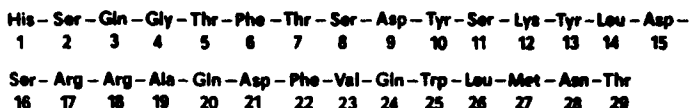
Для понимания всего комплекса структурно-функциональных взаимодействий на молекулярном уровне большое значение имеет изучение инсулиновых рецепторов [681]. В связи с этим следует напомнить об уже обсуждавшейся (разд. 2.3.1) возможности прямого входа инсулина в клетку, этим может быть лучше объяснено долговременное действие гормона.

Недавно удалось также синтезировать как цепя инсулина, так и человеческий проинсулин с помощью генной технологии [586, 682, 683].

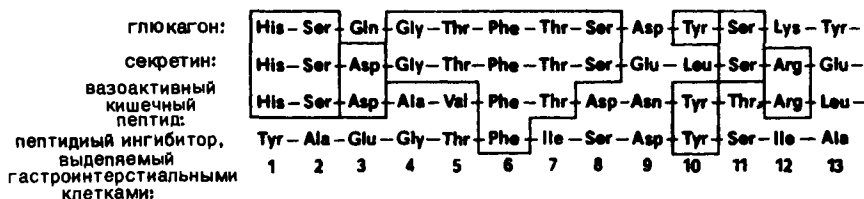
### 2.3.1.9. Глюкагон

Как и инсулин, глюкагон образуется в поджелудочной железе, но уже в А-клетках островков Лангерганса. Глюкагон, как и адреналин, является антагонистом инсулина и стимулирует гликогенолиз, повышая содержание сахара в крови. Кроме того, он обладает липолитическими свойствами. Действие протекает через аденилатциклазную систему. Глюкагон также увеличивает сокращение сердечной мышцы и повышает частоту ударов сердца.

Глюкагон — одноцепочечный пептид со следующей аминокислотной последовательностью (Броммер и др., 1956 г.):



Поразительным является совпадение с аминокислотными последовательностями секретина, вазоактивного кишечного пептида и пептидного ингибитора гастроинтерстициальных клеток в N-концевых участках 1-12:



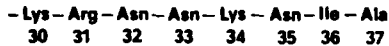
Интересно, что у всех четырех гормонов в положении 6 находится остаток фенилаланина, у первых трех совпадает N-концевой дипептид и только единственный гормон, стимулирующий секрецию поджелудочной железы, имеет в положении 10 остаток лейцина, в то время как остальные несут в этом положении остаток тирозина. Эти факты дали повод Вюншу отнести все 4 гормона к семейству глюкагона.

Полный синтез глюкагона был связан с большими трудностями из-за сложной аминокислотной последовательности. Это высокое содержание гидроксаминио кислот, наличие метионина и триптофана, концевые аминокислоты треонин и гистидин, трудные для синтеза последовательности -Arg-Arg- и -Asp-Thr-, а также недостаток мест разделения на фрагменты,

безопасных с точки зрения рацемизации, и т. д. Лишь при применении тактики максимальной защиты Вюнш и сотр. [685] после многолетней интенсивной работы смогли закончить полный его синтез. После гель-фильтрации на сефадексе G-50 синтетический гормон был получен в кристаллическом виде и по биологической активности оказался полностью идентичным с природным гормоном [685]. Связывая структуру и биологическую активность (повышение содержания сахара в крови), нужно отметить, что лишь две С-концевых аминокислоты могут быть отщеплены без ухудшения действия гормона, в то же время фрагменты 9-23 и 7-29, не обладая биологической активностью, дают полный иммунный ответ.

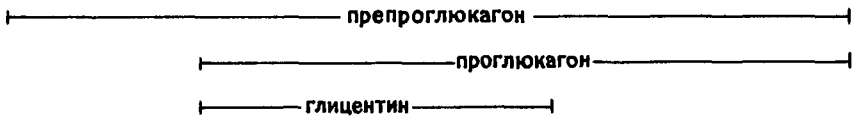
Глюкагон имеет терапевтическое применение при заболеваниях, связанных с понижением содержания сахара в крови (при передозировке инсулина или гиперинсулинизме) или с избытком глюкагона.

Тагер и Штейнер [686] из кристаллического глюкагона (теленка и свиньи) выделили 37-членный полипептид, дающий иммунохимическую реакцию, соответствующую глюкагону. Предполагается, что это фрагмент проглюкагона, так как его 29 N-концевых аминокислот идентичны соответствующему глюкагону. С-Концевой пептид имеет последовательность:



В 1979 г. Патцель [687] постулировал предположительную структуру проглюкагона.

Аминокислотная последовательность препроглюкагона (124 аминокислотных остатка) установлена Хабенером и др. [687a]:



### 2.3.1.10. Паратиреоидный гормон

Паратиреоидный гормон парашитовидной железы наряду с кальцитонином и 1,25-дигидроксиголекальциферолом участвует в регуляции фосфатного и кальциевого обмена у млекопитающих. Снижение содержания кальция в крови вызывает секрецию паратиреоидного гормона парашитовидной железой. Это повышает содержание кальция в крови и стимулирует секрецию фосфатов в мочу, чем снижается их содержание в крови. Важнейшие участки воздействия: тонкая кишка (увеличение всасывания ионов кальция), кости (рост связывания ионов кальция) и почки (повышение секреции фосфатов и стимуляция образования 1,25-дигидроксиголекальциферола из его

предшественника 25-гидроксиголекальциферола). Действие в качестве гормона-стимулятора для 1,25-дигидроксиголекальциферола, увеличивающего перенос ионов кальция из тонкой кишки в кровь, приводит к дополнительному увеличению концентрации кальция в крови.

Ниже приведены аминокислотные последовательности для паратиреоидного гормона из разных организмов [688—690]:

теленок	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
	Ala	Val	Ser	Glu	Ile	Gln	Phe	Met	His	Asn	Leu	Gly		
свинья	Ser						Leu							
человек	Ser						Leu							
теленок	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
	Lys	His	Leu	Ser	Ser	Met	Glu	Arg	Val	Glu	Trp	Leu		
свинья							Leu							
человек							Asn							
теленок	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36		
	Arg	Lys	Lys	Leu	Gln	Asp	Val	His	Asn	Phe	Val	Ala		
свинья														
человек														
теленок	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48		
	Leu	Gly	Ala	Ser	Ile	Ala	Tyr	Arg	Asp	Gly	Ser	Ser		
свинья							Val		His		Gly			
человек					Pro		Leu		Pro		Ala		Gly	
теленок	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60		
	Gln	Arg	Pro	Arg	Lys	Lys	Glu	Asp	Asn	Val	Leu	Val		
свинья														
человек														
теленок	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72		
	Glu	Ser	His	Gln	Lys	Ser	Leu	Gly	Glu	Ala	Asp	Lys		
свинья														
человек							Glu							
теленок	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84		
	Ala	Asp	Val	Asp	Val	Leu	Ile	Lys	Ala	Lys	Pro	Gln		
свинья	Ala													
человек							Thr		Ser					

По первичной структуре паратиреоидный гормон свиньи отличается от гормона теленка в 7 положениях, человеческий имеет отличие в 11 положениях.

По-видимому, не все 84 аминокислоты необходимы для биологической активности. Синтезированные Поттсом и сотр. по методу Мерриффилда N-концевые последовательности паратиреоидных гормонов теленка и свиньи

показали качественно соответствующую природному гормону специфическую активность при тестировании на почках и костях. Соответствующий фрагмент человеческого гормона был синтезирован ранее (1973 г.) Андреттой по классической методике конденсации фрагментов в растворе.

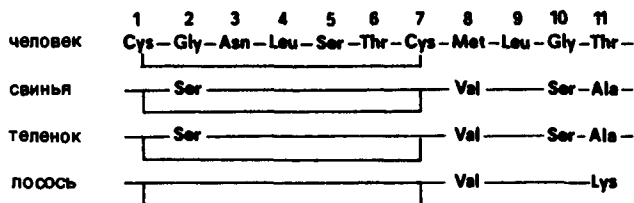
В начале 70-х годов Кон и др. [690] показали, что паратиреоидный гормон образуется в организме из прогормона. В более поздней работе (1977 г.) был описан соответствующий препрогормон [691], который может быть рассмотрен как биосинтетический предшественник.

### 2.3.1.11. Кальцитонин

Кальцитонин образуется в С-клетках щитовидной железы млекопитающих при повышении содержания кальция в крови. У низших животных вплоть до птиц место образования кальцитонина — ультимобранхиальное тельце (по этой причине не следует больше употреблять старое название «тиреокальцитонин»). Кальцитонин ингибирует перенос ионов кальция из костей в кровь, действуя при этом как регулятор, обратный паратиреоидному гормону.

В 1968 г. четыре различные лаборатории описали установление структуры и синтез кальцитонина свиньи. У выделенных несколько позднее кальцитонинов из других организмов [692] обнаружилось чрезвычайно большое различие в аминокислотных последовательностях. Общие структурные признаки всех кальцитонинов — полипептидная цепь из 32 аминокислотных остатков, С-концевой амид пролина и дисульфидный мостик между 1 и 7 остатками цистеина. Интересно, что кальцитонин, выделенный из ультимобранхиального тельца, в 30—40 раз более активен по сравнению с кальцитонинами млекопитающих. Из многочисленных исследований, проведенных на примере кальцитонина человека (кальцитонин М) [693], показано, что в противоположность другим пептидным гормонам (АКТГ, гастрин, паратиреоидный гормон) у кальцитонина так называемым активным центром, необходимым для проявления биологического действия, является неограниченная часть первичной структуры. По развитому Швицером предположению в данном случае мы, очевидно, имеем дело с так называемым «регнологическим» типом пептида, в котором область аминокислотной последовательности, необходимая для стимуляции рецептора, разделена на части, т. е. для проявления биологической активности кальцитонина необходим практически весь пептид.

Далее приведены первичные структуры кальцитонинов из разных источников:





	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
человек	Tyr	Thr	Gln	Asp	Phe	Asn	Lys	Phe	His	Thr	Phe
свинья	—	Trp	Arg	Asn	Leu	—	Asn	—	Arg	—	—
теленок	—	Trp	Lys	—	Leu	—	Asn	Tyr	—	Arg	—
лосось	Leu	Ser	—	Glu	Leu	His	—	Leu	Gln	—	Tyr
	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	
человек	Pro	Gln	Thr	Ala	Ile	Gly	Val	Gly	Ala	Pro	NH <sub>2</sub>
свинья	Ser	Gly	Met	Gly	Phe	—	Pro	Gly	Thr	—	—
теленок	Ser	Gly	Met	Gly	Phe	—	Pro	Gly	Thr	—	—
лосось	—	Arg	—	Asn	Thr	—	Ser	—	Thr	—	—

Биосинтез кальцитонина проходит через стадию препрокальцитонина — предшественника, состоящего из 136 аминокислотных остатков, из которого после отщепления сигнальной последовательности из 24 аминокислотных остатков образуется прокальцитонин [693a].

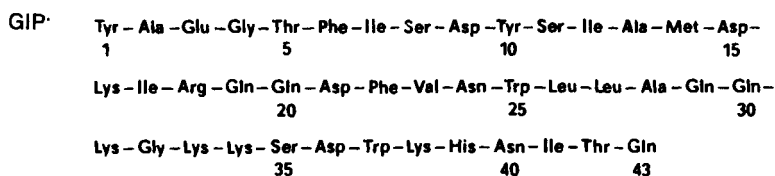
Большое терапевтическое значение кальцитонина и его аналогов с повышенным и пролонгированным действием послужило причиной разработки многочисленных вариантов синтеза. Кальцитонины различных видов (человека, лосося, угря и др.) и особенно стабильные карбоаналоги существуют в виде фармакопейных препаратов.

Значительные успехи были получены при лечении остео дистрофии (osteodystrophia deformans), болезни, проявляющейся выраженным декальцинированием костей. Возможно также терапевтическое применение при старческом остеопорозе (уменьшение массы костей) и в случаях переломов костей.

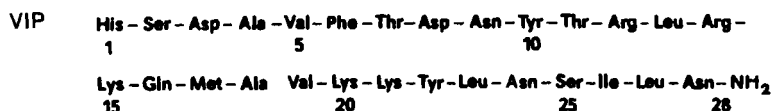
### 2.3.1.12. Гормоны желудочно-кишечного тракта

Пептидные гормоны желудочно-кишечного тракта являются так называемыми англандулярными гормонами, так как их образование происходит не в специально предназначенных для этого железах, а в определенных тканях, обычно характеризующихся другой первичной функцией. Эти гормоны были также названы тканевыми. Кроме хорошо охарактеризованных пептидных гормонов гастрин, секретин, холецистокининпанкреозимина и мотилина в желудочно-кишечном тракте найдены и структурно охарактеризованы и другие биологически активные вещества.

Так, общая желудочная секреция блокируется полипептидным ингибитором (GIP) [694], выделяемым гастроинтерстициальными клетками и имеющим структуру



Ранее уже отмечалось, что N-концевой участок 1—13 этого полипептида обнаруживает известную гомологию с первичными структурами глюкагона и секретина. Гомология наблюдается и в отношении вазоактивного кишечного пептида (VIP), воздействующего на сердечную деятельность. Вазоактивный кишечный полипептид показывает лишь около трети глюкагоновой активности и обладает кроме прочего стимулирующим действием на ткани гладких мышц [695, 696]. Его первичная структура:



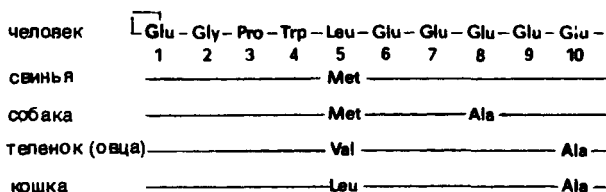
Как показал Бодански, биологическую активность проявляют также его C-концевые фрагменты 14—28 (1%) и 7—28 (5%). Из-за широкого спектра биологических активностей физиологическая роль VIP еще окончательно неясна.

Грегори [697] выделил из человеческой мочи вместе с урогастроном полипептид, являющийся антагонистом гастрина. Оба выделенных ингибитора состоят из 53 или 52 аминокислотных остатков, имеют три внутренних дисульфидных мостика и отличаются лишь C-концевым аргинином.

### 2.3.1.12.1. Гастрин [698]

Гастрин образуется в слизистой привратника желудка и кровью переносится к фундальным железам желудка. Он стимулирует секрецию соляной кислоты, секрецию ферментов поджелудочной железы и повышает моторику кишечника.

Название «гастрин» введено Эдвинсом, выдвинувшим уже в 1905 г. так называемую гастриновую гипотезу на основании того, что экстракт слизистой привратника стимулирует выделение соляной кислоты и тем самым включает в процесс пищеварения пепсин. В 1964 г. Грегори и Трейс описали выделение двух гастринов из слизистой желудка свиньи. Установление первичной структуры показало, что гастрин I является амидом гептадекапептида с остатком пироглутаминовой кислоты на N-конце. Гастрин II обладает такой же аминокислотной последовательностью, но тирозин в положении 12 содержит O-сульфогруппу:













### 2.3.1.16. Кинины плазмы крови [720, 721]

Кинины плазмы вызывают расширение сосудов, снижая тем самым артериальное давление, повышают проницаемость сосудов и оказывают стимулирующее действие на мышцы кишечника, бронхов и матки. Речь идет о тканевых гормонах, образующихся в плазме крови под действием протеазы калликреина из  $\alpha$ -глобулинов.

Калликреины крови и поджелудочной железы, образующиеся из различных неактивных предшественников, проявляют разную субстратную специфичность. В то время как калликреин плазмы крови, расщепляя связь Lys-Arg, образует из белков плазмы *брадикинин*, калликреин поджелудочной железы при гидролизе связи Met-Lys соответствующего субстрата дает *каллидин*. Кроме названных кининов: *брадикинина* (кинин-9) и *каллидина* (кинин-10) — при разбавлении плазмы крови спонтанно образуется *метиониллизилбрадикинин* (кинин-11).

брадикинин	Arg - Pro - Pro - Gly - Phe - Ser - Pro - Phe - Arg
каллидин	Lys - Arg - Pro - Pro - Gly - Phe - Ser - Pro - Phe - Arg
Met-Lys-брадикинин	Met - Lys - Arg - Pro - Pro - Gly - Phe - Ser - Pro - Phe - Arg

В биологическом действии между кининами существует только количественное различие. Решающая роль в открытии и установлении структуры кининов плазмы крови принадлежит лабораториям Верли и Эллиота; синтез более двухсот аналогов кининов связан с именами Бодански, Шредера, Штудера и др.

### 2.3.2. Пептиды животного происхождения с гормоноподобными активностями

Из животного материала во все возрастающем количестве выделяются пептидные вещества, проявляющие гормоноподобные эффекты. По-видимому, особенно богата такими короткими пептидами с вазоактивным действием кожа амфибий. Из слюнной железы каракатиц был выделен элдоизин, обнаруживающий аналогично другим пептидам гипотензивное действие и вызывающий усиление активности органов, имеющих гладкую мускулатуру. Как правило, физиологическая роль этих пептидов еще неясна; активности, наблюдаемые на определенных моделях, позволяют думать, что они могут иметь фармакологическое значение.

Некоторые представители, такие, как вещество P, бомбезин, причисляются к нейропептидам. Из кожи амфибий были изолированы новые интересные опиатоподобные пептиды, важнейший из них — дерморфин Tug-D-Ala-Phe-Dly-Tug-Pro-Ser-NH<sub>2</sub>, который наряду с [6-оксипролин]дерморфином был изолирован из метанольного экстракта кожи южноамериканских



лягушек *Phyllomedusa sauvagii* и *Phyllomedusa rhodei*. Присутствие D-аланина в обоих пептидах поразительно и совершенно необычно для пептидов немикробного происхождения. Они проявляют интенсивную и продолжительную опиатоподобную активность. При интрацеребровентрикулярной инъекции дерморфин действует в тысячу раз сильнее морфина. Название этого пептида отражает его происхождение и действие (дерма — кожа).

### 2.3.2.1. Тахикинины

Тахикинины объединяют группу биологически активных пептидов, которые в отличие от медленно действующих кининов быстро оказывают стимулирующий эффект на гладкую мускулатуру [722]. К этой группе принадлежат следующие пептиды:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
физалепмин	Glu	Ala	Asp	Pro	Asn	Lys	Phe	Tyr	Gly	Leu	Met-NH <sub>2</sub>
уперолеин	Glu	Pro	Asp	Pro	Asn	Ala	Phe	Tyr	Gly	Leu	Met-NH <sub>2</sub>
эледонзин	Glu	Pro	Ser	Lys	Asp	Ala	Phe	Ile	Gly	Leu	Met-NH <sub>2</sub>
филломедузин	Glu	Asn	Pro	Asn	Arg		Phe	Ile	Gly	Leu	Met-NH <sub>2</sub>
вещество P	Arg	Pro	Lys	Pro	Gln	Gln	Phe	Phe	Gly	Leu	Met-NH <sub>2</sub>
кассинин	Asp	Val	Pro	Lys	Ser	Asp	Gln	Val	Gly	Leu	Met-NH <sub>2</sub>

*Вещество P* (разд. 2.3.1.14) образуется в гипоталамусе и помимо биологического действия тахикининов проявляет другие разнообразные биологические активности.

*Эледонзин* (устаревшее название мошатиин) открыт в 1949 г. Эрспамером в слюнных железах головоногих из Средиземного моря (*Eledone moschata* и *Eledone aldrovandi*). В 1962 г. этот понижающий артериальное давление и действующий возбуждающе на гладкую мускулатуру пептид удалось выделить и установить его структуру [723]. Окончательное доказательство структуры путем химического синтеза сделано Сандрином и Буассона [724]. Эледонзин понижает артериальное давление у человека, но его передозировка ведет к учащению дыхания. Эледонзин можно фармакологически отличить от кининов плазмы благодаря качественным и количественным особенностям его действия как *in vivo*, так и *in vitro*. Гипотензивный эффект держится дольше, чем в случае брадикинина. При подкожном введении повышается секреторная активность слюнных желез и желез слизистой желудочно-кишечного тракта. Из структурно-функциональных исследований следует, что нона- и декапептид в два раза более активны, чем нативный гормон, а C-концевой гептапептид обладает полной активностью гормона. Активные аналоги могут быть получены N-ацилированием некоторых пента- и гексапептидных фрагментов.

Гипотезивное действие *физалемина* в 3—4 раза сильнее, чем эledoизина; в то же время он оказывает совершенно незначительное влияние на секреторную активность слюнных желез и гладкую мускулатуру. Выделение гормона из экстракта кожи южноамериканской болотной лягушки *Physalacetum fuscimatulatus* осуществлено Эрспамером в 1964 г. В том же году Бернарди с сотр. [725] опубликовал его полный синтез.

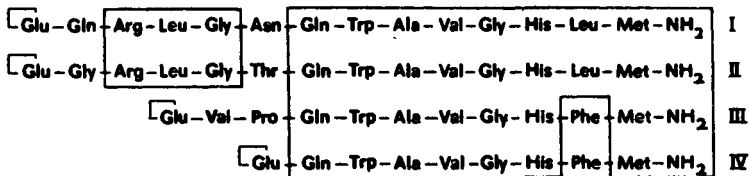
*Филломедузин* выделен в 1970 г. Анастаси и Эрспамером [726] из кожи южноамериканской лягушки *Phyllomedusa bicolor*. Установление последовательности показало его значительное структурное подобие с уже рассмотренными тахикининами, что также подтверждается спектром активностей. Полный синтез этого декапептида описан де Гастиглионе с сотр. [722].

*Уперолеин* удалось получить Анастаси с сотр. [727] из кожи австралийской лягушки *Uperoleia rugosa*. Установленная первичная структура была подтверждена полным синтезом [722]. Активность сравнима с филломедузином.

*Кассинин* выделен из метанольного экстракта кожи африканской лягушки *Kassina senegalesis* также Анастаси с сотр. [728]; определена первичная структура. Как все тахикинины, соединение содержит С-концевую последовательность из трех аминокислотных остатков -Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> и фенилаланин в положении 5. В отличие от других пептидов этой группы он содержит в своей цепи 12 аминокислотных остатков и, как и вещество Р, не имеет N-концевой пироглутаминовой кислоты. Интересно, что для выделения пептида потребовалась свежая кожа 12 000 лягушек. Используя фрагментную конденсацию, группа Яджима в 1977 г. синтезировала этот пептид [729]. Стимулирующее действие на сокращение подвздошной кишки морской свинки в случае кассинина составляет 0,41 действия вещества Р.

### 2.3.2.2. Группа бомбезина

Структурно сходны также следующие пептиды, выделенные из кожи амфибий и объединенные в группу бомбезина:



**Бомбезин (I)**, тетрадекапептид с N-концевым остатком пироглутаминовой кислоты, выделен Анастаси с сотр. [730] из метанольного экстракта кожи европейских лягушек *Bombina bombina* и *Bombina variegata*. Пептид вызывает сокращение гладких мышц, понижает артериальное давление и стимулирует функцию желудка и почек. Особое значение имеет исключительно сильное действие бомбезина на терморегуляцию. Инъекция < 1 нг

пептида в *cisterna cerebri*, находящейся при 4 °С, взрослой крысы в течение 15 мин вызывает понижение ректальной температуры на 5 °С, сохраняющееся в течение 2 ч [731]. Пептиды центрального действия нейротензин (разд. 2.3.1.15) и хенопсин обладают на несколько порядков меньшей терморегулирующей активностью. По той причине, что кожные железы лягушки связаны с нервными клетками, нельзя считать невероятным присутствие таких терморегулирующих пептидов в центральной нервной системе высших животных.

*Алитензин* (II) кожи жабы *Alytes obstetricans* отличается от бомбезина лишь двумя аминокислотными остатками.

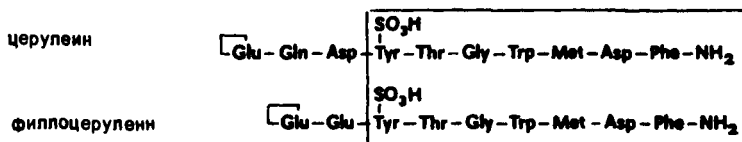
*Ранатензин* (III) выделен из кожи американской лягушки *Rana pipiens*. Оказывает вазоактивное и миотропное действие.

*Алитензин* (II) кожи жабы *Alytes obstetricans* отличается от бомбезина окислительным остатком член группы бомбезина. Найден в метанольном экстракте австралийской лягушки *Litoria (Hyla) aurea*. Синтез описан в работе [732].

С некоторой осторожностью можно предположить, что в будущем к группе бомбезина [732, 733] прибавятся новые представители.

### 2.3.2.3. Группа церулеина

В 1967 г. Эрспамер выделил из кожи австралийской лягушки *Hyla caerulea* пептид, названный *церулеином*. Приблизительно в то же время в коже южноамериканской лягушки *Phyllomedusa sauvagi* был найден очень похожий по первичной структуре пептид, получивший, в свою очередь, название *филлоцерулеин*:



Церулеин по сравнению с брадикинином снижает артериальное давление на более долгое время, однако вызывает более слабые сокращения гладких мышц. Имея похожую структуру с гормоном желудочно-кишечного тракта холецистокининпанкреозиминном (разд. 2.3.1.12), церулеин обладает и похожей биологической активностью. Сверх того, оба пептида церулеин и филлоцерулеин совпадают в С-концевом участке с гастрином. Филлоцерулеин в более слабой форме повторяет спектр активностей церулеина.

### 2.3.2.4. Брадикинины амфибий

Из метанольного экстракта кожи амфибий выделены различные брадикинины и их аналоги, например брадикинин из *Rana temporaria* [734], *Rana nigromaculata* [735], *Rana pipiens* [736] и *Bombina orientalis*, а также два различных аналога из *Rana nigromaculatus* [735] и *Bombina orientalis*.



путем достигающие тех клеток, на рецепторы которых они действуют. Если нейропептиды выделяются в синаптическую щель, то их можно рассматривать как нейротрансмиттеры, или нейромедиаторы (к ним относятся тиреолиберин, вещество P, прокталин). Фармакологи к нейроактивным пептидам относят те нативные пептиды или их части и синтетические аналоги, которые вызывают реакцию нервной системы. К нейропептидам принадлежат такие уже рассмотренные пептиды, как АКТГ,  $\alpha$ -МСГ,  $\beta$ -МСГ, гормоны гипоталамуса, окситоцин, вазопрессин, вещество P, нейротензин, ССК, VIP, гастрин, ангиотензин II, бомбезин, дерморфин, а также пептид, индуцирующий дельта-фазу сна,  $\beta$ -липотропин, нейрофизины, инсулин, карнозин, таурин, триптофилпептид, энкефалины, эйдорфины, экзорфины, кинторфин. Кроме того, известно ~50 факторов, присутствующих у беспозвоночных.

Эффекты, наблюдаемые при действии нейропептидов на центральную нервную систему, весьма разнообразны. Они могут действовать как нейротрансмиттеры (разд. 2.3.1.14), контролировать физиологический сон, оказывать влияние на процессы обучения, обладать обезболивающим действием и др. Эти факты заставили по-новому взглянуть на традиционные представления о действии и функциях гормонов. Действительно, становится все труднее однозначно разграничить гормональное действие от других инициированных биологических или физиологических эффектов. Различные пептидные гормоны воздействуют непосредственно на мозг и влияют на поведение и обучаемость. С целью изучения возможности применения для терапевтического лечения болезни Паркинсона, шизофрении, нарушений памяти и др. было осуществлено клиническое испытание многих пептидных препаратов. Наибольший интерес вызывают АКТГ, МСГ и вазопрессин, оказывающие действие на центральную нервную систему в некоторых поведенческих экспериментах на животных. Из различных поведенческих тестов прежде всего, должен быть назван так называемый тест «избегания», в котором животное пассивно или активно учится избегать неприятной ситуации (например, электрошока). Приобретенные рефлексы устойчивы лишь некоторое время, а затем постепенно угасают. Де Виду [751] удалось выделить из мозга подопытных животных (крыс) пептид, охарактеризованный как [дез-Gly-NH<sub>2</sub>]вазопрессин. Этот пептид, вероятно, образуется из [Arg<sup>8</sup>]вазопрессина и проявляет отчетливое действие в тесте избегания. Так, при введении данного пептида, а также самого вазопрессина в мозг заметно повышается устойчивость выработанного поведенческого рефлекса. Фаза исчезновения рефлекса удлиняется. При половой мотивации эффект проявляется особенно отчетливо.

АКТГ также влияет на выработанное поведение. Сотрудниками де Вида была установлена прямая взаимосвязь между поддержанием пассивной реакции избегания у крыс и соответствующим уровнем АКТГ в плазме крови. Вскоре после этого обнаружилось, что некоторые фрагменты АКТГ при отсутствии гормонального эффекта влияют на способность крыс к обучению. В частности участки последовательности АКТГ 4—10 (I) и 4—9 (II), а также полученный Органомом аналог Org 2766 (III) обуславливают за-

Met - Glu - His - Phe - Arg - Trp - Gly	I
Met - Glu - His - Phe - Arg - Trp	II
Met (O) - Glu - His - Phe - D - Lys - Phe	III

медление процесса угасания фазы различных условных рефлексов. Сверх того, эти пептиды, а также вазопрессин устраняют искусственно вызванную амнезию (у крыс можно вызвать потерю памяти действием пуромидина или  $\text{CO}_2$ ) к реакции избегания. Интересно, что антиамнестический эффект может быть достигнут даже через 14 сут после экспериментальной амнезии.

Влияние АКТГ на способность крыс к обучению, по-видимому, объясняется возрастанием побуждения животных к запоминанию и повышением их внимания. Пептид Orp 2766, вводимый через рот, и другие пептиды из последовательности АКТГ, учитывая их возможное значение как средства для улучшения способностей к обучению, были исследованы на человеке [752].

Непрямые, но убедительные данные дают основание предполагать, что вазопрессин принимает участие в процессах обработки информации. Эффект, вызванный вазопрессином или (дез-Gly-NH<sub>2</sub>)вазопрессином, в отношении упомянутой ранее реакции избегания ограничивается лишь центральной нервной системой и проявляется практически лишь при введении препарата в мозг. Антитела против этого производного вазопрессина и самого вазопрессина специфически снимают их дальнейшее действие на центральную нервную систему. И наконец, Штерба и сотр. смогли показать гистологически, что отростки пептидэргических нейронов гипоталамуса идут не только в нейрогипофиз, но также и в другие области мозга, причем связь с так называемой амгдалой особо подчеркивается. Возможно, на эту область, являющуюся, как установлено, центром ощущений страха, действуют гормоны нейрогипофиза. Нарушения в этом участке мозга ведут к общему снижению реакций на угрожающие внешние ситуации, к гиперсексуальности, к неконтролируемому приему пищи и др.

Значение нейропептидов как модуляторов нейронной активности и как нейротрансмиттеров постоянно растет. Уже было упомянуто, что функции нейротрансмиттера приписываются веществу P. Место контакта двух нейронов (нервных клеток) называется синапсом. Перенос информации от одной (пресинаптической) нервной клетки к другой (постсинаптической) осуществляется посредством нейротрансмиттеров, таких, как ацетилхолин, норадреналин, дофамин, гистамин, серотонин, глицин, глутаминовая и  $\gamma$ -аминомасляная кислоты, таурин и др. Помимо этих небольших молекул и вещества P в переносе информации, по-видимому, принимают участие и другие пептиды. При возбуждении пресинаптической клетки трансмиттер выделяется в синаптическую щель, диффундирует от пресинаптической мембраны к мембране постсинаптической целевой клетки и вызывает после взаимодействия с высокоспецифическим рецептором электрический сигнал или же подавляет сигнал, вызванный другими нейротрансмиттерами в дру-







Немного позже Симантов и Снайдер [772] выделили оба пентапептида из мозга телянка. Соотношение содержания Met-и Leu-энкефалинов в природных источниках различно. Вскоре после установления структуры энкефалинов были опубликованы различные варианты их полиых синтезов [773]. Пространственная структура Leu-энкефалина [774], установленная с помощью рентгеноструктурного анализа, приведена на рис. 2-44.

Одновременно с проведением полных синтезов энкефалинов началось интенсивное изучение структурно-функциональных взаимосвязей. Это прежде всего объясняется большим интересом к терапевтически применимым аналогам, т. е. аналогам, обладающим обезболивающим действием, но лишенным недостатков, присущих опиатам (симптом абстиненции, привыкание и др.). Фармакологическое исследование нейропептидов сопряжено со многими трудностями, тесно связанными с их быстрой деградацией под действием ферментов, а также с проблемой проникновения сквозь гемэнцефалический барьер, разделяющий мозг и кровь. Прямым введением энкефалина в мозг было показано, что, вероятно, из-за его быстрого расщепления протеазами можно наблюдать лишь небольшой эффект.

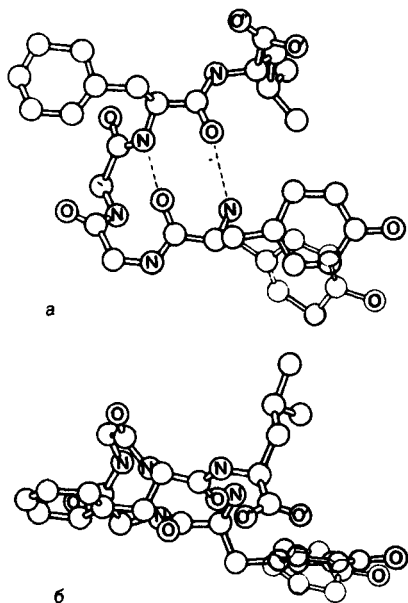
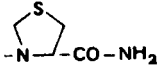
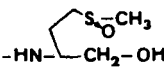
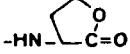


Рис. 2-44. Предлагаемая конформация Leu-энкефалина [774]. *а* и *б* — проекции на разные плоскости одной и той же модели (*б* — проекция на плоскость, перпендикулярную *а*). Тонкими линиями показано второе возможное пространственное расположение боковой цепи тирозина.

Заменой глицина в положении 2 на D-аланин или другие D-аминокислоты, а также другими изменениями в структуре природного вещества можно получить повышенную устойчивость к ферментативному расщеплению. Считается [775], что ферментативная устойчивость — единственное требование для анальгетического действия. Более того, изменения в структуре позволили улучшить транспорт пептида и его взаимодействие с соответствующими рецепторами. Приведем несколько примеров особенно активных синтетических аналогов:

H-Tyr-D-Met-Gly-Phe-Pro-NH <sub>2</sub>	[776]		
H-Tyr-D-Thr-Gly-Phe-Thz-NH <sub>2</sub>	[777]		амид тиазолин-4- карбоновой кислоты
H-Tyr-D-Met-Gly-Phe-Thz-NH <sub>2</sub>	[777]		
H-Tyr-D-Ala-Gly-MePhe-Met(O)-OH	[778]		сульфоксид метионинола
H-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Hse-лактон	[779]		лактон гомосерина

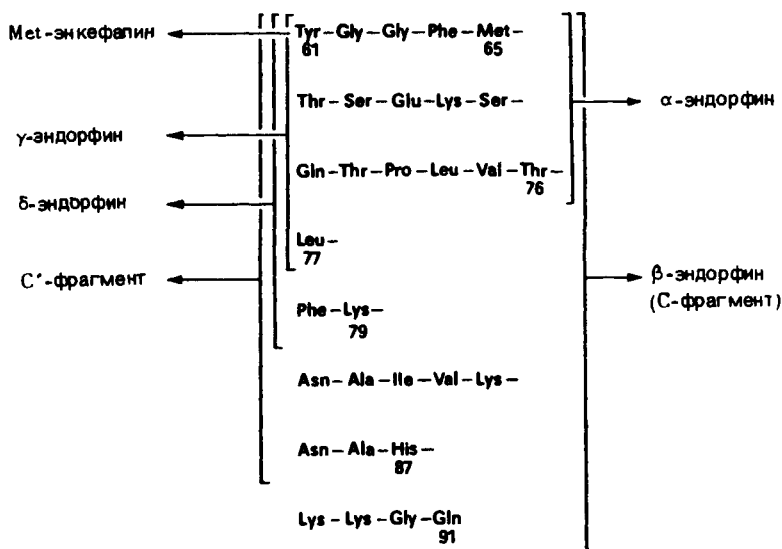
В 1979 г. из гипоталамуса крысы был выделен интересный пептид H-Tyr-Arg-OH, названный *киоторфином* и обладающий, как и его синтетический аналог H-Tyr-D-Arg-OH, в 4—20 раз более сильным действием, чем энкефалин.

Киоторфин как нейроактивный дипептид не может взаимодействовать с опиатным рецептором, ему приписывают освобождающее и одновременно стабилизирующее энкефалин действие. Этим самым объясняется его сильный анальгетический эффект. При выборе названия были учтены экзогенное происхождение пептида и его морфиноподобное действие. Фрагмент β-цепи казеина телянка, имеющий последовательность Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile, получил название *β-казоморфин-7*.

Отщеплением двух C-концевых аминокислот с помощью карбоксипептидазы Y получают β-казоморфин-5 Tyr-Pro-Phe-Phe-Gly, который обладает большей опиатной активностью, чем гептапептид. Пептид Tyr-D-Ala-Phe-Pro-Tyr-NH<sub>2</sub> — представитель наиболее активных синтетических аналогов. Сильный эффект на освобождение инсулина оказывает β-казоморфин-4, опиатное действие которого крайне низкое.

В связи с тем что последовательность Met-энкефалина совпадает с участком 61—65 β-липотропина (разд. 2.3.1.4), следует обратить внимание на другие фрагменты этого пептида. Из гипофиза верблюда Ли и сотр. выделили 31-членный фрагмент β-липотропина, показавший незначительное липотропное (мобилизующее жиры) действие и содержащий последовательность Met-энкефалина. Гольдштейном была установлена опиатоподобная активность этого пептида. Эти данные дали Ли основание назвать выделенный пептид β-эндорфином. Позже, когда были открыты другие эндорфины, это название стало общим для эндогенных опиатов.

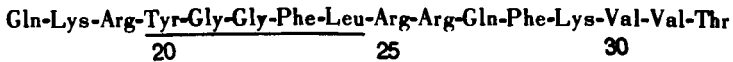
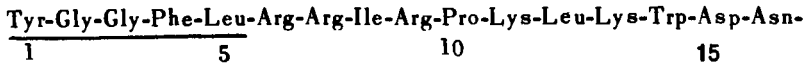
Исходя из частично очищенного экстракта смеси тканей гипофиза и гипоталамуса свиньи, Гийемен и сотр. провели выделение как  $\beta$ -эндорфина, так и двух других эндорфинов, названных  $\alpha$ - и  $\gamma$ -эндорфинами. Из гипофиза многих животных выделен так называемый С-фрагмент  $\beta$ -липотропина [781], оказавшийся идентичным с  $\beta$ -эндорфином. Более короткий С-фрагмент также проявляет себя как опиат [781]. Ниже приведены первичные структуры и названия метионинсодержащих эндорфинов, являющиеся С-концевыми частями  $\beta$ -липотропина свиньи.



Химическое родство этих пептидов несомненно. Все эндорфины имеют своим N-концевым участком Met-энкефалин. Интересно, что  $\beta$ -липотропин, формально являющийся предшественником эндорфинов, сам по себе не обладает опиатным действием. Последовательности  $\beta$ -эндорфина человека и  $\beta$ -эндорфины из других источников имеют относительно небольшие различия, что не оказывает какого-либо влияния на биологическую активность [782]:

Thr-1	Gly-2	Gly-3	Phe-4	Met-5	Thr-6	Ser-7	Glu-8	Lys-9	Ser-10	Gln-11	Thr-12	Pro-13	Leu-14	Val-15	Thr-16
Leu-17	Phe-18	Lys-19	Asn-20	Ala-21	Ile-22	Ile-23	Lys-24	Asn-25	Ala-26	Tyr-27	Lys-28	Lys-29	Gly-30	Glu-31	
свинья					Val					His				Gln	
верблюд, таянок, овца					Ile					His				Gln	

Поскольку в  $\beta$ -липотропине отсутствует последовательность Leu-энкефалина, что для этого эндогенного опиатного пептида должен существовать другой предшественник. В 1979 г. Кангава и др. [783] описали выделение «биг»-Leu-энкефалина из экстракта свиного гипоталамуса. Этот пептид, названный  $\alpha$ -неоэндорфином, построен из 10 аминокислотных остатков: Tyr-Dly-Dly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro-Lys. Соответствующий нонапептид без С-концевого лизина носит название  $\beta$ -неоэндорфин [784]. В 1982 г. Нума с сотр. установил первичную структуру препродинорфина, который содержит также последовательность неоэндорфина. Последовательность 209—240 предшественника, состоящего из 256 аминокислотных остатков, идентична с динорфином-32 (выделена последовательность Leu-энкефалина):



Последовательность 1—17 идентична динорфину (частично охарактеризованному еще в 1979 г.), который получил свое название благодаря высокой активности в биологических тестах на морских свинках. Открытый вначале динорфин обозначается как динорфин А, а тринадцатичленный пептид последовательности 20—32 динорфина-32 — как динорфин В. Другой фрагмент, динорфин-(1—8), был обнаружен в гипоталамусе в таких же или даже больших количествах, чем динорфин А, причем механизм его выделения, т. е. расщепления связи Ile-Arg, еще недостаточно ясен. Из-за сходства с предшественником энкефалина (см. далее) этот предшественник обозначен как препроэнкефалин В. Однако в настоящее время неизвестно, является ли Leu-энкефалин физиологическим продуктом этого предшественника, поэтому название «препродинорфин» предпочтительнее.

В 1982 г. была выяснена первичная структура предшественника человеческого энкефалина, состоящего из 267 аминокислотных остатков [785a]. Препроэнкефалин содержит шесть последовательностей Met-энкефалина и одну последовательность Leu-энкефалина и не содержит последовательностей других опиатных пептидов, таких, как динорфин,  $\alpha$ -неоэндорфин или эндорфин.

К настоящему времени эндорфины найдены в центральной нервной системе, в спинномозговой жидкости, в почках, в нервных волокнах желудочно-кишечного тракта, в крови, плаценте и гипофизе. Для изучения распределения эндорфинов используется иммуно-цитохимическая техника и радиоиммуноанализ. Поскольку различные опиатные пептиды имеют значительное структурное сходство, стало возможным получить антитела для всей группы пептидов. Показано, что высокомолекулярные эндорфины, прежде всего, вероятно, стабильный к протеазам  $\beta$ -эндорфин, концентрируются в гипофизе и гипоталамусе. Энкефалины найдены преимущественно в

других областях мозга, в *substantia gelatinosa* спинного мозга, в нервных сплетениях, а также в экзокринных клетках желудочно-кишечного тракта. Так как концентрация энкефалина в экстракте головного мозга после гипофизэктомии остается неизменной, можно утверждать, что существует вторая нейронная система, содержащая свои  $\beta$ -эндорфин и энкефалин.

Наилучшими тестовыми системами для эндорфинов оказались подвздошная кишка морской свинки и семявыносящий проток мыши. В нервных клетках этих периферийных тканей имеются рецепторы опиатов. Эндорфины, действуя как агонисты опиатов, вызывают дозозависимое уменьшение волн сокращения семявыносящего протока мыши и подвздошной кишки морской свинки. С помощью антагониста опиатов налоксона можно снять сокращение, вызванное эндорфинами, на основании чего может быть сделан вывод о специфическом взаимодействии с рецепторами опиатов. Эндорфины проявляют свое опиатное действие не только на названные изолированные органы, но и действуют как анальгезирующие препараты. Внутривенное введение эндорфинов как болеутоляющих средств малоэффективно, вероятно, из-за их незначительной устойчивости к протеазам. При введении в головной мозг или его желудочки больших доз можно получить кратковременный анестезирующий эффект. По этой причине необходимы синтетические аналоги, более стабильные к ферментативному расщеплению.  $\beta$ -Эндорфин — хорошее болеутоляющее средство, оказывающее по некоторым данным более сильное действие, чем морфин. К сожалению, надежда, что эндорфины могут служить эффективными обезболивающими средствами, не приводящими к привыканию, не оправдалась. В общем трудно представить, чтобы организм был зависим от своих собственных «опиатов». Прямое введение эндорфинов, а также их синтетических аналогов в мозг вызывает обезболивание и, после повторного введения, сильную толерантность и чувство зависимости (наркоманию). Отсюда следует, что эндорфины, как и морфин, тормозят действие аденилатциклазы клеток нейробластомы. Такая взаимосвязь, следствием которой являются толерантность и привыкание, делает крайне маловероятным то, что эндорфины могут служить в качестве «ненаркотических» болеутоляющих препаратов.

Нейромодулирующая функция эндорфинов при регулировании болевой чувствительности привела также к гипотезе, что эндорфины могут играть некоторую роль при акупунктурном обезболивании (иглоукальвание). Иглоукальвание действительно ведет к повышению содержания эндорфинов в спинномозговой жидкости. Подавление боли с помощью акупунктуры может быть блокировано налоксонам. На возможную взаимосвязь между стрессом и эндорфинной системой мы уже ссылались. Эндорфинам приписывается также роль в патогенезе психических болезней (шизофрения, галлюцинации и др.). Энкефалин тормозит выделение различных нейротрансмиттеров. Нужно упомянуть и о влиянии эндорфинов на проницаемость нейромембран ионами натрия. Принято считать, что эндорфины, являясь составной частью пептидэргических нейронов, могут выполнять нейрорегуляторную функцию при взаимодействии с другими нейронами. Хотя к настоящему времени физиологические функции эндорфинов выяснены неполно, можно с уверенностью сказать, что контроль болевой чувствительности является лишь одним из аспектов их спектра дейст-

вия. Возможна также взаимосвязь с работой автономных нервных систем (например, кровообращение, терморегуляция, сон, аппетит). В качестве практических аспектов выделяются снижение отдельными аналогами артериального давления и регуляция выделения пролактина.

### 2.3.4. Пептиды с иммунологическим действием

В последние годы сильно возрос интерес к пептидам, оказывающим действие на иммунную систему. Приведем некоторые примеры.

Тетрапептид *тафцин* (I) получен путем ферментативного расщепления  $\gamma$ -глобулиновой фракции, он оказывает стимулирующее действие на фагоцитоз:

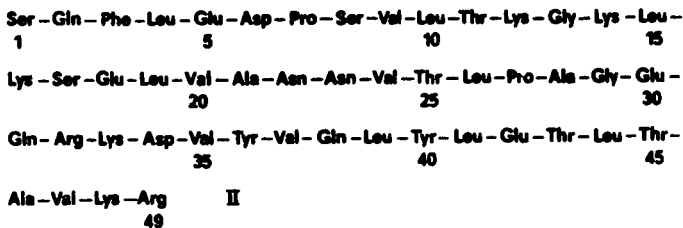


Термин *фагоцитоз* происходит от греч. *phagein* — поглощать, поедать и *kytos* — клетка. Клетки с фагоцитарной способностью в состоянии поглощать инородные частицы. В зависимости от размеров фагоцитируемых частиц выделяют макрофаги, способные к эндоцитозу больших частиц, и полиморфноядерные лейкоциты, способные поглощать только мелкие частицы. Последние названы Мечниковым микрофагами.

*Тафцин* впервые выделен в 1970 г. из лейкокинина [786]. Он получен из белка ферментативно посредством действия лейкокиназы или ограниченным расщеплением трипсином. Обнаружено, что эффект стимуляции полиморфноядерных лейкоцитов лейкокинином связан с тафцином, который содержится в Fc-фрагменте  $\gamma$ -глобулина [787]. Синтетический тафцин [787] по биологическому действию и физико-химическим свойствам полностью соответствует природному пептиду. Потенциальная возможность применения тафцина в качестве лекарства против различных инфекционных заболеваний привела к обширным исследованиям взаимосвязи структуры и активности [787—790].

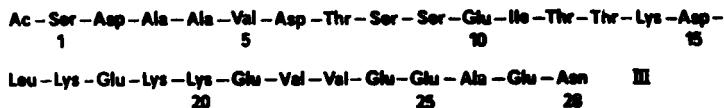
Из экстракта тимуса в последнее время также выделен ряд интересных пептидов [791]. Синтез *тимозина*  $\alpha_1$  описан в 1979 г. независимо Вангом с сотр., а также Бирром и Штолленверном.

*Тимопоэтин* II (II), стимулирующий образование Т-клеток, выделен в 1975 г. Шлесингером и Гольдштейном из тимуса теленка:



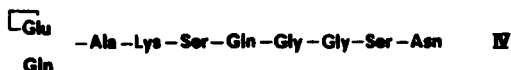
Активным центром гормона, узнающим Т-клетки, считают отрезок последовательности 32—36. Этот пептид Arg-Lys-Asp-Val-Tyr, называемый тимопозтином-5, синтезирован; он усиливает неспецифическую иммунную защиту.

Двумя годами позднее из того же материала Гольдштейн и сотр. [793] выделили второй гормон, названный *тимозином*  $\alpha_1$  (III):



Тимозин  $\alpha_1$  — один из компонентов тимозиновой фракции № 5, являющейся смесью пептидов тимуса теленка. Тимозин  $\alpha_1$  и тимозиновая фракция № 5 имеют значение как перспективное средство для лечения иммунной недостаточности, лейкоми и других типов рака. *In vivo* тимозин  $\alpha_1$  несет важную регуляторную функцию на поздних стадиях дифференцировки Т-клеток. В настоящее время проводятся обширные исследования влияния полипептидов тимуса на регуляцию иммунного защитного аппарата организма.

По сравнению с относительно большими пептидами тимуса пептид, выделенный из крови свиньи [794], содержит всего 9 аминокислотных остатков:



Этот пептид, названный STF (Serum-Thymus-Factor), не имеет какой-либо гомологии с тимопозтином II и тимозином  $\alpha_1$ , что говорит о том, что он не может быть их метаболитом. Еще окончательно не ясно, имеет ли остаток пироглутамина природное происхождение или он образовался из N-концевого глутамина в процессе выделения. Химический синтез обоих альтернативных нонапептидов [795] привел к продуктам с идентичной активностью как *in vivo*, так и *in vitro*. C-Концевой гексапептид биологически неактивен.

### 2.3.5. Пептидные антибиотики

Антибиотики — продукты жизнедеятельности бактерий и грибов, подавляющие рост или деление других микроорганизмов. Химически это весьма гетерогенный класс.

Равным образом очень сложно классифицировать пептидные антибиотики (известно более 300). Довольно часто их подразделяют на линейные пептиды и циклические структуры, причем последние подразделяют на гомодетные пептиды и гетеродетные пептиды (депсипептиды). К линейным пептидам-антибиотикам относятся *грамцицины* А—С, продуцируемый



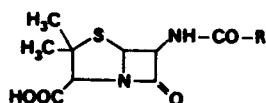


го синтеза грамицидина, тироцидина и бацитрацина, показали, что для биосинтеза используется принцип S-аминоацильного активирования с определенным ориентированием молекулы на ферментной матрице.

Далее будут рассмотрены подробнее некоторые представители пептидных антибиотиков, причем для их классификации использовали рекомендации Хассала [797], основывающиеся на механизме действия антибиотика.

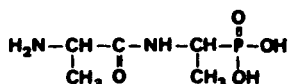
### 2.3.5.1. Пептидные антибиотики, подавляющие биосинтез клеточных стенок бактерий

Помимо цефалоспорина, D-циклосерина, фосфономицина ингибиторным эффектом на рост клеточных стенок бактерий обладают природные и полусинтетические пенициллины, а также пептидные антибиотики бацитрацин, ванкомицин, яниемидин и др. *Пенициллин*, продуцируемый *Penicillium notatum*, включает тиазолиновое кольцо, конденсированное с лактамным кольцом, и меняющийся радикал R:

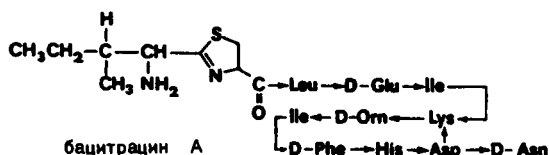


Пенициллин G, называемый также бензилпенициллином ( $R = -CH_2-C_6H_5$ ), очень часто применяют в медицине. Образование его из аминокислот (цистеин, валин и др.) дает формальное основание отнести пенициллин к пептидным антибиотикам. Антибиотическая активность пенициллина тесно связана с лабильностью лактамного кольца, в частности с реакционной способностью амидной группы. Пенициллин тормозит последнюю стадию биосинтеза клеточной стенки — поперечную сшивку между цепями пептидоглюкана.

*Фосфонопептиды* образуют новый класс синтетических антибактериальных соединений [798]. Типичный представитель — *алафосфин* (дипептид, состоящий из аланина и 1-аминоэтилфосфоновой кислоты):



Бацитрацины, продуцируемые *Bacillus licheniformis*, открыты еще в 1945 г. Выделение их было осуществлено с помощью противоточного распределения. Основной компонент, *бацитрацин A*, имеет следующую структуру:



Бацитрацины действуют на грамположительные бактерии. Имеющийся в продаже препарат содержит 70% А-компонента и применяется при кожных инфекциях. Образуя комплексное соединение с ундекапренилпирофосфатом, промежуточным веществом в биосинтезе клеточной стенки, бацитрацин препятствует ферментативному гидролизу и образованию соответствующего ортофосфата. Для активности антибиотика существенны тиазольное кольцо и остаток гистидина.

### 2.3.5.2. Пептидные антибиотики, подавляющие синтез и функционирование нуклеиновых кислот

Только один пептид,  $\alpha$ -аманитин, ингибирует как синтез и метаболизм нуклеотидов, так и ДНК-зависимую РНК-полимеразу II, катализирующую синтез мРНК в плазме клеточного ядра.  $\alpha$ -Аманитин — представитель аматоксинов, образующихся в бледной поганке (*Amanita phalloides*); этот пептид и есть причина отравления грибами. Поэтому его вряд ли можно рассматривать как антибиотик. Важным фактом является высокая специфичность подавления РНК-полимеразы, этот фермент ингибируется аманитином только в животных, но не в бактериальных клетках.

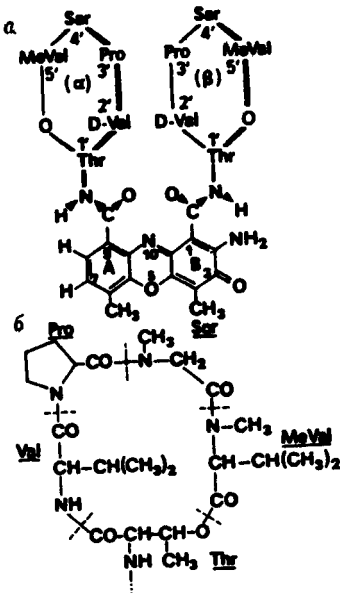


Рис. 2-45. Первичная структура актиномицина C<sub>1</sub> (а) и пентапептидного лактонового кольца (б) [800].

К антибиотикам, блокирующим матричную функцию ДНК, принадлежат актиномицины и хиноксалины.

*Актиномицины*, продуцируемые штаммами стрептомицетов [799, 800], окрашены в оранжево-красный цвет; они проявляют высокую антибиотическую и цитостатическую активность и относятся к очень токсичным хромопептидам. Актиномицин А, выделенный Ваксманом и др. в 1940 г., — первый антибиотик, полученный в кристаллическом виде. В настоящее время

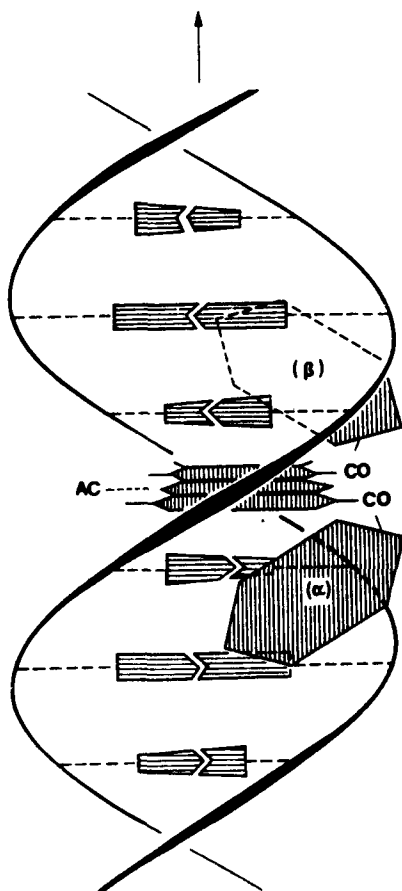


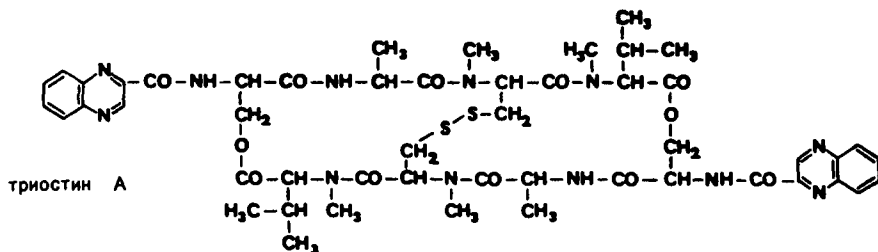
Рис. 2-46. Схема биологического действия актиномицина  $C_1$  [800]. Хромофорный остаток актиномицина (AC) входит между парами G — C двойной спирали ДНК.  $\alpha$  и  $\beta$  — пептидные лактонные кольца.

мя известно свыше 30 природных и значительное число синтетических и полусинтетических актиномицинов. Для них характерна структура, состоящая из двух пентапептидных лактонных колец, соединенных аминофеноксазином (хромофор). Наиболее известный и широко используемый представитель актиномицинов — актиномицин С (называемый в англосаксонской литературе актиномицином D). По предложению Майенхофера и Атертона [801], его следует называть [ди-(2'-D-валин)]актиномицином (Val<sub>2</sub>-AM) (рис. 2-45).

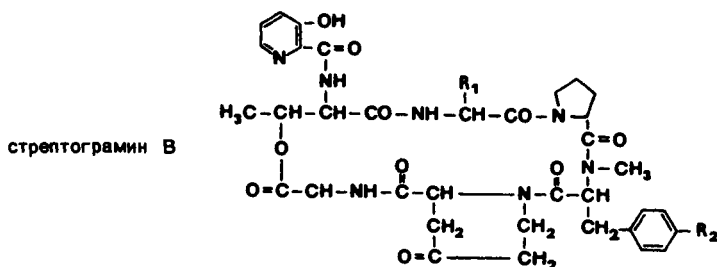
Актиномицины ингибируют рост грамположительных микроорганизмов уже в концентрации < 0,1 мкг/мл и, следовательно, обладают пенициллиноподобным действием. Однако их широкое применение лимитирует высокая токсичность. Для мышей летальная доза актиномицина С составляет 0,5—1 мг/кг, доза, переносимая в течение многих дней, — 0,1 мг/кг. Цитостатическое действие актиномицина С позволяет применять его для лечения некоторых редких видов рака (лимфогранулематоз, хоррионкарцинома, опухоль Вильмса; особенно в последнем случае можно ожидать успеха).

Биологическое действие актиномицинов основано на образовании комплексного соединения с ДНК (рис. 2-46), при этом подавляется ДНК-зависимый синтез РНК (транскрипция). Уже одна молекула актиномицина, приходящаяся на ~ 1000 пар оснований, приводит к 50%-ному ингибированию синтеза мРНК. Более высокая концентрация актиномицина подавляет также репликацию ДНК. Из того что актиномицины в противоположность пенициллинам не имеют принципиального различия в действии на бактериальные клетки и клетки инфицированного организма-хозяина, неизбежно следует высокая токсичность этих пептидных антибиотиков. Цитостатическую активность актиномицинов используют при исследованиях в области клеточной биологии.

*Хиноксалины* [802] обладают интересным спектром активностей, действуя как цитостатические, противовирусные и антибактериальные препараты. Антибиотики очень токсичны для млекопитающих. Они продуцируются различными штаммами стрептомицетов. Важнейшие представители — *хиномицины* и *триостины*

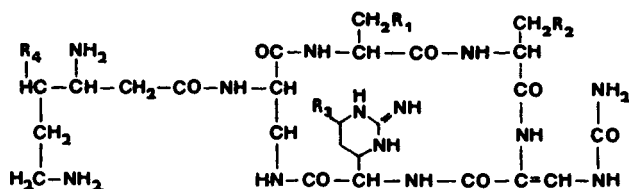


*Стрептограмин В* и *эдеин А* — антибиотики, которые, ингибируя функцию большой или малой субъединицы рибосомы, подавляют биосинтез белка. Это позволило широко использовать их при изучении функционирования рибосомы.



Стрептограмин *пристинамицин I* и *стафиломицин S* имеют ограниченное терапевтическое применение; структурно похожий пептидный антибиотик *микамицин* используется в Японии как стимулятор роста животных.

Благодаря туберкулостатической активности особый интерес представляют выделяемые из различных видов стрептомицетов *туберактиномицин*, *капреомицин* и *виомицин* (туберактиномицин В):



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
туберактиномицин А	ОН	ОН	ОН	ОН
виомицин	ОН	ОН	ОН	Н
туберактиномицин N	ОН	ОН	Н	ОН
туберактиномицин O	ОН	ОН	Н	Н
капреомицин 1А	ОН	NH <sub>2</sub>	Н	Н
капреомицин 1В	Н	NH <sub>2</sub>	Н	Н

Структура туберактиномицинов была установлена Сибой с сотр. и подтверждена на примере синтеза туберактиномицина O. Та же группа осуществила полный синтез капреомицина.

### 2.3.5.3. Мембраноактивные антибиотики

К настоящему времени выделено и охарактеризовано множество антибиотиков, обладающих определенной активностью к мембранам. По механизму действия их часто разделяют на две группы: ионофоры [803] и антибиотики, вызывающие нарушения в мембранах.



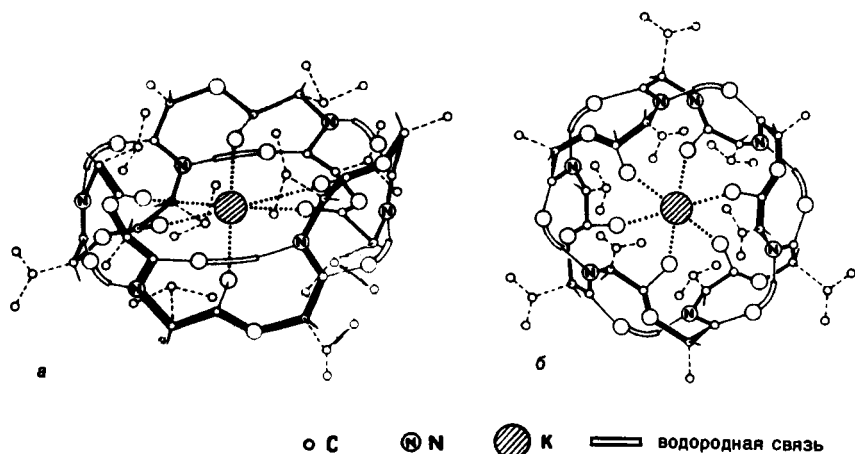
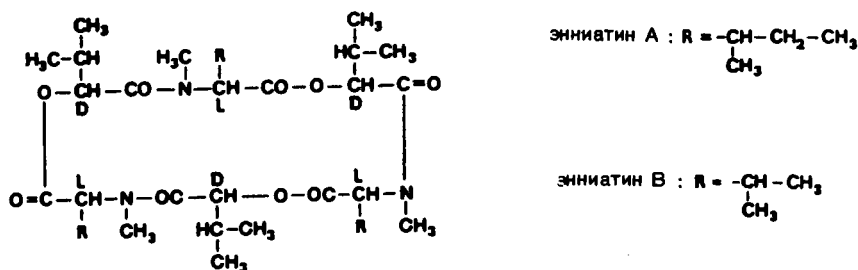


Рис. 2-47. Конформация комплекса валиномицин- $K^+$  [804]. а — вид сбоку, б — вид вдоль оси симметрии.

причем молекула, образующая канал, не совершает каких-либо движений.

**Энниатин** — циклический гексадесипептид с повторяющейся последовательностью D- $\alpha$ -гидроксивалерионил-L-метилизололейцина (**энниатин А**) или D- $\alpha$ -гидроксивалерионил-L-метилвалина (**энниатин В**):



Беауверицин обладает похожей структурой (R =  $-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$ ).

Энниатины были выделены в 1947—1948 гг. из разных видов фузариума Платтнером с сотр., в 1963 г. Фоглер и сотр. осуществили их химический синтез.

**Серратомолид** — тетрапептид с повторяющимися остатками D- $\beta$ -гидроксидекановой кислоты (D-Hyd) и L-серина (цикло-(D-Hyd-L-Ser)<sub>2</sub>). Представители несимметричных пептолидов — **споридезмолиды**. Для **споридезмолида I** установлена следующая структура (Huv = L- $\alpha$ -гидроксивалериановая кислота):



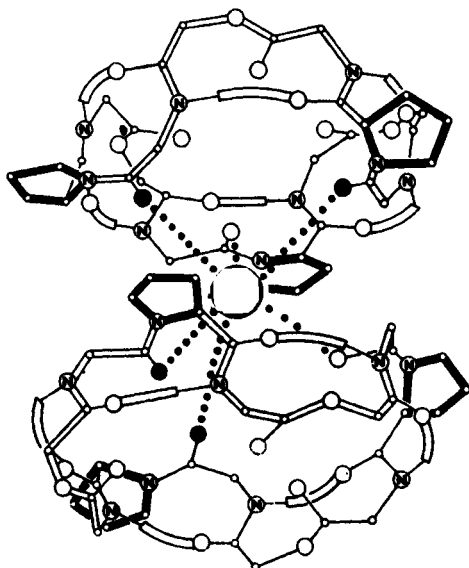


Рис. 2-48. Предполагаемая «сандвичевая» структура одного из аналогов валиномицина [805].

Множество синтезов пептолидов проведено Шемякиным и сотр. Его ученики, Овчинников, Иванов и др., в рамках программы изучения взаимосвязи структуры пептолидов и их активности синтезировали более 60 аналогов энниатина, ~ 100 аналогов валиномицина и провели большую работу по изучению конформаций. Оказалось, что антибактериальные свойства циклодеципептидов находятся в тесной взаимосвязи со способностью образовывать комплексы с катионами. Аналоги, не обладающие комплексообразующими свойствами, не оказывают антибактериального действия. Валиномицин, энниатин, антидот антаманид (разд. 2.3.6), а также их многочисленные аналоги связываются с катионами в отношении 1:1. Кроме того, Иванов и сотр. смогли установить, что в определенных условиях могут существовать прочные комплексы с другой стехиометрией. Рис. 2-48 показывает предлагаемую [805] для ряда валиномицина структуру комплекса в виде сэндвича.

Промежуточное положение между ионофорами и второй группой мембраноактивных пептидных антибиотиков занимает *аламетицин*. Аламетицин вместе с природными аналогами *сузукациллином* и *трихотоксином* причисляют к амфифильным пептидным антибиотикам, которые в липидных мембранах создают флуктуирующий, независимый от напряжения поток ионов и поэтому представляют большой интерес как модельные системы нервной проводимости.

Вследствие агрегации этих пептидов образуются поры, которые могут иметь различную проницаемость, поэтому они особенно хороши для изучения механизма проводимости ионных каналов.





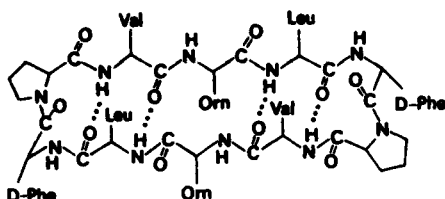


Рис. 2-50. Конформационная модель грамицидина S.

ем, встраивание в эти положения L-аланина ведет к полной потере активности. На рис. 2-50 приведена модель грамицидина S, построенная на основе конформационных исследований [812, 813]. Можно увидеть антипараллельную  $\beta$ -структуру с четырьмя внутримолекулярными водородными связями между остатками валина и лейцина и особое пространственное расположение обеих последовательностей.

**Тироцидины**, открытые в 1952 г., также продуцируются *Bacillus brevis*. Тироцидины А—Е различаются, по существу, ароматическими аминокислотами и обладают пентапептидным участком, сходным с грамицидином S:

Тироцидин	Последовательность
A	цикло-(Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro-Phe-D-Phe-Asn-Gln-Tyr-) 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
B	цикло-(— — — — — Trp — — — — )
C	цикло-(— — — — — Trp-D-Trp — — — — )
D	цикло-(— — — — — — — — — — Phe )
E	цикло-(— — — — — — — — — — Asp — Phe )

Тироцидины действуют преимущественно на грамположительные возбудители. Смесь тироцидинов используют часто в комбинации с 20% грамицидина для лечения кожных инфекций, а также инфекций полости рта и горла. Тироцидиновый аналог с открытой цепью биологически неактивен, в то время как соответствующий аналог грамицидина сохраняет около 1/12 активности природного вещества.

**Полимиксины** представляют собой циклические пептиды, содержащие остатки жирных кислот, продуцируемые *Bacillus polymyxa* и действующие против грамотрицательных возбудителей, в том числе против *Pseudomonas*.

Установление структуры полимиксинов оказалось весьма сложной задачей и первоначально не приводило к правильным результатам. Лишь в связи с многочисленными работами по полному синтезу, проведенными Штудером, Фоглером, Сузуки и др. (1959—1965 гг.), удалось получить однозначные данные о структуре полимиксинов, а также отнести к этой группе

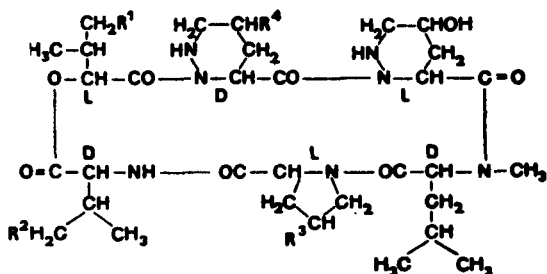
циркулинины А и В (Муррей и Тетраулт, 1948 г.), выделенные из культуральной жидкости *Bacillus circulans*, и колистины (Каяма, 1950 г.), найденные в культуральной жидкости *Bacillus colistinus*. Во всех случаях в основе структуры лежит разветвленный циклический гексапептид с остатком  $\alpha$ , $\gamma$ -диаминоасляной кислоты в разветвлении, образующим кольцевую структуру посредством  $\gamma$ -амидной связи с остатком треонина и соединенным  $\alpha$ -аминогруппой с тетрапептидом. Концевая аминогруппа несет остаток разветвленной жирной кислоты — (+)-6-метилоктановой ((+)-нзопеларгоновой) или 6-метилгептановой (изооктановой).

Заслуживает значительного внимания наличие L- $\alpha$ , $\gamma$ -диаминоасляной кислоты (Dbu). Первоначально N-концевому остатку этой кислоты приписывалась D-конфигурация.

$\text{R} - \text{Dbu} - \text{Thr} - \text{X} - \text{Dbu} - \text{Dbu} - \text{Y} - \text{Z} - \text{Dbu} - \text{Dbu} - \text{Thr}$				
Полимиксин	R	X	Y	Z
B <sub>1</sub>	Метилпектаноил-	Dbu	D-Phe	Leu
B <sub>2</sub>	Изооктаноил-	Dbu	D-Phe	Leu
D <sub>1</sub>	Метилпектаноил-	D-Ser	D-Leu	Thr
D <sub>2</sub>	Изооктаноил-	D-Ser	D-Leu	Thr
Колистин А = E <sub>1</sub>	Метилпектаноил-	Dbu	D-Leu	Leu
Колистин В = E <sub>2</sub>	Изооктаноил-	Dbu	D-Leu	Leu
Циркулин А	Метилпектаноил-	Dbu	D-Leu	Ile

Все представители группы полимиксинов — довольно токсичные соединения. Полимиксины и колистины применяют локально при желудочно-кишечных инфекциях; они обладают некоторым побочным нефротоксическим действием.

В заключении следует упомянуть о *монамицинах* — семействе из 15 гексапептидов, также относящихся к ионофорам. Они образуют прочные комплексы с ионами K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup> и нестойкие (в равных условиях) с ионами Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>. Монамицины имеют следующую структуру:



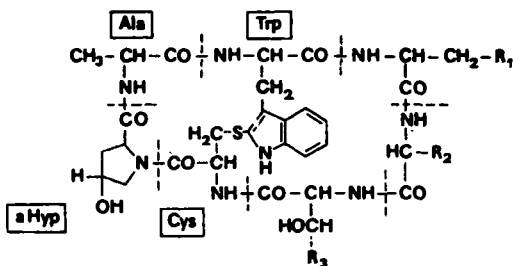
Моноамицин	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>
A	H	H	CH <sub>3</sub>	H
B <sub>1</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>	H
B <sub>2</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H	H
B <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	H
C	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H
D <sub>1</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H
D <sub>2</sub>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
E	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
F	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
G <sub>1</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>	Cl
G <sub>2</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H	Cl
G <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	Cl
H <sub>1</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	Cl
H <sub>2</sub>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Cl
I	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Cl

### 2.3.6. Пептидные токсины

В последние годы особенно интенсивно исследуются природные вещества, относящиеся к ряду пептидных токсинов. Эти вещества выделены из животного и растительного материала, а также из микроорганизмов.

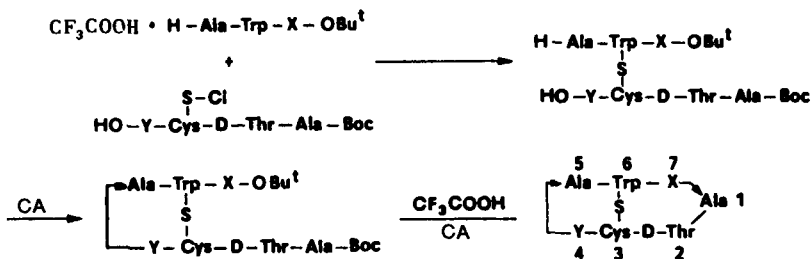
Структура яда бледной поганки (*Amanita phalloides*) установлена, а затем подтверждена синтезом в лаборатории Виланда в 1979 г. [814, 815]. Бледная поганка продуцирует десятки циклических пептидов: ядовитые *фаллотоксины* (LD<sub>50</sub> для мыши ~ 2 мг/кг), в течение нескольких часов разрушающие печень; циклический декапептид *антаманио*, способный быть при своевременном применении антагонистом к фаллоидинам; *аматоксин*, в основном ответственный за ядовитость гриба (LD<sub>50</sub> для мыши ~ 0,5 мг/кг).

К фаллотоксинам, в основе структуры которых лежит поперечносшитый циклический гептапептид, относятся *фаллоидин*, *фаллоин*, *фаллицин* и *фаллацидин*. В то время как первые три представителя ряда отличаются лишь степенью гидроксирования остатка эритролейцина, фаллацидин имеет на месте D-треонина остаток D-эритро-β-гидроксиаспарагиновой кислоты и в соседнем положении остаток валина вместо аланина. В остальном он совпадает со структурой фаллоидинов:

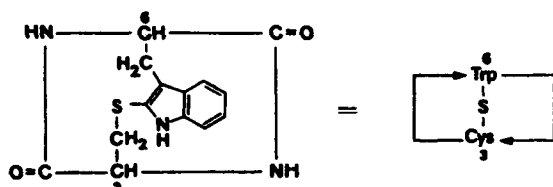


Фаллотоксин	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Фаллоидин	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\   \\ -\text{C}-\text{CH}_3 \\   \\ \text{OH} \end{array}$	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>
Фаллоин	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ -\text{C}-\text{CH}_3 \\   \\ \text{OH} \end{array}$	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>
Фаллицин	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\   \\ -\text{C}-\text{CH}_2-\text{OH} \\   \\ \text{OH} \end{array}$	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>
Фаллоцидин	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\   \\ -\text{C}-\text{CH}_3 \\   \\ \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagup \\ -\text{C} \\ \diagdown \\ \text{CH}_3 \end{array}$	-COOH

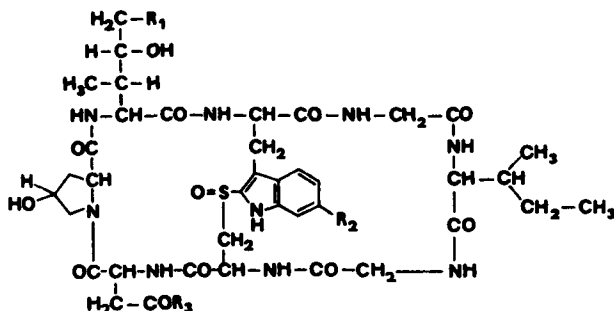
Ядовитость фаллотоксинов связана с циклической гептапептидной структурой, а также с тиоэфирной связью бокового радикала триптамина, соединяющей положение 2 индольного кольца с остатком цистеина. При выяснении связи между структурой и функцией были синтезированы различные аналоги фаллотоксинов. Виландом с сотр. [816] осуществлен полный синтез аналогов, в которых *алло*-гидроксипролин (положение 4) или  $\gamma,\delta$ -дигидроксилейцин (положение 7) заменены на другие аминокислоты. Синтез проведен по следующей схеме:



Той же исследовательской группой синтезирован так называемый *мини-фаллотоксин*, представляющий интерес как первый член ряда фаллотоксинов. Это соединение не ядовито и не обладает аффинными свойствами к F-актину.



Построенные из L-аминокислот аматоксины — циклические октапептиды, содержащие на месте тиоэфирной связи сульфоксидный мостик:



Аматоксин	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
α-	—OH	—OH	—NH <sub>2</sub>
β-	—OH	—OH	—OH
γ-	—H	—OH	—NH <sub>2</sub>
	—OH	—H	—OH

Свыше 90% смертельных случаев отравления грибами объясняются наличием аматоксинов [817]. Эти яды в высокой концентрации (0,2—0,4 мг/г биомассы) присутствуют в бледной поганке (*Amanita phalloides*) и в ее белой разновидности (*Amanita virosa*). Аматоксины есть также и в других грибах, например рода *Galerina* и у некоторых видов *Lepiota*. В 1966 г установлен механизм действия аматоксинов. Эти токсины уже в концентрации 10<sup>-8</sup> моль/л полностью подавляют транскрипцию ДНК в мРНК, в результате блокируется биосинтез белков печени, и это приводит к отмиранию (некрозу) большей части клеток печени. Хотя действие аматоксинов начинается, вероятно, уже через полчаса, распад клеток наступает через 2—3 сут после отравления.

Виландом описана относительно простой тест на аматоксины, основанный на фиолетово-синей цветной реакции, которую дают аматоксины с коричневым альдегидом в присутствии паров хлороводорода. Так как имеющийся в газетной бумаге лигнин содержит альдегид, реагирующий подобным образом, определение проводят следующим образом: свежесрезанный кусочек гриба, в котором предполагается наличие аматоксинов, с помощью ножа прижимают к краю газеты до появления отчетливого влажного пятна. Бумагу высушивают на воздухе и увлажняют 8 н. HCl. Появляющаяся в течение 15 мин отчетливая синяя окраска говорит о токсичности гриба.

Особый интерес вызывает открытие, что бледная поганка помимо приведенных токсинов также содержит в незначительной концентрации циклический декапептид, который может подавлять отравляющее действие фаллоидина и  $\alpha$ -аманитина. Структура этого противоядия, получившего название *антаманид*, установлена с помощью масс-спектрометрии и подтверждена синтезом:



Однако защита против смертельного действия грибных токсинов будет надежной лишь в том случае, если необходимую дозу антаманида (для мыши 0,5 мг/кг против 5 мг/кг фаллоидина) ввести раньше или одновременно с токсином.

Антаманид и различные аналоги образуют комплексы с ионами щелочных и щелочноземельных металлов. Связь между антитоксической активностью и комплексобразующими свойствами оставалась долгое время неясной. Конформации эквимольных комплексов антаманида с  $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  или  $\text{Ca}^{2+}$  сходны как в растворе, так и в кристаллическом состоянии. В седловидной структуре катион связан четырьмя кислородными атомами карбонильных групп. Ивановым с сотр. [818] обсуждается возможность образования комплекса-аналога с соотношением 2:1 и строением, подобным валиномициновому «сэндвичу» (разд. 2.3.5.3), причем предполагается воз-

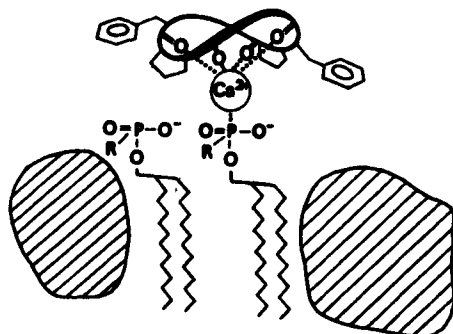
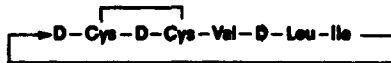


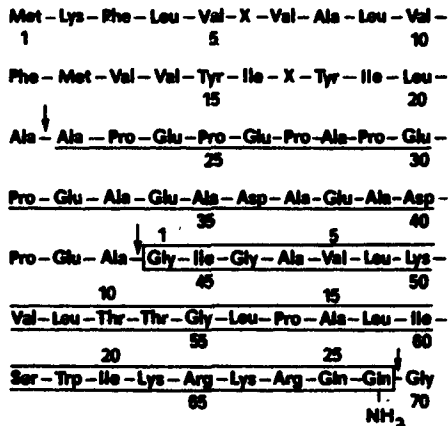
Рис. 2-51. Предполагаемый принцип взаимодействия антаманида с биомембраной [818]. Заштрихованы области белкового компонента мембраны.

можным взаимный переход между комплексами с различной стехиометрией. В отношении антиоксической активности антаманида постулируется взаимодействие комплекса с белковыми компонентами биомембраны (рис. 2-51), благодаря чему блокируются значительные области поверхности мембран, что в свою очередь меняет их проницаемость к названным токсинам.

*Малформин*, продукт метаболизма *Aspergillus niger*, помимо антибактериального действия обладает цитотоксической активностью, вызывает ростовые деформации у высших растений. Структура, установленная в 1958 г., была подтверждена в 1973 г. синтезом:



Из пчелиного яда выделено множество основных пептидов, важнейшие из которых — меллитин, апамин и пептид, дегранулирующий тучные клетки [819, 820]. По данным Крейла и др. [821], биосинтетическим предшественником меллитина является препромеллитин, состоящий из 70-аминокислотных остатков и имеющий на N- и C-концах остатки метионина и глицина соответственно. За сильногидрофобной N-концевой частью следует средняя богатая остатками пролина область, включающая в себя все кислые аминокислоты пептида, к которой примыкает участок 44—69, соответствующий активному меллитину, а также C-концевой остаток глицина:



В соответствии с «сигнальной» гипотезой Блобеля препоследовательность 1—21, называемая также сигнальным пептидом, имеет в своей структуре информацию, делающую возможным образование комплекса мРНК и рибосомы с рибосомным рецепторным белком. Благодаря этому последующая пептидная последовательность, синтезированная непосредственно в эндоплазматическом ретикулуме, проходит через мембрану во внутреннее пространство канальцев ретикулума и может таким образом быть секретирована наружу. Сигнальный пептид по окончании синтеза







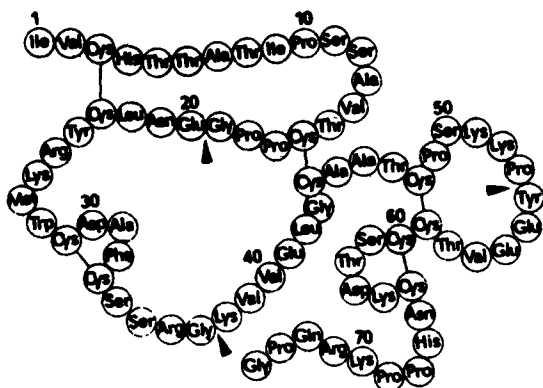


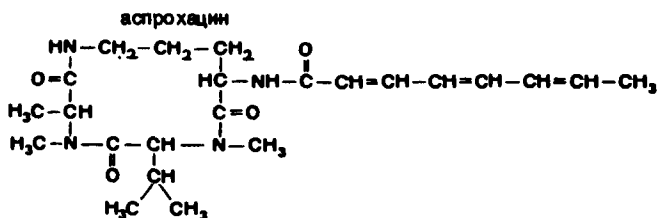
Рис. 2-52. Первичная структура  $\alpha$ -бунгаротоксина [825]. Стрелками показано предпринятое для полного синтеза разделение на фрагменты.

В лаборатории Иванова в Институте биоорганической химии им. М. В. Шемякина классическим методом, с использованием принципа максимальной защиты, осуществлен синтез  $\alpha$ -бунгаротоксина — токсина из яда тайваньской змеи *Bungarus multicinctus*, состоящего из 74 аминокислот и имеющего 5 дисульфидных мостиков. Полностью защищенный пептид был получен конденсацией фрагментов (1—19, 20—37, 38—53, 54—74) исключительно по остаткам глицина и пролина (рис. 2-52).

На этом примере стало возможным показать, что полипептид из 70 аминокислотных остатков может быть синтезирован в растворе с максимальной гидрофобной защитой боковых функций [825]. Следующий объект синтеза этой лаборатории — нейротоксин II из яда среднеазиатской кобры *Naja Naja Oxiana*, состоящий из 61 аминокислоты.

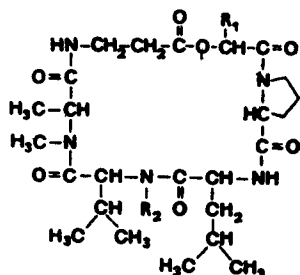
### 2.3.7. Пептидные инсектициды

В последние годы в природе найдены некоторые циклопептиды, действующие как инсектициды. Аспрохацин, образующийся как продукт метаболизма *Aspergillus ochraceus*, состоит из N-метилаланина, N-метилвалина и орнитина, а также октатриенкарбоновой кислоты, соединенной с  $\alpha$ -аминогруппой орнитина:



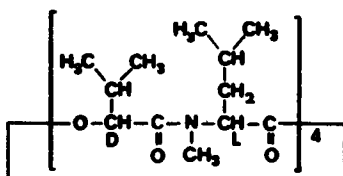
Аспрохацин показывает высокую токсичность для шелковичных червей.

В 1970 г. Сузуки и сотр. установил структуры выделенных из культуры *M. anisopliae* и обладающих инсектицидным действием циклических депсипептидов *деструксинов С и D*.



Деструксин	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
C	HO—CH <sub>2</sub> —CH(CH <sub>3</sub> )—CH <sub>2</sub> —	H <sub>3</sub> C—
D	H <sub>3</sub> C—CH(COOH)—CH <sub>2</sub> —	H <sub>3</sub> C—
Дезметил-	H <sub>3</sub> C—CH(CH <sub>3</sub> )—CH <sub>2</sub> —	H—

**Бассианолид** — продукт обмена энтомопатогенных грибов *Beauveria bassiana* и *Verticillium lecanii* (структура также установлена группой Сузуки [826]):



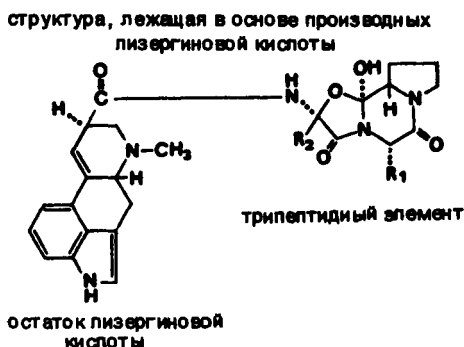
Это циклический депсипептид, состоящий из двух структурных элементов, N-метиллейцина и α-гидроксиизовалериановой кислоты, был получен синтетически. Бассианолид обладает высокой токсичностью для шелковичных червей.

В связи с рассмотрением пептидных инсектицидов должны быть упомянуты исследования Подушки, Сламы и др., занимавшихся ювенильной гормональной активностью обычных пептидных производных. Этиловый эфир L-изолейцил-L-аланил-4-аминобензойной кислоты имеет, например, структурное сходство с аналогами ювенильных гормонов, построенными из монотерпенов и ароматических соединений с замещением в положении 4. Повышения активности удалось достигнуть заменой остатка изолейцина на *трет*-бутилоксикарбонильную группу. Еще сильнее действует со-

ответствующее  $\alpha$ -хлоризобутирильное производное, уже 1 мг которого достаточно, чтобы путем нарушения процесса превращения нимфы во взрослую форму уничтожить 2 т клопов семейства *Pyrrhocoridae*.

### 2.3.8. Пептидные алкалоиды [827, 828]

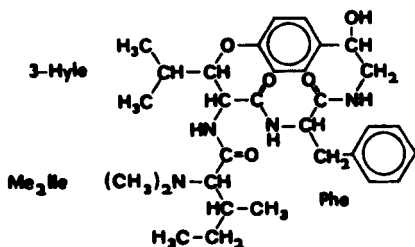
Лизергиновые производные алкалоидов спорыньи, например эрготаминового типа, имеют в структуре циклический трипептидный элемент, в образовании которого принимают участие D-пролин, L-лейцин, L-фенилаланин или L-аланин. Соединение с карбоксильной группой осуществляется или через аланин (эрготаминовый тип), или через валин (эрготоксиновый тип):



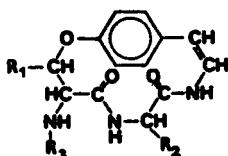
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Эрготамин	—CH <sub>2</sub> —C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	—CH <sub>3</sub>
Эргозин	—CH <sub>2</sub> —CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	—CH <sub>3</sub>
Эргокристин	—CH <sub>2</sub> —C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	—CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Эргокриптин	—CH <sub>2</sub> —CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	—CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>

Биосинтез осуществляется, исходя из триптофана и изопентенилпирофосфата. Пептидная часть алкалоидов эрготаминового и эрготоксинового типа синтезируется мультиферментным комплексом.

Пептидные алкалоиды пандаминового типа в последнее время во все возрастающем количестве находят в некоторых семействах растений [827]. Франгулин, основной алкалоид коры крушины (*Rhamnus frangula L.*), был впервые выделен Чеше с сотр. [829]. Он присутствует также в других видах крушины. Аминокислоты, входящие в структуру алкалоида: лейцин, N,N-диметилзoleyцин (Me<sub>2</sub>Le) и 3-гидроксилейцин (3-Hyle). Франгулин и приведенные далее родственные ему пептидные антибиотикоструктурно происходят из пандамина, алкалоида из *Panda oleosa*.



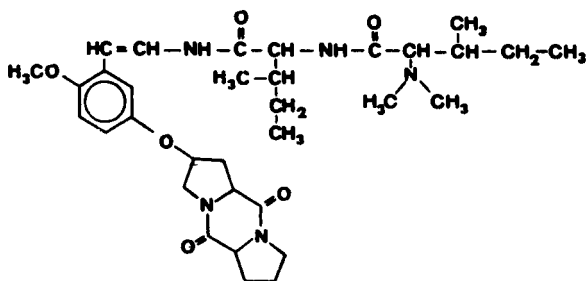
Помимо N-диметилизолейцина, 3-гидроксилейцина и фенилаланина пандамин содержит небелковый компонент — производное 1-амино-2-гидроксиэтилбензола. В франгуланине и других алкалоидах этой группы на месте гидроксизтанового мостика находится этеновая группа:



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Франгуланин	—CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	—CH <sub>2</sub> —CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Me <sub>2</sub> Ile—
Интергерренин	—C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	—CH <sub>2</sub> —CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Me <sub>2</sub> Ile—
Интергеррессин	—C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	—CH <sub>2</sub> —C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	Me <sub>2</sub> Ile—
Скутиамин	—CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	—CH <sub>2</sub> —C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	Me <sub>2</sub> Ile—Pro—

Типичной для приведенных пептидных алкалоидов является 14-членная кольцевая система, содержащая 4-алкоксистириламиновый остаток. При установлении структуры особенно эффективной была масс-спектрометрия.

**Зизибин** (Збирал с сотр., 1965 г.) — пример алкалоида с пептидным компонентом линейной структуры. Строение молекулы достоверно установлено при использовании химических методов, масс-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии.



## Литература

1. Fischer E., Ber., **39**, 530 (1906).
2. Schönheimer R., Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. **154**, 203 (1926).
3. Bergmann M., Zervas L., Ber., **65**, 1192 (1932).
4. Bergmann M. et al., J. Biol. Chem. **109**, 325 (1935).
5. Fruton J. S., Adv. Protein Chem. **5**, 1 (1949).
6. Wieland Th., Angew. Chem. **63**, 7 (1951).
7. Wieland Th., Angew. Chem. **66**, 507 (1954).
8. Grassmann W., Wünsch E., Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe (Wien), **13**, 444 (1956).
9. Wieland Th., Heinke B., Angew. Chem. **69**, 362 (1957).
10. Goodman M., Kenner G. W., Adv. Prot. Chem. **12**, 465 (1957).
11. Schwyzer R., Chimia **12**, 53 (1958).
12. Wieland Th. Angew. Chem. **71**, 417 (1959).
13. Meienhofer J., Chimia, **16**, 385 (1962).
14. Rydon H. N., Peptide Synthesis, Lecture Series, Nr..5, Royal Institute of Chemistry, London, 1962.
15. Rudinger J., Pure Appl. Chem. **7**, 335 (1963).
16. Wieland Th., Determann H., Angew. Chem. **75**, 539 (1963).
17. Johnson B. J., Ann. Rep. Med. Chem. **1969**, 307.
18. Hardy P. M., J. Chem. Soc. (B), **1969**, 491.
19. Katsoyannis P. G., Ginos J. Z., Ann. Rev. Biochem., **38**, 881 (1969).
20. Meienhofer J., Chemical Aspects of Peptide and Protein Synthesis, in: Protein Nutrition (H. Brown, Ed.), Ch. C.Thomas Publishers. Springfield, 1974.
21. Wünsch E., Angew. Chem. **83**, 773 (1971).
22. Katsoyannis P. G. The Chemistry of Polipeptides, Plenum Press, New York, London, 1973.
23. Greenstein J. P., Winitz M., Chemistry of Amino Acids, Vol.2, Wiley, New York, 1961.
24. Bodanszky M., Klausner Y. S., Ondetti M. A., Peptide synthesis, Wiley, New York, 1976.
25. Lübke K., Schröder E., The Peptides, Academic Press, New York, 1966.
26. Pettit G. R., Synthetic Peptides, Vol. 1-4, Elsevier, Amsterdam, 1970-1976.
27. Amino-acids, Peptides, and Proteins (G. T. Young, Ed.), Vol. 1-4, The Chemical Society, Burlington House, London, 1969-1972.
28. Пептиды: Пер. с англ. Под ред. Гросса Э., Майенхофера Дж. — М.: Мир, 1983.
29. Wünsch E., Synthese von Peptiden, in: Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie (E. Müller, Ed.), Vol.15, 1/2, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1975.
30. Lübke K., Schröder E., Kloss G., Chemie und Biochemie der Aminosäuren, Peptide und Proteine, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1975.
31. Amino-acid, Peptide and Protein Abstracts (P. A. Clare, Ed.), Information Retrieval Ltd., London, 1972.
32. Prag 1958, Coll. Czech. Chem. Comm., Special Issue, **24**, 1-160 (1959).
33. München 1959, Angew. Chem., **71**, 741-743 (1959).
34. Basel 1960, Chimia, **14**, 366-418 (1960).
35. Москва, 1961, Ж.Менд. общ., **7**, 353-486 (1962):Coll. Czech. Chem. Comm., **27**, 2229-2262 (1962).

36. Peptides 1962 (G. T. Young, Ed.), Pergamon Press, Oxford, 1963.
37. Peptides 1963 (L. Zervas, Ed.), Pergamon Press, Oxford, 1966.
38. Budapest 1964, (V. Brucner, K. Medzihradsky, Ed.) Acta Chim. Acad. Sci. Hung., **44**, 1-239 (1965).
39. Kessler H., Zimmermann G., Förster H., Engel J., Oepen G., Sheldrick W. S., Angew. Chem., **93**, 1085 (1981).
- 39a. Peptides 1966 (H. C. Beyerman, A. van den Linde, W. Massen van den Brink, Eds.), North-Holland, Amsterdam, 1967.
40. Peptides 1968 (E. Brigas, Ed.), North-Holland, Amsterdam, 1968.
41. Peptides 1969 (E. Scoffone, Ed.), North-Holland, Amsterdam, 1971.
42. Peptides 1971 (H. Nesvadba, Ed.), North-Holland, Amsterdam, 1972.
43. Peptides 1972 (H. Hanson, H.-D. Jakubke, Eds.), North-Holland, Amsterdam, 1973.
44. Peptides 1974 (Y. Wolman, Ed.), Keter Press, Jerusalem, 1975.
45. Peptides 1976 (A. Loffet, Ed.), Editions de l'Université de Bruxelles, 1976.
46. Peptides 1978 (I. Z. Siemion, G. Kupryszewski, Eds.), Wydawnictwa Uniwersytetu Wrocławskiego, 1979.
47. Peptides: Chemistry and Biochemistry, Proc. 1st Amer. Peptide Symp., Yale University, 1968 (B. Weinstein, S. Lande, Eds.), Marcel Dekker, New York, 1970.
48. Progress in Peptide Research, Vol. II, Proc. 2nd Amer. Peptide Symp., Cleveland, 1970 (S. Lande, Ed.), Gordon and Breach, New York, London, Paris, 1972.
49. Chemistry and Biology of Peptides, Proc. 3rd Amer. Peptide Symp., Boston, 1972 (J. Meienhofer, Ed.), Ann. Arbor Science Publ. Inc., Michigan, 1972.
50. Peptides: Chemistry, Structure and Biology, Proc. 4th Amer. Peptide Symp., New York, 1974 (R. Walter, J. Meienhofer, Eds.), Ann. Arbor Science Publ. Inc., Michigan, 1975.
51. Peptides, Proc. 5th Amer. Peptide Symp., San Diego, 1977 (M. Goodman, J. Meienhofer, Eds.), Wiley, New York, 1977.
52. Peptides: Structure and Biological Function, Proc. 6th Amer. Peptide Symp. (E. Gross, J. Meienhofer, Eds.), Pierce Chemical Comp., Rockford, Ill., 1979.
53. Материалы японских пептидных симпозиумов 1963-1975 гг. дублировались только на японском языке.
54. Peptide Chemistry 1976, Proc. 14th Symp. on Peptide Chem., Hiroshima, 1976 (T. Nakajima, Ed.), Protein Research Foundation, Osaka, 1977.
55. Peptide Chemistry 1977, Proc. 15th Symp. on Peptide Chem., Osaka, 1977 (T. Shiba, Ed.), Protein Research Foundation, Osaka, 1978.
56. Peptide Chemistry 1978, Proc. 16th Symp. on Peptide Chem., Fukuoka, 1978 (N. Izumiya, Ed.), Protein Research Foundation, Osaka, 1979.
57. Peptide Chemistry 1979, Proc. 17th Symp. on Peptide Chem., Osaka, 1979 (H. Yonehara, Ed.), 1980.
58. Peptide Chemistry 1980, Proc. 18th Symp. on Peptide Chem., Nishinomiya, 1980 (K. Okawa, Ed.), Protein Research Foundation, Osaka, 1981.
59. Yajima H. et al., Chem. Pharm. Bull. Japan, **16**, 1342 (1968).
60. Medzihradzsky K., Medzihradzsky-Schweiger H., Acta Chem. Acad. Sci. Hung., **44**, 15 (1965).
61. Sifferd R. H., du Vigneaud V., J. Biol. Chem., **108**, 753 (1935).
62. Wunsch E., Drees F., Chem. Ber., **99**, 110 (1966).
63. Sakakibara S., Shimonishi Y., Bull. Chem. Soc. Japan, **38**, 1412 (1965).
64. McKay S. C., Albertson N. F., J. Am. Chem. Soc., **79**, 4686 (1957).
65. Weygand F., Nintz E., Z. Naturforschg., **20b**, 429 (1965).
66. Schwyzer R., Angew. Chem. **71**, 742 (1959).



67. Gish D. T., Carpenter F. H., J. Am. Chem. Soc., **75**, 5872 (1953).
68. Chamberlin J. W., J. Org. Chem., **31**, 1658 (1966).
69. Patchornik A. et al. J. Am. Chem. Soc., **92**, 6333 (1970).
70. Birr C. et al., см. [42], с. 175.
71. Carpino L. A., J. Am. Chem. Soc., **79**, 98 (1957).
72. Schwyzer R. et al., Helv. Chim. Acta, **42**, 2622 (1959).
73. Schnabel E., Annalen, **707**, 188 (1967).
74. Birr C., Frödl R., Synthesis, **1970**, 474.
75. Schnabel E. et al. Annalen, **716**, 175 (1968).
76. Nagasawa T. et al. Bull. Chem. Soc. Japan, **46**, 1269 (1973).
77. Позднее В. Ф. — ХПС, **6**, 764 (1974).
78. Moroder L. et al. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **357**, 1651 (1976).
79. Tarbell D. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **69**, 730 (1972).
80. Meienhafer J., см. [37], с. 55.
81. Boissonas R. A., Preitner G., Helv. Chim. Acta, **36**, 875 (1955).
82. Kisfaludy L., Dualszky S., Acta Chim. Acad. Sci. Hung., **24**, 301, 309 (1960).
83. Blaha K., Rudinger J., Coll. Czech. Chem. Commun. **30**, 985 (1965).
84. Izumiya N. et al., Bull. Chem. Soc. Japan, **43**, 1883 (1970).
85. Erickson B. W., Merrifield R. B., см. [49], с. 191.
86. Birr C. et al., Annalen, **763**, 162 (1972).
87. Carpino L. A., Han G. Y., J. Am. Chem. Soc., **92**, 5748 (1970).
88. Losse G. et al., Angew. Chem., **76**, 271 (1964).
89. Kader A. T., Stirling C. J. M., J. Chem. Soc., **1964**, 258.
90. Schwyzer E. et al., Angew. Chem., **71**, 742 (1959).
91. Kalbacher H., Voelter W., Angew. Chem., **90**, 998 (1978).
92. Kasafirek E., Tetrahedron Letters, **1972**, 2021.
93. Мархинин Е. К., Подклетнов Н. Е. — ДАН СССР, **1977**, **235**, с. 1203.
94. Wünsch E., Spangenberg R., Chem. Ber., **104**, 2427 (1971).
95. Eckert H. et al., Angew. Chem., **90**, 338 (1978).
96. Veber D. F. et al., J. Org. Chem., **42**, 3286 (1977).
97. Sakakibara S. et al., Bull. Chem. Soc. Japan, **38**, 1522 (1965).
98. Haas W. L. et al., J. Am. Chem. Soc., **88**, 1988 (1966).
99. Jäger G., Geiger R., см. [42], с. 78.
100. Sieber P., Iselin B., Helv. Chim. Acta, **51**, 622 (1968).
101. Stevenson D., Young G. T., Chem. Commun., **1967**, 900.
102. McKay F. C., Albertson N. F., J. Am. Chem. Soc., **79**, 4686 (1957).
103. Matsueda G. R., Stewart J. M., см. [50], с. 333.
104. Kemp D. S. et al., Tetrahedron Letters, **1975**, 4625.
105. Tun-Kyi A., Schwyzer R., Helv. Chim. Acta, **59**, 1642 (1976).
106. Goerdeler J., Holst A., Angew. Chem., **71**, 775 (1959).
107. Zervas L. et al., J. Am. Chem. Soc., **85**, 3660 (1963).
108. Schönheimer R., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **154**, 203 (1926).
109. Du Vigneaud V., Behrens O. K., J. Biol. Chem., **117**, 27 (1937).
110. Nesvadba H., Roth H., Mh. Chem., **98**, 1432 (1967).
111. Horner L., Neumann H., Chem. Ber., **98**, 1715 (1965).
112. Weygang F., Czendes E., Angew. Chem., **64**, 136 (1952).
113. Hillmann A., Hillmann G., Z. Naturforschg., **6b**, 340 (1951).
114. Waley S. G., Chem. Ind., **1953**, 107.
115. Scoffone E. et al. Tetrahedron Letters, **1965**, 605.
116. Holley R. W., Holley A. D., J. Am., Chem. Soc., **74**, 3069 (1952).

116. *Steglich W., Batz H.-G.*, *Angew. Chem.*, **83**, 83 (1971).
117. *Fukuda T., Fujino M.*, см. [55], с. 19.
118. *Reese L.*, *Annalen*, **242**, 1 (1887).
119. *Nefkens G. H. L.*, *Nature*, **185**, 309 (1960).
120. *Schwyzer R. et al.*, *Chimia*, **16**, 295 (1962).
121. *Helfrich B. et al.*, *Ber.*, **58**, 852 (1925).
122. *Hillmann-Elies A. et al.*, *Z. Naturforschg.*, **8b**, 445 (1953).
123. *Tamaki T. et al.*, *Yuki Gosei Kagaku*, **29**, 599 (1971).
124. *Hiskey R. G. et al.*, *J. Org. Chem.*, **37**, 2472, 2478 (1972).
125. *Wünsch E.*, см. [29], с. 315.
126. *Fischer E.*, *Ber.*, **39**, 2893 (1906).
127. *Brenner M. et al.*, *Helv. Chim. Acta*, **33**, 568 (1950).
128. *Wang S.-S. et al.*, *J. Org. Chem.*, **42**, 1286 (1977).
129. *Bergmann M., Zervas L.*, *Ber.*, **66**, 1288 (1933).
130. *Roeske R. W.*, *Chem. Ind.*, **1959**, 1121.
131. *Taschner E. et al.*, *Annalen*, **646**, 134 (1961).
132. *Stelakatos G. C. et al.*, *J. Chem. Soc. (C)*, **1970**, 964.
133. *MacLaren J. A.*, *Austr. J. Chem.*, **25**, 1293 (1972).
134. *Stewart F. H. C.*, *Austr. J. Chem.*, **20**, 2243 (1967).
135. *Young G. T. et al.*, *Nature*, **217**, 247 (1968).
136. *Miller A. W., Stirling C. J. M.*, *J. Chem. Soc. (C)*, **1968**, 2612.
137. *Zervas L. et al.*, *J. Chem. Soc. (C)*, **1966**, 1191.
138. *Sheehan J. C., Umezawa K.*, *J. Org. Chem.*, **38**, 3771 (1973).
139. *Fru-ton J. S. et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 5469 (1965).
140. *Kemp D. S., Reczek J.*, *Tetrahedron Letters*, **1977**, 1031.
141. *Nefkens G. H. L.*, *Nature*, **193**, 975 (1962).
142. *Kenner G. W., Seelly J. M.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 3259 (1972).
143. *Rühlmann K. et al.*, *Annalen*, **683**, 211 (1965).
144. *Kricheldorf H. R.*, *Annalen*, **763**, 17 (1972); *Birkhofer L., Müller F.*, см. [40], с. 151.
145. *Sieber P.*, *Helv. Chim. Acta*, **60**, 2711 (1977).
146. *Wieland Th., Racky W.*, *Chimia*, **22**, 375 (1968).
147. *Weygand F. et al.*, *Chem. Ber.*, **101**, 3623 (1968).
148. *König W., Geiger R.*, *Chem. Ber.*, **105**, 2872 (1972); **103**, 2041 (1970).
149. *Sakakibara S. et al.*, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **40**, 2164 (1967).
150. *Goodman M., Stueben K. C.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 3980 (1959); **84**, 1279 (1962).
151. *Johnson B. J. et al.*, *J. Org. Chem.*, **33**, 4521 (1968); **34**, 1178 (1969); **35**, 255 (1970).
- 151a. *Мутин Ю. В., Надеждина Л. Б.* — *ЖОХ*, 1965, **35**, с. 1312.
152. *Hofmann K. et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 2814 (1950).
153. *Schwyzer R.*, *Angew. Chem.*, **71**, 742 (1959).
154. *Weygand F., Steglich W.*, *Chem. Ber.*, **92**, 33 (1959).
155. *Bergmann M. et al.*, *Annalen*, **224**, 40 (1934).
156. *Clubb M. E. et al.*, *Chimia*, **14**, 373 (1960); *Bodanszky M., Sheehan J. C.*, *Chem. Ind.*, **1960**, 1268.
157. *Yajima H. et al.*, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **16**, 1342 (1968).
158. *Guttman S., Pless J.*, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.*, **44**, 21 (1965).
159. *Bajusz S.*, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.*, **44**, 23 (1965).
160. *Zervas L. et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 3300 (1961).
161. *Wünsch E.*, *Naturwiss.*, **59**, 239 (1972).
162. *Jäger G., Geiger R.*, *Chem. Ber.*, **103**, 1727 (1970).
163. *Gish D. T., Carpenter R. H.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 5872 (1953).

164. *Habeeb A. F. S. A.*, *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **38**, 493 (1960).
165. *Nishimura O., Fujino M.*, *Chem. Pharm. Bull. Japan*, **24**, 1568 (1976).
166. *Photaki I. et al.*, *J. Chem. Soc. Perkin I*, **1976**, 259.
167. *Holley R. W., Sondheimer E.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 1326 (1954); *Fischer R. F., Whetstone R. R.*, *ibid.*, **76**, 5076 (1954).
168. *du Vigneaud V., Behrens O. K.*, *J. Biol. Chem.*, **117**, 27 (1937).
169. *Eckstein H.*, *Annalen*, **1976**, 1289.
170. *Van Batenburg D. D., Kerling K. E. T.*, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **8**, 1 (1976).
171. *Shaltiel S.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **29**, 178 (1967).
172. *Weygand F. et al.*, *Tetrahedron Letters*, **1966**, 3754.
173. *Schnabel E. et al.*, *Annalen*, **716**, 175 (1968).
174. *Haas W. L. et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 1988 (1966).
175. *Moroder L. et al.*, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **357**, 1647 (1976).
176. *Jäger G. et al.*, *Ber.*, **101**, 3537 (1968).
177. *Losse G., Krychowski U.*, *J. Prakt. Chem.*, **312**, 1097 (1970).
178. *Coyle S., Young G. T.*, *Chem. Commun.*, **1976**, 980.
179. *Sakakibara S., Fujii T.*, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **43**, 3954 (1970); *ibid.*, **42**, 1466 (1969).
180. *Fujii T. et al.*, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **49**, 1595 (1976).
181. *Amiard G. et al.*, *Bull. Soc. Chim. France*, **191**, 1464 (1955).
182. *Jones J. H., Ramage W. I.*, *Chem. Commun.*, **1978**, 472.
183. *Fletcher A. R. et al.*, *см. [46]*, с. 169.
184. *Nefkens G. H. L. et al.*, *Rec. Trav. Chim.*, **79**, 688 (1960).
185. *Alakhov Yu. B. et al.*, *Chem. Commun.*, **1970**, 406.
186. *Löw M. et al.*, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **359**, 1637 (1978); *ibid.*, **359**, 1617, 1629 (1978).
187. *Wünsch E. et al.*, *Chem. Ber.*, **100**, 816 (1967); *Z. Naturforsch.*, **22b**, 607.
188. *Izumiya N. et al.*, *см. [49]*, с. 269.
189. *Chorer M., Klausner Y. S.*, *Chem. Commun.*, **1976**, 596.
190. *Marchiori F. et al.*, *Gazz. Chim. Ital.*, **93**, 823, 834 (1963).
191. *Klieger E.*, *Annalen*, **724**, 204 (1969); *Yajima H. et al.*, *Chem. Pharm. Bull. Japan*, **19**, 1900 (1971).
192. *Storey H. T. et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 6170 (1972).
193. *Harris J. I. et al.*, *Biochem. J.*, **62**, 154 (1956).
194. *Okawa K., Tani A.*, *J. Chem. Soc. Japan*, **75**, 1197 (1950).
195. *Callachan F. M. et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 201 (1963).
196. *Iselin B., Schwyzer R.*, *Helv. Chim. Acta*, **39**, 57 (1956).
197. *Weygand F. et al.*, *Chem. Ber.*, **99**; 1944 (1966); *ibid.*, **101**, 923 (1968).
198. *Lapatsanis L.*, *см. [46]*, с. 105.
199. *Birkhofer L. et al.*, *Chem. Ber.*, **94**, 1263 (1961).
200. *Pojer P. M., Angyal S. J.*, *Tetrahedron Letters*, **1976**, 3067.
201. *Mizoguchi T. et al.*, *J. Org. Chem.*, **33**, 903 (1968).
202. *Ho T. L., Olah G. A.*, *Angew. Chem.*, **88**, 847 (1976).
203. *Thomas P. J. et al.*, *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **32**, 1767 (1967).
204. *Wünsch E. et al.*, *Chem. Ber.*, **91**, 542 (1958).
205. *Schröder E.*, *Annalen*, **670**, 127 (1963).
206. *Wünsch E., Jentsch J.*, *Chem. Ber.*, **97**, 2490 (1964).
207. *Holton R. A., Davis R. G.*, *Tetrahedron Letters*, **1977**, 533.
208. *Du Vigneaud V. et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **52**, 4500 (1930).
209. *Kamber B., Rittel W.*, *Helv. Chim. Acta*, **51**, 2061 (1968).

210. Hiskey R. G. et al., J. Org. Chem., **26**, 1152 (1961).
211. Kamber B., Helv. Chim. Acta, **56**, 1370 (1973).
212. Akabori S. et al., Bull. Chem. Soc. Japan, **37**, 433 (1964).
213. Fujino M., Nishimura O., Chem. Commun., **1976**, 998.
214. Zervas L., Photaki I., Chimia, **14**, 375 (1960); J. Am. Chem. Soc., **84**, 3887 (1962).
215. Amiard G. et al., Bull. Soc. Chim. France, **192**, 698 (1956).
216. Coyle S., Young G. T., J. Chem. Soc. (D), **1976**, 980.
217. Veber D. F. et al., Tetrahedron Letters, **1968**, 3057; J. Am. Chem. Soc., **94**, 5456 (1972).
218. Hermann P., Hoffmann G., см. [45], с. 121.
219. Arold H., Eule M., см. [43], с. 78.
220. Holland G. F., Cohen C. A., J. Am. Chem. Soc., **80**, 3765 (1958).
221. Guttmann S., Helv. Chim. Acta, **49**, 83 (1966); см. [37], с. 11.
222. Weber U., Hartmann P., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **351**, 1384 (1970).
223. Wünsch E., Spangenberg R., см. [41], с. 30.
- 223a. Chimiak A., Pastuszek J. J., Peptides 1978, Proceedings of the XV European peptide symposium. Wrocław 1979, p.101.
224. Mukaijama T., Takahashi K., Tetrahedron Letters, **1968**, 5907.
225. Weinert M. et al., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **350**, 1556 (1969); *ibid.*, **352**, 719 (1971).
226. Medzihradsky K., Medzihradsky-Schweiger H., Acta Chim. Acad. Sci. Hung., **44**, 14 (1965).
227. Yajima H. et al., Chem. Pharm. Bull. Japan, **16**, 1342 (1968).
228. Sieber P. et al., Helv. Chim. Acta, **59**, 2135 (1970).
229. Hughes E. D., Ingold C. H., J. Chem. Soc., **1933**, 1571.
230. Iselin B., Helv. Chim. Acta, **44**, 61 (1961).
231. Sasaki T. et al., см. [55], с. 15.
232. Curtius T., Ber., **35**, 3226 (1902).
233. Honzl J., Rudinger J., Coll. Czech. Chem. Commun., **26**, 2333 (1961).
234. Sieber P. et al., Helv. Chim. Acta, **53**, 2135 (1970).
235. Kemp D. S. et al., J. Am. Chem. Soc., **92**, 4756 (1970).
236. Schnabel E., Annalen, **659**, 168 (1962).
237. Albertson N. F., Org. Reactions, **12**, 157 (1962).
238. Wieland T., Bernhard H., Annalen, **572**, 190 (1951).
239. Boissonnas R. A., Helv. Chim. Acta, **34**, 874 (1951).
240. Vaughan Jr. J. R., J. Am. Chem. Soc., **73**, 3547 (1951).
241. Stewart F. H. C., Austr. J. Chem., **18**, 887 (1965).
242. Yajima H. et al., Chem. Pharm. Bull. Japan, **17**, 1958 (1969).
243. Anderson G. W. et al., J. Am. Chem. Soc., **89**, 5012 (1967).
244. Anderson G. W. et al., J. Am. Chem. Soc., **89**, 178 (1967).
245. Zaoral M., Coll. Czech. Chem. Commun., **27**, 1273 (1962).
246. Tilak M. A., Tetrahedron Letters, **1970**, 849.
247. Belleau B., Malek G., J. Am. Chem. Soc., **90**, 1651 (1968).
248. Kiso Y., Yajima H., Chem. Commun., **1972**, 942.
249. Wendelberger G., см. [29], том 2, с. 68.
250. Wieland T. et al., Angew. Chem., **83**, 333 (1971).
251. Leuchs H., Ber., **39**, 857 (1906).
252. Hirschmann R. et al., J. Am. Chem. Soc., **88**, 3163 (1966).
253. Hirschmann R. et al., J. Am. Chem. Soc., **90**, 3254 (1968).
254. Hirschmann R. et al., J. Org. Chem., **36**, 49 (1971).

255. *Hirschmann R., Denkwalter R. G.*, Naturwiss., **57**, 145 (1970).
256. *Iwakura Y.*, Biopolymers, **9**, 1419 (1970).
257. *Wieland T. et al.*, Annalen, **573**, 99 (1951).
258. *Schwyzler R. et al.*, Helv. Chim. Acta, **38**, 69 (1955).
259. *Beaumont S. M. et al.*, Acta Chim. Sci. Hung., **44**, 37 (1965).
260. *Jakubke H.-D.*, Z. Naturforschg., **20b**, 237 (1965).
261. *Jakubke H.-D., Voigt A.*, Chem. Ber., **99**, 2944 (1966).
262. *Jakubke H.-D. et al.*, Chem. Ber., **100**, 2367 (1967).
263. *Bodanszky M.*, Nature, **175**, 685 (1955).
264. *Bodanszky M. et al.*, J. Org. Chem., **38**, 3566 (1973).
265. *Rothe M., Kunitz F. A.*, Annalen, **609**, 88 (1957).
266. *Kupryszewski G.*, Roczn. Chem., **35**, 595 (1961).
267. *Kupryszewski G., Formela M.*, Roczn. Chem., **35**, 1533 (1961).
268. *Kovacs J., Kisfaludy L., Ceprini M. Q.*, см. [39], с. 23.
269. *Kazmierczak R., Kupryszewski G.*, Roczn. Chem., **37**, 659 (1963).
270. *Barth A.*, Annalen, **686**, 221 (1965).
271. *Johnson B. T., Ruethinger T. A.*, J. Org. Chem., **35**, 255 (1970).
272. *Klausner Y. S. et al.*, см. [51], с. 536.
273. *Jakubke H.-D.*, Chem. Ber., **97**, 2816 (1964).
274. *Weygand F., Steglich W.*, Angew. Chem., **73**, 757 (1961).
275. *Anderson G. W. et al.*, J. Am. Chem. Soc., **85**, 3039 (1963).
276. *Nefkens G. H. L., Tesser G. I.*, J. Am. Chem. Soc., **83**, 1263 (1961).
277. *Jeschkeit H.*, Z. Chem., **8**, 20 (1968).
278. *Jeschkeit H.*, Z. Chem., **9**, 266 (1969).
279. *Dzieduszycka M. et al.*, см. [42], с. 28.
280. *Kemp D. S., Chien S. W.*, J. Am. Chem. Soc., **89**, 2743 (1967).
281. *Okamoto K., Shimanura S.*, J. Pharm. Soc. Japan, **93**, 333 (1973).
282. *Bankowski K., Drabarek S.*, Roczn. Chem., **45**, 1205 (1971).
283. *Jones H. H., Young G. T.*, J. Chem. Soc. (C), **1968**, 436.
284. *Jakubke H.-D., Klessen Ch., Neubert K.*, J. Prakt. Chem., **319**, 640 (1977).
285. *König W., Geiger R.*, Chem. Ber., **103**, 788 (1970).
286. *Lloyd K., Young G. T.*, Chem. Commun., **1968**, 1400.
287. *Muzalewski F., Kowalczyk J.*, см. [46], с. 143.
288. *Jakubke H.-D.*, Z. Chem., **6**, 52 (1966).
289. *Garg H. G.*, J. Sci. Ind. Res. India, **29**, 236 (1970).
290. *Bodanszky M., Klausner Y. S.*, см. [22], с. 21.
291. *Hollitzer O. et al.*, Angew. Chem., **88**, 480 (1976).
292. *Wieland Th. et al.*, Annalen, **655**, 189 (1962).
293. *Wolman Y. et al.*, J. Chem. Soc., **1967**, 689.
294. *Kovacs J. et al.*, J. Am. Chem. Soc., **89**, 183 (1967).
295. *Woodward R. B., Olofson R. A.*, J. Am. Chem. Soc., **83**, 1010 (1961).
296. *Woodward R. B. et al.*, J. Org. Chem., **34**, 2742 (1969).
297. *Neuenschwander M. et al.*, Helv. Chim. Acta, **61**, 2437 (1978).
298. *Sheehan J. C., Hess G. P.*, J. Am. Chem. Soc., **77**, 1067 (1955).
299. *Sheehan J. C. et al.*, J. Am. Chem. Soc., **87**, 2492 (1965).
300. *Sheehan J. C., McGregor D. N.*, J. Am. Chem. Soc., **84**, 3000 (1962).
301. *Wolman Y. et al.*, Chem. Commun., **1967**, 629.
302. *Ito H. et al.*, Chemistry Letters Tokyo, **1977**, 539.
303. *Wünsch E., Dress F.*, Chem. Ber., **99**, 110 (1966).
304. *Weygand F. et al.*, Z. Naturforschg., **21b**, 426 (1966).

305. *Gross H., Bilk L.*, *Tetrahedron*, **24**, 6935 (1968).
306. *Jeschkeit H.*, *Z. Chem.*, **9**, 111 (1969).
307. *Yajima H. et al.*, *Chem. Pharm. Bull. Japan*, **21**, 1612 (1973).
308. *König W., Geiger R.*, *Chem. Ber.*, **103**, 788 (1970).
309. *König W., Geiger R.*, *Chem. Ber.*, **103**, 2024, 2034 (1970).
310. *Itoh M.*, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **46**, 2219 (1973).
311. *Yajima H. et al.*, *Chem. Pharm. Bull. Japan*, **21**, 2566 (1973).
312. *Романовский П. Я. и др.* — *Биоорганическая химия*, **1**, 1263 (1975).
313. *Przybylski J., Jeschkeit H., Kuryrzewski G.*, *Rocz. Chem.*, **51**, 939 (1977).
314. *Fujino M. et al.*, *Chem. Pharm. Bull. Japan*, **22**, 1857 (1974).
315. *Nishimura O. et al.*, *Chem. Pharm. Bull. Japan*, **23**, 1212 (1975).
316. *Kemp D. S. et al.*, *Tetrahedron Letters*, **1974**, 2695.
317. *Riniker B. et al.*, см. [46], с. 631.
318. *Jakubke H.-D., Klessen Ch.*, *J. Prakt. Chem.*, **319**, 159 (1977).
319. *König W., Geiger R.*, *Chem. Ber.*, **103**, 2034 (1970).
320. *Jakubke H.-D., Klessen Ch., Berger E., Neubert K.*, *Tetrahedron Letters*, **1978**, 1497.
321. *Jakubke H.-D., Klessen Ch., Döring G.*, неопубликованные данные.
322. *Goldschmidt S., Obermeier F.*, *Annalen*, **588**, 24 (1954).
323. *Mitin Yu. V., Glinskaya O. V.*, *Tetrahedron Letters*, **1969**, 5267.
324. *Mitin Yu. V. et al.*, см. [43], с. 57.
325. *Mukaiyama T. et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 4490 (1968).
326. *Mukaiyama T. et al.*, *Tetrahedron Letters*, **1970**, 1901.
- 326а. *Шельх Г. И., Власов Г. П., Митин Ю. В.* — *ЖОХ*, **1973**, **43**, с. 396.
327. *Gawne G. et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 5669 (1969).
328. *Bates A. J. et al.* см. [43], с. 124.
329. *Castro B. et al.*, *Synthesis*, **1976**, 751.
330. *Castro B. et al.*, *Tetrahedron Letters*, **1975**, 1219.
331. *Shioriri T. et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 6203 (1972); *Tetrahedron Letters*, **1973**, 1595.
332. *Bastrow L. E., Hruby V. J.*, *J. Org. Chem.*, **36**, 1305 (1971).
333. *Horner L. et al.*, *Annalen*, **626**, 26 (1959).
334. *Bestmann H. J., Mott L.*, *Annalen*, **693**, 132 (1966).
335. *Castro B., Dormoy J. R.*, *Tetrahedron Letters*, **1973**, 3243.
336. *Yamada S., Takeuchi Y.*, *Tetrahedron Letters*, **1971**, 3995.
337. *Wieland Th., Seeliger A.*, *Chem. Ber.*, **104**, 3992 (1971).
338. *Ugi I. et al.*, *Chem. Ber.*, **94**, 2814 (1961).
339. *Hoffmann P. et al.*, in: *Isonitrile Chemistry*, Ch.2 (Ugi I., Ed.), Academic Press, New York, 1971.
340. *Ugi I. et al.*, см. [45], с. 159.
341. *Ugi I.*, *Intra-Sci. Chem. Rep.*, **5**, 229 (1971).
342. *Ugi I., et al.*, см. [44], с. 71.
343. *Patchornik A. et al.*, см. [46], с. 135.
344. *Brenner M. et al.*, *Helv. Chim. Acta*, **40**, 1497 (1957).
- 344а. *Mitin Yu. V., Zapevalova N. P.*, *Tetrahedron Letters*, **1979**, **12**, 1081.
345. *Kemp D. S. et al.*, см. [50], с. 295.
346. *Bergmann M., Fraenkel-Conrat H.*, *J. Biol. Chem.*, **119**, 1937 (1937); *ibid.*, **124**, 1 (1938).
347. *Isowa Y. et al.*, *Yuki Gosei Kagaku Kyokaiishi*, **36**, 195 (1978).
348. *Kullmann W.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **91**, 693 (1979).
349. *Widmer F., Johansen T., Carlsberg Res. Commun.*, **44**, 37 (1979); *ibid.*, **45**, 453 (1980).

350. *Morihara K., Oka T.*, *Biochem. J.*, **163**, 531 (1977); *J. Biochem.*, **82**, 1055 (1977).  
351. *Morihara et K. et al.*, *Nature*, **280**, 412 (1977).  
352. *Oka T., Morihara K.*, см. [55], с. 79.  
353. *Luisi P. L. et al.*, *J. Mol. Catalysis*, **2**, 133 (1977).  
354. *Saltmann R. et al.*, *Biopolymers*, **16**, 631 (1977).  
355. *Pelligrini A., Luisi P. L.*, см. [51], с. 556.  
356. *Kuhl P., Könnecke A., Döring G., Däumer H., Jakubke H.-D.*, *Tetrahedron Letters*, **1980**, 893.
- 356a. *Мартинек К., Семенов А. Н., Березин И. В.*, — ДАН СССР, 1980, **254**, с. 121.  
357. *Goodman M., Glaser C.*, см. [47], с. 267.  
358. *Williams M. M., Young G. T.*, *J. Chem. Soc.*, **1964**, 3701.  
359. *Kemp D. S., Chien S. W.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 2745 (1967).  
360. *Weygand F. et al.*, *Tetrahedron, Suppl.*, **8**, 9 (1966).  
361. *Benoiton N. L., Chen F. M. F.*, см. [52], с. 261.  
362. *Kemp D. S.*, см. [42], с. 1.  
363. *Goodman M., Levine L.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 2918 (1964).  
364. *Goodman M., Glaser C.*, *Chem. Engng. News.*, **46**, 40 (1968).  
365. *Young G. T.*, см. [39], с. 55.  
366. *Liberek B.*, *Tetrahedron Letters*, **1963**, 925.  
367. *Kovacs J. et al.*, *Chem. Commun.*, **1970**, 53; *ibid.*, **1968**, 1066.  
368. *Almy J., Cram D. J.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 4459 (1969).  
369. *Kovacs J. et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 1541 (1971).  
370. *Liberek B.*, *Tetrahedron Letters*, **1963**, 1103.  
371. *Anderson G. W., Callahan F. M.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 2902 (1958).  
372. *Williams M. W., Young G. T.*, *J. Chem. Soc.*, **1963**, 881.  
373. *Kemp D. S. et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 1043, 5792 (1970).  
374. *Weygand F. et al.*, *Angew. Chem.*, **75**, 282 (1963).  
375. *Weygand F. et al.*, *Chem. Ber.*, **99**, 1451 (1966).  
376. *Weygand F. et al.*, *Z. Naturforschg.*, **23b**, 279 (1968).  
377. *Izumiya N., Muraoka M.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 2391 (1969).  
378. *Bodanszky M., Conklin L. E.*, *Chem. Commun.*, **1967**, 773.  
379. *Halpern B. et al.*, *Tetrahedron Letters*, **1967**, 3075.  
380. *Hirschmann R. et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 3255 (1968).  
381. *Bosshard H. R., Schechter I., Berger A.*, *Helv. Chim. Acta*, **56**, 717 (1973).  
382. *Goodman M. et al.*, *Bioorg. Chem.*, **6**, 239 (1977).  
383. *Wolters E. T. et al.*, *J. Org. Chem.*, **39**, 3388 (1974).  
384. *Borsook H.*, *Adv. Protein Chem.* **8**, 127 (1953), обзор.  
385. *Feinberg R. S., Merrifield R. B.*, *Tetrahedron*, **30**, 3209 (1974).  
386. *Könnecke A. et al.*, *Mn. Chem.*, **112**, 469 (1981).  
387. *Fujino M. et al.*, *Chem. Pharm. Bull. Japan*, **26**, 585 (1978); см. [54], с. 28.  
388. *Benoiton L. et al.*, см. [46], с. 165.  
389. *Merrifield R. B.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2149 (1963).  
390. *Nicholls R. V. V.*, *Angew. Chem.*, **67**, 333 (1955).  
391. *Merrifield R. B.*, *Adv. Enzymol.*, **32**, 221 (1969); *Marshall G. R., Merrifield R. B.* in: *Biochemical Aspects of Reactions on Solid Supports* (G. K. Stark, Ed.), pp. 11-169, Academic Press, New York, 1971; *Merrifield R. B.* in: *Chemistry of Polypeptides* (P. G. Katsoyannis, Ed.), pp. 335-361, Plenum, New York, 1973; *Erickson B. W., Merrifield R. B.*, in: *The Proteins* (H. Neurath, R. L. Hill, Eds.), 3 Ed., Bd. 2, pp.255-537, Academic Press, New York, 1976.

392. *Meienhofer J.* in: *Hormonal Proteins and Peptides* (C. H. Li, Ed.), Bd. 2, pp.45-267, Academic Press, New York, 1973.
393. *Manning M.* in: *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, Suppl.1, pp.492-510, 1976.
394. *Losse G., Neubert K.*, *Z. Chem.*, **10**, 48 (1970).
395. *Birr Ch.* in: *Reactivity and Structure Concepts in Organic Chemistry* (K. Hafner et al., Eds.), Bd. 8, Springer-Verlag, Berlin — Heidelberg-New York, 1978.
396. *Stewart J. M., Young J. D.*, *Solid Phase Peptide Synthesis*, Freeman, San Francisco, 1969.
397. *Jones J. H.*, см. [27], т. 2, с. 159.
398. *Wünsch E.*, *Angew. Chem.*, **83**, 773 (1971).
399. *Bayer E. et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 1735 (1970).
400. *Parr W., Brohmann K.*, *Tetrahedron Letters*, **1971**, 2633.
401. *Sheppard R. C.*, см. [42], с. 111.
402. *Atherton E. et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 6584 (1975).
403. *Wieland Th., et al.*, *Annalen*, **727**, 130 (1969).
404. *Buis J. T.*, *Dissertation Universität Nijmegen*, p.5, 1973.
405. *Southard G. T. et al.*, *Tetrahedron Letters*, **1969**, 3505.
406. *Pietta P. G., Marshall G. R.*, *Chem. Commun.*, **1970**, 650.
407. *Flanigan E., Marshall G. R.*, *Tetrahedron Letters*, **1970**, 2403.
408. *Tilak M. A., Hollinden C. S.*, *Tetrahedron Letters*, **1968**, 1297.
409. *Bayer E. et al.*, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **352**, 759 (1971).
410. *Weygand F. et al.*, см. [40], с. 183.
411. *Wang S. S., Merrifield R. B.*, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **4**, 309 (1972).
412. *Birr Ch. et al.*, см. [42], с. 175.
413. *Tesser G. T., Ellenbrock B. W. J.*, см. [39], с. 144.
414. *Gross E. et al.*, *Angew. Chem.*, **85**, 672 (1973).
415. *Mitchell A. B. et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 7357 (1976).
416. *Blake J., Li C. H.*, *Chem. Commun.*, **1976**, 504.
417. *Sparrow J. T. et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 1422 (1976).
418. *Rich D. H., Gurwara S. K.*, *Tetrahedron Letters*, **1975**, 301.
419. *Wang S. S.*, *J. Org. Chem.*, **41**, 3258 (1976).
420. *Merrifield R. B.*, *Pure Appl. Chem.*, **50**, 643 (1978); *Tetrahedron Letters*, **1979**, 4935.
421. *Kenner G. W. et al.*, *Chem. Commun.*, **1971**, 636.
422. *Loffet J. A.*, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **3**, 297 (1971).
423. *Bodanszky M., Sheehan J. T.*, *Chem. Ind.*, **1966**, 1597.
424. *Tesser G. T., Ellenbroek B. W. J.*, см. [39], с. 124.
425. *Atherton E. et al.*, см. [46], с. 207.
426. *Chang C. D., Meienhofer J.*, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **11**, 246 (1978).
427. *Pless J., Bauer W.*, *Angew. Chem.*, **85**, 142 (1973).
428. *Rebek J.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 4052 (1973).
429. *Hagenmair H.*, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **353**, 1973 (1972).
430. *Hagenmair H.*, *Tetrahedron Letters*, **1970**, 283.
431. *Bayer E. et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 1735 (1970).
432. *Mitchell A. R., Roeske R. W.*, *J. Org. Chem.*, **35**, 1171 (1970).
433. *Arfinsen C. B. et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 1353 (1972).
434. *Esko K., Karlson S.*, *Acta Chem. Scand.*, **24**, 1415 (1970).
435. *Elliot D. F. et al.*, *J. Chem. Soc. Perkin I*, **1972**, 1862.
436. *Jakubke H.-D., Baumert A.*, см. [42], с. 132.
437. *Dorman D. S.*, *Tetrahedron Letters*, **1969**, 2319.



438. *Losse G., Ulbrich R.*, *Tetrahedron*, **28**, 5823 (1972).
439. *Brunfeldt K. et al.*, *Acta Chem. Scand.*, **23**, 2906 (1969).
440. *Merrifield R. B. et al.*, *Anal. Chem.*, **38**, 1905 (1966).
441. *Brunfeldt K. et al.*, *Acta Chem. Scand.*, **23**, 2830 (1969).
442. *Birr Ch. et al.* см. [42], с. 175.
443. *Jakubke H.-D. et al.*, 4th Int. Symp. on Affinity Chromat., Abstracts B-62, 1981.
444. *Merrifield R. B.*, *Biochemistry*, **3**, 1385 (1964).
445. *Marshall G. R., Merrifield R. B.*, *Biochemistry*, **4**, 2394 (1965).
446. *Marglin A., Merrifield R. B.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 5051 (1966).
447. *Bayer E. et al.*, *Tetrahedron Letters*, **24**, 4853 (1968).
448. *Manning M.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 1348 (1968).
449. *Gutte B., Merrifield R. B.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 501 (1969).
450. *Sano S., Kurihara M.*, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **350**, 1183 (1969).
451. *Ontjes D. A., Anfinsen C. F.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **64**, 428 (1969).
452. *Wieland Th. et al.*, *Annalen*, **727**, 130 (1969).
453. *Li C. H., Yamashiro D.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 7608 (1970).
454. *Potts jr. J. T. et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 63 (1971).
455. *Sharp J. J. et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 6097 (1973).
456. *Hancock W. S. et al.*, *Am. Chem. Soc.* **93**, 1799 (1971).
457. *Noda K. et al.*, *Naturwiss.*, **58**, 147 (1971).
458. *Yajima H., Kiso Y.*, *Chem. Pharm. Bull. Japan*, **22**, 1078 (1974).
459. *Treagar G. W. et al.*, *Nature New Biol.*, **232**, 87 (1971).
460. *Ohno M. et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 5251 (1971).
461. *Matsuo H. et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 822 (1971).
462. *Aoyagi H. et al.*, *Biochem. Biophys. Acta*, **263**, 827 (1972).
463. *Izumiya N. et al.*, см. [49], с. 269.
464. *Yamashiro D., Li C. H.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**, 883 (1973).
465. *Colescott R. L. et al.*, см. [50], с. 463.
466. *Семёнов А. Н., Мартинек К.*, *Биоорганическая химия*, **6**, 1559 (1980).
467. *Merrifield R. B.*, *Intr. Sci. Chem. Rep.*, **5**, 183 (1971).
468. *Niall H. D.*, *Nature New Biol.*, **230**, 90 (1971).
469. *Letsinger R. L. et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 3045 (1963).
470. *Felix A. M., Merrifield R. B.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 1385 (1970).
471. *Shemyakin M. M. et al.*, *Tetrahedron Letters*, **1965**, 2323.
472. *Mutter M. et al.*, *Angew. Chem.*, **83**, 883 (1971).
473. *Mutter M., Bayer E.*, *Angew. Chem.*, **86**, 101 (1974).
474. *Hagenmair H.*, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **356**, 777 (1975).
475. *Göhring W., Jung G.*, *Annalen*, **1975**, 1765, 1776, 1781.
476. *Pfaender P. et al.*, см. [44], с. 137.
477. *Frank H., Hagenmair H.*, *Experientia*, **31**, 131 (1975).
478. *Fridkin M. et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 3164 (1966).
479. *Wieland Th., Birr Ch.*, *Angew. Chem.*, **78**, 303 (1966).
480. *Fridkin M. et al.*, см. [50], с. 395.
481. *Kalir R. et al.*, *Eur. J. Biochem.*, **42**, 151 (1974).
482. *Wolman Y. et al.*, *Chem. Commun.*, **1967**, 629.
483. *Ito H. et al.*, *Chemistry Letters*, **1975**, 577.
484. *Horiko K.*, *Tetrahedron Letters*, **1976**, 4103.
485. *Brown J., Williams R. E.*, *Canad. J. Chem.*, **49**, 3765 (1971).
486. *Jung G. et al.*, см. [50], с. 433.
487. *Mutter M. et al.*, см. [46], с. 239.

488. *Fridkin M. et al.*, J. Am. Chem. Soc., **87**, 4646 (1965).  
489. *Flanigan E., Marshall G. R.*, Tetrahedron Letters, **1970**, 2403.  
490. *Schwyzler R., Sieber P.*, Helv. Chim. Acta, **41**, 2186, 2190, 2199 (1958).  
491. *Schwyzler R. et al.*, Helv. Chim. Acta, **47**, 441 (1964).  
492. *Rothe M. et al.*, Angew. Chem., **77**, 347 (1965).  
492a. *Bats J. W., Friedrich A., Fuess H., Kessler H., Mästle W., Rothe M.*, Angew. Chem., **91**, 573 (1979).  
493. *Du Vigneaud V. et al.*, J. Am. Chem. Soc., **75**, 4879 (1953).  
494. *Kamber B.*, Helv. Chim. Acta, **56**, 1370 (1973).  
495. *Sieber P. et al.*, Helv. Chim. Acta, **57**, 2617 (1974).  
496. *Hiskey R. G., Ward jr. B. F.*, J. Org. Chem., **35**, 1118 (1970).  
497. *Zervas L. et al.*, J. Am. Chem. Soc., **87**, 4922 (1965).  
498. *Hiskey R. G. et al.*, J. Am. Chem. Soc., **91**, 7525 (1969).  
499. *Freedman M.* in: The Chemistry and Biochemistry of the Sulfhydryl Group, pp.199-229, Pergamon Press, Oxford, 1973.  
500. *Losse G., Bachmann G.*, Chem. Ber., **97**, 2671 (1964).  
501. *Gibian H., Lübke K.*, Annalen, **644**, 130 (1961).  
502. *Schwyzler R., Carrion J. P.*, Helv. Chim. Acta, **43**, 2101 (1960).  
503. *Ugi I., Fetzer U.*, Angew. Chem., **73**, 621 (1961).  
504. *Plattner P. A. et al.*, Helv. Chim. Acta, **46**, 927 (1963).  
505. *Shemyakin M. M. et al.*, Tetrahedron, **19**, 955 (1963).  
506. *Schwyzler R., Tun-Kyi A.*, Helv. Chim. Acta, **45**, 859 (1962).  
507. *Ivanov V. T. et al.*, см. [37], с. 337.  
508. *Шемьякин М. М. и др.*, Журн. общ. химии, **36**, 1391 (1966).  
509. *Rothe M., Kreiss W.*, Angew. Chem., **85**, 1113 (1973).  
510. *Rothe M., Kreiss W.*, Angew. Chem., **89**, 117 (1977).  
511. *Shemyakin M. M. et al.*, Tetrahedron, **21**, 3537 (1965).  
512. Abgekürzte Nomenklatur synthetischer Polypeptide, IUPAC-IUB Comission on Biochemical Nomenclature (CBN), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **349**, 1013-1016 (1968).  
513. *Bamford B. H., Elliott A., Hanby W. E.*, in: Physical Chemistry (E. Hutchinson, Ed.), Vol. V: Synthetic polypeptides, Academic Press, New York, 1956.  
514. *Katchalski E.*, Adv. Protein Chem. **6**, 123 (1959).  
515. *Katchalski E., Sela M.*, Adv. Protein Chem. **13**, 243 (1966).  
516. *Blout E. R.*, Polyamino Acids, Polypeptides and Proteins (M. A. Stahman, Ed.), University of Wisconsin Press, Madison, Wisc., 1962.  
517. *Fasman D.*, Poly- $\alpha$ -Amino Acids, Protein Models for Conformation Studies, Vol.1, Biological Macromolecules Series, Dekker, New York, 1967.  
518. *Johnson B. J.*, J. Pharm. Sci., **63**, 313 (1974).  
519. *Brack A., Spach G.*, C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. Paris, Ser. D, **271**, 916 (1970).  
520. *Zeiger A. R. et al.*, Biopolymers, **12**, 2135 (1973).  
521. *Wieland Th.*, Angew. Chem., **63**, 7 (1951).  
522. *Wieland Th. et al.*, Annalen, **633**, 185 (1960).  
523. *Knorre D. G., Shubina T. N.*, см. [38], с. 77.  
524. *Sheehan J. C. et al.*, J. Am. Chem. Soc., **87**, 2492 (1965).  
525. *Poduška K.*, Coll. Czech. Chem. Commun., **33**, 3779 (1968).  
526. *Schneider C. H., Wirz W.*, Helv. Chim. Acta, **55**, 1062 (1972).  
527. *Muramatsu I. et al.*, Chemistry Letters, **1977**, 1057.  
528. *Kisfaludy L. et al.*, Tetrahedron Letters, **1974**, 1785.  
529. *Bodanszky M. et al.*, J. Org. Chem., **39**, 444 (1974).

530. *Van Zon A., Beuerman H. C.*, *Helv. Chim. Acta*, **59**, 1112 (1976).  
531. *Kisfaludy L., Nyeki O.*, *Acta Chem. Acad. Sci. Hung.*, **86**, 343 (1975).  
532. *Penke B. et al.*, см. [45], с. 101.  
533. *Meienhofer J.*, *Chemtech.*, **1973**, 242.  
534. *Erickson B. W., Merrifield R. B.*, in: *The Proteins*, Vol.2, Academic Press, New York, 1976.  
535. *Zapevalova N. P., Maximov E. E., Mitin Yu. V.*, см. [46], с. 231.  
536. *Riniker B. et al.*, см. [46], с. 631.  
537. *Gil-Av E., Feibusch B.*, *Tetrahedron Letters*, **1967**, 3345.  
538. *König W., Nicholson G. I.*, *Anal. Chem.*, **47**, 951 (1975).  
539. *Weygand F., Ragnarsson U.*, *Z. Naturforsch.*, **21b**, 1141 (1966).  
540. *Offord R. E., Di Bello C.* (Eds.), *Semisynthetic Peptides and Proteins*, Academic Press, New York, 1978.  
541. *Tesser G. I., Boon P. J.*, *Semisynthesis in Protein Chemistry*, *Recl. Trav. Chim. des Pays-Bas*, **99**, 289 (1980).  
542. *Schnabel E. et al.*, *Annalen*, **749**, 90 (1971).  
543. *Klausner Y. S., Bodanszky M.*, *Bioorg. Chem.*, **2**, 354 (1973).  
544. *Eberle A., Schwyzer R.*, *Helv. Chim. Acta*, **58**, 1091 (1975).  
545. *Vorbrüggen H., Krolkiewicz K.*, *Angew. Chem.*, **87**, 877 (1975).  
546. *Riniker B. et al.*, *Helv. Chim. Acta*, **58**, 1086 (1975).  
547. *Felix A. M.*, *J. Org. Chem.*, **39**, 1427 (1974).  
548. *Yajima H. et al.*, *Chem. Commun.*, **1974**, 107.  
549. *Yajima H. et al.*, *Chem. Pharm. Bull. Japan*, **23**, 1164 (1975).  
550. *Matsuura S.*, *Chem. Commun.*, **1976**, 451.  
551. *Semmelhack M. F., Heinsohn G. E.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 5139 (1972).  
552. *Ohno M., Anfinsen C. B.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 4098 (1970).  
553. *Blecher H., Pfaender P.*, *Annalen*, **1973**, 1263.  
554. *Meyers C., Glass J. D.*, см. [50], с. 325.  
555. *Glass G. D., Pelzig M.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 2739 (1975).  
556. *Boissonnas R. A., Preitner G.*, *Helv. Chim. Acta*, **36**, 875 (1953).  
557. *Blaha K., Rudinger J.*, *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **30**, 585 (1965).  
558. *Losse G. et al.*, *Annalen*, **715**, 196 (1968).  
559. *Galpin I. J. et al.*, см. [46], с. 665.  
560. *Fujii N., Yajima H.*, *J. Chem. Soc.*, **1981**, 831.  
561. *Yanaihara N. et al.*, см. [55], с. 195.  
562. *Föhles J. et al.* in: *15th Eur. Peptide Symp.*, Gdansk, Abstracts, p.65. 1978.  
563. *Schwyzler R., Sieber P.*, *Nature*, **199**, 172 (1963).  
564. *Bajusz S. et al.*, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.*, **52**, 335 (1967).  
565. *Ivanov V. T. et al.*, см. [45], с. 219; [46], с. 41.  
566. *Wünsch E.*, *Z. Naturforsch.*, **22b**, 1269 (1967).  
567. *Bodanszky M. et al.*, *Chem. Ind.*, **1966**, 1757.  
568. *Feurer M.*, см. [51], с. 448.  
569. *Hamprecht B.*, *Angew. Chem.*, **88**, 211 (1976).  
570. *Cuatrecasas P.*, *Biochem. Pharm.*, **23**, 2353 (1974).  
571. *Cuatrecasas P.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **63**, 450 (1969).  
572. *Lefkowitz R. J. et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **65**, 745 (1970).  
573. *Goodfriend T., Lin S. Y.*, *Clin. Res.*, **17**, 243 (1969).  
574. *Lübke K. et al.*, *Angew. Chem.*, **88**, 790 (1976).  
575. *Kalota G. B.*, *Science*, **201**, 895 (1978).  
576. *Shome B. et al.*, *Endocrinol. Metab.*, **39**, 199, 203 (1974).

577. Gonadotropins and Gonadal Function (N. R. Mondgal, Ed.), Academic Press, New York, 1974.
578. Sairam M. R., Li C. H., Arch. Biochem. Biophys., **165**, 709 (1974).
579. Niall H. D. et al., Rec. Progr. Hormone Res., **29**, 387 (1973).
580. Schwabe C. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., **75**, 503 (1977); Science, **197**, 914 (1977).
581. Hormonal Proteins and Peptides (C. H. Li, Ed.), (a) Vol. 1, 1973; (b) Vol. 2, 1973; (c) Vol. 3, 1975; (d) Vol. 4, 1977.
582. Methods in Investigate and Diagnostic Endocrinology (S. A. Berson, R. S. Yalow, Eds.), Vols. 2a, 2b,: Peptide Hormones North-Holland, Elsevier, New York, 1973.
583. Peptide Hormones, Hormone Action (B. W. O'Malley, J. G. Hardman, Eds.), Part B; Methods Enzymol., **37**, 1975.
584. Rudinger J., The Design of Peptide Hormone Analogs, in: Drug Design (E. J. Ariens, Ed.), Vol. 11/II, Academic Press, New York, 1972.
585. Goth E., Fövényi J., Polypeptide Hormones, Akademiai Kiado, Budapest, 1971.
586. Ross M. J., National Institutes of Health Recombinant DNA Technical Bulletens, **3**, 1 (1980).
587. Peptide Hormones (J. A. Parson, Ed.), University Park Press, Baltimore, 1976.
588. Karlson P., Naturwiss., **62**, 126 (1975).
589. Guillemin R., Neurosciences, **16**, Suppl. 1 (1978).
590. Hormone-Receptor Interaction: Molecular Aspects (G. S. Levey, Ed.), Dekker, New York, 1976.
591. Methods of Hormone Radioimmunoassay (B. M. Jaffe, Behrman, Eds.), Academic Press, New York, 1974.
592. Blackwell R. E., Guillemin R., Ann. Rev. Physiol., **35**, 357 (1973).
593. Schwyzer R. et al., in: Structure-Activity Relationships of Protein and Polypeptide Hormones (M. Margoulies, F. C. Greenwood, Eds.), pp.167-175, Experta Medica, Amsterdam, 1972.
594. Riniker B. et al., Nature New Biol., **235**, 114 (1972).
595. Li C. H., Biochem. Biophys. Res. Commun., **49**, 85 (1972).
596. Schwyzer R., Sieber P., Helv. Chim. Acta, **49**, 134 (1963).
597. Mains R. E., Eiper B. A., Ling N., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 3014 (1977).
598. Chretien M., Seidah N. G., Chemistry and Biosynthesis of Pro-opiomelanocortin, Mol. Cell. Biochemistry, **34**, 101 (1981).
599. Cohen S. N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **70**, 3240 (1973).
600. Sanger F., Coulson A. P., FEBS Lett., **87**, 107 (1978).
601. Nakakishi S. et al., Nature, **278**, 423 (1979); см. [52], с. 957.
602. Growth and Growth Hormone (A. Pecile, E. E. Müller, Eds.), Experta Medica, Amsterdam, 1972.
603. Root A. W., Human Pituitary Growth Hormone, Thomas, Springfield, III., 1972.
604. Advances in Human Growth Hormone Research (S. Raiti, Ed.), pp.74-612, DHEW Publication. NIH, 1974.
605. Li C. H., Yamashiro D., J. Am. Chem. Soc., **92**, 7608 (1970).
606. Fryklund L., Sievertsson H., FEBS Letters, **87**, 55 (1978).
607. Niall D. H. et al. Recent Progr. Hormone Res., **29**, 387 (1973).
608. Maurer R. A. et al., Biochem. J., **161**, 189 (1977).
609. Li C. H., Nature **201**, 924 (1964); ibid. **206**, 1093 (1965).
610. Smith L., Biochem. Education, **8**, 1 (1980).
611. Graf L. et al., Biochem. Biophys. Acta, **229**, 276 (1971).
612. Chang A. C. Y. et al., см. [52], с. 957.

613. *Yoshimi H. et al.*, *Life Sci.*, **22**, 2189 (1978).
614. *Schwyzler R., Eberle A.*, *Front. Hormone Res.*, **4**, 18 (1977).
615. *Eberle A., Schwyzler R.* in: *Surface Membrane Receptors* (R. A. Bradshaw et al., Eds.), Plenum Press, New York, p.291, 1976.
616. *Eberle A. et al.*, *Bull. Schweiz. Acad. Med. Wiss.*, **34**, 99 (1978).
617. *Melanocyte Stimulating Hormone: Control, Chemistry and Effects* (F. J. Tilders et al., Eds.), Karger, Basel, 1977.
618. *Du Vigneaud V.*, in: *Perspectives in Biological Chemistry* (R. E. Olson, Ed.), p.133, Dekker, New York, 1970.
619. *Acher R. et al.*, *Eur. J. Biochem.*, **40**, 585 (1973).
620. *Acher R.*, *Angew. Chem.*, **91**, 905 (1979).
- 620a. *Land J. H., Schütz G., Schmale H., Richter D.*, *Nature*, **295**, 299 (1982).
621. *Pliška V.*, *Neuroscience Letters, Suppl.*, **1**, 225 (1978).
622. *Du Vigneaud V. et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 3115 (1954).
623. *Manning M. et al.*, *Biochemistry*, **9**, 3925 (1970).
624. *Walter R. et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 4528 (1974).
625. *Walter R.*, см. [43], с. 324.
626. *Urry D. W., Walter R.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 956 (1971).
627. *Walter R. et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **336**, 294 (1974); *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 972 (1978).
628. *Manning M. et al.*, *J. Med. Chem.*, **16**, 975 (1973); *Endocrinology*, **94**, 1106 (1974).
629. *Chan W. Y. et al.*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **146**, 364 (1974).
630. *Marbach P., Rudinger J.*, *Experientia*, **30**, 696 (1974).
631. *Prochazka Z. et al.*, *Col. Czech. Chem. Commun.*, **43**, 1285 (1978); *ibid.*, **31**, 4581 (1966).
632. *Hypophysiotropic Hormone of the Hypothalamus: Assay and Chemistry* (J. Meites, Ed.), Williams & Wilkers Comp., Baltimore, 1970.
633. *Voelter W.*, *Chemiker-Ztg.*, **98**, 554 (1974); **100**, 130 (1976).
634. *Hypothalamic Hormones. Chemistry, Physiology, Pharmacology and Clinical Use* (M. Motta et al., Eds.), *Proc. Serono Symp.*, Vol.6, Academic Press, New York, 1975.
635. *Hypothalamic Hormones. Structure, Synthesis and Biological Activity* (D. Gupta, W. Voelter, Eds.), Verlag Chemie, Weinheim, 1975.
636. *Frontiers in Neuroendocrinology* (L. Martini, W. F. Ganong, Eds.), Vol.4, Raven Press, New York, 1976.
637. *Vale W. et al.*, *Ann. Rev. Physiol.*, **39**, 473 (1977).
638. *Blech W.*, *Endokrinologie*, **69**, 369 (1977); **71**, 214 (1978); **72**, 77 (1978).
639. *Voelter W.*, *The Nomenclature of Peptide Hormones*, *J. Biol. Chem.*, **250**, 3215 (1975).
640. *Nair R. M. G. et al.*, *Biochemistry*, **9**, 1103 (1970).
641. *Burgus R. et al.*, *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. Paris, Ser. D*, **269**, 1870 (1969).
642. *Burgus R. et al.*, *Nature*, **226**, 322 (1970).
643. *Rivier J. et al.*, *J. Med. Chem.*, **15**, 479 (1972).
644. *Peterson R. E., Guillemin R. G.*, *Amer. J. Med.*, **57**, 591 (1974).
645. *Schally A. V., et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 393 (1971).
646. *Amoss M. et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 205 (1974).
647. *Blech W.*, *Endokrinologie*, **71**, 214 (1978).
648. *Matsuo H. et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 1334 (1971).
649. *Labrie F. et al.*, *Endocrinology*, **98**, 289 (1976).
650. *Blech W.*, *Endokrinologie*, **71**, 325 (1978).

651. *Lowry P. J.*, *J. Endocrinol.*, **62**, 163 (1974).  
652. *Portens S. E., Malven P. V.*, *Endocrinology*, **94**, 1699 (1974).  
653. *Celis M. E. et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 1428 (1971).  
654. *Nair R. M. G. et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 1376 (1971).  
655. *Walter R. et al.*, *Brain Res.*, **60**, 449 (1973).  
656. *Walter R.* in: *Psychoneuroendocrinology* (N. Hatonani, Ed.), p.285, Karger, New York, 1974.  
657. *Schally A. V. et al.*, *Endocrinology*, **84**, 1493 (1969).  
658. *Blech W.*, *Endokrinologie*, **72**, 77 (1978).  
659. *Vale W. et al.*, *Somatostatin, Rec. Progr. Horm. Res.*, **31**, 365 (1975).  
660. *Burgus R. et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 684 (1973).  
661. *Schally A. V. et al.*, *Biochemistry*, **15**, 509 (1976).  
661a. *Goodman R. H. et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5869 (1980).  
662. *Rivier J. et al.*, см. [50], с. 863.  
663. *Veber D.*, см. [52], с. 409.  
664. *Rivier J.*, *Int. Symp. on Somatostatin, Freiburg, Abstr.; 1977; Diabetes*, **26**, Suppl. 1, 360.  
665. *Garsky V. M. et al.*, см. [52], с. 547.  
666. *Itakura K. et al.*, *Science*, **198**, 1056 (1977).  
667. *Klostermeyer H., Humbel R. E.*, *Angew. Chem.*, **78**, 871 (1966).  
668. *Zahn H.*, *Naturwiss.*, **54**, 396 (1967).  
669. *Lübke K., Klostermeyer H.*, *Adv. Enzymol.*, **35**, 445 (1970).  
670. *Geiger R.*, *Chemiker-Ztg.*, **100**, 111 (1976).  
671. *Du Y.-C. et al.*, *Sci. Sin.*, **10**, 84 (1961).  
672. *Meienhofer J. et al.*, *Z. Naturforschg.*, **18b**, 1120 (1963).  
673. *Katsoyannis P. G. et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 930 (1964).  
674. *Kung Y.-t. et al.*, *Sci. Sin.*, **14**, 1710 (1965).  
675. *Steiner D. F. et al.*, *Science*, **157**, 697 (1967).  
676. *Chan J. S. et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 1964 (1976).  
677. *Yanaihara N. et al.*, см. [55], с. 195.  
678. *Föhles J. et al.*, 15th Europ. Pept. Symp., Gdansk, p.65, 1978.  
679. *Blundell T. L. et al.*, *Rec. Progr. Horm. Res.*, **27**, 1 (1971).  
680. *Geiger R., Obermeier R.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **55**, 60 (1973).  
681. *Cuatrecasas P.*, *Fed. Proc.*, **32**, 1838 (1973).  
682. *Villa-Komaroff L. et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3727 (1978).  
683. *Goeddel D. Y. et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 106 (1979).  
684. *Wünsch E. et al.*, *Chem. Ber.*, **101**, 3659 (1968).  
685. *Wünsch E. et al.*, *Chem. Ber.*, **101**, 3664 (1968).  
686. *Tager H. S., Steiner D. F.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 2321 (1973).  
687. *Patzelt C. et al.*, *Nature*, **282**, 260 (1979).  
687a. *Habener J. F. et al.*, in: *Peptides, Synthesis — Structure — Function, Proc. 7th Am. Peptide Symp.*, p. 457 (1981).  
688. *Brewer H. B. et al.*, *Amer. J. Med.*, **56**, 759 (1974).  
689. *Keutmann H. T. et al.*, *Biochemistry*, **17**, 5723 (1978).  
690. *Hamilton J. W. et al.*, *Fed. Proc.*, **32**, 269 (1973).  
691. *Maurer R. A. et al.*, *Biochem. J.*, **161**, 189 (1977).  
692. *Potts J. T. et al.* in: *Calcitonin 1969* (S. Taylor, G. Foster, Eds.), Heinemann, London, 1970.  
693. *Rittel W. et al.*, *Experientia*, **32**, 246 (1976).  
693a. *Jacobs J. W. et al.*, *Science*, **213**, 457 (1981).  
694. *Brown J. C. et al.*, *Canad. J. Biochem.*, **49**, 255, 867 (1971).

695. Said S. I., Mutt V., Eur. J. Biochem., **28**, 199 (1972).
696. Suzuki S. et al., см. [54], с. 151.
697. Gregory H., Nature, **257**, 325 (1975).
698. Kenner G. W., Chem. Ind., **1972**, 791.
699. Morley J. S., Proc. Roy. Soc. B., **170**, 97 (1968).
700. Noyes B. E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 1770 (1979).
701. Wünsch E. et al., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **362**, 179 (1981).
702. Gregory R. A., Tracy H. J., Gut, **15**, 683 (1974).
703. Moore S. et al., см. [52], с. 503.
704. Mut V., Jorpes J. E., Rec. Progr. Horm. Res., **23**, 483 (1967).
705. Wünsch E., Naturwiss., **59**, 239 (1972).
706. Jorpes J. E. et al., Acta Chem. Scand., **18**, 2408 (1964).
707. Mut V., Jorpes J. E., Eur. J. Biochem., **6**, 156 (1968).
708. Brown J. C. et al., Canad. J. Physiol. Pharm., **49**, 212 (1971); Gastroenterology, **62**, 401 (1972); Canad. J. Biochem., **51**, 533 (1973); *ibid.*, **52**, 7 (1974).
709. Wünsch E. et al., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **357**, 477 (1976).
710. Fujino M. et al., см. [54], с. 61.
711. Fisher J. W., Kidney Hormones, Academic Press, London, 1971.
712. Werning C., Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart, 1972.
713. Peart W. S., Roy. Soc. Ser., **B 173**, 317 (1969).
714. V. Euler U. S., Pernow P., Substance P, Raven Press, New York, 1977.
715. Skrabanek P., Powell D., Substance P, Ann. Res. Rev., Eden Press, Montreal, 1978.
716. Studer R. O. et al., Helv. Chim. Acta, **56**, 860 (1973).
717. Carraway R., Leeman S., J. Biol. Chem., **248**, 6854 (1973); см. [50], с. 679.
718. Bissette G. et al., Life Sci., **23**, 2173 (1978).
719. Araki K. et al., Chem. Pharm. Bull. Japan, **21**, 2801 (1973).
720. Erdös E. G., Wilde A. F., Bradykinin, Kallidin und Kallikrein, in: Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Bd. XXV, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New-York, 1970.
721. Frey E. K. et al., Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren, 2 Aufl., Enke-Verlag, Stuttgart, 1968.
722. De Castiglione R., Angelucci F., см. [45], с. 529.
723. Erspamer V., Anastasi A., Experientia, **18**, 58 (1962).
724. Sandrin E., Boissonnas R. A., Experientia, **18**, 59 (1962).
725. Bernardi L. et al., Experientia, **20**, 492 (1964).
726. Anastasi A., Falcomeri Erspamer G., Experientia, **26**, 866 (1970).
727. Anastasi A. et al., Experientia, **31**, 394 (1975).
728. Anastasi A. et al., Experientia, **33**, 857 (1977).
729. Sasaki T. et al., см. [55], с. 11.
730. Anastasi A. et al., Experientia, **27**, 166 (1971).
731. Brown M. et al., Science, **196**, 998 (1977).
732. De Castiglione, Angelucci F., см. [50], с. 529.
733. De Castiglione R. et al., см. [43], с. 463.
734. Anastasi A. et al., Comp. Biochem. Physiol., **14**, 43 (1965).
735. Nakajima T. et al., Chem. Pharm. Bull. Japan, **16**, 769 (1968).
736. Nakajima T. et al., Fed. Proc., **29**, 282 (1970).
737. Yasuhara T., Nakajima T., Chem. Pharm. Bull. Japan, **25**, 2464 (1977); см. [54], с. 159.
738. Peptides in Neurobiology (H. Gainer, Ed.), Plenum Press, New York, 1977.

739. Neuropeptide Influences on the Brain and Behavior (L. H. Miller, C. A. Sandman, A. J. Kastin, Eds.), Raven Press, New York, 1977.
740. Centrally Acting Peptides (J. Hughes, Ed.), Macmillan, London, 1977.
741. *Collu R., Ducharme J. R., Barteau A.*, Central Nervous System Effect of Hypothalamus Hormones and Other Peptides, Raven Press, New York, 1979.
742. *Graf L., Palkovits M., Ronai A. Z.*, Endorphins'78, Academiai Kiado, Budapest, 1978.
743. *Walker R. J.*, Polypeptides as Central Transmitters, *Gen. Pharmacol.*, **9**, 129 (1978).
744. *Brown M., Vale W.*, Central Nervous Effects of Hypothalamic Hormones, *Endocrinology*, **96**, 1333 (1975).
745. *Monnier M., Schoenberger G. A. S.*, Neuro-humoral Coding of Sleep by the Physiological Sleep Factor Delta, in: *Neurochemical Coding of Brain Function* (R. D. Myers, R. R. Drucker, Eds.), Odin, New York, 1974.
746. *Dunn A. H.*, The Chemistry of Learning and the Formation of Memory, in: *Molecular and Functional Neurobiology* (W. H. Gispen, Ed.), pp.347-387, Elsevier, Amsterdam, 1976.
747. *De Wied D., Witter A., Greven H. M.*, Behaviorally Active ACTH Analogues, *Biochem.-Pharmacol.*, **24**, 1463 (1975).
748. *De Wied D. et al.*, Pituitary Peptides and Memory, см. [50], с. 635.
749. *Prange A. J. et al.*, Peptides and the Central Nervous System, in: *Handbook of Psychopharmacology* (L. L. Iversen et al., Eds.), Vol. 7, Plenum Press, New York, 1978.
750. *Sterba G.*, Das oxytocinerge neurosekretorische System der Wirbeltiere. Beitrag zu einem erweiterten Konzept, *Zool. Jahrb. Abtl. Zool. Physiol. Tiere*, **78**, 409 (1974).
751. *De Wied D.*, *Life Sci.*, **20**, 195 (1977).
752. *Van Riesen H., Rigter H.*, *Arzneimittelforschg.*, **28**, 1294 (1978).
753. *Brown B. E.*, *Life Sci.*, **17**, 1241 (1975).
754. *Brown B. E., Starrat A. N.*, *J. Insect Physiol.*, **21**, 1879 (1975).
755. *Van Riesen H. et al.*, см. [739], с. 11.
756. *Ungar G.*, Agents and Actions, **1**, 155 (1970).
757. *Ungar G.*, *Life Sci.*, **14**, 595 (1974).
758. *Ungar G.*, Peptides and Behavior, in: *International Review of Neurobiology* (C. C. Pfeifer, J. R. Smythies, Eds.), Vol. 17, pp. 37-59, Academic Press, New York, 1975.
759. *Ungar G. et al.*, см. [50], с. 673.
760. *Beaumont A., Hughes J.*, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **19**, 245 (1979).
761. *Terenius L.*, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **18**, 189 (1978).
762. *Klee W. A., Nirenberg M.*, *Nature*, **263**, 609 (1976).
763. Opiates and Endogenous Opioid Peptides (H. W. Klosterlitz, Ed.), North-Holland, Amsterdam, 1976.
764. *Goldstein A.*, *Science*, **193**, 1081 (1976).
765. *Goldstein A. et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 1742 (1971).
766. *Snyder S. H.*, *Nature*, **257**, 185 (1975).
767. *Iverson L. L.*, *Nature*, **258**, 567 (1975).
768. *Hughes J.*, *Brain Res.*, **88**, 295 (1975).
769. *Hughes J. et al.*, *Nature*, **258**, 577 (1975).
770. *Fredrickson R. C. A.*, *Life Sci.*, **21**, 23 (1977).
771. *Miller R. J., Cuatrecasas P.*, *Naturwiss.*, **65**, 507 (1978).
772. *Simantov R., Snyder S. H.*, *Life Sci.*, **18**, 781 (1976).
773. *Voelter W. et al.*, *Chem. Ztg.*, **101**, 194 (1977).



774. *Smith G. D., Griffis J. E. F.*, Science, **199**, 1214 (1978).
775. *Bajusz S., Patthy A.*, см. [742], с. 63.
776. *Bajusz S. et al.*, FEBS Letters, **76**, 91 (1977).
777. *Yamashiro D. et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **78**, 1124 (1977).
778. *Roemer D. et al.*, Nature, **268**, 547 (1977).
779. *Dutta A. S. et al.*, Life Sci., **21**, 559 (1977).
780. *Lazarus L. H. et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**, 2156 (1976).
781. *Li C. H., Chung D.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**, 1145 (1976).
782. *Li C. H.*, Arch. Biochem. Biophys., **183**, 593 (1977); см. [52], с. 823.
783. *Kangawa K. et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **86**, 153 (1979).
784. *Kangawa E. et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **99**, 871 (1981).
785. *Kakidani H. et al.*, Nature, **298**, 245 (1982).
- 785a. *Comb M. et al.*, Nature, **295**, 663 (1982).
786. *Najjar V. A., Nishioka K.*, Nature, **228**, 672 (1970).
787. *Nishioka K. et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **47**, 172 (1972); Biochim. Biophys. Acta, **310**, 217 (1973).
788. *Fridkin M. et al.*, см. [45], с. 541.
789. *Nozaki S. et al.*, см. [54], с. 131.
790. *Konopinska D. et al.*, см. [45], с. 535.
791. Biological Activity of Thymic Hormones (D. W. Van Bekkum, Ed.), Kooyker Scientific Publications, Rotterdam, 1975.
792. *Schlesinger D. H., Goldstein A. L.*, Cell, **5**, 361 (1975).
793. *Goldstein A. L. et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 725 (1977).
794. *Bach J. F. et al.*, Ann. N. Y. Acad. Sci., **249**, 186 (1975); Nature, **266**, 55 (1977).
795. *Bricas E. et al.*, см. [51], с. 564.
796. *Lipmann F.*, Accounts Chem. Res., **6**, 361 (1973).
797. *Hassall C. H.*, см. [50], с. 891.
798. *Allen J. G. et al.*, Nature, **272**, 56 (1978).
799. *Brockmann H.*, Fortschr. Chem. Org. Naturst., **18**, 1 (1960); Angew. Chem., **72**, 939 (1960).
800. *Lackner H.* Angew. Chem., **87**, 400 (1975).
801. *Meienhofer J., Atherton E.*, Adv. Appl. Mikrobiol., **16**, 203 (1973).
802. *Katagiri K. et al.* in: Antibiotics III (J. W. Corwran, F. H. Hahn, Eds.), p.234, Springer-Verlag, Berlin, 1975.
803. *Ovchinnikov Yu. A., Ivanov V. T., Shkrob A. M.*, membrane Active Complexones, Elsevier, Amsterdam, 1974.
804. *Ovchinnikov Yu. A.*, см. [43], с. 17.
805. *Ivanov V. T.*, Ann. N. Y. Acad. Sci., **264**, 221 (1975).
806. *Fonina L. A. et al.*, см. [45], с. 635.
807. *Payne J. W. et al.*, Biochem. J., **117**, 757 (1970).
808. *Burgess A. W., Leach S. L.*, Biopolymers, **12**, 2691 (1973).
809. *Jung G.*, in: Peptides: Structure and Biological Function, Gross E., Meinhofer J. (Eds.), Pierce Chemical Comp., Rockford, Ill., 1979.
810. *Boheim G. et al.*, Biochem. Biophys. Acta, **507**, 485 (1978).
811. *Schwyzler R., Sieber P.*, Angew. Chem., **68**, 518 (1956).
812. *Hodgkin D. C., Oughton R. M.*, Biochem. J., **65**, 782 (1957).
813. *Ohnishi M., Urry D. W.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **36**, 194 (1969).
814. *Wieland Th., Faulstich H.*, Crit. Rev. Biochem. (CRC), **5**, 185 (1978).
815. *Wieland Th.*, Chemie in unserer Zeit, **13**, 56 (1979).
816. *Munekata E. et al.*, см. [46], с. 381.

817. *Faulstich H.*, *Naturwiss.*, **66**, 403 (1979).
818. *Ivanov V. T. et al.*, см. [50], с. 195.
819. *Habermann F.*, *Erg. Physiol. Chem. Exp. Pharmacol.*, **60**, 220 (1968).
820. *Gauldi J. et al.*, *Eur. J. Biochem.*, **61**, 369 (1976).
821. *Suchanek G. et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 701 (1978).
822. *Van Rietschoten J. et al.*, *Eur. J. Biochem.*, **56**, 35 (1975).
823. *Sandberg B. E. B., Ragnarsson U.*, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **7**, 503 (1975).
824. *Hirai Y. et al.*, см. [55], с. 155.
825. *Ivanov V. T. et al.*, см. [45], с. 219.
826. *Kanaoka M. et al.*, см. [55], с. 109.
827. *Warnhoff E. W.*, *Peptide Alkaloids, Fort. Chem. Org. Naturst.*, **28**, 163 (1970).
828. *Takai M. et al.*, *Chem. Pharm. Bull. Japan*, **23**, 2556 (1975); *ibid.*, **24**, 2118 (1976).
829. *Tschesche R. et al.*, *Chem. Ber.*, **100**, 3937 (1967).