

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

ББК 24.239  
Я49  
УДК 547.9 + 571.1

Якубке Х.-Д., Ешкайт Х.

Я49 Аминокислоты, пептиды, белки: Пер. с нем.—М.: Мир, 1985.— 456 с., ил.

Книга, написанная известными учеными ГДР, содержит основной материал по химии природных соединений, новейшие данные по синтезу ряда важных пептидных гормонов, их биологической роли; в ней рассматриваются также структурные вопросы химии пептидов и белков. В книге удачно сочетается глубина изложения с широтой охвата материала.

Для специалистов в области биоорганической химии и химии белка.

Я 1803000000-171  
— 89-85, ч. I  
041(01)-85

ББК 24.239  
547

*Редакция литературы по химии*

© Akademie-Verlag, Berlin, 1981

© Перевод на русский язык, «Мир», 1985

## *Предисловие редактора перевода*

Биоорганическая химия — это наука о веществах, вовлеченных в жизненный цикл организмов, о синтезе этих веществ, об их свойствах и превращениях. В отличие от органической химии, объектами изучения которой далеко не всегда являются вещества, связанные с организмами, биоорганическая химия имеет дело только с веществами, выделенными из организмов, влияющими на них или предназначенными для них. Биоорганическая химия развивается бурными темпами, особенно в последние десятилетия. Ведущую роль в ней играет химия аминокислот, пептидов и белков — трех исключительно важных классов веществ, связанных между собой тесными узами родства.

Литература, посвященная каждому из этих классов природных соединений, довольно обширна, однако редко можно встретить труды, в которых были бы рассмотрены эти соединения вместе, показана их взаимосвязь, даны их сравнительные характеристики. Основной трудностью такого совместного рассмотрения является обилие материала, накопленного за многие десятилетия развития экспериментальных работ по аминокислотам, пептидам и белкам. Ученые из ГДР Х.-Д. Якубке (Лейпцигский университет им. Карла Маркса) и Х. Ешкайт (университет Галле им. Мартина Лютера) взялись за эту трудную задачу и успешно с ней справились. Книга «Аминокислоты, пептиды, белки» выдержала три издания в ГДР, была переведена и издана в США.

Предлагаемый советскому читателю перевод выполнен с 3-го издания. Книга состоит из трех больших глав; каждая глава включает в себя историю развития вопроса, данные по химическим и физико-химическим свойствам рассматриваемых соединений. Большое внимание уделяется биологическим свойствам веществ. Особое место в книге занимает рассмотрение химических свойств каждого класса веществ, их анализа и синтеза. При этом неудивительно, что наибольшее внимание удалено пептидам, поскольку химия пептидов за последние два-три десятилетия претерпела чрезвычайные изменения в результате исключительно бурного развития. Появились очень эффективные методы синтеза пептидов, позволившие получить ряд биологически важных пептидов и сотни их аналогов.

В книге рассматриваются в сжатой, лучше сказать в концентрированной, форме все основные химические методы синтеза производных аминокислот, введения и удаления защитных групп, методы конденсации, а также выделения и очистки синтезируемых веществ. При этом авторы, опираясь на новейшие результаты исследований, опубликованные в последнее

время, основное внимание уделяют наиболее эффективным методам. Разумеется, в рамках сравнительно небольшой по объему книги невозможно подробно рассмотреть каждый процесс, каждый метод, для этого существует специальная литература, оригинальные источники, что нашло отражение в обширной библиографии, сопровождающей каждую из трех глав. Читатель, заинтересовавшийся тем или иным вопросом, может без труда найти ссылку на нужную работу. Библиография содержит около 1300 работ. Следует особо подчеркнуть, что в книге нашли отражение самые последние достижения биоорганической химии. Это относится, например, к разделу «Ферментативный синтез пептидов», в котором рассматривается новый, интенсивно развивающийся синтетический подход, основанный на использовании обратимости ферментативной реакции.

Удачно собранный материал умело подан читателю: он служит не только богатым источником информации, но и приглашает к творческому осмыслению излагаемых интересных сведений. Это особенно важно для молодых, начинающих исследователей.

Книга несомненно будет полезной исследователям, работающим в области биоорганической химии, студентам и аспирантам, стремящимся глубже проникнуть в проблемы этой интересной науки, а также специалистам смежных областей науки.

*Ю. Митин*

## *Предисловие к третьему изданию*

После выхода первого издания прошло десять лет. Развитие пептидной химии в эти годы привело к необходимости значительной переработки книги. Авторы, стараясь сохранить первоначальный подход с акцентированием внимания на пептиды, вынуждены были, однако, дополнить книгу новым материалом. Объем книги был увеличен благодаря включению новых иллюстраций и схем реакций и введению новых оригинальных литературных данных во всех трех главах.

В главе «Аминокислоты» изменения коснулись главным образом разделов, посвященных синтезу и анализу, причем особое внимание удалено биотехнологическим способам получения аминокислот, асимметрическому синтезу и новейшим методам выделения. В главе «Пептиды» более точно изложены и обоснованы цели химического синтеза и введен краткий исторический очерк развития этой области. Защитные группы представлены в таком порядке, как это обычно принято в литературе. При описании методов синтеза пептидов, которых в настоящее время известно около 130, авторы ограничивались наиболее широко применяемыми в практике пептидного синтеза. Кроме того, затронуты новые интересные направления пептидного синтеза, как, например, ферментативный. В разделе «Пептидные синтезы на полимерных носителях» рассмотрены важнейшие варианты этих синтезов. Семисинтез белков описывается во вновь введенном разделе «Стратегия и тактика». В этом же разделе авторы попытались критически оценить синтез пептидных и белковоподобных соединений и определить его возможности и границы применения.

При обсуждении важнейших биологически активных пептидных гормонов и токсинов рассмотрены также гормоны и токсины белкового характера. Отмечено возросшее количество работ, посвященных гормонам гипоталамуса и других нейропептидов, например эндорфина. Затронуты также и некоторые иммунологически интересные пептиды. Предлагаемая классификация пептидных антибиотиков основана на принципе главного действия.

В главе «Белки» наряду с подробным изложением физико-химических свойств, методов анализа и разделения цитируются также новые работы по определению первичной структуры и конформации белков. После этого следует описание некоторых важных представителей белков, причем за основу классификации их выбрана биологическая функция.

Мы благодарны коллегам в нашей стране и за рубежом, которые своими конструктивными указаниями помогли подготовке настоящего издания. В особенности мы признательны профессору Р.Б. Меррифилду, профессору Р. Вальтеру, профессору К. Брунфельдту и доктору М. Фойреру.

Мы благодарны издательству «Academie» за внимание к нашим пожеланиям и за плодотворную совместную работу.

Лейпциг и Галле  
Ноябрь 1980 г.

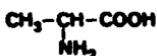
*X.-Д. Якубке  
Х. Ешкайт*

# 1. Аминокислоты

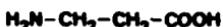
Аминокислоты существуют на нашей планете более трех миллиардов лет. Это доказано исследованием ископаемых микроорганизмов углеродсодержащих кремниевых остатков из докембрийского геологического периода с помощью рубидиево-цезиевого метода датирования. Существуют они и вне Земли, что показано хроматографическим анализом органических частей метеоритов. В водных экстрактах лунных пород найдены следы глицина и аланина.

Аминокислоты — это органические соединения, физико-химическое поведение и разнообразные реакции которых объясняются одновременным присутствием в молекуле основной аминогруппы  $\text{NH}_2$  — и кислой карбоксильной группы — $\text{COOH}$ .

Различают  $\alpha$ -аминокислоты, у которых амино- и карбоксильная группы соединены с одним и тем же атомом углерода, и  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -аминокислоты, функциональные группы которых разделены несколькими атомами углерода:



$\alpha$ -аминопропионовая кислота



$\beta$ -аминопропионовая кислота

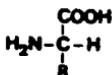


$\gamma$ -аминомасляная кислота



$\epsilon$ -аминокапроновая кислота

В природе встречаются главным образом  $\alpha$ -аминокислоты. Они имеют общую формулу



и различаются только по остаткам R боковой цепи. Все эти соединения содержат по крайней мере один центр хиральности (за исключением глицина, у которого R = H). Вследствие этого следует различать оптически активные энантиомеры и оптически неактивные (рацемические) формы  $\alpha$ -аминокислот. Встречающиеся в природе  $\alpha$ -аминокислоты имеют L-конфигурацию. Лишь некоторые продукты метаболизма низших организмов содержат D-аминокислоты.

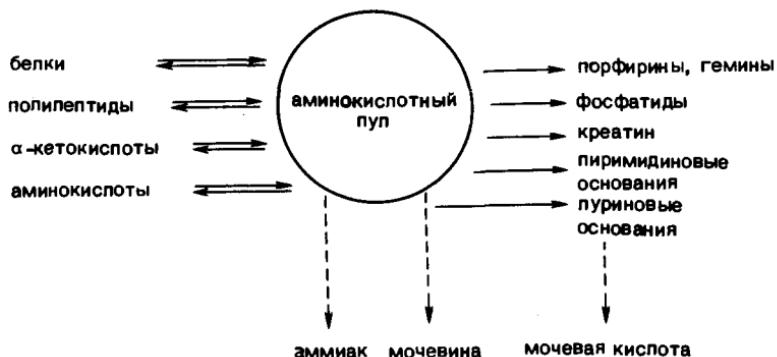


Рис. 1-1. Схематическое представление превращений аминокислот.

Аминокислоты как основные составные части белков участвуют во всех жизненных процессах наряду с нуклеиновыми кислотами, углеводами и липидами. Кроме аминокислот, входящих в состав белков, живые организмы обладают постоянным резервом «свободных» аминокислот, содержащихся в тканях и в клеточном соке. Они находятся в динамическом равновесии при многочисленных обменных реакциях. Аминокислоты используются в биосинтезе полипептидов и белков, а также в синтезе фосфатидов, порфиринов и нуклеотидов.

Свободные аминокислоты нужны в живом организме и для выполнения специфических задач. Так, глутаминовая кислота выполняет особую функцию переноса при переаминировании, метионин — при переметилировании. Главными продуктами разложения аминокислот являются аммиак, мочевина и мочевая кислота. Восполнение потерь аминокислот происходит в основном в результате расщепления белков, а также переаминирования  $\alpha$ -кетокислот и взаимных превращений аминокислот.

Далее, после обсуждения номенклатуры дается краткий обзор важнейших аминокислот, встречающихся в природе. Затем рассматриваются стереохимия, химические реакции, а также синтез и анализ аминокислот.

### 1.1. Номенклатура аминокислот

Названия аминокислот произошли в основном от исходных материалов, из которых они были впервые выделены; например, аспаргин (от лат. *asparagus* — спаржа) получен из сока спаржи, цистein и цистин (от греч. *cystis* — мочевой пузырь) — из камней мочевого пузыря, глутамин и глутаминовая кислота (от нем. *das Gluten* — клейковина) — из клейковины пшеницы, серин (от греч. *seros* — шелковичный червь) — из шелка и тирозин (от греч. *tytos* — сыр) — из сыра. Другие названия связаны с методами выделения. Так, аргинин (от лат. *argentum* — серебро) был впервые получен в виде серебряной соли, триптофан выделен при расщеплении белка с по-

мощью трипсина. Структурные связи с другими природными соединениями также внесли вклад в названия некоторых аминокислот. Так, валин назван как производное валериановой кислоты, треонин структурно связан с моносахаридом треозой. Название «пролин» происходит от рационального обозначения пирролидин-2-карбоновой кислоты.

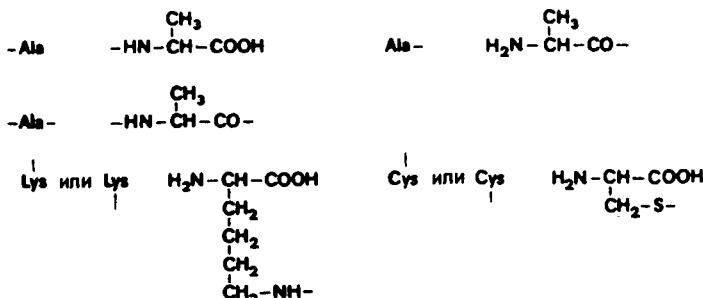
За исключением триптофана и аминодикарбоновых кислот, названия аминокислот имеют окончания -ин, что подчеркивает их принадлежность к аминам. Аминоацильные остатки общей формулы  $\text{NH}_2\text{-CHR-CO-}$  называют, добавляя к корню слова окончание -ил. Поскольку у аспарагиновой и глутаминовой кислот и их полуамидов одинаковые корневые слова, остатки глутамина и аспарагина называют обычно «глутаминил» и «аспарагинил», остатки же глутаминовой и аспарагиновой кислот получили названия «глутамил» и «аспарагил».

Для удобства написания пептидных фрагментов предложено пользоваться сокращенными названиями аминокислотных остатков, которые состоят из первых трех букв тривиального названия аминокислоты, например Ala для L-аланина и Met для L-метионина (сокращения для других аминокислот см. в табл. 1-1). Оптическая конфигурация аминокислоты указывается символами, причем специально отмечаются только D- и DL-аминокислоты, например D-Ala и DL-Met. Алло-Соединения обозначаются символом «а», например alle для алло-L-изолейцина.

У гидроксиаминокислот после первых двух букв Ну от латинского слова hydro следует первая буква названия аминокислоты, например для гидроксилизина — Hyl или для гидроксипролина — Nur. Однако более удобен пятибуквенный символ: Hylys и Nурго соответственно. Для аминокислот небелкового происхождения также введены сокращения. Для нораминокислот, которые имеют нормальную углеродную цепь, для различия с разветвленными изосоединениями перед символом ставят букву N, например для норлейцина Nle, для норвалина Nva. В случае высших неразветвленных аминокислот в начале символа ставят букву A, обозначающую функциональную аминогруппу, например для  $\alpha$ -аминомасляной кислоты Abu и для  $\alpha$ -аминоадипиновой кислоты Aad. В том случае, если молекула имеет две аминогруппы, символ начинается с буквы D, например для  $\alpha$ ,  $\gamma$ -диаминомасляной кислоты Dbu.  $\alpha$ - и  $\omega$ - положения аминогрупп специально не обозначают, во всех других случаях положение аминогруппы обозначается буквами греческого алфавита, например для  $\beta$ -аланина  $\beta$ -Ala. В случае N-алкиламинокислот, часто встречающихся в депептидах, сокращенное название алкила Me или Et пишут перед символом аминокислоты, например для N-метилвалина MeVal и для N-этилглицина EtGly.

**Обозначение аминокислотных остатков и производных аминокислот.** Принято обозначать замещения атома водорода в амино-, имино-, гуанидино-, окси- или тиольной группе, а также замещения -OH в карбоксильной группе с помощью свободной связи (черточки): в случае замещения водорода  $\alpha$ -аминогруппы ее ставят слева от символа аминокислоты, в случае замещения в гидроксильной группе  $\alpha$ -карбоксила — справа, если же замещение имеется в боковой цепи, то проставляется свободная связь сверху или снизу:

## Номенклатура аминокислот



Для производных аминокислот в соответствующих местах через связи записываются символы заместителей:

N-трифторацетилглицин	$\text{CF}_3-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{COOH}$	Tfa-Gly
этиловый эфир глицина	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOC}_2\text{H}_5$	Gly-OEt
N- $\alpha$ -ацетиллизин	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_2-\text{NH}_2 \end{array}$	Ac-Lys
N- $\epsilon$ -ацетиллизин	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3 \end{array}$	Lys Ac или Ac Lys или Lys (Ac)
$\alpha$ -бензил- $\beta$ -трет-бутиловый эфир N-бензил-оксикарбониласпаргиновой кислоты	$\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2\text{O}-\text{CO} \\   \\ \text{NH} \\   \\ \text{CH} \\   \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{COOCH}_2\text{C}_6\text{H}_5 \\   \\ \text{COOC}(\text{CH}_3)_3 \end{array}$	Z-Asp(OBu <sup>t</sup> )-OBzI Z-Asp(OBzI) <sup>t</sup> Z-Asp(OBu <sup>t</sup> )OBzI
S-бензипротеин	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH}$ $\text{NH}_2$	Cys BzI или Cys (BzI)
изоаспаргин	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CONH}_2$ $\text{NH}_2$	Asp-NH <sub>2</sub>
N-этан-N-метилглицин	$\begin{array}{c} \text{C}_2\text{H}_5 \\   \\ \text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	EtMe-Gly

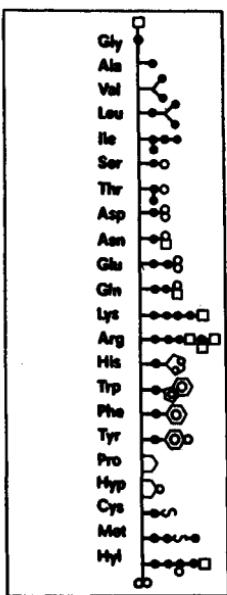


Рис. 1-2. Структурные символы аминокислот по Веллинеру и Мейстеру.

Принятая система сокращений помогает наглядно изображать схемы пептидных синтезов.

Рассмотренные сокращения (и сокращения, которые будут употребляться в дальнейшем) соответствуют правилам, принятым Международным союзом по чистой и прикладной химии (IUPAC) и Международным союзом по биохимии (IUB). Кроме того, введены также одно буквенные символы, которые применяются для изображения структур белков и длинных пептидных последовательностей, а также для расчетов с помощью ЭВМ.

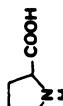
Первым системой сокращений для аминокислот и пептидов была опубликована Брандом и Эдсалом в 1947 г. Система графического изображения аминокислот, предложенная Веллинером и Мейстером, учитывает структурные особенности аминокислотных цепей (рис. 1-2).

## 1.2. Природные аминокислоты

В настоящее время известно около 180 различных природных аминокислот. Особенно много аминокислот выделено за последние годы после того, как благодаря развитию методов очистки и успехам аминокислотного анализа были предприняты систематические исследования животного и растительного материала.

*Таблица 1-1. 20 аминокислот белкового происхождения*

Тип амино-кислоты	Тривиальные названия аминокислот	Сокращение согласно IUPAC—IUB <sup>a</sup>	Структурная формула	Открыватель и исходный материал, из которого выделена (год)	Материалы с наиболее высоким содержанием аминокислоты и содержание, %
Алифатические, нефт-рольные аминокислоты	Глицин название аминокислот	Gly G	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$	Брагонно, шелк (1820)	Фибронн шелка 43,6 Желатин 25,7
	Аланин	Ala A	$\text{CH}_3-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	Вейль, фибронн шелка (1888)	
	Валин	Val V	$\begin{matrix} \text{H}_3\text{C} \\   \\ \text{CH}-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH} \end{matrix}$	Горул-Безане, экстракт желез (1836)	Эластин 17,4 Сухожилия быка 17,6 Аорта быка
	Лейцин	Leu L	$\begin{matrix} \text{H}_3\text{C} \\   \\ \text{CH}-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH} \end{matrix}$	Пруст, творог (1819)	Сывороточный альбумин быка 12,8 Кукуруза 19,0 Пепсиноген свинины
Алифатические гидроксамино-кислоты	Изолей-цин	Ile I	$\begin{matrix} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH} \\   \\ \text{H}_3\text{C} \end{matrix}$	Эрлик, патока (1904)	Сывороточный альбумин быка 2,6 Белок риса 4,3
	Серин	Ser S	$\text{HO}-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	Крамер, шелковый клей (1865)	Фибронн шелка 16,2 Трипсиноген 16,7 Пепсин 12,2

Треонин	Thr T	$\text{H}_3\text{C}-\text{CH(OH)-CH(NH}_2\text{)-COOH}$	Роз и др., фибрин (1935)	Кератин волоса человека Авидин (яичный белок)	8,5
Аминокис- лоты, со- держащие серу	Цистеин	Cys C	$\text{HSCH}_2\text{C}-\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	Бауман, цистин (вос- становлен- ем) (1884)	Кератин волос Кератин перьев Кератин шерсти
	Метионин	Met M	$\text{H}_3\text{C-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$	Мюллер, казеин (1921)	$\gamma$ -Казеин Овальбумин $\beta$ -Лактоглобулин
Иmino- кислоты	Пролин	Pro P		Фишер, казеин (1901)	Сальмин Казеин Желатин
Основные аминокис- лоты	Лизин	Lys K	$\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$	Дрехслев, казеин (1899)	Миоглобин лопиди Сывороточный альбумин быка $\beta$ -Лактоглобулин
Аргинин	Arg R		$\text{HN-NH-C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$	Шульце и др., про- ростки люпина (1886)	Сальмин Желатин Гистон (печени крысы)
Гистидин	His H		$\text{HOOC-C}_6\text{H}_4\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$	Коссель, стурн (1896)	Гемоглобин
Кислые аминокисло- ты и полу- амиды	Аспараги- новая кис- лота	Asp D		Ритхай- зен, бобовые (1868)	Эдестин Глобулин ячменя
					12,0 10,3

Продолжение табл. I-1

Тип аминокислоты	Тривиальные названия аминокислот	Сокращение согласно IUPAC—IUBa	Структурная формула	Открыватель и источник	Материалы с наиболее высоким содержанием аминокислот и содержание, %
Аспарагин	Asn N или Asp(NH <sub>2</sub> )		H <sub>2</sub> N—CO—CH <sub>2</sub> —CH(NH <sub>2</sub> )—COOH	Вокелин и Робике, спирожа (1806)	
Глутаминовая кислота	Glu E		HOOC—CH <sub>2</sub> —CH <sub>2</sub> —CH(NH <sub>2</sub> )—COOH	Риттхайзен, бобовы (1866)	Глиадин пшеницы 39,2 Глиадин ржи 37,7 Кукуруза 22,9
Глутамин	Gln Q или Glu(NH <sub>2</sub> )		H <sub>2</sub> N—OC—CH <sub>2</sub> —CH <sub>2</sub> —CH(NH <sub>2</sub> )—COOH	Шульце, сахарная свекла (1877)	
Ароматические и гетероароматические аминокислоты	Фенилаланин	Phe F		Шульце и Барбера, ячмень (1877)	Сывороточный альбумин 7,8 γ-Глобулин 4,6 Овальбумин 7,7
	Тирозин	Tyr Y		Либих, сыр (1846)	Фибронин шелка 12,8 Папанин 14,7
	Триптофан	Trp W		Голкинс и Кол, казеин (1901)	Лизоцим (яйца) 10,6 α-Лактальбумин 7,0

\* Однобуквенные символы применяются только при написании аминокислотных последовательностей.

Первой выделенной природной аминокислотой был аспарагин. Он был изолирован в 1806 г. Вокелином и Робике из сока спаржи. Эта аминокислота относится к 20 аминокислотам, являющимся основными составными частями животных и растительных белков, причем их встраивание в молекулу белка регулируется информацией генетического кода. Этим так называемым «протеиногенным» аминокислотам посвящен следующий раздел.

### 1.2.1. Протеиногенные аминокислоты

Аминокислоты, участвующие в образовании белков, можно классифицировать по разным признакам. По положению изоэлектрической точки различают кислые, основные и нейтральные аминокислоты, по строению боковой цепи R — алифатические, ароматические и гетероциклические. Гидроксиаминокислоты содержат дополнительно OH-группы, серусодержащие аминокислоты имеют в боковой цепи тиольные или тиозифирные группы. Самостоятельную группу образуют иминокислоты пролин и гидроксипролин, у которых вторичная аминогруппа -NH- входит в состав пирролидинового кольца.

По полярности боковой цепи R различают полярные и неполярные аминокислоты. К неполярным аминокислотам относятся глицин и аланин, а также гидрофобные аминокислоты — валин, лейцин, изолейцин, пролин, метионин и фенилаланин. К полярным аминокислотам причисляют серин, треонин, цистеин, аспарагин, глутамин и триптофан (нейтральные соединения), аспарагиновую и глутаминовую кислоты и тирозин (кислые гидрофильные аминокислоты), а также лизин, аргинин и гистидин (основные гидрофильные аминокислоты). Гидрофильные полярные соединения увеличивают растворимость пептидов и белков в водных системах, в то время как нейтрально-полярные аминокислоты ответственны за каталитическую активность ферментов. В противоположность неполярным гидрофобным аминокислотам полярные аминокислоты обычно находятся на поверхности молекулы белка.

По строению соединений, получающихся при расщеплении углеродной цепи протеиногенных аминокислот, различают глюкопластичные (глюконогенные) и кетопластичные (кетогенные) аминокислоты. Глюкопластичные аминокислоты — глицин, аланин, серин, треонин, валин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, аргинин, гистидин, метионин и пролин. При недостатке углеводов в организме они через щевелевоуксусную кислоту и фосфоэнолпиривиноградную кислоту превращаются в глюкозу (глюконеогенез) или гликоген. Единственной кетопластичной аминокислотой является лейцин. Изолейцин, тирозин и фенилаланин могут быть и глюко-, и кетопластичными.

Кроме того, биохимики различают заменимые и незаменимые аминокислоты, смотря по тому, могут ли они образоваться в организме или должны быть доставлены с пищей.

*Незаменимые аминокислоты* [13 — 16]. Растения и некоторые микроорганизмы могут производить все аминокислоты, нужные им для синтеза клеточных белков. Животные организмы способны синтезировать только 10 протеиногенных аминокислот. Остальные 10 не могут быть получены с помощью биосинтеза и должны постоянно поступать в организм в виде пищевых белков. Отсутствие их в организме ведет к угрожающим жизни явлениям (задержка роста, отрицательный азотный баланс, расстройство биосинтеза белков и т. д.). Розе и сотр. [17] предложили для этих аминокислот название «незаменимые аминокислоты» (НАК). В табл. 1-2 приведены незаменимые для организма человека аминокислоты и минимальная суточная потребность в них.

Таблица 1-2. Минимальная суточная потребность организма человека в незаменимых аминокислотах (НАК)

Аминокислота	Потребность индивидуума, г	Аминокислота	Потребность массы тела [18], мг/кг
Arg	1,8	Arg	
His	0,9	His }	Взрослый организм не нуждается
Ile	0,7	Ile	10
Leu	1,1	Leu	14
Lys	0,8	Lys	12
Met	1,1	Met (Cys)	13
Phe	1,1	Phe (Тир)	14
Thr	0,5	Thr	7
Trp	0,25	Trp	3,5
Val	0,80	Val	10

Некоторые незаменимые аминокислоты, как, например, метионин, могут вводиться в организм животного в форме D- или L-соединений, но скорость их усвоения значительно ниже по сравнению с аминокислотами L-ряда. Сначала происходит окислительное дезаминирование с помощью специфической D-аминокислотной оксидазы. Затем полученная  $\alpha$ -кетокислота стереоспецифически переаминируется в L-аминокислоту. Вообще говоря, НАК можно заменить промежуточными продуктами их биосинтеза, например соответствующими кетокислотами.

Потребность в НАК, определяемая по методу азотного баланса, различна для разных видов животных и в большой степени зависит от физиологического состояния организма. Так, например, необходимые молодым млекопитающим во время роста незаменимые аминокислоты аргинин и гистидин для поддержания обмена веществ взрослой особи не нужны. Обе эти аминокислоты наряду с другими входят в состав активных центров многих ферментов. Они служат для узнавания и связывания отрицательно заряженных субстратов и кофакторов [19]. Недостаток аргинина может быть причиной импотенции мужской особи.

Во время беременности повышается потребность женского организма в триптофане и лизине, у грудных детей — в триптофане и изолейцине. Особенно увеличивается потребность организма в незаменимых аминокислотах после больших потерь крови, ожогов, а также во время других процессов, сопровождаемых регенерацией тканей.

Для птиц незаменимой аминокислотой является глицин. У жвачных животных биосинтез всех НАК производится микроорганизмами кишечного тракта, при этом необходимы в достаточном количестве соединения азота (аммонийные соли, мочевина). Для человека обеспечение организма НАК — важнейшая задача питания. Высокую «биологическую ценность» имеют лишь немногие животные белки, такие, как белок куриного яйца или белок материального молока. Они содержат НАК не только в достаточном количестве, но и в необходимом для человека соотношении. Низкая ценность многочисленных растительных белков связана с небольшим содержанием в них отдельных незаменимых аминокислот (главным образом лизина и метионина). Важными компонентами смешанного корма являются рыбная и соевая мука. В белке соевой муки и в белке кормовых дрожжей мало метионина, в кукурузе — лизина и триптофана. Дефицит может компенсироваться добавлением недостающей аминокислоты или подходящей комбинацией других белков.

В табл. 1-3 приведено содержание НАК в некоторых важных природных белках. Бросается в глаза высокое содержание лизина в дрожжах, культивируемых на нефтепродуктах, бедных, однако, метионином.

В гидролизатах некоторых белков кроме протеиногенных аминокислот находятся и другие аминокислоты, появление которых обусловлено изменением боковых цепей после биосинтеза белка (разд. 3.6.2.1). Таковыми являются 4-гидроксипролин и 5-гидроксилизин коллагена, пиридиновые аминокислоты дезмозин и изодезмозин эластина, а также N-метилированный лизин некоторых мышечных белков.

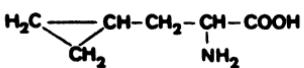
**Таблица 1-3. Содержание НАК в белках различного происхождения [20]**

Аминокислота	Содержание НАК, % (на сухую массу)						
	пшеничная мука	соевая мука	рыбная мука	говядина	коровье молоко	кормовые дрожжи	дрожжи из нефти
Leu	7,0	7,7	7,8	8,0	11,0	7,6	7,0
Ile	4,2	5,4	4,6	6,0	7,8	5,5	3,1
Val	4,1	5,0	5,2	5,5	7,1	6,0	8,4
Thr	2,7	4,0	4,2	5,0	4,7	5,4	9,1
Met	1,5	1,4	2,6	3,2	3,2	0,8	1,2
Lys	1,9	6,5	7,5	10,0	8,7	6,8	11,6
Arg	4,2	7,7	5,0	7,7	4,2	4,1	8,0
His	2,2	2,4	2,3	3,3	2,6	1,7	8,1
Phe	5,5	5,1	4,0	5,0	5,5	3,9	7,9
Trp	0,8	1,5	1,2	1,4	1,5	1,6	1,2
Cys	1,9	1,4	1,0	1,2	1,0-	1,0	0,1

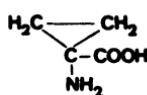
### 1.2.2. Непротеиногенные аминокислоты [21]

В растениях и микроорганизмах, в частности, встречаются аминокислоты, не принимающие участия в образовании белков. Они образуются во время повышенной потребности в азоте, например при образовании почек или прорастании семян, или же запасаются в виде растворимых веществ. Многие аминокислоты, образовавшиеся при обмене веществ низших организмов, имеют свойства антибиотиков. Они действуют как аминокислоты-антагонисты, т. е. являются конкурентными ингибиторами при обмене веществ, задерживая определенные ступени биосинтеза аминокислот или способствуя образованию ложных последовательностей при биосинтезе белков.

Между непротеиногенными и протеиногенными аминокислотами иногда существует близкое структурное родство. Так, аланину соответствуют свыше 30 производных, различающихся заместителями водородного атома метильной группы. Заместителем может быть аминогруппа, как, например, у  $\alpha$ ,  $\beta$ -диаминопропионовой кислоты  $H_2N\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$ , существующей в растениях семейства мимозовых; может образоваться циклопропановое кольцо, как у найденной в различных фруктах аминокислоты гипоглицина A (1) и 1-аминоциклогексанкарбоновой кислоты (2).

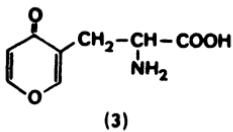


(1)

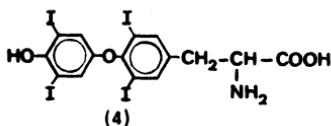


(2)

*Стизолобиновая кислота* (3) в проростках гороха содержит пироновое кольцо, гормон щитовидной железы *тироксин* (4) — иодзамещенную ароматическую боковую цепь:

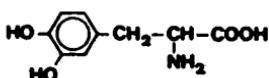


(3)

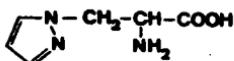


(4)

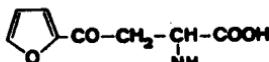
К производным аланина принадлежит изомерный  $\beta$ -аланин  $H_2N\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$  (основная составляющая кофермента А) и необходимый для образования меланина 3,4-дигидроксифенилаланин, или ДОФА (5). ДОФА существует в свободном состоянии в фасоли. Этой аминокислоте приписывают побочное действие усиливать половое возбуждение, которое бывает после употребления фасоли. Большое значение имеет ДОФА при лечении болезни Паркинсона. Из других производных аланина отметим  $\beta$ -пиразолил-аланин (6) и  $L$ -3-(2-фуруил)аланин (7) из гречихи и ракитника.



(5)

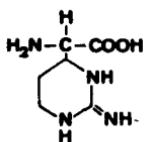


(6)

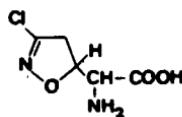


(7)

Производное глицина *саркозин*  $\text{CH}_3\text{-NH-CH}_2\text{-COOH}$  — промежуточное звено метаболизма аминокислот; входит в состав актиномицина.  $\alpha$ -*(2-Иминогексагидро-4-пиримидил)глицин* (8) является структурной единицей химостатина — тетрапептида микробного происхождения (эта группа тетрапептидов — ингибиторы протеаз химотрипсина и папаина). Изолированная из *Streptomyces sviceus*  $\alpha$ -амино-3-хлоро-2-изоксалин-5-уксусная кислота (9) — антибиотик с противоопухолевым действием.

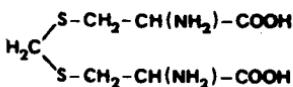


(8)

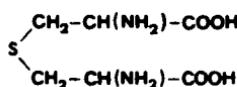


(9)

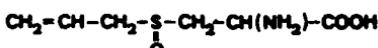
Представителями цистeinового ряда являются *дъенковая кислота* (10) из восточноазиатских бобов, содержащийся в волосах и шерсти *лантионин* (11), *аллицин* (12) лука, гомолог метионина *этционин*  $\text{H}_5\text{C}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$ , а также часто встречающийся в грибах *гомоцистein*  $\text{HS-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$ .



(10)



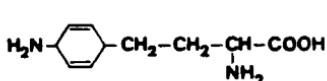
(11)



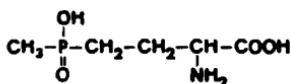
(12)

Из соединений, принадлежащих к ряду аминомасляной кислоты, интересны *гомосерин*  $\text{HOCH}_2\text{-CH}_2\text{-C}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$  из *Pisum sativum*, содержащийся в полимиксинах  $\text{l-}\alpha, \gamma$ -*диаминомасляная кислота*  $\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$ , а также антибиотик  $\text{l-2-амино-4-(4'-амино-$

-2',5'-циклогексадиенил)масляная кислота (13) и составная часть одного из пептидных антибиотиков *L*-2-амино-4-(метилфосфино)масляная кислота (14).

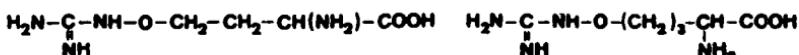


(13)



(14)

Как антагонисты аргинина действуют присутствующий в бобовых *канаванин* (15) и его гомолог бактериального происхождения *5-(O-изоуреидо)-L-норвалин* (16).

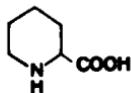


(15)

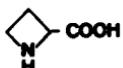
(16)

Канаванин как конкурентный ингибитор препятствует проникновению аргинина через клеточные мембрани и может встраиваться в белки вместо аргинина.

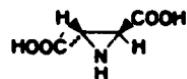
Представители ряда иминокислот — это распространенная в бобовых и микроорганизмах *пипеколиновая кислота* (17), а также встречающаяся в лилейных и агавах *азетидин-2-карбоновая кислота* (18).



(17)



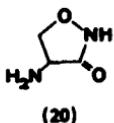
(18)



(19)

Антагонист пролина азетидин-2-карбоновая кислота, — токсин, входящий в состав эндемического ландыша. Действие этого токсина основано на том, что аппарат биосинтеза белка не может отличить пролин от азетидинкарбоновой кислоты. Сам же ландыш защищен от неконтролируемого встраивания этой кислоты в собственные белки благодаря наличию высокоспецифичной пролил-тРНК-сингтетазы.

К ряду иминокислот принадлежит также *L*-*транс*-2,3-дикарбоксизиридин (19) из культуры *Streptomyces*. Антибиотик *D*-циклосерин (20) действует как антагонист *D*-аланина и препятствует синтезу *D*-аланина, необходимого для построения стенок бактериальных клеток.



(20)

К ряду основных аминокислот относится *орнитин*  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$  (наличие его в белках спорно). Орнитин, как и *цитруллин*  $\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$ , — промежуточный продукт цикла мочевины; он широко распространен как свободная аминокислота, а также входит в состав различных антибиотиков. Как составная часть белка орнитин до сих пор был обнаружен только в гидролизатах некоторых морских водорослей.

Из ряда аминодикарбоновых кислот следует упомянуть *L*- $\alpha$ -аминоадипиновую кислоту  $\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$  (которая появляется в грибах на первой ступени биосинтеза лизина), а также *L*, *L*- $\alpha$ ,  $\epsilon$ -диамино-*пимелиновую кислоту*  $\text{HOOC}-\text{CH}(\text{NH}_2)-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$  (материал для клеточных стенок бактерий).

Аминотрикарбоновая  $\alpha$ ,  $\gamma$ -карбоксиглутаминовая кислота (Gla) была найдена в протромбине и в минерализованных белках тканей [22, 23].

### 1.3. Стереохимия аминокислот [24 — 26]

#### 1.3.1. Оптическая активность аминокислот

Все аминокислоты, за исключением глицина, оптически активны благодаря хиральному строению. Энантиомерные формы, или оптические антиподы, имеют различные показатели преломления (круговое двулучепреломление) и различные коэффициенты молярной экстинкции (круговой дихроизм) для лево и право циркулярно поляризованных компонент линейно-поляризованного света. Они поворачивают плоскость колебаний линейного поляризованного света на равные углы, но в противоположных направлениях. Вращение происходит так, что обе световые составляющие проходят оптически активную среду с различной скоростью и при этом сдвигаются по фазе.

По углу вращения  $\alpha$ , определенному на поляриметре, можно определить удельное вращение  $[\alpha]_D$ :

$$[\alpha]_D' = \frac{100\alpha}{lc}$$

где  $c$  — концентрация (г/100 мл) раствора;  $l$  — толщина слоя, т. е. длина трубы поляриметра (в дм). При этом обычно указывают температуру измерения  $t$ , растворитель и длину волны поляризованного света (обычно работают с монохроматическим светом с длиной волны натриевой линии  $\lambda = 589,3$  нм).

Используют также молекулярное вращение, т. е.  $[\alpha]$  относят к 1 молю:

$$[M]_D' = \frac{M}{100} [\alpha]_D'$$

В табл. 1-4 приведены значения удельного вращения и молекулярного вращения протеиногенных аминокислот в различных растворителях. Следует заметить, что зависимость оптического вращения от концентрации

Таблица 1-4. Молекулярное вращение  $[M]_D^{25}$   
и удельное вращение  $[\alpha]_D^{25}$  протеиногенных аминокислот

Амино- кислота	Молекуляр- ная масса <i>M</i>	$[M]_D^{25}$ ( $[\alpha]_D^{25}$ ) в различных средах			Кон- центра- ция <i>c</i>
		вода	5 н. HCl	уксусная кислота	
Ala	89,10	+ 1,6(1,8)	+ 13,0(14,6)	+ 29,4(33,0)	2
Val	117,15	+ 6,6(5,63)	+ 33,1(28,3)	+ 72,6(62,0)	1—2
Leu	131,18	- 14,4(11,0)	+ 21,0(16,0)	+ 29,5(22,5)	2
Ile	131,18	+ 16,3(12,4)	+ 51,8(39,5)	+ 64,2(48,9)	1
alle	131,18	+ 20,8(15,9)	+ 51,9(39,6)	+ 55,7(42,5)	1
Ser	105,10	- 7,9(7,5)	+ 15,9 <sup>a</sup> (15,1)		2
Thr	119,12	- 33,9(28,5)	- 17,9(15,0)	- 35,7(30,0)	1—2
aThr	119,12	+ 11,9(10,0)	+ 37,8(31,7)	+ 45,3 <sup>b</sup> (38,0)	1—2
Cystin	240,31	- 509,2 <sup>a</sup> (211,9)	- 557,4(231,9)		1
Cys	121,16	- 20,0(16,5)	+ 7,9(6,5)	+ 15,7(13,0)	2
Met	149,22	- 14,9(9,8)	+ 34,6(23,3)	+ 29,8(20,0)	1—2
Pro	115,14	- 99,2(86,2)	- 69,5(60,4)	- 92,1(80,0)	1—2
Hyp	131,14	- 99,6(76,0)	- 66,2(50,5)	- 100,9 <sup>a</sup> (77,0)	2
aHyp	131,14	- 78,0(59,4)	- 24,7(18,8)	- 39,3(30,0)	2
Lys	146,19	+ 19,7(13,5)	+ 37,9(25,9)		2
Arg	174,21	+ 21,8(12,5)	+ 48,1(27,6)	+ 51,3(29,4)	2
His	155,16	- 59,8(38,5)	+ 18,3(11,8)	+ 11,6(7,5)	2
Asp	133,11	+ 6,7(5,0)	+ 33,8(25,4)		2
Asn	132,12	- 7,4(5,6)	- 7,4(5,6)	+ 37,8 <sup>a</sup> (28,6)	2
Glu	147,14	+ 17,7(12,6)	+ 46,8(31,8)		2
Gln	146,15	+ 9,2(6,3)	+ 46,5 <sup>a</sup> (31,8)		2
Phe	165,20	- 57,0(34,5)	- 7,4(4,5)	- 12,4(7,5)	1—2
Тир	181,20		- 18,1(10,0)		2
Trp	204,23	- 68,8(33,7)	- 5,7(2,8)	- 69,4(34,0)	1—2

<sup>a</sup> В 1 н. HCl.

<sup>b</sup> *c* = 0,25.

имеет значение только в первом приближении. В области *c* = 1 + 2 соответствующие значения почти не зависят от изменения концентрации.

Если при измерении молекулярного вращения оптически активного соединения используют линейно-поляризованный свет с непрерывно меняющейся длиной волны, то получают характерный спектр. В том случае, если значения молекулярного вращения возрастают с уменьшением длины волны, говорят о положительном *эффекте Коттона*, в противоположном случае — об отрицательном. Особенно существенные эффекты наблюдаются при длине волны, соответствующей максимумам полос поглощения соответствующих энантиомеров: происходит изменение знака вращения. Это явление, известное как дисперсия оптического вращения (ДОВ), наряду с

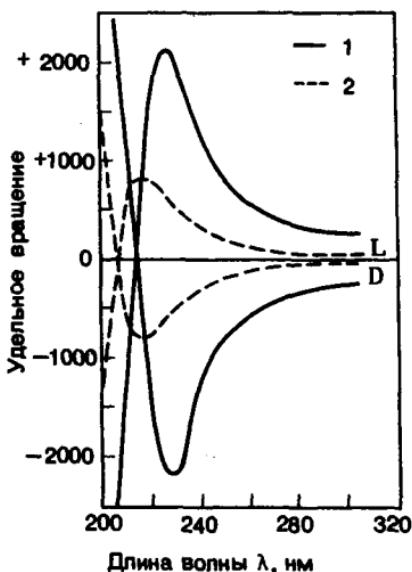


Рис. 1-3. Кривые ДОВ для D- и L-аланинов. 1 — гидрохлорид, 2 — нейтральный раствор аминокислоты.

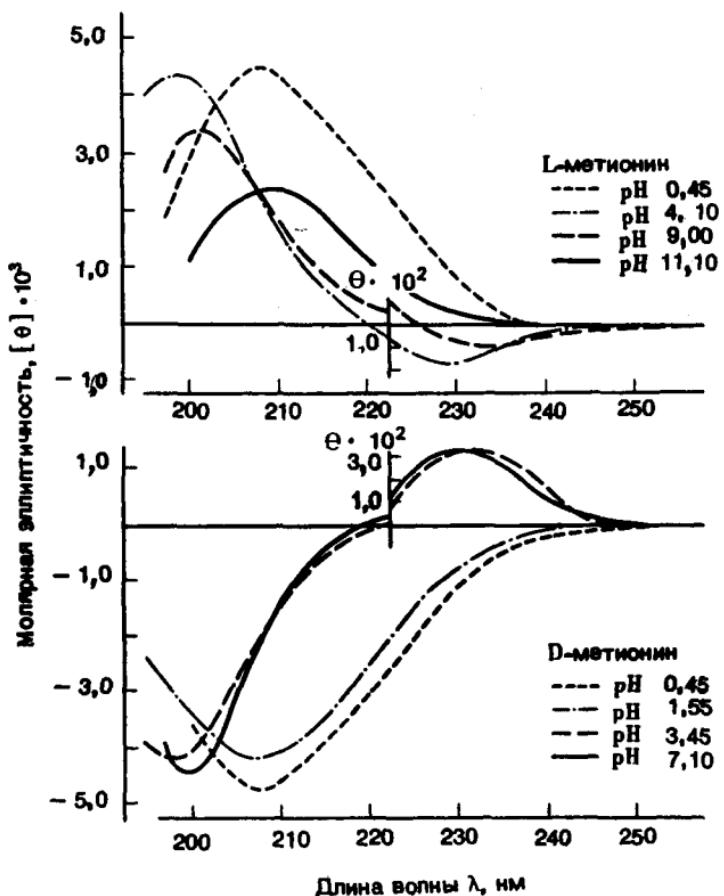


Рис. 1-4. Спектры КД D- и L-метионина.

круговым диахроизмом (КД) используется при структурных исследованиях оптически активных соединений.

На рис. 1-3 представлены кривые ДОВ L- и D-аланина, а на рис. 1-4 — спектры КД D- и L-метионина. Положение и величина вращения карбонильных полос в области 200 — 210 нм сильно зависят от pH. Для всех аминокислот принято, что при L-конфигурации проявляется положительный, при D-конфигурации отрицательный эффект Коттона.

### 1.3.2. Конфигурация и конформация аминокислот

Конфигурацию протеиногенных аминокислот соотносят с D-глюкозой; такой подход предложен Э. Фишером в 1891 г. В пространственных формулках Фишера заместители у хирального C-2 атома занимают положение, которое соответствует их абсолютной конфигурации (это было доказано через 60 лет).

На рис. 1-5 приведены пространственные формулы D- и L-аланина.

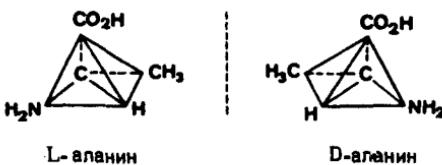
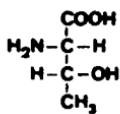


Рис. 1-5. Пространственные формулы D- и L-аланина.

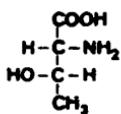
В двумерном изображении для D- и L-изомеров принят определенный порядок расположения заместителей. У D-аминокислоты наверху изображают карбоксильную группу, далее следуют по часовой стрелке аминогруппа, боковая цепь и атом водорода (см. ниже). У L-аминокислоты принят обратный порядок расположения заместителей, причем боковая цепь всегда стоит внизу.

В случае абсолютной конфигурации по Кану, Ингольду и Прелогу заместители хирального C-атома располагаются в убывающем порядке и D-аминокислотам соответствует обозначение (R)-, а L-аминокислотам — (S)-. Хотя эта система универсальна, она до сих пор не получила признания в номенклатуре аминокислот.

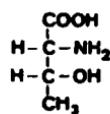
Аминокислоты треонин, изолейцин и гидроксипролин имеют два центра хиральности.



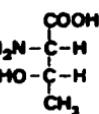
L-треонин



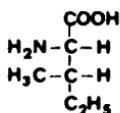
D-треонин



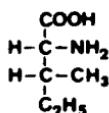
D-алло-треонин



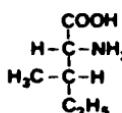
L-алло-треонин



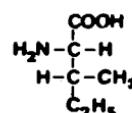
L-изолейцин



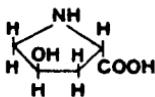
D-изолейцин



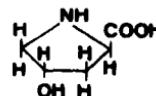
D-алло-изолейцин



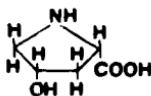
L-алло-изолейцин



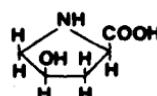
4-гидрокси-L-пролин  
(транс-4-гидрокси-L-пролин)



4-гидрокси-D-пролин  
(транс-4-гидрокси-D-пролин)



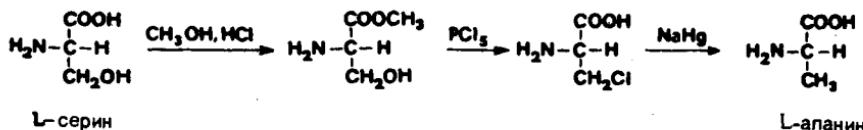
алло-4-гидрокси-L-пролин  
(цис-4-гидрокси-L-пролин)



алло-4-гидрокси-D-пролин  
(цис-4-гидрокси-D-пролин)

У цистина  $\text{HOOC}-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$  оба центра хиральности идентичны, так что кроме D-, L- и DL-форм появляется неактивный мезо-цистин.

При первых стереохимических исследованиях ограничивались указанием, что соединения, выделенные из белка, относятся к одному и тому же стерическому ряду. Основными критериями стерической корреляции служили одинаковое поведение при взаимодействии со стереоспецифическими ферментами, одинаковый положительный сдвиг оптического вращения при возрастающей концентрации кислоты [27], а также взаимные превращения отдельных аминокислот, происходящие с сохранением центра хиральности. Первым превращением такого рода был перевод L-серина в L-аланин, осуществленный Фишером:



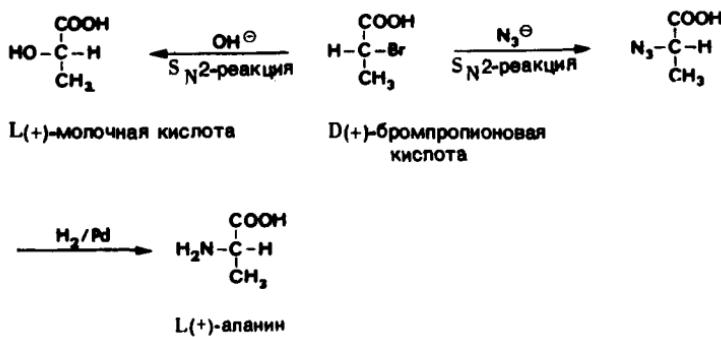
В 1933 г. Кун и Фрейденберг наблюдали однотипный сдвиг молекулярного вращения для производных аланина и молочной кислоты. Как видно из данных табл. 1-5, у производных L(+)-молочной кислоты и (+)-аланина происходит аналогичный переход  $[M]_D$  из положительной области в отри-

Таблица 1-5. Молекулярное вращение  $[M]_D$  различных производных аланина и молочной кислоты

		$M_D$		
Заместители		производное (+)-аланина	производное L-молочной кислоты	производное D-молочной кислоты
$R^1$	$R^2$	$\begin{matrix} \text{CO}^2 \\   \\ R^1-\text{O}-\text{C}-\text{H} \\   \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$	$\begin{matrix} \text{CO}^2 \\   \\ R^1-\text{NH}-\text{C}-\text{H} \\   \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$	$\begin{matrix} \text{CO}^2 \\   \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH}^1 \\   \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$
$\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}-$	-NH <sub>2</sub>	+70	+120	-120
$\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}-$	-OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	+12	+49	-49
$\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}-$	-OCH <sub>3</sub>	0	+35	-35
CH <sub>3</sub> CO-	-OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-74	-76	+76

цательную, так что природный (+)-аланин можно отнести к L-ряду. Таким образом была установлена относительная конфигурация протеиногенных аминокислот.

После установления абсолютной конфигурации молочной кислоты на основании расчета дисперсии вращения (Кун, 1935 г.) и винной кислоты с помощью рентгеноструктурного анализа (Бийвэ, 1951 г.) нужно было установить однозначные стерические связи природных аминокислот с этими гидроксикислотами. Это удалось Ингольду и др. в 1951 г.; они осуществили перевод D(+)-бромпропионовой кислоты в L(+)-молочную кислоту и в L(+)-аланин. Эти превращения протекают по S<sub>N</sub>2-механизму, и, как показано кинетическими исследованиями, обусловливают обращение конфигурации у асимметрического атома углерода. Таким образом была однозначно установлена абсолютная конфигурация аминокислот.



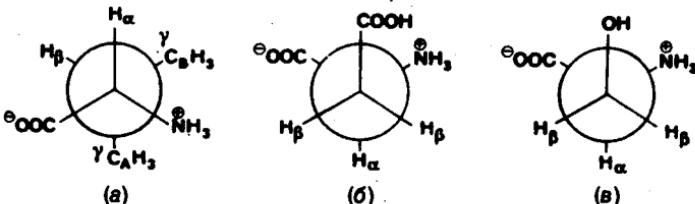
В настоящее время определение абсолютной конфигурации аминокислот проводят как с помощью рентгеноструктурного анализа и ферментативных методов, так и с помощью исследования спектров КД и ДОВ [28]. Оптически активный  $h \rightarrow \pi^*$ -переход карбоксильной группы ( $\lambda = 210$  нм) положителен для L-аминокислот и отрицателен для D-аминокислот [29, 30]. Для таких исследований часто применяются производные аминокислот. N-Алкилиотиокарбонильные и дансильные производные L-аминокислот обнаруживают положительный эффект Коттона, гидантоины — отрицательный.

Пирролинон [31], получающийся при реакции 2-метокси-2-дифенил-3(2H)-фуранона (МДФФ) с аминокислотами, имеет характеристический мультиплет в спектре КД. Отнесение конфигурации в таких случаях производят по максимуму абсорбции в длинноволновой области (~380 — 430 нм), положение которого не зависит от природы заместителей у хирального C-атома.

Для некоторых аминокислот наблюдается связь между их конфигурацией и вкусом, например L-Trp, L-Phe, L-Tyr и L-Leu имеют горький вкус, а их D-энантиомеры сладкие. Сладкий вкус глицина (от греч. glykys — сладкий) известен давно. Мононатриевая соль глутаминовой кислоты — глутамат натрия — один из важнейших носителей вкусовых качеств, применяемых в пищевой промышленности. Интересно отметить также, что производное дипептида из аспарагиновой кислоты и фенилаланина обнаруживает интенсивно сладкий вкус. Взаимосвязи строения и вкуса рассматриваются в работах [32, 33].

В последние годы стереохимия аминокислот развивается в основном в направлении изучения проблем конформации. Исследования с помощью различных физических методов, в особенности спектроскопии ядерно-магнитного резонанса (ЯМР) высокого разрешения, показывают, что заместители у  $\alpha$ - и  $\beta$ -C-атомов аминокислот предпочитают находиться в определенных конформациях [34 — 38].

Ниже с помощью проекционных формул Ньюмена приведены преимущественные конформации аминокислот с разветвленной боковой цепью: валина (a), L-аспарагиновой кислоты (b) и L-серина (c). При этом в формулах b и c представлено направление от  $C_\beta$  к  $C_\alpha$ , а в случае a  $C_\alpha \rightarrow C_\beta$ .



С помощью  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии можно проводить конформационный анализ как в твердом состоянии, так и в растворе. Например, N-трет-бутилоксикарбонилфенилаланин (Boc-Phe) в кристаллическом состоянии существует в виде ротамера с E-конфигурацией уретановой связи. При растворении в  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  E-конформер переходит в течение нескольких часов в Z-конформер, стабильный в растворе [39].

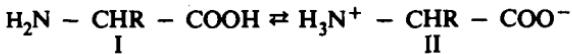
Конформационный анализ аминокислот дает важные сведения о конформационном поведении белков и пептидов.

## 1.4. Физико-химические свойства аминокислот

В твердом состоянии и в сильнополярных растворителях аминокислоты существуют в виде диполярных цвиттер-ионов. Это объясняет высокую температуру разложения аминокислот и их трудную растворимость в неполярных растворителях. Доказательства ионного дипольного строения аминокислот получены методами ЯМР-, ИК- и КД-спектроскопии: в спектрах отсутствуют полосы поглощения  $\text{NH}_2^-$  и  $\text{COOH}$ -групп. Сведения о кристаллической структуре обобщены в обзоре [40].

### 1.4.1. Растворимость

Аминокислоты (за немногими исключениями) хорошо растворяются в воде, аммиаке и других полярных растворителях, в неполярных и слабополярных растворителях (этанол, метанол, ацетон) растворяются плохо. Причиной такого поведения является легкий переход незаряженной молекулы (I) в цвиттер-ион (II), который связан с выигрышем свободной энергии 44,8 — 51,5 кДж/моль. В равновесии практически существует только цвиттер-ион (II). Например, в водном растворе аланина II:I = 260 000. Кроме того, растворимость аминокислот зависит от их строения. Более высокую растворимость имеют соединения с гидрофильной боковой цепью. Низкая растворимость большинства аминокислот в их изозелектрической точке объясняется снижением гидрофильности амино- и карбоксильных групп. Особенно трудно растворимы ароматические аминокислоты (Тир, Пhe, Тrр), в спиртах относительно легко растворяются иминокислоты (Pro и Hyp). Данные о растворимости аминокислот приведены в табл. 1-6.

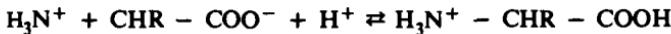


### 1.4.2. Кислотно-основные свойства

Кислотно-основные свойства аминокислот вследствие их диполярности сильно зависят от pH среды. В области pH 4 — 9 все аминокислоты ведут себя как кислоты (доноры протонов)



или как основания (акцепторы протонов)



В сильнокислой области существуют преимущественно катионы  $\text{H}_3\text{N}^+$ -CHR-COOH, в сильнощелочной — анионы  $\text{H}_2\text{N}-\text{CHR}-\text{COO}^-$ .

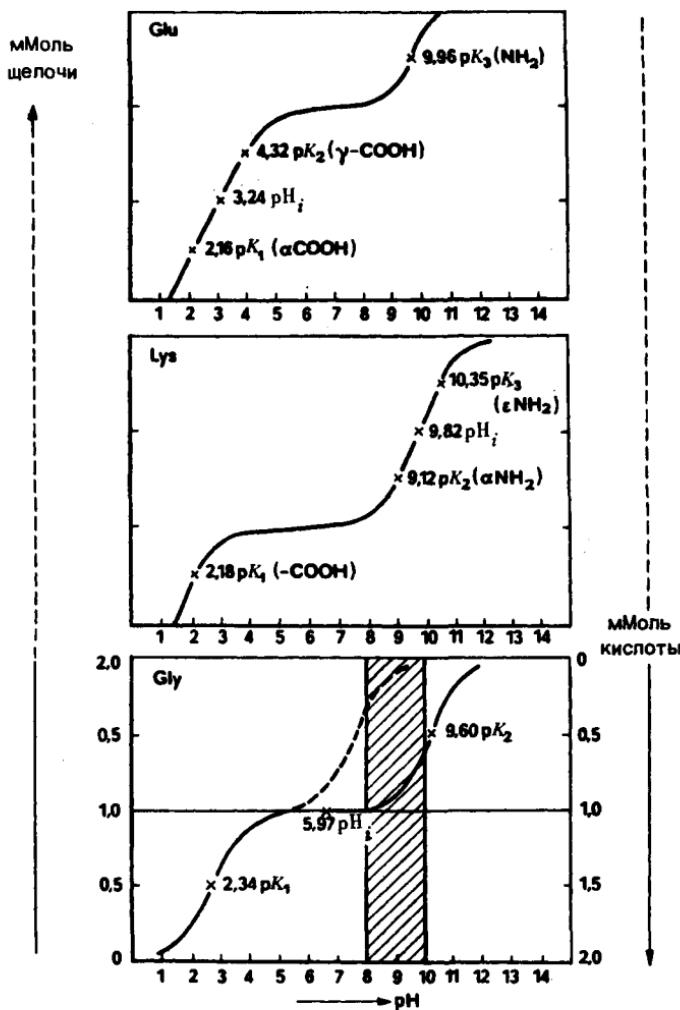


Рис. 1-6. Кривые титрования глицина, лизина и глутаминовой кислоты.

При титровании щелочью аминокислоты протонируются и ведут себя как двухосновные кислоты, т. е. они могут отдавать два протона. Если регистрировать изменение pH при добавлении щелочи, то получаются типичные кривые титрования для аминокислот (рис. 1-6).



Значение отдельных ступеней диссоциации лежит далеко одно от другого и может быть найдено с помощью уравнения Гендерсона — Хассельбаха:

$$\text{pH} = \text{p}K + \lg \frac{\text{[акцептор протонов]}}{\text{[донор протонов]}}$$

При равных концентрациях акцептора протонов и донора протонов измеренное значение pH численно равно значению  $\text{p}K$  соответствующей группы.

В кривых титрования глицина, например, при  $\text{p}K = 2,34$  в эквимолярных концентрациях сосуществуют  $\text{H}_3\text{N}^+ \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COOH}$  и  $\text{H}_3\text{N}^+ \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COO}^-$ , а при  $\text{p}K = 9,60$  наступает концентрационное равновесие между  $\text{H}_3\text{N}^+ \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COO}^-$  и  $\text{H}_2\text{N} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COO}^-$ . Точки перегиба на кривой титрования дают значения  $\text{p}K_1$  и  $\text{p}K_2$ , т. е.  $\text{p}K$  карбокси- и аминогрупп.

При  $\text{pH} 5,97$  для глицина кривая титрования имеет точку перегиба, которая называется *изозелектрической точкой* ( $\text{pH}_i$ ).  $\text{pH}_i$ , соответствующее этой точке уmonoаминокарбоновой кислоты, есть среднее арифметическое значений  $\text{p}K_1$  и  $\text{p}K_2$  и в сущности определяет условия (кислотность раствора), при которых почти все молекулы аминокислоты существуют в виде цвиттер-ионов. При формальном титровании глицина значение  $\text{p}K_2$  сдвигается из основной в нейтральную область pH (заштрихованная область). Это объясняется тем, что аминокислоты сначала переводятся в гидроксиметиламинокислоты, которые затем титруются с фенолфталеином в качестве индикатора как истинные слабые кислоты.

У аминокислот, имеющих диссоциирующие группы в боковой цепи (Glu, Asp, Cys, Tug, Lys, Arg, His), на кривых титрования появляется третий перегиб ( $\text{p}K_3$ ). На рис. 1-6 приведены кривые титрования лизина и глутаминовой кислоты, значения  $\text{p}K$  — в табл. 1-6.

В отличие от нейтральных и кислых аминокислот значение  $\text{pH}_i$  основных аминокислот вычисляют как среднее арифметическое значений  $\text{p}K_2$  и  $\text{p}K_3$ , например для лизина  $\text{pH}_i = 9,82 = (9,12 + 10,53)/2$ . Большое биологическое значение имеет поведение гистидина в качестве буфера. Это единственная протеиногенная аминокислота, которая действует в физиологической области  $\text{pH} 6 — 8$ .

Значения  $\text{p}K$  характеризуют кислотность аминокислот. Благодаря *-I*-эффекту аммонийной группы глицин ( $\text{p}K_1 = 2,34$ ) обладает более высокой кислотностью, чем уксусная кислота ( $\text{p}K = 4,76$ ). Этот эффект уменьшается с увеличением расстояния между амино- и карбоксильной группами: для  $\beta$ -аланина  $\text{p}K_1 = 3,6$ , для  $\delta$ -аминогексановой кислоты  $\text{p}K_1 = 4,43$ .

У аминодикарбоновых кислот  $\alpha$ -карбоксильная группа проявляет более сильные кислотные свойства, и преимущественно она принимает участие в образовании цвиттер-ионной структуры.

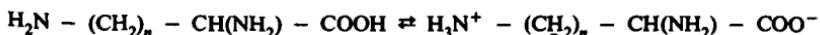
Основной характер аминокислот ослабляется из-за  $\text{COO}$ -группы, так что глицин с  $\text{p}K_2 = 9,72$  менее основен, чем этиламин с  $\text{p}K = 10,75$ . Еще более низкая основность у эфиров аминокислот (например, для этилового эфира глицина  $\text{p}K = 7,7$ ).

Таблица 1-6. Температура разложения, растворимость, и константы диссоциации протеиногенных аминокислот

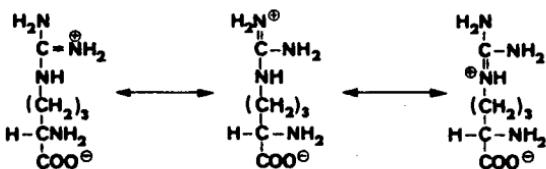
Амино- кислота	Температу- ра разло- жения, °С	Растворимость в воде, г/100 мл		$pK_1$	$pK_2$	$pK_3$	$pH_i$
		25°C	100°C				
Gly	292	24,99	67,17	2,34	9,60		5,97
Ala	297	16,65	37,3	2,34	9,69		6,01
Val	315	8,85	18,8	2,32	9,62		5,96
Leu	337	2,43	5,64	2,36	9,60		5,98
Ile	284	4,12	8,26	2,36	9,68		6,02
Ser	228	5,0	32,2	2,21	9,15		5,68
Thr	253			2,71	9,62		6,16
Cys	178 <sup>a</sup>	20,5		1,71	8,27(SH-)	10,78	5,02
Cys	260	0,01	0,11	1,04	2,05(COOH)	8,0	5,03
						10,25(NH <sub>2</sub> )	
Met	283	3,5	17,6	2,28	9,21		5,74
Pro	222	16,23	23,9 (70°C)	1,99	10,6		6,30
Hyp	270	36,1	51,6 (65°C)	1,92	9,73		5,83
Lys	224			2,18	9,12 ( $\alpha$ -NH <sub>2</sub> )	10,53	9,82
Arg	238			2,17	9,04 ( $\alpha$ -NH <sub>2</sub> )	12,84 (гуанидо)	10,76
His	277	0,43		1,82	6,00 (имидазол-)	9,17	7,59
Asp	270	0,5	6,9	1,88	3,65 ( $\beta$ -COOH)	9,60	2,77
Asn	236	2,98	55,1	2,02	8,80		5,41
Glu	249	0,86	14,0	2,16	4,32 ( $\gamma$ -COOH)	9,96	3,24
Gln	185	3,6		2,17	9,13		5,65
Phe	284	2,96	9,9	1,83	9,13		5,48
Түг	344	0,045	0,56	2,20	9,11	10,07(OH)	5,66
Trp	282	1,14	4,99	2,38	9,39		5,89

<sup>a</sup> Для гидрохлорида.

У диаминокарбоновых кислот  $\omega$ -аминогруппа проявляет более выраженные основные свойства, чем  $\alpha$ -аминогруппа. Здесь цвиттер-ионная структура осуществляется преимущественно с участием  $\omega$ -аминогруппы



У сильноосновной аминокислоты аргинина протон присоединяется к гуанидиновой группе с образованием мезомерно-стабилизированного гуанидо-катиона:



Хорошее представление о кислотно-основных равновесиях в растворах аминокислот особенно важно при их разделении в аналитических и preparативных целях с помощью электрофореза и ионообменной хроматографии.

Рис. 1-7 наглядно показывает, каким образом происходит разделение аминокислот при электрофорезе: анионные или катионные формы отклоняются в направлении соответствующего электрода, цвиттер-ионы не отклоняются. Подбирая подходящие буферные системы, можно разделять любые аминокислоты.

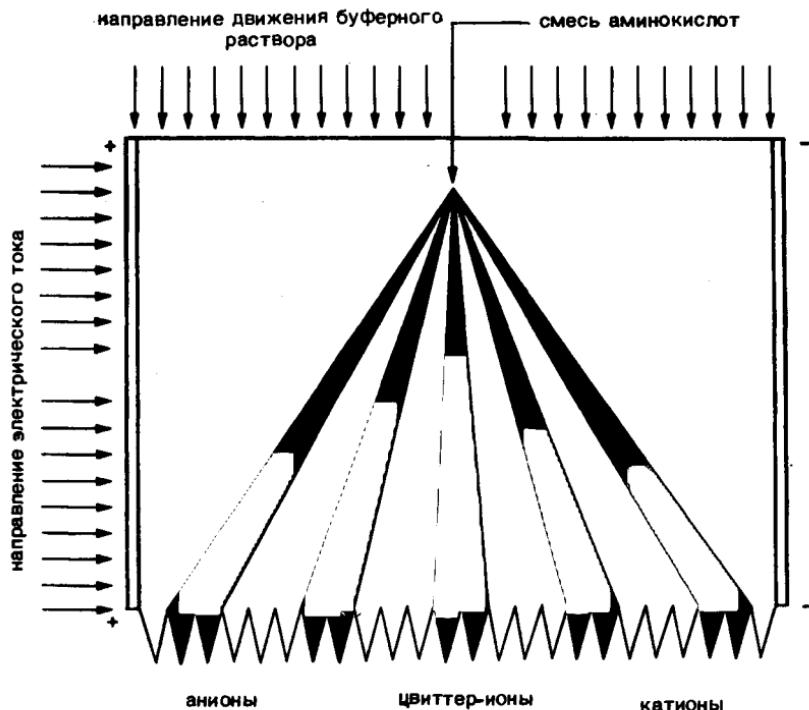


Рис. 1-7. Разделение аминокислот посредством непрерывного проточного электрофореза.

### 1.4.3. Спектры поглощения аминокислот

**УФ-спектры** [41, 42]. В области видимого спектра растворы протеиногенных кислот практически не поглощают, а в УФ-области для ароматических аминокислот можно наблюдать относительно высокое поглощение (ср. УФ-спектры тирозина и триптофана, рис. 1-8). Характеристический максимум поглощения этих аминокислот лежит  $> 250$  нм; слабое поглощение цистина, которое объясняется наличием дисульфидной группы, обнаруживается при 240 нм.

Высокая молярная экстинкция тирозина при 280 нм используется для определения содержания белка в растворах.

**ИК-спектры** [43, 44]. В спектрах аминокислот отсутствуют полосы нормальных валентных колебаний в области  $3300 - 3500 \text{ см}^{-1}$ , наблюдается поглощение при  $3070 \text{ см}^{-1}$ , которое можно отнести к  $\text{H}_3\text{N}^+$ -группе. Эта полоса наблюдается также в спектрах гидрохлоридов аминокислот. Кроме того, две характеристические полосы  $\text{H}_3\text{N}^+$ -группы находятся в области  $1500 - 1600 \text{ см}^{-1}$ .

Аминокислоты и их соли показывают типичное для  $\text{COO}^-$  поглощение при  $1560 - 1600 \text{ см}^{-1}$ . Карбонильное поглощение  $\text{COOH}$ -группы при  $1700 - 1730 \text{ см}^{-1}$  у гидрохлоридов аминокислот сдвинуто на  $\sim 20 \text{ см}^{-1}$  в коротковолновую область. Непрерывный ряд полос находится в интервале  $2500 - 3030 \text{ см}^{-1}$ .

**Спектры ЯМР** [34 — 38, 45].  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопические исследования аминокислот показали, что химический сдвиг аминокислотных протонов, а

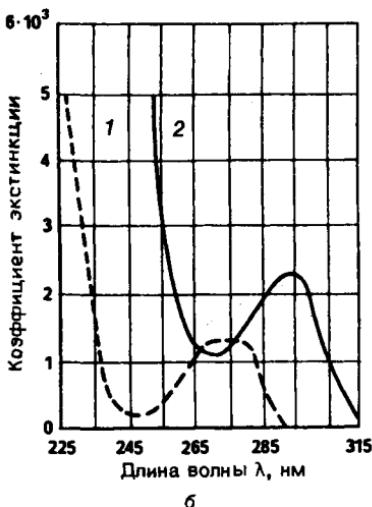
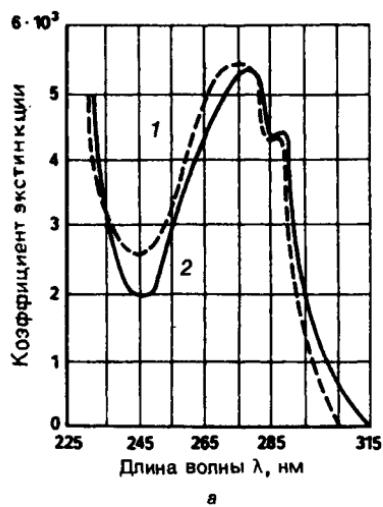


Рис. 1-8. УФ-Спектры триптофана (а) и тирозина (б) в 0,1 н.  $\text{HCl}$  (1) и 0,1 н.  $\text{NaOH}$  (2).

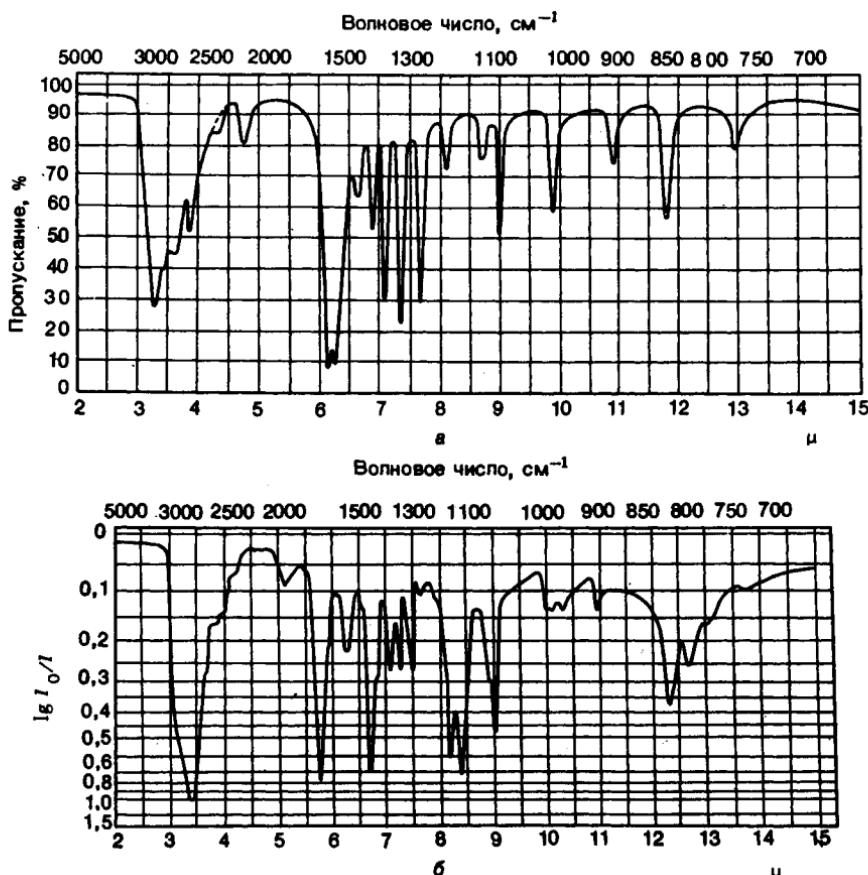


Рис. 1-9. ИК-спектры L-аланина (α) и L-аланингидрохлорида (β).

также константы протон-протонного взаимодействия зависят от заряженного состояния молекулы. В графическом изображении зависимость химического сдвига от pH имеет вид типичной кривой титрования. В качестве растворителей для ЯМР-спектроскопии аминокислот, пептидов и белков служит обычно вода или  $D_2O$ , а в качестве внутреннего стандарта применяют тетраметилсилан (ТМС), гексаметилдисилоксан (ГМДС) и 2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфонат (ДСС).

В случае  $^{13}C$ -ЯМР-спектроскопии [46, 47], которая применяется для выяснения строения неизвестных соединений и для аналитической характеристики простых производных аминокислот и пептидов, резонансные пики свободных аминокислот (стандарт — ТМС) лежат для карбоксильных групп между  $-168$  и  $-183$  м. д., для  $\alpha$ -углеродного атома между  $-40$  и

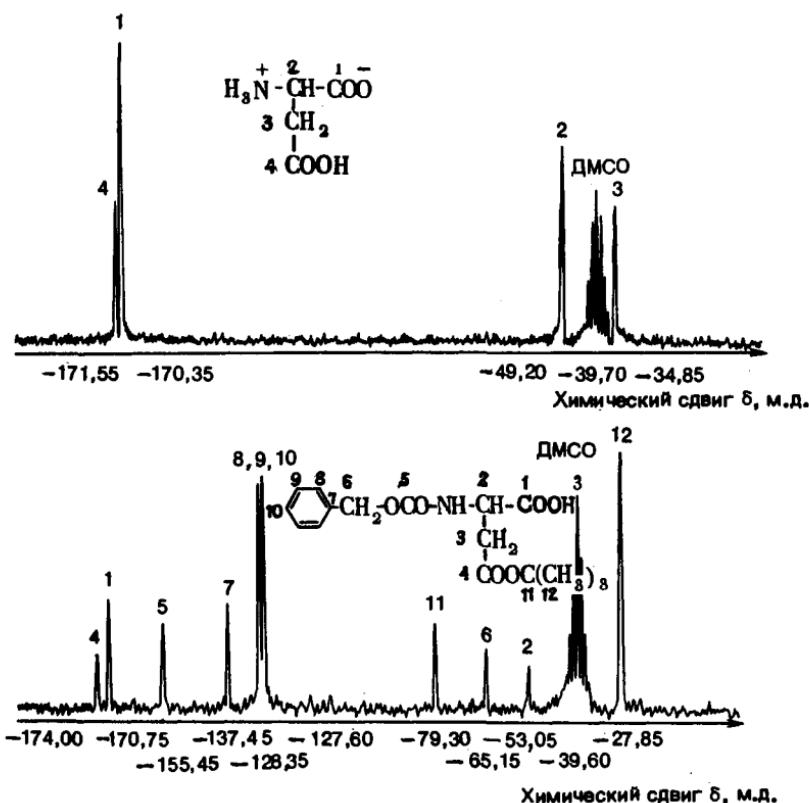


Рис. 1-10.  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-Спектры аспарагиновой кислоты и  $\beta$ -трит-бутилового эфира бензилоксикарбониласпарагиновой кислоты.

– 65 м. д., для  $\beta$ -углеродного атома между – 17 и – 70 м. д. и для  $\gamma$ - и  $\delta$ -углеродных атомов между – 17 и – 50 м. д. Сигналы атомов углерода ароматических и гетероароматических колец находятся между – 110 и – 140 м. д. На рис. 1-10 приведены  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектры аспарагиновой кислоты и  $\beta$ -трит-бутилового эфира бензилоксикарбонил- $\text{l}$ -аспарагиновой кислоты.

В полипептидах и белках индивидуальные сигналы сдвигаются и перекрываются из-за взаимодействия отдельных аминокислотных остатков. Это затрудняет количественное отнесение сигналов к определенным группам. Например, при применении в качестве внутреннего стандарта ДСС сигналы протонов у метильных групп алифатических остатков лежат между 0,9 и 1,5 м. д., у остальных протонов алифатических боковых цепей между 1,5 и 3,5 м.д., у протонов  $\alpha$ -С-атома между 3,5 и 4,5 м.д., у ароматически-

связанных СН-протонов, а также у протона пептидной группы CO-NH между 6,7 и 9,0 м.д. Резонансная область C<sub>2</sub>-протона имидазола гистидина лежит между 8,0 и 9,2 м.д., а NH-индольного протона триптофана между 9,0 и 11,0 м.д.

### 1.5. *Получение аминокислот [1—5, 48—53]*

Аминокислоты можно получать путем выделения из белковых гидролизатов, с использованием микробиологических методов, с помощью ферментативных методов или путем химического синтеза. Первые три подхода дают L-аминокислоты, а при химическом синтезе получаются DL-соединения, которые нужно еще разделить на оптические антиподы. До недавнего времени аминокислоты удавалось получить только в очень малых количествах, но в последние годы их производство приняло индустриальные масштабы и в 1977 г. достигло 400 000 т. Аминокислоты используются как вкусовые добавки в пищевой промышленности (глутамат натрия, аспарагиновая кислота, цистин, глицин и аланин), как питательные растворы и терапевтические средства в медицине (все протеиногенные аминокислоты), как добавки для улучшения неполнценных питательных белков и фуражи (лизин, метионин, триптофан), как промежуточные вещества в косметической промышленности (серин, треонин, цистеин), а также как исходные вещества для синтеза различных пептидов.

#### 1.5.1. Выделение из белковых гидролизатов

При получении аминокислот белки прежде всего расщепляют с помощью основного, кислотного или ферментативного гидролиза [54]. В классическом методе кислотного гидролиза [55, 56] используют 6 н. HCl ( $t_{\text{кип}} = 110^{\circ}\text{C}$ ) или 8 н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Время реакции от 12 до 72 ч в зависимости от строения белка. Очень устойчивы к гидролизу пептидные связи, образованные лейцином, изолейцином и валином. При этом триптофан разрушается полностью, серин и треонин до 10%.

Потери аминокислот, обусловленные присутствием углеводов, могут быть снижены, если работу проводят в вакууме и применяют большой избыток кислоты (белок: HCl = 1:10000).

В других методах кислотного гидролиза используют смесь пропионовой кислоты с 12 н. HCl [57] (время реакции при 160 °C 15 мии, при 130 °C 2 ч), 3 н. 4-толуолсульфокислоту [58] или 3 н. меркаптоэтансульфоновую кислоту [59] (время реакции при 110 °C 24 ч). Последний метод используется специально для аналитических целей. Триптофан при этом сохраняется на 95%.

При щелочном гидролизе с 6 н. раствором гидроксида бария в автоклаве (давление ~ 700 кПа) разрушаются гидроксиаминокислоты и цистеин, в то время как триптофан сохраняется.

Очень легко протекает ферментативный гидролиз белков. Для осуществления полного гидролиза необходимо применение комбинации нескольких ферментов, что связано с высокой специфичностью протеаз. На практике применяют протеиназы животного и бактериального происхождения (эндопептидазы), такие, как трипсин, пепсин и папаин в комбинации со специфическими амино- и карбоксипептидазами [60]. Нередко хорошие результаты получают, используя неочищенный фермент (сырой препарат), например панкреатин, который содержит все пищеварительные ферменты поджелудочной железы (его используют при получении аспарагина и глутамина).

Выделение отдельных аминокислот из белкового гидролизата не сопровождается никакими затруднениями в тех случаях, когда они содержатся в достаточно высоких концентрациях и заметно отличаются друг от друга по свойствам.

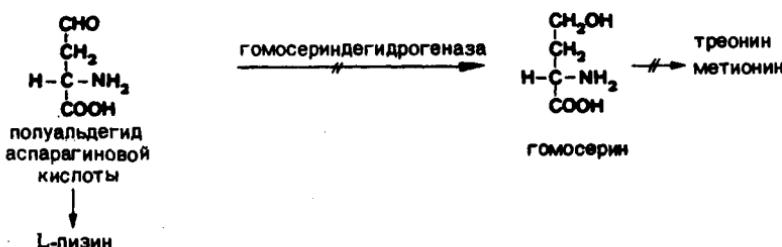
Глутаминовая кислота, например, кристаллизуется прямо из концентрированного гидролизата, насыщенного хлористым водородом, цистин и тирозин отделяют благодаря их плохой растворимости в воде. Селективное отделение ароматических аминокислот удается выполнить с помощью адсорбции на активированном угле. Полученную при гидролизе смесь аминокислот лучше всего разделить хроматографически. Выделению отдельных компонентов предшествует обычно разделение на кислые, основные и нейтральные группы аминокислот, при этом большое значение имеют электрофорез и специфические ионообменники. Раннее распространенные методы разделения, такие, как фракционная перегонка эфиров (по Фишеру), экстракцияmonoаминокарбоновых кислот *n*-бутиловым или амиловым спиртом (по Дакину), осаждение «гексоновых оснований» лизина, аргинина и гистидина фосфорновольфрамовой кислотой или флавиановой кислотой, теперь имеют только второстепенное значение.

### 1.5.2. Микробиологические методы [53, 61]

Почти все протеиногенные аминокислоты можно получать с помощью специфических микроорганизмов. Принцип микробиологического метода (ферментации) заключается в аэробном выращивании микроорганизмов в разбавленных питательных растворах, содержащих усвояемые источники углерода и азота, как, например, углеводы, углеводороды, органические и неорганические соединения азота, минеральные соли и ростовые вещества. Можно использовать также полупродукты биосинтеза аминокислот. Например, глутаминовая кислота получается из  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты, изолейцин и серин можно получать ферментацией культуры, содержащей треонин или глицин. В качестве микроорганизмов применяются культуры дикого типа, например *Corynebacterium glutamicum* и *Brevibacterium flavidum*, а также мутанты, которые производят большое количество специфических аминокислот.

В случае ауксотрофных мутантов микроорганизмы не располагают некоторыми ферментами, необходимыми для биосинтеза определенных ами-

нокислот. Синтез поэтому может остановиться на одной из первых ступеней или пойти по другому пути. Если продуктом первой ступени или продуктом такого побочного пути являются аминокислоты, то они производятся и аккумулируются в большом количестве, например применение мутанта, дефицитного по гомосерину из *Eschrichia coli*, обусловливает накопление лизина. Отсутствие гомосериндегидрогеназы блокирует гомосерин-треонин-метиониновый путь синтеза



в пользу побочного синтеза, приводящего к образованию лизина. В случае регуляторных мутантов, применяемых для получения аргинина, метионина, изолейцина и триптофана, «наработка» аминокислот осуществляется путем нарушения механизма обратной связи.

Таблица 1-7. Аминокислоты, полученные ферментацией

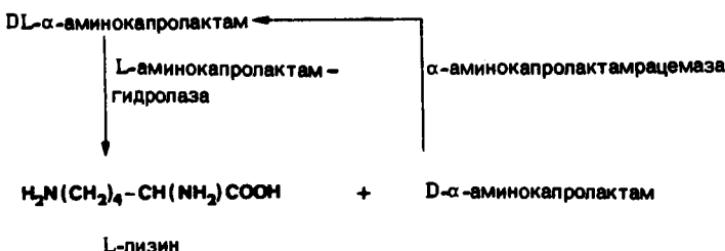
Микроорганизмы	Источники C, N	Полученные аминокислоты
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Глюкоза или гидролизат крахмала, патока тростникового и свекловичного сахара, аммиак, мочевина	Glu
Мутанты <i>Brevibacterium flavum</i>	Патока тростникового и свекловичного сахара, гидролизат крахмала, $\alpha$ -алканы, уксусная кислота	Lys, Val, Orn, Met, Trp, Glu
Мутанты <i>Pseudomonas trifoliolii</i> и <i>E. coli</i>	Этанол, неорганические соединения азота	Lys, Arg, Ile
<i>Serratia marcescens</i>	Фумаровая кислота, аммиак	Asp
Под <i>Corynebacterium</i>	Фенилмолочная кислота	Phe
Под <i>Brevibacterium</i>	Нефть, нитрат аммония	Glu, Ala, Asp
	Фосфаты, сульфат магния, хлорид марганца(II)	Lys, Arg, Тир
<i>Candida lipolytica</i> , <i>E. coli</i> и др.	Хлорид кальция и сульфат железа(II) в следовых количествах	Gly, Trp, Pro, Ser

Особое техническое значение приобрела ферментация глутаминовой кислоты так называемыми микроорганизмами дикого типа. Культивируют бактерии в стерилизованных ферmentерах при 35° С, используя в качестве источника углерода глюкозу или патоку и вводя в систему воздух и аммиак. Через 40 ч из культуры можно изолировать глутаминовую кислоту. Выход составляет 50 кг аминокислоты на 100 кг введенной глюкозы. Глутаминовая кислота в форме моноглутамата натрия применяется в значительных количествах как вкусовое вещество и приправа в пищевой промышленности. При незначительной добавке глутамата заметно усиливается и улучшается естественный вкус мясных блюд.

Аминокислоты, полученные ферментативно, представлены в табл. 1-7.

### 1.5.3. Ферментативные методы

В то время как при ферментации аминокислот присутствуют все ферменты микроорганизмов, при ферментативных синтезах используются изолированные или фиксированные на носителе ферменты для катализа заданного пути реакции. Так, при получении аспарагиновой кислоты путем присоединения аммиака к фумаровой кислоте используют L-аспартазу, при получении L-аланина из L-аспарагиновой кислоты — L-аспартат-β-декарбоксилазу. Особенno большое значение имеет синтез L-лизина из D, L- $\alpha$ -аминокапролактама с помощью L-аминокапролактамгидролазы, получаемой микробиологическим путем [62]. В этом синтезе, проводимом как одностадийный процесс, остающийся D- $\alpha$ -аминокапролактам рацемизуется  $\alpha$ -аминокапролак-



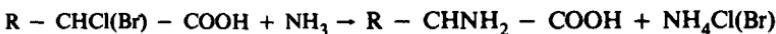
тамрацемазой и таким образом в конце концов полностью переводится в L-лизин.

#### 1.5.4. Методы химического синтеза

Известно очень много методов синтеза аминокислот. Ниже остановимся лишь на некоторых: аминолиз галогенкарбоновых кислот, синтез Штрекера, синтезы через азлактоны, гидантоины и шиффовы основания, а также синтезы с малоновым эфирем. Кроме того, рассматриваются асимметрический и пребиотический синтез, а также биосинтез аминокислот.

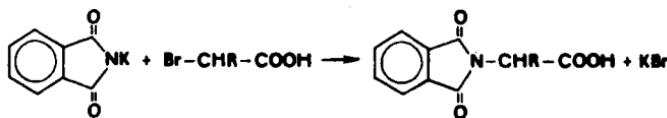
### 1.5.4.1. Аминолиз галогенкарбоновых кислот

Старейший метод синтеза аминокислот — нуклеофильное замещение галогена в легкодоступных галогенкарбоновых кислотах:



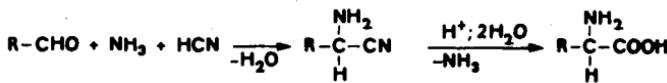
Впервые таким путем в 1858 г. был получен глутамин из монохлоруксусной кислоты. Выходы составляют 60 — 70%, если применять 10-кратный избыток аммиака и работать в присутствии карбоната аммония. При этом аминогруппа образующейся кислоты дает карбамат аммония  $R = \text{CH}(\text{NH}_2\text{COO}^{\ominus})_2$ , и это предохраняет ее от дальнейшего превращения во вторичные и третичные аминосоединения.

Удобнее использовать реакцию эфиров галогенкарбоновых кислот с фталимидом калия с последующим расщеплением получающейся фталил-аминокислоты кислотным гидролизом или гидразинолизом (синтез Габриэля). В качестве реагента аминолиза применяют также уротропин (Хильман, 1948 г.).



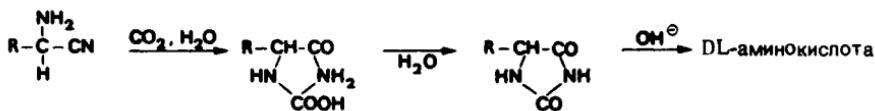
### 1.5.4.2. Синтез Штрекера

Синтез аминокислот, предложенный в 1850 г. Штрекером, основан на присоединении синильной кислоты к карбонильной группе альдегида в присутствии аммиака. Получающийся при этом нитрил  $\alpha$ -аминокарбоновой кислоты омыляется далее в DL-аминокислоту:

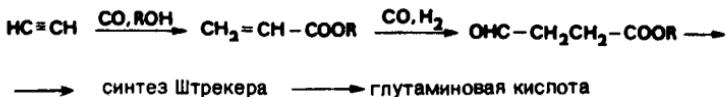


В качестве побочных продуктов могут получаться иминодинитрилы  $\text{NH}(\text{CHR-CN})_2$ , тринитрилы и карбоновые кислоты; общий выход при этом синтезе ~ 75%.

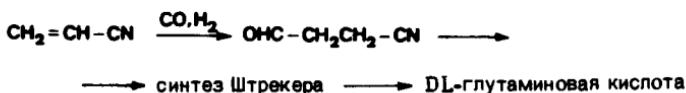
Бухерер внес изменения в синтез Штрекера: альдегид реагирует со смесью цианида натрия и карбоната аммония (или мочевины) и дает легко изолируемый гидантонин, который затем расщепляется щелочным гидролизом:



Синтез Штрекера имеет большое значение для получения в промышленности глутаминовой кислоты, метионина и лизина. Исходные альдегиды получают из продуктов нефтехимического производства, и синтезы обычно ведут через гидантоины. По методу Дюпона исходят из ацетилена:

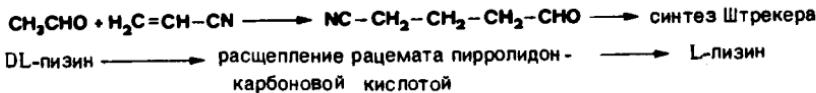


По методу Аджиномото получают DL-глутаминовую кислоту, исходя из акрилонитрила:

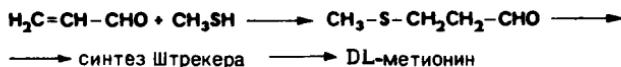


Расщепление рацемата по этому методу происходит самопроизвольной кристаллизацией при затравливании оптически чистыми кристаллами, причем выпавшая в осадок D-глутаминовая кислота после рацемизации снова вводится в процесс. В настоящее время в мире ежегодно производится ~250 000 т глутамата натрия, причем большую часть составляет продукт, полученный синтетически.

При техническом синтезе лизина исходят из цианомасляного альдегида, который получают присоединением ацетальдегида к акрилонитрилу:



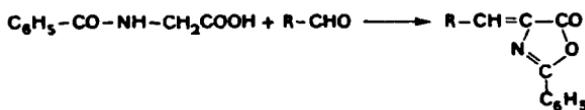
Промышленное производство DL-метионина (в 1977 г. произведено 100 000 т), который применяется главным образом как добавка в корм скоту, ведется по методу Штрекера из β-метилмеркаптопропионового альдегида, который получают из акролеина и метилмеркаптана. В этом случае не требуется разделения энантиомеров, так как L- и D-метионин одинаково хорошо усваиваются животными.



#### 1.5.4.3. Азлактонный синтез по Эрлейнмайеру — Плёхлю

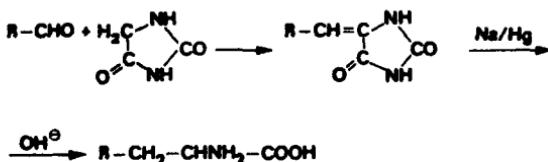
Синтез основан на том, что ароматический или α, β-ненасыщенный алифатический альдегид обрабатывается бензоилглицином (гиппуровая кислота) или ацетилглицином (ацетуровая кислота) в присутствии уксусного ангидрида и ацетата натрия. При этом образуется замещенный азлактон, кото-

рый при нагревании с фосфором и иодоводородной кислотой претерпевает восстановительное расщепление:



#### 1.5.4.4. Гидантоиновый синтез

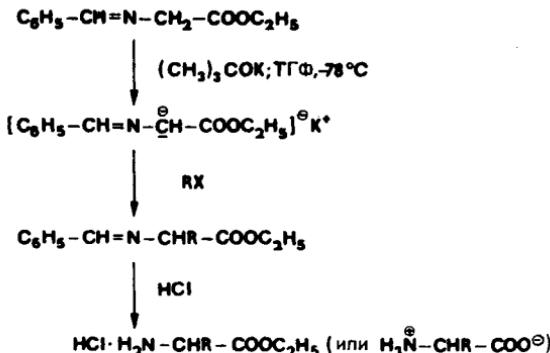
Альдегиды реагируют с гидантоином (метиленовый компонент) и смесью ацетангирида — ацетат натрия (конденсирующее средство), давая продукты конденсации, которые после восстановления амальгамой натрия или смесью иодоводорода и фосфора последующим щелочным гидролизом переводятся в аминокислоты.



Вместо гидантоина в качестве соединений с активной метиленовой группой можно использовать также тиогидантоин, 2,5-диоксониперазин и роданин (тиазолидин-4-он-2-тион).

#### 1.5.4.5. Алкилирование шиффовых оснований [63]

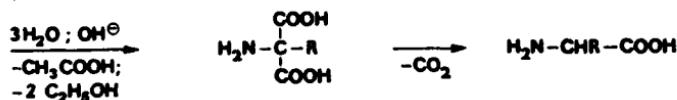
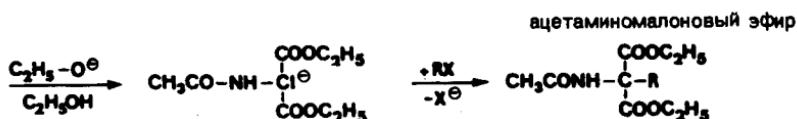
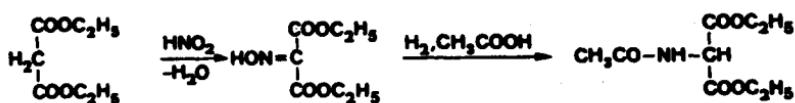
Легкодоступные бензилиденовые производные этилового эфира глицина можно превращать в  $\alpha$ -аминокарбанионы действием сильных оснований, таких, как литийдизопропиламиド (ЛДА) или *tert*-бутилат калия, и затем алкилировать:



Синтезы проходят с выходом ~ 90%. Повторное металлирование и алкилирование позволяют ввести второй алкильный остаток, что приводит к разветвлению цепи. При использовании шиффова основания, полученного из этилового эфира глицина и бензофенона, алкилирование можно проводить в условиях техники фазового переноса.

#### 1.5.4.6. Синтезы с малоновым эфиром

В синтезе аминокислот этот метод имеет большое значение. Введение боковой цепи происходит путем алкилирования аниона малонового эфира, который образуется в присутствии сильных оснований, например метилата натрия. Наиболее благоприятно протекание реакции через N-ациламиномалоновый эфир:



В качестве ацильного остатка кроме ацетильной и формильной групп применяется фталimidогруппа (Сёренсен, 1903 г.), алкилирующими реагентами служат алкилгалогениды и основания Манниха.

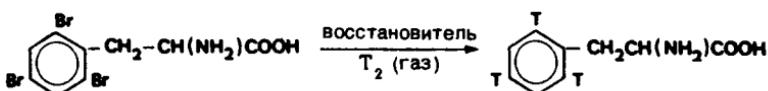
#### 1.5.4.7. Синтез меченых аминокислот [64]

Применение меченых аминокислот значительно расширило наши знания о биохимических функциях аминокислот, пептидов и белков. В зависимости от конкретной задачи синтезируются аминокислоты с одной или несколькими метками, меченные азотом-15, тритием, углеродом-14 и серой-35. Введение тритиевых меток осуществляют методом изотопного обмена или (лучше) прямым химическим синтезом.

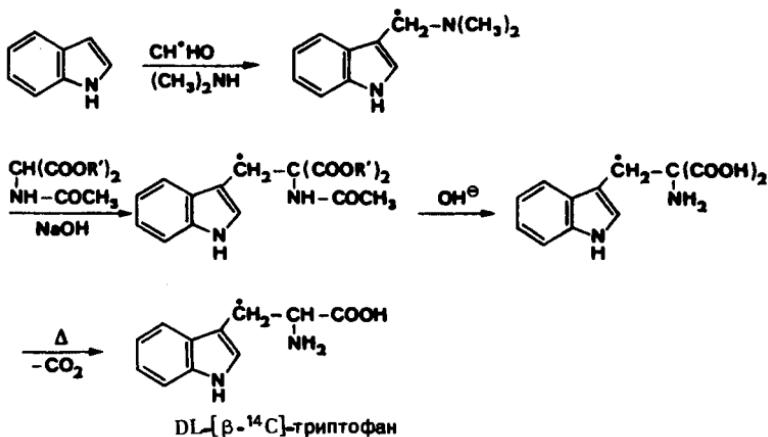
В случае изотопного обмена получают препараты с удельной активностью < 10 Ки/ммоль, причем радиоактивные изотопы обычно равномерно распределены по молекуле. Можно проводить восстановление ненасыщенных

## Получение аминокислот

ных или галогенированных полупродуктов в присутствии газообразного трития. При этом, например, из 2,4,6-трибром-L-фенилаланина получается L-2,4,6-<sup>3</sup>H-фенилаланин с высокой удельной активностью (60 — 80 КИ/ммоль):



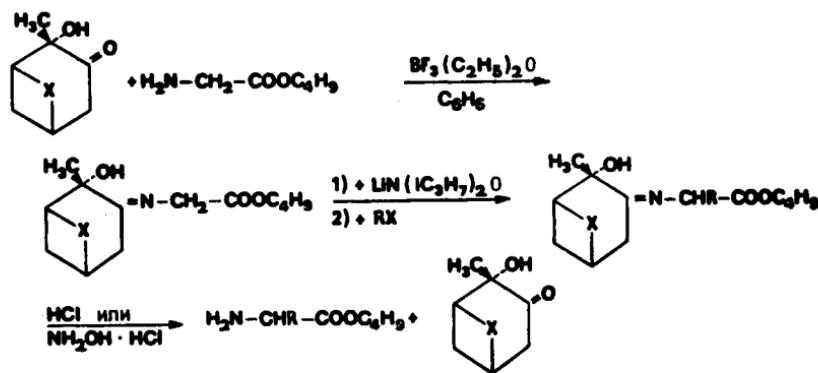
Аминокислоты могут быть получены микробиологическими методами, если в питательном растворе содержится <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> или другие источники <sup>14</sup>C [65]. После разрушения клеточной структуры фракции белка изолируют и полученную при гидролизе смесь аминокислот разделяют хроматографически. О биосинтезе <sup>35</sup>S-L-метионина с очень высокой удельной активностью сообщили Бретчер и Смит [66]. Для введения <sup>14</sup>C-метки можно использовать прямой химический синтез. Большое применение находит малоновый эфир (синтезы с циануксусным эфиром, содержащим 2-<sup>14</sup>C в остатке уксусной кислоты, для C<sub>2</sub>-метки и с <sup>14</sup>C-сирильной кислотой для C<sub>1</sub>-метки). Если исходят из <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>, то сначала из алкилгалогенида, магния и CO<sub>2</sub> получают карбоновую кислоту R-<sup>14</sup>COOH (реакция Гриньара), затем с помощью галогенирования и аминолиза ее переводят в аминокислоту. Синтез Штрекера, с K<sup>14</sup>CN приводит к метке карбоксильного углерода, с <sup>15</sup>NH<sub>3</sub> — к <sup>15</sup>N-аминокислотам (имеющим важное значение в исследовательской практике). Классический синтез триптофана с малоновым эфиром — пример введения метки в положение C<sub>3</sub> (Гейдельберг, 1949 г.):



Производные цистеина и валина, меченные тритием, а также валин с двойной меткой (<sup>15</sup>N и <sup>2</sup>H) применялись при исследованиях биосинтеза пенициллина [67, 68].

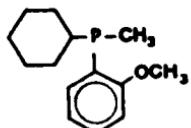
### 1.5.4.8. Асимметрические синтезы [69, 70]

Для стереоспецифического синтеза аминокислот с помощью хиральных реагентов имеются многочисленные возможности. Из них следует упомянуть асимметрическое гидрирование ненасыщенных соединений с хиральными катализаторами — фосфинами родия и рутения [71] или фосфиновыми лигандами, фиксированными на полимере [72], асимметрическое декарбоксилирование специфических комплексов малоната кобальта (III) при малоновом синтезе, переаминирование  $\alpha$ -кетокислот с L-пролином в качестве хирального реагента и асимметрическое алкилирование шиффовых оснований [73, 74]. Практическое значение асимметрический синтез имеет в том случае, если он приводит к получению ценных, редких аминокислот, если хиральные реагенты не очень дороги или если их можно регенерировать. Проблематичны асимметрические синтезы, протекающие через циангидрины или гидантоины, так как при гидролизе приходится считаться с рацемизацией. Об асимметричном синтезе по методу Штрекера сообщается в работе [75]. Ниже приводится пример асимметрического алкилирования шиффова основания *трем-бутилового эфира глицина* и гидроксипинанона [76].



При гидролитическом расщеплении алкилированного основания L-аминокислоты получают с оптическим выходом 60 — 80%, гидроксипинанон может быть регенерирован, например, в виде оксима и вновь использован для синтеза.

Практический интерес получил асимметрический синтез L-ДОФА, при котором удалось осуществить стереоспецифическое гидрирование дигидроксикоричной кислоты с помощью катализатора Вилькинсона RhL<sub>3</sub>Cl [77].



Структура оптически активного лиганда L

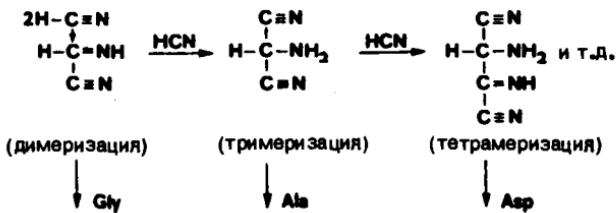
#### 1.5.4.9. Пребиотические синтезы [78 – 85]

В связи с проблемой возникновения жизни на Земле внимание исследователей привлекает вопрос первого синтеза аминокислот. В результате исследований твердо установлено, что рацематы почти всех природных аминокислот могли быть получены в особых энергетических условиях из простых углеродных и азотных соединений.

Абиогенное образование аминокислот происходило не только на Земле. Это было подтверждено хроматографическим анализом мерчисонского метеорита, упавшего в 1969 г. в Австралии. В экстрактах образцов, которых не касалась рука человека нашли 23 рацемические аминокислоты, среди них глицин, глутаминовую кислоту, аланин, валин и пролин (в миллиграммовых количествах), а также саркозин, изовалени, пипеколиновую и аминомасляную кислоты (в следовых количествах).

Аминокислотные анализы водных экстрактов образцов лунного грунта, проведенные в рамках американской программы «Аполлон», показали присутствие глицина и аланина. Еще четыре аминокислоты были обнаружены с помощью газовой хроматографии в кислотном гидролизате экстракта. Это Glu, Ser, Asp, Tyg. Спектроскопические данные однозначно показывают присутствие  $\text{NH}_3$ , HCHO и HCN в космическом пространстве. В лунных пробах также обнаружены исходные продукты для abiогенного образования «внеземных» аминокислот:  $\text{CH}_4$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{CO}_2$ , HCN (20 — 70 нг/г). Возможно, правда, что часть предшественников аминокислот происходят от газов земных ракет.

Особое значение при абиогенном синтезе аминокислот имеет, по-видимому, си-нильная кислота [86]. Исходя из нее, можно легко объяснить синтезы ряда аминокислот в присутствии альдегидов и аммиака (синтез Штрекера). Кроме того, превращения самой HCN тоже могут привести к возникновению различных аминокислот.



Новые возможности олигомеризации цианидов рассматриваются в работе [87]. Сообщается также об образовании аминокислот при облучении растворов HCN кобальтом-60 [88].

При пребиотическом синтезе пептидов могли играть роль коицепсационные реагенты, образованные в ходе химической эволюции, такие, как циклические или линейные полифосфаты или ненасыщенные алифатические структуры (например, карбодинимид) [89, 90].

В работе [91] сообщается об олигомеризации глицина до пентаглицина под влиянием периодической тепловой обработки суспензии гидратированного глинистого материала и глицина. Полиаминокислоты образуются путем термической конденсации при 105 °C без катализаторов [92].

Большой интерес представляют сообщения о том, что в экстрактах вулканического пепла, собранного в момент извержения, обнаружены некоторые аминокислоты.

Таблица 1-8. Аминокислоты, полученные абиогенно

Исходные компоненты	Источник энергии	Аминокислоты
$\text{CH}_4$ , $\text{NH}_3$ , $\text{H}_2$ , $\text{H}_2\text{O}$	Электрический разряд	Gly, Ala, $\beta$ -Ala, Abu
$\text{CH}_4$ , $\text{NH}_3$ , $\text{H}_2$ , $\text{H}_2\text{S}$ $\text{CH}_4$ , $\text{CO}_2$ , $\text{N}_2$	То же " "	Cys, цистин, Met и др. Gly, Ala, Nva, Abu, Ser, Asp и др.
$\text{HCNO}$ , $\text{NO}_3^-$ , $\text{H}_2\text{O}$ , $\text{FeCl}_3$	УФ-облучение	Ser, Asp, Asn, Gly, Ala, Thr, Val, Orn, Arg, Pro, Glu, Lys, Leu, Ile, His
Глюкоза, $\text{NH}_3$ , $\text{V}_2\text{O}_5(\text{H}_2\text{O})$ $\text{CH}_4$ , $\text{C}_2\text{H}_6$ , $\text{NH}_3$ , $\text{H}_2\text{S}$ , $\text{HCN}$ $\text{HCHO}$ , $\text{KNO}_3$ , $\text{H}_2\text{O}$	" "	Gly, Ala, Asp, Val, Lys
Винная кислота, $\text{KNO}_3$ , $\text{H}_2\text{O}$ $\text{CH}_3\text{COOHNNH}_4$ , $\text{H}_2\text{O}$ $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ $(\text{NH}_3\text{CH}_3)_2\text{CO}_3$ Пропионовая кислота, $\text{NH}_3$ , $\text{H}_2\text{O}$ $\text{CH}_4$ , $\text{NH}_3$ , $\text{H}_2\text{O}$ ( $\text{SiO}_2$ )	УФ-облучение и электрический разряд Солнечный свет (25–300 ч)	Phe, Тир и др. Asp, Lys, Ala, Gly, Orn, Arg, Glu, His, Ser, Thr
Глицин, оксид алюминия	Солнечный свет (500 ч) $\beta$ -Излучение $\gamma$ -Излучение $\pi$ , $\gamma$ -Излучение Электрофорез в тлеющем разряде, 3 ч Тепловая энер- гия (950°C)	Asp, Ala Asp, Glu Gly, Ala Gly, Ala, Lys Ala, $\beta$ -Ala, Gly Gly, Ala, Ser, Asp, Thr, Glu, Val, Leu, Pro, Ile, альфа Тир, Abu Arg, Ala, Gly, Ser, Asp, Glu, Leu, Ile, Abu, Thr
$((\text{CH}_3)_3\text{NH})_2\text{CO}_3$	$\pi$ , $\gamma$ -Излучение	Gly, Ala, Lys, Val, Abu

ты — глицин, аланин, серин, аспарагиновая кислота — в количестве 0,1 мг/кг [92а]. Это свидетельствует о том, что на поверхности пепла при повышенных температурах может происходить синтез аминокислот из вулканических газов:  $\text{CO}$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{CH}_4$ .

#### 1.5.4.10. Биосинтез аминокислот [93]

Лишь 10 аминокислот могут синтезироваться в организмах млекопитающих. В синтезе этих заменимых аминокислот (рис. 1-11) используются простые продукты углеводного обмена; процесс включает несколько стадий.

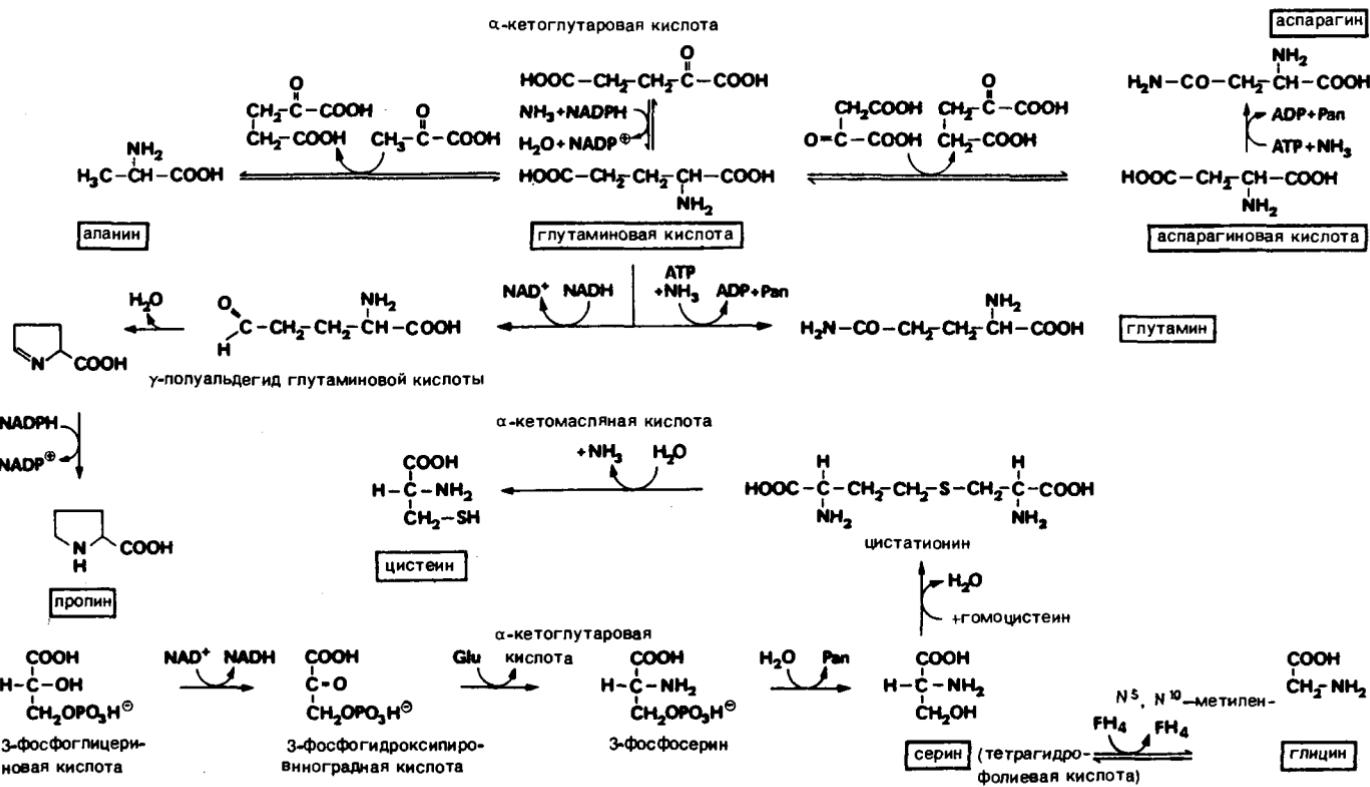


Рис. 1-11. Биосинтез заменимых аминокислот. Не показан синтез тирозина; он образуется гидроксилированием фенилаланина.

Центральное положение занимает здесь глутаминовая кислота, которая образуется при реакции  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты с амиаком, а затем благодаря переаминированию передает аминогруппу другим аминокислотам.

Биосинтез незаменимых аминокислот исследовался преимущественно у микроорганизмов и высших растений, причем оказалось, что для разных видов наблюдаются только небольшие изменения путей синтеза. Исходными веществами в этих случаях тоже являются сравнительно простые алифатические соединения (см. табл. 1-9).

*Таблица 1-9. Исходные вещества для биосинтеза незаменимых аминокислот*

Аминокислота	Исходные вещества
Лейцин, валин	Пировиноградная кислота
Изолейцин	$\alpha$ -Кетомасляная кислота
Лизин	Кетоглутаровая кислота или полуальдегид аспарагиновой кислоты
Метионин, треонин	Гомосерин
Фенилаланин (тироzin)	Фосфоенолпиривиноградная кислота
Триптофан	Эритрозо-4-фосфат
Гистидин	5-Фосфорибозил-1-пирофосфат, глутамин, АТР

Биосинтез аминокислот с разветвленными боковыми цепями (Leu, Val, Ile) и ароматическими кольцевыми системами (Phe, Тир, Trp) происходит аналогично.

## 1.6. Разделение рацематов аминокислот [94, 95]

В 1851 г. Пастер показал, что синтетические аминокислоты и аминокислоты естественного происхождения различаются по их оптическим свойствам. Предположение, что синтетические соединения представляют собой эквимолярную смесь D- и L-энантиомеров, было подтверждено в 1886 г. микробиологическими исследованиями Шульца и Боссхардта. В том же году Пьютти удалось разделить на энантиомеры DL-аспарагин путем перекристаллизации из водного раствора. Эрлих детально исследовал ферментативный метод расщепления рацематов и выделил с хорошими выходами в чистом виде D-антиподы ряда важных аминокислот. Первое химическое разделение рацемата было проведено Фишером в конце прошлого века. Для этого из N-ациламинокислот были получены соли с алкалоидами. Такие диастереомерные соли имеют различные физические свойства.

В настоящее время разделение рацематов аминокислот осуществляют в промышленном масштабе. При этом особое значение имеют хроматографи-

фическое разделение на носителях с хиральными группами, методы селективной кристаллизации и ферментативные разделения с помощью фиксированных на носителях ферментов. Для того чтобы рацемат полностью перевести в L-или D-форму, второй антипод, полученный при разделении рацемата, *рацемизацией* снова переводится в DL-аминокислоту, которая опять подвергается разделению на оптические антиподы. Рацемизацию проводят ферментативно с помощью специфических рацемаз или действием уксусного ангидрида, а в случае свободных аминокислот и их солей — нагреванием до 200 — 250 °C водных растворов под давлением.

Длительный естественный процесс рацемизации ведет к образованию определенных D-аминокислот в окаменелостях и морских отложениях. Например, для эпимеризации L-изолейцина в D-алло-изолейцин период полу-превращения составляет ~ 100 000 лет, так что можно использовать определение степени рацемизации для установления возраста пород (аминокислотное датирование [96 — 98], которое далеко превышает область датирования по радиоактивному углероду). Следует, однако, принимать во внимание, что рацемизация свободных аминокислот зависит также от температуры, pH, ионной силы и ионного состава среды [99].

Одним из неразрешенных вопросов, касающихся пребиотического периода, является разделение на энантиомеры полученных абиогенным путем DL-аминокислот. Возможно, в этом процессе участвовал циркулярно- или эллиптически-поляризованный свет, возникающий при отражении от поверхности моря; он мог активировать преимущественное образование в химических реакциях одного из антиподов. В 1977 г. Норден [100] получил экспериментальное доказательство фоторазложения или фотоинверсии энантиомеров при облучении водных растворов DL-аминокислот циркулярно-поляризованным светом. Облучение вело к накоплению энантиомеров с положительным циркулярным диахромизмом. Этим может объясняться преобладание L-аминокислот в биосфере. Преимущественное разрушение D-антиподов при действии  $^{90}\text{Sr}$ - $\beta$ -излучения на DL-тирозин (Гарей, 1968 г.) тоже говорит в пользу оптического отбора.

Другая принципиальная возможность преимущественного накопления одного энантиомера основана на энантиоселективном обмене с неорганическими хиральными носителями. Так, например, кварцевый порошок абсорбирует из диметилформамидного раствора DL-аланина преимущественно D-аланин (D:L = 49,5:50,5), из раствора гидрохлорида изопропилового эфира DL-аланина — гидрохлорид D-эфира с обогащением от 1,5 до 12,4% [101]. Происхождение оптической активности обсуждается в работах [102 — 104].

### 1.6.1. Методы кристаллизации [105]

В некоторых случаях при кристаллизации из пересыщенных растворов образуются не смешанные кристаллы DL-энантиомеров, а эвтектика из кристаллов D- и L-изомеров, так что энантиомеры можно отделить друг от друга механическим отбором. В ряду аминокислот применение этого метода ограничено, так как только аспарагин, глутаминовая кислота и треонин выпадают в виде хорошо образованных кристаллов (*спонтанная кри-*

*стализация*). Практическое значение имеет метод *затравки*: в пересыщенные растворы аминокислот вводят кристаллы D- или L-энантиомеров соответствующей аминокислоты. Выкристаллизовывающаяся аминокислота имеет такую же конфигурацию, как добавленная затравка. Этот метод успешно применяется для расщепления глутаминовой кислоты, гистидина, треонина, аспарагиновой кислоты, аспарагина и глутамина.

Методы кристаллизации успешно применяются также в случае аммониевых солей ацилированных аминокислот (Trp, Phe) или в случае солей аминокислот с ароматическими сульфокислотами, например сульфаниловая кислота или антрахинон- $\beta$ -сульфокислота используются для разделения лизина, сульфаниловая кислота — для серина.

### 1.6.2. Химические методы

Химические методы расщепления рацематов основаны на образовании диастереоизомерных солей с оптически активными вспомогательными веществами и разделении их фракционной кристаллизацией. Для образования солей с N-ацил(или N-алкил)-аминокислотами применяют алкалоиды,  $\alpha$ -фенилэтиламин, фенхиламин, хлорамфеникол и его синтетический предшественник 1(+)-*treo*-1-(4-нитрофенил)2-амино-1,3-пропандиол.

Для образования солей с такими производными аминокислот, как эфиры, амиды, гидразиды и нитрилы, в качестве оптически активных вспомогательных веществ успешно применяют винную кислоту, дibenзоил-D-винную кислоту или D-камфорсульфокислоту.

Успех химического расщепления рацематов зависит от вида и количества применяемого растворителя, температуры кристаллизации и легкости отщепления вспомогательного вещества от диастереомерной соли. Только в исключительных случаях выделение оптически чистого энантиомера удается без последующей перекристаллизации. Высокую чистоту имеют соединения, самопроизвольно выделившиеся в твердую фазу в виде кристаллов из растворов продуктов реакции. Можно повлиять на поведение энантиомера при кристаллизации, добавляя вспомогательные вещества противоположной конфигурации. Так, например, при добавлении L-винной кислоты вместо D-винной диастереомер, который раньше оставался в маточном растворе, выделялся в виде кристаллов высокой степени оптической чистоты.

### 1.6.3. Ферментативные методы

Среди ферментативных методов получения оптически активных аминокислот различают три направления:

- 1) селективное окисление или декарбоксилирование энантиомеров DL-аминокислот специфическими ферментами;
- 2) катализируемый ферментами асимметрический синтез производных аминокислот;

3) ферментативный гидролиз  $\alpha$ -амино- или  $\alpha$ -карбоксизамещенных производных аминокислот.

Первое направление нашло лишь ограниченное применение для получения специфически меченные энантиомеров. Из экономических соображений вместо изолированных оксидаз и карбоксилаз вводят микроорганизмы (дрожжи, *Penicillium glaucum*, *Aspergillus niger*, *E. coli* и т. д.), которые содержат нужные системы ферментов и могут использовать в своем обмене только один антипид (обычно L-форму).

Второе направление использует стереоспецифическое образование анилидов и фенилгидразидов N-ациламинокислот из N-ацил-DL-аминокислот и анилина или фенилгидразина, катализируемое папапном и пепсином. Для успешного протекания реакции должны получаться нерастворимые продукты (из хорошо растворимых исходных веществ). Метод применим и для расщепления аминокислот с двумя центрами хиральности. Это было показано Соколовской и др. [108] на примере реакции бисбензилоксикарбонилдиаминопимелиновой кислоты с анилином, катализируемой папапном. При этом получается кристаллический LL-моноанилид (исходное DD-соединение остается неизменным).

Большое значение имеет введенный Гринштейном ферментативный гидролиз, при котором ацетил- или хлорацетиламинокислоты расщепляются ацилазами. Реже применяют расщепление эфиров DL-аминокислот с помощью эстераз. Благодаря использованию фиксированных на носителе микробных ферментов (в ос-

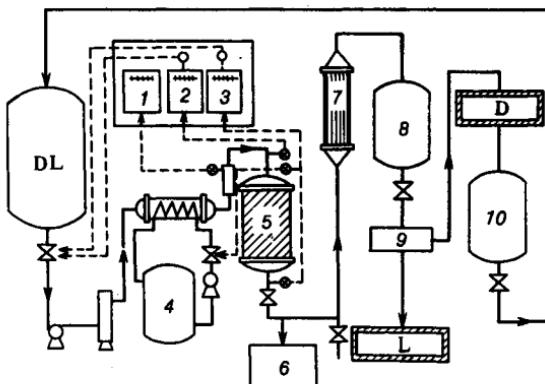


Рис. 1-12. Непрерывное производство кристаллических L-аминокислот на иммобилизованной аминоцилазе. DL — ацетил-DL-аминокислота, L — L-аминокислота, D — ацетил-D-аминокислота, 1 — 3 — приборы для измерения скорости потока, pH и температуры, 4 — камера с горячей водой, 5 — колонка с иммобилизованной аминоцилазой, 6 — автоматический самописец, 7 — испаритель, 8 — камера кристаллизации, 9 — фильтр-разделитель, 10 — камера для рацемизации.

новном это системы аминоацилаз — ДЭАЭ-сифадекс) этот процесс был автоматизирован и заметно удешевлен. Метод применяется для промышленного получения ряда L-аминокислот (Phe, Val, Met, Trp, DOPA и др.). Остающиеся при расщеплении N-ацил-D-аминокислоты рацемизируются и снова вводятся в процесс расщепления [53]. Схема непрерывного процесса получения L-аминокислот с помощью иммобилизованных ацилаз представлена на рис. 1-12.

## 1.7. Анализ аминокислот [109, 110]

Для аналитического определения аминокислот разработано множество методов, из которых здесь рассматриваются только методы бумажной, тонкослойной, ионообменной и газовой хроматографии, а также ферментативные и изотопные методы.

Аминокислотный анализ существенно способствовал бурному развитию химии белка. Главными областями применения аминокислотного анализа (наряду с идентификацией отдельных аминокислот) являются установление аминокислотного состава белковых гидролизатов, определение первичной структуры белков, а также аналитический контроль пептидного синтеза.

### 1.7.1. Хроматографические методы [109 — 117]

При хроматографическом разделении смесь веществ в подвижной фазе транспортируется через стационарно закрепленную (неподвижную) фазу. При этом компоненты смеси из-за различий в строении, растворимости, полярности или заряде вступают в специфическое взаимодействие с неподвижной фазой, которое обусловливает различные скорости транспорта компонентов.

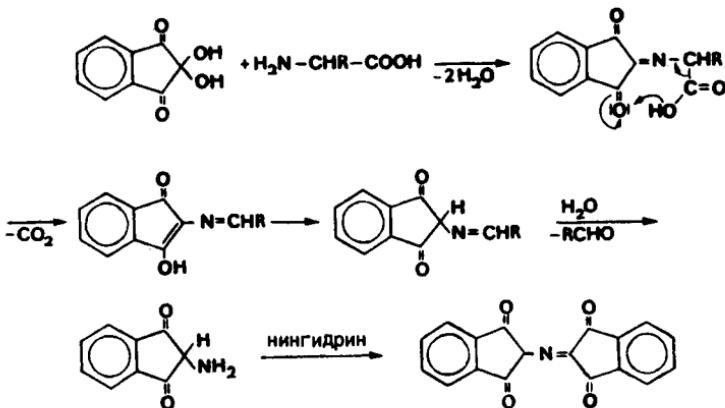
В соответствии с агрегатным состоянием подвижной фазы различают жидкостную хроматографию (ЖХ) и газовую хроматографию (ГХ). Кроме того, по совокупности возможных комбинаций разделения различают следующие виды хроматографии: жидкость — твердая фаза (ЖТХ), жидкость — жидкость (ЖЖХ), газ — твердое тело (ГТХ) и газожидкостную (ГЖХ).

Если растворенное вещество вступает во взаимодействие с твердой стационарной фазой, то основной эффект разделения определяется адсорбционным равновесием. В этом случае говорят об адсорбционной хроматографии в противоположность распределительной хроматографии, при которой разделение компонентов происходит соответственно их распределению по закону Нернста. В случае жидкостной хроматографии на процесс разделения могут оказывать влияние физико-химические свойства подвижной фазы. Если состав подвижной фазы в ходе процесса разделения ступенчато или непрерывно меняется, то говорят о градиентной хроматографии. Современная высокоэффективная хроматография основана на ис-

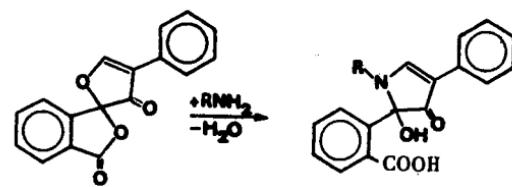
пользовании стационарных фаз с частицами малых диаметров с применением давления до 700 бар. В газовой хроматографии высокий эффект разделения достигается применением капиллярной техники, в особенности введением стеклянных капилляров. Современные аминокислотные анализаторы автоматизированы таким образом, что процесс анализа занимает немного времени. Градиентное элюирование осуществляется дозирующими устройствами. Высокочувствительная детекторная система делает возможной точную работу сnano- и пикограммовыми количествами.

Идентификация аминокислот производится в большинстве случаев с помощью окрашенных или флуоресцирующих производных или с помощью радиоактивных реагентов [118]. Особенно важными являются реакции с нингидрином и флуорескамином.

В случае реакции с нингидрином получается сине-фиолетовая окраска (максимум поглощения 570 нм; для пролина 440 нм) в результате взаимодействия  $\alpha$ -аминогруппы и реагента по схеме:



Техника работы с флуорескамином разработана в 1972 г. [119 — 122]. Аминокислоты реагируют при комнатной температуре с 4-фенилспирофуран-2(3Н)-1'-фталаном (флуорескамином) и дают сильнофлуоресцирующие соединения. Сам флуорескамин и полученные разрушением его избытка продукты гидролиза не обнаруживают собственной флуоресценции. В противоположность нингидрину реагент практически нечувствителен к аммиаку. Примерно так же ведет себя 2-метокс-2,4-дифенил-3-(2Н)-фuranон (МДФФ).



флуорескамин

Из других показательных реакций высокую чувствительность имеют реакции с 2,4,6-тринитробензолсульфокислотой, 1,2-нафтохинон-4-сульфокислотой (аминокислотный реагент Фолина), 4,4'-тетраметилдиаминодифенилметаном (ТДМ, голубое окрашивание) [123], а также образование интенсивно флуоресцирующих производных с 2-фталевым альдегидом в присутствии восстановителей [124 — 126], пиридоксалем и Zn(II) [127, 128], дансилхлоридом (5-диметиламинонафтилинсульфонилхлоридом) [129, 130] и [ $^3\text{H}$ ]-бансилхлоридом (5-ди-*n*-бутиламинонафтилинсульфонилхлоридом) [131, 132] и мансилхлоридом (*N*-метил-2-анилин-6-нафтилинсульфонилхлоридом) [132]. Интенсивность флуоресценции можно значительно усилить применением смешанных систем растворителей, например ДМСО —  $\text{H}_2\text{O}$  [133].

### 1.7.1.1. Бумажная хроматография

Бумажная хроматография, впервые примененная в 1944 г. Консденом, Гордоном и Мартином, представляет собой распределительную хроматографию, при которой адсорбционно связанная с целлюлозой вода образует стационарную, а смесь органических растворителей — подвижную фазу. Непрерывная диффузия растворенных компонентов из одной фазы в другую приводит к их распределению между фазами. Отношение концентраций при таком распределении соответствует закону распределения Нернста  $C = c_2/c_1$ , где  $C$  — зависящий от температуры коэффициент распределения, а  $c_1$  и  $c_2$  — концентрации вещества в обеих фазах. После идентификации разделенных веществ их положение на хроматограмме характеризуется коэффициентом удерживания  $R_f$  (от англ. retention factor):

$$R_f = \frac{\text{расстояние, пройденное веществом}}{\text{расстояние, пройденное подвижной фазой}}$$

Часто коэффициент удерживания указывают в процентах ( $hR_f$ ) или как относительную величину (к стандарту)  $R_{st}$  (расстояния, пройденные отдельными веществами, относят к одному определенному веществу, см.  $R_{\text{Leu}}$  в табл. 1-10).

Существует определенная связь между строением и значением  $R_f$ . Аминокислоты с заряженными или полярными боковыми цепями (аминодикарбоновые и диаминодикарбоновые кислоты, гидроксикислоты) имеют более низкие значения  $R_f$ , чем аналогичные аминокислоты с незамещенными боковыми цепями. С повышением гидрофобного влияния боковой цепи повышается значение  $R_f$ , например, в ряду Gly < Ala < Val < Leu.

В табл. 1-10 приведены значения  $R_f$  и  $R_{\text{Leu}}$  протеиногенных аминокислот, полученные при хроматографии на бумаге шляйхер-шуль 2043 в в системах бутанол — уксусная кислота — вода (4:1:1) и бутанол — изомасляная кислота — уксусная кислота — вода (5:0,5:0,7:5). Значения  $R_{\text{Leu}}$  — результаты трехкратного элюирования. Значения коэффициентов удерживания воспроизводятся, если хроматографирование идет в направлении волокна бумаги.

В настоящее время бумажная хроматография применяется чаще всего как двумерная хроматография. Для хроматографирования в первом направ-

Таблица I-10. Значения  $R_f$  и  $R_{Leu}$  протеиногенных аминокислот [138]

Аминокислота	$R_f$	$R_{Leu}$	Аминокислота	$R_f$	$R_{Leu}$
Cys	0,07	0,04	Ala	0,44	0,44
Lys	0,14	0,09	Pro	0,43	0,50
His	0,20	0,11	Tyr	0,45	0,56
Arg	0,20	0,14	Trp	0,50	0,63
Asp	0,19	0,21	Met	0,55	0,75
Ser	0,27	0,23	Val	0,60	0,77
Gly	0,26	0,27	Phe	0,68	0,91
Glu	0,30	0,32	Ile	0,72	0,98
Thr	0,35	0,35	Leu	0,73	1,00

лении применяют главным образом систему бутанол — уксусная кислота — вода (4:1:5); во втором направлении работают с несколькими системами: этанол — вода (95:5), бензиловый спирт — вода (70:30), пиридин — амиловый спирт — вода (35:35:30).

### 1.7.1.2. Тонкослойная хроматография [139 — 143]

Методом тонкослойной хроматографии (ТХ) можно быстро разделить аминокислоты; метод требует несложного оборудования и малых исходных количеств. Для изготовления слоев толщиной 0,1 — 0,3 мм применяют стандартные носители, такие, как силикагель, оксид алюминия, порошок целлюлозы, ионообменники на основе целлюлозы, полиамиды, а также поликарбамидный и декстрановый гели. В зависимости от материала носителя ТХ бывает адсорбционной (например, разделение на силикагеле и оксиде алюминия) или распределительной (например, разделение на слоях целлюлозы). В качестве подвижной фазы применяют те же системы, что и для бумажной хроматографии.

На рис. 1-13 приведены результаты двумерного разделения гидролизата В-цепи инсулина на силикагеле G.

При определении очень малых количеств аминокислот применяют проявление ТХ-пластинки флуорескамином [раствор 10 мг флуорескамина в смеси ацетон/тексан (1:4)] [145]. После элюирования подходящим растворителем наблюдают флуоресценцию при 366 нм. Предел обнаружения метода при проявлении с помощью производного флуорескамина 10 пмоль.

Особенно легко и быстро удается разделить смесь аминокислот с помощью комбинации двумерного разделения, например тонкослойного электрофореза на целлюлозе и хроматографии (метод «отпечатков пальцев»). Сначала проводят электрофорез (низковольтный электрофорез без охлаждения, 20 В/см, муравьиная кислота), а затем хроматографируют во втором направлении, например с элюентом состава *прем*-бутанол:метанол:пиридин:муравьиная кислота:вода (33:43:9,6:0,4:20). В слу-

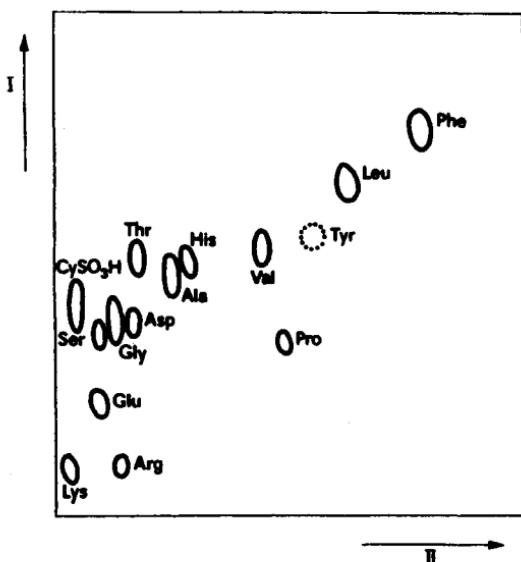


Рис. 1-13. Разделение гидролизата В-цепи инсулина с помощью тонкослойной хроматографии [144]. Состав элюента и время: направление I — хлороформ/метанол/17%-ный раствор  $\text{NH}_4\text{OH}$  (2:1:1), 75 мин; направление II — фенол/вода (75:25), 180 мин.

чае тонкослойного электрофореза биологического материала не требуется предварительной деминерализации (обессоливания) образца. Легкоподвижные чужеродные ионы через небольшой промежуток времени после начала электрофореза уходят из области разделения аминокислот.

### 1.7.1.3. Ионообменная хроматография [146, 147]

После установления условий проведения количественной нингидринной реакции Муру и Штейну удалось в 1948 г. разделить 2,5 мг гидролизата сывороточного альбумина быка с помощью распределительной хроматографии на колонке с крахмалом. Элюат был разделен на 400 фракций, в каждой фракции проведена нингидринная реакция, и из интегральных кривых по-глощения, соответствующих отдельным аминокислотам, рассчитывались их молярные доли в смеси. На коллег-современников большое впечатление произвели высокая скорость анализа (1 нед), малое количество анализируемого вещества и малая погрешность ( $\pm 3\%$ ).

С переходом к ионообменной хроматографии Шпакман, Мур и Штейн смогли автоматизировать анализ [148]. Принцип работы первых автоматических аминокислотных анализаторов показан на рис. 1-14.

В качестве ионообменников применялись смолы даузкс и амберлит. Разделение аминокислот проходило в колонке 9,9×150 см с помощью непрерывно прокачива-

## Анализ аминокислот

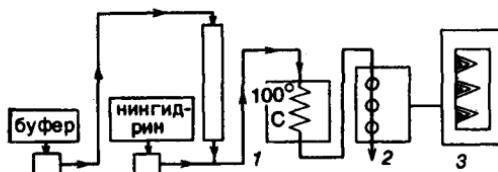


Рис. I-14. Автоматический аминокислотный анализатор по Шпакману, Муру и Штейну.

мого цитратного буфера (рН 3,25 и 4,25). Элюат подавался в капиллярную тефлоновую трубку 1, где взаимодействовал с нингидрином (15 мин при 100° С); интенсивность нингидринного окрашивания измерялась в проточном колориметре 2 и регистрировалась самописцем 3. Время анализа 24 ч. Мур и Штейн совместно с Аинфинсеном получили за эту работу в 1972 г. Нобелевскую премию по химии.

Автоматические аминокислотные анализаторы все время совершенствуются [149]. Современные чувствительные автоматические анализаторы требуют для разделения белкового гидролизата 2 — 3 ч. Цех и Вольтер предложили жидкостную хроматографическую систему под давлением; это позволяет проводить анализ за 45 мин, причем предел обнаружения лежит в области пикомолей.

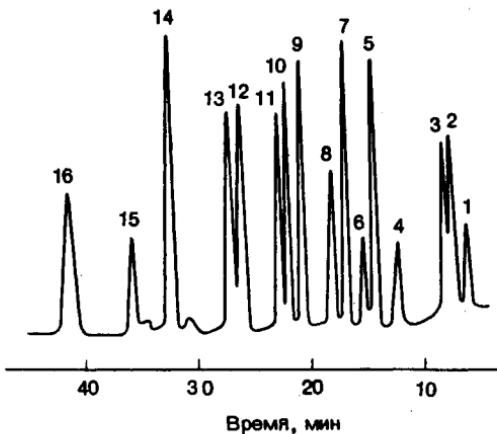


Рис. I-15. Жидкостная хроматограмма высокого давления гидролизата аминокислот. Разделение на колонке Хевлетта — Паккарда НР 1010 В (3 × 250 мм), наполненной сильнокислой полистиролдивинилбензольной ионообменной смолой (размер зерен 8 — 2 мкм): концентрация аминокислоты: 500 пмоль/л, реагент для детектирования — флуорескими; детектор флуориметрический типа Хевлетта — Паккарда (типа 1033 А).

1 — Asp, 2 — Thr, 3 — Ser, 4 — Glu, 5 — Gly, 6 — ALa, 7 — Cys, 8 — Val, 9 — Met, 10 — Ile, 11 — Leu, 12 — Түг, 13 — Phe, 14 — Lys, 15 — His, 16 — Arg.

### 1.7.1.4. Газовая хроматография [151 — 156]

Газовая хроматография предложена как метод Джеймсом и Мартином в 1952 г.; как метод химического анализа ГХ отличается особо высокой производительностью. Благодаря высокой скорости потока подвижной фазы (газообразные водород, гелий, азот и аргон) достигается быстрое установление фазового равновесия. В качестве стационарной фазы применяют чаще всего силикон, полизифир или полигликоль на таких носителях, как цеолит, хромосорб, стерхамол и др. Длина колонки при обычных разделениях колеблется от 1 до 6 м, при разделениях энантиомеров на капиллярных колонках их длина достигает 150 м. Идентификация разделенных веществ производится высокочувствительными детекторами — пламенно-ионизационным ( $10^{-10}$  моль), электронзахватывающим, а также работающими на основе измерения теплопроводности ( $10^{-16}$  моль). Предел обнаружения

**Таблица 1-11.** Производные аминокислот для газохроматографического разделения

Аминофункция	Карбоксильная функция	Неподвижная фаза	Литература
Ацетил	Пропиловый эфир	Карбовакс 20-MX	159
Трифторацетил (ТФА)	Метиловый эфир	XE-60/QE-1/MS-200	160
Гептафторбутирил (ГФБ)	Бутиловый эфир Метиловый эфир Пропиловый эфир Изоамиловый эфир	Ализон М ПЭГ/адипат/апиезон OV-1 SE-30	161 162 163 164
Триметилсилил (TMC)	Триметилсилиловый эфир (TMC-эфир)	OV-11	165
Динитрофенил (ДНФ)	Метиловый эфир	SE-30	166
<i>Циклические производные аминокислот</i>			
Фенилтиогидантон (ФТГ-аминокислоты)	TMC-эфиры	OV-101/OV-225	167
Метилтиогидантон (МТГ-аминокислоты)	TMC-производные	OV-17	168
Оксазолидинон [2,2-бис(хлордифторметил)оксазолидин-5-он]		Силикон	169

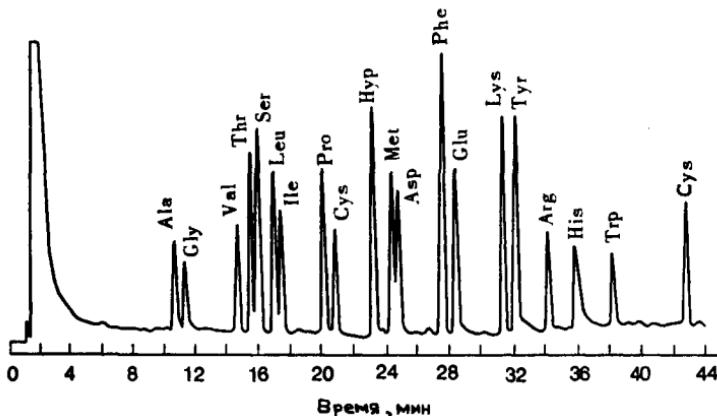


Рис. 1-16. ГХ-анализ N-ГФБ-пропиловых эфиров 20 протеиногенных аминокислот.

жения лежит в нано- и пикомольной области. Газовая хроматография в сочетании с масс-спектрометрией предоставляет идеальные возможности для обнаружения неизвестных аминокислот и пептидных структур [157 — 158].

Существенный недостаток ГХ состоит в том, что для анализа нельзя непосредственно использовать труднолетучие аминокислоты. Сначала их нужно перевести в летучие соединения путем получения подходящих производных или с помощью реакций разложения. Наилучшим оказалось одновременное замещение амино- и карбоксильной функций аминокислот. В табл. 1-11 приведены производные аминокислот, с которыми удалось полное разделение, или получены достаточно удовлетворительные результаты. Продукты распада, такие, как альдегиды, амины, аминоспирты, нитрилы, гидроксикислоты и др., до сих пор не удалось однозначно идентифицировать.

О применении газовой хроматографии для определения рацемизации при пептидном синтезе сообщается в разд. 2.2.6.2, для установления аминокислотной последовательности — в разд. 3.6.1.2.2.

На рис. 1-16 приведены результаты газохроматографического разделения 20 протеиногенных аминокислот в виде N-гептафторбутирилпропиловых эфиров. Получение производных осуществлялось взаимодействием с ангидридом гептаформасляной кислоты.

#### 1.7.1.5. Хроматографическое разделение энантиомеров

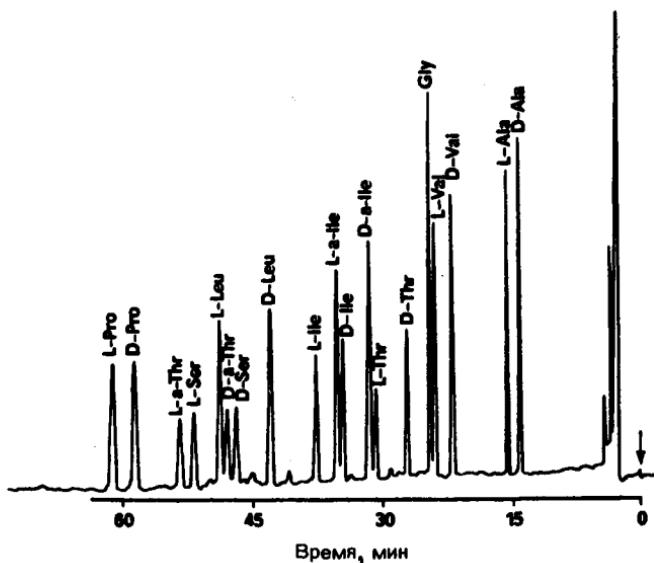
Хроматографические методы разделения энантиомеров применяются прежде всего при определении конфигурации аминокислот, для исследования рацемизации и для препаративного выделения небольших количеств энантиомеров. Некоторые аминокислоты могут быть разделены на оптические

антиподы с помощью бумажной и тонкослойной хроматографии. При этом разделение достигается применением оптически активных элюентов или взаимодействием с хиральными молекулами целлюлозы.

На альгинатсиликагелевых бумагах L-аминокислоты более подвижны, чем D-аминокислоты.

В случае лигандаобменной хроматографии [170 — 173] применяют хиральные полимерные носители, которые содержат ионы переходных металлов ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  и др.), координационно связанные оптически активными аминокислотами так, что остаются ненасыщенные координационные связи. В ходе разделения свободные координационные связи занимаются лигандами подвижной фазы. Таким образом был разделен ряд DL-аминокислот на полистирольных смолах с L-пролином, сульфированным фенилаланином [174], L-гидроксипролином [175] и другими энантиомерами аминокислот в качестве фиксированных лигандов. Некоординированные энантиомеры элюировались в виде комплекса с ионом  $\text{Cu}^{2+}$ , координированные энантиомеры вымывались концентрированным аммиаком.

В случае газохроматографического разделения энантиомеров различают методы, основанные на двух принципах:



*Рис. 1-17. Разделение энантиомеров изопропиловых эфиров пентафторпропиониламинокислот в стеклянной капиллярной колонке (20 м) с N-TFA-L-Phe-L-Asp-бисциклогексиловым эфиром в качестве неподвижной фазы. Температура 130° С; температурная программа: 10° С/мин до 165° С.*

- 1) получение производных энантиомеров с оптически активными реагентами с последующим разделением на оптически неактивной фазе;
- 2) непосредственное разделение энантиомеров на хиральной неподвижной фазе [176, 177].

В качестве хиральных реагентов для получения пригодных для хроматографии диастереомерных производных аминокислот используют оптически активные амиловый спирт как компонент этерификации для N-пентафторпропиониламинокислот [178] и  $\alpha$ -хлоризовалерилахлорид как ацилирующий компонент для эфиров аминокислот [179]. Применение продажных стеклянных капилляров с готовой неподвижной фазой обеспечивает оптимальное разделение большинства аминокислот.

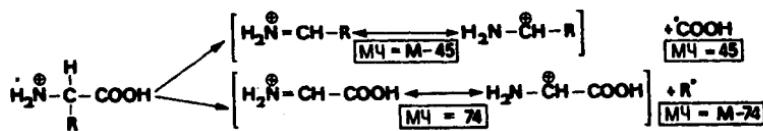
Использование второго принципа позволило разделить эфиры N-трифторацетиламинокислот в стеклянных капиллярах (диаметр 15 мм, длина 150 м), которые содержат в качестве оптически активной неподвижной фазы эфир N-трифторацетил-L, L-дипептида. Циклогексиловый эфир N-TFA-Val-Val [180] был применен для энантиомерного разделения аминокислот, а циклогексиловые эфиры N-TFA-Phe-Leu [181] и N-TFA-L-Abu-L-Abu [182] использовались при анализе образцов метеоритов. Особой термической устойчивостью отличаются бисциклогексиловый эфир N-TFA-Phe-Asp [183] и карборанилпропиловый эфир N-TFA-Val-Val [184]. По Кёнигу, эффект разделения основан на пространственном сближении между партнерами одинаковой конфигурации, причем кроме связывания водородными мостиками важную роль играет также диполь-дипольное взаимодействие между дипептидными и аминокислотными производными.

Байер и др. [185, 186] предложили хиральный полисилоксан для газохроматографического разделения энантиомерных аминокислот и других DL-соединений (гидроксикислоты, спирты, амины). В качестве хиральных якорных групп используются аминокислоты или пептиды, которые присоединяются к термически устойчивому органосилоксановому остову. Особенно подходящей оказалась фаза Chirasil-Val с *трем*-бутиламидом L-валина в качестве оптически активного лиганда.

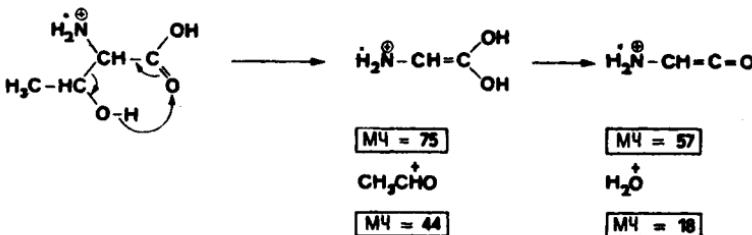
### 1.7.2. Масс-спектрометрический анализ аминокислот [187 — 189]

Принцип масс-спектрометрического анализа заключается в регистрации фрагментных ионов и радикалов, которые образуются при разложении первичного, полученного электронным ударом, богатого энергией молекуларного иона. Для оценки спектра требуется знание механизма реакций разложения ионизированной аминокислотной молекулы.

Характерное для  $\alpha$ -аминокислот разложение на стабилизированные мезомерией иминиевые ионы и относительно устойчивый радикал ·COOH и радикал боковой цепи R· идет по следующей схеме:



Кроме указанных реакций, дальнейшее фрагментирование зависит от строения боковой цепи. В показанном на рис. 1-18 масс-спектре треонина, например, кроме пика нормальных фрагментов ( $M\ddot{C} = 74$  и  $M\ddot{C} = 45$ ) можно наблюдать еще два пика относительно высокой интенсивности. Они обусловлены протекающей реакцией:



В связи с трудной летучестью аминокислот пробы вносятся в ионный источник масс-спектрометра при  $10^{-4}$  —  $10^{-5}$  Па и 100 — 150 °С. Благоприятно введение летучих производных аминокислот, которые применяются и для газовой хроматографии.

Масс-спектроскопия приобрела особое значение при анализе аминокислотных последовательностей белков (разд. 3.6.1.2.2). Для определения фенилтиогидантгоина используют *масс-спектроскопию полевой десорбции ионов*, причем применяется прибор высокого разрешения с фотодетектором.

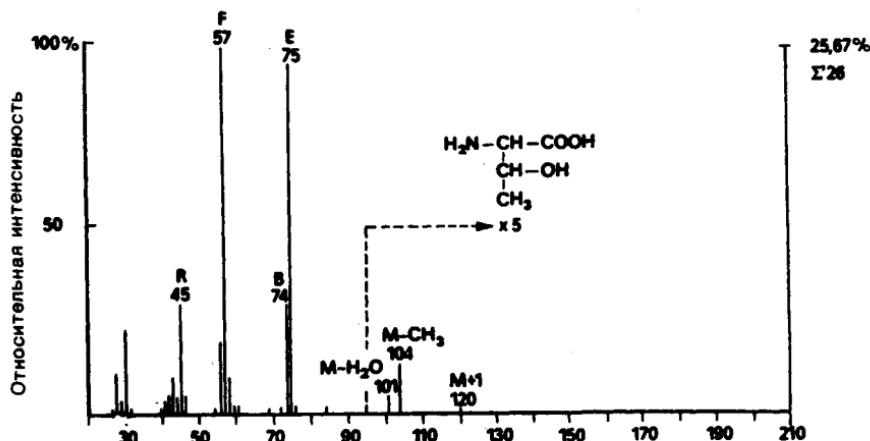


Рис. 1-18. Масс-спектр треонина (70 эВ).

Можно легко определять отдельные аминокислоты, так как благодаря высокой интенсивности молекулярных пиков из-за малого фрагментирования и относительно слабого межмолекулярного взаимодействия получают спектры высокого разрешения.

### 1.7.3. Методы анализа с использованием изотопов [192 — 194]

Изотопные методы являются обычными методами аминокислотного анализа; к ним относятся:

- 1) метод изотопного разбавления и
- 2) метод активированных производных.

В случае метода изотопного разбавления смешивают анализируемую пробу с определенным количеством меченой аминокислоты и рассчитывают степень разбавления изотопа после выделения определяемой аминокислоты:

$$B = \left( \frac{C_0}{C} - 1 \right) A$$

где  $B$  — искомое количество аминокислоты в пробе,  $A$  — количество добавленной меченой аминокислоты,  $C_0$  — концентрация изотопного элемента в добавленной аминокислоте и  $C$  — концентрация изотопного элемента в выделенной аминокислоте. Об ультрачувствительном методе изотопного разбавления для определения L-аминокислот сообщают Рубин и Гольдштейн [195].

В случае часто применяемого метода активированных производных аминокислот, подлежащая определению, сначала метится взаимодействием [195] с реагентами, которые содержат устойчивые или радиоактивные изотопы. Затем ее смешивают с избытком немеченого производного аминокислоты и очищают до постоянной молярной концентрации изотопа  $C_c$ . Количество  $w$  искомой аминокислоты находят по формуле

$$w = W \frac{C_c}{C_r}$$

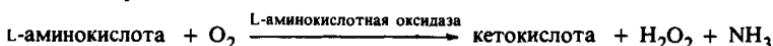
где  $W$  — количество добавленного неактивного производного,  $C_r$  — молярная концентрация изотопа в производном, полученном из реакции между очищенной аминокислотой и реагентом.

Особо чувствительный метод двойной метки основан на применении меченого  $[^3\text{H}]$ -дансилхлорида в качестве реагента и меченой  $[^{14}\text{C}]$ -аминокислоты как внутреннего стандарта. Отношение  $^3\text{H}:^{14}\text{C}$  в дансильном производном зависит от отношения количества добавленной  $[^{14}\text{C}]$ -аминокислоты к концентрации немеченой аминокислоты в пробе. Этот метод особенно подходит для идентификации аминокислот в биологическом материале. Его чувствительность лежит в пикомольной области [196].

### 1.7.4. Ферментативные методы

Ферментативные методы аминокислотного анализа основаны на определении продуктов реакции, которые образуются при биохимическом расщеплении аминокислот. Из-за их сравнительно низкой чувствительности ( $10^{-2} — 10^{-4}$  моль/л) эти методы применяют только при серийных анализах определенных аминокислот. К анализируемой смеси аминокислот добавляют специфическую декарбоксилазу (или же производящие эту декарбоксилазу микроорганизмы), и получающуюся при декарбоксилировании углекислоту определяют манометрически в аппарате Варбурга.

Все большее значение приобретает определение аминокислот с помощью ферментативных электродов [197 — 200], в которых стереоселективное расщепление катализируется иммобилизованными ферментами; например, в случае оксидазного электрода, специфичного к L-аминокислотам, расщепление протекает по схеме



Для определения можно использовать образующиеся  $\text{H}_2\text{O}_2$  или  $\text{NH}_3$ . Аммиак можно определять титрованием, пероксид водорода — либо амперометрически, либо по вторичной реакции с ионами  $\text{I}^-$ . Изменение концентрации  $\text{I}^-$  можно регистрировать иодселективным электродом.

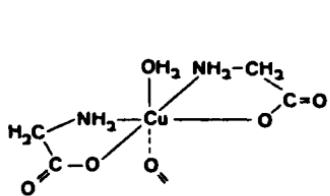
### 1.8. Специфические реакции аминокислот

Химические реакции аминокислот определяются их функциональными группами и столь многочисленны, что следует остановиться только на важнейших из них. О реакциях, которые ведут к производным аминокислот, имеющим значение для синтеза пептидов, говорится в гл. 2.

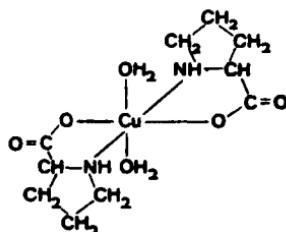
#### 1.8.1. Образование комплексов с металлами [201]

Аминокислоты образуют с ионами тяжелых металлов хелатные комплексы, из которых наиболее известны темно-синие, хорошо кристаллизующиеся соединения с  $\text{Cu(II)}$ . Образование хелата типа  $\text{CuA}_2$  используется при комплексометрическом титровании ряда аминокислот. Титрование производят раствором сульфата меди(II) при  $\text{pH} 9$  в присутствии мурексида как индикатора [202].

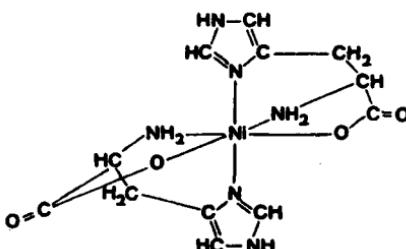
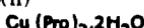
Анализ кристаллических структур комплексов белков с металлами показал, что аминокислотные комплексы металлов имеют октаэдрическое строение, причем два остатка аминокислоты связаны с центральным атомом металла амино- и карбоксильными группами, а свободные координационные места заняты водой. Особой устойчивостью отличаются комплексы с аминокислотами, имеющими функциональные боковые цепи, как, например, гистидин, азот имидазола в котором образует дополнительную связь с центральным атомом.



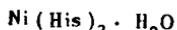
гидрат бис-глицинат меди (II)



дигидрат бис-DL-пролината меди(II)



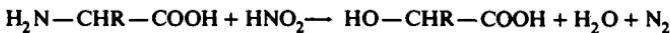
гидрат бис-L-гистидината никеля(II)



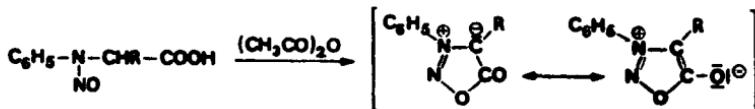
Бек и др. [203] провели систематические исследования комплексов аминокислот и простых пептидов с платиной (II). При этом оказалось, что построенные из аминокислотных комплексов платины(II) олигопептидные комплексы типа *cis*-PtAS<sub>2</sub>X<sub>2</sub> (AS<sub>2</sub> — эфир дипептида, X — анионный лиганд, например Cl<sup>-</sup>) обладают противоопухолевым действием.

### 1.8.2. Реакции с азотистой кислотой

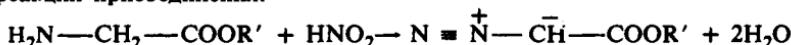
Свободные аминокислоты как первичные амины реагируют с HNO<sub>2</sub> с отщеплением азота. При этом аминогруппа замещается гидроксилом и изменения конфигурации у хиального атома углерода не происходит. Измерение количества выделяющегося азота служит для количественного определения аминокислот по ван Слайку (1910 г.):



Из N-алкил(или арил)-аминокислот и HNO<sub>2</sub> получаются сидноны. Сначала получается нитрозамин, при дегидратации которого с помощью ацетангирида происходит замыкание кольца.

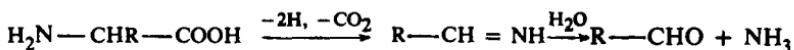


Фенилзамещенные сидноны и сиднонимины представляют фармакологический интерес благодаря их противоопухолевому, бактериостатическому и жаропонижающему действию [204]. Эфиры аминокислот при реакции с  $\text{HNO}_2$  переходят в относительно устойчивые диазоэфиры. Известным примером является диазоуксусный эфир, получающийся из эфира глицина, который находит применение в органическом синтезе для расширения циклов и реакций присоединения:



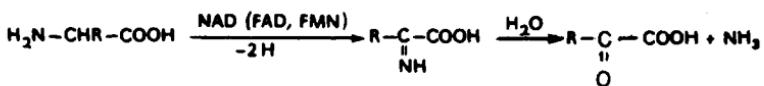
### 1.8.3. Окислительное дезаминирование

Эlimинирование аминогруппы аминокислоты происходит при окислении с образованием карбонильного соединения и амиака. Впервые оно наблюдалось Штрекером (1862 г.) при взаимодействии аланина с аллоксаном. В качестве окислителей применяются ди- и трикетоны, N-бромусукцинид, оксид серебра(II) и др. Конечными продуктами реакции, протекающей с одновременным декарбоксилированием, являются альдегид, цепь которого на один С-атом короче, и амиак:



Окислительное дезаминирование аминокислот нингидрином имеет аналитическое значение (разд. 1.7.1).

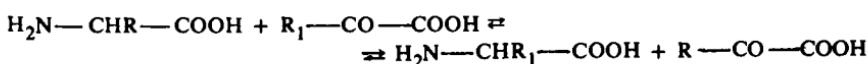
При биохимическом дезаминировании аминокислот аминогруппа на первой стадии реакции под влиянием D- и L-аминокислотных оксидаз дегидрируется в иминогруппу, затем полученная иминокислота гидролизуется в кетокислоту:



При этом в роли акцепторов водорода выступают никотинамидаденидинуклеотид, флавинаденидинуклеотид или флавинмононуклеотид. Образующийся амиак токсичен для организмов и выделяется у человека и других млекопитающих в виде мочевины, у птиц и рептилий в виде мочевой кислоты.

### 1.8.4. Переаминирование

Аминогруппа аминокислоты может переноситься в обратимой реакции на кетокислоту, и при этом получаются новая аминокислота и новая кетокислота:



Биохимическое переаминирование — важнейшая реакция переноса группы в аминокислотном обмене. Она катализируется аминотрансферазами (трансаминазами), коферментом является пиридоксальфосфат, который принимает участие в обмене аминогрупп, образуя шиффовы основания в качестве промежуточной ступени.

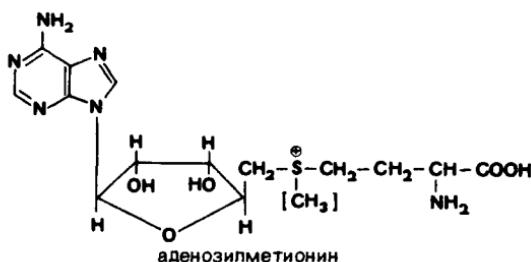
Путем переаминирования большинство аминокислот может превращаться одна в другую или заменяться соответствующей кетокислотой. Поэтому реакции переаминирования — одни из важнейших при биосинтезе заменимых аминокислот. Особенно легко переаминируются глутаминовая и аспаргиновая кислоты. Соответствующие им трансаминазы (глутаматкса-лацетаттрансаминаза и глутаматпируваттрансаминаза) имеют очень высокую активность. Кетокислоты, получающиеся из этих аминодикарбоновых кислот ( $\alpha$ -кетоглутаровая и шавелевоуксусная кислоты), осуществляют связь углеводного и белкового обмена.

### 1.8.5. N-Алкилирование

По числу соединенных с азотом алкильных групп различают моно-, ди- и триалкиламинокислоты. Помимо полного алкилирования аминогруппы (пералкилирование) проходит с диазоалканами или диалкилсульфатами, причем оно идет ступенчато через моно- и диалкилированные продукты. Моно- и диметиламинокислоты принимают участие в образовании пептидов микробного происхождения.

Некоторые перметилированные аминокислоты обнаружены в природе, например *Herzynin* как бетаин гистидина в шампиньонах, *Nyraphorin* как бетаин триптофана в семенах *Erythrina hypaphoros*, *Stachydrin* как бетаин пролина в *Stachys* и других растениях и гомобетаин  $\beta$ -аланина в мясном экстракте. Название «бетаины» произошло от латинского (*Beta Vulgaris* — сахарная свекла, в которой имеется простейший представитель этого ряда бетаин ( $\text{CH}_3)_3\text{N}^+ \text{-CH}_2\text{-COO}^-$ ). Они всегда находятся в цвиттер-ионной форме.

При биохимическом N-метилировании роль донора метильной группы исполняет аденоцилметионин, получающийся из метионина и аденоцинтрифосфата:

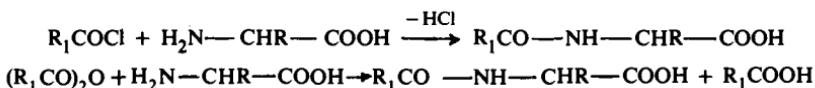


В качестве активного сульфониевого соединения S-аденоцилметионин переносит связанную с ним метильную группу в виде  $\text{CH}_3^+$  к свободной электронной паре.

тронной паре азота, а сам он при этом переходит в аденоцилгомоцистеин. Из коламина  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$  получается при этом, например, холин  $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$ , из гуанидоуксусной кислоты  $\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{NH})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{COOH}$  — креатин  $\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{NH})-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{COOH}$ .

### 1.8.6. N-Ацилирование

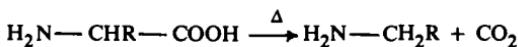
При взаимодействии ацилирующих реагентов (хлорангидриды, ангидриды и др.) с аминокислотами получаются по реакции Шоттена — Баумана N-ациламинокислоты:



Полученные N-ацильные соединения обычно хорошо кристаллизуются и подходят для характеристики и идентификации аминокислот. Часто N-ацильные остатки можно легко и быстро отщепить снова, так что они могут служить временной защитой аминогруппы (разд. 2.2.4.1.1). Фторзамещенные N-ациламинокислоты служат для приготовления легколетучих производных для газовой хроматографии, N-ацетил- и N-хлорацетиламинокислоты для ферментативного расщепления DL-соединений. Аминокислоты, ацилированные остатками природных жирных кислот, как, например, N-лауроил- и N-стеарилглутаминовая кислоты, приобретают большое значение в качестве поверхностно-активных веществ, не загрязняющих окружающую среду.

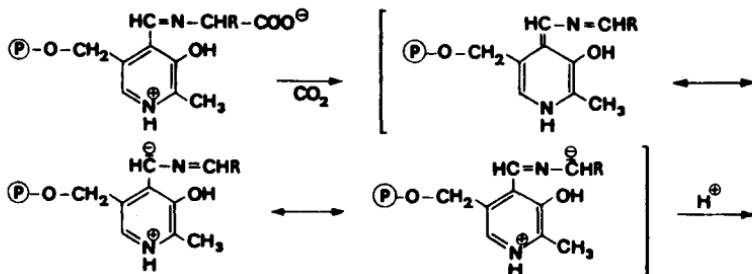
### 1.8.7. Декарбоксилирование

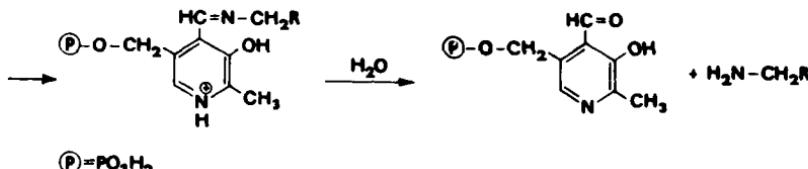
Из реакций карбоксильной группы аминокислот особое значение имеет декарбоксилирование. При постепенном нагревании до температур  $>200^\circ\text{C}$  аминокислоты начинают отщеплять  $\text{CO}_2$  и переходить в первичные амины:



Реакции катализируются ионами металлов. Например, аспарагиновая кислота легко декарбоксилируется в присутствии  $\text{Cu}(\text{II})$  с образованием аланина.

Декарбоксилирование аминокислот в живых системах катализируется декарбоксилазами. В них принимает участие пиридоксальфосфат, кофермент метаболизма аминокислот.





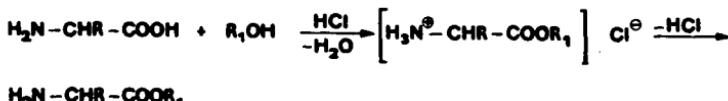
Продукты декарбоксилирования аминокислот, за исключением простых алифатических аминокислот, таких, как Gly, Ala, Val, Leu и Ile, обладают выраженным биологическим действием (биогенные амины). Некоторые из них имеют сильное фармакологическое действие, другие являются составными частями коферментов, гормонов и витаминов. Производные триптиамина широко известны как вещества, вызывающие галлюцинации. Так, N,N-диметил- и N,N-диэтилтриптиamin содержатся в никотиновом табаке, употребляемом некоторыми южноамериканскими индейцами, псилоцин и псилоцибин, активные составные части *Psilocybe mexicana* с вызывающим галлюцинации действием, являются соответственно 4-гидрокси-N,N-диметилтриптиамином и его эфиром с ортоfosфорной кислотой. Обзор биогенных аминов приведен в табл. 1-12.

Таблица 1-12. Важнейшие биогенные амины

Аминокислоты	Продукт декарбоксилирования	Местонахождение и действие
Гистидин	Гистамин	Тканевый гормон, действующий на кровяное давление
Лизин	Кадаверин	Компонент рибосом
Орнитин	Путресцин	Продукт бактериального метаболизма
Аргинин	Агматин	Продукт метаболизма кишечных бактерий
Аспарагиновая кислота	$\beta$ -Аланин	Компонент кофермента А
Глутаминовая кислота	$\gamma$ -Аминомасляная кислота	Продукт метаболизма головного мозга; препарат, снижающий кровяное давление
Серин	Коламин	Компонент холина и фосфатидов
Тreonин	Пропанол-амин	Компонент витамина B <sub>12</sub>
Цистеин	Цистеамин	Компонент кофермента А
Тирозин	Тирамин	Тканевый гормон, вызывающий сокращение матки
ДОФА	Дофамин	Нейромедиатор (центральная нервная система); промежуточное вещество в синтезе адреналина
Триптофан	Триптиамин	Тканевый гормон
5-Гидрокситриптофан	Серотонин	То же
N-Ацетил-5-гидрокситриптофан	Мелатонин	Гормон эпифиза

### 1.8.8. Этерификация

Наиболее распространенный метод этерификации аминокислот — взаимодействие с безводным спиртом в присутствии катализаторов (хлороводород, сильнокислые катионаобменники):



Сначала получается гидрохлорид эфира, при добавлении основания эфир аминокислоты освобождается, извлекается органическим растворителем и перегоняется в вакууме. Свободные эфиры имеют характерный аминный запах. При хранении и особенно при нагревании они переходят в 2,5-диоксипептиазины, отщепляя спирт. По этой же причине часть продукта теряется при перегонке эфиров аминокислот. Относительно термически устойчивы изопропиловые эфиры, и благодаря этому свойству они были предложены для осторожного разделения смесей аминокислот перегонкой их эфиров.

*Метиловые эфиры* чаще всего готовят, используя тионилхлорид и метанол, при этом, вероятно, в качестве активированного промежуточного продукта образуется эфир хлорсульфиновой кислоты [206].

Эфиры аминокислот и пептидов получают в очень мягких условиях из их цезиевых солей реакций с алкилгалогенидами [207]. Одностадийный метод этерификации аминокислот первичными, вторичными и третичными спиртами в присутствии имидхлорида, полученного из диметилформамида, описал Штадлер [208].

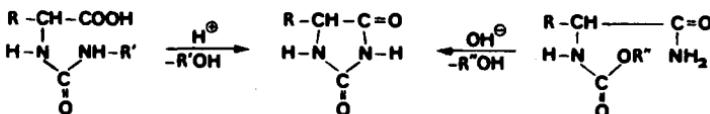
Эфиры аминокислот при действии восстановителей переходят в аминоальдегиды или аминоспирты. Особенно гладко проходит восстановление с литийалюминийгидридом; при этом с высокими выходами образуются оптически активные аминоспирты.

Этерификация как защита карбоксильной группы при пептидном синтезе, а также «активированные» эфиры рассматриваются в гл. 3.

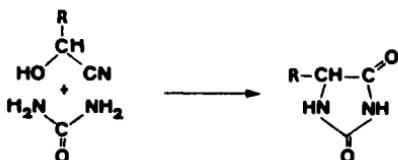
### 1.9. Циклические производные аминокислот

Из множества циклических производных аминокислот в этом разделе рассмотрены наиболее важные: пятичленные гидантонины, оксазолиноны и оксазолидиндоны и шестичленные диоксипептиазины.

*Гидантонины* (имидазолидиндоны) уже упоминались в связи с синтезом аминокислот. Их получают циклизацией уреидокарбоновых кислот при катализе кислотами или циклизацией амидов алкилоксикарбониламинокислот при катализе основаниями.



Проще всего их получают путем нагревания циангидринов с мочевиной или реакцией аминокислот с изоцианатами.

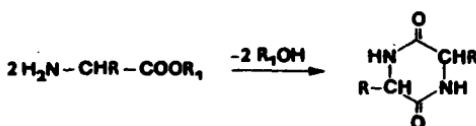


**Креатинин**, образующийся в мышечной ткани, представляет собой 2-имино-3-метилгидантоин. Стоит упомянуть и **тиогидантоин**, который образуется при определении аминокислотных последовательностей реакцией с изотиоцианатами (ср. разд. 3.6.1.2.2).

**Оксазолиноны** (азлактоны) получаются дегидратацией N-ациламинокислот с помощью уксусного ангидрида или в присутствии карбодиимидов. Они являются промежуточными продуктами синтеза аминокислот. Их образование в побочных реакциях пептидного синтеза ведет к частичной рацемизации соответствующей аминокислоты (разд. 2.2.6.1).

**Оксазолидиндоны** (N-карбоксиангидриды, называемые по имени их открывателя также ангидридами Лейкса) получаются отщеплением бензилхлорида от хлорангидридов N-бензилоксикарбониламинокислот или, проще, из аминокислоты и фосгена. Они очень реакционноспособны и применяются прежде всего для получения полиаминокислот и пептидов (разд. 2.2.5.2.3).

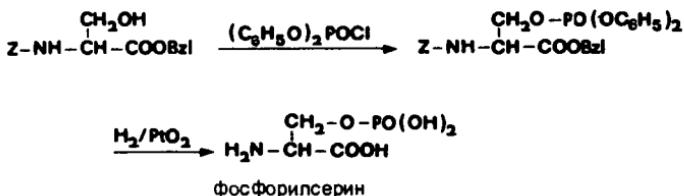
**2,5-Диоксопиперазин**, образующийся при межмолекулярной эфирной конденсации эфиров, аминокислот, известен как продукт обмена веществ различных микроорганизмов. Для синтетической химии аминокислот и пептидов он имеет лишь второстепенное значение.



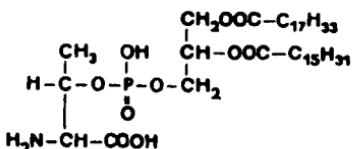
## 1.10. Фосфорил- и фосфатидиламинокислоты

Значение этих соединений определяется тем, что они входят в состав биохимически важных фосфопептидов и фосфобелков. Эти аминокислоты обычно образуются из гидроксаминокислот (Ser, Thr, Hyp) и содержат фосфор, связанный ковалентной Р—O-связью. Их получают, например, при

взаимодействии фенилфосфорилхлорида с замещенными производными аминокислот:



O-(Пальмитоилолеилглицерилфосфорил)-L-треоин представляет собой природную фосфатидиламинокислоту. Он был изолирован из рыб рода тунцов.



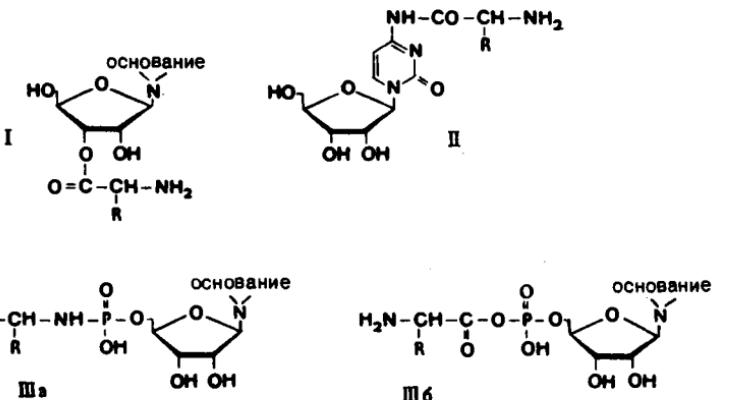
## 1.11. Гликоаминокислоты

Гликоаминокислоты входят в состав широко распространенных в животном и растительном мире гликопептидов и гликопротеинов (протогликанов). Они являются связывающим звеном между углеводными компонентами и пептидными цепями. Связывание происходит с использованием гидроксильных групп серина или треонина (O-гликозидная связь), как, например, в иммуноглобулинах, аминогрупп лизина и аргинина или же амидной группы аспарагина (N-гликозидная связь), как, например, в белках плазмы и в лактальбумине, или посредством свободных карбоксильных групп аминодикарбоновых кислот (эфирная связь).

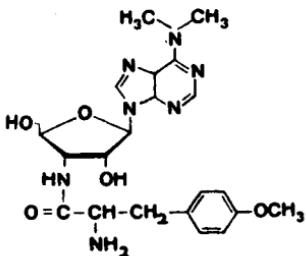
Углеводная часть состоит из 2—15 моносахаридных звеньев, причем в качестве сахаров преобладают N-ацетилгексозамин, галактоза и манноза. Синтез гликоаминокислот происходит по принципам гликозидного связывания или этерификации при использовании производных соответствующих аминокислот.

## 1.12. Нуклеоаминокислоты

По типу связи нуклеозидных и нуклеотидных остатков с аминокислотами различают три вида нуклеоаминокислот. В случае первого и самого важного вида аминокислота связана с 2'- или 3'-гидроксигруппой рибозного кольца эфирной связью (I). Во втором случае связывание осуществляется амидной связью за счет аминной группы пуринового или пиримидинового основания (II). У нуклеотидов существует дополнительная возможность



связывания с помощью остатка фосфорной кислоты (III<sub>a</sub> и III<sub>b</sub>). Эфирная группировка типа I встречается в тРНК (разд. 3.7.1), которая имеет важное значение в биосинтезе белка. Удивительная структурная аналогия имеется у антибиотика *пуромицина*, ингибирующего биосинтез белка.



Нуклеоаминокислота N-(пурин-6-ил)аспарагиновая кислота была найдена в мицелии пенициллиума.

О синтезе эфиров нуклеотидил-(5'-N)-аминокислот и пептидов путем связывания соответствующих аминокислотных и нуклеотидных производных карбодимидным и карбонилдимидазольным методами сообщалось в работе [209]. Стереорегулярные гомонуклеотиды из активированных производных урацил-N'-β-аланина получили Швачкин и сотр. [210].

## Литература

1. Lübke K., Schröder E., Kloss G., Chemie und Biochemie der Aminosäuren, Peptide und Proteine, Bd. I u. II, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1975.
2. Weinstein B., Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol. 1-5, Marcel Dekker, Inc., New York, 1971-1978.
3. Fahnenschmid R., Heese J., Tanner H. Aminosäuren in: Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie, Verlag Chemie, Weinheim, 1974.

4. Гринштейн Дж., Виниц М. Химия аминокислот и пептидов. — М.: Мир, 1965.
5. Meister A., Biochemistry of the Amino Acids, Bd. 1 a. 2, Academic Press, New York — London, 1965.
6. Corrigan J. J., Science, **164**, 142 (1969).
7. IUPAC-IUB-Nomenklaturregeln, J. Biol. Chem., **245**, 5171 (1970); J. Biol. Chem., **247**, 977 (1972); Pure Appl. Chem., **31**, 641 (1972); Pure Appl. Chem., **40**, 315 (1974); Eur. J. Biochem., **53**, 1 (1975).
8. Brand E., Edsal J. T., Ann. Rev. Biochem. **16**, 224 (1947).
9. Wellner D., Meister A., Science, **151**, 77 (1966).
10. Barret G. C. Amino Acids, Peptides, Proteins, **8**, 1 (1976).
11. Fowden L., Endeavour **21**, 35 (1962).
12. Tschiersch B., Pharmazie **17**, 721 (1962).
13. Kühnau J., Angew. Chem. **61**, 357 (1949).
14. Schuphan W., Schwerdtfeger E., Die Nahrung **9**, 755 (1965).
15. Сафонова Е. Н., Беликов В. М. — Успехи химии 1967, **36**, с.913.
16. The Therapeutic Use if EAS and their Analogues. IIIrd Int. Symp. (1976) Erlangen, Z. Ernährungswiss **16**, 1 (1977).
17. Rose W. C. et al., J. Biol. Chem. **176**, 753, (1948); **188**, 49 (1951); **206**, 421 (1954); **216**, 763 (1955); **217**, 987 (1955).
18. Joint FAO/WHO Ad Hoc Expert Comitee, WHO, Techn. Report Ser. No. **522**, 55 (1973).
19. Schneider F., Naturwiss. **65**, 376 (1978).
20. Champagnat A. et al., Nature **197**, 13 (1963).
21. Bell E. A., John D. I., Int. Rev. Sci.: Org. Chem. Ser. Two, **6**, 1(Hsg.: H. N. Rydon), Butterworth/London, (1976).
22. Märki W., Helv. Chim. Acta **59**, 1591 (1976).
23. Shah D. V., Tews J. K., Harper A. E., Suttie J. W., Biochim Biophys. Acta **539**, 209 (1978).
24. Neuberger A., Adv. Protein Chem. **4**, 297 (1948).
25. Гринштейн Дж., Виниц М. Химия аминокислот и пептидов. — М.: Мир, 1965, с. 105.
26. Eliel E. L., Chemie u. Zeit **8**, 148 (1974).
27. Lutz O., Jirgenson B., Ber. dtsch. chem. Ges. **63**, 448 (1930); **64**, 1221 (1931).
28. Toniolo C., Signor A., Experientia **28**, 753 (1972).
29. Jennings J. P., Klyne W., Scopes P. M., J. Chem. Soc. **1965**, 294.
30. Fowden L., Scopes P. M., Thomas R. N. J. Chem. Soc. **1971**, 833.
31. Toome V., Weigle S. M. Tetrahedron **31**, 2625 (1975).
32. Wieser H., Jugel H., Belitz H.-D., Z. Lebensmittel-Unters. u. Forsch. **164**, 277 (1977).
33. Ariyoshi Yasuo, Agr. and Biol. Chem. **40**, 983 (1976).
34. Taddel F., Pratt L., J. Chem. Soc. **1964**, 1553.
35. Abraham R. J., Thomas U. A. J. Chem. Soc. **1964**, 3739.
36. Martin R. B., Mathur R., J. Amer. Chem. Soc. **87**, 1065 (1965).
37. Cavanaugh J. R., J. Amer. Chem. Soc. **89**, 1558 (1967).
38. Roberts G. C. K., Jardetzky O., Adv. Protein Chem. **24**, 460 (1970).
39. Zimmerman S. S., Pottle M. S., Nemethy G., Scheraga H. A. Macromolecules **10**, 1 (1977).
40. Marsh R. E. Donoheu J., Adv. Protein Chem. **22**, 235 (1967).
41. Beaven G. H., Holiday E. R., Adv. Protein Chem. **7**, 319 (1952).
42. Wetlauffer D. B., Adv. Protein Chem. **17**, 303 (1962).
43. Sutherland G. B. B. M., Adv. Protein Chem. **7**, 291 (1952).

44. *Turba F.*, Aminosäuren, Peptide in: Hoppe Seyler/Thierfelder, Handbuch der Physiologisch- und Pathologisch-Chemischen Analyse, 10. Aufl., Bd. III/2, S. 1685ff., Springer-Verlag; Berlin — Göttingen — Heidelberg (1955).
45. *Takeda M., Jardetzky O.*, J. Chem. Phys. **26**, 1346 (1957).
46. *Breitmair E., Voelter W.*, <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie, Verlag Chemie, Weinheim, 1974.
47. *Voelter W., Zech K., Grimminger W., Breitmair E., Jung G.*, Chem. Ber. **105**, 3650 (1972).
48. *Wieland Th.*, Fortschr. chem. Forschung **1**, 211 (1949).
49. *Kaneko T., Izumi Y., Chibata I., Itoh T.* Synthetic Production and Utilization of Amino Acids, Halsted Press, Wiley, New York, 1974.
50. Беликов В. М. — Вестник Академии наук СССР 1973, № 8, 33.
51. Сафонова Е. Н., Беликов В. М. — Успехи химии 1974, **43**, с.1575.
52. *Meienhofer J.*, J. Med. Chem. **18**, 643 (1975).
53. *Izumi Y., Chibata I., Itoh T.*, Angew. Chem. **90**, 187 (1978).
54. *Hill R. L.*, Adv. Protein Chem. **20**, 37 (1965).
55. *Moore S., Stein W. H.*, Methods in Enzymology **6**, 819 (1963).
56. *Gruber H. A., Mellon E. F.*, Anal. Biochem. **26**, 180 (1968).
57. *Westall F., Hesser H.*, Anal. Biochem. **61**, 610 (1974).
58. *Liu T. Y., Chang Y. H.*, J. Biol. Chem. **246**, 2842 (1971).
59. *Penke B., Ferenczi R., Kovacs K.*, Anal. Biochem. **60**, 45 (1974).
60. *Hill R. L., Schmidt R.* J. Biol. Chem. **237**, 389 (1962).
61. *Yamada K. et al.*, The Microbial Production of Amino Acids, Kodansha, Tokyo/Wiley, New York, 1972.
62. *Fukumura T.*, Agric. Biol. Chem. **40**, 1687 (1976).
63. *Hoppe D.*, Angew. Chem. **87**, 450 (1975).
64. *Schütte H. R.*, Radioaktive Isotope in der organischen Chemie und Biochemie, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin/Verlag Chemie, Weinheim, 1966.
65. *Tovey K. C., Spiller G. H., Oldham K. G., Lucas N., Carr N. G.*, Biochem. J. **142**, 47 (1974).
66. *Bretscher M. S., Smith A. E.*, Anal. Biochem. **47**, 310 (1972).
67. *Morecombe D. J., Young D. W.*, J. C. S. Chem. Commun. 198 (1975).
68. *Huang F. C., Chan J. A., Sih C. J., Fawcett P., Abraham E. P.*, J. Amer. Chem. Soc. **97**, 3858 (1975).
69. *Valentine D., Scott J. W.*, Synthesis 329 (1978).
70. *Scott J. W., Valentine D.*, Science **184**, 943 (1974).
71. *Hermann K.*, Nachr. Chem. Tech. Lab. **26**, 651 (1978).
72. *Takaishi N., Imai H., Bertelo C. A., Stille J. K.*, J. Amer. Chem. Soc. **100**, 264 (1978).
73. *Harada K., Iwasaki T., Okawara T.*, Bull. Chem. Soc. Japan **46**, 1901 (1973).
74. *Harada K., Okawara T.*, J. Org. Chem. **38**, 707 (1973).
75. *Weinges K., Stemmler B.*, Chem. Ber. **106**, 2291 (1973).
76. *Oguri T., Kawai N., Shiori T., Yamada S.*, Chem. Pharm. Bull. **26**, 803 (1978).
77. *Izumi Y., Tai A.* Stereo-Differentiation Reactions, Kodansha, Tokyo/Academic Press, New York, 1977.
78. *Böhm R., Losse G.*, Z. Chem. **7**, 409 (1967).
79. *Wolman Y., Haverland W. J., Miller S. L.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **69**, 809 (1972).
- 79a. *Мумин Ю. В., Власов Г. П.* — ЖХОХ 1965, **35**, с.861.
80. *Miller S. L., Orgel L. E.*, The Origins of Life on Earth, Englewood Cliffs, N. Y.: Prentice Hall (1973).
81. *Hatamaka H., Egami F.*, Bull. Chem. Soc. Japan **50**, 1147 (1977).
82. *Harada K., Suzuki S.*, Nature **266**, 275 (1977).

83. *Eigen M., Schuster P.*, Naturwiss. **65**, 351 (1978).
84. *Lawless J. G., Peterson E.*, Orig. Life **6**, 3 (1975).
85. *Ivanov C. P., Slavcheva N. N.*, Orig. Life **8**, 13 (1977).
86. *Wolman Y., Miller S. L.*, Tetrahedron Letters 1199 (1972).
87. *Ferris J. P., Ryan T. J.*, J. Org. Chem. **38**, 3302 (1973).
88. *Sweeney M. A., Toste A. P., Ponnanperuma C.*, Orig. Life **7**, 187 (1976).
89. *Rabinowitz J.*, Helv. Chim. Acta **52**, 2663 (1969); **53**, 1353 (1970).
90. *Rabinowitz J., Hampai A.*, Helv. Chim. Acta **62**, 1842 (1978).
91. *Lahav N., White D., Chang S.*, Science **201**, 67 (1978).
92. *Hennon G., Plaquet R., Biserte G.*, Biochimie **57**, 1395 (1975).
- 92a. *Мархинин Е. К., Подклетнов Н. Е.* — ДАН СССР 1977, **235**, с. 1203.
93. *Ленинджер А.* Основы химии. В 3-х томах. Пер. с англ. — М.: Мир, 1985.
94. *Greenstein J. P.*, Adv. Protein Chem. **9**, 121 (1954).
95. *Losse G., Jeschkeit H.*, Pharmazie **15**, 164 (1960).
96. *Helfman P. M., Bada J. L.*, Nature **262**, 279 (1976).
97. *Bada J. L., Protsch R.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **70**, 1331 (1973).
98. *Schröder R. A., Bada J. L.*, Science **182**, 479 (1973).
99. *Smith G. G., Williams K. M., Wonnacott D. M.*, J. Org. Chem. **43**, 1 (1978).
100. *Norden B.*, Nature **266**, 567 (1977).
101. *Bonner W. A., Kavasmaneck P. R., Martin F. S., Flores J. J.*, Orig. Life, 367 (1975).
102. *Elios W. E.*, J. Chem. Educ. **49**, 448 (1972).
103. *Harada K.*, Naturwiss. **57**, 114 (1970).
104. *Thiemann W.*, Naturwiss. **61**, 476 (1974).
105. *Harada K.*, Nature **206**, 1354 (1965).
106. *Yamada S., Yamamoto I., Chibata I.*, J. Org. Chem. **38**, 4408 (1973).
107. *Yamada S., Hongo C., Yamamoto M., Chibata I.*, Agric. Biol. Chem. **40**, 1425 (1976).
108. *Arendt A., Kolodziejczyk A., Sokolowska T., Szufler E.*, Roczniki Chem. **48**, 635 (1974).
109. *Blackburn S.*, Amino Acid Determination, M. Dekker. Inc., New York, Basel, 1978.
110. *Jaeger E.*, in Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, 15/2, 681ff. (1974).
111. *Turba F.*, Chromatographische Methoden in der Proteinchemie, Springer-Verlag, Berlin, 1954.
112. *Hesse G.*, Chromatographisches Praktikum, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, 1968.
113. *Hesse G.*, Methodicum Chimicum, Bd. I, 1, 92; Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, 1973.
114. *Krauss G.-J., Krauss G.*, Wiss. u. Fortschr. **23**, 458, 512, 552 (1973); **24**, 26, 76, 126 (1974).
115. *Krauss G.-J., Krauss G.*, Experimente zur Chromatographie, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 1979.
116. *Eppert G.*, Einführung in die schnelle Flüssigkeitschromatographie, Akademie-Verlag, Berlin, 1978.
117. *Hrapia H.*, Einführung in die Chromatographie, Akademie-Verlag, Berlin, 1977.
118. *Lustenberg N., Lange H. W., Hempel K.*, Angew. Chem. **11**, 227 (1972).
119. *Udenfriend S., Stein S., Böhnen P., Dairman W., Leimgruber W.*, Science **178**, 871 (1972).
120. *Mendez E., Lai C. Y.*, Anal. Biochem. **65**, 281 (1975).
121. *Stein S., Böhnen P., Stone J., Dairman W., Udenfriend S.*, Arch. Biochem. Biophys. **155**, 202 (1973).

122. Nakamura H., Pisano J. J., *J. Chromatogr.* **121**, 33 (1976).
123. von Arx E., Faupel M., Brugger M., *J. Chromatogr.* **120**, 224 (1976).
124. Roth M., Hampai A., *J. Chromatogr.* **83**, 353 (1973).
125. Benson J. R., Hare P. E., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **72**, 619 (1975).
126. Cronin J. P., Hare P. E., *Anal. Biochem.* **81**, 151 (1977).
127. Maeda M., Tsuji A., *Anal. Biochem.* **52**, 555 (1973).
128. Lange H. W., Lustenberg N., Hempel K. Z. *Anal. Chem.* **261**, 337 (1972).
129. Bayer E., Grom E., Kaltenegger B., Uhmann R., *Anal. Chem.* **48**, 1106 (1976).
130. Seiler N., Wiechmann M., *Z. Anal. Chem.* **220**, 109 (1966).
131. Burzynski S. R., *Anal. Biochem.* **65**, 93 (1975).
132. Osborne N. N., Stahl W. L., Neuhoff V., *J. Chromatogr.* **123**, 212 (1976).
133. Froehlich P. M., Myrohy L. D., *Anal. Chem.* **49**, 1606 (1977).
134. Hais I. M., Macek K., *Handbuch der Papierchromatographie* VEB Gustav Fischer-Verlag, Jena (1958).
135. Cramer F., *Papierchromatographie*, 5. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim, 1962.
136. Jork H., Kraus L., *Methodicum Chimicum*, I/1, 67, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart. 1973.
137. Zweig G., Sherma J., *Anal. Chem.* **48**, 66R (1976).
138. Grütte F. K., Kohnke B. J. *Chromatogr.* **26**, 325 (1967).
139. Randerath K., *Dünnschichtchromatographie*, 2. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim, 1966.
140. Шмаль Э. *Хроматография в тонких слоях*. — М.: Мир, 1965.
141. Pataki G., *Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptidchemie*, Verlag W. de Gruyter, Berlin, 1966.
142. Kirchner J. G., *Thin-Layer-Chromatography*, Intersci. Publ., New York — London — Sidney, 1967.
143. Issaq H. I., Barr E. W., *Anal. Chem.* **49**, 83A (1977).
144. Fahmy A. P., Niederwieser A., Pataki G., Brenner M., *Helv. Chim. Acta* **44**, 2022 (1961).
145. Nakamura H., Pisano J. J., *J. Chromatogr.* **121**, 33 (1976).
146. Rybak M., Brada Z., Hais J. M., *Säulenchromatographie an Celluloseaustauschern*, VEB Gustav Fischer-Verlag, Jena, 1966.
147. Determann H., Lampert K., *Methodicum Chimicum*, Bd I/1, 134, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, 1973.
148. Spackman D. H., Stein W. H., Moore S., *Anal. Chem.* **30**, 1190 (1958).
149. Bayer E. et al., *Anal. Chem.* **48**, 1106 (1976).
150. Zech K., Voelter W., *Chromatographia* **8**, 350 (1975); *J. Chromatogr.* **112**, 643 (1975).
151. Husæk P., Macek K., *J. Chromatogr.* **113**, 139 (1975).
152. Marek V., *Chem. Listy*, **68**, 250 (1974).
153. Kaiser R., Prox A., in: *Analytische Methoden zur Untersuchung von Aminosäuren, Peptiden und Proteinen*, S. 267, Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt/M., 1968.
154. Kolb B., in: *Methodicum Chimicum*, Bd. 1/2, 1059, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, 1973.
155. Röder W., Wölm G., *Grundlagen der Gaschromatographie*, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 1976.
156. Schomburg G., *Gaschromatographie*, Taschentext 48, Verlag Chemie, Weinheim-New York, 1976.
157. Lawless J. G., Peterson E., *Orig. Life* **6**, 3 (1975).
158. Frick W., Chang D., Folkers K., Daves G. D., *Anal. Chem.* **49**, 1241 (1977).

159. Adams R. F., J. Chromatogr. **95**, 189 (1974).
160. Cliffe A. J., Berridge N. J., Westgarth D. R., J. Chromatogr. **78**, 333 (1973).
161. Gehrke C. W., Takeda H., J. Chromatogr. **76**, 63 (1973).
162. Hasegawa M., Matsubara I., Anal. Biochem. **63**, 308 (1975).
163. Moss C. W., Lambert M. A., Diaz F. J., J. Chromatogr. **60**, 134 (1971).
164. Zanetta J. P., Vincendon G., J. Chromatogr. **76**, 91 (1973).
165. Gehrke C. W., Leimer K., J. Chromatogr. **57**, 219 (1971).
166. Ikekawa N., Hoshino O., Watanuki R., Anal. Biochem. **17**, 16 (1966).
167. Eyem J., Sjöquist J., Anal. Biochem. **52**, 255 (1973).
168. Lamkin W. M., Jones N. S., Pan T., Ward D. N., Anal. Biochem. **58**, 549 (1974).
169. Weygand F., Z. Anal. Chem. **205**, 406 (1964).
170. Davankov V. A., Rogozhin S. V., J. Chromatogr. **60**, 280 (1971).
171. Davankov V. A., Rogozhin S. V., Semechkin A. V., J. Chromatogr. **91**, 493 (1974).
172. Masters R. G., Leyden D. E., Anal. Chim. Acta **98**, 9 (1978).
173. Песлекас И., Рогожин С. В., Даванков В. А. — ЖХОХ, 1974, 44, с.468.
174. Ямское И. А., Березин Б. Б., Тихонов В. Е., Бельчич Л. А., Даванков В. А. — Биоогр. химия **4**, 1170 (1978).
175. Davankov V. A., Zolotarev Yu. A., J. Chromatogr. **155**, 285 (1978).
176. König W. A., Nicholson G. J., Anal. Chem. **47**, 951 (1975).
177. König W. A., Chem. Ztg. **101**, 201 (1977).
178. König W. A., Rahn W., Eyem J., J. Chromatogr. **133**, 141 (1977).
179. Halpern B., Westley J., Chem. Commun. **12**, 246 (1965).
180. Feibusch B., Gil-Av E., Tetrahedron **26**, 1361 (1970).
181. König W. A., Parr W., Lichtenstein H. A., Bayer E., Oro J., J. Chromatogr. Sci. **8**, 183 (1970).
182. Parr W., Howard P. J., Angew. Chem. **84**, 586 (1972); Anal. Chem. **45**, 716 (1973).
183. Störling K., König W. A., Chromatographia **9**, 331 (1976).
184. Brazell R., Parr W., Andrewes F., Zlatkis A., Chromatographia **9**, 57 (1976).
185. Frank H., Nicholson G. J., Bayer E., Angew. Chem. **90**, 396 (1978).
186. Frank H., Nicholson G. J., Bayer E., J. Chromatogr. Sci. **15**, 174 (1977).
187. Heyns K., Grützmacher H. F., Massenspektrometrische Analyse von Aminosäuren und Peptiden, Fortschr. chem. Forschung **6**, 536 (1966).
188. Spitteler G., Massenspektrometrische Strukturanalyse organischer Verbindungen, Verlag Chemie, Weinheim, 1966.
189. Fehlhaber H. W., in: Methodicum Chemicum, Bd. I/1, S. 496, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, 1973.
190. Schulten H. R., Wittmann-Liebold B., Anal. Biochem. **76**, 300 (1976).
191. Suzuki Tateo, Song Kyung-Duck, Hagaki Yasuhiro, Tuzimura Katura, Org. Mass. Spectrom. **11**, 557 (1976).
192. Foster G. L., J. Biol. Chem. **159**, 431 (1945).
193. Shemin D., J. Biol. Chem. **159**, 439 (1945).
194. Keston A. S., Udenfriend S., Cannan R. K., J. Amer. Chem. Soc. **71**, 249 (1949).
195. Rubin I. B., Goldstein G., Anal. Biochem. **33**, 244 (1970).
196. Brown J. P., Perham R. N., Eur. J. Biochem. **39**, 69 (1973).
197. Nanjo M., Guilbault G. G., Anal. Chim. Acta **73**, 367 (1974).
198. Tran-Minh C., Broun G., Anal. Chem. **47**, 1359 (1975).
199. Johansson G., Edström K., Ögren L., Anal. Chim. Acta **85**, 55 (1976).
200. Mascini M., Palleschi G., Anal. Chim. Acta **100**, 215 (1978).
201. Freeman H. C., Adv. Protein Chem. **22**, 258 (1967).
202. Garwagiou Y. A., Besada A., Hassouna M. E. M., Mikrochim. Acta **1003** (1974).

## Литература

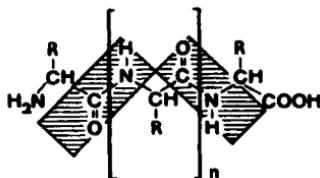
203. *Beck W., Purucker B., Girth M., Schönenberger H., Seidenberger H., Ruckdeschel G.*, Z. Naturforsch. **31b**, 832 (1976).
204. *Ackermann E.*, Pharmazie **22**, 537 (1967).
205. *Jain J. C., Sharma I. K., Sahni M. K., Gupta K. C., Mathur N. K.*, Indian J. Chem. **B15**, 766 (1977).
206. *Brenner M., Huber W.*, Helv. Chim. Acta **36**, 1109 (1953).
207. *Wang S. S., Gisin B. F., Winter D. P., Makowske R., Kulesha I. D., Tzougraki C., Meienhofer J.*, J. Org. Chem. **42**, 1286 (1977).
208. *Stadler P. A.*, Helv. Chim. Acta **61**, 1675 (1978).
209. *Юодка Б., Лиоранчайте Л., Янушоните Л., Саснаускене С.* — Биоорг. хим., 1976, **2**, с.1513
210. *Швачкин Ю. П., Воскова Н. А., Коршунова Г. А.*, — ЖОХ, 1976, **46**, с.2634.

## 2. Пептиды

### 2.1. Общие свойства пептидов

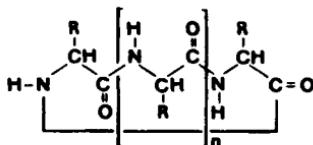
#### 2.1.1. Что такое пептиды? Их строение

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



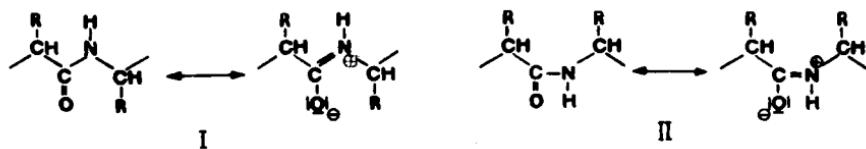
Термин «пептиды» был предложен известным химиком Эмилем Фишером (1852—1919 гг.). Слово образовано из первых четырех букв названия *пептоны* (продукты расщепления белков пепсином) и конечных букв названия углеводов полисахариды.

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 амино- 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 *цик* (II), при затрудненном свободном вращении около связи C—N:



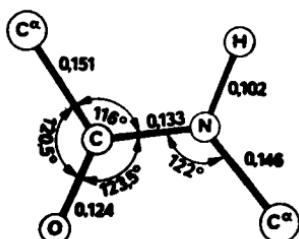


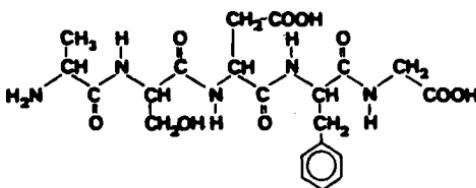
Рис. 2-1. Средние расстояния между атомами (нм), образующими пептидную связь и углы между связями.

В 2,5-дикетопиразинах, 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 большего 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 мембранны.

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

Ala — Ser — Asp — Phe — Gly

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 Грииштейна и Виница, в упрощенной формуле при амино- и карбоксильной группах указывать наличие протона и гидроксильной группы с помощью соответствующих символов, например для цвяттер-иона (II), аниона (III) и катиона (IV) рассматриваемого здесь пентапептида:

H-Ala-Ser-Asp-Phe-Gly-OH

I

H<sub>2</sub><sup>+</sup>-Ala-Ser-Asp-Phe-Gly-O<sup>-</sup>

II

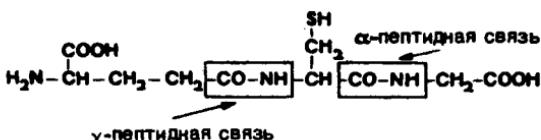
H-Ala-Ser-Asp-Phe-Gly-O<sup>-</sup>

III

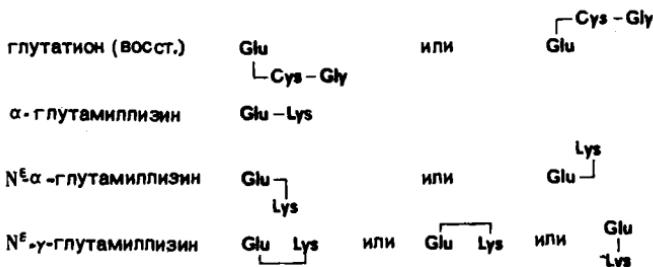
H<sub>2</sub><sup>+</sup>-Ala-Ser-Asp-Phe-Gly-OH

IV

При общепринятом способе написания формул исходят из того, что аминокислоты с тремя функциями, имеющие дополнительные амино- или карбоксильные функции (Lys, Orn, Glu, 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:

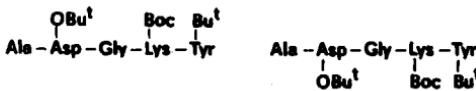
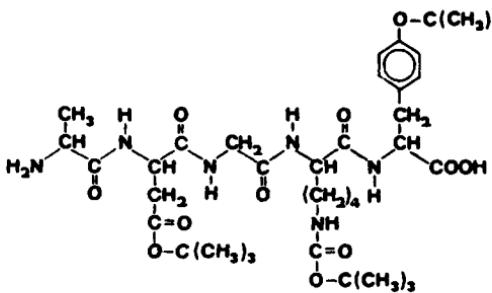


Способ обозначения  $\gamma$ -пептидного связывания в глутатионе и других  $\omega$ -пептидах ясен из следующих примеров:



Пептидная связь между  $\epsilon$ -аминогруппой лизина и  $\gamma$ -карбоксилом глутаминовой кислоты ( $\beta$ -карбоксилом аспарагиновой кислоты) называется *изопептидной 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:

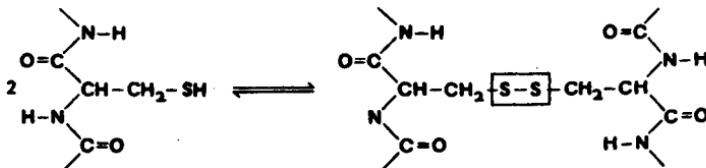


Число и последовательность связанных в пептид аминокислот называют *первичной структурой*. Для пептида с известной последовательностью формулу записывают, соединяя символы аминокислотных остатков черточками. Наконец, различают собственно пептид, например Ala-Ser-Asp-Phe-Gly и фрагмент -Ala-Ser-Asp-Phe-Gly-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

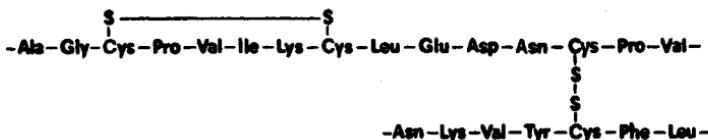
Gly-Gly-Ala-Ser-Phe-(Tyr, Phe, Pro, Arg, Lys)-Val-Pro-Gly-Ala

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

Протеиногенная аминокислота цистein 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 символьических формул (в качестве примера выбран грамицидин S):

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

cyclo-(Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro-Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro-)

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

—Val—Orn—Leu—D—Phe—Pro—Val—Orn—Leu—D—Phe—Pro—

или

—Val—Orn—Leu—D—Phe—Pro—Val—Orn—Leu—D—Phe—Pro—

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

—Val → Orn → Leu → D — Phe → Pro  
Pro ← D — Phe ← Leu ← Orn ← Val←

Циклические гетеродетногомомерные пептиды при сокращенной записи изображаются аналогично замещенным аминокислотам.

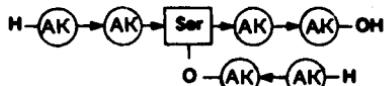
Гомодетные – гомомерные пептиды

1.Линейный пептид



Гетеродетные – гомомерные пептиды

1.Линейный О-пептид



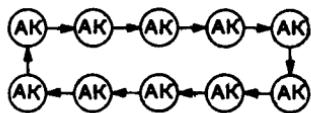
2.Разветвленный пептид



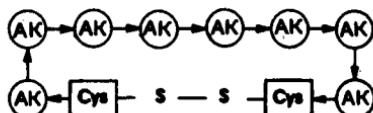
2.Линейный S-пептид



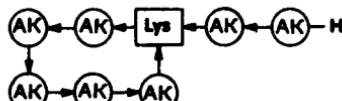
3.Циклический пептид



3. Циклический пептид (дисульфид)



4. Циклический разветвленный пептид



4. Циклический разветвленный пептид (пептидлактон)

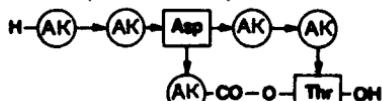


Рис. 2-2. Схема построения гомомерных пептидов. АК — аминокислотный остаток.

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

К *гетеродетным пептидам* относятся дипептиды и пептоиды. Под дипептидами понимают, согласно Шемякину, все пептиды, которые наряду с пептидными связями содержат также и эфирные, т. е. дипептидами следует считать гомомерные О-пептиды и пептидлактоны оксигаммино-кислот серина и треонина. Для пептидов с встроенным в цепь оксигаммино-кислотами 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 амино- 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, алитетзин, 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 аденоzinокртикотропного 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 *тентоксин*, цикло-(L-MeAla-L-Leu-MePhe[(Z)D]-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.

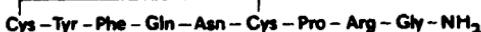
Методы выделения, очистки и аналитические характеристики пептидов описаны подробно в разд. 3.3. Изучение связи между строением и биологической функцией пептидов ведет к познанию молекулярного механизма их действия. При этом главное внимание обращается на выяснение активного центра и определение аминокислотной 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-бромсукининимидом); 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 С-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-2a-треонин-Iupaciubin      Ala-Lys-Thr-Glu-Tyr-Leu

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

4. Пропуск аминокислотного остатка указывают префиксом дез:

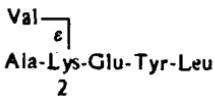
Дез-3-глутаминовая кислота — Iupaciubin      Ala-Lys-Tyr-Leu

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

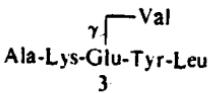
1 2 4 5

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

a)  $N^{e2}$ -валил-lupaciubin



### 6) Cy<sup>3</sup>-lupaciubyl-валин



**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 (глицин, 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 амино- 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 малозэффективен. 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 случалось 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 скотофербина 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 радиоиммunoлогических 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 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 N-концевой аминофункции ведет к снижению биологического дей-

ствия, полное удаление этой аминогруппы 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, эледоизин, 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 амино- 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).

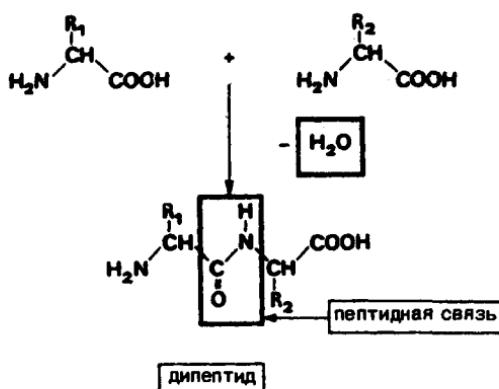


Рис. 2-3. Основной принцип пептидного синтеза.

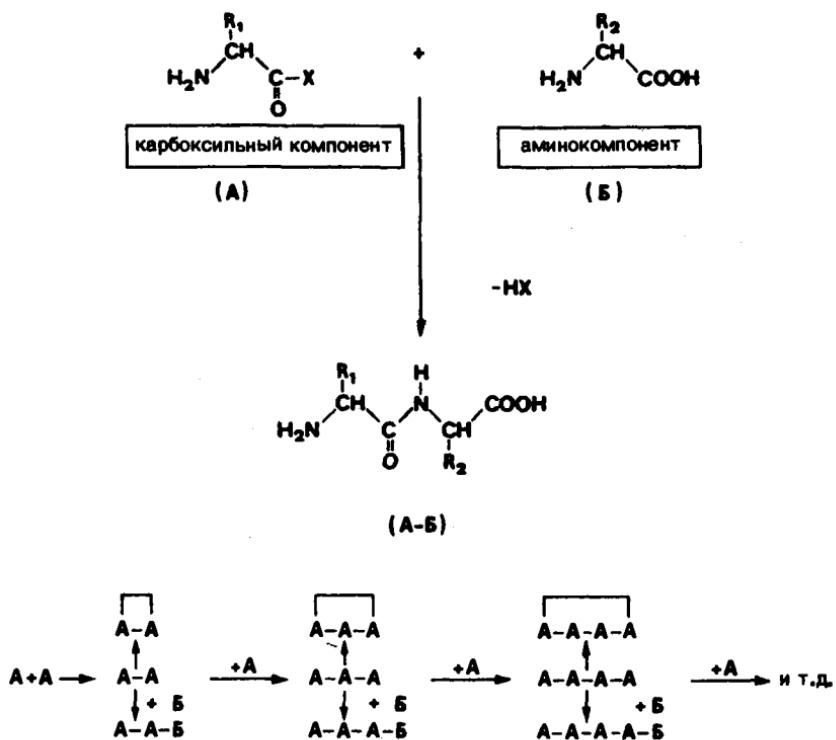


Рис. 2-4. Схема образования пептидной связи без защиты не участвующих в реакции функциональных групп. X — активирующая группа.

В первую очередь получают частично замещенные аминокислоты, при этом они одновременно теряют цвяттер-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 аминокомпоненты. 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, Tug, Asp, Glu, Lys, Arg, His и Cys. Следует различать *временные* и *постоянные* защитные группы. Временные защитные группы служат для защиты концевых

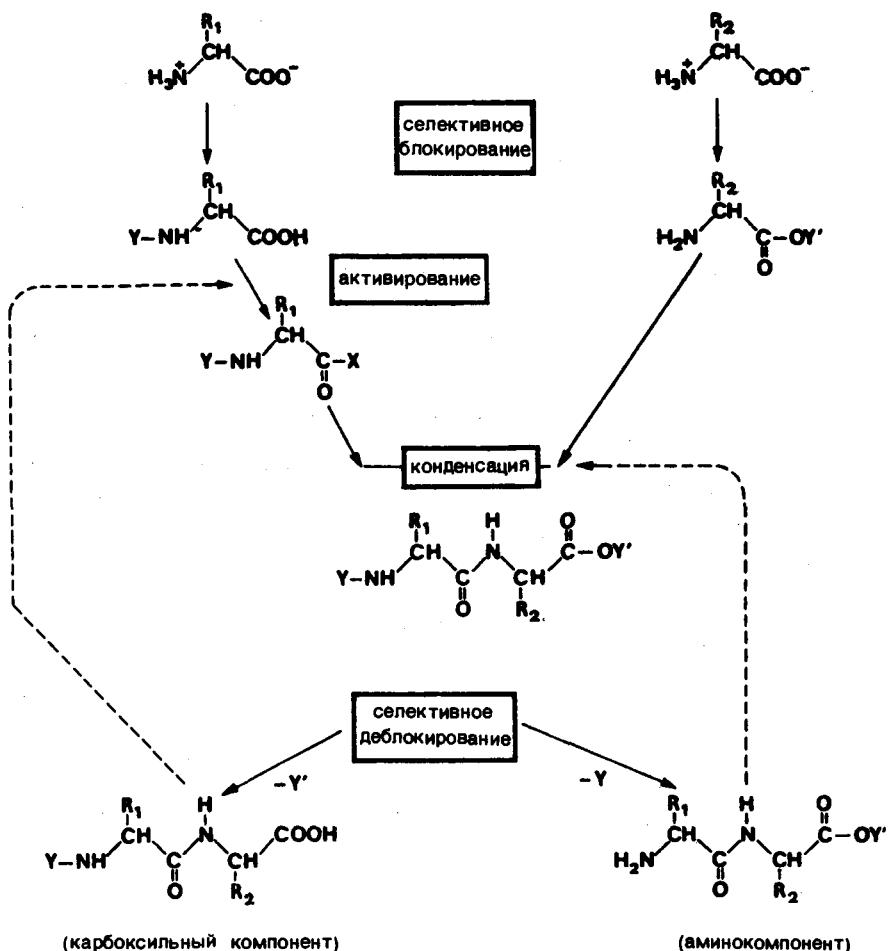


Рис. 2-5. Трехступенчатый процесс пептидного синтеза. Y — защита аминогруппы, X — активирующая группа, Y' — защита карбоксильной группы, R — остаток боковой цепи.

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 эквимолярных 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 стерически 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 трудно осуществимо 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. Меррифиллом 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 Куршиусом (1857—1928 гг.). При попытке получить гиппуровую 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 Курциус 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;

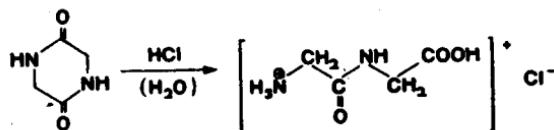
доказательство пригодности эфиров аминокислот для использования в пептидном синтезе;

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 диоксониперазина 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 галогенациламиноислоту в хлорангидрид и затем ввести в реакцию с эфирем аминокислоты (или также с аминокислотой или пептидом) в водно-щелочном растворе. Достигнув желаемой длины цепи, можно заместить галоген на аминогруппу обработкой аммиаком.

В 1965 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-пиперидинтиокарбоновой 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. Шёнхаймер [2] применил при синтезе простых пептидов 4-толуолсульфонильный остаток для защиты аминогруппы. Эту защиту можно селективно удалить обработкой в течение нескольких часов иодоводородной кислотой в присутствии иодида фосфония при 50—65 °C. Ученики Фишера Макс Бергман, Эмиль Абергальден 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 аминозащитную 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, Боган). 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 Меррифиллом 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 устойчивы и легко идентифицироваться;
- 5) карбоксильная группа должна легко активироваться в случае защиты аминогруппы, 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 тиольной, гидроксильной, гуанидиновой и имидазольной групп естественно относятся к постоянным блокирующими 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 аминогрупп и для  $\omega$ -аминогрупп 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 единственной 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 аминогруппы применяются и некоторые алкильные производные.

### 2.2.4.1.1. Защитные группы ацильного типа

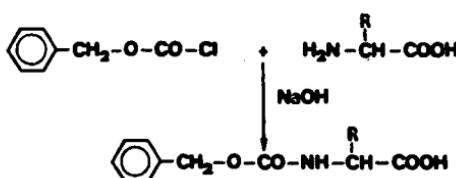
Уже Бергман и др. интенсивно применяли N-ацетиламинокислоты для целенаправленного синтеза пептидов. Оптически активные исходные продукты для образования пептидной связи они получали ацетилированием эфиров аминокислот уксусным ангидридом и последующим омылением. Амидная группировка, выступающая в этом 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 катализитическом гидрировании, они заменили этильную группу на бензильную в остатке карбамидной кислоты и получили защитную группу, которую можно удалять 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).

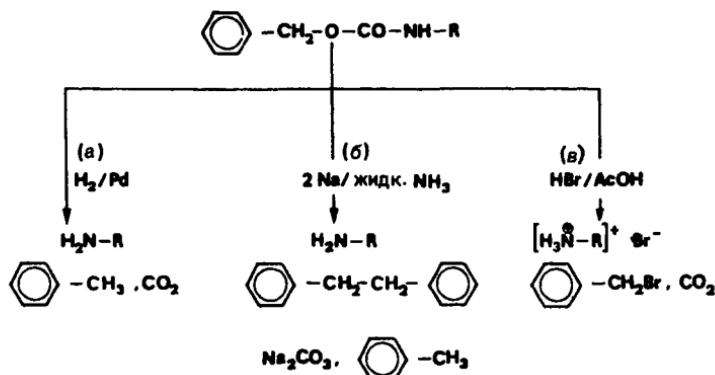


Рис. 2-6. Важнейшие реакции отщепления бензилоксикарбонильной группы. R — остаток аминокислоты или пептида.

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

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

При катализитическом 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 получаются 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 эфирата трифтогорида бора [59] или 4 г-экс. циклогексиламина [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  $\text{N}$ -тозильная,  $\text{N}$ -тритильная,  $\text{N}^{\text{Im}}$ -, 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 -Lis-Pro- и -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 треоамина и серина идет О-ацетилирование, в случае метионина — S-переэтерификация, разрушаются триптофан и нитроаргинин, расщепляются бензиловые эфиры и амидные группы, а также происходит переэтерификация 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-тозильных, N-формильных, N-фталильных, N-бензильных и N-4-метоксибензильных 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-метоксибензилоксикарбонильный остаток [64], который легко вводится при использовании кристаллического азота  $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{OCON}_3$  и селективно удаляется безводной трифторуксусной кислотой при температуре  $< 0^\circ\text{C}$ ; бензилоксикарбонильная группа при этом не затрагивается [65]. Для исключения побочных реакций 4-метоксибензильного катиона, получающегося при ацидолитическом отщеплении, требуются добавки анизола или резорцина.

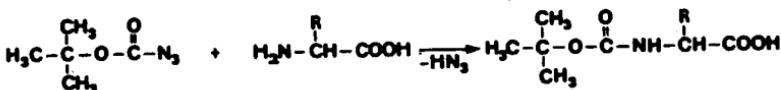
Швицер [66] предложил окрашенные 4-замещенные бензилоксикарбонильные защиты (как, например, 4-фенилазобензилоксикарбонил), которые облегчают аналитический контроль при операциях очистки. 4-Нитробензилоксикарбонильная группа [67] отщепляется гидрогенолизом легче незамещенной бензилоксикарбонильной группы, 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 *tert*-бутилоксикарбонильных групп от производных диаминокислоты. Наряду с уже известной фоточувствительной 3,5-диметоксибензилоксикарбонильной группой [68] были предложены другие защитные группы, отщепляемые фотехимически: 6-нитровератрилоксикарбонильная, 2-нитробензилоксикарбонильная [69], а также  $\alpha,\alpha$ -диметил-3,5-диметоксибензилоксикарбонильная [70]; последняя может сниматься при обработке 5%-ным раствором трифторуксусной кислоты в дихлорметане.

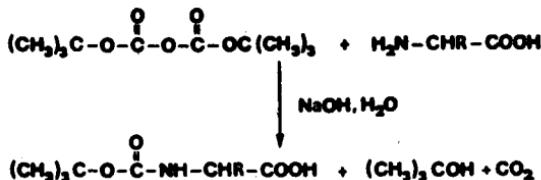
*tert*-Бутилоксикарбонильная группа [71] наряду с бензилоксикарбонильной является наиболее важной аминозащитной группой. Особенное значение имеет тот факт, что ацильные защитные группы урганового типа при постепенном наращивании пептидной цепи с C-конца предохраняют соответствующую аминокислоту от рацемизации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

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

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



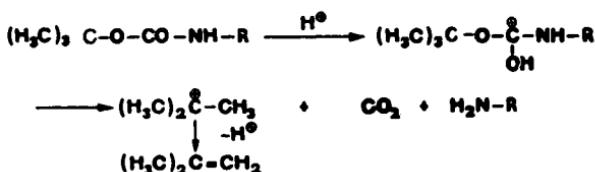
Он реагирует с солью аминокислоты в водно-диоксановой смеси в присутствии триэтиламина или оксида магния; pH можно также поддерживать с помощью 2—4 н. NaOH. Можно вести реакцию и с эфиром аминокислоты в пиридине. Шиабель предложил для введения Вос-группы методику с использованием pH-стата [73, 74]. Естественно, 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 *трем*-бутилоксикарбонилазида, интересны и другие варианты введения этой группы, так как при перегонке *трем*-бутилоксикарбонилазида может произойти разложение со взрывом, а выделяющаяся во время реакции ацилирования азотистоводородная кислота очень токсична. Особое значение приобрел *трем*-бутилоксикарбонилфторид, который образуется из хлорфторфосгена и *трем*-бутанола при температурах около  $-25^{\circ}\text{C}$  и дает при строгом контроле pH *трем*-бутилоксикарбониламинокислоты с выходом > 90% [75]. *трем*-Бутил-S-[4,6-диметилпиримидил-2-тио]карбонат [76] тоже является хорошим реагентом для введения *трем*-бутилоксикарбонильной группы. Превосходным агентом для этой цели оказался дн-*трем*-бутилпирокарбонат (*Boc*)<sub>2</sub>O [77—79]:



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

Аминокислоты и пептиды, защищенные по аминогруппе *трем*-бутилоксикарбонилом, 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  $\text{HCl}$ , 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:



*трем*-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 *трем*-бутилирование индольного кольца триптофана или тиоэфирной 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 бензилоксикарбонилом, при ацидолитическом отщеплении *трем-бутилоксикарбонила*. Поэтому были предложены другие деблокирующие реагенты, такие, как эфират трехфторида бора, 2-меркаптоэтансульфокислота, водная трифтормукусная 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 *трем-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-Зашитные группы уретанового типа Y-C(=O)-NH-R  
(R—остаток аминокислоты или же пептида)

Защитная группа R	Сокращенное обозначение защитной группы R	Y	Снятие защиты -
Бензилокси-карбонил- [3]	Z		H <sub>2</sub> /Pd; HBr/CH <sub>3</sub> COOH; Na/жидк. NH <sub>3</sub>
4-Метокси-бензилоксикарбонил- [64, 65]	Z(OMe)		CF <sub>3</sub> COOH; H <sub>2</sub> /Pd; Na/жидк. NH <sub>3</sub>
Нитробен-зилоксикарбо-нил-	Z(2-NO <sub>2</sub> ) [67] Z(3-NO <sub>2</sub> ) [80] Z(2-NO <sub>2</sub> ) [69]		H <sub>2</sub> /Pd (легко); HBr/AcOH (затрудне-но по ср. с Z) Дополнительно фотолиз
Хлорбензило-кикарбонил-	Z(4-Cl) [81, 82] Z(3-Cl) [83, 84]  Z(2-Cl) [80] Z(2, 4-Cl) [85]		Аналогично Z, но под действием H <sub>2</sub> /Pd или HBr/AcOH (труднее) CF <sub>3</sub> COOH/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (1:1)
3,5-Димето-ксибензилокси-карбонил- [68]	Z(OMe) <sub>2</sub>		Фотолиз
α,α-Диметил-3,5-диметокси-бензилоксикар-бонил- [86]	Ddz		Фотолиз, 5%-ная CF <sub>3</sub> COOH в CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
2-Нитро-4,5-диметоксибен-зилоксикарбо-нил-(б-нитрове-ратрилоксикар-бонил-)	Ndz (Nvoc)		Аналогично Z; фотолиз
Флуоренил-9-метоксикарбо-нил- [87]	Fmoc		Жидк. NH <sub>3</sub> ; 2-ами-ноэтанол; морфолин

Продолжение табл. 2.1

Защитная группа R	Сокращенное обозначение защитной группы R	Y	Снятие защиты
Фурил-2-метоксикарбонил- (фурфурилоксикарбонил-) [88]	Foc		CF3COOH; HCl/AcOH; H2/Pd
2-(4-Толилсульфонил)-этоксикарбонил- [89]	Tsoc		C2H5ONa в этаноле
Метилсульфонилэтоксикарбонил- [383]	Msc		Катализируемое основаниями β-эlimинирование
4-Фенилазобензилоксикарбонил- [90]	Paz		Аналогично Z
2-Иодэтоксикарбонил- [92]	Iec		Zn/метанол; электролиз
<i>трет</i> -Бутилоксикарбонил- [71]	Boc		CF3COOH; CF3COOH/CH2Cl2; HCl в органических растворителях
2-Циан- <i>трет</i> -бутилоксикарбонил- [93]	Cyoc		Слабоосновные реагенты (водный K2CO3; триэтиламин)
2,2,2-Трихлор- <i>трет</i> -бутилоксикарбонил- [94]	Tcboc		Кобальт(I)-фталоцианиновый анион в метаноле; Zn/AcOH
Изоникотинилоксикарбонил- [95]	iNoc		Zn/AcOH; H2/Pd; устойчив к кислотам
<i>трет</i> -Амилоксикарбонил- [96]	Aoc		CF3COOH(анизол); CF3COOH/CH2Cl2 (1:1)

Продолжение табл. 2.1

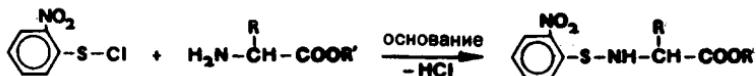
Защитная группа R	Сокращенное обозначение защитной группы R	Y	Снятие защиты
Адамантил-1-оксикарбонил-[97]	Adoc		CF <sub>3</sub> COOH
1-[1-Адамантил]-1-метилэтоксикарбонил-[98]	Adpos		3%-ная CF <sub>3</sub> COOH в CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ; устойчив к гидрогенолизу
Изоборнилооксикарбонил-[98]	Ibos		CF <sub>3</sub> COOH; устойчив к H <sub>2</sub> /Pd и основным реагентам
2-[Бифенил-4]-пропил-2-оксикарбонил-[99]	Bros		80%-ная AcOH
Пиперидин-оксикарбонил-[100]	Pipos		Электролитическое восстановление; H <sub>2</sub> /Pd
Циклопентилоксикарбонил-[101]	CPos		HBr/AcOH; Na/жидк. NH <sub>3</sub> ; устойчив к гидрогенолизу (H <sub>2</sub> /Pd)
$\alpha$ -Метил-2,4,5-trimетилбензилоксикарбонил-[102]	Tmz		3%-ная (по объему) CF <sub>3</sub> COOH в CHCl <sub>3</sub> ; отщепляется легче, чем Вос, медленнее, чем Bros
Бензилизо-казол-5-метиленоксикарбонил-[103]	Bic		Изомеризация в присутствии 3 экв. триэтиламина в ДМФ и сольволиз в водном буфере (pH 7)
(4-Фенилазо-фенил)изопропилоксикарбонил-[104]	Azosc		Аналогично Bros

**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	$\text{H}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{C}}{\text{—}}}$	Сольволиз; окисление, гидразинолиз
Трифторацетил- [111]	Tfa	$\text{CF}_3-\overset{\text{O}}{\underset{\text{C}}{\text{—}}}$	Разб. NaOH; $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ; раствор аммиака
Ацетоацетил- [114]	Aca	$\text{H}_3\text{C}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{C}}{\text{—}}} \text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\underset{\text{C}}{\text{—}}}$	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{NH}-\text{NH}_2$ или же $\text{H}_2\text{N}-\text{OH}$ в растворе уксусной кислоты
2-Нитрофено-ксацетил- [115]	Npa		Восстановление и последующее нагревание в $\text{H}_2\text{O}$ до 100°C
Монохлорацетил- [116]	Mca	$\text{Cl}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\underset{\text{C}}{\text{—}}}$	Амид пиперидин-1-тиокарбоновой кислоты
2-Нитрофенилтио- [105, 106]	Nps		Хлороводород в инертных растворителях, никель Ренея, тиольные реагенты; дифенилсульфимид
4-Толуолсульфонил- [107]	Tos	$\text{H}_3\text{C}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2-$	Na/жидк. $\text{NH}_3$ ; $\text{HBr}/\text{AcOH}$ (фенол); нодоводородная кислота/иодид фосфория
Бензилсульфонил- [108]	Bes	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{SO}_2-$	Na/жидк. $\text{NH}_3$ ; гидрогенолиз
4-Толилметилсульфонил- [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> Фтаильная 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 (Майнхофер, 1965 г.), меркаптанами (Фонтана и др., 1966 г.), нуклеофильными тиольными реагентами (Кеслер и Изелин, 1966 г.), дibenзолсульфимидом (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)индольное 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 *тозильной*, 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 фосфория.

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



Отщепление тозильной 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 аминозащитная группа теперь тоже может относиться к селективно удаляемым.

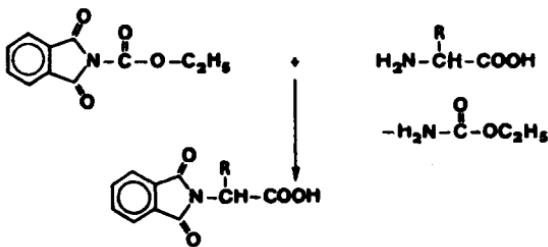
На возможность детозилирования по Фишеру (иодоводород + иодид фосфония в уксусной кислоте) при 60 °C уже указывалось. Деблокирование проходит также с HBr/AcOH в присутствии фенола в течение 16 ч при комнатной температуре (Рудинггер и сотр., 1959 г.).

Благодаря высокой стабильности тозильного остатка в условиях отщепления защитных групп уретанового типа эта защитная группа часто применяется для блокирования  $N^{\omega}$ -аминофункций, как, например, гуанидиновой группы аргинина. Проблема детозилирования 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 амиака или гидроксида бария. Для присоединения N-трифторацетиламинокислот 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 *трем*-бутиловый эфир. При этих условиях бензилоксикарбонил-, *трем*-бутилоксикарбонил- и *трем*-бутилэфирные группы устойчивы. При активировании трифторацетиламинокислот существует опасность рацемизации, благодаря чему значение этой защитной группы для целей синтеза не столь велико. Широкое распространение получили эфиры N-трифторацетиламинокислот и эфиры пептидов; благодаря высокой летучести эти производные используются в газовой хроматографии.

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



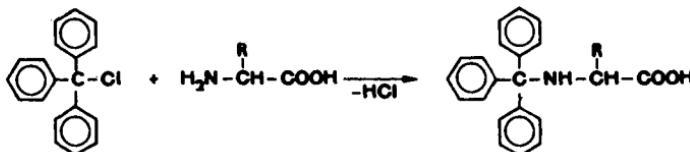
Отщепление фтаильной группы [120] производится ацетатом гидразина в метаноле. Этот мягкий метод деблокирования, протекающий при кажущемся pH 6,5 в случае щелочелабильных пептидных производных следует предпочесть обычным методам гидразинолитического расщепления.

Устойчивость фтаильной группы в условиях деблокирования многих других защитных групп должна была бы способствовать ее широкому применению. Однако фтаильная защита лишь иногда используется в определенных синтезах; ее применение ограничено трудностями отделения получаемого во время гидразинолитического расщепления фталигидразида 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 катализитическом гидрировании в присутствии палладиевой черни при 70–80 °C.

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

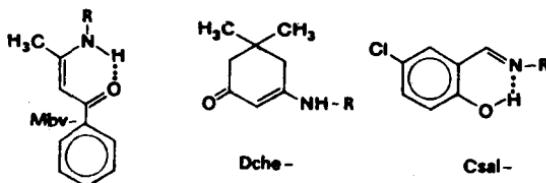


Можно исходить также из эфиров аминокислот и удалять эфирную группу после тритилирования. Однако омыление часто бывает затруднительным. Встречаются сложности и при селективном гидрогенолитическом отщеплении бензильной группы от соответствующих тритилированных бензиловых эфиров аминокислот. При применении в качестве растворителя дноксана удаляется только бензильная эфирная группировка. Активированнию карбоксильной группы тритилированных аминокислот мешают стерические препятствия, создаваемые тремя объемными фенильными остатками. Наилучшие результаты дает применение карбодиimidного метода (разд. 2.2.5.4). Кроме того, хорошие результаты получаются с N-гидрокисусукцинимидными 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  $0 \pm -10^{\circ}\text{C}$ , кратковременным нагреванием с ледяной уксусной кислотой или многочасовой обработкой 70—80%-ной уксусной кислотой. Удаляется тритильный остаток и при катализитическом гидрировании, причем отщепление идет медленнее, чем удаление в тех же условиях бензилоксиарбонильной группы. Все эти методы отщепления позволяют селективно удалять тритильные остатки в присутствии бензилоксиарбонильной, *трем*-бутилоксиарбонильной, О-бензильной, О-*трем*-бутильной и S-бензильной групп. Были предложены и такие методики детритилирования, когда  $\text{N}^{\omega}$ -,  $\text{N}^{\text{im}}$ -, 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.

*I*-Метил-2-бензоильтвинильная группа (Mbv) получается при взаимодействии бензоилацетона 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

*S,S*-Диметил-3-оксоциклогексен-1-ильная группа (Dche) вводится при реакции эфиров аминокислот с димедоном (Гальперн и сотр., 1964 г.). Она устойчива к кислотам и катализитическому гидрированию. Для активирования N-[5,5-диметил-3-оксоциклогексен-1-ил]аминокислот подходят карбоднимидный и азиный 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-хлорсалцицепт)-группа (Csal) была предложена в 1962 г. Шиханом и др. для защиты N-концевых аминокислот и последующего связывания их в дипептиды карбоднимидным методом. Деблокируют их при комнатной температуре с помощью 1 н. HCl.

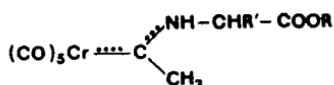
Растущий интерес вызывают защитные группы, такие, как введенная Тессером Msc-группа (табл. 2-1), которые могут быть отщеплены основаниями:

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 фосфоневые соединения, такие, как *фосфонийэтоксикарбонильные производные*  $(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{P}^+ \cdot \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CO-NH-R}$ .

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

*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 аминокомпонента 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 перезтерификация с образованием активированного эфира конечного продукта.

та. Этот активированный эфир может вступать в реакцию с еще не прореагировавшим аминокомпонентом, 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:



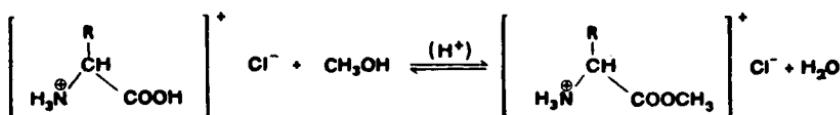
#### 2.2.4.2.1. Истинные карбоксизащитные группы

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]:



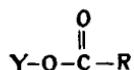
Согласно закону действующих масс, количественный перевод аминокислоты в соответствующий эфир достигается тем, что спирт берут в большом избытке, а образующуюся воду удаляют из сферы реакции, например, азеотропной отгонкой. Наряду с хлороводородом в качестве катализаторов были предложены эфират трифтогида 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 переэтерификацией или реакцией с олефинами (последнюю используют для синтеза *трет*-бутиловых эфиров).

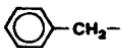
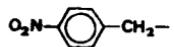
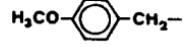
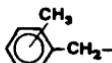
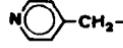
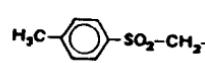
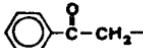
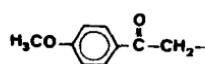
*N*-Защищенные аминокислоты этерифицируют реакцией с алкилгалогенидами в присутствии третичных аминов или с диазометаном или производными диазометана и т. д. *N*-Защищенные аминокислоты и пептиды можно превращать в соответствующие эфиры в очень мягких условиях при реакции их цезиевых солей с алкилгалогенидами [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 (этаноле), 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 гидрогенолизу и мягкому ацидолизу. При гидразинолизе 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 С-концевая аминокислота должна нести амидную группу.

*Бензиловые эфиры (-OBzI)* [129] свободных аминокислот получаются 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
Метиловый Этиловый	$\text{CH}_3-$ $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-$	Щелочной гидролиз; ферментативные методы (трипсин или химотрипсин); с 0,1 н. $\text{NaOH}$ , рН 7,0
Бензиловый [129]		$\text{H}_2/\text{Pd}$ ; насыщ. $\text{HBr}/\text{AcOH}$ ; $\text{Na}/\text{жидк. NH}_3$ ; жидк. $\text{HF}$ ; щелочной гидролиз
4-Нитробензиловый		$\text{H}_2/\text{Pd}$ ; щелочной гидролиз; $\text{Na}/\text{жидк. NH}_3$ ; устойчив против $\text{HBr}/\text{AcOH}$
<i>tert</i> -Бутиловый [130, 131]	$\text{CH}_3$ $\text{H}_3\text{C}-\overset{\text{C}}{\underset{\text{CH}_3}{\text{C}}}-$	$\text{CF}_3\text{COOH}$ ; насыщ. $\text{HCl}/\text{AcOH}$ ; 2 н. $\text{HBr}/\text{AcOH}$ ; эфират трифтогида бора/ $\text{AcOH}$
4-Метоксибензиловый [132, 133]		$\text{CF}_3\text{COOH}$ (анизол) при 0°C; $\text{HCl}/\text{нитрометан}$ ; $\text{H}_2/\text{Pd}$ ; жидк. $\text{HF}$ ; щелочной гидролиз
Метилзамещенный бензиловый [134]	 (2,4,6-триметил- и пентаметилбен- зиловый)	$\text{CF}_3\text{COOH}$ при 20°C; 2 н. $\text{HBr}/\text{AcOH}$
Пиридинил-4-метиловый (4-пиколиловый) [135]		$\text{H}_2/\text{Pd}$ ; $\text{Na}/\text{жидк. NH}_3$ ; щелочной гидролиз; электроли- тическое восстановление
2-(Толуол-4-сульфо- нил)- этиловый [136]		$\beta$ -Элиминирование в смеси вода/диоксан с раствором $\text{Na}_2\text{CO}_3$ при 20°C
Фенациловый [137]		Тиофенолят натрия; $\text{H}_2/\text{Pd}$ ; $\text{Zn}/\text{AcOH}$ ; фотолиз
4-Метоксифенациловый [138]		Фотолиз при УФ-облучении при 20°C

## Продолжение таблицы 2-3.

Эфир аминокислоты	Y	Снятие защиты
Дифенилметиловый (бензидриловый) [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
Фтальимидометиловый [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. $H_2O_2$ )
Триметисилиловый [143, 144]	$(CH_3)_3Si-$	Сольволиз водой или спиртом
2-Триметисилилэти- ловый [145]	$(CH_3)_3Si-CH_2-CH_2-$	$F^-$

ляется азеотропной отгонкой с подходящим растворителем (бензол, толуол, тетрахлорид углерода). Для получения бензиловых эфиров пригоден также и тионилхлоридный метод [127]. Синтезы бензиловых эфиров N-замещенных аминокислот проводят с использованием дициклогексилкарбодимида, тионилхлорида и сульфурилхлорида, а также методами переэтерификации. 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 °C). Используют также натрий в жидким 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 жидким аммиаке.

*трет*-Бутиловые эфиры (-OBu<sup>1</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, гидразинолиза и аммонолиза. Далее следует отметить ее устойчивость в условиях кислотного отщепления 2-нитрофенилтио-, тритильной и 2-[бифенил-(4)]пропил-2-оксикарбонильной групп. Эфирят трифтогида 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 переэтерификацией 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 переэтерификацией 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 удается этерифицировать другим способом.

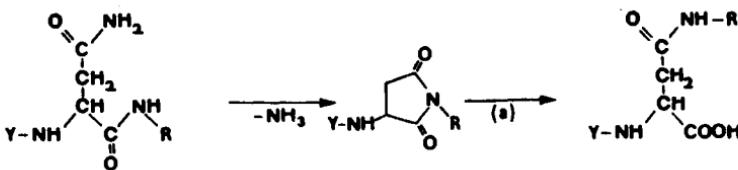
*Пиридил-4-метиловый эфир* [135] благодаря основным свойствам позволяет обратимо фиксировать пептиды на катионаобменниках после каждой ступени синтеза. Таким путем можно отделять пептиды от побочных продуктов. Преимущество этого метода состоит в том, что в противоположность твердофазному синтезу здесь 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).

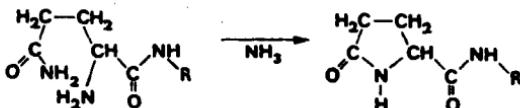
Карбоксизащитные группы в случае аминодикарбоновых кислот могут применяться как для  $\alpha$ -, так и для  $\omega$ -карбоксильной функции. Относительно просто можно получать пептиды с С-концевыми аминодикарбоновыми кислотами. Пептиды с аминодикарбоновыми кислотами в середине цепи или с N-концевыми аминодикарбоновыми кислотами нельзя получить без специального блокирования. Поэтому для наращивания пептидов с  $\alpha$ - или  $\omega$ -аминодикарбоновыми кислотами 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 дициклогексилкарбодимида 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 сукциниимидных производных в случае пептидов, содержащих аспарагин с незамещенной амидной функцией, влечет за собой нежелательную транспептидацию (а):



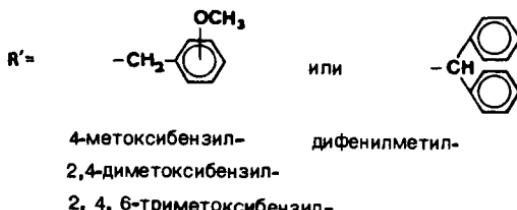
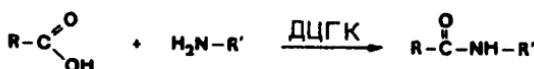
Пептиды, имеющие N-концевой глутамин с незащищенной аминной функцией, легко превращаются в пироглутамилпептиды:



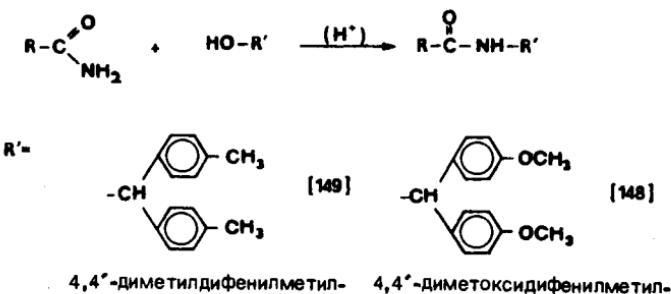
Для исключения описанных побочных реакций и особенно для улучшения растворимости в органических растворителях пептидов, имеющих амидные группы, большое значение имеет обратимое блокирование амидных функций. Как известно, незамещенные амидные функции склонны к образованию внутри- или же межмолекулярных 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 ацидоловым. Для введения метоксизамещенного бензильного остатка или же незамещенного дифенилметильного остатка N-защищенное производное аминокислоты (R) со свободной карбоксильной функцией конденсируют с соот-

вествующим амином ( $R'$ ) с помощью дициклогексилкарбодимида [147]:



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



Все амидозащитные группы могут отщепляться жидким фтороводородом [149]. За исключением 4-метоксибензильной и дифенилметильной групп, удаление защитных групп удается уже при обработке трифторуксусной кислотой при 20 °С. Добавка анизола благоприятствует 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.

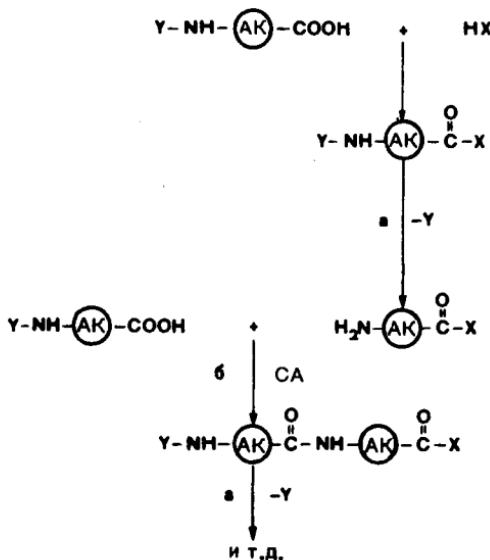
### 2.2.4.2.2.1. Активированные карбоксизащитные группы

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 внутрен- 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 диокспиперазинов) и могут аммонолизом превращаться в амиды. Однако из-за слишком низкой (для пептидного синтеза) активности названные эфиры здесь не рассматриваются.

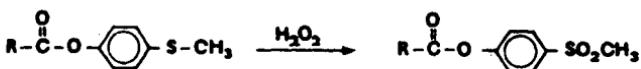
В случае *backing-off*-метода N-защищенная аминокислота (для предотвращения рацемизации предпочтительны защитные группы уретанового типа) переводится в активированный эфир ( $X$  — активирующий компонент) и после этого деблокируется. Полученный аминокомпонент связывается с другой N-защищенной аминокислотой (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.

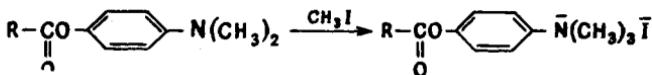
### 2.2.4.2.2. Потенциально активируемые карбоксизащитные группы

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).

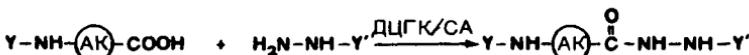
Другим примером эфиров с переменной активностью служат N,N-диметиламинофениловые эфиры. Такие эфиры неактивны, они не взаимодействуют с аминами. Однако после метилирования с помощью метилиодида образующаяся четвертичная аммониевая группа вызывает значительную активацию эфира [151a]:



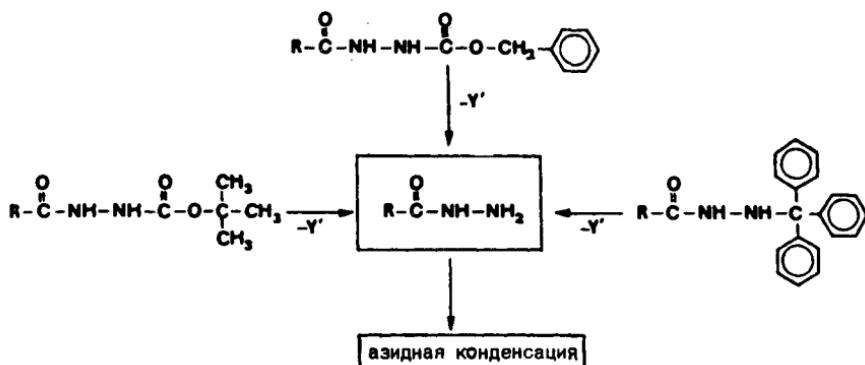
По своей активности они близки к *l*-нитрофениловым эфирам и могут быть использованы для образования новых пептидных связей.

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 аминозащитные группы, из которых важнейшими являются бензилоксикарбонил [152], *trt*-бутилоксикарбонил [153] и тритил [154].

N'-Замещенные гидразиды получаются 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 проводят селективное деблокирование Y' (Y' = Z-, Вос- или Trt-). N-Защищенный гидразид пептида можно после перевода в азид использовать далее в качестве карбоксильного компонента (*R*-N-защищенный остаток пептида):

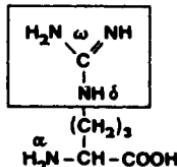


4-Метилтитиофениловый эфир нельзя использовать для синтеза фрагментов, содержащих серусодержащие остатки аминокислот, из-за необходимости окислительного активирования. Применение N'-замещенных гидразидов N-ациламинокислот не лимитировано и позволяет планировать самые разнообразные синтезы, разумно комбинируя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

### 2.2.4.3. $\omega$ -Защитные группы трифункциональных аминокислот

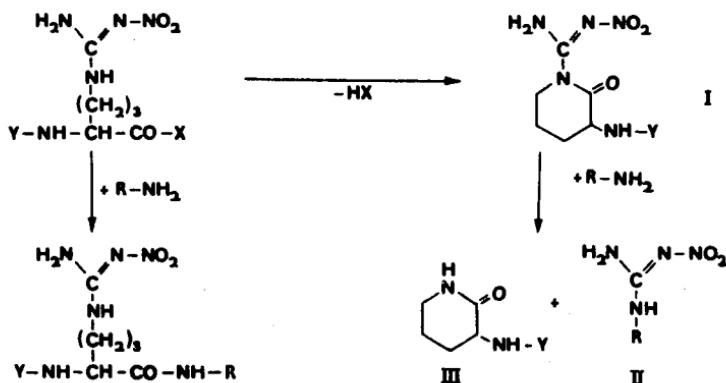
Если в пептидном синтезе используют полифункциональные аминокислоты, такие, как глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, лизин, аргинин, серин, тирозин и т. д., то функциональная группа их боковой цепи должна быть селективно блокирована. Нужные для этого защитные группы не отличаются от тех, которые применяются для блокирования  $\alpha$ -амино- или  $\alpha$ -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,  $N^\omega$ -моно- или же  $N^\omega, N^6$ -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:



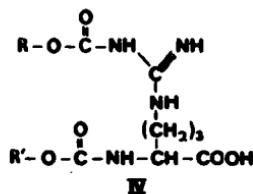
Полученный как побочный продукт лактам (I) дает при аминолизе производное замещенного нитрогуанидина (II) и лактам орнитина (III) [156]. Нитрогруппа отщепляется удобнее всего гидрированием в присутствии палладия или никеля Ренея или же в случае серусодержащих остатков аминокислот гидрированием с палладиевым катализатором при добавке эфира трифторметил 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 *тозильная группа*, которая, однако, тоже не полностью исключает образование лактама. Для дегидрирования подходит обработка натрием в жидким 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, метансульфокислотой или трифторметансульфокислотой (Йаджима и др., 1978 г.).

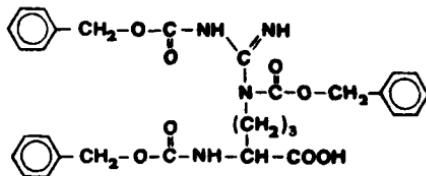
*4-Метоксибензолсульфонильная группа* [165]  $H_3C-O-C_6H_4-SO_2^-$  в противоположность тозильной группе может отщепляться легко и полностью метансульфокислотой или бортрис(трифторацетатом). Однако она устойчива к трифторметансускской кислоте и гидрогенолизу.

Для  $N^{\omega}$ -моноацилирования можно успешно применять защитные группы уретанового типа, причем проще всего удается готовить  $N^{\alpha},N^{\omega}$ -днацильные производные ( $R = R'$ ) (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 ( $R' = -CH_2C_6H_5$ ;  $R = -CH_2-C_6H_4-NO_2$ ) [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 HBr/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



V

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

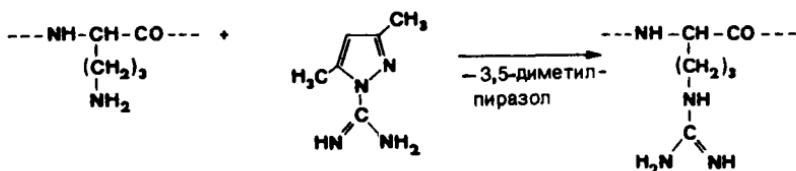
В работе [166] показано, что защищенное по  $N^\alpha$ -и карбоксилу производное аргинина со свободной (непротонированной) гуанидиновой группой дает с активированным эфиром бензилоксикарбонилглицина  $N^\omega, N^\delta$ -диацильное производное, которое может дальше перацилироваться с Z-Phe-OH/ДЦГК.

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

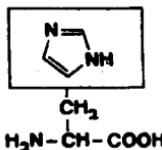
Бензилоксикарбониларгинингидробромид получают очень просто из Z-Arg-OH обработкой 1,4 н. HBr в метаноле и высаживанием продукта абсолютным эфиром. Производное гидробромида аргинина со свободной  $\alpha$ -аминогруппой можно использовать в синтезах в качестве аминокомпонента.

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

жащие пептиды путем амидирования (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 аминокомпонентом. Только после того, как в 1954 г. получили *трет*-бутилоксикарбонилгистидиназид (Z-His-OH практически нерастворим в применяемых для пептидного синтеза растворителях), были проведены синтезы с не замещенными по имидазолу азидами гистидина [167]. Вообще же благоразумнее 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<sup>Im</sup>-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-OH [169] и Boc-His-OH [170], можно синтезировать важные исходные продукты с Z-His(Tos)-OH, Z-His(Adoc)-OH и Z-His(Boc)-OH. Разумеется, можно исследовать возможность получения еще и других защитных групп уретанового типа, например N<sup>Im</sup>-бензилоксикарбонильной и др. Блокированные ацильной группой производные гистидина могут как ацилимидаэолиды вызывать нежелательные ацилирования. Кроме того, будучи лабильными к аминолизу и гидролизу, они потенциально опасны при последующих стадиях омыления эфиров или их гидразинолиза.

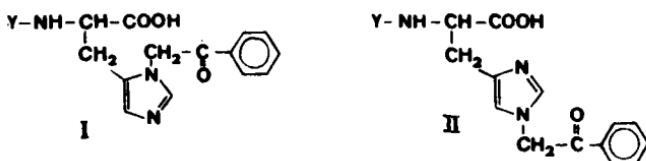
Хотя производные N<sup>Im</sup>-тозилгистидина до сих пор применялись главным образом в твердофазном синтезе пептидов, интерес к этой защитной группе растет и при осуществлении синтезов в растворе. Нуклеофильные соединения (1-гидроксибензотриазол, аммиак и др.) способны вызывать от-

Таблица 2-4. Защитные группы для имидазольной функции гистидина

N <sup>Im</sup> -Защитная группа	Формула	Деблокирование
Бензил [168]		Na/жидк. NH <sub>3</sub>
2,4-Динитрофенил [171]		2-Меркаптоэтанол (рН 8; 1 ч); устойчив при ацидозисе
1-Бензилоксикарбонил- амино-2,2,2-трифторметил [172]		H <sub>2</sub> /Pd; устойчив в условиях от- щепления Вос-остатков и алкило- вых эфиров
<i>tert</i> -Бутилоксикарбо- нил [173]		HBr/AcOH; HBr/CF <sub>3</sub> COOH; HF; устойчив к HCl в диоксане
Аламантин-1-оксикар- бонил [174, 175]		CF <sub>3</sub> COOH
Пиперидинокарбонил [176]		N <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O; 2 н. NaOH в ди- оксане
Дифенилметил [177]		6 н. HBr/AcOH (3 ч); HCOOH (10 мин); CF <sub>3</sub> COOH (1 ч)
Пиридиндифенилметил [178]		Катализитическое или электроли- тическое восстановление; Zn/AcOH
4-Толуолсульфонил [179]		Гидроксибензотриазол (HOBT) [180]; HF; щелочное омыление

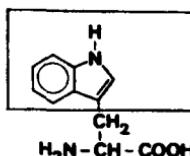
щепление этой группы [180], поэтому следует проявлять осторожность при получении некоторых активированных эфиров. К тому же существует опасность, что частичное детозилирование при нуклеофильном воздействии аминокомпонента приведет к образованию N<sup>α</sup>-тозилпроизводного пептида. Пиридиндифенилметильная группа [178] аналогично давно известной N<sup>Im</sup>-тритильной группе [181] может отщепляться гидрогенолизом или ацидозисом. Комбинация N<sup>Im</sup>-тозильной защиты с N<sup>α</sup>-Вос-группой из-за недоста-

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

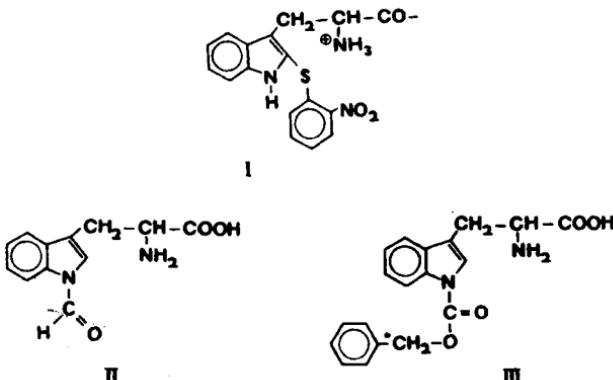


$N^{Im}$ -фенацильная группа приобрела практическое значение также для твердофазного синтеза, после того как было описано приготовление I ( $Y = \text{Boc}$ ) [183]. Деблокирование с цинковой пылью в водной уксусной кислоте проходит быстро и количественно.

#### 2.2.4.3.3. Защита индольной функции триптофана

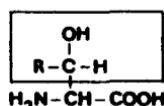


До сих пор в подавляющем большинстве случаев индольная функция триптофана не защищалась. Обычные методы образования пептидной связи позволяют вводить триптофан без особых проблем как в качестве аминокомпонента, так и в качестве карбоксильного компонента. Однако при неточном соблюдении стехиометрических соотношений в случае получения азива из гидразида возможно  $N$ -нитрозирование индольного кольца. Производные триптофана, защищенные по N- и C-концам, получаются 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 *трет*-бутильного типа случается  $N^{In}-$ *трет*-бутилирование [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). Этую побочную реакцию можно в значительной степени подавить добавлением избытка метилиндола (10–20 экв.) [187].

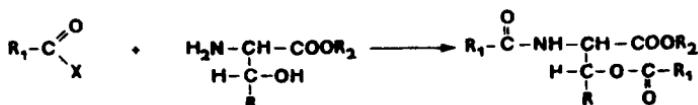


Возможности блокирования индольной функции сравнительно невелики. Первой защитной группой, использованной в пептидном синтезе, был предложенный Изумия и др. [188]  $N^{In}$ -формильный остаток (II). Отщепление происходит при 2-часовом воздействии пиперидина. Возможна комбинация  $N^{In}$ -For-защиты с  $N^{\alpha}$ -Вос-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 Вос-Trp-OEt, удалось ацилировать индольный азот с помощью бензил-(4-нитрофенил)карбоната в ацетонитриле в присутствии динизопропилэтиламина и фторида калия.  $N^{In}$ -Z-Группа устойчива в условиях отщепления Вос-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 ( $\text{R} = \text{H}$ ), треонин ( $\text{R} = \text{CH}_3$ ) или гидроксипролин является составной частью аминокомпонента. 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 гидроксиаминокислоты, вначале использовали только азидный метод. Позднее появились работы, в которых указывалось, что для активирования не защищенных по гидроксилу производных можно применять также ангидридные и карбодиимидный методы. Применение активированных эфиров вначале терпело неудачу, потому что не удавалось получить чистый N-защищенный эфир гидроксиаминокислоты с неблокированной 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].

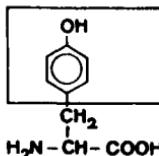
При синтезе пептидов с О-незащищенными гидроксиаминокислотами все-таки часто наблюдаются нежелательные побочные реакции. Так, в кислых условиях может происходить N → O-аминоацильная миграция [193] с последующими нежелательными реакциями. При деблокировании N<sup>α</sup>-аминозащитной группы посредством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

Таблица 2-5. Защитные группы для гидроксильной функции

О-защитная группа	Формула	Снятие защиты
Бензил [194]		Гидрогенолиз; HF; Na/жидк. NH <sub>3</sub> ; HBr/диоксан
<i>tert</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)
Тетрагидропиридин [196]		Ацидолиз
1-Бензилоксикарбонил-амино-2,2,2-трифторметил [197]	F <sub>3</sub> C-C(=O)-CH(O-)-NH-	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
Триметилсilyl [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 О-бензильный и О-*трет*-бутильный остатки. О-Бензил-L-треонин получают одновременной этерификацией карбоксильной и гидроксильной групп L-треонина бензиловым спиртом в присутствии 4-толуолсульфокислоты и последующим щелочным омылением H-Thr(Bzl)-OBzl [201]. В свою очередь О-эфирную группу можно удалить обработкой иодтритметилсиланом [202].

#### 2.2.4.3.5. Защита ароматической гидроксильной функции



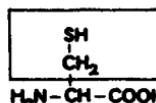
Фенольный гидроксил имеет более кислый характер по сравнению со спиртовыми функциями серина, треонина и гидроксипролина. Поэтому требования к защите этой группы повышаются. Можно, конечно, проводить пептидные синтезы и с незащищенным гидроксимом тирозина. Однако при этом получаются более низкие выходы, 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 С-концевым тирозином существует повышенная опасность рацемизации. Довольно много исследований проводилось с О-ацилированными производными тирозина, при этом оказалось, что устойчивость О-ацильной группы к нуклеофильным воздействиям недостаточна и нельзя полностью исключить ацильную миграцию O→N. В старых синтезах вазопрессина применяли тозильную группу [203]. Введение О-аллоксикарбонильных групп (Z, Bos и др.) не привело к желаемому успеху, тем более что алкилфенилкарбонатная группировка могла реагировать с аминогруппой аминокомпонента, тем самым блокируя ее.

Для защиты ароматических гидроксифункций предлагались в основном те же О-алкилпроизводные, которые уже обсуждались для алифатических гидроксиаминокислот (табл. 2-5). *O*-Тирозинбензиловые эфиры [204] можно получать прямым алкилированием медного комплекса тирозина бензилбромидом [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 трифтормуксусной кислоте. В последних случаях, однако, возможны как неполное расщепление, так и побочные реакции. При ацидолизе существует опасность С-бензилирования, поэтому рекомендуется добавлять «ловушки» катионов (анизол, резорцин и др.).

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

(1—2 ч, комнатная температура) или концентрированной соляной кислотой при 0 °C 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 иод trimetilsilana [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 жидким 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 (дирадановый метод или метод Хиски) [210] или метод Камбера (посредством метоксикарбонилсульфенилхлорида Cl-S-CO-OCH<sub>3</sub>) [211].

Наиболее употребительные тиолзащитные группы (табл. 2-6) представляют собой ациламинометилполутиоацетали (S,N-ацетали), тиоацетали, тиоуретаны и несимметричные дисульфиды. Описанные в литературе тиоэфиры (S-ацильная защитная группа), как уже указывалось, не рассматриваются.

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



Здесь речь идет о тиолдисульфидном 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-алкилиозащитные группы, тогда как другие защитные группы, в том числе и тиолзащитные группы другого типа, устойчивы к тиолизу.

Следует упомянуть защиту тиольной функции S-сульфогруппой [225].

Таблица 2-6. Защитные группы тиольной функции

S-Защитная группа	Формула	Снятие защиты (превращение в пептиды цистина по методам А, Б, В <sup>a</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)
Тритиyl [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)
Пиридинилдифенил- метил [216]		Соли Hg(II) (pH 4); Zn/AcOH; электролитическое восстановление (А)
Ацетамидометил [217]		Соли Hg(II) (pH 4); Nps-Cl с последующим восста- новлением (А/Б/В)
Хлорацетамидоме- тил [218]		I-Пиперидинтиокарбоксамид
Изобутириламидо- метил [219]		Соли Hg(II) (pH 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]		Щелочная среда (NH <sub>3</sub> , NaOCH <sub>3</sub> , NaOH); соли Ag и Hg(II) (pH 7)

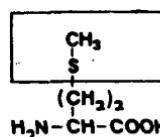
S-Защитная группа	Формула	Снятие защиты (превращение в пептиды цистина по методам А, Б, В <sup>a</sup> )
Этилтио [222]	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-$	Тиолиз (тиофенол, тиогликоловая кислота и др.)
<i>трет</i> -Бутилтио [223]	$\text{H}_3\text{C}-\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{C}-\text{S}-\text{S}-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

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

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

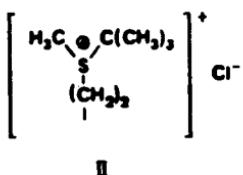
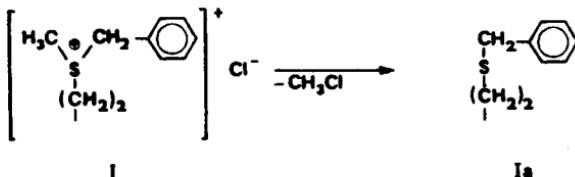
В заключение следует еще раз указать, что защита тиольной функции вызывает большие затруднения и из описанных (более 50) возможных защит тиольной группы трудно остановиться на удовлетворяющем различным требованиям варианте.

#### 2.2.4.3.7. Защита тиоэфирной функции метионина



Тиоэфирная группа метионина, собственно говоря, не должна вызывать чрезвычайных затруднений при синтезе пептидов. Введение амино- 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 жидким 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 трифтторида бора [227]. При ацидолитическом 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-карионами (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, аизол и др.) не всегда возможно.

Другая причина нежелательных побочных реакций — чувствительность тиоэфирной 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 метилэтанолсульфита 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 тиоэфирной 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-

лоду. 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 аминокомпонента ( $R_2$  — остаток аминокомпонента).



Нуклеофильный аминокомпонент 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  $\text{R}'\text{X}^-$ .

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].

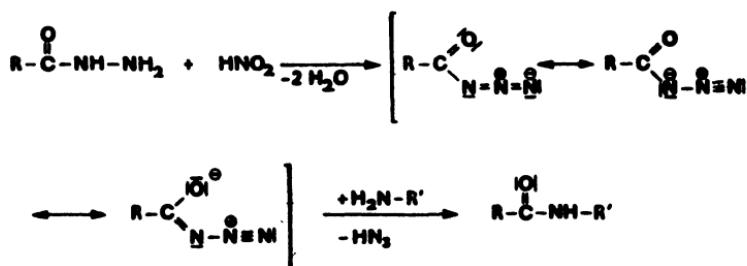
Из наиболее употребительных методов надо назвать азидный метод, метод смешанных ангидридов карбоновых и алкилугольных кислот, метод активированных эфиров и, наконец, карбодиимидный метод, который в своей модифицированной форме (карбодиимид с добавками) наиболее широко используется в синтезах. Именно 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 аминокомпонентов 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 холода этилацетатом, промывают, высушивают и вводят в реакцию с аминокомпонентом:

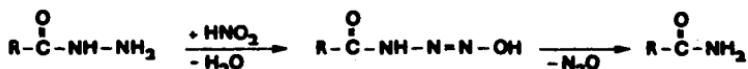


Некоторые азиды могут быть выделены путем осаждения при добавлении ледяной воды и затем, после растворения в подходящем растворителе, введены в реакцию с аминокомпонентом. Эти операции следует проводить при низких температурах ввиду нестабильности азидов и связанной с этим опасности взрыва.

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 ациламинокислот легко рацемизуются 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.

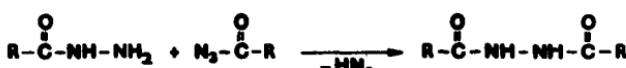
При количественном протекании азидной конденсации единственным побочным продуктом является азотистоводородная кислота, обработка реакционной смеси не вызывает затруднений. К сожалению, однако, синтез усложняется нежелательными побочными реакциями, хотя при тщательном соблюдении условий многие конкурентные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

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

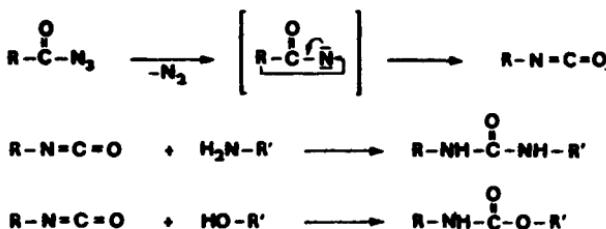


Согласно Рудингеру, можно в значительной степени избежать этой побочной реакции, проводя процесс в безводной среде с алкилнитритами (например, *трет*-бутилнитритом) в присутствии хлороводорода [233].

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 оксазолиона-2:



Кроме того, при азидной конденсации наблюдалась 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-карбоксиангидриды).

#### **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 аминокомпонентом 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 а). Последняя при использовании алкилхлорформиатов ( $R$  — этил или изобутил) очень неустойчива и сразу разлагается на  $CO_2$  и соответствующий спирт. Правда, известны также примеры воздействия аминокомпонента на карбонил угольной кислоты [241, 242], причем освобождается ациламинокислота и в качестве побочного продукта получается уретан (путь б). Как показал Виланд, эту побочную реакцию нельзя полностью исключить даже при температуре реакции  $-15^{\circ}C$ . Указанныя побочная реакция протекает обычно при использовании N-тозил-, N-тритил- и N-трифтораце-

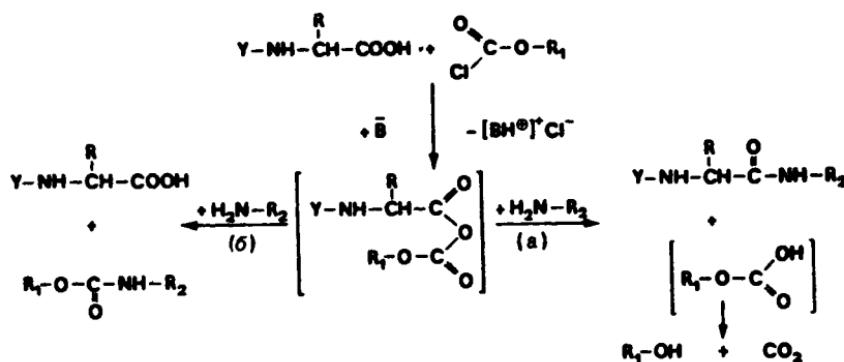


Рис. 2-7. Синтез по методу смешанных ангидридов. Y — N-защитная группа, R — остаток боковой цепи, B — третичное основание, R<sub>1</sub> — радикал алкилугольной кислоты, R<sub>2</sub> — остаток аминокомпонента.

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  $-5 + -15^\circ\text{C}$  добавляют соответствующий алкилхлорформиат.

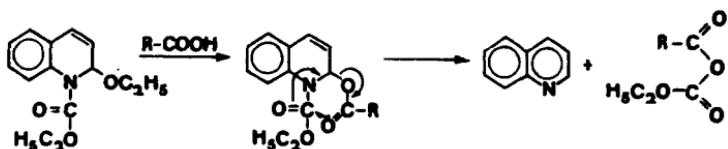
Андерсон и сотр. [243] предложили условия, при которых можно полностью избежать рацемизации при использовании изобутилхлорформиата: в качестве основания применяют N-метилморфолин, время образования ангидрида — 30 с и низкая температура (от  $-5$  до  $-15^\circ\text{C}$ ). Эти данные были подтверждены Кемпом с помощью чувствительного метода изотопного разбавления. Тест на рацемизацию по Изумия неожиданно показал 2,4% рацемата. Добавлением N-гидроксисукцинида 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 иссимметричных 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, гидроксиаминокислоты, 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» аминолиза.

Тилак [246] описал ускоренный вариант синтеза без очистки промежуточных продуктов, так называемый метод последовательных избытков (ПСА-метод)\*. Если для приготовления ангидрида используют реакцию с изобутилхлорформиатом в присутствии N-метилморфорлина 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,  $\text{pH} 8$ ).

В одном из вариантов метода смешанных ангидридов предложено применять 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 гидроксиаминокислоты можно вводить в реакцию без специальной защиты гидроксила. Отметим, что ацилспаррагин при этом реагирует без побочных реакций.

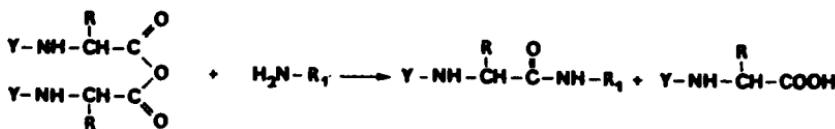
Возвращаясь к механизму реакции, следует допустить, что предполагаемый промежуточный продукт — 1-этоксикарбонил-2-ацилокси-1,2-дигидрохинолин, будучи активированным эфиrom, может также реагировать с аминокомпонентами по аналогии с эфирами 8-оксихинолина (разд. 2.2.6.1.1) [249].

### 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 аминолиза, вообще не существует. Правда, выход пептида не может превышать 50%. Большую часть ациламинокислоты, образую-

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

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



Симметричные ангидриды ациламинокислот можно легко синтезировать, используя дициклогексилкарбодиимид (ДЦГК), этоксинацетилен, 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].

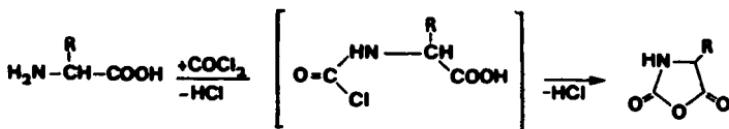
### 2.2.5.2.3. N-Карбоксиангидриды (НКА)

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-оксазолидиндоны-2,5) были получены термическим отщеплением этилхлорида от хлорангидридов N-этоксикарбониламинокислот:

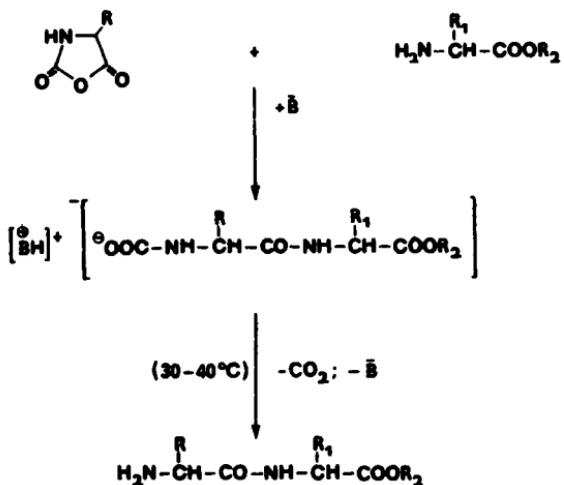


При получении N-карбоксиангидридов в качестве исходных соединений наиболее подходят хлорангидриды N-бензилоксикарбониламинокислот. Очень удобный способ синтеза N-карбоксиангидридов состоит во взаимодействии свободных аминокислот с фосгеном, при этом в качестве промежуточных продуктов образуются соответствующие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

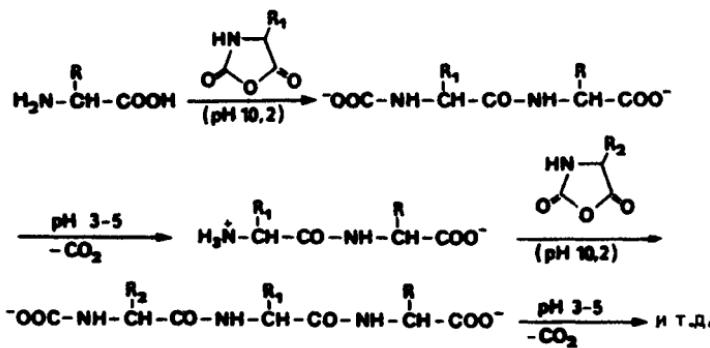


Поскольку даже следы воды вызывают полимеризацию N-карбоксиангидридов в полипептиды, то применение N-карбоксиангидридов для контролируемого синтеза пептидов сопряжено с большими трудностями.

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 карбаминовой 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 карбаминовой 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 холода 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 (HTA; 1,3-тиазолидиндоны-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].

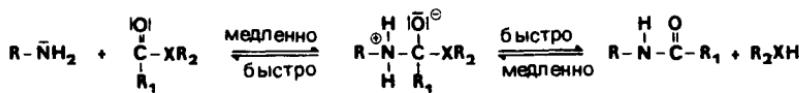
Применение НКА и HTA особенно удобно для осуществления свободного от рацемизации синтеза пептидных фрагментов без выделения промежуточных продуктов, причем трифункциональные аминокислоты, за исключением лизина и цистеина, не требуют специальной защиты. Хиршману и Денкевальтеру [255] удалось синтезировать 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 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (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 тиоэфиры 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 аминолизе эфира классифицируется по аналогии с омылением эфира как катализируемое основанием бимолеку-

лярное расщепление эфирной группы между ацильным остатком и кислородом ( $B_{Ac}$  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 аминолизе фениловых эфиров в органических растворителях определяющей скорость стадией следует считать не образование тетраэдрических аддуктов, а скорее их разложение.

В противоположность замещенным алкиловым, незамещенным или замещенным ариловым эфирам ( $X = O$ ), а также изологичным тио- ( $X = S$ ) и селеновым эфирам ( $X = Se$ ), аминолиз которых протекает по классическому механизму  $B_{Ac}$  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 аминолиза этих эфиров образуется циклическое переходное состояние, стабилизированное водородными связями, которые в свою очередь обусловлены наличием подходящих протоноакцепторных групп (рис. 2-8). В результате этого аминолиз протекает с высокой скоростью, и в то же время исключается образование оксалонов, ведущее к рацемизации (разд. 2.2.6.1.1).

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

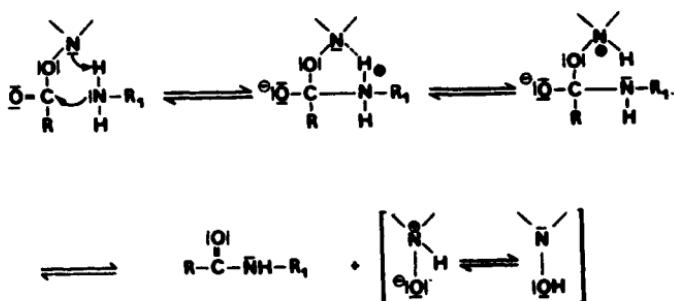


Рис. 2-8. Активирование карбоксила по механизму внутримолекулярического основного катализа при образовании циклического переходного состояния. R — остаток карбоксикомпонента, R<sub>1</sub> — остаток аминокомпонента.

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

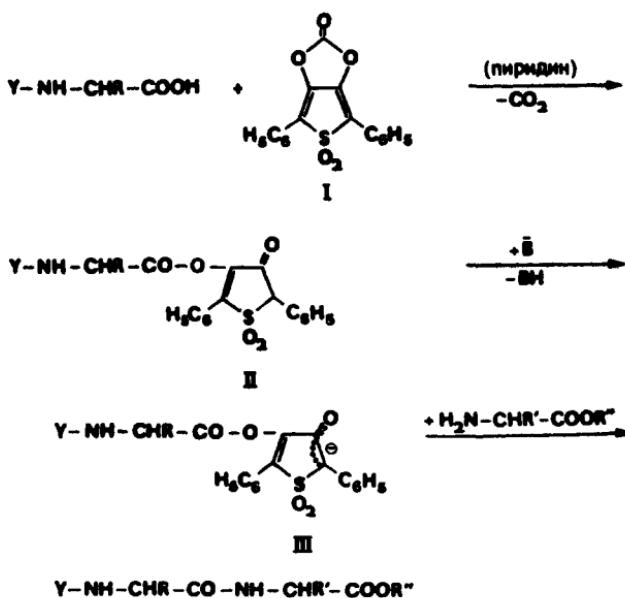


Таблица 2-7. Активированные эфиры



(R — остаток аминокислоты, A — активирующий компонент)

№ п/п	Эфир	Сокращение	Формула А	Литература
1	Тиофениловый	SPh		257
2	Цианометиловый	OCm		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	Пентафтормениловый	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		274
11	N-Гидроксипиперидиновый	OPip		259
12	8-Хинолиловый	OQ		260, 262
13	5-Хлор-8-хинолиловый	OQCl		261
14	N-Гидроксисукцинимидный	ONSu		275

№ п/п	Эфир	Сокра- щение	Формула А	Литература
15	N-Гидроксифталимидный	ONPh		276
16	N-Гидроксиглутаримидный	ONGI		277
17	N-Гидроксиуретановый	ONUr		278
18	N-Гидроксиридин-2,3-дикарбо- ксимидный			279
19	2-Гидрокси-3-этиламинокарбо- нилфениловый			280
20	N-Гидроксиморфолиновый	ONMor		281
21	2-Метокси-4-нитрофениловый			282
22	2-Гидроксифениловый			283
23	3-Гидрокс-4-оксо-3,4-дигидро- хиназолиновый	OOCh		284
24	1-Гидроксибензотриазоловый	OBr		285
25	2-Тиопиридиловый	SPur		286
26	3-Гидроксиридазон-6-овый	OPn		287
27	N-Гидрокси-5-норборнен-2,3-ди- карбоксимидный	ONB		316, 317

<sup>a</sup> Аминолиз эфиров 1—10 протекает по механизму  $B_{Ac}2$ , в то время как для эфиров 11—27 активирование карбоксила осуществляется по механизму внутримолекулярного основного катализа с образованием циклического промежуточного состояния (аналогично эфирам N-оксипиридинина и 8-оксихинолина)

N-защищенными аминокислотами в протонных растворителях с образованием соответствующих активированных эфиров (II). Как видно из приведенной схемы, активированный эфир реагирует с аминокомпонентом, 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-гидрокисукцинимидные и галогензамещенные фениловые эфиры. Для приготовления 4-нитрофениловых эфиров (впервые описаны Бодански) пригодны метод смешанных ангидридов, дициклогексилкарбодиимидный (см. ниже) и карбонатный методы [292].

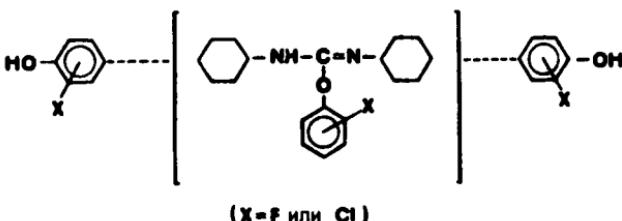
Большой экономический интерес представляет разработанный Вольманом [293] вариант их приготовления. При реакции бензил-(4-нитрофенил)-карбоната с солью аминокислоты получают соответствующую соль бензилоксикарбониламинокислоты, которая после подкисления и добавления ДЦГК образует с освободившимся 4-нитрофенолом замещенный активированный эфир с выходами 65—80%. Если исходить из *тремт*-бутил-(4-нитрофенил)-карбоната, то можно получить 4-нитрофениловые эфиры Вос-аминокислот. 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 аминолиза в диметилформамиде, N,N-диметилацетамиде и диметилсульфоксиде. Каталитические добавки уксусной кислоты, пивалиновой кислоты, азолов и N-гидрокисисоединений ускоряют реакцию аминолиза. Отделение освобождающегося во время аминолиза 4-нитрофенола часто бывает трудным. Удаление побочных продуктов, особенно нежелательных при последующем гидрогенолизе, осуществляется обычно переосаждением в системах диметилформамид — вода или диметилформамид — эфир, адсорбией на ионитральном оксиде алюминия или образованием комплексов с пиридином (pH 6,5).

*N*-Гидрокисукцинимидные эфиры, предложенные впервые Андерсоном и сотр., отличаются хорошей способностью к кристаллизации и высокой активностью при аминолизе. 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 гидрокисукцинимидными эфирами N-замещенных аминокислот, получая пептиды с хорошими выходами. Преимуществом является также то, что освобождающийся при аминолизе N-гидрокисукцинимид растворим в воде.

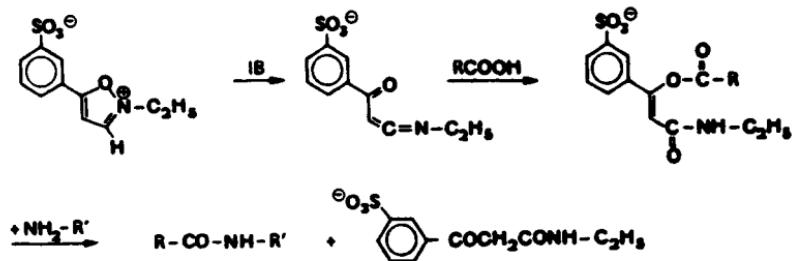
Большое практическое значение имеют также *галогензамещенные фениловые эфиры N*-замещенных аминокислот, которые были введены в синтетическую пептидную химию Купришевски и сотр. По скорости аминолиза они сравнимы с 4-нитрофениловыми эфирами, но имеют преимущество, так как удаление освобождающегося при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

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



Перечисленные методы получения пригодны и для *пентафторфениловых эфиров*, которые оказались превосходными ацилирующими агентами для синтеза различных пептидов. Комплекс *пентафторфенола с производными изомочевины* (F-комплекс), который имеет строение, аналогичное комплексу пентахлорфенола с карбодииimidом (*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*-защищеннымами аминокислотами и пептидами в присутствии мягких оснований реакционноспособный эфир енола, который далее без выделения можно вводить в реакцию с аминокомпонентом:



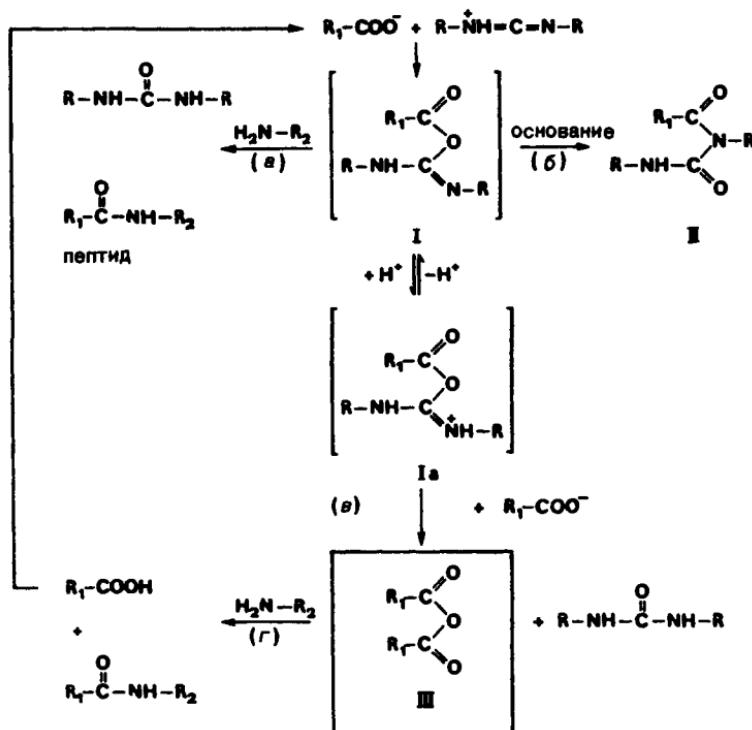
Образующееся производное ацилацетамида хорошо растворяется в воде, поэтому его можно легко удалить. Кроме того, были изучены другие соединения изоксазолия на предмет применения их в пептидном синтезе [296].

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

#### 2.2.5.4. Карбодиimidный метод

Пригодность карбодиимидов 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 карбодиимиду присоединяется анион карбоксильного компонента с образованием ацилуреида I (O-ациллактам, производное изомочевины),



**Рис. 2-9.** Механизм образования пептидной связи с помощью ДЦГК. R — циклогексил, R<sub>1</sub> — остаток N-защищенной аминокислоты или пептида, R<sub>2</sub> — 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 *b*). Симметричный ангидрид может реагировать с аминокомпонентом, образуя пептид и одну молекулу ациламинокислоты (путь *c*).

Катализируемая основаниями перегруппировка О-ациллактима I в производное ацилмочевины (путь *b*) 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 карбодиимидом, которые обладают достаточной основностью для этого.

#### 2.2.5.4.1. Применение дициклогексилкарбодиимида

N,N'-Дициклогексилкарбодиимид (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 дициклогексилкарбодиимидным методом N,N'-дициклогексилмочевина выпадает из реакционной смеси. Дициклогексилкарбодиимидные сочетания можно проводить в присутствии воды, так как скорости гидролитического и аминолитического расщепления О-ациллактима 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 карбодиимидом использовать производные аминокислот, полностью защищенные по боковым функциям.

#### 2.2.5.4.2. Применение модифицированных карбодиимидов

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 карбодиимиды с третичноаминными или четвертичноаммонийными группами. Побочные соединения, которые полу-

чаются с такими карбодиимидами, легче удалить благодаря их растворимости в воде или в кислотах. Такие соединения, как 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимидгидрохлорид [299] или 1-циклогексил-3(3-диметиламинопропил)-карбодиимидметилюид [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 карбодиимидами*. Вольман и сотр. [301] синтезировали полигексаметиленкарбодиимид  $-(\text{CH}_2)_6-\text{N}=\text{C}=\text{N}-[(\text{CH}_2)_6-\text{N}=\text{C}=\text{N}]_n-(\text{CH}_2)_6-$ . Полимерная мочевина, получающаяся в результате реакции, легко удаляется. Ито и др. [302] предложили *несимметричные карбодиимиды*, 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-этилкарбодиимида 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 карбодиимидов 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-гидроксисукцинимида образование пептидной связи протекает практически без рацемизации и без образования ацилмочевины. Метод Вюнша — Вейганда стал теперь конкурентно способным азидному методу для случаев конденсации фрагментов.

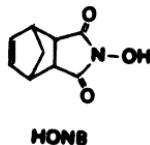
С помощью этого комбинированного ДЦГК-метода были успешно проведены фрагментные конденсации и циклизация фрагментов. Метод имеет, однако, недостаток: может протекать конкурентная реакция между ДЦГК и N-гидроксисукцинимидом, особенно заметная в случае стерически затрудненных пептидов. Согласно исследованиям Гросса и Билка [305], эта побочная реакция ведет к размыканию кольца О-ациллактима, образованного из эквимолярных количеств ДЦГК и N-гидроксисукцинимида, под действием второго моля N-гидроксисукцинимида. При этом отщепляется дициклогексилмочевина. Промежуточный продукт — ацилнитрен перегруппировывается в изоцианат, который в свою очередь присоединяет третий моль N-гидроксисукцинимида с образованием N-гидроксисукцинимидного эфира сукцинимидоксикарбонил- $\beta$ -аланина. Этот активированный эфир может выступать в качестве конкурирующего ацилирующего реагента, вследствие чего происходит неконтролируемое встраивание  $\beta$ -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 карбодиимидного 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-бензольсульфгидроксамовая кислота [311], динитрил изонитрозомалоновой кислоты  $\text{HO}-\text{N}=\text{C}(\text{CN})_2$  [312]. Предлагались также другие изонитрозопроизводные [313], 5,7-дихлор-8-гидроксихинолин [307], а также N-гидрокси-5-нонборнен-2,3-дикарбоксимиид [314, 315].

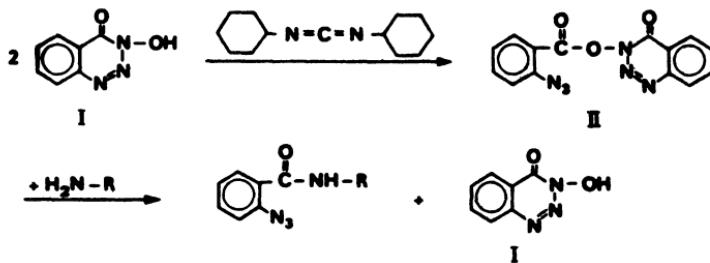
Долгое время методы Вюнша — Вейганда и Гейгера — Кёнига считались наиболее пригодными для синтеза пептидов. Что касается безопасности в отношении рацемизации, то, как показано новыми исследованиями [310, 312, 316, 317], имеются ограничения и при работе с ДЦГК-гидроксibenзотриазолом.

Большое практическое значение приобретает *N*-гидрокси-5-нонборнен-2,3-дикарбоксимиド (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-гидроксибензотриазол) 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 О-ацилпроизводное изомочевины (III) (рис. 2-10). Оно

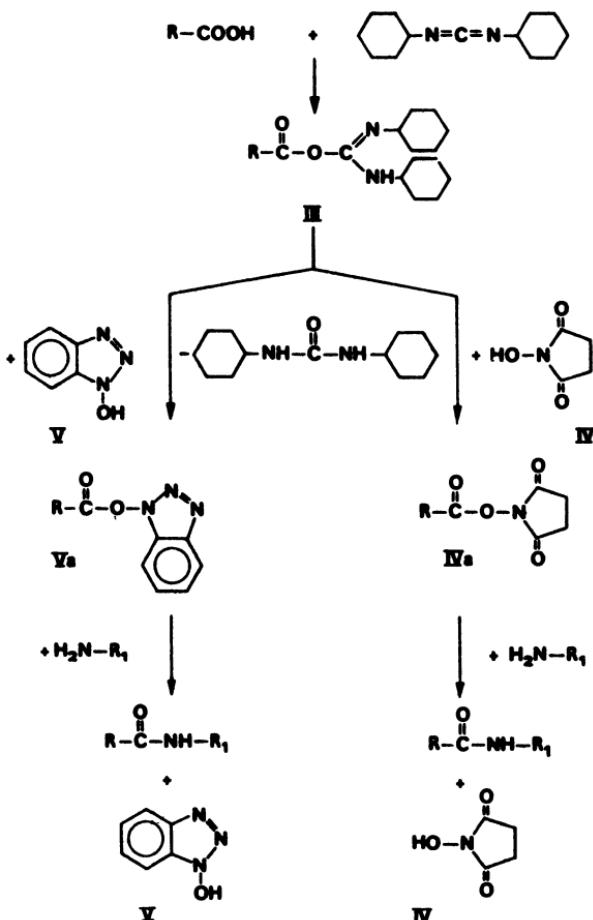


Рис. 2-10. Реакции, протекающие при синтезе по ДЦГК-методу с добавками N-гидроксисоединений. R — остаток карбоксикомпонента, R<sub>1</sub> — остаток аминокомпонента.

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 О-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<sub>3</sub> или AlCl<sub>3</sub> 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<sub>2</sub> 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 оксазолона 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.

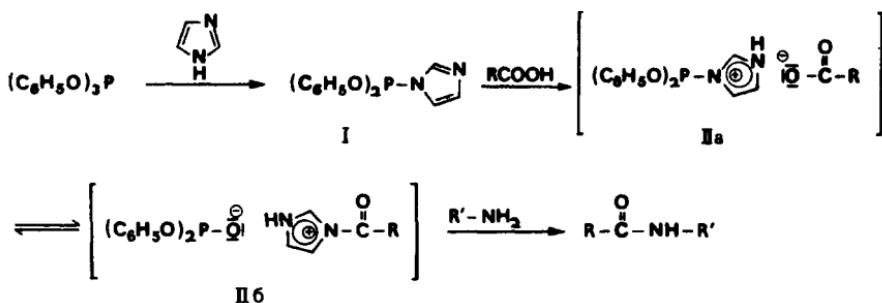
## 2.2.5.5. Пептидные синтезы с применением соединений фосфора

Применение соединений фосфора для образования пептидной связи кажется обоснованным уже потому, что при биосинтезе белка активирование аминокислот происходит при реакции с аденоинтрифосфатом. 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

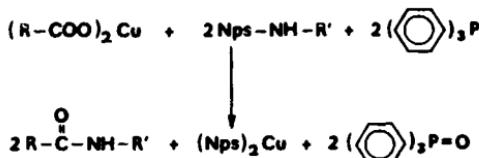
Митин и сотр. [323, 324] предложили проводить конденсацию N-ациламинокислоты с эфирами аминокислот в присутствии трифенилfosфита и 2 г-экв. имидазола при 40 °C. В качестве растворителей используют ацетонитрил, диоксан или диметилформамид. Соответствующие эфиры N-ацилпептидов получаются с хорошими выходами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



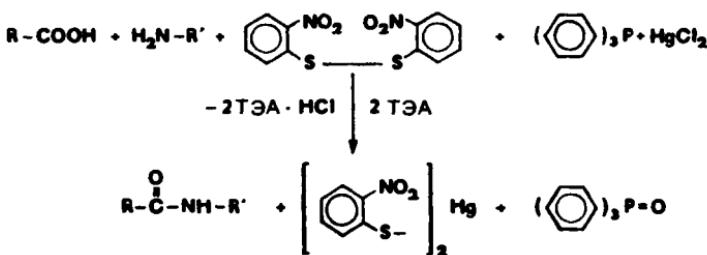
Хотя допустимы и другие промежуточные ступени, реакция, вероятно, идет прямо через N-ацилимидаолиум-(дифенил)-fosфит (II<sub>b</sub>), который образуется из имидазолил-(дифенил)-fosфита (I) и карбоксильного компонента. В качестве N-защитных групп используют бензилоксикарбонильный или *tert*-бутилоксикарбонильный остаток, тогда как, например, арилсульфенильные группы приводят к побочным реакциям.

### 2.2.5.5.2. Метод Мукайма

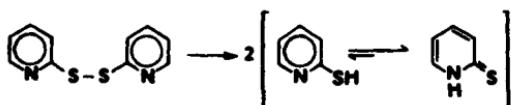
Мукайма и сотр. [325] предложили методику синтеза, названного окислительно-восстановительной конденсацией. Медная соль ациламинокислоты и эфир 2-нитрофенилсульфениламинокислоты реагируют с трифенилfosфином, причем  $Cu^{2+}$  выступает как тиольная «ловушка»:



Точно так же могут реагировать с трифенилfosфином 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:

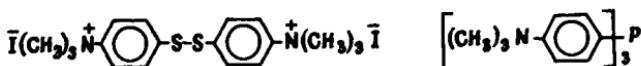


Еще лучше в качестве дисульфидного компонента вводить дипиридил-2-дисульфид [326]. Добавка тиольной «ловушки» не нужна, так как образующийся во время реакции пиридин-2-тиол перегруппировывается в более устойчивый тион:



Метод Мукаяма пригоден и для реакций конденсации на полимерных носителях.

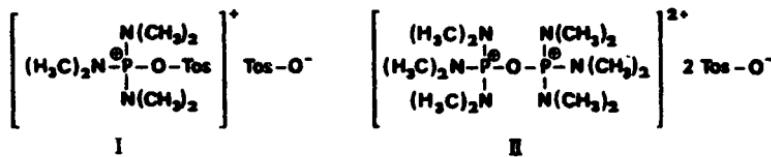
Интерес представляет использование для окислительно-восстановительной конденсации водорастворимых производных диарилдисульфида и триарилфосфина [326а]:



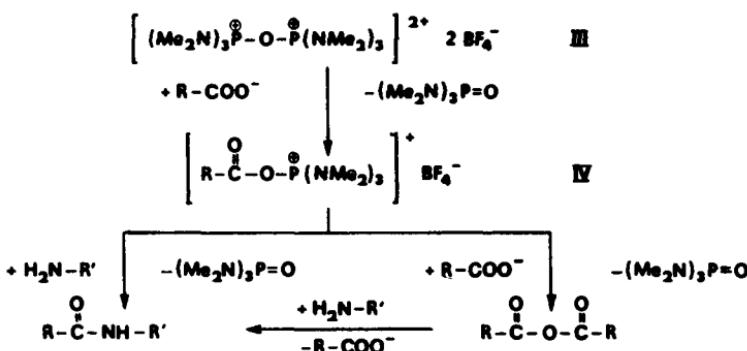
Применение этих реагентов значительно облегчает выделение синтезированного пептида, так как все побочные продукты реакции легко удаляются водой.

#### 2.2.5.5.3. Применение других производных фосфора

Кеннер, Шеппарт и др. [421] разработали метод коагенсации с применением гексаметилтриамида 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 °С за 5–20 мин образуется тозилат монокатиона (I), который при нагревании до 55 °С переходит в дитозилат (II).

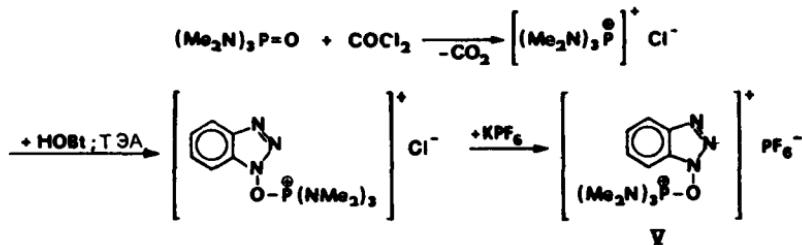


Очень гигроскопичный дитозилат II может быть переведен в сухом ацетонитриле с тетрафтороборатом натрия в кристаллический нетигроскопичный бис-(тетрафтороборат) III, который известен как *реактив Бейтса*. При его использовании дипептиды получаются с высоким выходом. Правда, этот метод не вполне надежен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



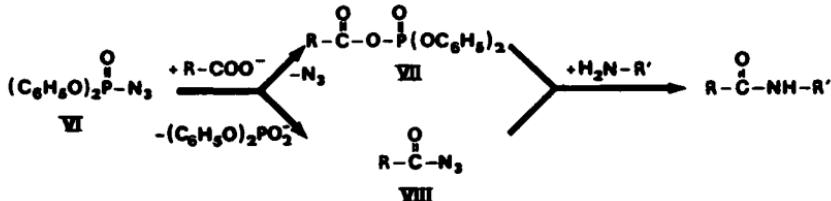
фониевая соль (IV), с которой реагирует аминокомпонент. Наряду с этим возможен также путь через симметричный ангидрид.

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

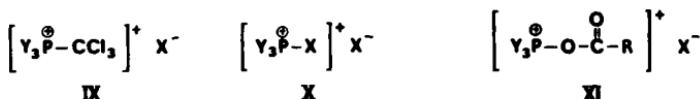


При конденсации с помощью V амидная группа аспарагина не дегидратируется в нитрил. Но этот вариант синтеза также не свободен от рацемизации [330].

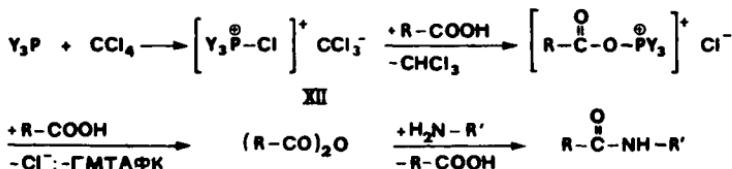
Практический интерес в качестве реагента конденсации представляет фосфорилазид (VI) [331]. В этом случае наряду с несимметричным ангидридом VII в качестве промежуточного продукта может получаться также ацилазид (VIII).



При взаимодействии триарил(триалкил)fosфина с тетрагалогенметанами или же с галогенами ( $X = Cl, Br$ ) получаются аддукты IX [332] или X [333, 334], которые при взаимодействии с ациламинокислотами образуют активированные ацилок-ситиарил(триалкил)-fosфоневые соли (XI).



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

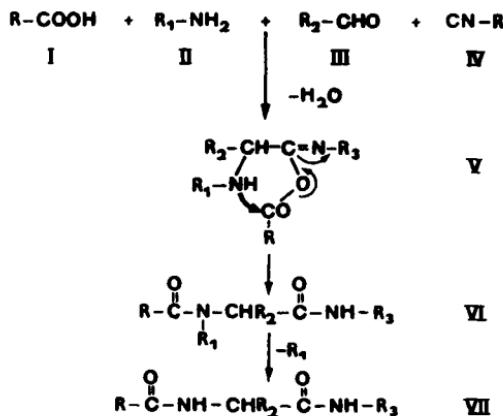


Ямада и Такеучи [336] получили с трис-(диэтиламидом)fosфористой кислоты, а также с трибутилфосфином и трис-(4-метил)-пиперазиноfosфином лучшие результаты, чем с trimетилфосфитом ( $Y = \text{OCH}_3$ ). Надежность этих методов в отношении рацемизации спорна.

#### **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.

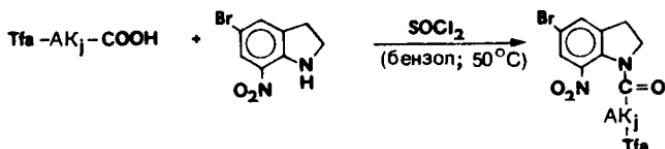
Уги и сотр. [338] разработали метод, отличающийся от классического пептидного синтеза, который пригоден как для получения пептидных фрагментов, так и для конденсации фрагментов.



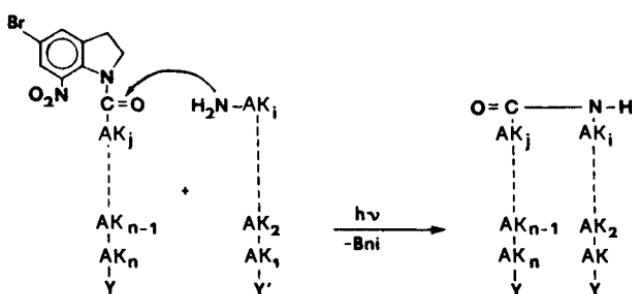
Метод Уги можно рассматривать как комбинацию реакции Пассерини с конденсацией Манниха. Для получения пептидных фрагментов проводят в одну стадию, без выделения промежуточных продуктов, взаимодействие N-ациламинокислоты (I), замещенного амина (II), альдегида (III) и изонитрила (IV) (производного аминокислоты 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-нитрондолин фотопод действует 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:



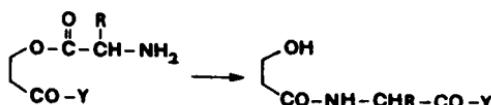
Таким путем можно получить пентапептид по схемам 2 + 3 или же 4 + 1.

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

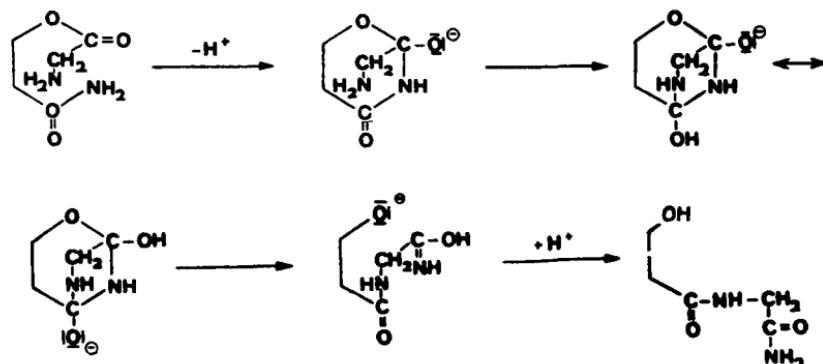
конденсации растворителях. При низкой концентрации реагентов реакции конденсации идут очень медленно. В этих условиях могут идти необратимые внутримолекулярные побочные реакции или обменные взаимодействия с растворителем. Не спасает положения и более энергичное активирование карбоксила, так как при этом повышается опасность рацемизации. Здесь могли бы помочь некие «молекулярные щипцы», 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 карбоксилису.

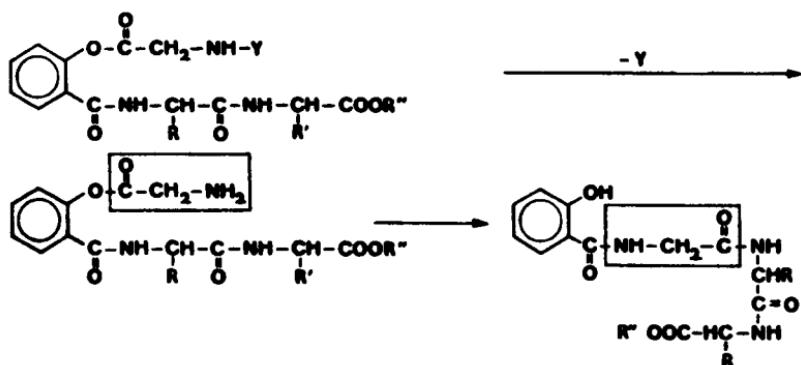


Для таких реакций подходят свободные карбоновые кислоты ( $\text{Y} = \text{OH}$ ), эфиры ( $\text{Y} = \text{OR}$ ), амиды ( $\text{Y} = \text{NH}_2$ ), а также замещенные амиды ( $\text{Y} = \text{NH}-\text{R}$ ). Так как N-ациламиокислоты представляют собой замещенные амиды ( $\text{Y} = \text{NH}-\text{CH(R)}-\text{COY}'$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



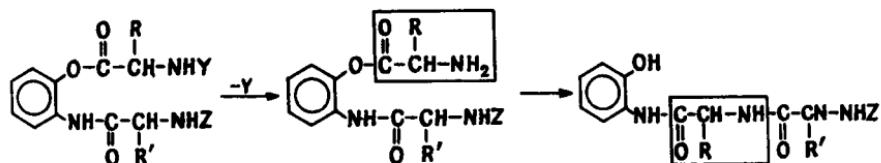
Превращение очень легко протекает с салициловой кислотой в качестве гидроксилодержащего компонента:





После введения О-аминоацильного остатка и последующего отщепления амино-защитной группы Y происходит спонтанная перегруппировка с образованием эфира салицилойлтрипептида. 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 Вильандом и сотр. в 1956 г.

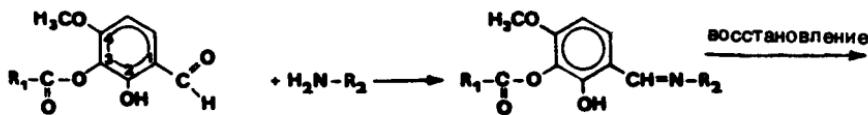
Интерес представляет внутримолекулярная перегруппировка производных *o*-аминофенола, также приводящая к образованию пептидной связи [344а]:

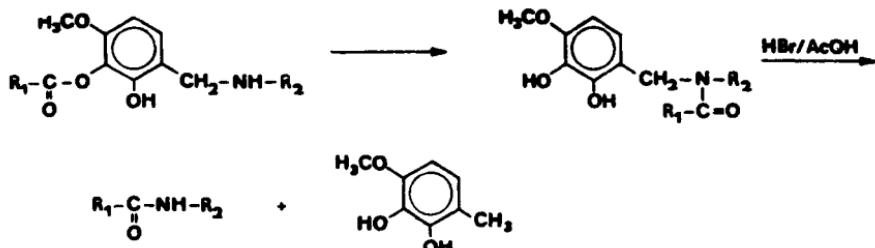


В отличие от перегруппировки Бреннера наращивание пептидной цепи здесь идет от C- к N-концу.

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-гидроксибензальдегид. 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-гидроксибензальдегида, 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-дигидроксибензильным 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. Данилевски 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 пластиенином. Впоследствии многие исследователи занимались синтезами высокомолекулярных пластиенинов 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 осуществляется фермент пептидилтрансфераза. Так как этот фермент взаимодействует с протеиногенными 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 анилид гиппуровой кислоты:



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

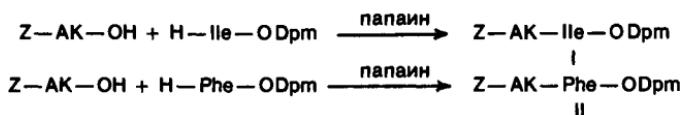
используют производные аминокислот или пептидов и  
продукт выпадает в осадок, благодаря чему равновесие сдвигается в сторону об-  
разования пептида.

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

После работ исследовательских групп Исбэва (Исследовательский центр по химии в Сагами) и Морихара (Исследовательская лаборатория в Сино-ги) в Японии и Луизи и сотр. в Швейцарии на ферментативном пептидионом 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.

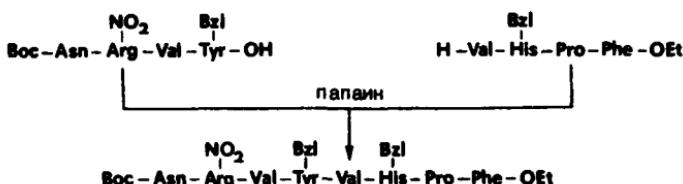
В качестве ферментов использовались протеазы животного, растительного и микробного происхождения. Исбэва и сотр. [347] применяли в качестве катализаторов для образования пептидной связи папаин, пепсин, субтилизин BPN' (иагароза), а также бактериальные металлопротеазы протелизин (*Bacillus subtilis var. amyloliquefaciens*), тациназу N (*Streptomyces caespitiosus*), термолизин 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]:



AK	Выход, %		AK	Выход, %	
	I	II		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

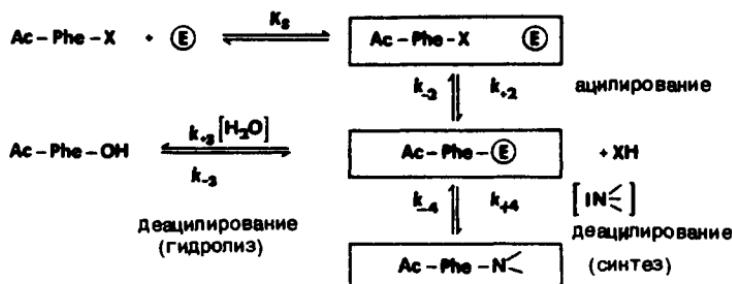
С другими названными выше протеазами также получены многообещающие результаты при реакциях конденсации. Исова и сотр. показали применимость ферментативного синтеза для получения небольших биологически активных пептидов, таких, как, например, [1-аспаргин, 5-валин]-ангиотензин (II):



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 аминокомпонентом ( $N =$ ) 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 аминокомпонентов 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. [356а] 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 Иохансена [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.

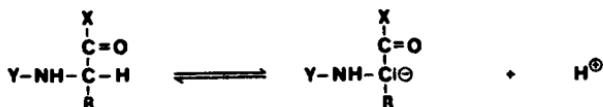
## 2.2.6. Проблемы рацемизации при пептидных синтезах

Все операции при синтезе пептидов, которые проводятся по функциональным группам, связанным с асимметрическим центром, таят 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 карбоксили N-ациламинокислот, 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-ациламинокислоты I (рис. 2-11) может с отщеплением NH образоваться азлактон, который, как известно, очень легко рацемизуется [357]. Скорость образования азлактона II зависит от различных факторов. Благодаря электрофильному заместителю X

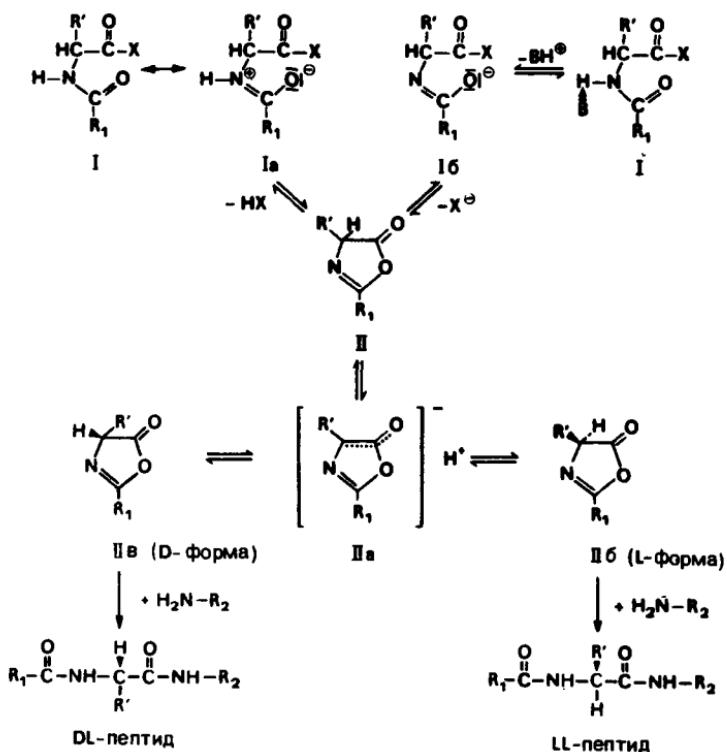


Рис. 2-11. Азлактонный механизм рацемизации. R' — остаток С-концевой аминокислоты, R<sub>1</sub> — остаток пептида, X — активирующая группа, R<sub>2</sub> — остаток аминокомпонента, B — основание.

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, аминоацетил 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].

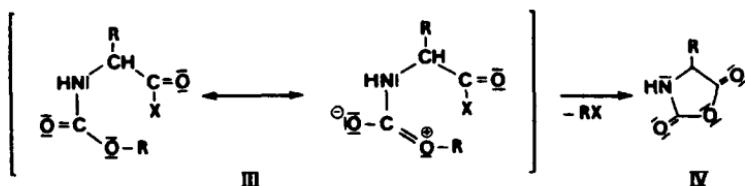
Полученный азлактон II может легко рацемизоваться в условиях конденсации (аминокомпонент, основные активирующие средства и др.). При

этом благодаря псевдоароматическому промежуточному IIа 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 — Гамметта. 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. Аллоксикарбониламинокислоты III могут, правда в активированной форме ( $X = Cl$ ), давать N-карбоксангидриды [1,3-оксазолидин-2,5-дионы] IV, однако аллоксигруппы препятствуют образованию азлактонного кольца.



Бенуатон и Чен сообщили [361], что при определенных условиях из Вос-аминокислот и карбодиимида вопреки существовавшему мнению образуются 2-аллоксиоксазолоны. Последние, однако, в противоположность оптически лабильным 2-алкилоксазолонам 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.

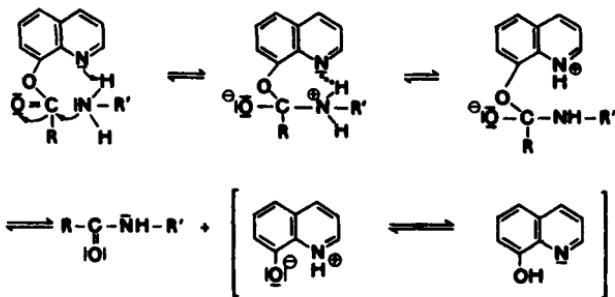
3. *Использование азидного метода.* Азидная конденсация безопасна в отношении рацемизации при условии отсутствия избытков *трет*-основания

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, аминолиз 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-гидроксипиридиновые и 8-хинолиловые эфиры (разд. 2.2.5.3). Это активированные эфиры с новым механизмом действия, который показан на примере 8-хинолилового эфира [262]:



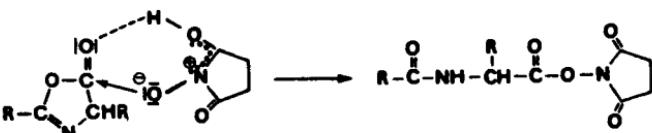
Благодаря слабому активированию С-атома карбоксила образование азлактона исключено или сильно затруднено. Повышенная скорость аминолиза объясняется промежуточным образованием циклического переходного состояния. Аналогичный реакционный механизм предлагается [362] также в случае активирования реагентом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

**6. Карбодиimidный метод с добавками** (разд. 2.2.5.4.3) принадлежит к наиболее часто применяемым методам конденсации. Гудман и сотр. [363, 364] провели исследование N-гидрокси соединений 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  $\alpha$ -нуклеофилов или 1,2-динуклеофилов), в особенности производных гидроксиламина 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 О-атома карбонила;  
 3) нуклеофильный центр располагает отщепляемым протоном.

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



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 аминолизу промежуточный продукт, как в случае производных N-гидроксиламина. Все эти добавки существенно снижают рацемизацию при размыкании азлактонного кольца эфиrom аминокислоты. Это было показано на примере синтеза Z-Pro-Val-Pro-OMe из соответствующего оптически активного азлактона и Pro-OMe. Наблюдаемый эффект объясняется как катализитическим 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.

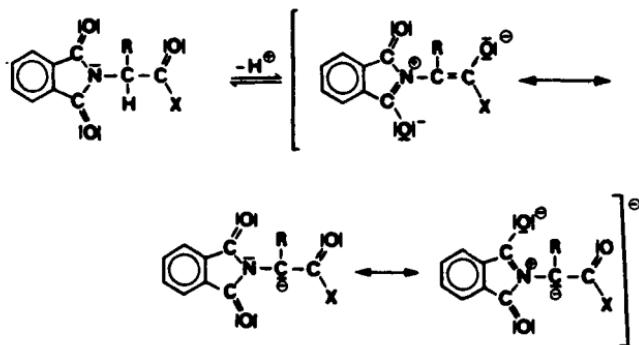
Подробно ознакомиться с проблемой рацемизации можно по прекрасным обзорам Янга [365] и Гудмана [357].

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

На устойчивость  $\alpha$ -С—Н-связи аминокислот сильно влияет характер заместителей. Особенно легко при катализе основаниями рацемизуются активированные эфиры N $^{\alpha}$ -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-фталиламинокислот 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.

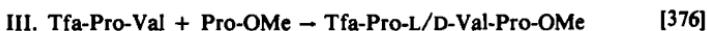
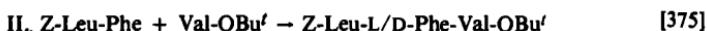
1. *Тест Андерсона — Каллагана* [371]. В случае модельного пептида Z-Gly-Phe-Gly-OEt (пептид Андерсона), полученного из Z-Gly-Phe-OH и Gly-OEt, можно разделить стереоизомеры образовавшегося рацемата фракционной кристаллизацией. Чувствительность определения степени рацемизации 1—2%.

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. Доля 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 раз-бавления чувствительность определения степени рацемизации намного по-вышена и составляет ~0,001—1%.

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



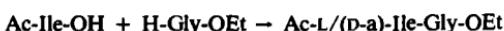
Согласно второму варианту, после отщепления защитных групп три-фторуксусной кислотой в анизоле при частичном гидролизе трипептида по-лучают Phe-Val. Его этерифицируют (HCl/метанол), затем получают три-фторацетильное производное с помощью метилового эфира трифторуксус-ной кислоты. Соотношение диастереоизомеров Tfa-L/D-Phe-Val-OMe, опре-деленное газохроматографическим анализом, дает степень рацемизации. Вариант III подкупает простотой исполнения. Чувствительность ~0,1—1%.

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



Диастереоизомеры, полученные при отщеплении защитной группы гидро-генолизом, разделяются ионообменной хроматографией и после окрашива-ния нингидрином определяются количественно. Чувствительность ~0,1—1%.

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



После полного гидролиза полученного дипептида количественно определя-ют D-алло-изолейцин и изолейцин на автоматическом анализаторе. Чувст-вительность ~0,1—2%.

7. *Тест Гальперна — Вайнштейна* [379]. С помощью сигналов метиль-ной 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 ~3%.

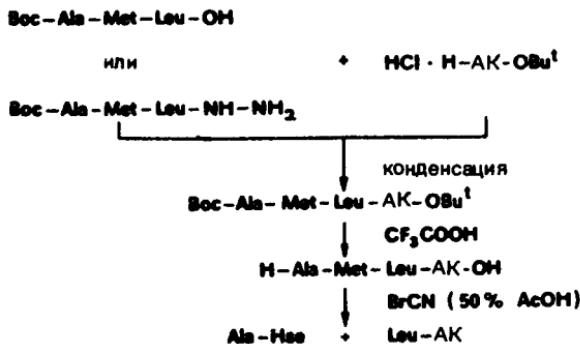
Используя сателлитный сигнал  $^{13}\text{C}-\text{H}$  LL-пептида в качестве внутреннего стандарта, можно при низком содержании DL-изомера повысить чувстви-тельность в 10 раз [380].

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



и отщепления защитных групп гидрогенолизом 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, произошедшей у C-концевого D-аланина карбоксикомпонента. Этот тест относится к наиболее чувствительным методам определения рацемизации.

9. Тест Фуджино [387]. Тестовая система основана на взаимодействии Boc-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-АК-OH (AK = Leu, Ile, Asp). С помощью этой тестовой системы можно изучать влияние аминокомпонента на степень рацемизации. Оказалось, что Asp(OBu') способствует рацемизации сильнее, чем Leu или Ile, даже в отсутствие гидрохлорида триэтиламина. Результаты представлены в табл. 2-8.

На примере карбодинимидного метода с добавкой N-гидрокси-5-нонборнен-2,3-дикарбоксимида, было изучено влияние различных растворителей при конденсациях 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)	Темп- ратура, °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/HOBt	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
Мукайма	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 триэтиламинна; 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 C-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. Николос [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 получаются 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

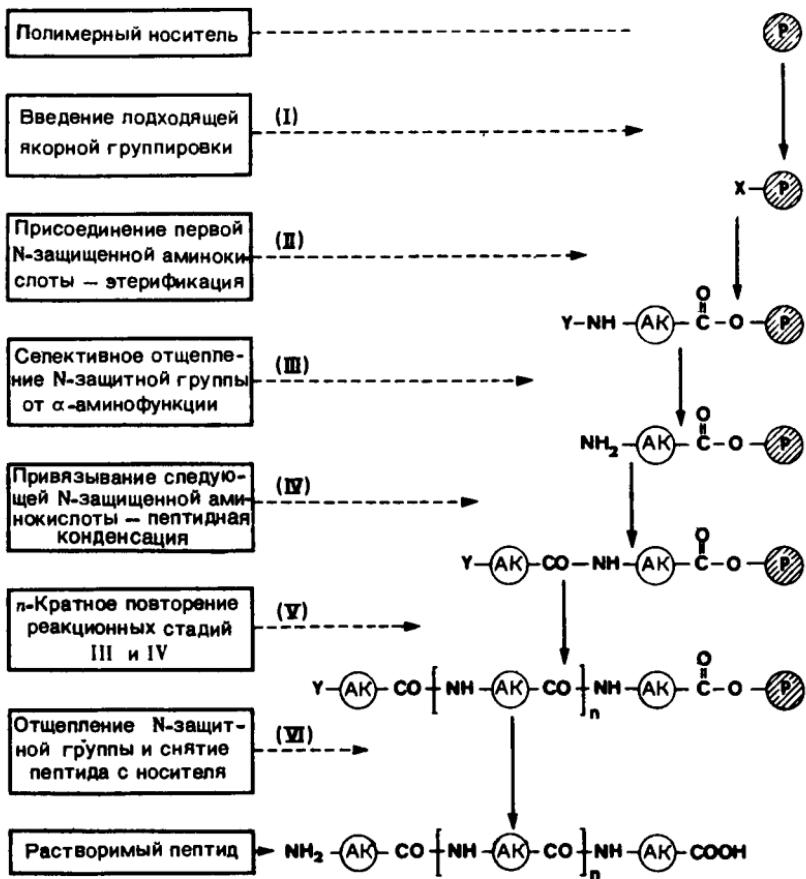


Рис. 2-12. Схема синтеза Меррифилда.

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 неиабухающий сополимер стирола и дивинилбензола с высокой степенью сшивок 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].

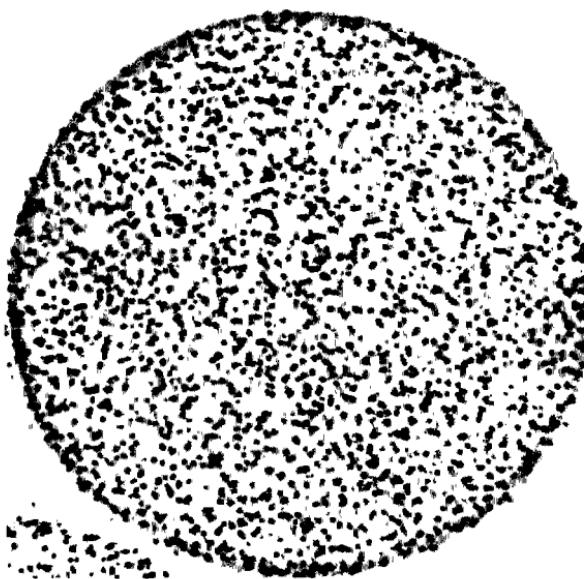
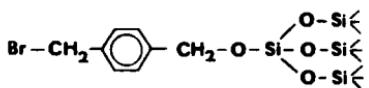


Рис. 2-14. Автодиаграмма пептидов, меченных  $H^3$ , в зернах полистирола с 1% ДВБ [467].

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 Меррифилда можно объяснить различием полярностей углеводородной основы полимерной матрицы и растущей на носителе пептидной цепи (рис. 2-15).

На рис. 2-15, а 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 скимается (б). В полярных растворителях (в ледяной уксусной кислоте, ДМФ, спир-

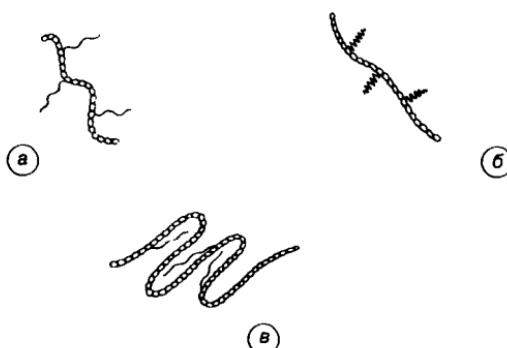


Рис. 2-15. Поведение привязанной к носителю полипептидной цепи в растворителях различной полярности [401].

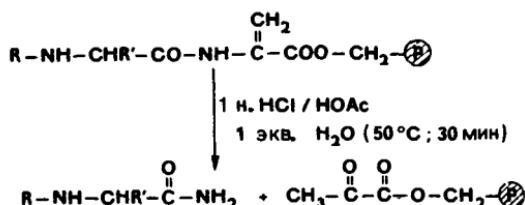
так и др.) матрица носителя сжимается, причем сольватированные короткие пептидные цепи могут оказаться зажатыми (в).

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 при соединения 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* (I, 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:



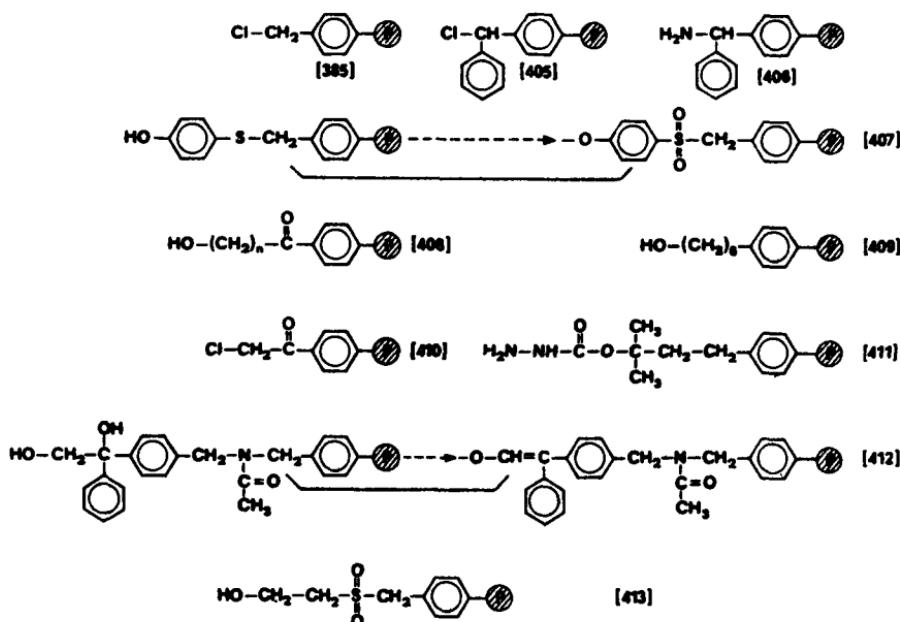
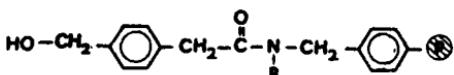
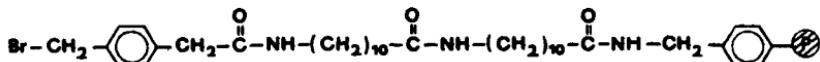


Рис. 2-16. Якорные группировки для синтеза Меррифилда [404].

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



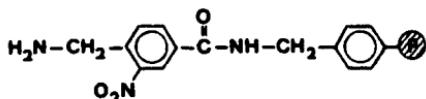
Однако отщепление пептида от носителя в этом случае возможно только с помощью HF. Что касается повышения выхода при твердофазном синтезе пептидов, то оказалось, что более длинные группировки между С-концевой аминокислотой и полимерным носителем оказывают положительное влияние, например [417]:



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  $\alpha$ -метилфенациловых эфиров был перенесен и на твердофазный синтез [419]. Фотолитические методы отщепления позволяют проводить синтез 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 *дитиосукционильная* 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

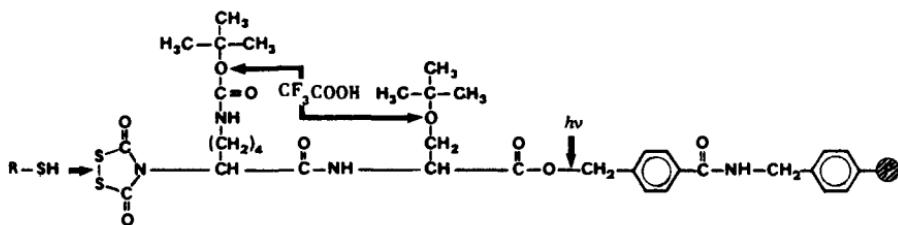
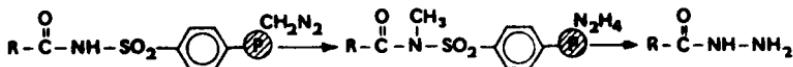
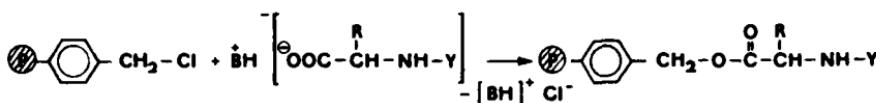


Рис. 2-17. Принцип ортогональных защит по Меррифилду [420].

мягких условиях. Так, например, ацилсульфонамидная связь совершенно устойчива к трифторуксусной кислоте или к HBr 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.

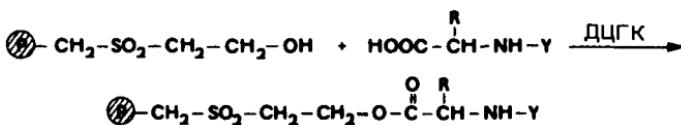


*Присоединение первой аминокислоты* (II, рис. 2-12) может происходить с образованием эфирной, гидразидной или амидной связи. В большинстве случаев используется образование эфирной связи:



Этерификация хлорметилированных смол происходит в этаноле, ТГФ, бензole 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-карбонилдиimidазола [423]. 2-Гидроксизтилсульфонилметилированный полимер («β-сульфоновая смола»), предложенный Тессером и Элленброеком [424], позволяет присоединять первую аминокислоту с помощью мягких методов образования пептидной связи, как, например, посредством дициклогексилкарбодиимида.



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-защищенной аминокислоты все остальные операции проводятся в специальном стеклянном реакторе, снабженном пористой пластинкой, приспособлением для отсасывания и турусом (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-

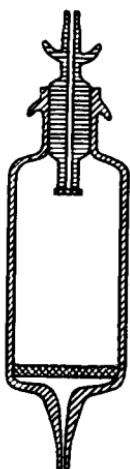


Рис. 2-18. Реакционный сосуд для синтеза Меррифилда.

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  $N^{\alpha}$ -*трем*-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  $N^{\alpha}$ -Вос-группу (табл. 2-1) можно применять для твердофазного синтеза в комбинации с защитными группами боковых функций на основе *трем*-бутиловых эфиров.

Само собой разумеется, можно использовать  $N^{\alpha}$ -аминозащитные группы, отщепляемые при фотолизе. Хорошой комбинацией защитных групп является Fmoc-группа для  $\alpha$ -аминной функции и защиты третичнобутильного типа для боковых цепей [425, 426]. Fmoc-группа отщепляется в мягких основных условиях, например, с помощью 50%-ного пиперидина в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

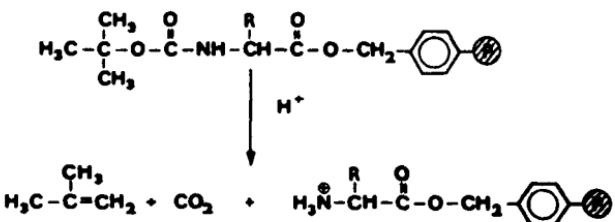
Захист имидазольного азота гистидина — так же как и при синтезе в растворе — представляет серьезную проблему. Применение  $N^{Im}$  бензильной группы вызывает трудности при отщеплении, так как действие натрия в жидким аммиаке далеко не щадящий метод и может затрагивать также имидазольное кольцо. Другая возможность защиты — тозильная группа, но она требует для отщепления обработки жидким фтороводородом.

Гуаниновая группа аргинина может блокироваться нитрованием или тозилированием. Последний метод, очевидно, предпочтительнее, так как тозильный 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 Мерриффилда.

Окислительная лабильность триптофана в условиях ацидолитического отщепления  $N^{\alpha}$ -аминозащитных групп требует добавки 2-меркаптоэтанола, дитиотрейтоля или другого подходящего восстановителя. Требуются также новые защиты для тиоэфирной функции метионина, так как применение в качестве защитного производного сульфоксида не представляет собой оптимального варианта.

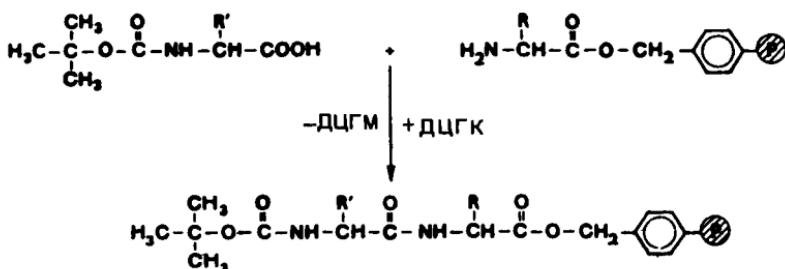
Описанная проблематика защитных групп при твердофазном пептидном синтезе показывает, что различные лимитирующие факторы метода Мерриффилда тесно связаны с указанными неразрешенными (или же недостаточно разрешенными) вопросами. Совокупность этих проблем не может здесь подробно обсуждаться, поэтому желающие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

После удаления ацидолизом наиболее часто используемой  $N^{\alpha}$ -Вос-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 О-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 реагент.

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—Д—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 дроблении 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 амино-ацилирование проходит с высоким выходом [432].

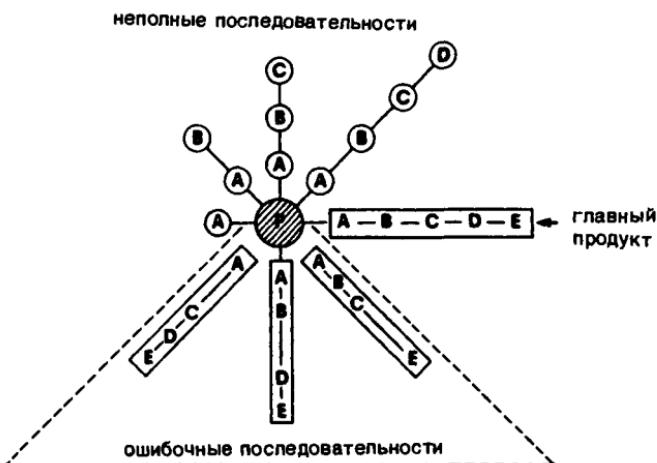


Рис. 2-19. Неполные и ошибочные последовательности.

При синтезе аналога цитохрома *c* (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 Меррифилда 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 просты различные титrimетрические методы, как, например, метод Дормана [437], согласно которому после предварительного протонирования непрореагировавших аминогрупп пиридингидрохлоридом или пиридингидробромидом [438] галогенид элюируется триэтиламином и определяется в злюате. Другой метод — прямое титрование непрореагировавших аминогрупп 0,1 н.  $HClO_4$  [439]. Наряду с этим разрабатывались различные цветные реакции (с нингидрином, флуорескамином и др.) для контроля полноты

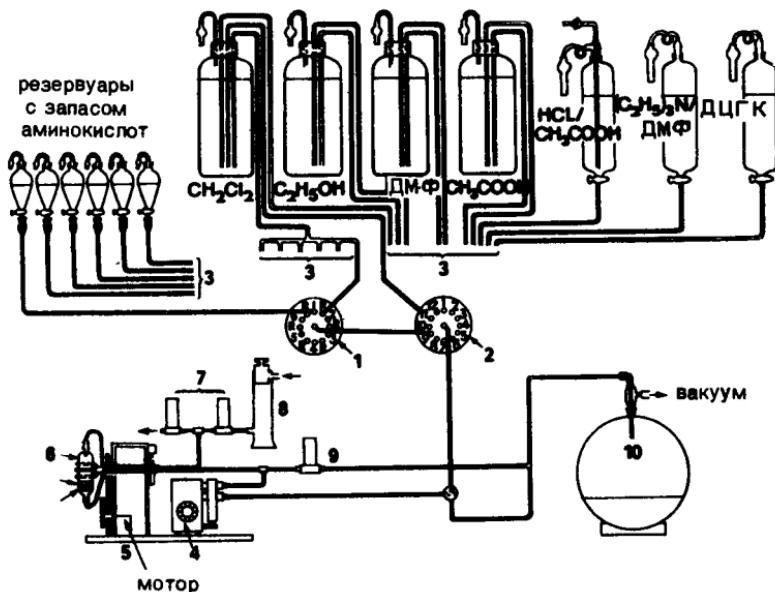


Рис. 2-20. Схема первого «синтезатора» Меррифилда [440].

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-нитрофталевой 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 вентилей 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; Chemtrix 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 встраиваемым 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 трифтормукусной кислоте, уксусная кислота меньше подходит в качестве растворителя из-за опасности ацетилирования гидроксиаминокислот. Описаны также многие отщепления при помощи безво-

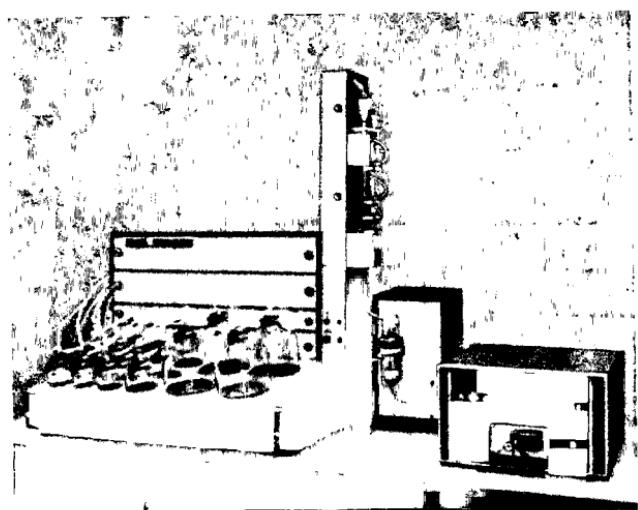


Рис. 2-21. Первая коммерческая модель «пептидного синтезатора» по Брунфельдту.

дного жидкого фтороводорода [63] при 0 °C в присутствии анизола в качестве «ловушки» катионов. При этом отщепляются также все N- и O-защитные группы на основе *трем-бутильного* и бензильного остатков, нитрогруппа аргинина и S-метоксибензильная группа. К таким же результатам приводит метод Плесса и Бауэра [427] (отщепление с помощью бор-тристрифторацетата). 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 переэтерификации бензильовых 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 A [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 Меррифилда

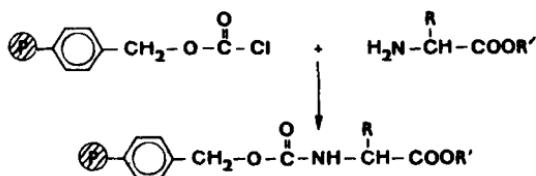
Пептид	Число аминокислот	Год	Литература
Брадикинин	9	1964	444
Ангиотензин II	8	1965	445
Цепи инсулина	21/30	1966	446
Ферредоксин	55	1968	447
Окситоцин	9	1968	448
Рибонуклеаза А	124	1969	449
Цитохром с	104	1969	450
Стафилокковая нуклеаза (6—47)	42	1969	451
Антаманид	10	1969	452
Гормон роста человека	188	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 Т <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 Меррифилда, 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 преодолеть

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 ангидрильным методом. Недостаток 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 карбоксилатных 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 высыпания. Введением полиэтиленгликоля (ПЭГ) как С-концевой защитной группы растущей пептидной цепи и применением ультрафильтрации для отдельных низкомолекулярных реагентов Муттер и сотр. [472] решившим образом улучшили «жидкофазный» метод.

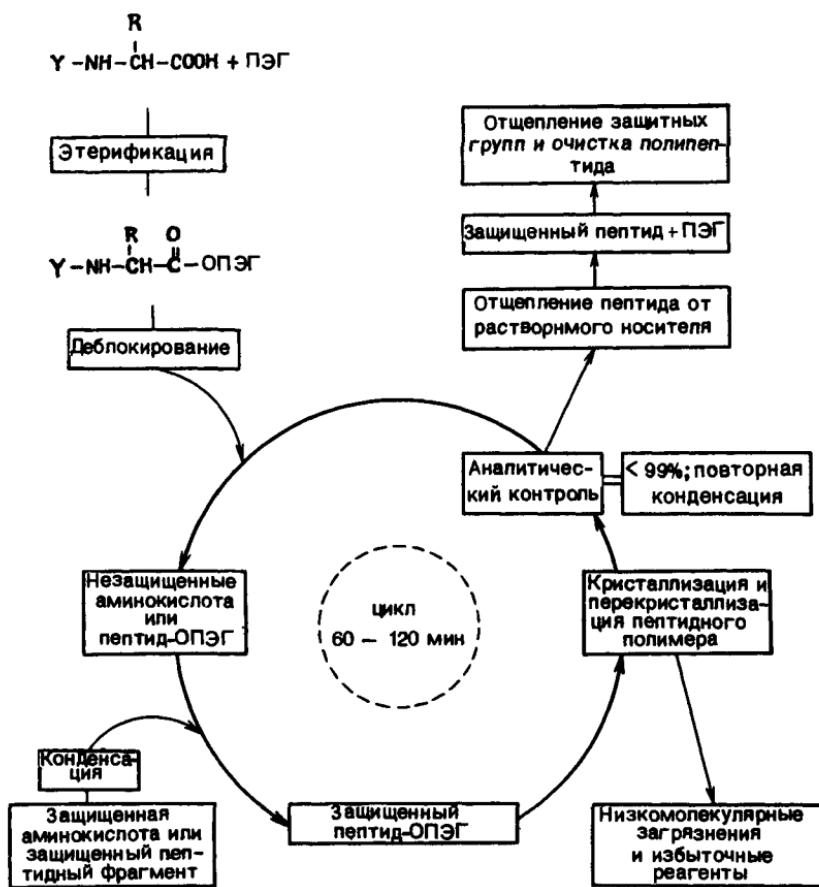


Рис. 2-22. Схема жидкофазного пептидного синтеза по Муттеру и Байеру [473].

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.

Пфейдер 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 Хагенмайер [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

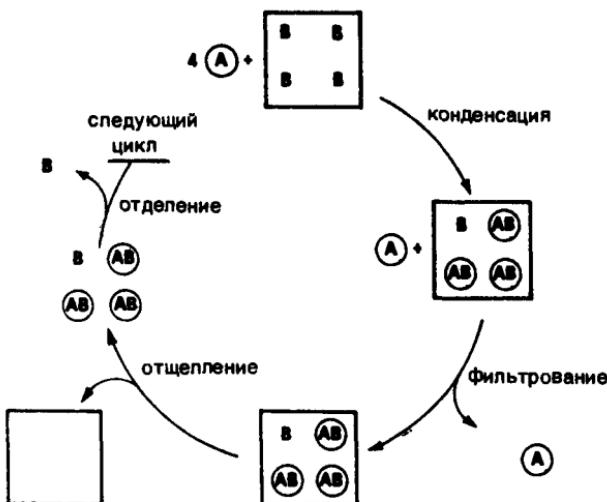
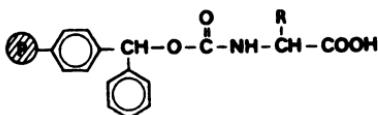


Рис. 2-23. Схема синтетического цикла чередующегося твердофазно-жидкофазного пептидного синтеза.

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 нерасторимого 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 фильтрования и промывания. Затем путем отщепления полимерной аминозащитной группы пептид вместе с избыtkом 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 пополам 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 полизиленгликоля. Ход реакции конденсации и деблокирования можно контролировать аналитически с помощью нингидрида или флуорескамина. Первей полимерной аминозащитной группой был связанный носителем бензидроксикарбонильный остаток, который позволяет освобождать пептид с помощью 10%-ной трифтормусской 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 применение полимерных носителей.

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

Речь идет, собственно, не о синтезе на полимерном носителе, так как растворяющая пептидная цепь постоянно находится в растворе. В реакцию с аминокомпонентом 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-гидроокси-3-нитробензил]-стиrola) (I), синтезировали за-

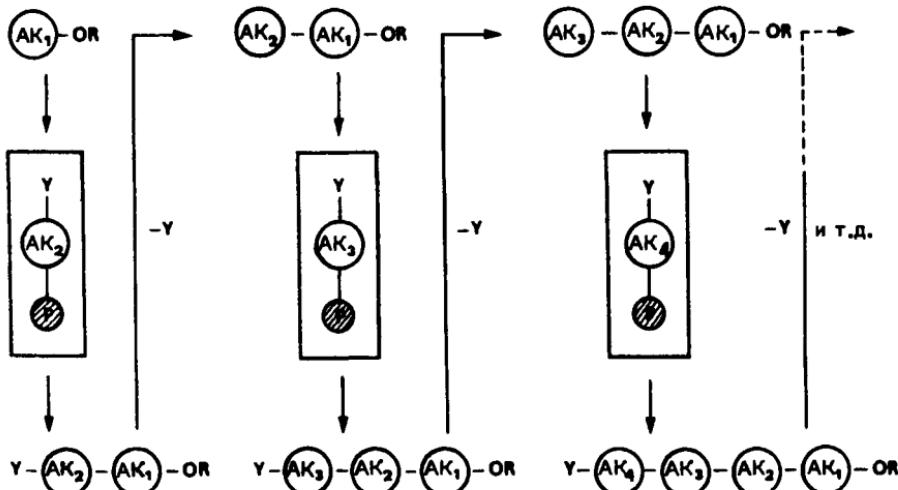
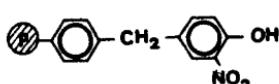
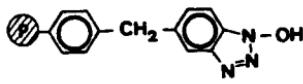


Рис. 2-24. Принцип непрерывного синтеза с полимерными реагентами [479].

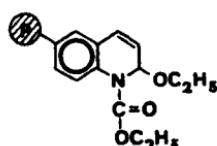
щищенный фоллиберин с общим выходом 68,8% [480]. Превосходными свойствами обладает также поли-([1-оксибензотриазол]-стирол) (II). Соответствующий полимерный активированный эфир получают ДЦГК-методом при 4 °C за 15—20 мин. Средняя емкость смолы 0,6—1,3 ммоль/г [481]. Полимерный 1-оксибензотриазоловый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



I



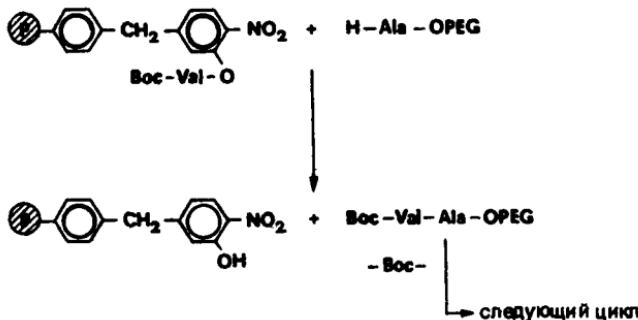
II



III

Для реакций конденсации могут с успехом применяться также полимерно связанный карбодиимид [482, 483], полимерно связанный трифенилfosфин/2,2'-дипиридилсульфил [484] и поли-(1-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолин) (III). Последний может быть получен из 6-изопропенилхинолина, 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-

щиту после окончания пептидного синтеза. При использовании для соединения с полиэтиленгликолем якорных групп на основе бензила получают связи, которые можно расщеплять гидрогенолизом. 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.

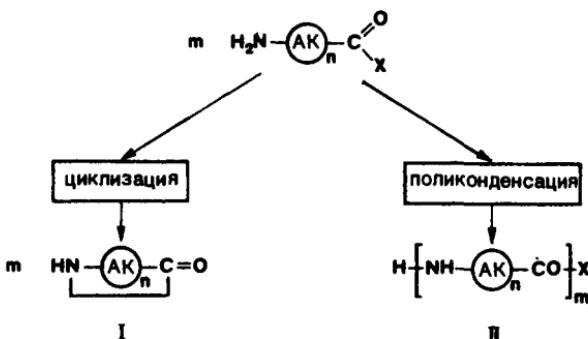


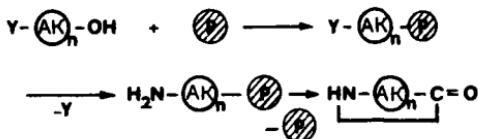
Рис. 2-25. Схематическое представление конкуренции между реакцией замыкания кольца и поликонденсацией.

1. *Активирование при блокированной аминофункции.* 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 дициклогексилкарбодимида (также с добавками), водорастворимых карбодимиидов или других активирующих средств.

3. *Активирование при протонированной аминофункции.* Аминофункция промежуточно блокируется солеобразованием. Активирование может производиться при образовании азода, смешанного ангидрида и т. д. Затем аминофункцию 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, при соединяется к подходящему полимерному активирующему реагенту. После деблокирования циклический пептид получается путем внутримолекулярного 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 произвольно 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 Швицера 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  $\alpha$ -Н-атомов (напряжение Прелога). Циклодимеризация, без сомнения, способствует антипараллельное взаимное расположение двух молекул трипептида с образованием водородных мостиков. Димеризация с образованием водородных связей невозможна, если в трипептид встроен пролин; кроме того, в этом случае *цис*- и *транс*-конфигурации пептидных связей практически равнозначны 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-бензилглицин) [492a].

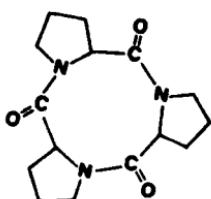


Рис. 2-26. Структура циклотрипролила.

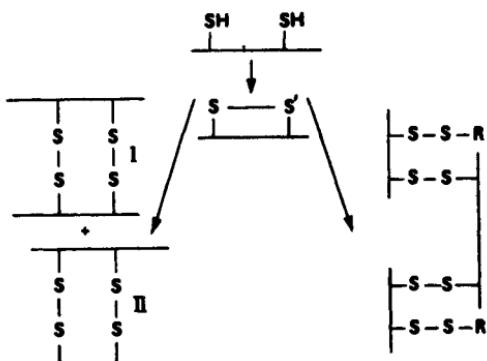
Для циклических тетрапептидов с 4-*транс*-пептидными связями нельзя построить модели, полностью свободные от напряжения. Однако это можно сделать при чередовании *цис*- и *транс*-конфигураций. Циклопентапептиды содержат только *транс*-пептидные связи, как и наиболее изученные циклогексапептиды.

### 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 дипептидов.

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

Синтез простых моноциклических цистeinовых 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.

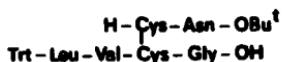
Значительно сложнее синтез пептидов, содержащих многие дисульфидные мостики, в особенности многоцепочных молекул с добавочными междуцепочечными дисульфидными связями. Цистeinовые пептиды можно получать двумя путями:

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

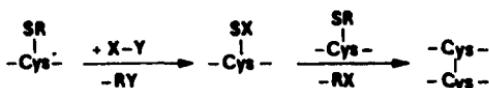
2) через S-защищенный цистeinовый пептид с последующим переводом в цистиновый.

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.

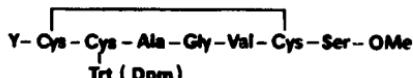
На основе полученного в 1973 г. Камбером [494] несимметричного цистинового пептида A(20-21)-B(17-20) Зибер [495] осуществил при последовательном образовании дисульфидных мостиков полный синтез инсулина человека.



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, диорданом [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, Thp и др.) и дает производное цистина:



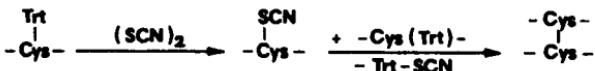
Применение селективно-отщепляемых S-защитных групп было впервые предложено Зервасом и сотр. [497]. Этим путем был получен гептапептидный фрагмент инсулина овцы с внутрицепочечным дисульфидным мостиком, а также с блокированной Trt- или Dpm-остатком третьей тиольной функцией:



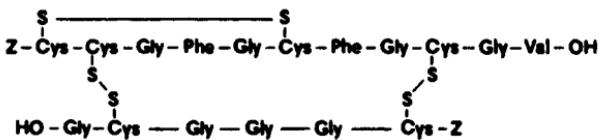
В качестве аминозащитной группы Y в случае Dpm-тиольной защиты применялись Z- или Вос-остатки, а также S-Trt-группа и Nps-остаток.

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 диродана, выступает в качестве активированной тиольной группировки:



При применении такого сульфенилтиоцианатного метода был получен инсулиноподобный модельный пептид:



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

Нежелательной побочной реакцией при синтезе несимметричного дисульфида является дисульфидный обмен:



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

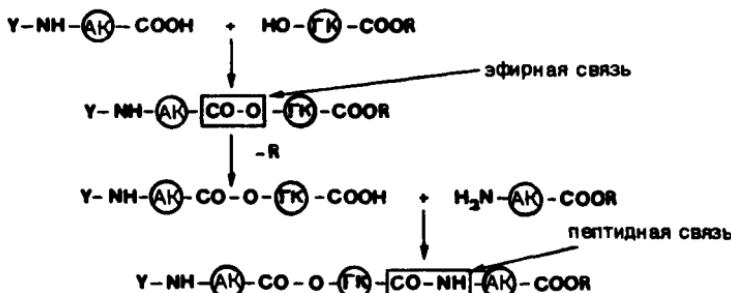
Нельзя не упомянуть, что при статистическом окислении двух различных цистеиновых пептидов также может получиться несимметричный цистеиновый пептид. Этот путь был описан, например, при первом полном синтезе инсулина (разд. 2.3.1.8).

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).

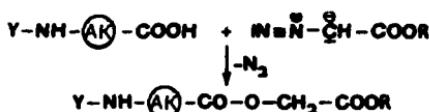
На специальной проблематике синтеза гомомерных пептидных лактонов не стоит останавливаться. Пептолиды являются гетеромерными пептидами, в которых аминокислоты заменены на  $\alpha$ -или  $\beta$ -гидроксикислоты (ГК); в большинстве случаев пептолиды обладают циклической структурой. Для реакции замыкания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

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

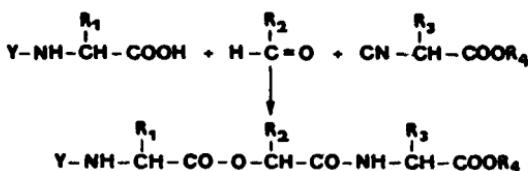
Стратегические и тактические вопросы синтеза пептолидов мало отличаются от тех же проблем пептидного синтеза. Пептолиды с периодической структурой, т. е. с повторяющимися единицами дипептолида, названы, по Лоссе и Бахману [500], регулярными пептолидами. Их синтез можно вести как ступенчато попеременным 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 лиазоуксусной кислоты с N-замещенными аминокислотами:



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



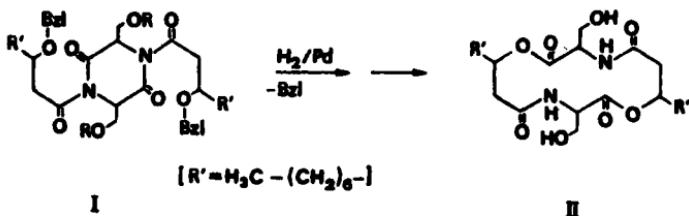
Фрагментную конденсацию, так же как и реакцию замыкания кольца, в предварительно полученном линейном пептолиде лучше проводить путем образования пептидной связи.

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 поликонденсации, 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 гидрокси- 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 додекапептид в толуоле ( $c = 0,001$  моль/л) с выходом 56%.

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



### 2.2.9. Синтез полиаминокислот и регулярных полипептидов

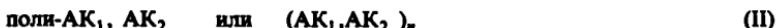
Полнаминокислоты и регулярные полипептиды — это синтетические полипептиды, которые получаются при поликонденсации аминокислот или коротких пептидных последовательностей. В противоположность систематически построенным пептидам они представляют собой не отдельные соединения, а смесь гомологов макромолекул. 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 биохимич-

ский интерес к соединениям такого рода, так как с их помощью получают новые важные результаты в энзимологии и иммунологии. В различных монографиях и обзора [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:

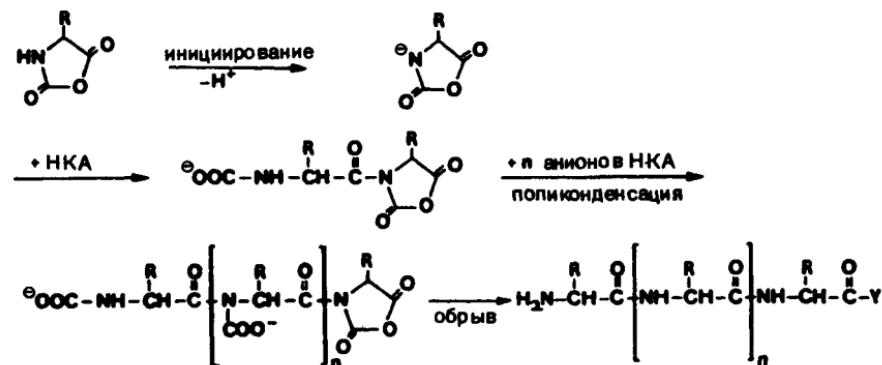


При всех методах поликонденсации предпочтитают максимально защищать все третья функции, причем применяемые защитные группы должны быть устойчивыми в условиях синтеза, а после поликонденсации полностью отщепляться от высокомолекулярных полипептидов.

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

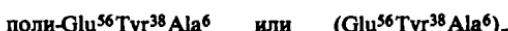
Для поликонденсации N-карбоксиангидридов в растворе нужны инициаторы. Тип инициатора определяет механизм поликонденсации и молекулярную массу продукта. При помощи сильных оснований (третичные амины, алкоголяты щелочных металлов, алкилметаллические соединения) получают гомополиаминокислоты с узким молекулярномассовым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

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



Обрыв цепи вызывается гидроксилом ( $\text{Y} = \text{OH}$ ) или вторичным амином ( $\text{Y} = \text{NR}_2'$ ). 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 ( $n = 20 + 100$ ).

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-карбоксиангидридов. 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 полiamинокислот — 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 диоксопептидинов. Поэтому применяют предпочтительно три-, тетра- и пентапептидные мономеры. По сравнению с поливиниловыми кислотами при поликонденсации пептидов получают продукты с более короткими цепями (25–55 пептидных единиц).

Образование регулярных полипептидов имеет место также при *пластениновой реакции* [521, 522], при которой под каталитическим воздействием различных протеаз (трипсин, химотрипсин, пепсин, катепсин и т. д.) из так называемых пластенинактивных пептидных мономеров получаются продукты конденсации — пластенины. В качестве субстратов годятся продукты частичного ферментативного гидролиза белков (пептоны, альбумозы и др.). Первый пластеноактивный синтетический пептид имел последовательность Тир-Ил-Гли-Глу-Фен.

В случае синтетических субстратов получались пластенины с более низкими молекулярными массами, чем при работе с продуктами, полученными при ферментативном распаде белков. Хотя механизм пластениновой 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 выбранных 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 (твердотвердофазный синтез), либо как гомогенная реакция при применении растворимых полимерных носителей (жидкофазный синтез), либо как одновременно гетерогенная, так и гомогенная реакция (чредующийся 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  $N^{\alpha}$ -защитных групп уретанового типа (разд. 2.2.4.1.1.1) независимо от выбранного мето-

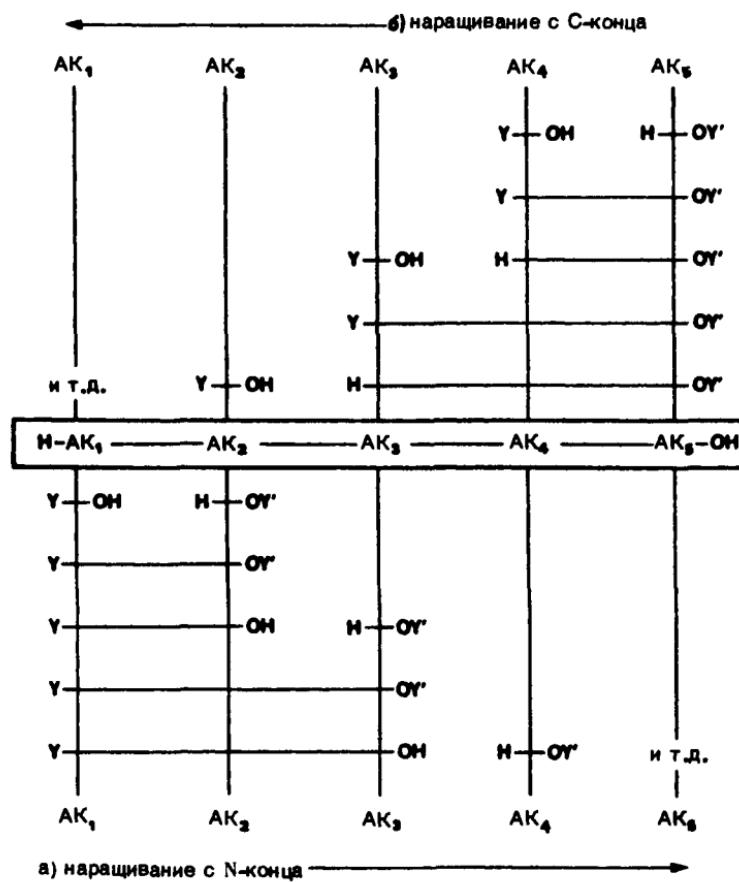


Рис. 2-27. Стратегия ступенчатого удлинения цепи.

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/НТА-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 пентафтормениловых 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] затраты 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 Меррифиллом 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 c	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
B-Цепь (инсулин)	30	22,6	55,7	74,7	97,1
A-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 стадии) 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 Меррифилда.

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 (ДМФ, ацетонитрил, гексаметилтриамид фосфорной кислоты (ГМТАФ) и др.) и адсорбционно нагружается аминокомпонентом. Фиксированный на силикагеле аминокомпонент взаимодействует далее с пентафторфениловыми эфирами Вос-аминоакислот, супендированными 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. Избыtkом 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 аминокомпонента 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-Тир<sup>16</sup>-B<sup>16</sup> 30%. При перенесении места соединения на связь Leu<sup>15</sup>-Tyr<sup>16</sup> и применение ДЦГК-метода с добавкой гидроксибензотриазола с 10%-ным выходом был получен нежелательный диастереомер D-Leu<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 Рагнасоном [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 субтилином 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  $[Hse^{65}]$ -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.

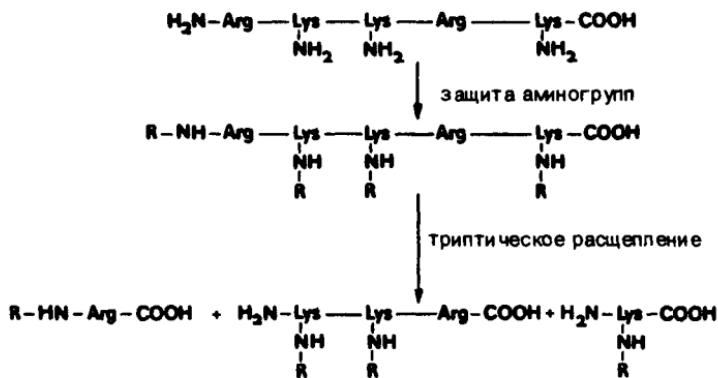
Для семисинтеза вообще необходимы следующие операции:

- обратная защита перед расщеплением;
- расщепление и разделение фрагментов;
- обратная 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 c.

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

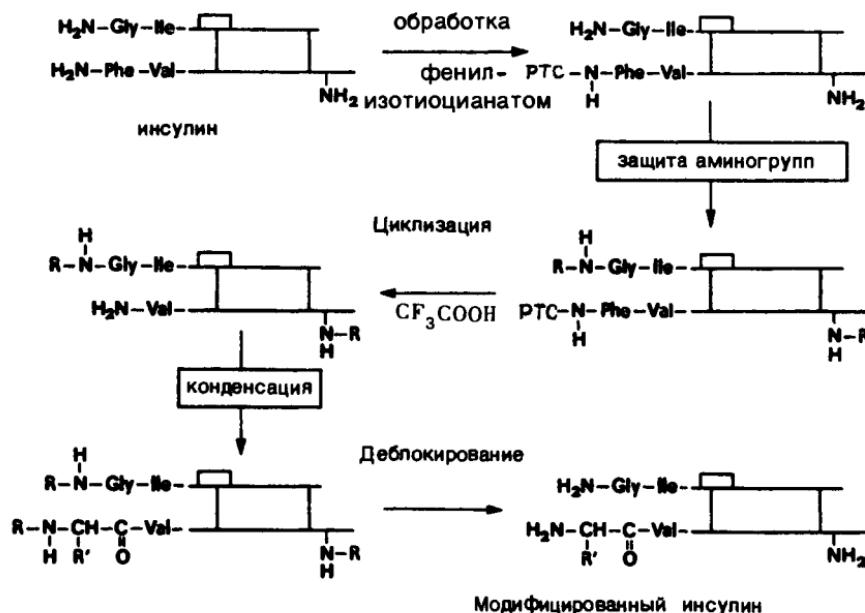


Рис. 2-28. Модификация N-конца В-цепи инсулина в семисинтезе [540].

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. Неизбежно 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* эффективно 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  $\varepsilon$ -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 нонапептидах (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 обсуждались в разд. 2.2.2 и 2.2.4. Важнейшая проблема тактики

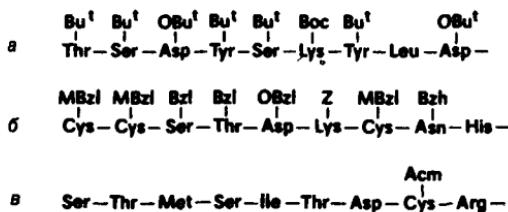


Рис. 2-29. Применение техники максимальной и минимальной защиты.

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  $\varepsilon$ -аминогруппы остатков лизина и гуанидиновые группы остатков аргинина были защищены тозильными 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 аминозащитных групп, особенно Вос-группы, в присутствии бензилоксикарбонильных остатков, так как при применении трифтормуксусной кислоты и HCl в органических раствори-

телях селективность не всегда была удовлетворительной. Согласно Шнабелью [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 эквимолярного 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 трифтормэтаноле. Кинетическими исследованиями показано, что в системе HCl/трифтормэтанол 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 временными 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 Мерриффилду (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 сильнокислых 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 тозильная, тритильная, дифенилметильная, бензильная и карбобензокисгруппа, удаляются электрохимически [551].

Для синтеза  $\alpha$ - и  $\epsilon$ -пептидов из аминодикарбоновых 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, и 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-

Временные защитные группы		для аминогруппы										для карбоксила						
Постоянныe защитные группы		Z		Boc		Nps		Broc		Trt		OMe/OEt		OBz		OtBu		
		s	g	s	g	s	g	s	g	s	g	s	g	s	g	s	g	
для аминогруппы	Z	-	$\frac{H_2}{Na/NH_3}$ HBr	TFA	HBr	HCl	HBr	AcOH	HBr	AcOH	$\frac{H_2}{Na/NH_3}$ HBr	$\text{OH}^\ominus$	-	$\text{OH}^\ominus$	$\frac{H_2}{Na/NH_3}$ HF	TFA	HBr	
	Boc	$H_2$	HBr	-	TFA	$\frac{SH}{HCl}$	TFA	AcOH	TFA	AcOH	TFA	$\text{OH}^\ominus$	-	$\text{OH}^\ominus$	$H_2$	HF	-	TFA
	Tos	$\frac{H_2}{HF}$	$Na/NH_3$	TFA	-	HCl		AcOH		AcOH	$Na/NH_3$	$\text{OH}^\ominus$	-	$\text{OH}^\ominus$	$\frac{H_2}{H_3}$	$Na/NH_3$	TFA	-
	OMe OEt	$H_2$	HBr	-	TFA	-	HCl	-	AcOH	-	AcOH	-	-	$\text{OH}^\ominus$	$H_2$	$\text{OH}^\ominus$	TFA	-
	OtBu	$\frac{H_2}{Na/NH_3}$	HBr	-	TFA	$\frac{SH}{HCl}$	TFA	AcOH	TFA	AcOH	TFA	$\text{OH}^\ominus$	-	$\frac{H_2}{Na/NH_3}$	HF	-	TFA	
	OBz	(HBr)	$\frac{H_2}{Na/NH_3}$	TFA	HF	HCl	HF	AcOH		AcOH	$\frac{H_2}{Na/NH_3}$	-	$\text{OH}^\ominus$	-	$\frac{H_2}{Na/NH_3}$	HF	TFA	HF (HBr)
для карбокси-группы	BzI		$\frac{H_2}{Na/NH_3}$	TFA	HF	HCl	HF	AcOH	HF	AcOH	$\frac{H_2}{Na/NH_3}$	$\text{OH}^\ominus$		$\text{OH}^\ominus$	$\frac{H_2}{Na/NH_3}$	TFA	HF	
	tBu	$\frac{H_2}{Na/NH_3}$	HBr		TFA	$\frac{SH}{HCl}$	TFA	AcOH	TFA	AcOH	TFA	$\text{OH}^\ominus$	-	$\text{OH}^\ominus$	$H_2$	HF	TFA	HF
	NO <sub>2</sub>	HBr	$H_2$	HF	TFA	HF	HCl	HF	AcOH	HF	AcOH	$\frac{H_2}{HF}$	$\text{OH}^\ominus$	-	$\text{OH}^\ominus$	$\frac{H_2}{HF}$	TFA	HF
	Tos	$\frac{H_2}{HF}$	$Na/NH_3$	TFA	HF	HCl	HF	AcOH	HF	AcOH	$\frac{Na/NH_3}{HF}$	$\text{OH}^\ominus$	-	$\frac{H_2}{OH^\ominus}$	$Na/NH_3$	TFA	HF	
	BzI	HBr	$\frac{H_2}{Na/NH_3}$	TFA	-	HCl	-	AcOH	-	AcOH	$Na/NH_3$	$\text{OH}^\ominus$	-	$\text{OH}^\ominus$	$\frac{H_2}{Na/NH_3}$	TFA	-	
	BzOMe	-	$Na/NH_3$	TFA	HF	$\frac{SH}{HCl}$	HF	AcOH	HF	AcOH	$\frac{Na/NH_3}{HF}$	$\text{OH}^\ominus$	-	$\text{OH}^\ominus$	$Na/NH_3$	TFA	HF	
для гидрокси-группы	Trt	-	$Na/NH_3$	HF		HF	HCl	HF	AcOH	HF	AcOH	$\frac{Na/NH_3}{HF}$	$\text{OH}^\ominus$	-	$\text{OH}^\ominus$	$Na/NH_3$	HF	
	Acm	HBr		TFA	-	HCl	-	AcOH	-	AcOH	-	( $\text{OH}^\ominus$ )	-	( $\text{OH}^\ominus$ )		TFA	-	
	S-tBu	HBr	$Na/NH_3$	TFA	-	HCl	-	AcOH	-	AcOH	$Na/NH_3$	-	-	-	$Na/NH_3$	TFA	-	
	S-Et	HBr	$Na/NH_3$	TFA	-	HCl	-	AcOH	-	AcOH	$Na/NH_3$	-	-	-	$Na/NH_3$	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 HBr 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 аминокомпонента. Прототип этого варианта синтеза — конденсация с участием дициклогексилкарбодимида (все не участвующие в конденсации карбоксильные группы должны быть предварительно защищены). Только при эквимолярном количестве амино- 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 аминокомпонента 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 заменами в последующие десятилетия будет важным средством для выяснения вопросов,

#### Лабораторный синтез

Boc - Ser - Tyr - Ser - Met - NH - NH <sub>2</sub>	1 - 4	1 - 10
Z - Glu - His - Phe - Arg - Trp - Gly - OH	5 - 10	
Boc	11 - 14	11 - 19
Pz - Lys - Pro - Val - Gly - NH - NH <sub>2</sub>	11 - 14	
Boc Boc NO <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>	15 - 19	11 - 24
Trt - Lys - Lys - Arg - Arg - Pro - OMe	15 - 19	
Z - Val - Lys - Val - Tyr - Pro - OBu <sup>t</sup>	20 - 24	11 - 24

#### Промышленный синтез

Boc - Ser - Tyr - Ser - Met - NH - NH <sub>2</sub>	1 - 4	1 - 10
Z - Glu - His - Phe - Arg - Trp - Gly - OH	5 - 10	
Boc	11 - 14	11 - 16
Z - Lys - Pro - Val - Gly - OH	11 - 14	
Boc Boc	15 - 16	11 - 24
Z - Lys - Lys - OMe	15 - 16	
Z - Arg - Arg - Pro - OH	17 - 19	17 - 24
Z - Val - Lys - Val - Tyr - Pro - OBu <sup>t</sup>	20 - 24	

Рис. 2-31. Различные тактико-стратегические концепции синтеза АКТГ [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-

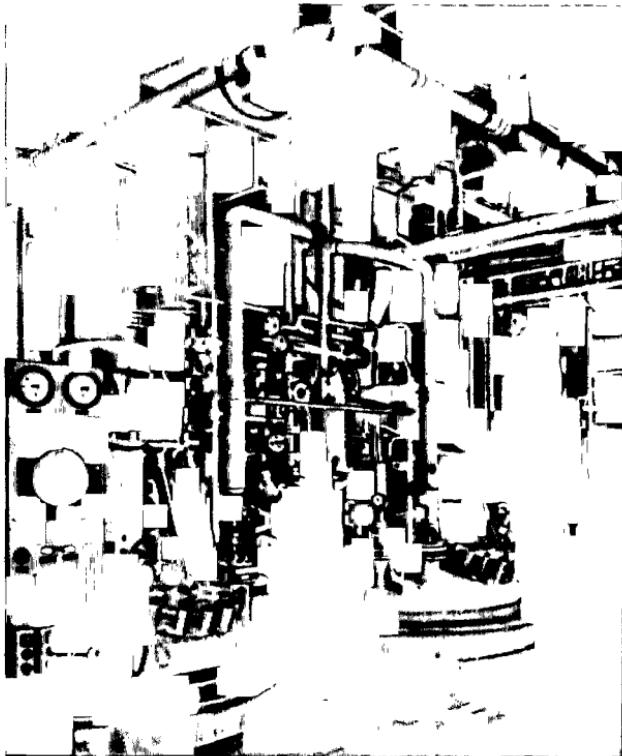


Рис. 2-32. Реактор для промышленного пептидного синтеза [568].

колоидические 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)
Метилокситоцин	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	Sandoz (1961)
		Diapid (США)	Sandoz (1970)
АКТГ (1—24)	24	Synacthen	CIBA (1967)
АКТГ (1—28) и (1—32)	28(32)	Humacthid	Gedeon-Richter (1970)
Пентагастрина	5	Peptavlon	ICI (1969)
Дезаминоокситоцин	9	Sandopart	Sandoz (1971)
Дезамино-D-Arg-вазопрессин	9	Minirin	Ferring (1973)
Тиреолиберин	3	TRF	Roche (1974)
		Tiregan	Hoechst
		Thyipionone	Abbott
Кальцитонин (лососевых)	32	Calcitonin	Sandoz (1974)
		Calcimar	Armour (1975)
Гонадолиберин	10	Relisorm L	Abbott (1975)
Кальцитонин (человека)	32	Cibacalcin	Ciba-Geigy (1977)
Триглицил[ <i>Lys</i> <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  $-20 + +70^\circ\text{C}$ .

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

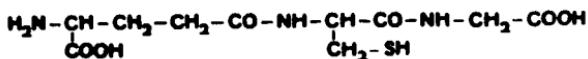
За последние годы число пептидов, найденных в живых системах, сильно возросло. В период 1944—1954 гг. были разработаны основные аналитические методы выделения, очистки и установления структуры пептидов. Однако исследования некоторых пептидов, особенно пептидов головного мозга, совершенно не развивались, так как были неизвестны соответствующие аналитические методы определения нанограммовых ( $10^{-9} \text{ г}$ ) 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  $10^{-12} \text{ г}$  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 зидокринная регуляция. Оба исследователя (совершенно независимо друг от друга) установили последовательность первых гормонов гипоталамуса и синтезировали их в лаборатории.

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

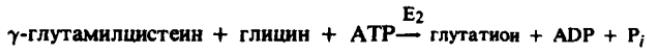
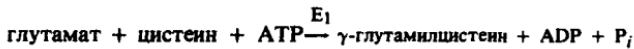
только на одну аминокислоту. Затем были найдены другие активные пептиды, такие, как  $\beta$ -эндорфин из гипофиза и  $\alpha$ - и  $\gamma$ -эндорфины из системы гипоталамус-нейтрогипофиз. Этот класс соединений, названный в совокупности эндорфинами, имеет огромное значение для физиологии и фармакологии в связи с новыми данными, полученными при исследовании болевых ощущений и подавления 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-коцевым остатком глутаминовой кислоты, присоединенным γ-пептидной связью:



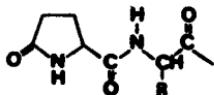
Биосинтез таких пептидов осуществляется не обычным путем при участии рибосом, а протекает в двухступенчатых катализируемых ферментами реакциях с использованием АТР:



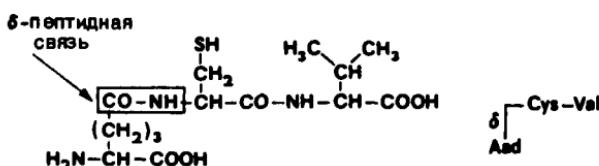
где  $E_1$  —  $\gamma$ -глутамилцистенинсинтетаза,  $E_2$  — глутатионсинтетаза.

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.

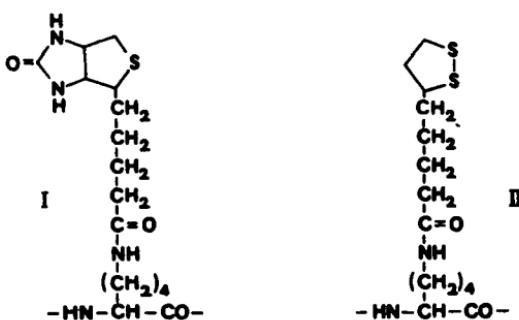
Действенной защитой против ферментативного расщепления аминопептидазами служит пироглутаминовая кислота (пирролидонкарбоновая кислота) — N-концевой остаток в *пироглутамилпептидах*:



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



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



В бациллацине (разд. 2.3.5.1) имеется разветвленно-циклическая структура, присоединенная через  $\varepsilon$ -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 нервно-секреторных 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 высокоразвитых 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, секretируемые 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 их образования, не должны называться гормонами, однако все же часто к гормонам относят нейротрансмиттеры (акцептилхолин, 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 иейроэндокринологии. 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 локализуются или на клеточной поверхности (клеточные мембранны), 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 AMP, образующийся при активации аденилатциклазной системы, становится во многих случаях «вторым курьером», формирующим следующие стадии внутриклеточных реакций (рис. 2-33). cAMP был открыт Шутерландом в начале 50-х годов.

Инициированный 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 кортикоиды (альдостерон, кортизол), а в половых железах — предпочтительно андрогены, гестагены и эстрогены. Инсулин связывается с рецепторами на мемbrane жировой клетки. Взаимодействие со специфическим рецептором повышает концентрацию cGMP, концентрация же cAMP понижается. Образование

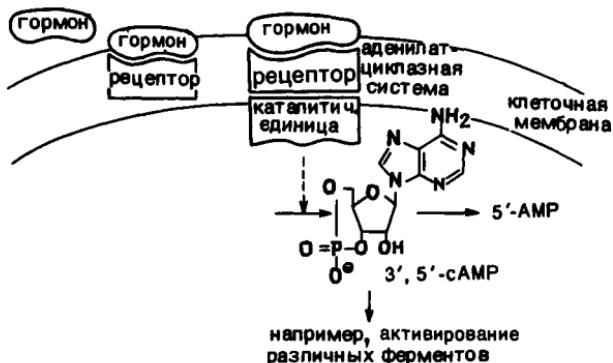


Рис. 2-33. Схематическое изображение действия гормона через рецептор, связанный с мембраной [574].

cGMP посредством активации гуанилатциклизы и стимулированные этим изменения мембранны в жировых клетках при связывании инсулина с рецептором ясно показывают, что cGMP также может служить в качестве «второго курьера». Адреналин и глюкагон, напротив, активируют аденилатциклизную 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 внутрь 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 взглядам, 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 (либерини), 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 супрапитко-гипофизарному 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, действующие на центральную нервную систему (нейропептиды), активные вещества из амфибий и головоногих (эледоизин, физалемин, филломедузин, уперолеин, кассинин, церулеин, филлоцеруlein), 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 (тиреоидостимулирующий гормон)	Гипофиз	Образование и выделение гормонов щитовидной железы	Гликопротеин, 2 субъединицы ( $\alpha$ : 96 аминокислот, $\beta$ : 113 аминокислот)
Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ, фоллигтропин) [577]	"	Способствует росту и созреванию фолликул; стимулирует сперматогенез	Гликопротеин, 2 субъединицы [576] Гонадотропин
Лютенизирующий гормон (ЛГ, лютропин, 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])	Одноцепочный белок (овца: 198 аминокислот, 3 S—S-связи)
Соматотропный гормон (СТГ, соматотропин, гормон роста)	"	Необходим для нормального роста, стимулирует рост костей в длину	Одноцепочный белок (СТГ человека: 191 аминокислота)
Липотропный гормон (ЛТГ, липотропин)	"	Стимулирует образование свободных жирных кислот из триглицеридов	$\beta$ -ЛТГ: 91 аминокислота
Адренокортико-тропный гормон (АКТГ, кортико-тропин)	"	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 аминокислот ( $\beta$ -МСГ человека: 22 аминокислоты)
Окситоцин	Гипоталамус (образование), гипофиз (накопление)	Вызывает выделение молока и стимулирует сокращение матки	Гетеродетный циклический иона-пептид

*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 nonapeptид
Тиреолиберин (рилизинг-фактор тиреотропина)	Гипоталамус	Выделение тиреолиберина	Трипептид
Гонадолиберин (рилизинг-фактор гонадотропина, люлиберин, фоллиберин)	"	Выделение ЛГ и ФСГ	Декапептид
Кортиколиберин (рилизинг-фактор кортикотропина)	"	Выделение АКТГ	Пептид
Пролактолиберин (рилизинг-фактор пролактина)	"	Выделение пролактина	"
Соматолиберин (рилизинг-фактор соматотропина)	"	Выделение соматотропного гормона	"
Меланолиберин (рилизинг-фактор меланотропина)	"	Выделение МСГ	"
Пролактостатин (гормон, ингибирующий выделение пролактина)	"	Подавление выделения пролактина	"
Соматостатин (гормон, ингибирующий выделение соматотропина)	"	Подавление выделения соматотропина	Гетеродетный циклический tetradecapeptid
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 undekapeptid
Нейротензин	Гипоталамус	Кининовая активность, регуляция обмена гликогена в печени	Линейный тридекапептид

*Продолжение таблицы 2-13*

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
Паратиреодный гормон	Паратищитовидная 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)
Хориосоматомаммоторпин человека	"	Действие, подобное соматотропному гормону и пролактину	Одноцепочный белок (190 аминокислот, 2 дисульфидные связи)
Гастрин	Слизистая желудка	Стимуляция секреции кислоты в желудке и образование ферментов в поджелудочной железе	Линейный гептадекапептид
Секретин	Слизистая двенадцатiperстной кишки	Стимуляция образования и выделения панкреатического сока, повышение отделения желчи	Линейный пептид: 27 аминокислот
Холецистокинин-панкреоцимин	Слизистая двенадцатiperстной 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 nonапептид
Каллидин (кинин-10)	"	Действие, подобное брадикинину	Линейный декапептид
Метиониллизил-брадикинин (кинин-11)	"	То же	Линейный undекапептид

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 (адренокортикотропин, адренокортикотропный 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
свинья	Gly - Lys - Lys - Arg - Arg - Pro - Val - Lys - Val - Tyr - Pro - Asn - Gly -
	15 20 25
тепенок, овца	Ala - Glu - Asp - Glu - Ser - Ala - Glu - Ala - Phe - Pro - Leu - Glu - Phe
	30 35
— Leu - Ala - Glu —	
— Ser - Ala - Gln —	

Первый полный синтез АКТГ свиньи с первоначально установленной и, как оказалось впоследствии, ошибочной аминокислотной последовательностью описан в 1963 г. Швицером и Зибром [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 Ямаширо 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.

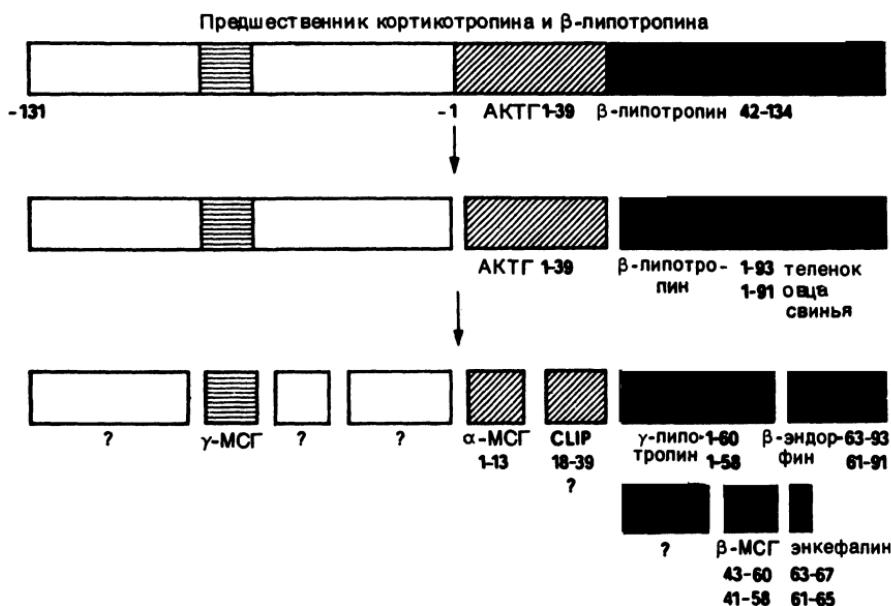
Различные функциональные состояния организма, например стресс или пониженный уровень гормонов коры надпочечников в крови, побуждают переднюю долю гипофиза посредством гормона гипоталамуса кортиколиберина к секреции АКТГ. Образовавшийся гормон по кровяному руслу следует затем к клеткам-мишениям, а именно 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 С-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 — *проопиомеланокортина* [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 С-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  $\beta$ -липотропина и  $\beta$ -эндорфина, а также о метионинэнкефалине, сказано далее. (CLIP — сокращение для кортиcotропиноподобного пептида из промежуточной доли гипофиза, последовательность которого наряду с  $\alpha$ -МСГ содержится в АКТГ.)

### **2.3.1.2. Соматотропный гормон**

Соматотропный гормон [602—604] (СТГ, соматотропин, 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 последние 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,ложенная 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 генной 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 с 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 Фриклундом 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 трипсинового 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 сплитой тремя внутренними дисульфидными мостиками. Из гипофиза теленка и овцы пролактин может быть выделен относительно легко и дифференцировано 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:

Glu - Leu - Ala - Gly - Ala - Pro - Pro - Glu - Pro - Ala - Arg - Asp - Pro - Glu - Ala -  
 1 5 10 15  
 Pro - Ala - Glu - Gly - Ala - Ala - Arg - Ala - Glu - Leu - Glu - Tyr - Gly - Leu -  
 20 25 30  
 Val - Ala - Glu - Ala - Glu - Ala - Glu - Lys - Lys - Asp - Glu - Gly - Pro - Tyr -  
 35 40 45  
 Lys - Met - Glu - His - Phe - Arg - Trp - Gly - Ser - Pro - Pro - Lys - Asp - Lys - Arg -  
 50 55 60  
 Tyr - Gly - Gly - Phe - Met - Thr - Ser - Glu - Lys - Ser - Gin - Thr - Pro - Leu - Val -  
 65 70 75  
 Thr - Leu - Phe - Lys - Asn - Ala - Ile - Val - Lys - Asn - Ala - His - Lys - Lys - Gly - Glu -  
 80 85 90

N-Концевая аминокислотная последовательность 1—58 соответствует первичной структуре  $\gamma$ -липотропина.  $\beta$ -Липотропин теленка 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:

<i>Участок <math>\beta</math>-липотропина</i>	<i>Пептидный гормон</i>
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	Мет-энкефалин

Собственно  $\beta$ -липотропин не обладает каким-либо гормональным действием на организм человека и может быть охарактеризован как прогормоны  $\beta$ -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 проопиомеланокортина.

### 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 белка третью последовательность меланотропи-

на, названную  $\gamma$ -МСГ. Для всех трех меланотропинов теленка установлены следующие аминокислотные последовательности [610]:

$\alpha$ -MCF      Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-Gly  
                   1       5                  10                  14

$\beta$ -MCF Tyr - Lys - Met - Glu - His - Phe - Arg - Trp - Gly - Ser - Pro - Pro - Lys - Asp  
 1                5                10                14

$\gamma$ -MCF      Tyr – Val – Met – Gly – His – Phe – Arg – Trp – Asp – Arg – Phe – Gly  
 1                  5                  10                  12

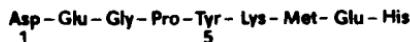
Существование в молекуле проопиомеланокортина четвертого участка с аминокислотной последовательностью, имеющей структурную гомологию с тремя известными меланотропинами, позволяет предположить существование серии дупликаций гена.

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  $\beta$ -липопротропина:



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.

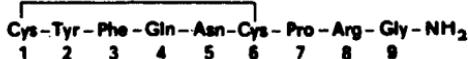
### 2.3.1.6. Окситоцин и вазопрессин [584, 618, 619]

Образование нейрогипофизарных гормонов окситоцина и вазопрессина про- текает не в нейрогипофизе (задняя доля гипофиза), так как он не является

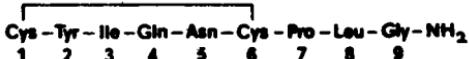
внутрисекреторным органом, а лишь выполняет функцию «депо» гормонов нейросекреторных клеток. Транспортными белками для нейрофизиарных гормонов долгое время считались нейрофизины, образующиеся в гипоталамусе наряду с окситоцином и вазопрессином. Нейрофизинами называют линейные, с высоким содержанием цистеина, 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. лю Биньо с сотр. и независимо от него Таппи с сотр.



В то время как в гипофизе свиньи присутствует  $[\text{Lys}^8]$ вазопрессин, у теленка и других млекопитающих найден  $[\text{Arg}^8]$ вазопрессин:



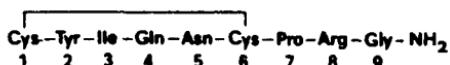
В противоположность этому окситоцин у всех млекопитающих идентичен.

**Окситоцин** действует на гладкую мускулатуру матки и стимулирует ее сокращение (действие, стимулирующее родовые схватки). Кроме того, окситоцин вызывает сокращение миозителиальных клеток молочных желез и тем самым выделение молока. В незначительной степени окситоцин проявляет биологическое действие вазопрессина.

**Вазопрессин** (антидиуретин, алиуретин) 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 веществам. При недостатке вазопрессина появляется картина болезни *Diabetes insipidus*, при которой ежесуточно 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.

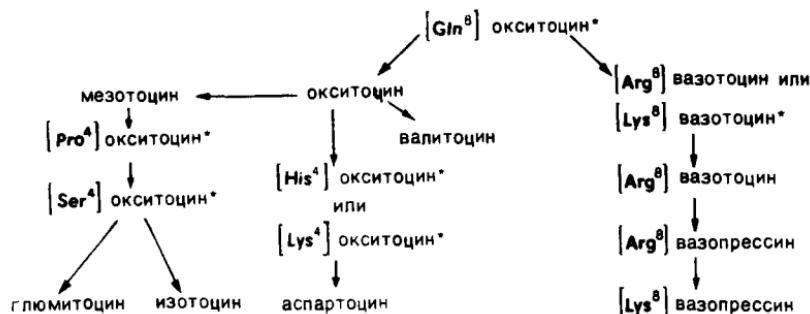
В нейрогипофизах различных классов позвоночных было показано существование 9 биологически активных пептидов (рис. 2-34).

Различные гормоны отличаются лишь замещением в положениях 3, 4 и 8. Применив 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
[ <i>Arg</i> <sup>8</sup> ] вазопрессин	Phe	Gln	Arg	Млекопитающие
[ <i>Lys</i> <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)

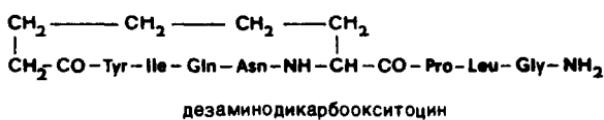
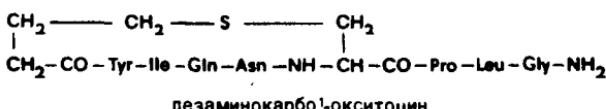
Рис. 2-34. Первичные структуры встречающихся в природе нейрогипофизарных гормонов.

гипофизарных гормонов, согласно которому гормоном-предшественником позвоночных должен быть  $[Gln^8]$ окситоцин вместо ранее принятого  $[Arg^8]$ вазотоцина (еще не обнаруженные в природных источниках гормоны отмечены звездочкой):



Уже через год после установления структуры окситоцина дю 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, раздельным действием и особенно аналоги со свойствами ингибиторов. Существенной для биологической активности является 20-членная кольцевая структура. Замещая один или оба атома дисульфидного мостика на  $\text{CH}_2$ -группы, получают биологически активные карбоаналоги. Очень часто также удаляют  $\alpha$ -аминогруппу, чем повышают уровень активности. Рудингер и Йошт синтезировали различные дезаминокарбоокситоциновые 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, оказыавший 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-

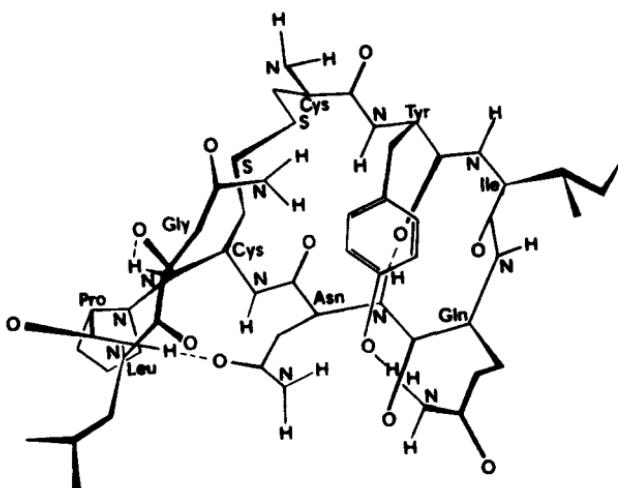


Рис. 2-35. Предположительная биологически активная конформация окситоцина [625].

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>]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 пенициллинамин или  $\beta$ -меркапто- $\beta$ , $\beta$ -диметилпропионовую кислоту [629], а также определенными модификациями тирозина в положении 2 получают производные с ингибиторными к окситоциновым рецепторам свойствами. В качестве примера можно привести [ $\alpha$ -иод-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 неимением 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 Хинссеем, а также Грином и Харрисом (1937—1949 гг.). Многочисленные исследования за следующие двадцать лет привели к выводу, что существует семь освобождающих и три ингибирующих гормона, которые в передней доле гипофиза либо вызывают вырабатывание гормонов, либо его ингибируют. Согласно так называемой единой концепции, каждый гормон гипоталамуса всегда контролирует гормон adenогипофиза. 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 IUPAC—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 *циберины*, 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 ли- тературе 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 доле гипофиза путем гормон-рецепторного взаимодействия на рецепторах клеточных мембран, и затем через аденилатциклазную систему они стимулиру-

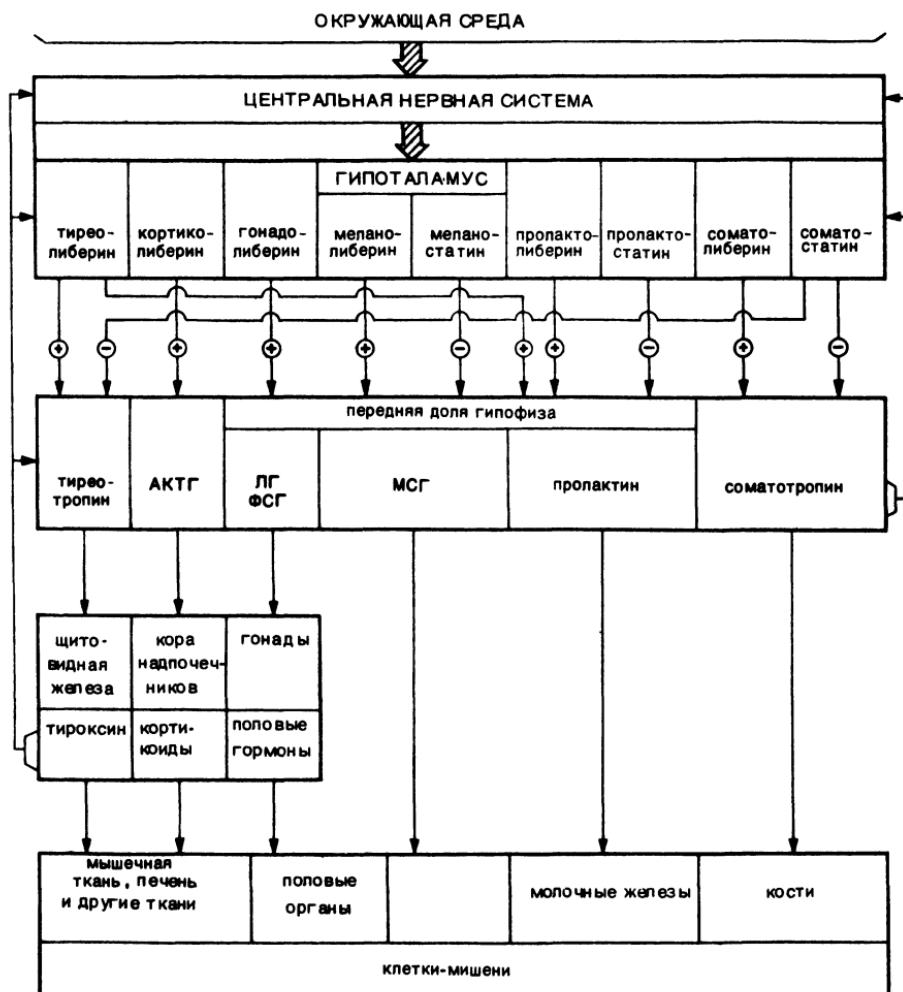


Рис. 2-36. Регуляция передней доли гипофиза гормонами гипоталамуса и действие гонадотропных гормонов [638].

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 мышь, 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 нейротензин — 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 нанограммовых 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.

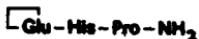
Высокие требования должны предъявляться к разработке и повышению чувствительности как тестовых систем *in vitro* или *in vivo* для биологического контроля процесса выделения, так и методов установления строения полученного в результате весьма незначительного количества чистого вещества. В результате 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 сепадекс G-25 (2 раза)	16 г	16
Распределительная хроматография (2 раза)	246 мг	800
Адсорбционная хроматография (2 раза)	4,2 мг	30 500
Распределительная хроматография	2,0 мг	58 500
Распределительная хроматография	1,0 мг	57 000

Установление структуры гормона оказалось чрезвычайно сложным делом. Следующая аминокислотная последовательность тиреолиберина подтверждена химическим синтезом:



С 1969 г. описано большое число синтезов тиреолиберинов; 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].

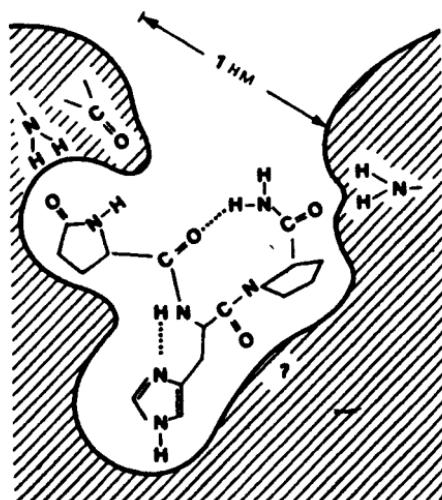


Рис. 2-37. Схема взаимодействия тиреолиберина с рецептором [644].

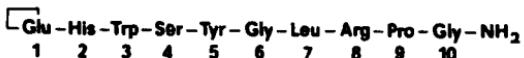
Тиреолиберин регулирует в аденогипофизе синтез и секрецию тиреотропина — гормона, стимулирующего щитовидную железу (рис. 2-36). Вероятно, ему также свойствен эффект стимуляции выделения пролактина (окончательно в этом вопросе еще нет ясности). Исследование конформации и данные о биологической активности синтетических аналогов тиреолиберина позволили Петерсону и Гийемену [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 (рилизинг-фактор гонадотропина) [647]

Рилизинг-фактор гонадотропина удалось впервые (1971 г.) выделить из гипоталамуса свиньи и овцы группы 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], занимавшейся установлением первичной структуры, гонадолиберин имеет следующую последовательность:



К настоящему времени описаны различные варианты синтеза этого либерица, причем приведенный аминокислотный состав 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 парентерально, 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 амунин, 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 противоречавших 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 тиреолиберином и до сих пор еще не известным пролактолиберином.

#### 2.3.1.7.5. Меланолиберин и меланостатин (рилизинг-фактор меланотропина и гормон, ингибирующий выделение меланотропина) [650]

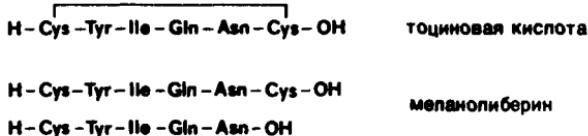
Хотя физиологическая роль МСГ у человека еще неясна, интересен механизм регуляции его выделения в аденогипофизе. В качестве меланостатина были предложены пептиды, в значительной степени происходящие из окситоцина:

Меланостатин I    H-Pro-L<sup>eu</sup>-Gly-NH<sub>2</sub>

Меланостатин II    H-Pro-His-Phe-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>

Меланостатин I [653, 654] образуется из окситоцина при ферментативном отщеплении C-концевого амида тетрапептида. Вальтером [655] было доказано существование соответствующей пептидазы, связанной с мембранами в *Eminentia mediana* гипоталамуса. Этим впервые было показано, что определенный гормон (окситоцина) 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.

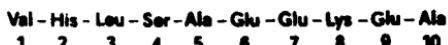
О меланолиберине известно намного меньше. Предположительно это открытое кольцо тоциновой кислоты или соответствующий пептапептид:



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 интерпретируемые. Меланостатин I рекомендован к применению при болезни Паркинсона.

### 2.3.1.7.6. Соматолиберин (рилизинг-фактор соматотропина)

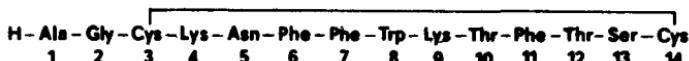
В 1969 г. Шалли и сотр. [657] из гипоталамуса свиньи выделили декапептид следующей структуры:



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 тиреотропной системы и действует при этом как антиагонист 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 тиреолиберином обнаружен также в нейрогипофизе, где, вероятно, стимулирует выделение [ $\text{Arg}^8$ ]вазопрессина. Аналогично тиреолиберину, гонадолиберину и меланостатину I соматостатин действует вне гипоталамуса в качестве нейротрансмиттера и, вероятно, в качестве партнера тиреолиберина. Кроме того, соматостатин модулирует искронную активность в центральной нервной системе. В желудке соматостатин вызывает снижение секреции гастрин, пепсина, соляной кислоты и, кроме того, замедляет моторику и кровоснабжение желудка, в то же время в тонкой кишке ингибируется выделение секретина и холецистокининпанкреозимина. 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-Trp <sup>8</sup> ]соматостатин	821	639	800
[дез-Asn <sup>3</sup> ]соматостатин	10	1	4
[дез-Ser <sup>13</sup> ]соматостатин	4	1	10
[дез-Asn <sup>5</sup> , D-Trp <sup>8</sup> ]соматостатин	60	1	13
[дез-Asn <sup>5</sup> , D-Ser <sup>13</sup> ]соматостатин	481	1	1
[D-Trp <sup>8</sup> , D-Ser <sup>13</sup> ]соматостатин	261	1	70
[дез-Asn <sup>5</sup> , D-Trp <sup>8</sup> , D-Ser <sup>13</sup> ]соматостатин	1753	100	13
[дез-АК <sup>1,2,4,13</sup> , D-Trp <sup>8</sup> ]соматостатин	75	8	8
[дез-АК <sup>1,2,4,12,13</sup> , D-Trp <sup>8</sup> ]соматостатин	72	1	1
[дез-АК <sup>1,2,4,5,13</sup> , D-Trp <sup>8</sup> ]соматостатин	36	7	25
[дез-АК <sup>1,2,4,5,12</sup> , D-Trp <sup>8</sup> ]соматостатин	70	21	—
[дез-АК <sup>1,2,4,5,12,13</sup> , D-Trp <sup>8</sup> ]соматостатин	45	7	9

АК — 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-Trp 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

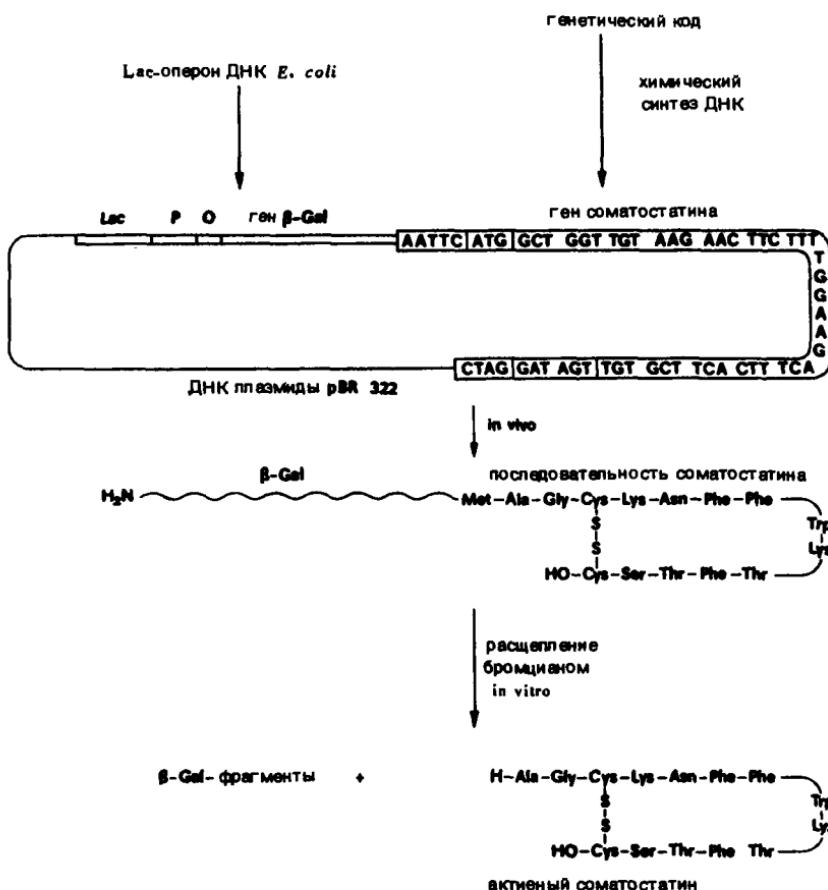


Рис. 2-38. Схема синтеза соматостатина соединением полностью синтетического гена с β-галактозидазным геном в плазмиде pBR 322 *E. coli* [666].

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 целью. 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 [ $D\text{-Trp}^5,8$ ]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. Физиологическая 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 фософруктокиназы. Он стимулирует синтез гликогена и белков. Кроме снижения липолиза ингибируется образование пириваткарбоксилазы 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 которой 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. Невыясненная 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. Абелем, а в 1955 г. Сенгер опубликовал полную структуру инсулина. (Это выдающееся достижение в 1958 г. также было отмечено Нобелевской премией.) 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 мышах, окисление глюкозы в жировых тканях или в отдельных жировых клетках) показывают примерно равную биологическую активность. Так, инсулини морских свинок отличаются от инсулина крысы не менее чем в 17 положениях. Обычно различия в первичной структуре велики настолько, насколько далеко отстоят организмы друг от друга в филогенетическом развитии.

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 связанными атомами цинка), наблюдавшаяся 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 протамицином.

Инсулин промышленно производится преимущественно из экстрактов поджелудочной железы свиньи и теленка. В 1 кг поджелудочных желез теленка содержится ~2000 и.е. (27 и.е. = 1 мг) инсулина. Инсулин экстрагируют 70%-ным этанолом, подкисленным HCl до pH 1–2; образовавшийся раствор инсулина быстро отделяют от нерастворимых протеаз (их содержание >40 г/кг). После дальнейшей очистки может быть получен кристаллический инсулин. Полученный кристаллический продукт не является чистым и не может быть далее очищен перекристаллизацией. Для тонкой очистки (отделение проинсулина, дезамидоинсулина и частично этерифицированного инсулина) используют хроматографию, противоточное распределение и в особых случаях (отделение высокомолекулярных, иммуногенных веществ) гель-хроматографию.

К началу 60-х годов пептидная химия получила такое развитие, что можно было приступить к синтезу цепей инсулина. Не менее 10 исследовательских групп взялись за выполнение этой задачи. Но лишь группы Цана (в Ахене), Каояниса (в Питтсбурге) и Ванга (в Шанхае) после многолетней

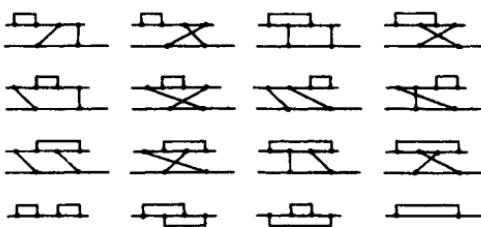


Рис. 2-39. Схема образования изомеров инсулина и мономерных А- и В-цепей с замкнутыми дисульфидными связями (по Цану).

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, pH 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. Кацоянису 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 результатирующей 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 Кацоянисом с сотр. [673], и в 1965 г. группа Ванга закончила синтез инсулина теленка [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-

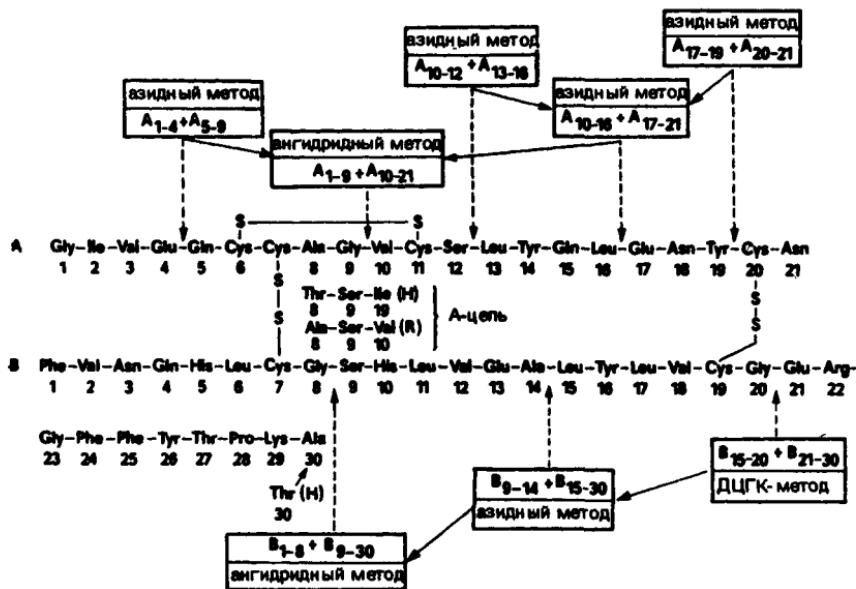


Рис. 2-40. Стратегия синтеза инсулина овцы по Чану [672]. Инсулины человека (Н) и теленка (Р) отличаются от инсулина овцы участком 8 – 10 А-цепи. Кроме того, инсулин человека имеет отличие в положении В-30.

ноцепочечном 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-

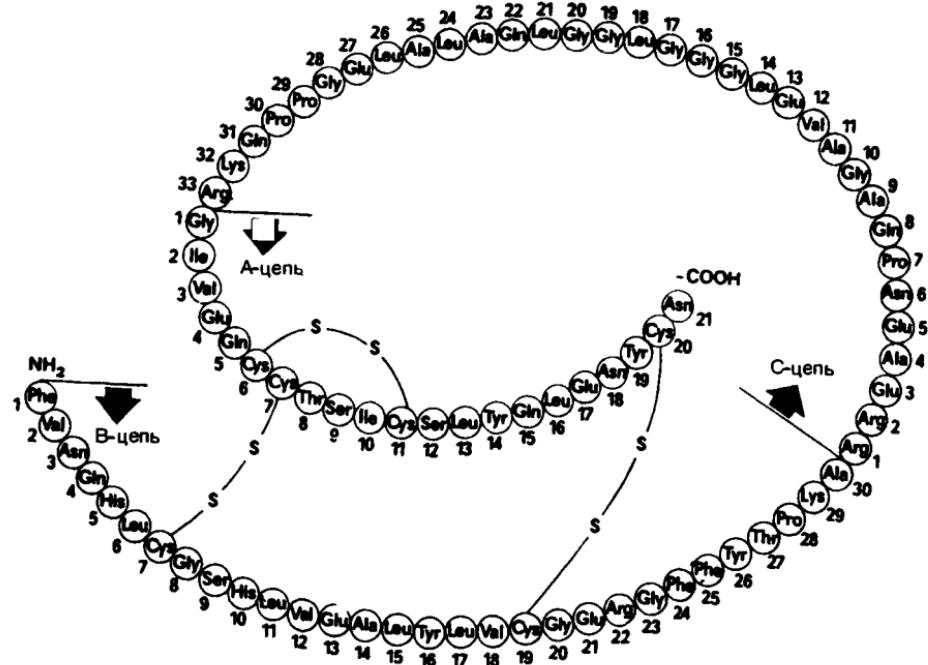
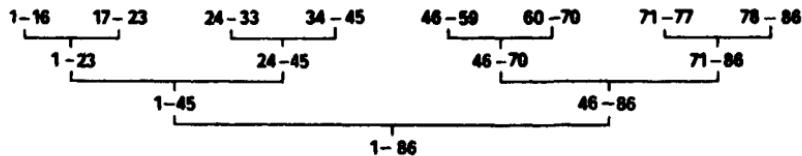


Рис. 2-41. Первичная структура проинсулина свиньи [675].

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

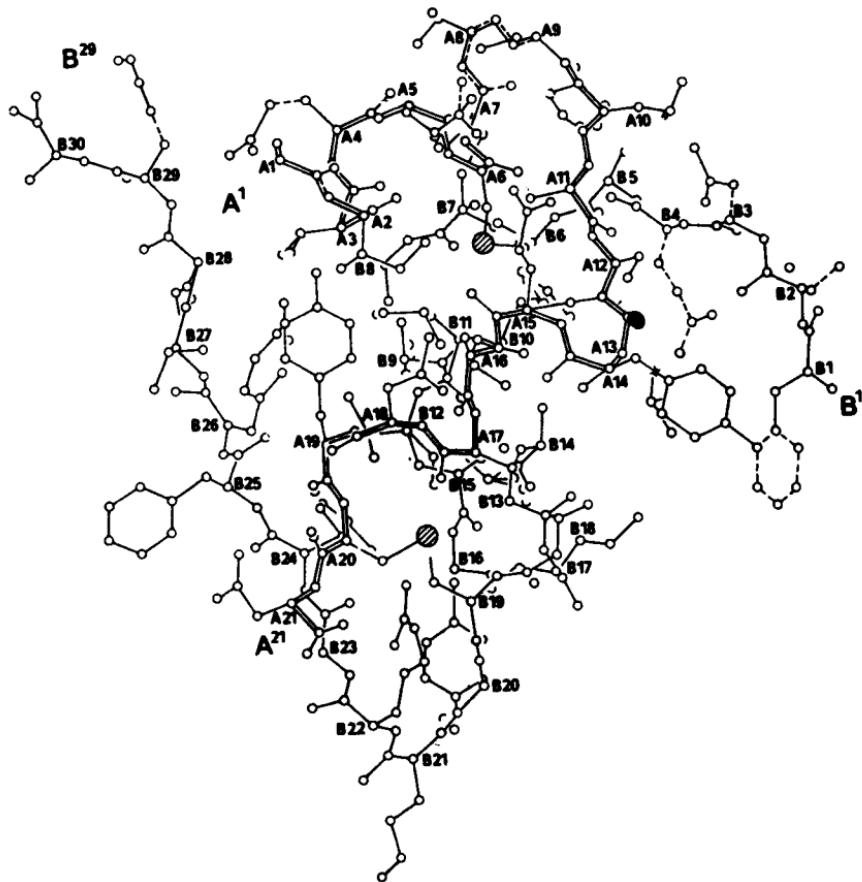


Рис. 2-42. Трехмерная модель мономера инсулина [679].

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-

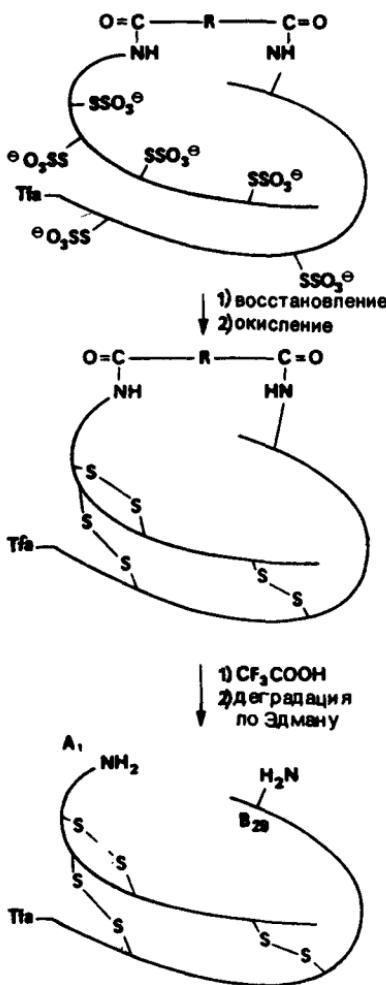
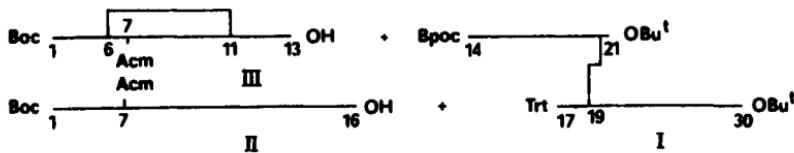


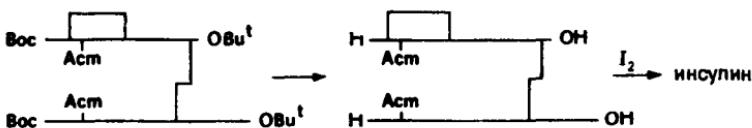
Рис. 2-43. Рекомбинация цепей инсулина с применением сшивающих реагентов [680].

тида A(20—21)-B(17—20) после присоединения к участку А-цепи Boc-A(14—19)-OH и соответственно к участку В-цепи H-B(21—30)-OBu<sup>t</sup> был получен большой асимметричный цистиновый сегмент I с дисульфидной связью между A<sup>20</sup> и B<sup>19</sup>:



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 кислотолабильной Брос-группы. Подходящим оказался ацидолиз тритильного остатка в трифтогорэтаноле как растворителе при контроле pH. Затем сегмент II был сконденсирован с помощью ДЦГК/НОВt с частично защищенным сегментом I. Затем после селективного удаления Брос-группы последовала конденсация с сегментом III, синтез которого также был соображен со значительными трудностями. Замыкание внутреннего дисульфидного мостика A<sup>6</sup> — A<sup>11</sup> окислением иодом, исходя из соответствующих S-тритильтиестериновых остатков, требовало условий, в которых чувствительная к иодолизу S-Аcm-группа не затрагивается.

После отщепления N- и C-концевых, а также боковых защитных групп *трет*-бутильного типа была замкнута дисульфидная связь A<sup>7</sup> — B<sup>7</sup> 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-Тиг-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 (имеются 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, это может быть лучше объяснено долговременное действие гормона.

Недавно удалось также синтезировать как цепи инсулина, так и человеческий проинсулин с помощью генной технологии [586, 682, 683].

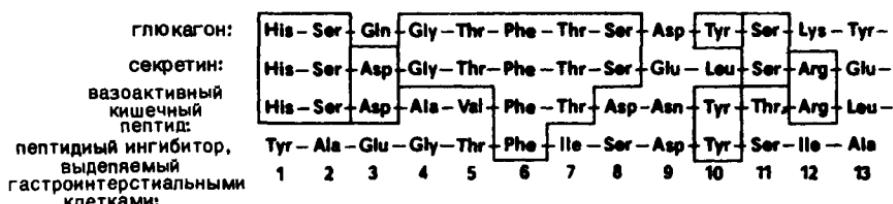
### 2.3.1.9. Глюкагон

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 — однोцепочечный пептид со следующей аминокислотной последовательностью (Броммер и др., 1956 г.).

His	—	Ser	—	Gln	—	Gly	—	Thr	—	Phe	—	Thr	—	Ser	—	Asp	—	Tyr	—	Ser	—	Lys	—	Tyr	—	Ileu	—	Asp	—	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15																
Ser	—	Arg	—	Arg	—	Ala	—	Gln	—	Asp	—	Phe	—	Val	—	Gln	—	Trp	—	Ileu	—	Met	—	Asn	—	Thr	—			
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29																	

Поразительным является совпадение с аминокислотными последовательностями секрецина, вазоактивного кишечного пептида и пептидного ингибитора гастроинтерстициальных клеток в N-концевых участках 1-12:



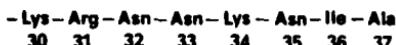
Интересно, что у всех четырех гормонов в положении 6 находится остаток фенилаланина, у первых трех совпадает N-концевой дипептид и только единственный гормон, стимулирующий секрецию поджелудочной железы, имеет в положении 10 остаток лейцина, в то время как остальные несут в этом положении остаток тирозина. 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 гидроксиамиокислот, 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 C-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.

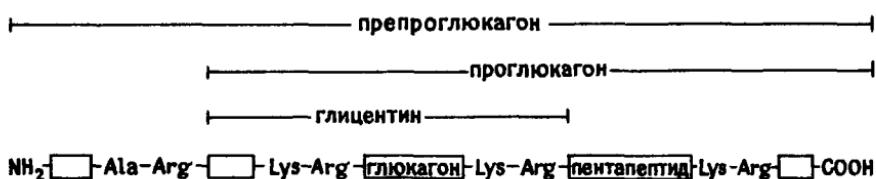
Глюкагон имеет терапевтическое применение при заболеваниях, связанных с понижением содержания сахара в крови (при передозировке инсулина или гиперинсулинизме) или с избытком глюкагона.

Тагер и Штейнер [686] из кристаллического глюкагона (теля 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. C-Концевой пептид имеет последовательность:



В 1979 г. Патцель [687] постулировал предположительную структуру проглюкагона.

Аминокислотная последовательность препроголюкагона (124 аминокислотных остатка) установлена Хабенером и др. [687а]:



### 2.3.1.10. Паратиреоидный гормон

Паратиреоидный гормон парашитовидной железы наряду с кальцитонином и 1,25-дигидроксихолекальциферолом 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-дигидроксихолекальциферола из его

предшественника 25-гидроксихолекальциферола). Действие в качестве гормона-стимулятора для 1,25-дигидроксихолекальциферола, 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]:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12													
телец	Ala	—	Val	—	Ser	—	Glu	—	Ile	—	Gln	—	Phe	—	Met	—	His	—	Asn	—	Leu	—	Gly		
свинья	Ser	—											Leu	—											
человек	Ser	—											Leu	—											
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24													
телец	Lys	—	His	—	Leu	—	Ser	—	Ser	—	Met	—	Glu	—	Arg	—	Val	—	Glu	—	Trp	—	Leu		
свинья	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Leu	—											
человек	—	—	—	—	—	—	—	—	Asn	—															
	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36													
телец	Arg	—	Lys	—	Lys	—	Leu	—	Gln	—	Asp	—	Val	—	His	—	Asn	—	Phe	—	Val	—	Ala		
свинья	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—												
человек	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—												
	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48													
телец	Leu	—	Gly	—	Ala	—	Ser	—	Ile	—	Ala	—	Tyr	—	Arg	—	Asp	—	Gly	—	Ser	—	Ser		
свинья	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Val	—	His	—	—	—	—	—	—	—	—	Gly	
человек	—	—	—	—	—	—	—	Pro	—	Leu	—	—	Pro	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Ala	—	Gly
	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60													
телец	Gln	—	Arg	—	Pro	—	Arg	—	Lys	—	Lys	—	Glu	—	Asp	—	Asn	—	Val	—	Leu	—	Val		
свинья	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—												
человек	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—												
	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72													
телец	Glu	—	Ser	—	His	—	Gln	—	Lys	—	Ser	—	Leu	—	Gly	—	Glu	—	Ala	—	Asp	—	Lys		
свинья	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—												
человек	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Glu	
	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84													
телец	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 Меррифилда 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.) Андреаттой 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 ингибитирует 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 предложению в данном случае мы, очевидно, имеем дело с так называемым «регнилогическим» 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:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
человек	Cys	—Gly—Asn—Leu—Ser—Thr—Cys—Met—Leu—Gly—Thr—									
свинья	Ser	—————	Val	—————	Ser	—Ala—					
теленок	Ser	—————	Val	—————	Ser	—Ala—					
лосось		—————	Val	—————							Lys

	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	-	
человек	Tyr	-	Thr	-	Gln	-	Asp	-	Phe	-	Asn	-	
свинья	—	—	Trp	-	Arg	-	Asn	-	Leu	—	Asn	—	
теленок	—	—	Trp	-	Lys	—	Leu	—	Asn	-	Tyr	—	
лосось	Leu	-	Ser	—	Glu	-	Leu	-	His	—	Leu	-	
	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32			
человек	Pro	-	Gln	-	Thr	-	Ala	-	Ile	-	Gly	-	
свинья	Ser	-	Gly	-	Met	-	Gly	-	Phe	—	—	Pro	-
теленок	Ser	-	Gly	-	Met	-	Gly	-	Phe	—	—	Pro	-
лосось	—	Arg	—	—	Asn	-	Thr	—	Ser	—	Thr	—	

Биосинтез кальцитонина проходит через стадию препроказитонина — предшественника, состоящего из 136 аминокислотных остатков, из которого после отщепления сигнальной последовательности из 24 аминокислотных остатков образуется прокальцитонин [693а].

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 остеодистрофии (*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 антагонистическими 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 гастрина, секретина, холецистокинина панкреозимина 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 гастроинтестициальными клетками и имеющим структуру

	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	-	
человек	Tyr	-	Thr	-	Gln	-	Asp	-	Phe	-	Asn	-	
свинья	—	—	Trp	-	Arg	-	Asn	-	Leu	—	Asn	—	
теленок	—	—	Trp	-	Lys	—	Leu	—	Asn	-	Tyr	—	
лосось	Leu	-	Ser	—	Glu	-	Leu	-	His	—	Leu	-	
	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32			
человек	Pro	-	Gln	-	Thr	-	Ala	-	Ile	-	Gly	-	
свинья	Ser	-	Gly	-	Met	-	Gly	-	Phe	—	—	Pro	-
теленок	Ser	-	Gly	-	Met	-	Gly	-	Phe	—	—	Pro	-
лосось	—	—	Arg	—	—	Asn	-	Thr	—	Ser	—	Thr	—

Биосинтез кальцитонина проходит через стадию препроказитонина — предшественника, состоящего из 136 аминокислотных остатков, из которого после отщепления сигнальной последовательности из 24 аминокислотных остатков образуется прокальцитонин [693а].

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 остеодистрофии (*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 антагонистическими 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 гастрина, секретина, холецистокинина панкреозимина 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 гастроинтестициальными клетками и имеющим структуру

GIP-	Tyr - Ala - Glu - Gly - Thr - Phe - Ile - Ser - Asp - Tyr - Ser - Ile - Ala - Met - Asp -												
	1	5	10										15
Lys - Ile - Arg - Gln - Gln - Asp - Phe - Val - Asn - Trp - Leu - Leu - Ala - Gln - Gln -													20 25 30
Lys - Gly - Lys - Lys - Ser - Asp - Trp - Lys - His - Asn - Ile - Thr - Gln													35 40 43

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:

VIP	His - Ser - Asp - Ala - Val - Phe - Thr - Asp - Asn - Tyr - Thr - Arg - Leu - Arg -												
	1	5	10										
Lys - Gin - Met - Ala - Val - Lys - Lys - Tyr - Leu - Asn - Ser - Ile - Leu - Asn - NH <sub>2</sub>													
15	20	25	28										

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 урогастрономом 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 Эдвансом, 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 гентадекапептида с остатком пироглутаминовой кислоты на N-конце. Гастрин II обладает такой же аминокислотной последовательностью, но тиразин в положении 12 содержит O-сульфогруппу:

человек	—	Glu	-	Gly	-	Pro	-	Trp	-	Leu	-	Glu	-	Glu	-	Glu	-
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10							
свинья	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Met	—	—	—	—	—	—
собака	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Met	—	Ala	—	—	—	—
теленок (овца)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Val	—	—	Ala	—	—	—
кошка	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Leu	—	—	Ala	—	—	—

	(SO <sub>3</sub> H)							
	Ala	Tyr	Gly	Trp	Met	Asp	Phe	NH <sub>2</sub>
человек	11	12	13	14	15	16	17	
свинья								
собака								
телеонок (овца)								
кошка								

В различных организмах гастрин I и II выделяются в разных пропорциях. В процессе синтеза гастрин Кеннером с сотр. был тестирован на биологическую активность амид C-концевого N-защищенного тетрапептида Z-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>. В результате был получен неожиданный результат, его биологическое действие оказалось равным 1/10 (в расчете на моль) биологической активности полного гормона. Более 500 аналогов гастрин синтезировано Морлеем [699] для структурно-функциональных исследований. В результате этих обширных исследований введен в медицинскую практику и используется для диагностики секреции желудка пентагастрин Вос-β-Ala-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub> («пептавлон»).

В пептидной лаборатории в Чикаго в процессе синтеза тетрапептида гастрин Шлёттер сделал случайное, но в высшей степени интересное наблюдение, что дипептид H-Asp-Phe-OMe сладкий на вкус (в 100—200 раз сладче сахарозы). Открытие, сделанное при перекристаллизации, привело к появлению промышленно производимого сладкого вещества «аспартам».

Превращение полученного химическим синтезом гастрин I в гастрин II можно осуществить обработкой его комплексом пиридин — SO<sub>3</sub>, при pH 10. Но при такой обработке могут протекать различные процессы в аминокислотных остатках в области 14—17 (важной для проявления биологической активности), ведущие к инактивации пептида, например замещение в триптофановом кольце, окисление метионина в его S-оксид, дезамидирование и т. д. Для уменьшения этих изменений Met<sup>15</sup> может быть заменен без уменьшения биологической активности на Leu<sup>15</sup>. Это наблюдение имеет большое практическое значение, потому что [Leu<sup>15</sup>]гастрин I человека, не имея остатка метионина, более устойчив к окислению и обладает повышенной стабильностью при хранении. Замены в участке 1—13 не оказывают какого-либо влияния на биологическую активность. Гастрин из других организмов, отличающиеся от человеческого этим участком, также проявляют биологическую активность.

Очень вероятно, что первоначально гастрин не имеют N-концевого остатка пироглутаминовой кислоты, после отщепления от предшественника на данном месте находится остаток глутамина, циклизующийся в процессе выделения гастрин. По данным Нойеса с сотр. [700], предшественником гастриня является прогастрин с *M* ~ 10000. В качестве предшественника Грегори и Трейси в 1975 г. описали «биг»-гастрин человека («биг»-большой), имеющий (после уточнения в 1980 г.) следующую аминокислотную последовательность:

Glu — Leu — Gly — Pro — Gln — Gly — Pro — Pro — His — Leu — Val — Ala —		
1	5	10
Asp — Pro — Ser — Lys — Lys — Gln — Gly — Pro — Trp — Leu — Glu — Glu —		
15	20	
Glu — Glu — Glu — Ala — Tyr — Gly — Trp — Met — Asp — Phe — NH <sub>2</sub>		
25	30	34

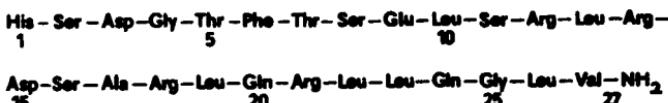
В соответствии с данными по пересмотру первичной структуры Вюнш с сотр. [701] осуществил новый полный синтез «биг»-гастрина I человека.

Еще один член семейства гастринов был выделен Грегори и Трейси [702] из гастринпродуцирующей опухоли Золлингера — Эллисона. По аминокислотной последовательности он соответствовал участку 22—34 «биг»-гастрина и соответственно участку 5—17 гастрина I человека, вследствие чего получил название «мини-гастрин I». По предложению Вальша приняты сокращения: для гастрина I человека — HG-17 I, для мини-гастрина — HG-13 I. После дополнительных исследований аминокислотная последовательность минигастрина была скорректирована и подтверждена синтезом. Оказалось, что он состоит из 14 аминокислотных остатков, имеет триптофан на N-конце и соответствует участку 4—17 гастрина I человека [703].

### 2.3.1.12.2. Секретин

Секретин, образующийся слизистой тонкой кишки, стимулирует секрецию поджелудочной железы пищеварительного сока, содержащего бикарбонат натрия, стимулирует образование печенью желчной жидкости и должен, по различным данным, вызывать секрецию инсулина поджелудочной железой. Кроме того, постулировано, что секретин противодействует образованию кислоты в желудке.

Этот гормон открыт в 1902 г. Байлисом и в 1961 г. выделен Стерлингом в чистом виде, а четырьмя годами позднее установлена его первичная структура [704]:

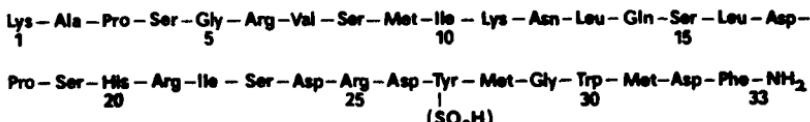


Структура была подтверждена двумя полными синтезами, проведенными Бодански с сотр. в 1967—1968 гг., отличающимися стратегическими концепциями (ступенчатый синтез с помощью нитрофениловых эфиров и фрагментная конденсация). Синтез с использованием фрагментной конденсации в «100-граммовом масштабе», проведенный Вюншем [705], привел к «сырому» секретину с 50%-ной биологической активностью. После однократной очистки с помощью ионообменной хроматографии был получен синтетический продукт, идентичный с природным гормоном.

Удлинение цепи с N-конца, не влияя на биологическую активность, увеличивает продолжительность действия пептида. Укороченные или частичные последовательности не обладают биологической активностью.

### 2.3.1.12.3. Холецистокининпанкреозимин

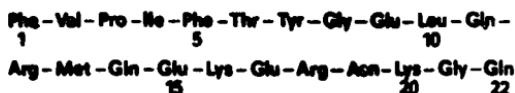
Кажущееся несколько сложным название гормона обусловлено историческими причинами. В 1928 г. Иви и Олдберг сообщили о существовании в сыром экстракте слизистой кишечника вещества, обладающего сократительным действием на желчный пузырь и названного холецистокинином. В таком же экстракте в 1943 г. Харпером и Рапером было найдено вещество, увеличивающее секрецию ферментов поджелудочной железы и названное панкреозимином. И наконец, в 1964 г. было доказано [706], что оба гормональных действия принадлежат одному веществу пептидной природы, получившему название «холецистокининпанкреозимин». Гормон обладает следующей аминокислотной последовательностью [707]:



В С-концевой области наблюдается значительная гомология с гастрином и цефалином. Полученный триптическим расщеплением амид С-концевого октапептида и соответствующий додекапептид показывают более высокую биологическую активность, чем нативный гормон. Для амида октапептида действие (при расчете на 1 мг) в 10 раз более высокое. Для амида додекапептида установлена в 2,5 раза более высокая активность в teste на сокращение желчного пузыря по сравнению с природным гормоном, причем было отмечено сильное увеличение обычно слабо выраженной гастриновой активности.

### 2.3.1.12.4. Мотилин

Структура мотилина установлена Муттом и Брауном; гормон стимулирует деятельность желудка и выделение пепсина, но не оказывает влияния на содержание кислоты. Состоит из 22 аминокислотных остатков со следующей первичной структурой [708]:



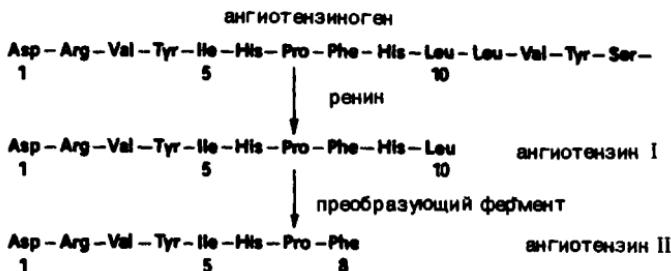
При рассмотрении аминокислотной последовательности не удается найти родственных связей с каким-либо из известных к настоящему времени гормонов желудочно-кишечного тракта. Необычным является распределение гидрофильных и гидрофобных аминокислот в молекуле. В 1975—1976 гг. полные синтезы мотилина описаны лабораториями Яджими, Ямады и Михары; Вюнш и сотр. [709] описали синтезы [ $\text{Nle}^{13}$ ,  $\text{Glu}^{14}$ ]мотилина и [ $\text{Leu}^{13}$ ,  $\text{Glu}^{14}$ ]мотилина. Эти работы показали, что метионин в положении 13 несуществен для биологической активности и, заменив его на другие аминокислоты, удается обойти некоторые трудности синтеза, связанные с наличием последовательности -Arg-Met-. Наличие D-фенилаланина в положении 5 не влияет на биологическую активность гормона; в то же время присутствие D-фенилаланина в положении 1 снижает активность на 80% [710]. Окисление метионина в положении 13 до S-оксида снижает биологическую активность на 20% (относительно природного гормона).

### 2.3.1.13. Ангиотензин [711—713]

Ангиотензин II сильно повышает артериальное давление, стимулирует образование альдостерона в коре надпочечников и сильно влияет на гладкие мышцы матки и желудочно-кишечного тракта, причем это влияние не имеет физиологического значения. Инактивация гормона происходит в крови под действием фермента ангиотензиназы.

Ангиотензин II (ангиотонин, гипертензин) образуется в результате двухстадийного ферментативного процесса из белка  $\alpha_2$ -глобу-

линовой фракции плазмы. Сначала под действием образующейся в почках протеазы ренина в крови от ангиотензиногена («рениновый субстрат») отщепляется биологически неактивный декапептид ангиотензин I. На второй стадии под действием конвертирующего фермента дипептидазы, зависимой от хлорид-иона и чувствительной к ЭДТА, происходит отщепление дипептида His-Leu и образование активного ангиотензина II:

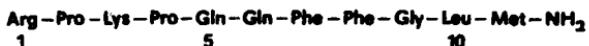


Действием трипсина на  $\alpha_2$ -глобулиновую фракцию может быть получен тетрадекапептид, так называемый «полипептидный субстрат ренина», структура которого установлена и к настоящему времени осуществлен его синтез. Приведенный на схеме [ $Ile^5$ ]ангиотензин II (человека, лошади, свиньи) не отличается по биологической активности от [ $Val^5$ ]ангиотензина II (телецка). Оба ангиотензина, а также [ $Val^5$ ]ангиотензин I синтезированы в 1957—1958 гг. в лаборатории Швейцера. Структурно-функциональные исследования, проведенные многими исследовательскими группами, показали, что важное значение для биологической активности имеют Тир, Ile или Val в положении 5, а также участок His-Pro-Phe, в то время как замена N-концевого аспарагина на Glu, Gln или пироглутаминовую кислоту не ведет к потере активности. Аналоги с D-Asp или D-Asn в положении 1 более активны из-за большей устойчивости к деградации аминопептидазами. С-Концевая карбоксильная группа должна оставаться свободной. Хотя ангиотензин считается одним из наиболее изученных пептидных гормонов (синтезировано более 200 аналогов), интерес к изучению его физиологической роли и ее связи с конформацией и рецепторным взаимодействием не ослабевает. Синтезированы различные антагонисты, такие, как [ $Phe^4$ , Тир<sup>8</sup>]ангиотензин II, [ $Sar^1$ , Leu<sup>8</sup>]ангиотензин II, [ $Ile^8$ ]ангиотензин II и др.

### 2.3.1.14. Вещество Р [714, 715]

В 1931 г. Эулер и Гаддум обнаружили в мозге и кишечнике лошади вещество, которое снижало артериальное давление и вызывало сокращение кишечных мышц кролика. Высущенный экстракт закодирован буквой Р (от английского powder). Отсюда произошло принятое сейчас название — «вещество Р». В 1967 г. Лиман и сотр. выделили из гипоталамуса крысы вещество пептидного характера, стимулирующее секрецию слюнных желез и названное поэтому «сиалоген». Той же группе удалось в 1970—1971 гг.

установить аминокислотную последовательность гормона и подтвердить ее синтезом:



Идентичность вещества Р и сиалогена была доказана в 1973 г. Штудером и сотр. [716]. Вещество Р найдено в желудочно-кишечном тракте различных млекопитающих и в мозге человека, млекопитающих, птиц, рептилий, рыб и др. С помощью радиоиммунных методов показано присутствие вещества Р в клетках центральной и периферической нервной системы. Выделение гормона, вероятно, происходит при возбуждении первичных, сенсорных нервов, и в этой части нервной системы вещество Р может служить нейротрансмиттером. Вещество Р подавляет действие морфина и эндорфина. Кроме того, допускают, что оно может играть роль при предотвращении необратимого геморрагического шока. Не следует исключать общую функцию вещества Р при защите от нарушений, вызванных стрессовыми ситуациями. Кроме усиления моторики кишечника, понижения артериального давления крови и повышения слюноотделения вещество Р вызывает множество других физиологических и фармакологических эффектов.

По названным причинам крайне сложно отнести вещество Р к какому-либо определенному классу биологически активных пептидов. Часто его считают гормоном гипоталамуса, однако можно встретить вещество Р включенным в группу тахикининов, и, наконец, не будет ошибочным считать этот пептид нейротрансмиттером.

### 2.3.1.15. Нейротензин [717, 718]

Установление структуры и синтез нейротензина осуществлены Каравеем и Лимманном, которые выделили его в 1973 г. из гипоталамуса теленка. Согласно полученным данным, пептид имеет следующую структуру:

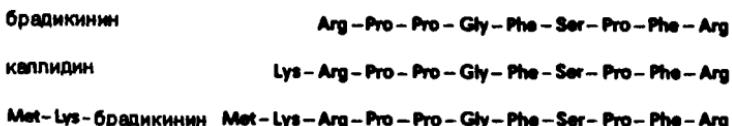


Кроме биологического действия, характерного для кининов плазмы, — понижения артериального давления, повышения проницаемости капилляров, сокращения кишок и матки, нейротензин повышает секрецию ЛГ и ФСГ без влияния на выделение тиреотропина и соматотропина. Он вызывает также гипергликемию и проявляет ряд других активностей. Из структурно-функциональных исследований вытекает, что пентапептид Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu является самым коротким из проявляющих полную нейротензиновую активность. Интересен факт, что пептид хенопсин Prg-Gly-Lys-Arg-Pro-Trp-Phe-Leu, выделенный из кожи лягушки *Xenopus laevis* [719], явно гомологичен с C-концевой областью нейротензина. В тестах на понижение артериального давления и гипергликемическое действие, а также при цианозе хенопсин проявляет ~ 20% активности нейротензина. Эта активность совпадает с активностью нейротензинового фрагмента 6—13.

### 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).



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. Повидимому, особенно богата такими короткими пептидами с вазоактивным действием кожа амфибий. Из слюнной железы каракатиши был выделен эледозин, обнаруживающий аналогично другим пептидам гипотензивное действие и вызывающий усиление активности органов, имеющих гладкую мускулатуру. Как правило, физиологическая роль этих пептидов еще неясна; активности, наблюдавшиеся на определенных моделях, позволяют думать, что они могут иметь фармакологическое значение.

Некоторые представители, такие, как вещество Р, бомбезин, причисляются к нейропептидам. Из кожи амфибий были изолированы новые интересные опиатоподобные пептиды, важнейший из них — дерморфин Тут-D-Ala-Phe-Dly-Tut-Pro-Ser-NH<sub>2</sub>, который наряду с [6-оксипролин]дерморфином был изолирован из метанольного экстракта кожи южноамериканских

лягушек *Phyllomedusa sauvagai* 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 дермоморфин 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
физапемин	Glu	—Ala—Asp—Pro—Asn—Lys					Phe	Tyr	Gly	—Leu—Met—NH <sub>2</sub>	
упероленин	Glu	—Pro—Asp—Pro—Asn—Ala					Phe	Tyr	Gly	—Leu—Met—NH <sub>2</sub>	
эледоизин	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					Phe	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.

Эледоизин (устаревшее название мошатии) 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 возбуждающее на гладкую мускулатуру пептид удалось выделить и установить его структуру [723]. Оконачательное доказательство структуры путем химического синтеза сделано Сандрином и Буасона [724]. Эледоизин понижает артериальное давление у человека, но его передозировка ведет к учащению дыхания. Эледоизин 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 С-концевой гепталептид 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 эледоизина; 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 *Physalaemus fuscitaculatus* осуществлено Эрспамером в 1964 г. В том же году Бернарди с сотр. [725] опубликовал его полный синтез.

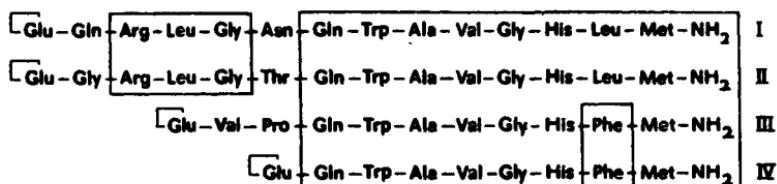
*Филломедузин* выделен в 1970 г. Анастаси и Эрспамером [726] из кожи южноамериканской лягушки *Phyllomedusa bicolor*. Установление последовательности показало его значительное структурное подобие с уже рассмотренными тахикининами, что также подтверждается спектром активностей. Полный синтез этого декапептида 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 C-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 сходы 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 cerebrī*, 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 присутствием таких терморегулирующих пептидов в центральной нервной системе высших животных.

*Алитензин* (II) кожи жабы *Alytes obstetricans* отличается от бомбезина лишь двумя аминокислотными остатками.

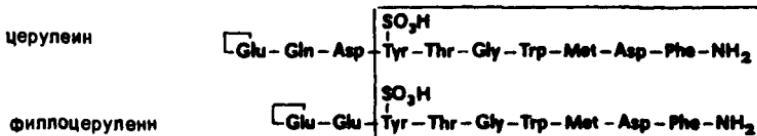
*Ранатензин* (III) выделен из кожи американской лягушки *Rana pipiens*. Оказывает вазоактивное и миотропное действие.

*Алитензин* (II) кожи жабы *Alytes obstetricans* отличается от бомбезина нокислотных остатка 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

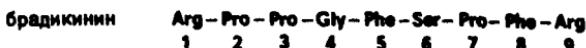
В 1967 г. Эрспамер выделил из кожи австралийской лягушки *Hyla caerulea* пептид, названный *церуленином*. Приблизительно в то же время в коже южноамериканской лягушки *Phyllomedusa sauvagei* был найден очень похожий по первичной структуре пептид, получивший, в свою очередь, название *филлоцерулен*:



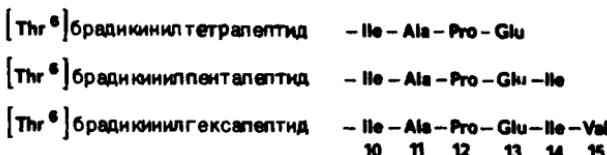
Церуленин по сравнению с брадикинином снижает артериальное давление на более долгое время, однако вызывает более слабые сокращения гладких мышц. Имея похожую структуру с гормоном желудочно-кишечного тракта холецистокининпанкреозимином (разд. 2.3.1.12), церуленин обладает и похожей биологической активностью. Сверх того, оба пептида церуленин и филлоцерулен совпадают в С-концевом участке с гастрином. Филлоцерулен в более слабой форме повторяет спектр активностей церуленина.

### 2.3.2.4. Брадикинины амфибий

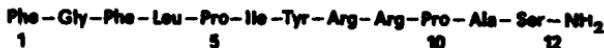
Из метанольного экстракта кожи амфибий выделены различные брадикинины и их аналоги, например брадикинин из *Rana temporaria* [734], *Rana nigromaculata* [735], *Rana pipiens* [736] и *Bombina orientalis*, а также два различных аналога из *Rana nigromaculatus* [735] и *Bombina orientalis*.



Помимо брадикинина, были найдены [ $\text{Thr}^6$ ]брадикинин и [ $\text{Val}^1$ ,  $\text{Thr}^6$ ]брадикинин. Язухара и Накайма [737] выделили из кожи *Rana rugosa* кроме [ $\text{Thr}^6$ ]брадикинина три удлиненных с С-конца аналога:

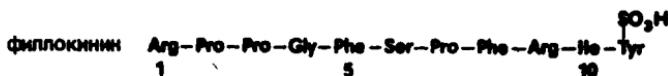


Из кожи *Rana rugosa* был также выделен другой интересный пептид, содержащий 12 аминокислотных остатков и, вследствие своего дегранулирующего действия на тучные клетки, получивший название *гранулиберин-R* [737]:



Интересно то, что в N-концевой области собраны гидрофобные остатки, в то время как С-концевая область построена из гидрофильных и основных аминокислот. Пептид обладает свойствами поверхностно-активного вещества.

Известны и другие удлиненные с С-конца аналоги брадикинина амфибий. Это брадикинилпентапептид из *Rana nigromaculata* (-Val-Ala-Pro-Ala-Ser), брадикинилтетрапептид из *Bombina orientalis* (-Gly-Lys-Phe-His) и филлокинин из кожи лягушки *Phyllomedusa rohdei*.



Входящий в состав яда осы *полистескинин* (с. 314) имеет последовательность брадикинина, удлиненную с N-конца.

Структурное совпадение брадикинина плазмы и брадикининов амфибий обнаруживает интересные, но пока неясные генетические связи.

### 2.3.3. Нейропептиды [738—750]

В последние годы интерес исследователей в значительной степени обращен к нейропептидам. Это прежде всего пептиды, образующиеся в нейронах и обладающие сигнальной функцией для других клеток. Важные представители нейропептидов — секреируемые первыми клетками нейрогормоны, попадающие в кровь, а также в спинномозговую жидкость и таким

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 Р, 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 Р, нейротензин, ССК, VIP, гастрин, ангиотензин II, бомбезин, дерморфин, а также пептид, индуцирующий дельта-фазу сна,  $\beta$ -липотропин, нейрофизины, инсулин, карноцин, таурин, триптофилпептид, энкефалины, эйдорфины, экзорфины, киоторфин. 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, нарушенной 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 [ $\text{des-Gly-NH}_2$ ]вазопрессин. Этот пептид, вероятно, образуется из [ $\text{Arg}^8$ ]вазопрессина и проявляет отчетливое действие в teste 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 Органоном аналог Org 2766 (III) обусловливают 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 устраниют искусственно вызванную амнезию (у крыс можно вызвать потерю памяти действием пуромицина 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 Org 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>)<sup>9</sup>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 амнгдалой 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 Р. 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 Р в переносе информации, по-видимому, принимают участие и другие пептиды. При возбуждении пресинаптической клетки трансмиттер выделяется в синаптическую щель, диффундирует от пресинаптической мембранны к мемbrane постсинаптической целевой клетки и вызывает после взаимодействия с высокоспецифическим рецептором электрический сигнал или же подавляет сигнал, вызванный другими нейротрансмиттерами в дру-

гих синапсах той же клетки. Нейроны, синтезирующие пептид-трансмиттер, названы пептидэргическими (например, холинэргические, дофаминэргические и др. нейроны).

Тиреолиберин (разд. 2.3.1.7.1) должен образовываться по большей части вне гипоталамуса мозга крысы, в определенных сепタルных и преоптических областях. Гормон, очевидно, участвует в регуляции активности нервной системы.

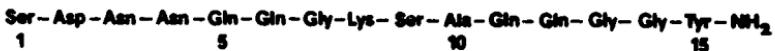
Исходя из ~125 кг (~125 000 особей) тараканов вида *Periplaneta americana*, Браун и сотр. [753, 754] выделили 0,18 мкг пентапептида Arg-Tyr-Leu-Pro-Thr, получившего название «проктолин». Та же лаборатория в 1977 г. подтвердила установленную структуру пептида полным химическим синтезом. Существуют данные, позволяющие предполагать, что это миотропное вещество универсально для насекомых. Проктолин действует как возбуждающий нейротрансмиттер мышц кишечника. Уже при концентрации  $10^{-9}$  моль/л он усиливает моторику кишечника.

Конечно, нельзя не упомянуть, что помимо названных нейропептидов интенсивно исследуются и другие гормоны гипоталамуса, например меланостатин, соматостатин, гонадолиберин и др., оказывающие определенное действие на нервную систему. Более того, в недалеком будущем новые интересные принципы действия пептидов пробудят интерес к ним не только нейробиологов. В 1979 г. Кнолл с сотр. добавил к известным пептидам сатиетин, снижающий потребление пищи крысами.

Во многих случаях при разнообразнейшем действии нейропептидов речь, по-видимому, идет не столько о физиологическом, сколько о фармакологическом эффекте. О функциях и механизме действия нейропептидов в настоящее время существуют противоречивые мнения. Комплексная проблематика пептидной фармакологии [755] представляет собой весьма сложную задачу.

### 2.3.3.1. Пептиды, осуществляющие «перенос памяти» [756—758]

В последние годы большое внимание уделяется биохимическим исследованиям процессов запоминания, протекающих в мозге. Существует мнение, что в накоплении информации принимают участие РНК, белки и, вероятно, пептиды. Г. Унгар высказал гипотезу, что получаемая организмом информация кодируется в аминокислотных последовательностях белков. Мозг крыс, у которых выработана боязнь темноты, был химически переработан, и выделенный действующий фактор ввели нетренированным крысам или мышам. В результате нетренированные животные продемонстрировали несвойственное им поведение — боязнь темноты. Этот первый пептид, осуществляющий «перенос памяти», был назван скотофобином (от греч. scotos — темнота, phobos — боязнь). По данным Парра и Хольцера (1971 г.), он имеет следующую первичную структуру:



Таким образом было найдено первое кодовое слово нейральной кодирующей системы, которая может быть ответственной за накопление информации в центральной нервной системе. Хотя эксперименты Унгара были подтверждены во многих лабораториях, все-таки существует большое сомнение в том, что пентадекапептид действительно хранит информацию о боязни темноты.

Унгар [759] выделил из мозга крыс также пептид *амелетин* Pyr-Ala-Gly-Tyr-Ser-Lys, содержащий, по-видимому, информацию о реакции животного на звуковой сигнал.

И наконец, нужно сказать о *хромодиопсине*, образующемся в мозгу золотых рыбок при вырабатывании рефлекса, связанного с распознаванием цветов.

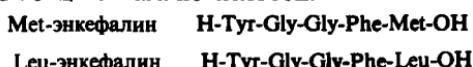


### 2.3.3.2. Эндорфины [742, 760—764]

Название эндорфины объединяет пептиды с морфиноподобным действием, образуемые самим организмом и являющиеся эндогенными лигандами опиатных рецепторов (эндогенные морфины — эндорфины). Кроме того, часто используются названия *опиатные*, или *опиоидные*, пептиды.

Наиболее важным для медицины действием морфина и его полусинтетических и синтетических производных (опиатов) является анальгезия (снятие болевых ощущений). Помимо смягчения болевых ощущений в медицине используется способность опиатов снимать чувство страха. Однако постоянно существует непосредственно связанный с анальгетическим эффектом опасность привыкания к препарату. Модельные исследования позволили установить, что ощущение боли связано с повышением уровня cAMP в соответствующих нервных клетках. Снижение уровня cAMP и одновременное повышение уровня cGMP, возможно, находится в связи с уменьшением боли и одновременным улучшением самочувствия.

В 1975 г. Снайдер [766] и Иверсен [767], основываясь на концепции Гольдштейна [765], провели идентификацию и описали свойства опиатных рецепторов нервной системы, при этом были проведены интенсивные поиски эндогенных лигандов этих рецепторов. После того как в 1975—1976 гг. Терениус и Вальштрем, а также ряд других групп доказали с помощью связывания *in vitro* веществ из головного мозга млекопитающих с опиатными рецепторами фактическое существование эндогенных опиатов, установлено [768, 769] выделение первого эндогенного опиата, получившего название *энкефалин* (*enkephalos* — мозг) [770, 771]. Этот опиат, присутствующий в головном мозге свиньи, оказался смесью двух пенталептидов, различающихся лишь С-концевой аминокислотой:



Немного позже Симантов и Снайдер [772] выделили оба пентапептида из мозга теленка. Соотношение содержания Met-и Leu-энкефалинов в природных источниках различно. Вскоре после установления структуры энкефалинов были опубликованы различные варианты их полных 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 гемоэнцефалический барьер, разделяющий мозг и кровь. Прямыми введением энкефалина в мозг было показано, что, вероятно, из-за его быстрого расщепления протеазами можно наблюдать лишь небольшой эффект.

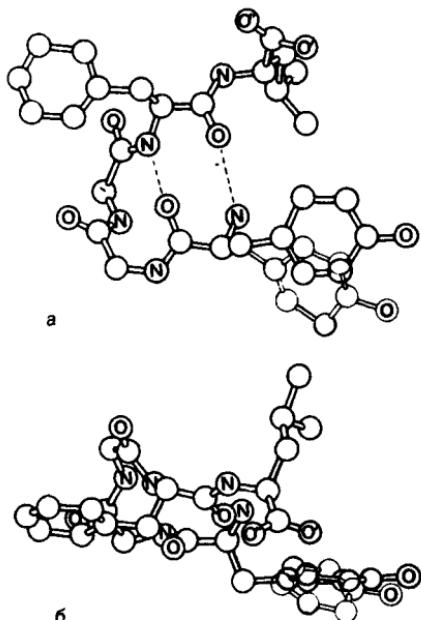
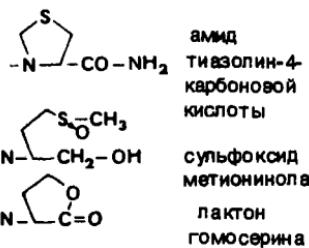
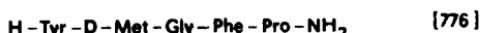


Рис. 2-44. Предлагаемая конформация Leu-энкефалина [774]. *а* и *б* — проекции на разные плоскости одной и той же модели (*б* — проекция на плоскость, перпендикулярную *а*). Тонкими линиями показано второе возможное пространственное расположение боковой цепи тирозина.

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:



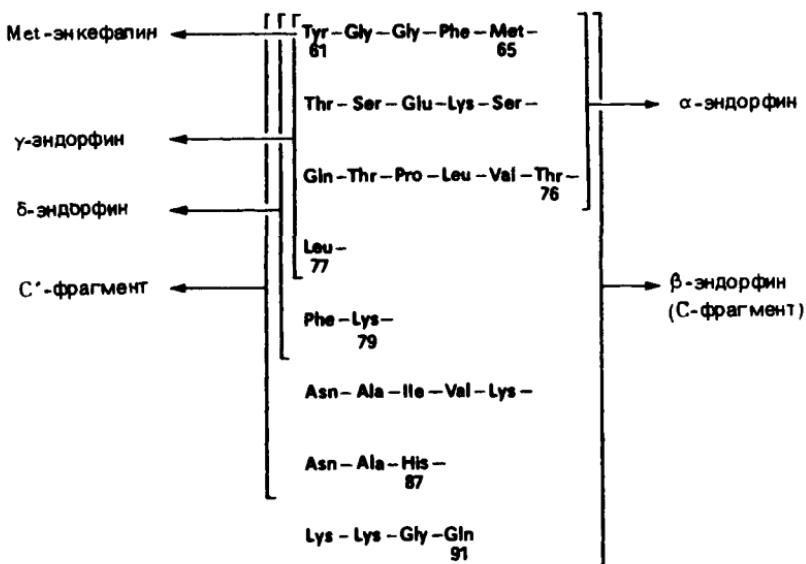
В 1979 г. из гипоталамуса крысы был выделен интересный пептид H-Туг-Агр-ОН, названный *киоторфином* и обладающий, как и его синтетический аналог H-Туг-D-Arg-ОН, в 4—20 раз более сильным действием, чем энкефалин.

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  $\beta$ -цепи казеина теленка, имеющий последовательность Туг-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile, получил название  $\beta$ -казоморфин-7.

Отщеплением двух C-концевых аминокислот с помощью карбоксипептидазы Y получают  $\beta$ -казоморфин-5 Туг-Pro-Phe-Gly, который обладает большей опиатной активностью, чем гептапептид. Пептид Туг-D-Ala-Phe-Pro-Туг-NH<sub>2</sub> — представитель наиболее активных синтетических аналогов. Сильный эффект на освобождение инсулина оказывает  $\beta$ -казоморфин-4, опиатное действие которого крайне низкое.

В связи с тем что последовательность Met-энкефалина совпадает с участком 61—65  $\beta$ -липотропина (разд. 2.3.1.4), следует обратить внимание на другие фрагменты этого пептида. Из гипофиза верблюда Ли и сотр. выделили 31-членный фрагмент  $\beta$ -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  $\beta$ -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]:

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: Tug-Dly-Dly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tug-Pro-Lys. Соответствующий нонапептид без C-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):

Tug-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-			
1	5	10	15
Gln-Lys-Arg-Tug-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Gln-Phe-Lys-Val-Val-Thr			
20	25	30	

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 радиоиммunoанализ. 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 gelationosa 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 (иглоукалывание). Иглоукалывание действительно ведет к повышению содержания эндорфинов в спинномозговой жидкости. Подавление боли с помощью акупунктуры может быть блокировано налоксоном. На возможную взаимосвязь между стрессом и эндорфиновой 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:

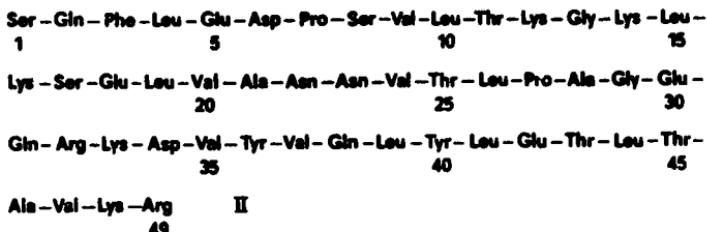


Термин *фагоцитоз* происходит от греч. phagein — поглощать, поедать и kyotos — клетка. Клетки с фагоцитарной способностью в состоянии поглощать ино-родные частицы. В зависимости от размеров фагоцитируемых частиц выделяют макрофаги, способные к эндоцитозу больших частиц, и полиморфонуклеарные лей-коциты, способные поглощать только мелкие частицы. Последние названы Мечни-ковым 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 полиморфонуклеарных 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].

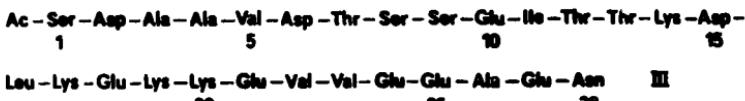
Из экстракта тимуса в последнее время также выделен ряд интересных пептидов [791]. Синтез тимозина  $\alpha_1$  описан в 1979 г. независимо Вангом с сотр., а также Бирром и Штолленверном.

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 тимопоэтином-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, лейкемии 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:

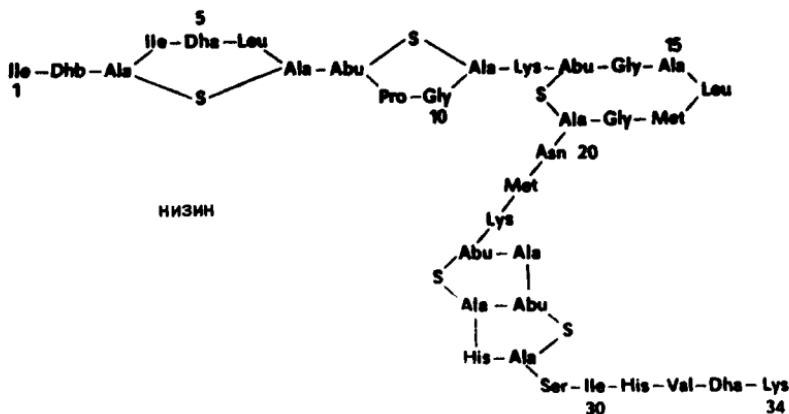


Этот пептид, названный STF (Serum-Thymus-Factor), не имеет какой-либо гомологии с тимопоэтином II и тимозином  $\alpha_1$ , что говорит о том, что он не может быть их метаболитом. Еще окончательно не ясно, имеет ли остаток пироглутамина природное происхождение или он образовался из N-концевого глутамина в процессе выделения. Химический синтез обоих альтернативных нонапептидов [795] привел к продуктам с идентичной активностью как in vivo, так и in vitro. С-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 *грамицидины* А—С, продуцируемый



*Streptococcus lactis* низин и структурно ему подобный субтилин. В молекуле низина помимо дегидроаланина (Dha) и  $\alpha$ -аминодегидромасляной кислоты (Dhb) имеется несколько гетеродетных пентациклических структур, включающих лантионин (Ala-S-Ala) или  $\beta$ -метиллантионин (Abu-S-Ala).

На примере низина и субтилина было показано наличие природных  $\alpha$ , $\beta$ -ненасыщенных аминокислот. Каждый из этих двух антибиотиков содержит два остатка дегидроаланина и один  $\alpha$ -аминодегидромасляной кислоты. Субтилин состоит из 32 аминокислотных остатков и продуцируется *Bacillus subtilis*.

Смесь антибиотиков, выделенная из *Streptomyces carzinostaticus*, помимо трех веществ А, В, С, обладающих антибактериальной активностью, содержит 109-членный линейный полипептид, получивший название неокарциностатин. В противоположность веществу А, имеющему один дисульфидный мостик, в неокарциностатине два мостика. В дозах 0,1—1,6 мг/кг неокарциностатин показывает противоопухолевую активность.

В качестве короткоцепочечного антибиотика можно назвать трипептид L-аргинил-D-аллотреонил-L-фенилаланин, выделенный из культуральной среды гриба *Keratinophyton terreum*, подавляющий, однако, только рост грибов, но не бактерий. Его антибиотическое действие снимается L-гистидином.

Большинство пептидных антибиотиков имеет циклическую структуру, которая может содержать помимо пептидной сложноэфирную и другие виды химических связей. Циклическое строение, а также наличие в молекуле D-аминокислот и других небелковых элементов придает таким антибиотикам высокую устойчивость к протеолитическим ферментам. Часто сложная структура препятствует широкому использованию химического синтеза. Из-за высокой токсичности систематическое применение находят лишь отдельные пептидные антибиотики.

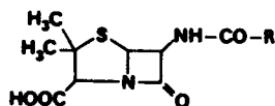
Биосинтез пептидных антибиотиков осуществляется по принципу, отличному от принципа биосинтеза белков на рибосоме. Исследования, впервые предпринятые Липманном [796] на примере бактериального пептидно-

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.

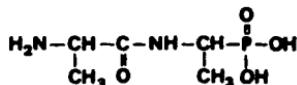
### 2.3.5.1. Пептидные антибиотики, подавляющие биосинтез клеточных стенок бактерий

Помимо цефалоспорина, D-циклосерина, фосфономицина ингибиторным эффектом на рост клеточных стенок бактерий обладают природные и полусинтетические пенициллины, а также пептидные антибиотики бацитрацин, ванкомицин, янисемицин и др. *Пенициллин*, продуцируемый *Penicillium notatum*, включает тиазолиновое кольцо, конденсированное с лактамным кольцом, и меняющийся радикал R:

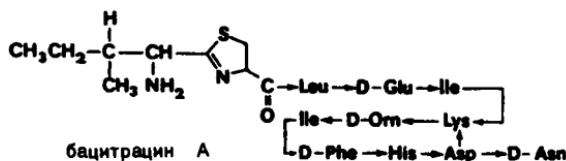


*Пенициллин G*, называемый также бензилпенициллином ( $\text{R} = -\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$ ), очень часто применяют в медицине. Образование его из аминокислот (цистein, валин и др.) дает формальное основание отнести пенициллин к пептидным антибиотикам. Антибиотическая активность пенициллина тесно связана с лабильностью лактамного кольца, в частности с реакционноспособностью 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:



Бациллацины 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, бациллацин 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, ингибитирует 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.

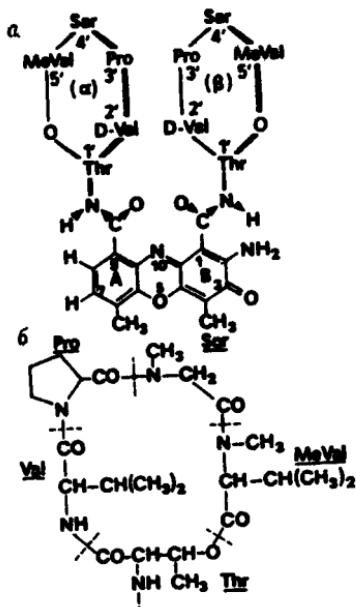


Рис. 2-45. Первичная структура актиномицина С<sub>1</sub>(а) и пентапептидного лактонового кольца (б) [800].

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 вре-

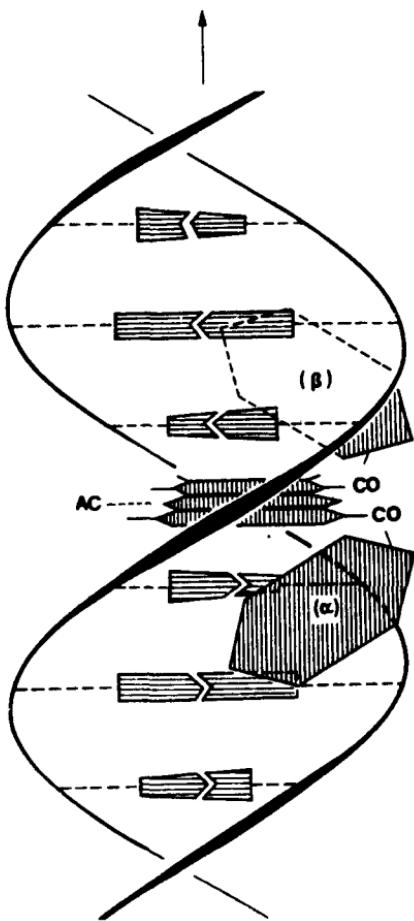


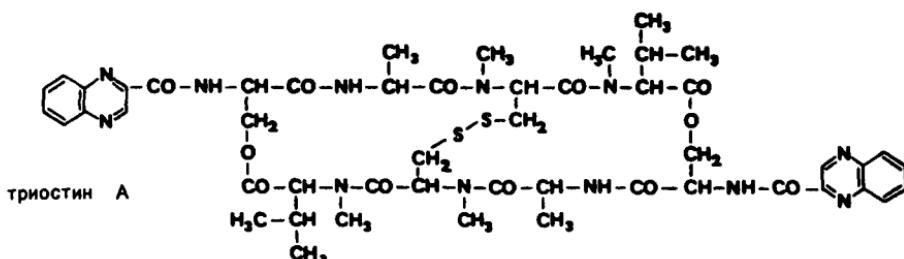
Рис. 2-46. Схема биологического действия актиномицина C<sub>1</sub>[800]. Хромофорный остаток актиномицина (AC) входит между парами G — C звивной спирали ДНК.  $\alpha$  и  $\beta$  — пептидные лактонные кольца.

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).

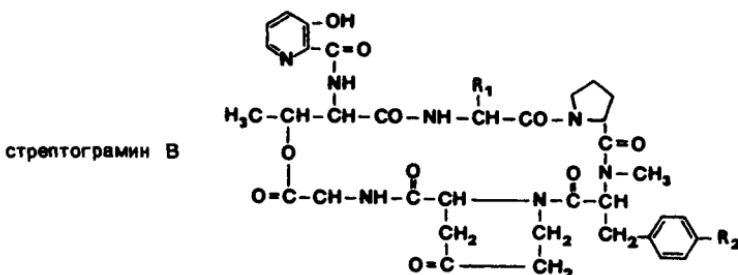
Актиномицины ингибируют рост грамположительных микроорганизмов уже в концентрации <0,1 мкг/мл и, следовательно, обладают пенициллиноподобным действием. Однако их широкое применение лимитирует высокая токсичность. Для мышей летальная доза актиномицина С составляет 0,5—1 мг/кг, доза, переносимая в течение многих дней, — 0,1 мг/кг. Цитостатическое действие актиномицина С позволяет применять его для лечения некоторых редких видов рака (лимфогрануломатоз, хорионкарцинома, 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 пенициллином 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.

Хинокалины [802] обладают интересным спектром активностей, действия как цитостатические, антивирусные и антибактериальные препараты. Антибиотики очень токсичны для млекопитающих. Они продуцируются различными штаммами стрептомицетов. Важнейшие представители — хиномицины и триостинны.

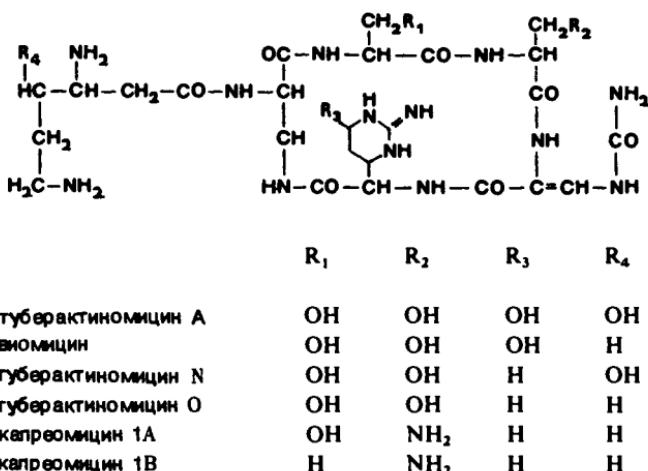


*Стрептограмин В* и *эдеин А* — антибиотики, которые, ингибируя функцию большой или малой субъединицы рибосомы, подавляют биосинтез белка. Это позволило широко использовать их при изучении функционирования рибосомы.



Стрептограмины *пристинацин 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 *туберактиномицины, капреомицин и виомицин* (туберактиномицин В):



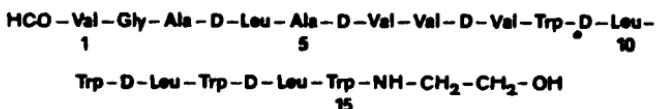
Структура туберактиномицинов была установлена Сибой с сотр. и подтверждена на примере синтеза туберактиномицина О. Та же группа осуществила полный синтез капреомицина.

### 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.

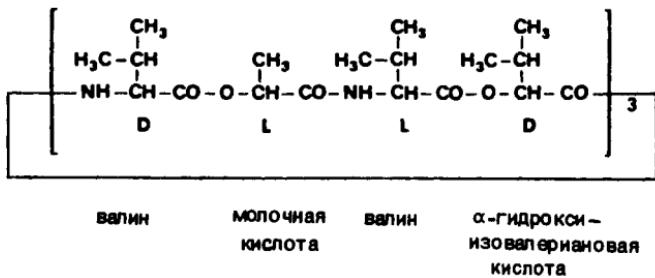
*Ионофоры* индуцируют транспорт ионов через биологические мембранны и искусственные фосфолипидные бислои. Важнейшие представители: грамицидины А — С, валиномицин, эннатин, аламетицин и др.

Продуцируемые *Bacillus brevis* грамицидины А — С — линейные пентадекапептиды с N-концевой формильной и C-концевой  $\beta$ -этаноламидной группами. В зависимости от N-концевой аминокислоты (валин или изолейцин) грамицидины дифференцируются на валинграмицидины А — С и изолейцинграмицидины А — С. От приведенного ниже валинграмицидина А формы В и С отличаются заменой триптофана в положении 11 на фенилаланин и тирозин соответственно:



Примечательно чередующееся расположение L- и D-аминокислот. Грамицидин A обусловливает транспорт ионов  $K^+$ ,  $Na^+$  и других одновалентных ионов через мембранны митохондрий и эритроцитов, а также через синтетические бислои. Грамицидины A—C иногда применяют в медицине, в основном локально, против грамположительных возбудителей болезни.

**Валиномицин** — циклический додекапептид, состоящий из трех одинаковых участков последовательности:



Как и многие другие ионофоры, валиномицин имеет кольцевую структуру и специфически индуцирует транспорт ионов  $K^+$  через биологические и искусственные мембранны. Валиномицин — классический представитель ионофоров и первый пептидный антибиотик с полностью выясненной пространственной структурой (Иванов и сотр., 1969 г.). Ион калия образует комплекс с валиномицином (рис. 2-47) [804].

Гидрофобные боковые остатки придают комплексу  $K^+$ -валиномицину хорошую растворимость в неполярных углеводородных слоях мембран, и, таким образом, становится возможным транспорт ионов  $K^+$  через мембрану. В случае грамицидина А обсуждается возможность образования ионных каналов. Полагают, что линейный пептид образует канальную структуру, проходящую через мембрану, через которую идет поток ионов,

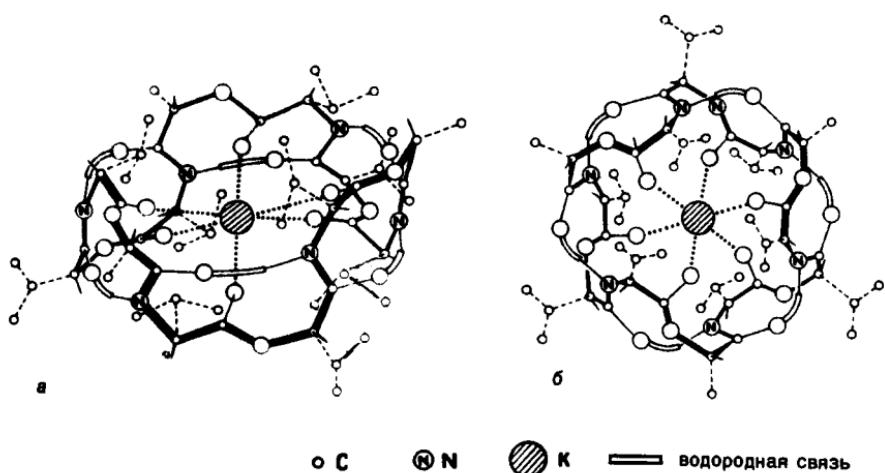
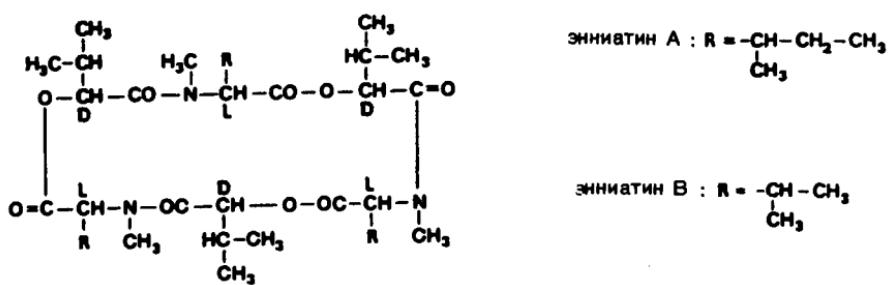


Рис. 2-47. Конформация комплекса валиномицин- $\text{K}^+$  [804]. а — вид сбоку, б — вид вдоль оси симметрии.

причем молекула, образующая канал, не совершают каких-либо движений.

Энниатин — циклический гексадепептид с повторяющейся последовательностью D- $\alpha$ -гидроксивалероил-L-метилизолейцина (энниатин А) или D- $\alpha$ -гидроксивалероил-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 (Hyv = L- $\alpha$ -гидроксиизоловалиновая кислота):



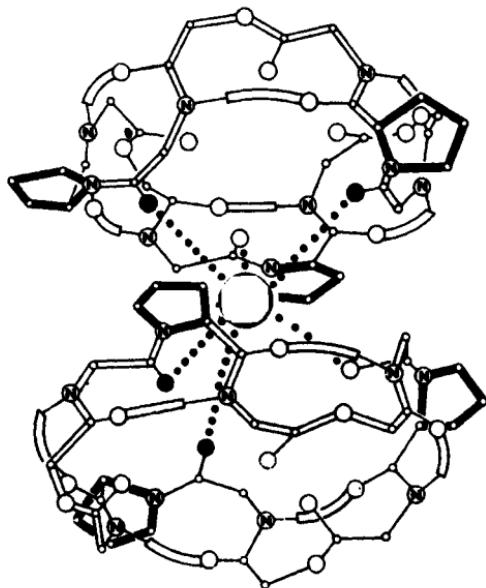


Рис. 2-48. Предполагаемая «сандвичевая» структура одного из аналогов валиномицина [805].

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 эннатина, ~ 100 аналогов валиномицина и провели большую работу по изучению конформаций. Оказалось, что антибактериальные свойства циклодепептидов находятся в тесной взаимосвязи со способностью образовывать комплексы с катионами. Аналоги, не обладающие комплексообразующими свойствами, не оказывают антибактериального действия. Валиномицин, эннатин, антидот антаманил (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 предложенную [805] для ряда валиномицина структуру комплекса в виде сандвича.

Промежуточное положение между ионофорами и второй группой мембраноактивных пептидных антибиотиков занимает аламетицин. Аламетицин вместе с природными аналогами сузукациллином и трихотоксином причисляют к амфи菲尔ным пептидным антибиотикам, которые в липидных мембранных создают флукутирующий, 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.

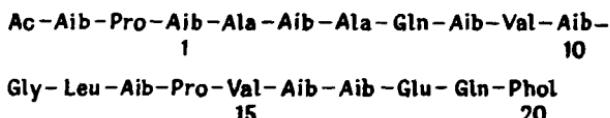


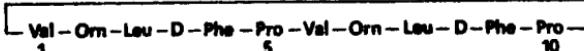
Рис. 2-49. Первичная структура аламетицина. Aib —  $\alpha$ -аминоизомасляная кислота, Phol — фенилаланиол.

Первоначально предполагалось, что аламетицин имеет структуру циклооктадекапептида [807]. В пересмотренной и подтвержденной синтезом первичной структуре (рис. 2-49) остаток N-концевой  $\alpha$ -аминоизомасляной кислоты (Aib) ацетилирован, в то время как на C-конце присутствует остаток фенилаланиола [808].

Наряду с уже упоминавшейся мембраний и антибиотической активностью аламетицина следует также отметить его мембранорастворяющее действие к асцитным клеткам карциномы Эрлиха, а также эритроцитам. Подобно аламетицину на мембранны действуют также его природные аналоги сузукациллин А и трихотоксин А40, которые имеют также значительную гомологию в первичной структуре [809, 810].

Приведенные далее циклические пептиды воздействуют на структуру мембранны, сначала попадая путем адсорбции и проникновения в пористые клеточные стенки и затем взаимодействуя с белковолипидными комплексами, что в свою очередь приводит к разрушению мембранны. Антибактериальная активность грамицидина S и структурно похожего на него тироцидина обусловлена, вероятно, именно свойствами поверхностно-активного вещества.

Грамицидин S впервые выделен в СССР в 1944 г. группой Гаузе и Бражниковой из штамма *Bacillus brevis*. В 1946 г. Синге с сотр. установили его первичную структуру. Молекула состоит из двух идентичных пентапептидов, соединенных между собой и образующих десятичленный цикл. Приведенное ниже строение антибиотика подтверждено Швицером и Зибером [811] полным химическим синтезом:



В 1967 г. Ваки и Идзумия, проводя циклодимеризацию активированного производного пентапептида, помимо грамицидина S получили с 32%-ным выходом циклический пентапептид. Этот полуграмицидин S показал себя биологически неактивным.

Грамицидин S действует только на грамположительные и не влияет на грамотрицательные возбудители. Изучение взаимосвязи структуры и активности показало, что без потери активности можно заменить пролин на глицин или сарказин и орнитин на лизин. Заменяя D-фенилаланин на D-аланин или глицин, получают аналоги со слабым биологическим действи-

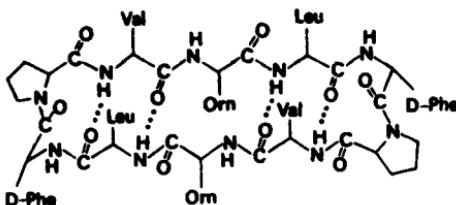


Рис. 2-50. Конформационная модель грамицидина S.

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 )

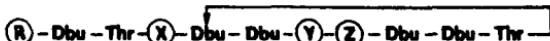
Тироцидины действуют преимущественно на грамположительные возбудители. Смесь тироцидинов используют часто в комбинации с 20% грамицидина для лечения кожных инфекций, а также инфекций полости рта и горла. Тироцидиновый аналог с открытой цепью биологически неактивен, в то время как соответствующий аналог грамицидина сохраняет около 1/12 активности природного вещества.

Полимиксины представляют собой циклические пептиды, содержащие остатки жирных кислот, продуцируемые *Bacillus polytuxa* 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

**циркулины A и B** (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 гекапептид с остатком  $\alpha,\gamma$ -диаминомасляной 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 ((+)-изопеларгоновой) или 6-метилгептановой (изооктановой).

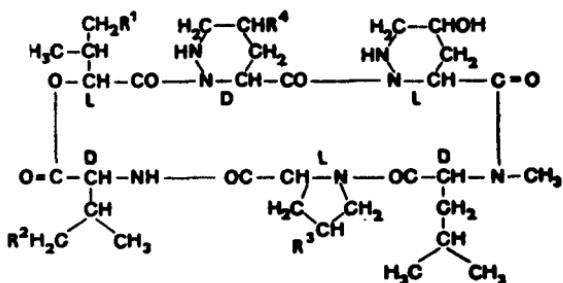
Заслуживает значительного внимания наличие L- $\alpha,\gamma$ -диаминомасляной кислоты (Dbu). Первоначально N-концевому остатку этой кислоты приписывалась D-конфигурация.



Полимиксин	R	X	Y	Z
B <sub>1</sub>	Метилоктanoил-	Dbu	D-Phe	Leu
B <sub>2</sub>	Изооктanoил-	Dbu	D-Phe	Leu
D <sub>1</sub>	Метилоктanoил-	D-Ser	D-Leu	Thr
D <sub>2</sub>	Изооктanoил-	D-Ser	D-Leu	Thr
Колистин A = E <sub>1</sub>	Метилоктanoил-	Dbu	D-Leu	Leu
Колистин B = E <sub>2</sub>	Изооктanoил-	Dbu	D-Leu	Leu
Циркулин A	Метилоктanoил-	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 гекапептидов, 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:



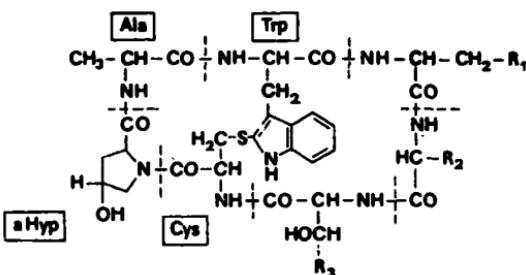
Монамицин	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>
A	H	H	CH <sub>3</sub>	H
B <sub>1</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>	H
B <sub>2</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H	H
B <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	H
C	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H
D <sub>1</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H
D <sub>2</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.

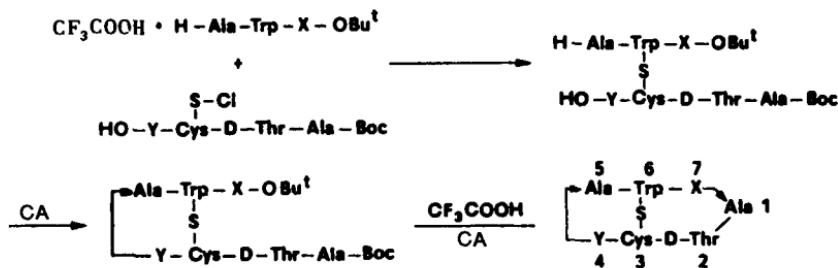
Структура яда бледной поганки (*Amanita phalloides*) установлена, а затем подтверждена синтезом в лаборатории Виланда в 1979 г. [814, 815]. Бледная поганка продуцирует десятки циклических пептидов: ядовитые фаллотоксины ( $LD_{50}$  для мыши  $\sim 2$  мг/кг), в течение нескольких часов разрушающие печень; циклический декапептид *антаманио*, способный быть при своевременном применении антагонистом к фаллоидинам; *аматоксин*, в основном ответственный за ядовитость гриба ( $LD_{50}$  для мыши  $\sim 0,5$  мг/кг).

К фаллотоксинам, в основе структуры которых лежит поперечношитый циклический гептапептид, относятся *фаллоидин*, *фаллон*, *фаллицин* и *фаллацидин*. В то время как первые три представителя ряда отличаются лишь степенью гидроксилирования остатка эритролейцина, фаллацидин имеет на месте D-треонина остаток D-эритро- $\beta$ -гидроксиаспарагиновой кислоты и в соседнем положении остаток валина вместо аланина. В остальном он совпадает со структурой фаллоидинов:

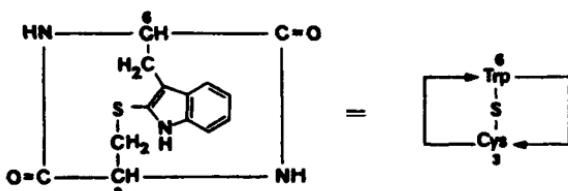


Фаллотоксин	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Фаллоидин	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\   \\ -\text{C}-\text{CH}_3 \\   \\ \text{OH} \end{array}$	$-\text{CH}_3$	$-\text{CH}_3$
Фаллоин	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ -\text{C}-\text{CH}_3 \\   \\ \text{OH} \end{array}$	$-\text{CH}_3$	$-\text{CH}_3$
Фаллицин	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\   \\ -\text{C}-\text{CH}_2-\text{OH} \\   \\ \text{OH} \end{array}$	$-\text{CH}_3$	$-\text{CH}_3$
Фаллоцидин	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\   \\ -\text{C}-\text{CH}_3 \\   \\ \text{OH} \end{array}$	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	$-\text{COOH}$

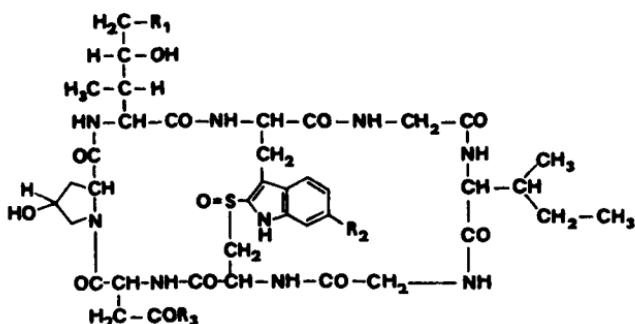
Ядовитость фаллотоксинов связана с циклической гептапептидной структурой, а также с тиоэфирной связью бокового радикала триптигина, соединяющей положение 2 индолевого кольца с остатком цистеина. При выяснении связи между структурой и функцией были синтезированы различные аналоги фаллотоксинов. Виландом 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-актинину.



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  $10^{-8}$  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: свежеотрезанный 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 комплексообразующими свойствами оставалась долгое время неясной. Конформации эквимолярных 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 «сандвичу» (разд. 2.3.5.3), причем предполагается воз-

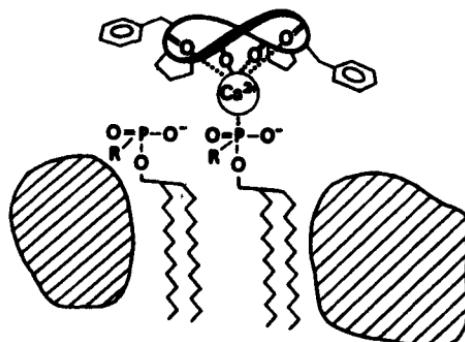
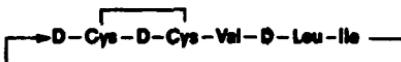


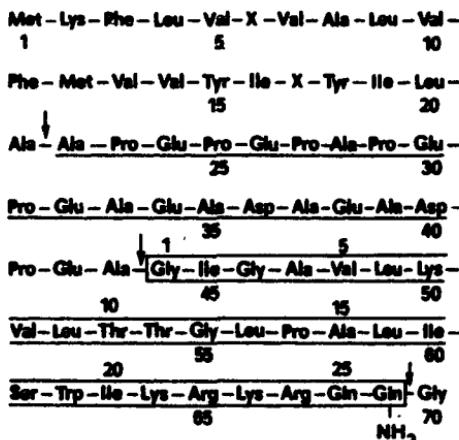
Рис. 2-51. Предполагаемый принцип взаимодействия антаманида с биомемброй [818]. Заштрихованы области белкового компонента мембранны.

можным взаимный переход между комплексами с различной стехиометрией. В отношении антитоксической 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:

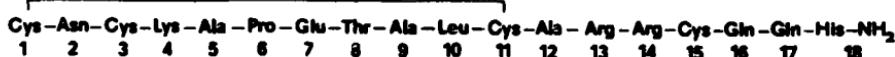


В соответствии с «сигнальной» гипотезой Блобеля препоследовательность 1—21, называемая также сигнальным пептидом, имеет в своей структуре информацию, делающую возможным образование комплекса мРНК и рибосомы с рибосомным рецепторным белком. Благодаря этому последующая цептидная последовательность, синтезированная непосредственно в эндоплазматическом ретикулуме, проходит через мембрану во внутреннее пространство каналцев ретикулума и может таким образом быть секретирована наружу. Сигнальный пептид по окончании синтеза

всего белка отщепляется сигнальной протеазой, локализованной на внутренней части мембраны. Для образования меллитина из промеллитина требуется отщепление C-концевого остатка глицина с одновременным образованием амидной группы и расщепление связи  $\text{Ala}^{43}\text{-Gly}^{44}$ . В противоположность рассмотренному промеллитину пчелиной матки промеллитин рабочих пчел имеет N-концевой проприосток из 6—9 аминокислот, не совпадающий с соответствующим участком 35—43 приведенной выше последовательности препромеллитина.

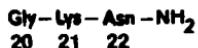
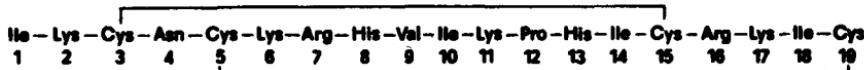
**Меллитин** представляет собой амид гексакозапептида, соответствующий последовательности 44—69 препромеллитина пчелиной матки. Гемолизирующее действие и способность понижать поверхностное натяжение объясняются распределением гидрофобных аминокислотных остатков в N-концевой части и гидрофильностью C-концевой части («инвертирующее мыло на пептидной основе»). Синтез меллитина описан в 1971 г. Любке с сотр.

**Апамин** впервые выделен и очищен в 1965 г. Хаберманом, двумя годами позднее установившим его структуру:



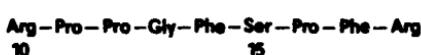
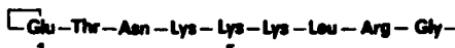
Полный синтез осуществлен в 1975 г. [822, 823]. Апамин — нейротоксический компонент пчелиного яда.

Третим пептидным компонентом яда пчел является пептид, вызывающий дегрануляцию тучных клеток (MCD-пептид) и имеющий следующую последовательность:

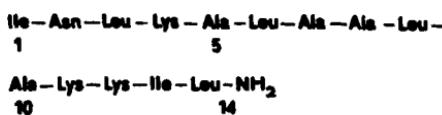


Этот пептид обладает противовоспалительным действием. Лечебное действие пчелиного яда при ревматических заболеваниях объясняется присутствием этого пептида. После успешного синтеза, осуществленного Бирром в 1977 г., новые интереснейшие данные могли бы дать исследование действия пептида на клеточные мембранны тучных клеток, а также исследование противовоспалительного действия при варировании аминокислотной последовательности.

**Яд ось** более беден активными пептидами. Фармакологически кининоподобным действием обладает полистескинин, выделенный из *genus Polistes*. Этот кинин ось представляет собой брадикинин, удлиненный с N-конца на 9 аминокислот:

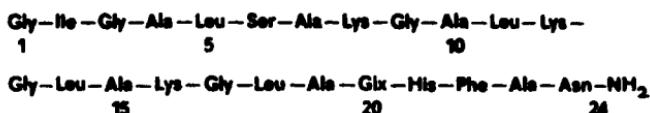


В 1977 г. Накаджима с сотр. [824] из яда *Vespula lewisii* выделил пептид, обладающий дегранулирующим действием на тучные клетки и получивший название *мастопаран*. Его действие подобно действию гранулиберина R (разд. 2.3.2.4), но он имеет явные структурные отличия как от гранулиберина, так и от MCD-пептида:

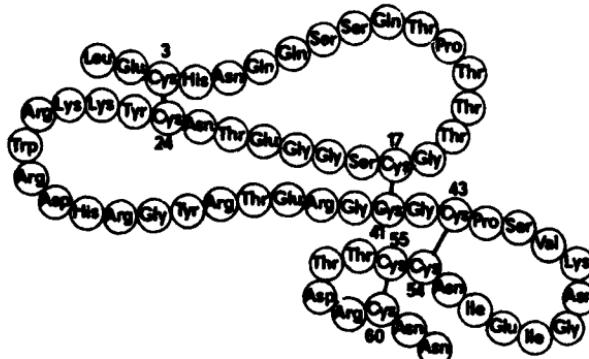


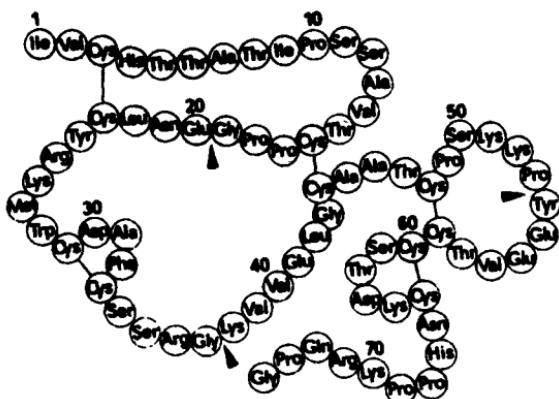
В ядах других ос также найдены подобные пептиды.

Известное структурное сходство с меллитином показывает выделенный из защитного секрета европейской жерлянки (*Bombina*) бомбинин, отличающийся гемолитической активностью:



*Яды у змей* образуются в верхнечелюстных слюнных железах и состоят из сложной смеси высокотоксичных пептидов с антигенным действием, белков, а также ферментов. В то время как токсины вызывают паралич и смерть укушенного животного, определенные ферменты (гигалуронидаза и др.) способствуют проникновению яда и начинают процесс переваривания проглоченной пищи. В соответствии с их действием токсичные пептиды разделяются на *кардиотоксины* (яды, действующие на сердечные мышцы и вызывающие необратимую деполяризацию мембран мышечных и нервных клеток) и *нейротоксины* (нервные яды, блокирующие нервно-мышечную трансмиссию). Лучше всего изучены нейротоксины ядовитых змей, в свою очередь подразделяющиеся на короткоцепочечные полипептидные токсины (60—62 аминокислоты) и длинноцепочечные соединения (71—74 аминокислоты). Кобротоксин, первичная структура которого приведена ниже, синтезирован в 1972 г. на твердой фазе Изумия с сотр.





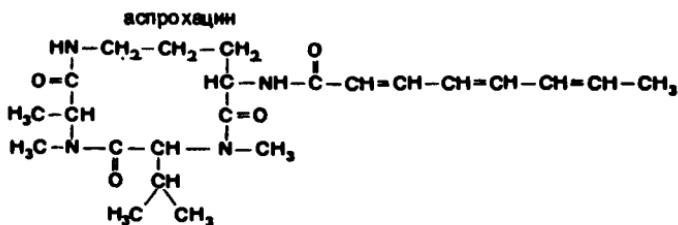
**Рис. 2-52.** Первичная структура  $\alpha$ -бунгаротоксина [825]. Стрелками показано предпринятое для полного синтеза разделение на фрагменты.

В лаборатории Иванова в Институте биоорганической химии им. М. В. Шемякина классическим методом, с использованием принципа максимальной защиты, осуществлялся синтез  $\alpha$ -булгаротоксина — токсина из яда тайванской змеи *Boiga tictinctus*, 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).

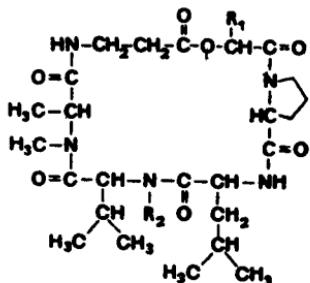
На этом примере стало возможным показать, что полипептид из 70 аминокислотных остатков может быть синтезирован в растворе с максимальной гидрофобной защитой боковых функций [825]. Следующий объект синтеза этой лаборатории — нейротоксин II из яда среднеазиатской кобры *Naja Naja Oxiana*, состоящий из 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:

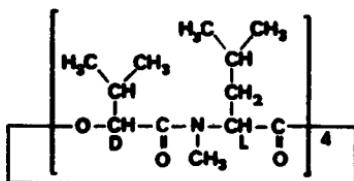


Аспрохацин показывает высокую токсичность для шелковичных червей. В 1970 г. Сузуки и сотр. установил структуры выделенных из культуры *M. anisopliae* и обладающих инсектицидным действием циклических депси-пептидов деструксинов C и D.



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]):



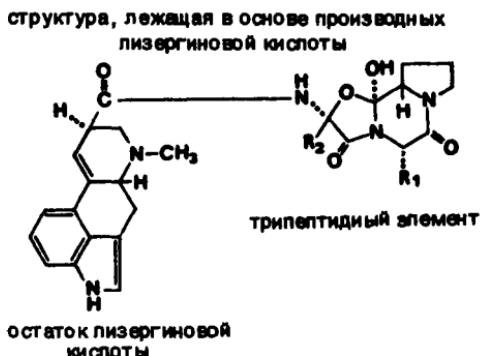
Это циклический депси-пептид, состоящий из двух структурных элементов, N-метиллейцина и α-гидроксизовалериановой кислоты, был получен синтетически. Бассианолид обладает высокой токсичностью для шелковичных червей.

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]

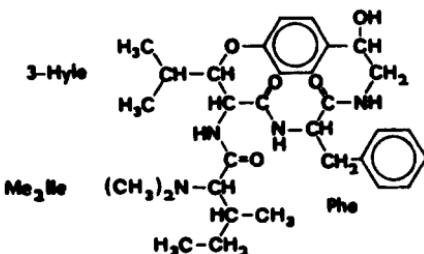
Лизергиновые производные алкалоидов спорыны, например эрготаминового типа, имеют в структуре циклический трипептидный элемент, в образовании которого принимают участие D-пролин, L-лейцин, L-фенилаланин или L-аланин. Соединение с карбоксильной группой осуществляется или через аланин (эрготаминовый тип), или через валин (эрготоксиновый тип):



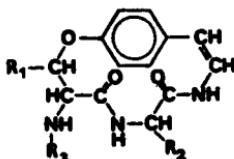
	$R_1$	$R_2$
Эрготамин	$-CH_2-C_6H_5$	$-CH_3$
Эргозин	$-CH_2-CH(CH_3)_2$	$-CH_3$
Эргокристин	$-CH_2-C_6H_5$	$-CH(CH_3)_2$
Эргокриптин	$-CH_2-CH(CH_3)_2$	$-CH(CH_3)_2$

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]. Франгуланин, 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-диметиллизолейцин ( $Me_2Ile$ ) и 3-гидроксилейцин (3-Hyle). *Франгуланин* и приведенные далее родственные ему пептидные антибиотики структурно происходят из пандамина, алкалоида из *Panda oleosa*.



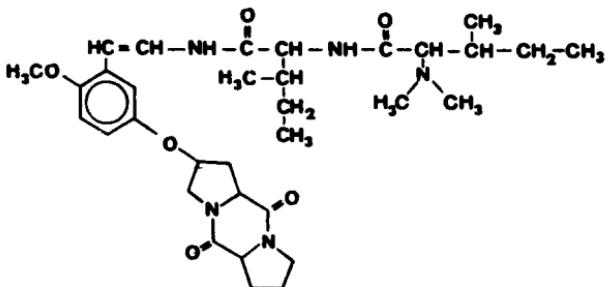
Помимо N-диметилизолейцина, 3-гидроксилейцина и фенилаланина пандамин содержит небелковый компонент — производное 1-амино-2-гидроксиэтилбензола. В франгуланине и других алкалоидах этой группы на месте гидроксиэтанового мостика находится этиеновая группа:

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-алкоксицистиириламинный остаток. При установлении структуры особенно эффективной была масс-спектрометрия.

**Зизифин** (Збирайл 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. *Schwizer 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.*, Giros 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 Polypeptides, Plenum Press, New York, London, 1973.
23. *Greenstein J. P.*, Winitz M., Chemistry of Amino Acids, Vol.2, Wiley, New York, 1961.
24. *Bodansky M.*, Klausner Y. S., Ondetti M. A., Peptide synthesis, Wiley, New York, 1976.
25. *Lübbe 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. *Lübbe 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'Universite 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, III., 1979.
53. Материалы японских пептидных симпозиумов 1963-1975 гг. публиковались 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. *Medzihradsky K., Medzihradsky-Schweiger H., Acta Chem. Acad. Sci. Hung.*, **44**, 15 (1965).
61. *Sifferd R. H., du Vigneaud V., J. Biol. Chem.*, **108**, 753 (1935).
62. *Wünsch 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. Sov. Japan, **46**, 1269 (1973).
77. *Позднеев В. Ф.* — ХПС, **6**, 764 (1974).
78. *Moroader 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. *Meienhofer 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.
- 92а. *Мархинин Е. К., Подклетнов Н. Е.* — ДАН СССР, **1977**, **235**, с. 1203.
93. *Wünsch E., Spangenberg R.*, Chem. Ber., **104**, 2427 (1971).
94. *Eckert H. et al.*, Angew. Chem., **90**, 338 (1978).
95. *Veber D. F. et al.*, J. Org. Chem., **42**, 3286 (1977).
96. *Sakakibara S. et al.*, Bull. Chem. Soc. Japan, **38**, 1522 (1965).
97. *Haas W. L. et al.*, J. Am. Chem. Soc., **88**, 1988 (1966).
98. *Jäger G., Geiger R.*, см. [42], с. 78.
99. *Sieber P., Iselin B.*, Helv. Chim. Acta, **51**, 622 (1968).
100. *Stevenson D., Young G. T.*, Chem. Commun., **1967**, 900.
101. *McKay F. C., Albertson N. F.*, J. Am. Chem. Soc., **79**, 4686 (1957).
102. *Matsueda G. R., Stewart J. M.*, см. [50], с. 333.
103. *Kemp D. S. et al.*, Tetrahedron Letters, **1975**, 4625.
104. *Tun-Kyi A., Schwyzer R.*, Helv. Chim. Acta, **59**, 1642 (1976).
105. *Goerdeler J., Holst A.*, Angew. Chem., **71**, 775 (1959).
106. *Zervas L. et al.*, J. Am. Chem. Soc., **85**, 3660 (1963).
107. *Schönheimer R.*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **154**, 203 (1926).
108. *Du Vigneaud V., Behrens O. K.*, J. Biol. Chem., **117**, 27 (1937).
109. *Nesvadba H., Roth H.*, Mh. Chem., **98**, 1432 (1967).
110. *Horner L., Neumann H.*, Chem. Ber., **98**, 1715 (1965).
111. *Weygang F., Czendes E.*, Angew. Chem., **64**, 136 (1952).
112. *Hillmann A., Hillmann G.*, Z. Naturforschg., **6b**, 340 (1951).
113. *Waley S. G.*, Chem. Ind., **1953**, 107.
114. *Scoffone E. et al.*, Tetrahedron Letters, **1965**, 605.
115. *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. Fruton 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. Мумин Ю. В., Надеждина Й. Б. — ЖХХ, **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. Guttmann 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.*, cm. [46], c. 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. Naturforschg., **22b**, 607.
188. *Izumiya N. et al.*, cm. [49], c. 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.*, cm. [46], c. 105.
199. *Birkhofer L. et al.*, Chem. Ber., **94**, 1263 (1961).
200. *Pojer P. M., Anyal 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.
- 223а. Chmiak A., Pastuszak 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. Medzihradzky K., Medzihradzky-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, **53**, 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. Boissonnais 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., Denkewalter R. G., *Naturwiss.*, **57**, 145 (1970).
256. Iwakura Y., *Biopolymers*, **9**, 1419 (1970).
257. Wieland T. et al., *Annalen*, **573**, 99 (1951).
258. Schwyzer 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., Jeschke H., Kupryszecki G., Roczn. 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., Neuberger 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. Шелых Г. И., Власов Г. П., Митин Ю. В. — ЖХХ, **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., Zapovedalova 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 Kyokaishi, **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. *Мартишек 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. *Benoitou 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. *Bodansky 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. *Benoitou 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., Ellenbroek 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. *Laffet 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. *Anfinsen 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], c. 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. Matl. 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. Treagor 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], c. 269.
464. Yamashiro D., Li C. H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**, 883 (1973).
465. Colescott R. L. et al., см. [50], c. 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], c. 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], c. 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], c. 433.
487. Mutter M. et al., см. [46], c. 239.

488. Fridkin M. et al., J. Am. Chem. Soc., **87**, 4646 (1965).
489. Flanigan E., Marshall G. R., Tetrahedron Letters, **1970**, 2403.
490. Schwyzer R., Sieber P., Helv. Chim. Acta, **41**, 2186, 2190, 2199 (1958).
491. Schwyzer 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., 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 Sulphydryl 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. Schwyzer 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. Schwyzer R., Tun-Kyi A., Helv. Chim. Acta, **45**, 859 (1962).
507. Ivanov V. T. et al., см. [37], с. 337.
508. Шемякин 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. Maturforschg.*, **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., Krolikiewicz 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., Petzig 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. *Schwyzer 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. Naturforschg.*, **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. Benson, 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., Fövenyi J., Polypeptide Hormones, Akadémiai 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. Chrétien 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. Nakaknishi 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., Sieversson 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. Schwyzer R., Eberle A., *Front. Hormone Res.*, **4**, 18 (1977).
615. Eberle A., Schwyzer 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. Plíška 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., cm. [43], c. 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. Voleter, 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. Séances 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. Goodmap R. H. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5869 (1980).
662. Rivier J. et al., см. [50], c. 863.
663. Veber D., см. [52], c. 409.
664. Rivier J., *Int. Symp. on Somatostatin, Freiburg, Abstr.*; 1977; *Diabetes*, **26**, Suppl. 1, 360.
665. Garsky V. M. et al., см. [52], c. 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], c. 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. Skrabaneck 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, Kalidin 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. Ersparmer 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., Falcomerri Ersparmer 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, Angeluci 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 Analoques, *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 Riezen 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 Riezen 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., Cuatrecases 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., Meienhofer J. (Eds.), Pierce Chemical Comp., Rockford, Ill., 1979.
810. *Boheim G. et al.*, *Biochem. Biophys. Acta*, **507**, 485 (1978).
811. *Schwyzer 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. Pharmakol., **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 Rietshoten 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).

### 3. Белки

#### 3.1. Значение. Исторический аспект

Белки — высокомолекулярные соединения, полностью или большей частью построенные из аминокислот и составляющие большую часть органических веществ, содержащихся в живой клетке. Например, клетка кишечной палочки *Escherichia coli* содержит 3000 различных белков, а человеческий организм ~1000000. Молекулы белков состоят из одной или нескольких полипептидных цепей, организованных в характерную трехмерную структуру. Индивидуальные белки имеют определенный химический состав. Их молекулярные массы охватывают интервал от 6000 до более миллиона.

Обмен веществ, структура и функция каждой клетки в решающей степени определяются белками. Химические реакции в клетке, которые *in vitro* протекали бы исключительно медленно, ускоряются особыми каталитическими белками, ферментами, в сотни тысяч раз. Само собой разумеется, что при этом подвергается влиянию не состояние равновесия реакции, а скорость его наступления. Другие белки выполняют внешние или внутренние защитные функции.

Структурные и каркасные белки — важные элементы защитных и соединительных тканей; иммуноглобулины играют решающую роль в иммунной системе организма, фибриноген и тромбин действуют как факторы свертывания крови. Особые белки принимают участие в построении мембран и тем самым ответственны за отделение клетки от внешней среды и разделение внутриклеточного пространства. Белки-переносчики осуществляют, например, электронный перенос при дыхании и фотосинтезе, в других случаях они транспортируют продукты обмена веществ. Кислород в крови переносится гемоглобином, железо — трансферрином, медь — церулоплазмином и жирные кислоты — альбуминами плазмы. Резервные белки, такие, как альбумин яичного белка или казеин молока, образуют запас аминокислот для растущего эмбриона. Ферритин — «кладовая» железа в селезенке, глиадин (из пшеницы), цеин (из манса) и туберин (из картофеля) — известные растительные резервные белки. Сократительные белки актин и миозин действуют совместно в двигательном процессе мышечных клеток (мышечное сокращение). Рецепторные белки, например cAMP-рецепторный белок, способствуют специальному связыванию активного вещества в соответствующем месте. Белки с антивирусными свойствами, интерфероны, образуются после первичной вирусной инфекции организма и подавляют дальнейшее размножение вирусов. Часть растворимых глобулярных белков служит для поддержания осмотического давления.

Ряд белков относится к гормонам (разд. 2.3.1). Токсические белки, токсины, образуются микроорганизмами, но распространены также в животном и растительном мире. Этот подбор вполне достаточен для того, чтобы иметь первое представление о центральной роли класса веществ, называемого белками.

Принцип построения белков определен генетическим материалом клетки. Информация, содержащаяся в ДНК, определяет число и последовательность аминокислот в образующейся в процессе биосинтеза полипептидной цепи. После отделения от рибосомы спонтанно образуется структура, необходимая для выполнения определенной биологической функций. Установление этой биологически активной белковой структуры необходимо для понимания процессов жизнедеятельности, протекающих на молекулярном уровне.

Наряду с жирами и углеводами белки — основная составная часть пищи человека. В индустриальных странах главным источником пищевых белков являются продукты животного происхождения, в то время как в развивающихся странах в пище преобладают биологически неполнценные растительные белки. Для удовлетворения потребности постоянно растущего населения помимо увеличения производства животных и растительных продуктов, выведения сортов зерновых с повышенным содержанием недостающих аминокислот и повышения ценности биологически неполнценных растительных белков добавлением синтетических аминокислот все большее значение приобретает дальнейшее развитие микробиологических процессов получения белков одноклеточных микроорганизмов [10 — 15]. Микробиологические процессы основаны на способности определенных микроорганизмов использовать в обмене веществ в качестве источника углерода такие вещества, как углеводороды нефти, спирты или сырье, содержащее углеводы (крахмал, меласса, целлюлоза). Обзор важнейших процессов дан в табл. 3-1.

**Таблица 3-1. Микробиологическое производство белков одноклеточных [10]**

Источник углерода	Источник азота	Микроорганизм	Выход, кг продукта/кг субстрата
n-Алканы	Аммиак, соли аммония	Дрожжи <i>Candida lipolytica</i>	1,0
Этанол		<i>Saccharomyces</i>	0,66
Углеводы		<i>Torula</i>	0,5
Целлюлоза	Аммиак, соли аммония	Бактерии <i>Trichoderma viridis</i> <i>Methylococcus</i> <i>Methylomonas</i>	0,5 1,0 0,5
Углекислый газ	Нитраты, мочевина	Водоросли <i>Chlorella</i>	0,01*

\* Выход рассчитан как соотношение энергии света к энергии, содержащейся в биомассе.

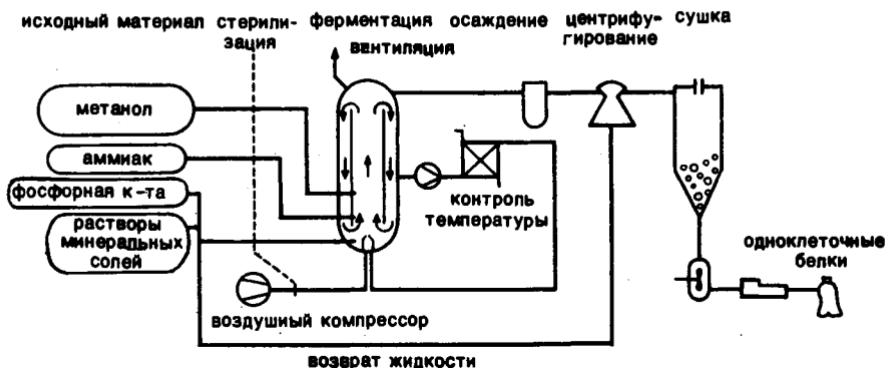


Рис. 3-1. Микробиологический процесс синтеза белка на основе метанола.

Преимущества микробиологического процесса заключается в быстром получении биомассы с высоким содержанием белков хорошего качества и в независимости процесса производства от климата и времени года. Лишь белки водорослей более целесообразно производить в местах с постоянной и интенсивной солнечной радиацией.

В настоящее время промышленные установки на основе метанола и нефти с производительностью до 100 000 т биомассы в год работают в СССР, Италии, Англии и Японии [16]. В ГДР сооружена установка с производительностью 55 000 т/год (производство фермозина), использующая в качестве сырья фракции дизельного топлива.

На рис. 3-1 приведена схема микробиологического процесса на основе метанола.

Белки микробного происхождения в настоящее время применяются вместо сои и рыбной муки прежде всего как корм в животноводстве (при выкармливании птицы, свиней, для подкормки рыбы), причем текстура, окраска и вкус таких кормов могут меняться в соответствии с привычками животных. Для непосредственного питания человека белки микробного происхождения пока еще не применяются. Состав биомасс, полученных в различных процессах, приведен в табл. 3-2.

Применяемая до сих пор лишь в незначительном объеме целлюлоза в будущем станет основным сырьем для микробиологического синтеза белка. Подходящие для этого бактериальные штаммы изучаются. Оптимизацией условий ферментации (марганец в качестве микроэлемента) была достигнута степень превращения до 60%. Из 1 кг соломы получают, например, 250 — 300 г биомассы.

Прямое использование зеленой массы растений, особенно белков, содержащихся в зеленых листьях, является дальнейшей возможностью для устранения нехватки белков. В листьях белки составляют ~ 30% сухой массы и могут быть экстрагированы с 50 — 60%-ным выходом. Животные, поедая листья, используют белки лишь на ~ 18%. По биологической ценности белки листьев сравнимы с белками соевых бобов.

Еще в 1784 г. было высказано мнение, что белки образуют самостоятельный класс веществ. Дальнейшее уточнение понятия приписывают Мальдеру, предложившему называть белки (1839 г.) *протеинами* (от греческого

Таблица 3-2. Состав биомассы различных микробиологических продуцентов белка [10]

Компоненты биомассы	Состав биомассы, %						
	Дрожжи (алкановые)	Метанольные бактерии		Грибы	Водоросли	Соевая мука	Сухое молоко
		фирма ICI	фирма Hoechst				
Суммарный белок	60	89	91	31,7	72,6	45	34
Жиры	9	9,5	0,5	4,9	7,3	1,8	1
Нуклеиновые кислоты	5	15	1				
Минеральные вещества	6	9,5	3,5	2	4,7	6	8
Аминокислоты	54	65	102			40	
Вода	4,5	2,8	4,0	13,5	3,6	12	5

protos — первый, первичный). (Сам термин «протеины» был введен еще Берцелиусом.) После первых попыток Кюна установить строение белков ферментативными методами Косселью на рубеже XX века удалось выделить целый ряд белковых веществ. Примерно в то же время Хоффмайстер и Фишер установили принцип химического построения белков, затем подтвержденный последним с помощью целенаправленного химического синтеза [17 — 19].

Первым белком, полученным в кристаллическом состоянии, стал яичный альбумин. В 1925 г. Абель осуществил кристаллизацию инсулина, а 10 годами позднее Зумнер описал кристаллизацию уреазы. Вирус табачной мозаики получен в кристаллическом состоянии в 1935 г.

В период между 1925 — 1930 гг. Сведберг с помощью ультрацентрифугирования произвел определение молекулярных масс различных белков. Одновременно применение других аналитических методов, как, например, электрофореза и различных видов хроматографии, привело к развитию аналитической белковой химии. В 1951 — 1956 гг. Сенгер [20, 21] установил аминокислотную последовательность инсулина. Использованные при этом методы легли в основу систематического определения первичной структуры многих белков. Созданный Эдманом в 1966 г. секвенатор и применение масс-спектрометрии в сочетании с ЭВМ как средством регистрации, обработки и оценки масс-спектрометрических данных привели к тому, что к настоящему времени опубликовано более 15 000 работ, посвященных определению аминокислотных последовательностей, и установлены первичные структуры более чем для 1000 белков.

После 1945 г. началось систематическое исследование пространственной структуры белков. Основываясь на работах по белковым конформациям

Полинга и Кори, Кендрю и Перутц с помощью рентгеноструктурного анализа монокристаллов установили пространственные структуры миоглобина и гемоглобина, продемонстрировав этим возможность, основываясь на полученных *in vitro* структурных данных, делать выводы о механизме биологической активности белков *in vivo*. На примере первой установленной пространственной структуры фермента лизоцима описаны на молекулярном уровне процессы связывания и расщепления субстрата.

В 1969 г. Меррифилд сделал попытку осуществить химический синтез фермента рибонуклеазы.

### 3.2. Классификация белков

Из множества белков, существующих в живых организмах, первичные структуры в настоящее время известны лишь для некоторых. Пока не представляется возможным систематически классифицировать белки по структурно-функциональным параметрам. Используются различные принципы классификации, часто перекрещивающиеся и во многих отношениях несовершенные.

Взяв за основу происхождение организма, различают растительные, животные, вирусные и бактериальные белки, в то же время учитывая органы и клеточные органеллы — белки плазмы, мышечные белки, белки молока, яиц, рибосомные белки, белки клеточного ядра, микросом и мембран.

По общим биологическим функциям можно подразделить белки на ферменты, структурные, транспортные, резервные и рецепторные белки.

На различии в растворимости и строении молекулы основано подразделение белков на глобулярные и фибриллярные.

*Глобулярные белки* растворимы в воде и разбавленных солевых растворах и обладают шарообразной формой молекулы (эллипсоид вращения). Компактная структура возникает при определенном сворачивании полипептидной цепи; в основе такой структуры, по существу, лежит гидрофобное взаимодействие неполярных боковых цепей аминокислот. Помимо этого во взаимодействии отдельных участков цепи играют роль водородные связи и в некоторой степени ионные связи. Хорошая растворимость глобулярных белков объясняется локализацией на поверхности глобулы заряженных аминокислотных остатков, которые, окружая себя гидратной оболочкой, обеспечивают хороший контакт с растворителем. К глобулярным белкам относятся все ферменты и, за исключением структурных, большинство других биологически активных белков.

Со времени зарождения белковой химии принято деление глобулярных белков на альбумины, глобулины, гистоны, проламины, протамины, гутелины. Оно основано на более или менее выраженных различиях в растворимости, распределении зарядов и аминокислотном составе отдельных белков.

*Альбумины* хорошо кристаллизуются, растворимы в воде в интервале pH 4 — 8,5, осаждаются 70 — 100%-ным (от насыщения) раствором сульфа-

та аммония. Широко распространенные полифункциональные глобулины более высокомолекулярны, чем альбумины, труднее растворимы в воде с типичным минимумом растворимости в изоэлектрической точке, растворимы в солевых растворах и чаще всего содержат углеводную часть.

*Гистоны* — низкомолекулярные основные, из-за высокого содержания лизина и аргинина, белки. Растворимы в воде и кислотах, как, впрочем, и сильноосновные *протамины*, содержащие до 85% аргинина. Гистоны и протамины образуют устойчивые ассоциаты с нуклеиновыми кислотами и выступают в качестве регуляторных и репрессорных белков (нуклеопротеины).

Признаком *проламинов* является высокое содержание глутаминовой кислоты (30 — 45%) и пролина (15%). Они нерастворимы в воде, но растворяются в 50 — 90%-ном этаноле. Вместе с содержащими глутаминовую кислоту (до 45%) глутелинами они чаще всего встречаются в белках зерна.

*Фибрillярные белки* практически нерастворимы в воде и солевых растворах, обладают волокнистой структурой. Полипептидные цепи, расположенные параллельно одна другой в форме длинных волокон, образуют структурные элементы соединительных тканей. Важнейшие представители этой группы структурных белков — коллагены, кератины и эластины (разд. 3.8.3).

От обычных белков, состоящих исключительно из протеиногенных аминокислот, следует отличать сложные белки, называемые также *конъюгированными белками* или *протеидами*. Это вещества, содержащие помимо белковой части небелковый органический или неорганический компонент, необходимый для функционирования, могущий быть связанным с полипептидной цепью ковалентно, гетерополярно или координационно и вместе с аминокислотами присутствующий в гидролизате. Важнейшие представители сложных белков: гликопroteины (простетическая группа — нейтральные сахара (галактоза, манноза, фукоза), аминосахара (*N*-ацетилглюкозамин, *N*-ацетилгалактозамин) или кислые производные моносахаридов (уроновые или сиаловые кислоты)); липопротеины, содержащие триглицериды, фосфолипиды и холестерин, металлоконформации с ионом металла, связанный ионной или координационной связью, фосфопротеины, связанные эфирной связью через остаток серина или треонина с фосфорной кислотой, нуклеопротеины, ассоциирующиеся с нуклеиновыми кислотами в рибосомах или вирусах, а также хромопротеины, содержащие в качестве простетической группы окрашенный компонент. Обзор структур важнейших белков см. в разд. 3.8.

### 3.3. Выделение и очистка [22—25]

Выделение нерастворимых фибрillярных белков не сопряжено с особыми трудностями, в то же время очистка индивидуальных глобулярных белков из животных или растительных тканей, бактериальных культур и клеточных суспензий сильно затруднена одновременным присутствием в растворе многих других белков, углеводов, нуклеиновых кислот, липидов и других

биомолекул. К этому добавляется чувствительность белка к протеолитическим ферментам, влияние температуры и других факторов, вызывающих денатурацию. Лишь в исключительных случаях, например при выделении гемоглобина из эритроцитов, казеина из молока или альбумина из яичного белка, белковая часть превосходит в количественном отношении остальные компоненты настолько, что уже обычное осаждение приводит к относительно чистому продукту. В других случаях требуются сложные многостадийные операции очистки, которые на каждой стадии необходимо контролировать с помощью аналитических или биологических тестов.

На первой стадии разрушают биологический материал. Обычно начинают с разрезания и затем механического размельчения в гомогенизаторе. Для разрыва клеточных стенок используются различные методы: обработка ультразвуком, встряхивание со стеклянными шариками, растирание замороженного материала в ступке, осмотический шок, осмотический лизис дистиллированной водой, обработка поверхностно-активными веществами или воздействие протеазами. Нежелательные составные части клеток могут быть отделены центрифугированием, нуклеиновые кислоты отделяют осаждением протаминсульфатом, углеводы — электрофорезом, липиды — низкотемпературной экстракцией органическими растворителями.

При выделении желаемого белка обычно сначала экстракцией водой или разбавленным солевым раствором получают обогащенную белковую фракцию. Собственно, процесс разделения может основываться на различной (в определенных условиях) растворимости, различном размере, различном электрическом заряде или различных адсорбционных свойствах молекул белков, а также на различной биологической активности. К выделению индивидуального белка может привести также взаимодействие с комплексообразующими веществами, например альбуминами, альгинатами, пектинами [26].

Разработанные к настоящему времени методы разделения исключительно эффективны, однако лишь их комбинированное применение приводит к получению белков, удовлетворяющих необходимым критериям чистоты.

*Разделение на основе различной растворимости* относится к наиболее старым методам выделения и очистки белков. При изоэлектрическом осаждении разделение достигается благодаря минимальной растворимости глобулярного белка в изоэлектрической точке (ИЭТ). Следует обратить внимание, что ИЭТ белков помимо прочего зависит от ионной силы раствора. ИЭТ некоторых белков приведены в табл. 3-6.

Для разделения белков на фракции можно использовать *метод высыпивания* NaCl, KCl, NH<sub>4</sub>Cl и особенно (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; последний предпочтителен, так как создает высокую ионную силу раствора и очень хорошо растворим в воде (при 0°C 709,6 г/л). Растворимость отдельных белков помимо прочего зависит от их заряда. Механизм высыпающего действия солей при осаждении белка рассмотрен в разд. 3.5.2.

Разделение белковой смеси возможно при добавлении смешивающихся с водой органических растворителей, таких, как этанол или ацетон (*фракционирование растворителем*), что ведет к снижению диэлектрической проницаемости системы. В результате снижаются гидратация и растворимость белка и при достаточно высокой

Таблица 3-3. Важнейшие методы разделения белков

Метод	Свойство, положенное в основу метода
Осаждение (изоэлектрическое осаждение, осаждение растворителем, осаждение солями)	Различная растворимость
Противоточное распределение	То же
Распределительная хроматография	" "
Диализ и ультрафильтрация	Различный размер молекул
Центрифугирование	Размер и форма молекул; плотность белковой массы
Гель-хроматография (гель-фильтрация, гель-проникающая хроматография)	Размер и форма молекул
Электрофорез (электрофорез без носителя, электрофорез на носителе: гель-электрофорез, диск-электрофорез, изоэлектрическое фокусирование, изотахоэлектрофорез, иммуноэлектрофорез <sup>a</sup> )	Различный заряд частиц
Ионообменная хроматография	То же
Аффинная хроматография	Биоселективное взаимодействие белок—лиганд

<sup>a</sup> Наряду с зарядом используется различная биоспецифичность.

концентрации органического растворителя происходит осаждение белковой фракции. При низких температурах (0 — 10° С) фракционирование растворителем, как и осаждение высаливанием, протекает без денатурации. Применение органических растворителей для осаждения белков имеет преимущество, так как после осаждения белков нет необходимости избавляться от солей. Фракционирование растворителем было разработано [27, 28] специально для разделения белков плазмы, но позднее применено в процессах разделения других белков. На рис. 3-2 приведена схема разделения белков плазмы с использованием изменения pH и концентрации органического растворителя (фракционирование по концентрации).

Другим методом очистки белков, основанным на различии в растворимости, является *противоточное распределение* по Крейту [29, 30]. Сегодня оно осуществляется с помощью полностью автоматических установок, позволяющих проводить распределение разделяемых компонентов при многих тысячах ступеней переноса. Состояние равновесия при каждом распределении между двумя фазами описывается законом распределения Нернста. При разделении двух веществ эффект разделения будет тем выше, чем больше фактор переноса  $\beta$ , равный соотношению коэффициентов распределения  $K_1$  и  $K_2$ .

Противоточное распределение зарекомендовало себя при очистке пептидных веществ и промежуточных продуктов синтеза пептидов. Наиболее часто применяют следующие системы растворителей: бутанол — уксусная кислота, трихлоруксусная кислота — толуолсульфокислота, хлороформ — бензол — метанол — фенол — вода и многие другие комбинации. Сложнее подобрать систему для разделения белков из-

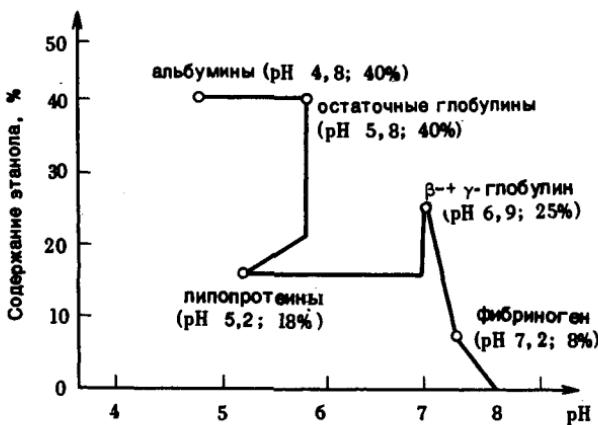


Рис. 3-2. Фракции плазмы [27, 28].

за их малой растворимости в органических растворителях и опасности денатурирования. Крейг и Хаусман [31] провели разделение рибонуклеазы и лизоцима в системе этанол — вода — сульфат аммония (3746 и 3420 соответственно ступеней переноса) при полном сохранении биологической активности. В той же лаборатории гомогенный (по данным ультрацентрифугирования) сывороточный альбумин ( $M_r$  68 000) в системе бутанол — трихлоруксусная — уксусная кислота — этанол в присутствии стабилизатора при 401 ступени распределения был разделен на 4 фракции (рис. 3-3). Чистый альбумин характеризуется коэффициентом распределения  $K = 0,857$ . Для

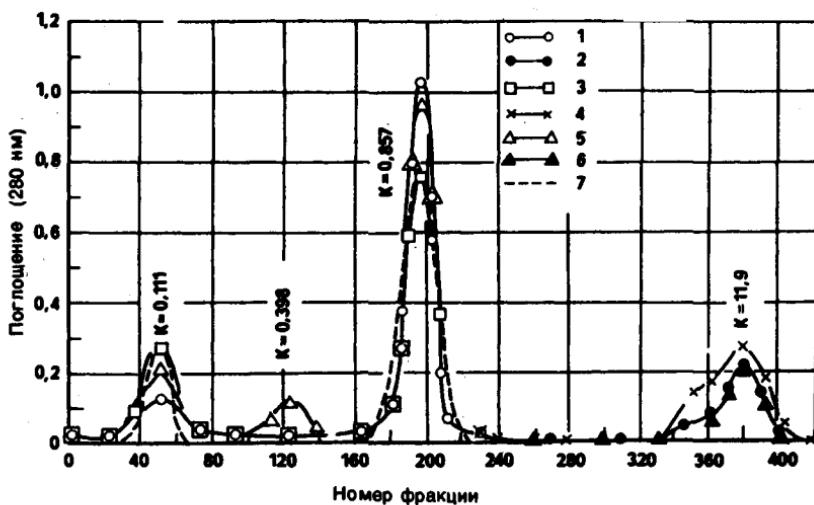


Рис. 3-3. Фракции сывороточного белка [31].

противоточного распределения высокомолекулярных белков предложено использовать растворы, содержащие полимеры, такие, как полизтиленгликоль и полипропиленгликоль с дектраном, и образующие с водой двухфазную систему. Однако в этом случае время расслоения очень велико и, кроме того, отделение белка от полимеров, содержащихся в растворе, сопряжено с существенными трудностями.

Важнейшие методы разделения белков, основанные на различии *молекул по размеру*, — это диализ, ультрафильтрация, центрифугирование и гель-хроматография. С помощью *диализа и ультрафильтрации* [32] отделяют преимущественно низкомолекулярные компоненты от белков. При проведении диализа полупроницаемая мембрана (размер пор 5 — 100 нм) беспрепятственно пропускает воду, небольшие ионы и молекулы, в то время как крупные молекулы белков задерживаются. Движущей силой процесса разделения является перепад концентраций между раствором и растворителем на мембране. При ультрафильтрации процесс разделения ускоряется путем приложения повышенного давления (0,5 — 10 бар). В качестве мембран чаще всего применяются синтетические материалы на основе производных целлюлозы и полиамида, делающие возможным при различных размерах пор (1 — 10 нм) разделение пептидов, пептидных производных и белков.

При *ультрацентрифугировании* для разделения используется седиментация, зависящая от размера, плотности и формы молекулы белка. *Центрифугирование в градиенте плотности* (зональное центрифугирование) часто применяется для разделения белков, а также для разделения органел и вирусов. Одной из характеристик белка служат данные седиментационного анализа в ультрацентрифуге (разд. 3.5.4). Положение возникающих белковых зон можно наблюдать с помощью оптических методов.

*Гель-хроматографией* [33 — 37] (при работе в водной фазе — *гель-фильтрацией*) называется молекулярно-ситовой процесс, близкий к хроматографическим методам разделения, при котором неподвижной (стационарной) фазой является, как правило, трехмерная структура полисахаридного или акриламидного геля. В зависимости от степени сшивки и размера пор геля, находящегося в набухшем состоянии, молекулы белка движутся через колонку с разной скоростью. При использовании геля с определенной степенью сшивки и размером пор скорость движения зависит от размера и формы молекул. Более крупные молекулы движутся в основном в пространстве между частичками геля и выходят из колонки первыми, мелкие молекулы проникают в поры геля и вследствие этого движутся значительно медленнее. Варьируя размеры пор, можно фракционировать белки с молекулярными массами от нескольких сотен до многих миллионов. В развитии гель-хроматографии, считающейся сегодня важнейшим и эффективнейшим методом разделения белков, особенно большую роль сыграла шведская фирма AB-Farmacia. С 1959 г. она поставляет на рынок дектрановый гель сепадекс, получаемый из спиртого эпихлоргидрином дектрана с  $M 30\,000 - 50\,000$ . Дектран, высокомолекулярный гликан с преимущественно  $\alpha$ -1,6-гликозидными связями, получают из сахарозы микробиологическим способом.



Рис. 3-4. Изучение седиментации методом ультрацентрифугирования (шлирен-оптика).

Таблица 3-4. Гели для гель-хроматографии

Тип геля	Торговое название	Рабочий диапазон мол. масс	Фирма
Декстрановый гель	Сефадекс (от G-10 до G-200)	700—600 000	Pharmacia
	LH-20/LH-60	4 000/10 000	"
	Молселект (от G-10 до G-200)	700—600 000	Reanal
Агарозный гель	Сефароза (от 6B до 2B)	4 000 000—40 000 000	Pharmacia
	Биогель (от A-0,5 до A-150)	500 000—150 000 000	Bio-Rad
Полиакриламидный гель	Биогель (от P-2 до P-300)	2 500—400 000	"
	Акрилекс (от P-2 до P-300)	2000—300 000	Reanal
Полиакриламидагарозный гель	Ультрагель (от AcA 54 до AcA 22)	70 000—600 000	LKB
Полиакрилолимформолино-вый гель	Энзакрил (от K0 до K10)	1000—2 000 000	Koch-Light

В дополнение к полисахаридным гелям фирмой Bio-Rad (США) предлагаются биогели на поликарбамидной основе (табл. 3-4). Введение в практику макропористых полистирольных смол, иенабухающих пористых стеклянных шариков и иммобилизация гидрофобных радикалов на декстрановой матрице сделали возможным гель-хроматографическое фракционирование в среде органических растворителей. Алкилированные декстраны (типа сефадекс-LH) находят широкое применение в синтетической пептидной химии [38].

Другими важными методами разделения и очистки белков являются **электрофорез** и **ионообменная хроматография**. Оба метода основаны на различных свойствах частиц, несущих неодинаковый заряд. Величина и знак заряда для каждого белка характеризуются числом ионизируемых боковых групп аминокислотных остатков и, как в случае аминокислот (разд. 1.4.2), могут быть установлены из кривой титрования. Выше ИЭТ находится зона pH с отрицательным, а ниже ИЭТ — зона pH с избыточным положительным зарядом молекулы.

При **электрофорезе** заряженные частицы под влиянием электрического поля движутся с различной, зависящей от отношения заряда к массе скоростью к аноду или катоду и таким образом могут быть отделены друг от друга. Различают электрофорез без носителя, при котором белковые молекулы движутся непосредственно в потоке буфера, и электрофорез с носителем (зонный электрофорез), при котором в качестве носителя используют различные материалы.

**Классический электрофорез без носителя** осуществляют в U-образной ячейке, в которой на буферный раствор, содержащий белок, наславивается чистый буферный раствор. Выбором подходящего pH достигают одинакового знака заряда белков, ко-

торые затем в виде, например, анионов движутся к положительному электроду и проникают в зону буферного раствора. Здесь они могут быть локализованы оптическими методами (по различию в показателях преломления) в виде так называемых «извилистых узоров».

Высокое разрешение и высокая производительность достигаются в современном электрофорезе без носителя, в котором электрическое поле приложено к текущему между двумя охлаждаемыми пластинами буферному раствору. Под действием поля белки отклоняются от направления потока буфера на определенный угол.

При наиболее продуктивном в аналитической химии белка *электрофорезе с носителем* в качестве носителя для потока буферного раствора используют целлюлозы, гели и пленки. Работают с напряженностью поля 6 — 10 В/см (низковольтный электрофорез) и при охлаждении с напряженностью до 100 В/см (высоковольтный электрофорез).

*Гель-электрофорез* проводится в агарозном или полиакриламидном геле. Это исключительно гибкий метод разделения; варьируя структуру геля и состав буферного раствора, можно проводить разделение на основе различия в молекулярных массах, изоэлектрических точках и биоспецифическом сродстве. Особенно высокого разрешения достигают при гель-электрофорезе в полиакриламиде [39], так как здесь дополняют друг друга электрофорез и молекулярно-сетевой эффект. Сыворотка, например, расщепляется на 20 полос, в то время как при электрофорезе в агарозе появляется лишь 5 полос.

Еще лучшее разделение дает *диск-электрофорез* [40, 41], при котором используют дискретную (прерывающуюся) разделительную систему из различных буферных растворов и работают с акриламидными гелями, имеющими различные размеры пор. Несколько (минимум два) слоев геля с различными pH наслаживают один на другой, благодаря чему процессу разделения предшествует концентрирование компонентов и в результате получаются очень узкие полосы белков.

*Изоэлектрическое фокусирование* [42 — 45] в линейном градиенте pH позволяет разделить белки, характеризующиеся различными изоэлектрическими точками. Для создания градиента используют носители с цвиттер-ионными свойствами — алифатические полиаминополикарбоновые кислоты, имеющие *M* 200 — 700. При движении в градиенте pH суммарный заряд белка постоянно меняется, и в области pH, близких к изоэлектрической точке, становится равным нулю. Соответствующий белок «фокусируется», образуя узкую зону. При препартивном «фокусировании» в колонке стабилизация градиента pH осуществляется с помощью градиента плотности используемого буферного раствора, однако чаще работают с плоскими слоями полиакриламидного или гранулированного геля. Опубликовано краткое сообщение о непрерывном электрофокусировании без носителя [46]. Эффективность электрофокусирования высока. Так, возможно, например, разделить белки, отличающиеся по ИЭТ лишь на 0,01 единицы pH. При разделении сыворотки образуется более 40 белковых полос.

При *изотахофорезе* (*iso* — равный, *tacho* — скорость) [47, 48], также обладающем высокой разрешающей способностью, разделяемую белковую смесь вводят в специальный электролит, содержащий ионы с более высокой подвижностью (лидирующие) и ионы с меньшей подвижностью (терминирующие), чем подвижность ионов белка при разных скоростях перемещения. При добавлении специфических промежуточных ионов, «поддерживающих интервал», разделяются белки с очень близкими подвижностями. Препартивное разделение белков проводят большей частью в колонках с полиакриламидным гелем при применении амфолитов в качестве буферных и «поддерживающих интервал» веществ, причем разделенные компоненты элюируются из колонки с помощью подходящей системы.

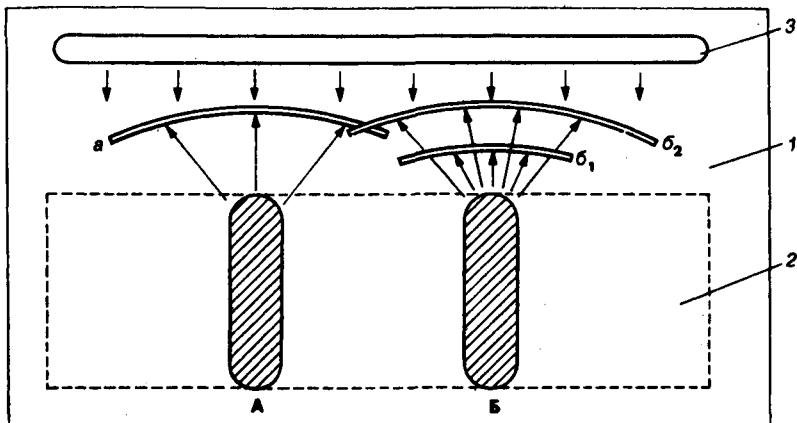


Рис. 3-5. Принцип иммуноэлектрофореза (по Рапопорту).

1 — слой агара; 2 — электрофоретически разделяемая сыворотка (смесь антигенов); 3 — антисыворотка (смесь антител). А — серологически однородная электрофоретическая фракция ( $a$  — полоса преципитации к А); Б — электрофоретическая фракция, серологически состоящая из двух компонентов ( $\sigma_1$  и  $\sigma_2$  — полосы преципитации к Б).

В случае иммуноэлектрофореза [49 — 51] принцип электрофореза сочетается с биоспецифической аффинностью белка (рис. 3-5). Белки-антигены сначала разделяются гель-электрофоретически. При встрече с диффундированными внутрь геля антителами происходит образование комплексов антиген — антитело, наблюдаемых в виде серповидных полос преципитации. Иммуноэлектрофорез имеет особое значение в медицинской диагностике (разделение и идентификация сывороточных белков и др.). Рис. 3-6 поясняет эффективность этого метода по сравнению с другими видами электрофореза.

При разделении белков ионообменной хроматографией [52] применяют прежде всего ионообменные смолы на полисахаридной основе, например аниониты DEAE-целлюлозу (диэтиламиноэтилцеллюлозу) или DEAE-сефадекс и катиониты КМ-целлюлозу (карбоксиметилцеллюлозу) или КМ-сефадекс, в которых функциональные ионообменные группы связаны с гидроксильными группами моносахаридных остатков. Гидрофильная основа ионообменников не приводит к денатурации белков. Белки, в кислой среде в виде катионов и в щелочной среде в виде анионов, связываются с соответствующим ионообменником, а затем элюируются буферным раствором с возрастающей ионной силой (концентрационный градиент) или с изменяющимся pH (градиент pH). При концентрационном градиенте ионизованные белки разделяются в результате взаимодействия с ионами соли, в случае градиента pH разделение вызвано изменением электрических зарядов белков. Ионообменная хроматография предложена в 1956 г. Петерсоном и Собером. На рис. 3-7 приведена диаграмма элюирования смеси различных гемоглобинов.

На биоселективном взаимодействии с лигандами, фиксированными на носителе, основано разделение белков с помощью аффинной хроматографии [54 — 61]. Ли-

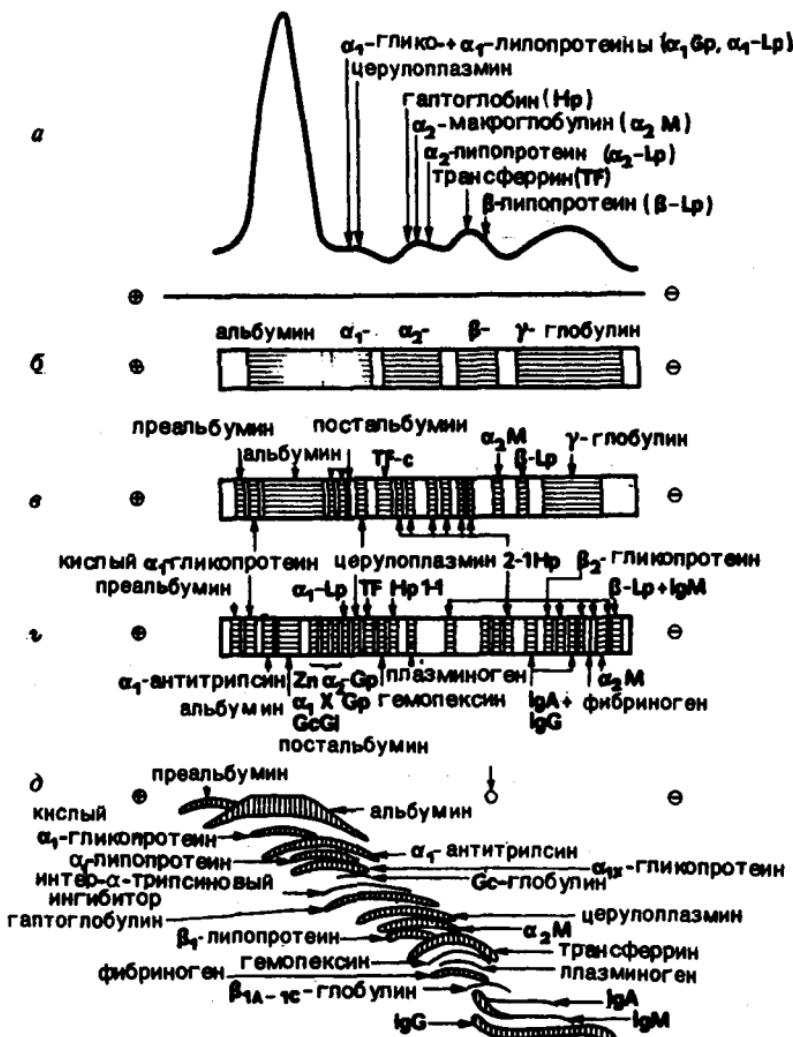


Рис. 3-6. Электрофоретическое разделение белков плазмы человека пятью различными методами при pH 8. а — электрофорез без носителя; б — электрофорез на бумаге; в — электрофорез в крахмальном геле; г — электрофорез в поликарбамидном геле; д — иммуноэлектрофорез (полосы преципитации к поливалентной антисыворотке человека). Стрелки показывают положение отдельных белков плазмы.

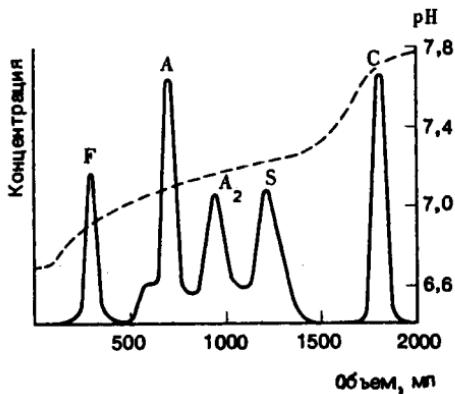


Рис. 3-7. Диаграмма элюирования при разделении различных гемоглобинов (F, A, A<sub>2</sub>, S и C) на КМ-сепадексе С-50.

ганд, обычно низкомолекулярный (конкурентный ингибитор, кофермент, модифицированный субстрат, специфический антиген), ковалентно (сложнозифириная или амидная связь) связывается с инертным нерастворимым носителем путем азосочетания, с помощью бромциана или бифункциональных реагентов. При реакции с комплементарным белком образуется устойчивый комплекс белок — лиганд, из которого белок может быть освобожден селективно изменением pH или ионной силы. Взаимодействие белка с лигандом облегчается встраиванием между лигандом и матрицей гибкой «ножки». В качестве матрицы применяются агароза, пористое стекло, целлюлоза, сшитые лектраны и др.\*

Пористое стекло (диаметр пор 5 — 250 нм), как и наиболее широко применяемые носители на основе агарозы, отличается низкой неспецифической сорбцией и высокой емкостью. Аффинная хроматография нашла широкое применение при разделении ферментов, полипептидных и белковых гормонов, антител, антигенов, а также транспортных и рецепторных белков.

Белки, полученные с помощью различных методов разделения и очистки, считаются чистыми, если их гомогенность доказывается появлением только одной белковой полосы, например, при диске-электрофорезе или характерной диффузионной константой или константой седиментации при ультрацентрифугировании.

Другой тест на чистоту вытекает из диаграммы растворимости; в случае гомогенного белка вплоть до достижения точки насыщения количество добавленного и количество растворившегося белка связаны линейной зависимостью. Критериями чистоты также служат аминокислотный состав, изоэлектрическая точка, а также в некоторой степени кристаллизуемость. В случае биологически активных белков, например ферментов, вывод о чистоте может быть сделан из критериев активности (субстратная специфичность, оптимальные pH и температура, кинетические эксперименты).

\* В последнее время широкое применение в качестве матрицы для аффинных сорбентов находит жесткий макропористый гидрофильный сополимер 2-гидроксиэтилметакрилата и этиленгликольметакрилата (сферон) [Туркова Я. Аффинная хроматография. — М.: Мир, 1980]. — Прим. перев.

### 3.4. Обнаружение и количественное определение

Для качественного определения белков известны различные, не всегда специфичные, классические цветные реакции, основанные часто на присутствии определенных аминокислотных остатков (табл. 3-5). С этой целью можно использовать также денатурацию при осаждении белков путем добавления трихлоруксусной, пикриновой, хлорной или фосфорно-вольфрамовой кислот, солей тяжелых металлов (Cu, Pb, Zn, Fe и др.) и путем нагревания в изоэлектрической точке.

Для количественного определения может быть использована биуретовая реакция, хотя в случае пептидов также наблюдается положительный результат. Реакция основана на образовании фиолетового медного комплекса, интенсивность окраски которого (540 — 560 нм) может быть измерена колориметрически. Гораздо более высокую чувствительность имеет метод Лаури [62], в котором при участии остатков Тгр, Туг и Сys образуется комплекс белка с фосфомолибденовой кислотой и медью. Это наиболее часто применяемый колориметрический метод определения малых количеств белка. Образующийся голубой комплекс (максимум абсорбции при 750 нм) достаточно устойчив для количественного определения. В качестве стандартного белка служит сывороточный альбумин. Предел обнаруживания 5 — 10 мкг/мл раствора. Определению по методу Лаури мешают трис-

**Таблица 3-5. Цветные реакции, применяемые для качественного определения белков**

Реакция	Условия проведения	Реагирующий участник белка	Окраска
Биуретовая	Смешивают сильнощелочной раствор пробы с раствором сульфата меди(II)	Пептидная связь	Пурпурно-фиолетовая
Миллона	Нагревают раствор пробы с $Hg(NO_3)_2$ и конц. $H_2SO_4$	Туг	Красно-коричневый осадок
Паули	Смешивают щелочной раствор пробы с диазобензолсульфокислотой	Туг, His	Красная
Хопкинс-Коле	Смешивают пробу с глиоксиловой кислотой и под слой вводят конц. $H_2SO_4$	Тгр	Фиолетовое кольцо
Сакагучи	Смешивают пробу с растворами $\alpha$ -нафтола и гипобромита	Arg	Красная
Фолина	Смешивают пробу с 1,2-нафтахинон-4-сульфоновой кислотой	Туг, Тгр	
Ксанто-протеиновая	Смешивают пробу с конц. $HNO_3$	Туг, Phe	Желтая (после добавления щелочи оранжевая)

буферы, гуанидин- и тиолсодержащие соединения. Эти факторы не оказывают влияния на результаты при определении белка по Бредфорду [63]. Метод основан на изменении окраски специфического красителя в зависимости от концентрации белка. При классическом количественном определении по Кельдалю аналитическая пробы разрушается при кипячении с концентрированной серной кислоте в присутствии катализатора, причем органически связанный азот образует эквивалентное количество сульфата аммония. Выделяющийся при добавлении щелочи аммиак поглощается раствором борной кислоты и определяется титрованием 0,01 н.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

Возможно прямое определение белка путем измерения оптической плотности (поглощения) при 280 нм, основанное на присутствии в белке остатков тирозина и триптофана. Зная удельный коэффициент экстинкции  $\varepsilon$  (оптическая плотность 1%-ного раствора белка при 280 нм и длине оптического пути 1 см), можно, исходя из измеренной экстинкции раствора белка неизвестной концентрации, установить содержание белка (в мг/1 мл).

С помощью других физико-химических методов (рефрактометрия, измерение плотности, измерение светорассеяния с помощью нефелометра) можно также определить содержание белка с большей или меньшей точностью и специфичностью.

### 3.5. Физико-химические свойства [5, 64, 65]

#### 3.5.1. Цвиттер-ионная природа белковой молекулы

Амфолитная природа белка базируется на количестве кислых и основных групп в боковых цепях и их распределении, так как в общем случае концевые амино- и карбоксильные группы вносят очень малый вклад в суммарный заряд молекулы.

В зависимости от pH раствора молекулы белка несут положительный (в кислой области) или отрицательный (в щелочной области) избыточный заряд, причем в обоих случаях гидратация и растворимость возрастают. Независимо от знака заряда решающий фактор, определяющий гидратацию, — разность между суммами положительных и отрицательных зарядов на молекуле белка.

В изоэлектрической точке белковая молекула представляет собой цвиттер-ион, т. е. положительные и отрицательные заряды в молекуле взаимно уравновешиваются и суммарный заряд молекулы равен нулю; растворимость и гидратация минимальны, отсутствует движение в электрическом поле. Изоэлектрическая точка может быть определена из кривой титрования, отражающей суммарное состояние ионизации молекулы. В случае глобулярных белков ионизируемые группы преимущественно локализованы на поверхности молекулы. Группы, находящиеся внутри или принимающие участие в образовании водородных связей, могут быть зарегистрированы титрованием после денатурации. Кроме того, изоэлектрическая точка может быть установлена путем определения минимума растворимости в

различных буферных растворах, электрофорезом при различных рН или электрофокусированием в градиенте рН, образованном амфолитами. У белков, содержащих много основных аминокислот, изоэлектрические точки находятся в щелочной, а у богатых аминодикарбоновыми кислотами белков — в кислой области рН. В табл. 3-6 приведены изоэлектрические точки некоторых белков.

**Таблица 3-6. Изоэлектрические точки некоторых белков**

Белок	Изоэлек- трическая точка
Пепсин	1,0
Яичный альбумин	4,59
Сывороточный альбумин	4,8
Коллаген	6,7
$\beta$ -Лактоглобулин	5,2
$\alpha_1$ -Глобулин (человека)	5,8
$\alpha_2$ -Глобулин (человека)	7,3
Гемоглобин (человека)	7,07
Гемоглобин (лошади)	6,92
Миоглобин	7,0
Цитохром с	10,6
Уреаза	5,0
Химотрипсиноген	9,5
Рибонуклеаза	9,6
Лизоцим	11,6
Протамин	11,8

Изоэлектрическая точка зависит от ионной силы и вида применяемого буфера, так как нейтральные соли оказывают влияние на степень ионизации ионогенных групп боковых цепей.

белок — катион  $\rightleftharpoons$  белок — цвиттер-ион  $\rightleftharpoons$  белок — анион

На этих равновесиях основано физиологически важное буферное действие белков. Гемоглобин, например, играет важную роль в стабилизации рН крови. Нормальное значение рН крови лежит между 7,35 и 7,40, изменение этой величины на 0,3 — 0,5 единицы опасно для жизни.

### 3.5.2. Растворимость

Растворимость белка, помимо рН раствора, природы растворителя (диз-  
лектрическая проницаемость), концентрации электролита (ионная сила) и  
вида противоиона, несомненно зависит от структурных особенностей моле-

кулы данного белка. Уже говорилось о различной растворимости глобулярных и фибрillлярных белков, на которой основан классический принцип их подразделения, и о снижении растворимости белков при добавлении нейтральных по отношению к белку солей или растворителей.

Большое значение для растворимости белка имеет концентрация электролита. Белки с ярко выраженным асимметрическим распределением заряда, как, например, сывороточные глобулины, требуют для растворения или стабилизации раствора определенной концентрации соли. Этот солевой эффект основан на снижении ассоциации или агрегации белковых молекул, вызванном присоединением низкомолекулярных противоионов. Результатом являются повышенная гидратация и улучшение растворимости белка, его реассоциация при этом затруднена. Высаливание, ведущее к осаждению белка, основано на понижении гидратации белка за счет гидратации ионами электролита. Так как для различных белков необходима различная высаживающая концентрация электролита, высаливание относится к важным и удобным методам грубого фракционирования белков.

### 3.5.3. Денатурация [66]

Денатурация — любые вызванные физическими и химическими воздействиями изменения, которые при сохранении первичной структуры белка сопровождаются большей или меньшей потерей его биологической активности и других индивидуальных свойств белка. При денатурации ослабляются гидрофобные взаимодействия, разрушаются водородные связи, а в присутствии восстановителей и дисульфидные связи. Денатурация с разрывом невалентных связей обычно обратима. Путем образования новых невалентных связей, а также благодаря взаимодействию с денатурирующим веществом новая конформация стабилизируется. Возникающее метастабильное состояние при восстановлении физиологических условий может вернуться к нативной конформации (*ренатурация*). Принципиально возможна ренатурация и при восстановительном расщеплении дисульфидных связей (рис. 3-8).

При произвольном дисульфидном обмене, неспецифическом окислении и при образовании ковалентных связей иного вида *денатурация необратима*. Тепловая денатурация в начальной стадии ведет, например, к региоселективным изменениям конформации, которые могут быть *обратимыми*. На последующей стадии неконтролируемая агрегация ведет к образованию неупорядоченного клубка.

Переход от нативного состояния с минимальной энергией к неупорядоченной денатурированной форме сопровождается увеличением энтропии. Но конечно, одновременно повышается упорядоченность окружающих молекул воды, поскольку происходит дополнительная гидратация освобождающихся гидрофобных групп боковых цепей, так что этот эффект в значительной степени компенсируется. При денатурации меняются и другие свойства белковой молекулы: уменьшаются растворимость и способность кристаллизоваться из-за появления дополнительных ионизируемых групп,

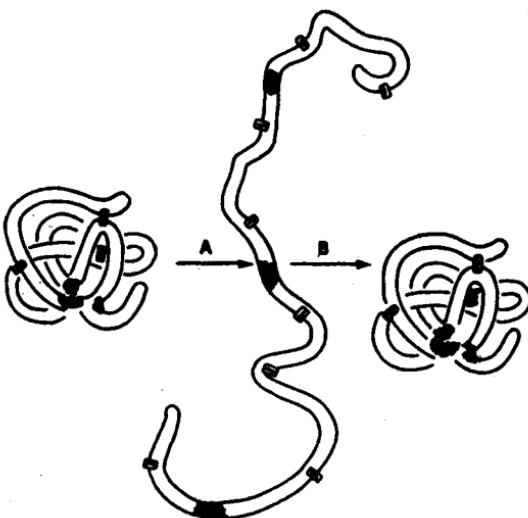


Рис. 3-8. Денатурация и ренатурация на примере панкреатической рибонуклеазы (по Анфинсену).

объясняемого разворачиванием пептидных цепей; сдвигается изоэлектрическая точка; повышается вязкость; увеличивается из-за освобождения фенольных гидроксильных групп поглощение в УФ-области.

Физическая денатурация может быть вызвана механическими (сильное перемешивание, встряхивание) или физическими воздействиями (нагревание, ультрафиолетовое, рентгеновское и радиоактивное облучение, обработка ультразвуком и абсорбция на границе раздела). Химическая денатурация достигается прежде всего с помощью соединений, разрывающих водородные связи ( $6 - 8\text{ M}$  раствор мочевины,  $4\text{ M}$  раствор гидрохлорида гуанидина), обработкой кислотами и щелочами ( $3 > \text{pH} > 9$ ), а также воздействием поверхностно-активных веществ, например,  $1\%-ным$  раствором додецилсульфата натрия. Чувствительность отдельных белков к денатурирующим средствам различна.

### 3.5.4. Молекулярная масса

Молекулярные массы белков, состоящих из одной полипептидной цепи, лежат в интервале от 10 000 до 100 000, для большинства многоцепочных (олигомерных) белков — от 50 000 до многих миллионов.

Для определения молекулярной массы и одновременно формы молекулы подходят различные физико-химические методы, которые грубо можно подразделить на кинетические и равновесные. Кинетические методы основаны на оценке процесса переноса частиц, например определение вязкости,

измерение скоростей седиментации и диффузии в ультрацентрифуге и определение электрофоретической и гель-хроматографической подвижности при использовании дектрановых и полиакриламидных гелей с определенным размером пор. При *равновесных методах* раствор белка находится в термодинамически равновесном состоянии.

К равновесным методам относятся измерение светорассеяния и осмотического давления, а также метод малоуглового рентгеновского рассеяния.

*Метод измерения светорассеяния* основан на том факте, что с увеличением размера частиц эффект Тиндаля в растворе белка сильно возрастает. С помощью фотометра для рассеянного света измеряется соотношение интенсивностей падающего и рассеянного под углом 45° или 90° света. В идеальных условиях разность светорассеяния чистого растворителя и раствора белка прямо пропорциональна числу и размеру молекул белка.

*Осмотическое давление* определяется с помощью мембранных осмометров, причем для белков граница определяемых молекулярных масс лежит вблизи 20 000. Ниже этой границы применение мембранных осмометров проблематично, для этой области лучше подходит осмометр, основанный на измерении давления паров. В случае мембранных осмометров разность высоты столбиков жидкости в сравнительном и измерительном капиллярах показывает величину осмотического давления. При применении динамического принципа измерения, при котором определяется и автоматически компенсируется поток растворителя через полупроницаемую мембрану, время определения существенно сокращается.

При определении молекулярных масс в *ультрацентрифуге* [67 – 69] различают метод измерения скорости седиментации и равновесное центрифugирование. В то время как в первом случае измеряют скорость седиментации, во втором — определяют положение седиментационного равновесия.

В случае измерения *скорости седиментации* необходимы поля центробежных сил, обеспечивающие полное осаждение белков. Белок, находящийся в виде коллоидного раствора, обладает большей плотностью, чем растворитель. В ходе центрифугирования на молекулу белка действует значительная центробежная сила, которая, вызывая движение молекулы через среду, обеспечивает скорость перемещения, пропорциональную трению молекулы в среде. Скорость седиментации прямо пропорциональна молекулярной массе. Для определения молекулярной массы необходимы приборы со скоростью вращения ротора до 60 тыс. об/мин. Раствором белка заполняют прозрачную ячейку. Изменения концентрации, возникающие в процессе центрифугирования, могут прослеживаться с помощью оптических методов, например посредством цилирен- или интерференционной оптики, а также посредством прямого измерения абсорбции в УФ-области (сканирующая система).

Определение молекулярной массы с помощью аналитической ультрацентрифуги основано на работах Сведенберга, шведского химика, специалиста в белковой химии, разработавшего в 1925 г. центрифугу. Молекулярная масса может быть вычислена по следующей формуле:

$$M = \frac{RTs}{D(1 - \rho_L V_{Prot})}$$

где  $s$  — коэффициент седиментации (имеет размерность времени; единица измерения коэффициента седиментации называется свебергом;  $s = 1 \cdot 10^{-13}$  с);  $R$  — газовая постоянная;  $T$  — температура в кельвинах;  $V_{\text{Prot}}$  — парциальный удельный объем белка;  $\rho_L$  — плотность растворителя;  $D$  — коэффициент диффузии.

Парциальный удельный объем белка  $V_{\text{Prot}}$  может быть получен измерением плотности. Для того чтобы найти молекулярную массу, необходимо еще знать коэффициент диффузии  $D$ , который для сферической молекулы можно вычислить теоретически. Однако реальные молекулы имеют форму, отличающуюся от сферы, поэтому коэффициент диффузии определяют экспериментально центрифугированием белка при меньшем числе оборотов и измерением вызванного диффузией уширения границы между белковой зоной и раствором.

При определении молекулярной массы по методу седиментационного равновесия знание коэффициента диффузии не является необходимым. В этом случае используют более низкое число оборотов. По сравнению с предыдущим методом, для которого необходимо гравитационное поле до 400 000 g, здесь достаточно центробежной силы, в 10 — 15 тыс. раз превосходящей земное притяжение. Через несколько часов или через несколько суток процесс седиментации и обратной диффузии достигает состояния равновесия, при котором перемещение частиц отсутствует. Измерив градиент концентрации белка от мениска до дна ячейки, можно вычислить его молекулярную массу. Медленное установление равновесия — недостаток метода. Этого можно избежать при проведении определения по Арчибальду. В этом «низкоскоростном» методе для расчетов можно использовать градиент концентрации, образующийся в измерительной ячейке у мениска жидкости (до отделения белковой зоны). Метод нулевой концентрации в мениске, предложенный в 1964 г., делает возможным достижение седиментационного равновесия при высокой скорости ротора (высокоскоростной метод), в этом случае белковая зона уже отделена от мениска. Это дает возможность сократить время эксперимента до 2 — 4 ч.

Следует также упомянуть метод центрифугирования в градиенте плотности. Обычно работают в возрастающем градиенте плотности сахараозы при высокой скорости ротора. Расстояние, на которое перемещается белок в градиенте, обратно пропорционально его молекулярной массе. Молекулярную массу неизвестного белка с достаточной точностью можно определить, сравнивая его с добавленным стандартным белком известной молекулярной массы.

При определении молекулярной массы с помощью гель-фильтрации [70, 73] применяют сефадексы различного типа (G-50, G-100, G-150, G-200), агарозы (сефарозы 2B, 4B, 6B) или полиакриламиды (биогели P-100, P-150, P-300). Процесс проводят как в хроматографических колонках, так и на тонкослойных пластинках. Принцип метода уже рассматривался в разд. 3.3.

При помощи градиуровочной кривой, полученной при элюировании стандартных белков с различной молекулярной массой, и используя простейшее аппаратурное оформление, можно провести определение молекулярной массы с погрешностью 5 — 10%.

Об эффективности гель-фильтрации можно судить по рис. 3-9.

Молекулярную массу белков можно также определять посредством гель-электрофореза в полиакриламиде [41]. Мономеры, предназначенные для образования геля, растворяют в буфере и полимеризуют в стеклянных трубках или между пластинками при использовании в качестве сшивющего агента бисакриламида. Большая разделяющая способность метода объясняется молекулярно-ситовым эффектом.

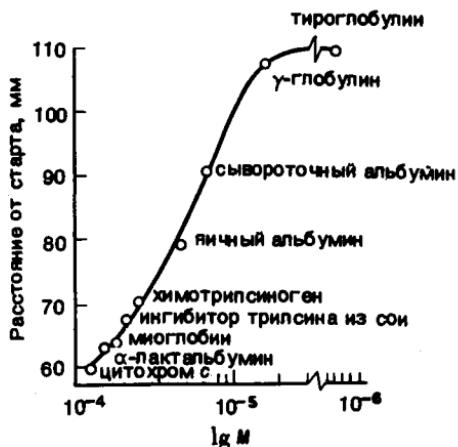


Рис. 3-9. Определение молекулярной массы методом тонкослойной гель-фильтрации.

Электрофорез проводят в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН). Таким путем можно определить молекулярные массы субъединиц олигомерных белков [74 — 76]. Молекулы ДСН образуют за счет гидрофобного взаимодействия комплексы с полипептидными цепями, характеризующиеся постоянным отношением ДСН : белок. Тогда электрофоретическую подвижность можно выразить как функцию молекулярной массы и сравнить с подвижностью стандартного белка. Метод отличается высокой скоростью (2 — 4 ч) и требует для одного определения, как правило, лишь 10 — 50 мкг белка. В последнее время ДСН-электрофорез проводят также на стеклянных шариках с контролируемым размером пор (120 — 200 нм). Комплекс ДСН — белок не адсорбируется на носителе, интервал определяемых молекулярных масс 3 500 — 12 000 [77].

Из-за зависящей от концентрации тенденции многих белков к агрегации или диссоциации на субъединицы определение молекулярных масс становится проблематичным, интерпретация результатов различных физико-химических методов часто также является сложной. Обычно суммируют значения для различных фракций и затем делят полученную величину на число частиц в растворе или относят среднюю величину не к числу, а к средней массе частиц. Метод ультрацентрифугирования позволяет найти среднюю молекулярную массу.

### 3.5.5. Форма молекул

Существуют различные методы определения формы молекул. Величиной, характеризующей форму молекулы белка, является соотношение осей  $f/f_0$  (как уже было сказано, почти все белки имеют форму, отличную от сферы):

$$f/f_0 = a \left/ \left( \frac{3V_{\text{Prot}} \cdot M}{4\pi N} \right)^{1/3} \right.$$

где  $f$  — молярный коэффициент трения,  $f_0$  — коэффициент трения для идеальной сферической молекулы,  $a$  — стоксовский радиус,  $N$  — число Авогадро,  $V_{\text{Prot}}$  — парциальный удельный объем белка,  $M$  — молекулярная масса.

При экспериментах по ультрацентрифугированию из константы седиментации при знании стоксовского радиуса можно вычислить отношение осей  $f/f_0$ . Под стоксовским радиусом понимают радиус молекулы при наименьшей площади ее поперечного сечения. Он может быть получен из гель-хроматографической константы эксклюзии ( $r$  — эффективный диаметр пор):

$$K_D = (1 - a/r)^2 [1 - 2,104(a/r) + 2,09(a/r)^3 - 0,95(a/r)^5]$$

Отношение осей белковой молекулы, форма которой охарактеризована как эллипсоид вращения, для большинства глобулярных белков лежит в интервале между 2 и 30, в то время как для фибрillярных белков это соотношение  $> 30$ .

Форма молекулы может быть также определена путем измерения вязкости, а также методом двойного лучепреломления в потоке. С помощью электронной микроскопии возможно прямое определение формы молекулы. При этом пользуются методом негативного контрастирования при применении тетраоксида осмия или других тяжелых металлов в качестве контрастирующих средств.

### 3.6. Принципы структурной организации белковых молекул

По рекомендации Линдерстрема — Ланга были введены термины «первичная, вторичная и третичная структура», характеризующие уровни структурной организации белков. *Первичная структура* белка дает сведения о числе и последовательности связанных друг с другом пептидной связью аминокислотных остатков. *Вторичная структура* описывает конформацию полипептидной цепи, возникающую при образовании водородных мостиков между карбоксильными кислородными атомами и атомами амидного азота в составе скелета молекулы. Под *третичной структурой* понимают трехмерную укладку полипептидной цепи, вызванную внутримолекулярным взаимодействием боковых цепей.

Введенный в 1958 г. Берналом термин *четвертичная структура* охватывает наблюдающийся у ряда белков процесс ассоциации нескольких интактных полипептидных цепей в определенный молекулярный комплекс. В этом случае связывание обеспечивают межмолекулярные взаимодействия. Вторичная, третичная и, если есть, четвертичная структуры в сумме дают *конформацию* белка.

Этот чисто академический принцип подразделения не следует переоценивать. Спорна прежде всего дифференциация вторичной и третичной

структур, поскольку в обоих случаях конформация поддерживается нековалентными связями. Но все-таки такое подразделение правомерно хотя бы потому, что изменение элементов вторичной структуры протекает намного быстрее, чем структурные перестройки третичной структуры.

Правила структурной организации глобулярных белков рассмотрены Шульцем [81]\*. Согласно им, в структуре таких белков следует выделять большее число уровней организации. Иерархия берет свое начало от аминокислотной последовательности. Затем следует вторичная структура с регулярной укладкой полипептидной цепи, характеризующейся максимальным образованием водородных связей. Вторичная структура может образовывать до 75% всей полипептидной цепи. Иногда в молекуле белка можно выделить *агрегаты вторичной структуры* (сверхвторичная структура), являющиеся регулярными образованиями из нескольких участков полипептидных цепей, например двойная  $\alpha$ -спираль или складчатый лист-спираль. Пример более высокой ступени организации глобулярных белков — *образование доменов*. Они возникают у крупных белков и характеризуются как независимые пространственные структуры. Иммуноглобулины, например, образуют при соответствующем сворачивании полипептидных цепей от 2 до 4 доменов. В химотрипсине активный центр находится внутри, между двумя доменами. В данном случае домены имеют структуру складчатого листа-цилиндра и связаны один с другим лишь одной полипептидной цепью. И наконец, глобулярные белки, построенные из нескольких доменов, могут упаковываться в еще более крупные структурные образования. Возникающие при этом агрегаты обычно построены симметрично, причем структура входящих в их состав мономеров, вероятно, не меняется.

### 3.6.1. Первичная структура

Установление первичной структуры начинается с определения аминокислотного состава и молекулярной массы выделенного и очищенного белка. Белки, состоящие из нескольких полипептидных цепей, разделяются с помощью денатурирующих реагентов (концентрированный раствор мочевины или ДСН) на мономеры. Дисульфидные мостики расщепляют восстановлением меркаптоэтанолом. Для предотвращения дисульфидного обмена и окисления образующихся свободных меркаптогрупп их блокируют каким-либо методом, например алкилированием иодуксусной кислотой с образованием S-карбоксиметильного производного или цианэтилированием акрилонитрилом. После определения N- и C-концевых аминокислот полипептидная цепь расщепляется химически или ферментативно (в нескольких вариантах) на меньшие перекрывающиеся фрагменты. Для каждого фрагмента устанавливается аминокислотная последовательность. И наконец, комбинируя отдельные последовательности, приходят к полной последовательности исходной полипептидной цепи.

К настоящему времени опубликовано свыше 15 000 работ о первичных структурах более 1 000 белков. Все известные первичные структуры заре-

\* См. также книгу: Шульц Г., Ширмер Р. Принципы структурной организации белков: Пер. с англ. — М.: Мир, 1982. — Прим. ред.

гистрированы в «Атласе белковых последовательностей и структур» [83]. Методические основы анализа первичной структуры разработаны Сенгером с сотр. в 1945 — 1954 гг.

### 3.6.1.1. Селективное расщепление полипептидных цепей

Расщепление пептидной цепи, необходимое для определения последовательности аминокислот, осуществляют с помощью частичного химического или ферментативного гидролиза. При *ферментативном расщеплении* чаще всего используют протеазы: трипсин, химотрипсин, пепсин, папаин, субтилизин, эластазу и термолизин [84].

*Трипсин* расщепляет пептидные связи, в которых карбоксильная функция представлена лизином или аргинином. Селективность расщепления может быть повышена блокированием боковых цепей лизина (*Z*-, *Tfa*- или *Dnp*-остатки на  $\epsilon$ -аминогруппе) или аргинина (циклогександионовое производное по гуанидиновой группе) [85]. Блокированные остатки не затрагиваются, и, таким образом, расщепление идет селективно либо по лизину, либо по аргинину. Цистеин также может быть включен в триптическое расщепление, если модифицировать меркаптогруппу этиленамином. Образующееся *S-β-аминозильное производное* структурно похоже на лизин, и пептидная цепь расщепляется со стороны его карбоксила.

*Химотрипсин* преимущественно расщепляет те пептидные связи, карбоксильная функция которых относится к ароматическим аминокислотам. В длинных полипептидных цепях гидролизуются также связи, образованные лейцином, валином, аспарагином и метионином. *Пепсин* обладает слабо выраженной специфичностью. Расщепляются связи, образованные триптофаном, фенилаланином, тирозином, метионином и лейцином.

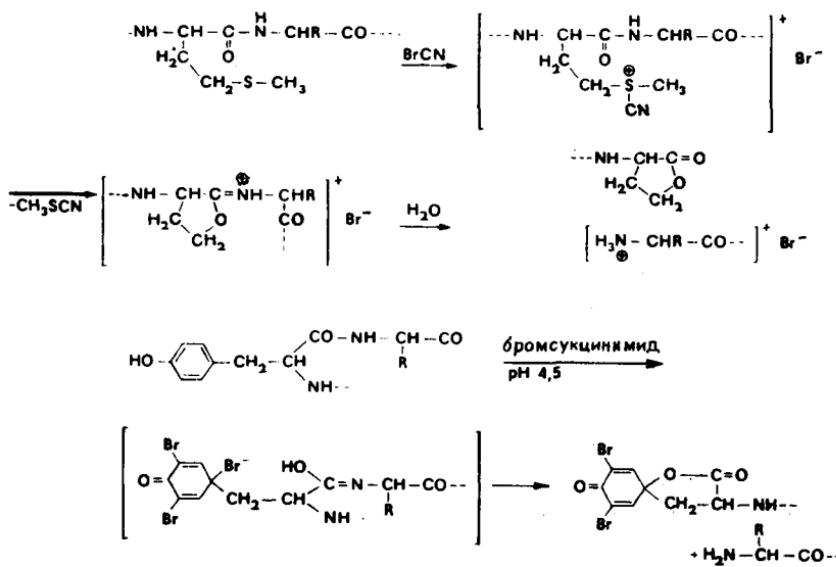
*Субтилизин* прежде всего расщепляет связи по соседству с серином, глицином и ароматическими аминокислотами. *Эластаза* менее специфична и преимущественно гидролизует связи нейтральных аминокислот. Основными точками воздействия малоспецифичного *папаина* являются остатки аргинина, лизина и глицина, кислые аминокислоты не затрагиваются. *Термолизин* предпочтительно расщепляет полипептидную цепь по аминокислотным остаткам с гидрофобной боковой цепью.

В общем случае ферментативный гидролиз протекает тем специфичнее, чем короче время инкубации с протеазой. При этом большое значение имеет чистота выбранного фермента. Для удаления из трипсина последних остатков химотрипсина применяют, например, селективно ингибирующие вещества, такие, как дифенилкарбамилхлорид или *l-(1-тозиламино-2-фенил)-этилхлорметилкетон*.

Расщепление полипептидных цепей, содержащих дисульфидные мостики, обычно приводит к сложной смеси низших пептидов. При реконструкции полипептидной цепи установление исходного порядка дисульфидных связей — довольно трудная задача. Один из путей ее решения дает диагональный электрофорез по Хартли, при котором пептиды после ферментативного гидролиза сначала разделяют электрофоретически на полосе бумаги.

Окислением надмуравынной кислотой расщепляют цистиновые мостики, при этом образуются два новых пептида, содержащие цистеиновую кислоту. Затем полосу бумаги закрепляют на листе бумаги большего размера и повторяют электрофорез в направлении, перпендикулярном первоначальному. При этом не претерпевшие изменений пептиды располагаются по диагонали листа, а кислые пептиды, в состав которых входит цистеиновая кислота, оказываются вне ее и могут быть непосредственно идентифицированы.

Помимо приведенных ферментативных методов для селективного расщепления пептидных цепей используются химические методы [87, 88]. Так, например, бромциан расщепляет пептидные связи, образованные с участием карбоксильной группы метионина, а N-бромсукцинимид — связи тирозина или триптофана.



Для расщепления пептидной связи по остатку цистеина последний сначала реакцией с 2-нитро-5-тиоцианобензойной кислотой превращают в S-цианоцистеин, амидная связь которого может быть гидролизована легко без побочных реакций [90, 91].

Смесь пептидов, образующихся в результате использования различных методов расщепления, сначала должна быть разделена, и каждый из пептидов очищен. Целевой компонент перед анализом последовательности должен быть гомогенен по данным как минимум четырех различных методов разделения: ионообменной хроматографии, электрофореза, бумажной или тонкослойной хроматографии и противоточного распределения.

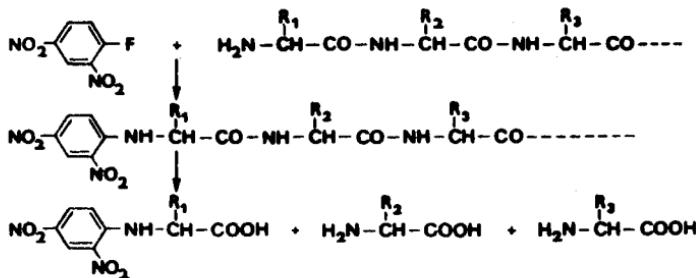
### 3.6.1.2. Установление аминокислотной последовательности [92 — 95]

Помимо приведенных далее методов следует сослаться (разд. 2.3.1.1. и 3.8.4.5) на возможность установления аминокислотной последовательности анализом соответствующей белку мРНК. Этот путь приобрел значение благодаря достижениям в определении первичной структуры нуклеиновых кислот (Фредерик Сенгер, Нобелевская премия за 1980 г.).

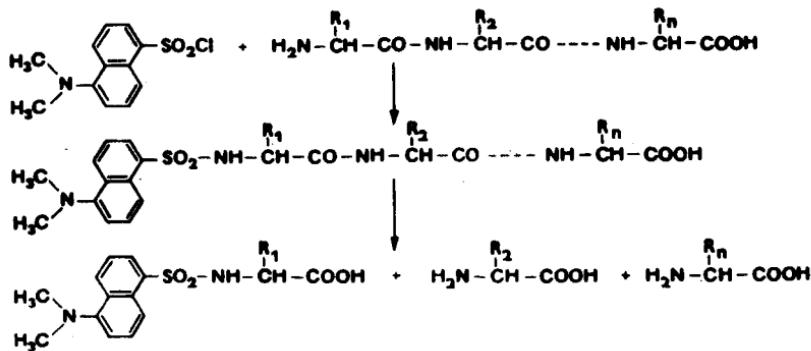
#### 3.6.1.2.1. Определение концевых аминокислот

Химические методы определения концевых остатков основаны главным образом на превращении или модификации концевых аминокислот. После полного гидролиза производные концевых аминокислот отделяются от остальных немодифицированных аминокислот и идентифицируются.

Наиболее известен *динитрофенильный метод Сенгера* [97]. В этом методе пептид или белок обрабатывается 2,4-динитрофторбензолом (реагент Сенгера) и образующаяся в результате гидролиза ДНФ-аминокислота экспонируется и идентифицируется.



Значительно чувствительнее *дансильный метод* (5-диметиламинонафтилсульфонильный метод) [98], в котором N-концевая аминокислота идентифицируется после тонкослойной хроматографии в виде интенсивно флуоресцирующего желтым светом пятна дансильного производного. Предел обнаружения  $10^{-14}$  моль.



Другими, менее важными методами блокирования N-концевой аминокислоты являются арилсульфонирование при взаимодействии с нафтил- или бензолсульфохлоридом, карбамилирование цианатом калия, карбоксиметилирование бромуксусной кислотой и др.

И наконец, определение N-концевой аминокислоты может быть предпринято с помощью *лейцинаминопептидазы*.

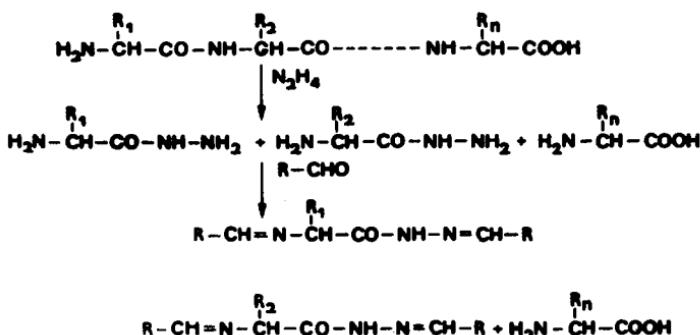
Для определения C-концевой аминокислоты используют чаще всего экзопептидазы — карбоксипептидазы А, В и Y.



Специфичность обеих экзопептидаз различна. Карбоксипептидазой A, впервые использованной Ленсом в 1949 г. для определения C-концевых остатков в инсулине, отщепляются все аминокислоты, кроме Lys, Arg, Pro и His. Карбоксипептидаза В отщепляет Lys, Arg, Orn и S-аминоэтилцистеин. Оба фермента взаимно дополняют друг друга и, как правило, применяются в комбинации.

Карбоксипептидаза Y из дрожжей обладает широкой специфичностью и отщепляет все аминокислоты, кроме Gly, связанного с Pro.

Из химических методов определения C-концевой аминокислоты наибольшее значение имеет *метод Акабори* [99]. При кипячении с безводным гидразином ( $100^{\circ}\text{C}$ , 5 ч) все аминокислоты, за исключением C-концевой, превращаются в гидразиды. Отделение значительного избытка гидразидов аминокислот осуществляется реакцией с изовалерановым (или другим) альдегидом. Можно также смесь, полученную непосредственно после гидразинолиза, обработать динитрофторбензолом и после подкисления выделить ДНФ-аминокислоту.



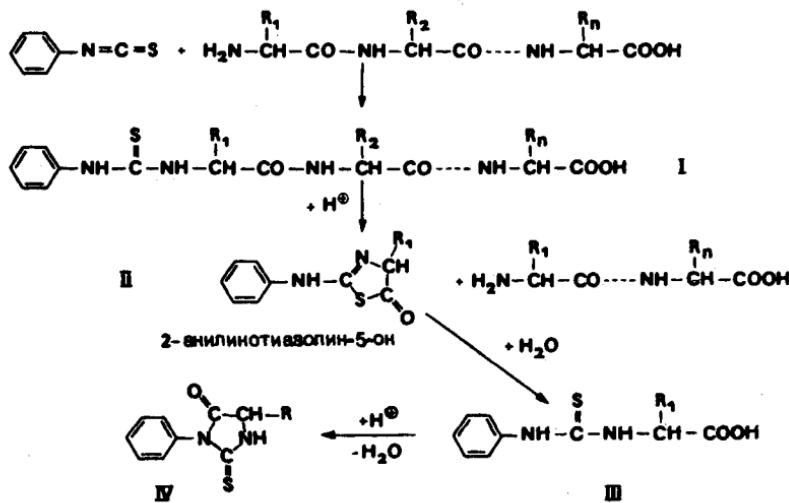
Этим методом не могут быть определены C-концевые цистеин, глутамин, аспарагин и триптофан; аргинин частично превращается в орнитин.

Другой метод определения С-концевой аминокислоты основан на восстановлении концевой карбоксильной группы литийалюминийгидридом. Белок перед восстановлением полезно этерифицировать диазометаном. Полный гидролиз дает легко выделяемый и идентифицируемый аминоспирт, соответствующий С-концевому остатку аминокислоты.

### 3.6.1.2.2. Ступенчатая деградация полипептидной цепи

#### 3.6.1.2.2.1. Химические методы

Важнейший химический метод ступенчатой деградации пептидов с N-конца — фенилтиогидантоновый метод (деградация по Эдману) [100].



При обработке пептида фенилизоцианатом при pH 9 и 40 °С сначала образуется производное тиомочевины (I), которое в кислой среде расщепляется на 2-анилиnotиазолин-5-он (II) и пептид, укороченный на одну аминокислоту. Относительно нестабильный тиазолинон непригоден для идентификации. Он гидролизуется в фенилтиогкарбаминовую кислоту (III), переходящую с замыканием кольца в 3-фенил-2-тиогидантон (ФТГ-аминокислота) (IV). Прямая изомеризация тиазолинона в тиогидантон происходит при нагревании в кислой среде. Образующиеся ФТГ-аминокислоты IV экстрагируют и идентифицируют с помощью бумажной, тонкослойной или газовой хроматографии. Количественное определение осуществляется спектрофотометрически при 268 — 270 нм. Оставшийся пептид выделяется и подготавливается к следующему циклу деградации.

Идентификацию ФТГ-аминокислот можно также осуществить с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [101 — 103]. Время проведения одного процесса хроматографического разделения составляет 7 мин; метод характер-

ризует высокая достоверность, причем работают на нанограммовом уровне. Работают на колонках с  $\text{SiO}_2$  при применении давления и градиента растворителей.

Особо чувствительным методом определения фенил- и метилтиогидантоинов аминокислот является масс-спектрометрия [104 — 106]. В качестве окрашенного реагента для деградации предложен 4'-N,N-диметиламино-азобензол-4-изотиоцианат [107].

Другими вариантами ступенчатой деградации являются комбинация метода Эдмана с дансильным методом [108 — 110], микроопределение на фильтровальной бумаге, тонкослойная хроматография на полиамидных слоях и конденсация с пентафторфенилизотиоцианатом. В противоположность фенилизотиоцианату фторпроизводное допускает применение при газохроматографическом определении тиогидантоинов детектора с электронным захватом [111].

Принципиально деградация по Эдману при непрерывном повторении циклов возможна вплоть до С-конца. Однако на практике возможно определение последовательности примерно 10 аминокислотных остатков, так как отщепление протекает не всегда количественно, а дополнительное неспецифическое расщепление лептидной цепи вносит ошибку в результаты. Решить проблему удалось Эдману и Бегту [112, 113] одновременно с автоматизацией процесса. На рис. 3-10 приведена принципиальная схема так называемого белкового секвенатора. В отличие от неавтоматизированного варианта здесь нестабильный 2-анилиниотиазолин-5-он автоматически переносится в коллектор фракций и затем, вне реакционной ячейки, превращается в ФТГ-аминокислоту.

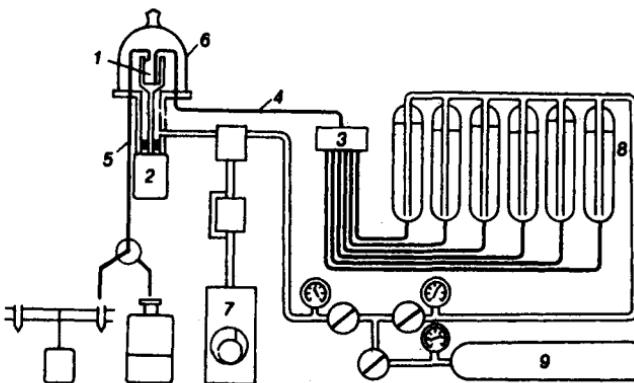


Рис. 3-10. Схема коммуникаций жидкостного секвенатора белков [112, 113].

\*В настоящее время для разделения ФТГ-аминокислот, как правило, используют сорбенты на основе  $\text{SiO}_2$ , модифицированного октильными или октадецильными группами. — Прим. перев.

Реакционный сосуд 1 представляет собой цилиндрический, термостатируемый при 50 °C стеклянный стакан, вращаемый электромотором 2 со скоростью 1425 об/мин. Раствор, находящийся в ячейке, под действием центробежных сил распределяется на поверхности в виде тонкой пленки. Необходимые реагенты и растворители, подача которых регулируется краном 3, поступают по специальной трубке 4 на дно вращающегося стеклянного стакана, раствор после экстракции удаляется из реакционного сосуда через боковую трубку 5. Такая конструкция позволяет осуществлять все необходимые операции: растворение, упаривание, вакуумную сушку и экстракцию. При этом каждый раз укорачиваемая на одну аминокислоту полипептидная цепь всегда остается в реакционной ячейке. Стеклянный цилиндр закрыт стеклянным колпаком 6 и может вакуумироваться вакуумным насосом 7. Реагенты и растворители находятся в соответствующих сосудах для хранения 8, находящихся под давлением азота. Разность в давлениях между сосудами и реакционной камерой позволяет осуществлять непрерывную подачу в реакционный сосуд желаемых реагентов и растворителей.

Цикл, необходимый для отщепления одной аминокислоты, включает ~30 операций и продолжается 93,6 мин. Таким образом за 24 ч удается отщепить и идентифицировать около 15 аминокислотных остатков. Так как выход на цикл составляет 97 — 98%, теоретически возможно при данных условиях ступенчато отщепить до 100 аминокислот. Для небольших пептидов «классический» автомат подходит меньше, так как недостаточное различие растворимостей пептида и тиазолона затрудняет селективную экстракцию последнего.

Лишь модификация процесса, осуществленная Брауницером и др. [114, 115], сделала возможным полное ступенчатое расщепление полипептидной молекулы вплоть до C-концевой аминокислоты. Введенном в ε-аминогруппы боковых цепей остатков лизина, входящих в состав пептидов триптического расщепления, гидрофильных остатков нафталинсульфокислоты была снижена вымываемость даже коротких пептидов и тем самым обеспечены условия работы на секвенаторе. В дополнение к такой модификации может быть предпринята деградация по *квадрольному методу* [116]. Квадрол [N, N, N', N'-тетракис-(2-гидроксипропил) этилендиамин], хорошо растворяющий модифицированные белки, рекомендован в качестве буферного вещества для реакции Эдмана. Но обычно его применение ведет к преждевременному окончанию деградации из-за сильной вымываемости коротких пептидов.

Альтернативным путем для установления последовательности коротких пептидов является *деградация по Эдману на твердой фазе*. По аналогии со способом Меррифилда деградируемый пептид связывается ковалентно с полимерным носителем и ступенчато расщепляется с N-конца. Принципиальная применимость этого метода доказана во многих лабораториях. В качестве носителя чаще всего используют устойчивый к трифтормукусной кислоте аминоалкилполистирол. Присоединение секвенируемого пептида более предпочтительно через амидную связь.

Первый твердофазный секвенатор предложен в 1970 — 1971 гг. Лоурсеном [117, 118]. Он значительно дешевле, чем секвенатор Эдмана, и подходит для работы с

пептидами, имеющими до 30 остатков. Все реакции деградации проходят в термостатируемой колонке.

Реагенты и растворители, скорость подачи которых регулируется с помощью клапанов, прокачиваются через колонку. Продукты реакции на каждом шаге деградации собираются коллектором фракций. Всеми операциями управляет программирующее устройство.

Секвенирование на твердой фазе затрудняется присутствием в пептиде карбоксильных групп (образование циклических имидов, прекращение процесса, если амидная связь образована через  $\beta$ - или  $\gamma$ -карбоксильные группы) [119, 120]. Для решения этой проблемы Лоурсен [121] предложил связывать с носителем лизинсодержащие триптические пептиды через  $\epsilon$ -аминогруппу с помощью бифункциональных реагентов, например *n*-фенилендиизотиоцианата, или проводить связыванием с носителем после предварительного блокирования карбоксильных групп [122].

Помимо этого существуют другие возможности удерживания на носителе анализируемого триптического фрагмента белка [123, 124]. Так, Ниалл с сотр. [125] применил в качестве носителя для автоматического секвенирования на наномольном уровне синтетические полиаминокислоты типа H-(Norleu-Arg)<sub>27</sub>-NH<sub>2</sub>.

В некоторых других твердофазных секвенаторах в качестве носителя применяется 3-аминопропилстекло [126]. Введение аминогрупп осуществляется обработкой 3-аминопропилтриэтоксисилианом. Полипептидные цепи фиксируются на 3-аминопропилстекле после активации карбоксильных групп подходящим методом либо в случае лизинсодержащих пептидов с помощью *n*-фенилендиизотиоцианата. Модифицированные носители на основе стекла отличаются постоянной емкостью при присоединении пептидов и хорошей проницаемостью для потока жидкости в колонке. Лоудон и Пархам [127] предложили использовать в качестве носителя пористое стекло с определенным размером пор (CPG-стекло), содержащее карбоксильные группы, активированные N-гидроксисукцинимидом и способные присоединять пептиды с образованием амидных связей. Деградация по Эдману пептида, адсорбированного на поверхности оксида алюминия за счет ионных связей, предложена Виландом и сотр. В качестве реагента для секвенирования предложен изотиоцианат бензосульфокислоты. Манеке и Гюнцель предложили полимерный деградирующий реагент — полизотиоцианат. Введенный Штарком [128] метод тиоцианатного расщепления с С-конца был использован в твердофазном варианте [129]. С его помощью удалось идентифицировать последние 6 аминокислот рибонуклеазы.

О достижениях техники разделения при анализе последовательностей белков и пептидов сообщается в обзоре [130].

### 3.6.1.2.2.2. Ферментативные методы

В разд. 3.6.1.2.1 отмечалось, что карбоксипептидазы А, В и У преимущественно используются для определения С-концевых аминокислот. Однако при более длительном воздействии пептидная цепь может быть путем отщепления отдельных аминокислот деградирована с С-конца. Для этого необходимы определенные предпосылки. Фермент не должен содержать активных

эндопротеаз или других пептидаз (ингибиование длизопропилфторfosфатом). Кроме того, процесс нарушают С-концевые D-аминокислоты, амидные группы, пролин и гидроксипролин. Во многих нативных белках С-концевая часть доступна лишь после денатурации белка. И наконец, выделение аминокислот из реакционной смеси в порядке, соответствующем их последовательности, затруднительно, так как отщепление разных аминокислот идет с различной скоростью.

При деградации пептидов с N-конца аналогичным образом можно работать с лейцинаминопептидазой.

Другой путь ферментативной деградации возможен при использовании дипептидиламинопептидазы I [131]. Этот фермент последовательно отщепляет дипептиды с N-конца, которые затем могут быть разделены и идентифицированы. Второй набор дипептидов получают при повторении деградации той же полипептидной цепи, но укороченной на одну аминокислоту. В случае коротких пептидов полная последовательность вытекает из сопоставления данных обеих дипептидных деградаций и данных анализа полного гидролизата интактного пептида.

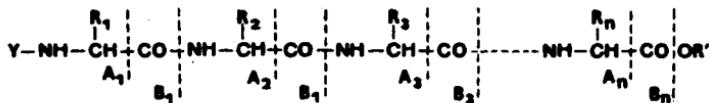
Для больших пептидов Овчинников и Кирюшкин [132] рекомендовали применение комбинированного хромато-масс-спектрометрического метода идентификации дипептидов и обработку результатов анализа на ЭВМ при использовании картотеки масс-спектров, содержащей данные для 400 возможных дипептидов.

В методе, предложенном Каллаханом с сотр. [133], пептид и дипептида за находятся с одной стороны мембраны. Отщепленный дипептид диффундирует через мембрану и затем идентифицируется с помощью тонкослойной хроматографии.

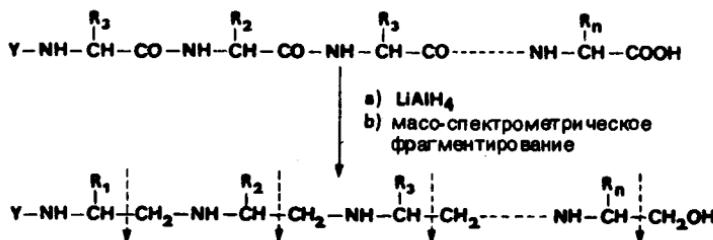
### **3.6.1.2.2.3. Физические методы**

В последнее время для анализа аминокислотных последовательностей наряду с химическими широко используются различные физические методы. Шайнблат [134] определил последовательность некоторых ди- и трипептидов с помощью ЯМР. Метод основан на изменениях спектра в зависимости от pH среды и последовательности пептида.

Большее значение имеет *масс-спектрометрический метод* установления последовательности [135]. Он основан на наблюдении за ионами, характерными для каждой последовательности и образующимися в результате расщепления связей C — CO или CO — N. В простых случаях появление амино- (A) и аминоацилфрагментов (B) и их интенсивности позволяют судить о порядке следования аминокислот и длине цепи исследуемого пептидного производного:



Обработка и отнесение спектров в случае длинных пептидов и пептидов с полифункциональными аминокислотами остатками особенно сложны, так как в этих случаях фрагментация на А и В часто перекрываются множеством других типов фрагментации. Первый метод масс-спектрометрического анализа последовательности был разработан в 1959 г. Биманном с сотр. [136] и основан на легкой расщепляемости С — С-связей в группах  $-NH-CHR-CH_2-NH-$ , образующихся при восстановлении пептида литийалюминийгидридом:



Восстановление позволило одновременно преодолеть трудности, связанные с плохой летучестью пептидных производных ( $Y =$  ацетил).

Дальнейшее развитие техники эксперимента дало возможность введение непосредственно в ионизационную камеру масс-спектрометра трифторацетильных, ацетильных и других ацилированных пептидов.

Метод масс-спектрометрии особенно удобен при выяснении структуры пептидных антибиотиков, присутствие в которых непротеиногенных аминокислот и D-энантиомеров исключает использование ферментативного расщепления.

При анализе последовательностей особенно удачна комбинация методов масс-спектрометрии и газовой хроматографии [137 — 140]. Сложные олигопептидные смеси, образующиеся при частичном гидролизе, после превращения в летучие производные разделяют на газовом хроматографе и идентифицируют с помощью масс-спектрометра. Установление последовательности осуществляют с помощью ЭВМ, основываясь на данных идентификации всех олигопептидов. Серин, тирозин и триптофан не вносят каких-либо трудностей.

### 3.6.2. Вторичная и третичная структуры [78, 81, 141 — 147]

Установленная секвенированием последовательность аминокислот может рассматриваться лишь в качестве одного из уровней структурной организации белка. Она закодирована в соответствующем гене и находится в тесной связи со вторичной и третичной структурами белка, его конформацией и биологической активностью. Образование вторичной и третичной структур

происходит в процессе или сразу после окончания биосинтеза белка (разд. 3.7.3). За их стабилизацию помимо ковалентных пептидных и дисульфидных связей ответственны прежде всего нековалентные взаимодействия боковых радикалов аминокислот.

### 3.6.2.1. Пространственное расположение полипептидной цепи

Для установления вторичной и третичной структур химические методы не применимы. Для этой цели преимущественно применяют рентгеноструктурный анализ, причем из получаемой дифракционной картины рассчитывают распределение электронных плотностей в кристалле белка. Точное установление пространственных структур белков стало возможным благодаря работам Полинга и Кори. На аминокислотах, их амидах и простых пептидах в основном с помощью рентгенографических исследований были определены длины связей и валентные углы. Оказалось, что пептидная связь в значительной степени обладает характером двойной связи. Она является планарной, поэтому в пептидной цепи на один аминокислотный остаток приходятся лишь два места поворота. Одним является поворот вокруг  $C^{\alpha}$ —N-связи (угол  $\varphi$ ), другим — вращение вокруг оси  $C^{\alpha}$ —C-связи (угол  $\psi$ ). Значения  $\varphi$  и  $\psi$  для всех остатков аминокислот определяют пространственное расположение цепи.

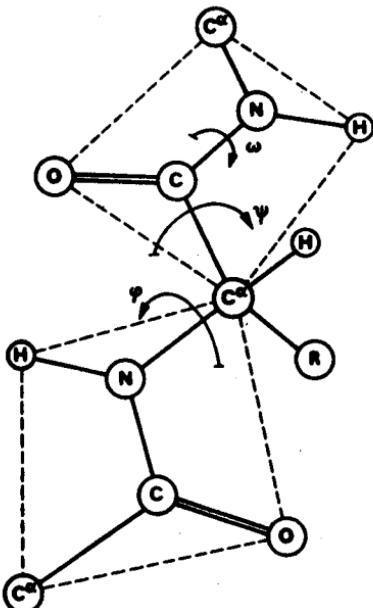


Рис. 3-11. Возможные углы поворота в полипептидной цепи.

Из планарности пептидной связи следует, что угол поворота  $\omega = 0$  (рентгеноструктурными исследованиями белков была показана возможность незначительного поворота с выходом из планарности). По определению углы  $\varphi$  и  $\psi$  получают положительное значение, если, при наблюдении от  $C^\alpha$ -атома, вращение осуществляется по часовой стрелке. Принципиально для этих углов разрешены не все значения; это ограничение определяется радиусами взаимодействия не связанных друг с другом атомов. Рамачандран и др. [148, 149] исследовали на различных моделях с помощью ЭВМ все возможные комбинации углов поворота  $\varphi$  и  $\psi$  (в табл. 3-7 приведены минимальные расстояния между ковалентно не связанными атомами, которые были взяты для расчетов стерически разрешенных и запрещенных конформаций белковой молекулы при отклонении ее от планарности амидной связи). Из-за стерических ограничений практически реализуется лишь 15% всех возможных значений  $\varphi$  и  $\psi$ .

**Таблица 3-7.** Минимальные расстояния (нм) между ковалентно не связанными атомами, полученные из вандерваальсовых радиусов (в скобках приведены минимальные расстояния по Рамачандрану)

	C	O	N	H
C	0,32 (0,30)	0,28 (0,27)	0,29 (0,28)	0,24 (0,22)
O		0,27 (0,26)	0,27 (0,26)	0,24 (0,22)
N			0,27 (0,26)	0,24 (0,22)
H				0,20 (0,19)

На  $\varphi$ ,  $\psi$ -диаграмме (рис. 3-12) *транс*-пептидных конформаций Рамачандрана разрешенные комбинации углов  $\varphi$  и  $\psi$  лежат в защищированной области (расчет произведен с нормальными радиусами атомов; табл. 3-7). Используя минимальные контактные расстояния, разрешенную зону расширяют (ограничена штриховой линией), и в окрестностях точки  $\varphi = \psi = 240^\circ$  появляется новая разрешенная область.

Комбинации разрешенных углов  $\varphi$  и  $\psi$ , рассчитанные Рамачандраном для модели из твердых сфер, соответствуют максимально устойчивым конформациям. Значительно влияют на стерически разрешенные конформации объемные боковые радикалы аминокислот. Приведенная на рис. 3-12  $\varphi$ ,  $\psi$ -диаграмма базируется на расчетах, сделанных для аланина. Для глицина разрешено значительно больше комбинаций углов, чем, например, для валина или изолейцина.

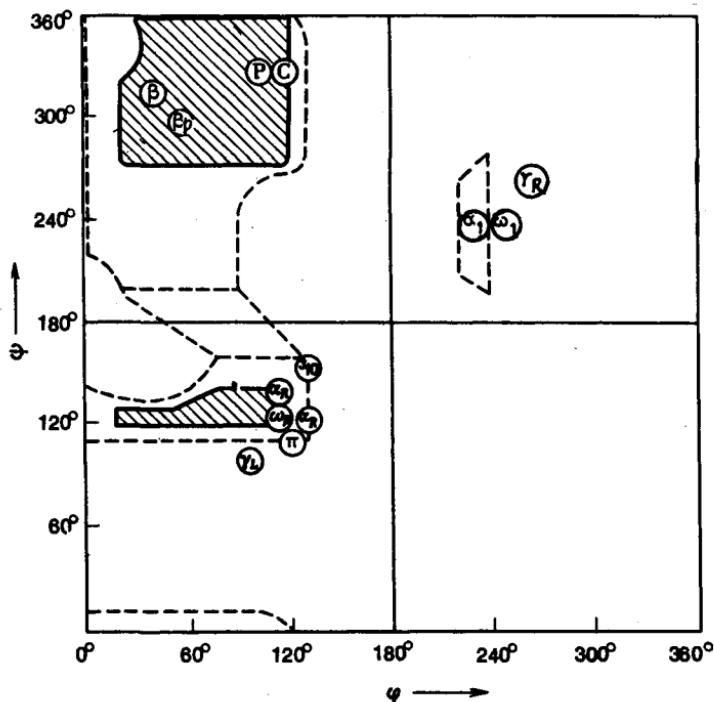


Рис. 3-12. Диаграмма разрешенных значений углов  $\varphi$  и  $\psi$  [148, 149].  
Обозначения: Р — полипролиновая спираль; С — коллагеновая спираль;  
 $\beta$  — антипараллельная  $\beta$ -структуря;  $\beta_p$  — параллельная  $\beta$ -структуря;  
 $\alpha_R$  и  $\alpha_L$  — лево- и правовращающая  $\alpha$ -спираль;  $\omega_R$  и  $\omega_L$  — лево- и  
правовращающая  $\omega$ -спираль;  $\gamma_R$  и  $\gamma_L$  — лево- и правовращающая  
 $\gamma$ -спираль;  $3_{10}$  —  $3_{10}$ -спираль.

В 1951 г. Полинг [150, 151] разработал две относительно простые структурные модели, спиральную и складчатого листа, объясняемые исключительно планарностью пептидной связи и водородными связями между пептидными группами и образующие основу для построения высших структур. Модели нашли свое подтверждение в пространственно-структурных исследованиях Перутца [152].

Определение вторичной структуры белков возможно также с помощью лазерной спектроскопии комбинационного рассеяния [153]. Установление вторичной структуры глобуллярных белков с помощью ЭВМ открывает дальнейшие интересные возможности [154].

### 3.6.2.1.1. Спиральные структуры [155, 156]

Идентичность значений углов  $\varphi$  и  $\psi$  при каждом атоме пептидной связи в пептидной цепи неизбежно дает спираль с определенным числом  $n$  аминокислотных остатков на виток, характерной высотой  $h$  витка и определенным подъемом  $d$  на каждый остаток (рис. 3-13). Принимая во внимание планарность пептидной связи, величины  $n$  и  $d$  однозначно определяются из углов  $\varphi$  и  $\psi$ , а зная  $n$  и  $d$ , можно получить высоту витка спирали  $h$ .

Возможно существование нескольких различных спиральных структур, возникающих при образовании водородных связей между структурными элементами пептидной связи ( $\text{NH}$ - и  $\text{CO}$ -группы), из которых наиболее известна  $\alpha$ -спираль (рис. 3-14) с параметрами:  $n = 3,6$ ,  $d = 0,15$  нм и  $h = 0,54$  нм. В случае  $\alpha$ -спирали за счет внутримолекулярных водородных связей образуется 13-членная кольцевая структура. Правильно называть такую структуру можно так:  $\alpha(3,6_{13})$ -спираль. Другими упорядоченными конформациями спирального типа для остова молекулы белка являются  $3_{10}$ -спираль,  $\pi(4,4_{16})$ -спираль и  $\gamma(5,1_{17})$ -спираль.

В глобулярных белках доминирует правовращающая  $\alpha$ -спираль, кроме того, в отдельных белках (гемоглобин, лизоцим) показано наличие  $3_{10}$ -спирали. В  $\alpha$ -кератине высота витка  $\alpha$ -спирали меньше (0,51 нм), чем соответствующая величина (0,54 нм) в нормальной  $\alpha$ -спирале.

Принципиально  $\alpha$ -спираль может быть образована как L-, так и D-аминокислотными остатками. Склонность полипептидной цепи к образованию спиральной структуры в значительной степени зависит от природы боковых цепей аминокислот. Различают стабилизирующие спираль аминокислоты (Ala, Val, Leu, Phe, Trp, Met, His, Gln) и дестабилизирующие (Gly, Glu, Asp, Ile, Thr, Lys, Arg, Tug, Asn, Ser). В случае кислых и основных аминокислот дестабилизирующее действие определяется наличием зарядов на боковых группах. В полиглутаминовой кислоте и полилизине, например,  $\alpha$ -спираль образуется при pH 2 и 12 соответственно, т. е. при преобладании незаряженных боковых функциональных групп. При одноименном заряженных боковых группах силы отталкивания сильнее, чем прочность стабилизирующих водородных связей. В случае, изолейцина дестаби-

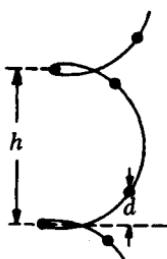


Рис. 3-13. Спираль с тремя остатками на виток (по Хагемайеру).

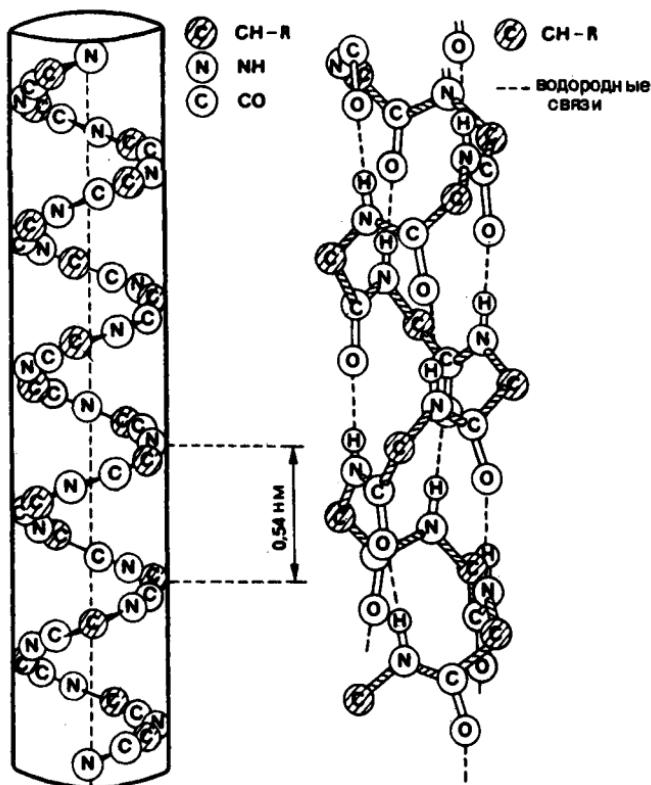


Рис. 3-14. Структура  $\alpha$ -спирали (по Рапопорту).

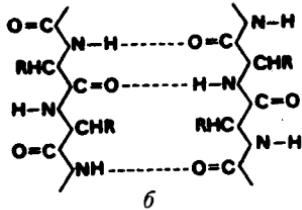
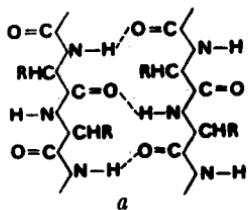
лизирующее действие объясняется стерическим эффектом. Наличие пролина всегда ведет к прерыванию спирали, образуемой полипептидной цепью (точка излома), так как в этом случае атом азота зафиксирован в составе пирролидинового кольца и не способен образовывать водородную связь.  $\alpha$ -Спиральность полипептидной цепи может быть приблизительно определена сравнением удельного оптического вращения до и после денатурации. При денатурации белков наблюдается увеличение угла вращения влево.

### 3.6.2.1.2. Структура складчатого листа

Как и в спиральной структуре, максимальное замыкание водородных связей может достигаться между двумя идущими в противоположном направлении пептидными цепями. Стерические затруднения, вызванные боковыми группами, вынуждают пептидные группировки к повороту относительно

друг друга. Образующаяся структура называется структурой складчатого листа или  $\beta$ -структурой.

В зависимости от параллельности или антипараллельности хода двух соседних цепей различают два вида структур: *параллельную (а)* и *антипараллельную (б)* структуры складчатого листа.



Соседние полипептидные цепи, идущие в противоположном направлении, в пространственном представлении (рис. 3-15) обнаруживают «плиссированность», причем боковые радикалы аминокислотных остатков стоят попеременно с разных сторон складчатого листа. Штрихами показаны водородные связи. Соответствующие пары углов  $\varphi$  и  $\psi$  для параллельной и антипараллельной структур могут быть получены из рис. 3-12.

$\beta$ -Структура присутствует в фибронине шелка. Она может также образовываться в различных белковых доменах, например в доменах карбоксипептидазы А и лизоцима.

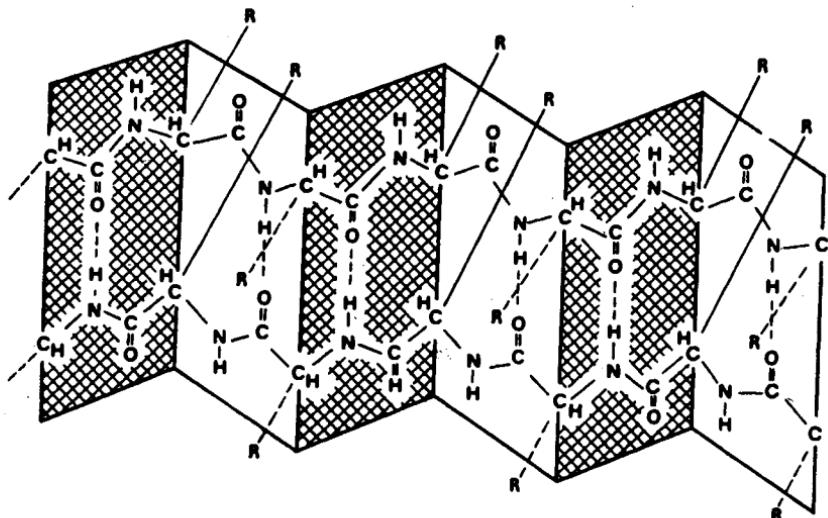


Рис. 3-15. Антипараллельная структура складчатого листа.

### 3.6.2.1.3. Неупорядоченные конформации полипептидной цепи

Как в случае спиральной структуры, так и структуры складчатого листа пары углов  $\varphi$  и  $\psi$  для всех аминокислотных остатков лежат в одной точке диаграммы Рамачандрана (рис. 3-12). Напротив, в случае неупорядоченной конформации эти пары углов для различных аминокислотных остатков не находятся в одной точке, а распределяются по разрешенной области диаграммы. Вследствие этого образуется огромное разнообразие конформаций, причем распределение всех комбинаций углов не является равномерным статистическим в математическом смысле. Ограничения возможных конформаций вытекают из взаимного расположения имеющихся боковых групп, а также из их взаимодействий с растворителем. По энергетическим причинам это приводит к предпочтению определенных локальных конформаций.

Неупорядоченные белковые конформации появляются при процессах денатурации, при переходах спираль — клубок, у синтетических полиаминокислот и др. Кинетические и теоретические проблемы переходов спираль — клубок освещены в обзорных работах [157, 158].

Это определение не следует прямо переносить на конформации глобулярных белков. Например, у химотрипсина неупорядоченные области не сравнимы со статистическим клубком. Более того, пары углов  $\varphi$  и  $\psi$  для каждого аминокислотного остатка принимают свои определенные значения.

### 3.6.2.1.4. Третичная структура глобулярных белков

До сих пор при рассмотрении периодических структурных элементов полипептидной цепи не принималось во внимание влияние боковых радикалов аминокислот на конформацию белковой молекулы. Но белки, в особенности глобулярные, характеризуются трехмерным расположением полипептидной цепи, за стабилизацию которого помимо обсуждавшихся водородных связей в основном ответственны нековалентные взаимодействия.

При той причине, что белки функционируют в водной среде, а вода обладает исключительно сильно выраженным деассоциирующим действием, образование белковых конформаций не может быть объяснено одним лишь большим числом водородных связей в спиральной и  $\beta$ -структурах. Помимо водородных связей решающий вклад в стабилизацию конформаций вносят ионные связи, вандерваальсовы дисперсионные силы и особенно гидрофобные взаимодействия. Под гидрофобными взаимодействиями понимают тот факт, что в водной среде гидрофобные группы плотно контактируют друг с другом с тем, чтобы уменьшить поверхность контакта с водой. Причина этого лежит в том, что соприкосновение гидрофобных групп с окружающими молекулами воды энергетически невыгодно. Об этом говорит то, что значение  $\Delta H^\circ$  слегка превышает нулевое. Рассмотрим окружение некоторого гидрофобного бокового радикала таким образом, что оно будет охарактеризовано определенным упорядоченным состоянием молекул воды. Если две гидрофобные группы вступают во взаимодействие, то умень-

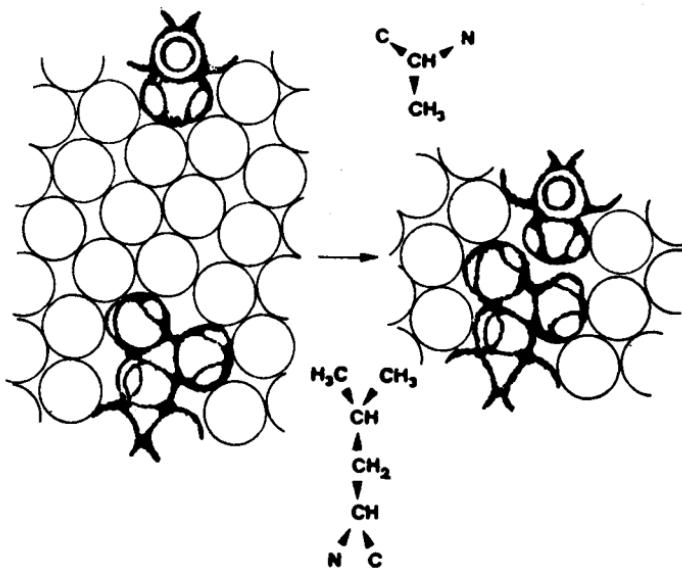


Рис. 3-16. Гидрофобные взаимодействия.

шается упорядоченность молекул воды (рис. 3-16). В соответствии с уравнением

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

результатом этого является прирост энтропии и, следовательно, появление отрицательной свободной энталпии.

Фактором, благоприятствующим гидрофобным взаимодействиям, является изменение энтропии, точнее говоря, ее прирост. В случае глобулярных белков полярные и прежде всего почти все ионные группы находятся на поверхности, чем облегчается гидратация молекулы белка, имеющая большое значение для стабилизации пространственной структуры. У некоторых белков удаление воды неизбежно связано с их денатурацией. Большая часть неполярных остатков, напротив, находится внутри молекулы белка. Они укладываются плотно один к другому и практически выдавливают воду из первоначально еще непрочной клубковой структуры полипептидной цепи, что приводит к компактности и стабильности гидрофобного ядра. Само собой разумеется, что часть функциональных (ионных) групп боковых цепей находится внутри молекулы белка. Группы, оказавшиеся замаскированными, не подвергаются внешним воздействиям (изменение pH, реакции модификации и др.). Более того, измененная реакционноспособность таких функциональных групп, имеющая значение для каталического действия ферментов, определяется гидрофобным окружением и взаимодействием с

другими группами. В общем случае пространственная укладка полипептидной цепи глобулярных белков характеризуется относительно небольшой долей периодических структурных элементов ( $\beta$ -структура,  $\alpha$ -спираль) и обнаруживает несимметричное и нерегулярное строение. В конечном счете причиной образования конформаций высокой стабильности является кооперативность между водородными и гидрофобными связями, а также другими нековалентными взаимодействиями, причем для биологически активных белков в физиологических условиях проявляются термодинамически стабильные конформации с минимальной свободной энергией.

Обобщая, остается сказать, что конформация остава белковой молекулы вносят решающую долю в формирование конформации глобулярного белка. Однако с помощью нековалентных взаимодействий (гидрофобные, диполь-дипольные взаимодействия, ионные связи, дисперсионные силы) осуществляется образование стабильной трехмерной структуры белка, имеющей исключительное значение для биологической функции глобулярного белка.

Следует указать также, что гидрофобные взаимодействия сами могут иметь значение для стабилизации определенной конформации ( $\alpha$ -спираль,  $\beta$ -структура) остава молекулы белка.

### 3.6.2.2. Методы установления пространственной структуры белков

При рентгеноструктурном анализе белка неизвестной структуры регистрируется интерференционная картина от кристалла белка. Исходя из положения, числа и интенсивности рефлексов (максимумов интерференции) при определенных условиях, можно установить структуру рассеивающего кристалла [159, 160]. Вычисление распределения электронных плотностей осуществляется по формуле

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{h=-\infty}^{+\infty} \sum_{k=-\infty}^{+\infty} \sum_{l=-\infty}^{+\infty} |F(hkl)| \cos 2\pi [(hx + ky + lz - \alpha(hkl))]$$

Вся установка для рентгеноструктурного анализа автоматизирована и связана с ЭВМ. Вычисляют распределение электронных плотностей  $\rho(x, y, z)$  в элементарной ячейке. Каждый рефлекс характеризуется с помощью индексов Миллера  $h$ ,  $k$  и  $l$ .  $V$  — объем элементарной ячейки,  $F(h, k, l)$  — структурный фактор и  $\alpha(h, k, l)$  — соответствующий фазовый угол. Последний должен быть определен косвенными методами, в то время как остальные величины вытекают из дифракционной картины.

Значения электронной плотности вычисляются по слоям, в которых точки равной плотности соединяют линиями. Таким образом, получают послойную диаграмму кристалла белка.

Установить структуры больших молекул белка стало возможным только при применении производных с тяжелыми атомами. Тяжелый атом, например атом рту-

ти, встраивается в поверхность молекулы. Это приводит к незначительным изменениям в структуре (изоморфное замещение), однако изменяет интенсивности рентгеновских рефлексов.

При применении нескольких производных с тяжелыми атомами на основе появляющихся изменений интенсивностей можно определить фазовый угол и затем рассчитать электронные плотности. Проведение такого структурного анализа кристаллов весьма трудоемко даже тогда, когда для сложных расчетов в распоряжении исследователя имеется высокопроизводительная вычислительная техника. Так, с кристалла белка и кристаллов различных изоморфных производных того же белка должно быть получено, измерено и скорректировано множество рефлексов. За этим следует установление положения тяжелых атомов и определение фазового угла для каждого рефлекса. Затем для нескольких десятков тысяч точек должны быть рассчитаны электронные плотности, и в заключение результаты должны быть интерпретированы.

Поскольку определение электронных плотностей с небольшим разрешением (0,5 нм) не столь трудоемко, обычно начинают исследование структуры кристалла белка с этого этапа. Тонкая структура, т. е. положение отдельных атомов, требует разрешающей способности 0,15 нм. Развитие этого метода, осуществленное в 1952 — 1960 гг. лабораториями Кендрию и Перутца, стало значительным научным достижением. Обзоры по установлению пространственной структуры белков написаны Хоппе [161], а также Дикерсоном и Гайсом [78]. К настоящему времени известны пространственные структуры более 50 белков.

Есть указания на принципиальную возможность анализа структуры кристалла белка с помощью электронного излучения, а также посредством метода нейтронного рассеяния [162]. В будущем, вероятно, приобретут значение математические методы, которые позволят осуществлять на ЭВМ расчет третичной структуры на основе данных о первичной структуре [163]. Первые попытки, в основном в применении к спиральным белкам (многолобин), привели к интересным результатам [164]. Хеглер и Хониг [165] рассчитали на примере полипептидной цепи, составленной из глицина и аланина, условия, необходимые для образования компактной глобуллярной структуры белка.

В случае аденилаткиназы данные, полученные из предсказания структуры белка, сопоставимы с данными рентгеноструктурного анализа. Совпадение выявилось в идентификации  $\alpha$ -спиралей, а также в установлении контактов между тремя полипептидными цепями пятицепочечной  $\beta$ -структурой. Наиболее точно были определены точки «перелома» белковой цепи [166]. К другим стратегиям установления конформаций некристаллизующихся белков можно отнести кинетические исследования де- и ренатурации с целью локализации центров свертывания [167] и палеонтологические сопоставления, позволяющие выявить родственные связи между белками [168].

Для изучения конформации в физиологических условиях применяются различные спектроскопические методы. ЯМР-спектроскопия высокого разрешения, особенно в сочетании с КД-техникой, позволяет проводить на-

дежный анализ и интерпретировать сложные спектральные параметры. В противоположность упорядоченному состоянию в кристаллах в растворе наблюдается большое число конформаций.

Взаимодействие пептидов и белков с их окружением (гормон — рецептор, фермент — субстрат) приводит к конформационным изменениям участвующих молекул, которые можно проследить спектроскопически так же, как конформационные изменения, вызванные влиянием растворителей, комплексообразованием с ионами металлов или биологическими рецепторами.

Изменения конформации полипептидной цепи ( $\alpha$ -спираль,  $\beta$ -структура, статистический клубок) могут быть также определены с помощью инфракрасной спектроскопии. Характерные полосы «амид I» и «амид II» изменяют положение максимума в зависимости от конформации. Измерение дихроизма в инфракрасной области с помощью плоскополяризованного излучения дает возможность однозначно различить  $\alpha$ -спираль и  $\beta$ -структуру.

В УФ-области конформационные изменения белков лишь в незначительной степени влияют на абсорбцию, поэтому здесь наиболее достоверным методом является дифференциальная спектроскопия. Из сдвига спектра в коротко- или длинноволновую область, не связанного с изменениями интенсивности, могут быть получены данные о конформации белка в водном растворе.

*Дисперсия оптического вращения* (ДОВ) и *круговой дихроизм* (КД) изучались на большом числе белков [171, 172], но интерпретация этих данных относительно сложна.

Стремясь облегчить интерпретацию, пробуют установить связь между эффектом Коттона и данными рентгеноструктурного анализа. Этим методом было, например, показано высокое содержание  $\alpha$ -спиралей в миоглобине и немного меньшее (с участками  $\beta$ -структуры) в лизоцимне, карбооксипептидазе А и папапине, в то время как в рибонуклеазе и химотрипсине  $\alpha$ -спиральность оказалась очень низкой. Хорошая корреляция рентгеноструктурных данных и результатов ДОВ и КД была получена на миоглобине и лизоцимне, т. е. на белках с высокой спиральностью, но не удалась на химотрипсине.

Очевидно, в неспиральных белках на эффект Коттона сильно влияют другие элементы пространственной структуры, например асимметрия, присущая дисульфидным связям или ароматическим остаткам в окружении асимметрических центров, что приводит к более или менее сильным искажениям. Кроме того, проявляемый эффект в случае  $\beta$ -структуры намного ниже, чем в случае  $\alpha$ -спиралей. Ситуация усложняется еще тем, что и другие структуры обуславливают эффект Коттона подобно  $\alpha$ -спиралям.

Несмотря на эти ограничения, хироптические методы получили большое значение при конформационном анализе белков. Результативным является прямое сравнение данных, полученных на нативных и денатурированных белках, а также распространение исследований на химически модифицированные белки.

Метод водородно-дейтериевого обмена позволяет определить в белке число и вид водородных связей. Метод основан на том, что атом водоро-

да, связанный со свободной электронной парой другого атома, может в виде протона очень быстро обмениваться с протонами растворителя. Атомы водорода, связанные с атомами углерода, в обмене участия не принимают. На этой основе выработаны различные экспериментальные варианты метода.

Например, за обменом протонов пептильных связей можно наблюдать непосредственно, следя за исчезновением полосы деформационных колебаний N — H при  $1550 \text{ см}^{-1}$ . В то же время при длительной обработке тяжелой водой ( $D_2O$ ) все замещаемые атомы водорода обмениваются на дейтерий. Затем в воде посредством ИК-спектроскопии или измерения плотности снимается кинетика замещения дейтерия. Однозначность получаемых результатов ограничена даже при том условии, что применяются очень чистые белки.

В заключении можно констатировать, что как приведенные здесь, так и другие методы исследования конформаций полипептидов и белков в растворе по отдельности дают информацию лишь о некоторых аспектах структуры белка, однако совместное применение различных методов ведет к получению более надежных результатов.

### 3.6.3. Четвертичная структура [173 — 174]

Под четвертичной структурой понимают построение олигомерного белка из определенного комплекса нескольких полипептидных цепей. Ассоциация двух или нескольких полипептидных цепей происходит под действием межмолекулярных взаимодействий между полярными, ионизируемыми и неполярными боковыми группами посредством диполь-дипольных взаимодействий, водородных связей, гидрофобных взаимодействий и образования ионных пар. В исключительных случаях четвертичная структура также стабилизируется дисульфидными мостиками.

Все четвертичные структуры характеризуются как стехиометрическим составом, так и геометрией строения. Наименьшая, как правило связанный нековалентно, часть белка, имеющего четвертичную структуру, называется *субъединицей*.

Четвертичная структура может быть как гомогенной, так и гетерогенной. В первом случае в функциональную структуру ассоциированы только идентичные полипептидные цепи, в то время как элементами белков с гетерогенной четвертичной структурой являются неидентичные цепи. Оказалось, что у глобулярных белков с  $M > 50\,000$  всегда доминирует четвертичная структура. До 1974 г. было известно приблизительно 650 белков с четвертичной структурой, из них ~ 500 ферментов. Принцип образования четвертичной структуры имеет важное значение для функции белка. Например, становятся возможными кооперативные реакции, имеющие значение для регуляторных процессов в клетке.

Регуляторные ферменты, в отличие от нерегуляторных одноцепочечных, состоят в основном из субъединиц.

Таблица 3-8. Молекулярные массы и состав некоторых белков, имеющих четвертичную структуру

Белок	Источник	<i>M</i>	Субъединицы	
			Число	<i>M</i>
Гемоглобин	Кровь млекопитающих	64 250	4 ( $\alpha_2\beta_2$ )	$\alpha$ : 15 130 $\beta$ : 15 870
Вирус табачной мозаики	Инфицированные листья	39 400 000	2130	17 530
Конканавалин А	<i>Canavalia ensiformis</i>	55 000	2 <sup>a</sup>	27 000
Лактоглобулин		36 750	2 <sup>a</sup>	18 375
Энтеротоксин	Холерные вибрионы	84 000	6 <sup>a</sup>	14 000
Церулоплазмин	Плазма	125 000	4 ( $\alpha_2\beta_2$ )	$\alpha$ : 16 000 $\beta$ : 53 000
Нервный ростовой фактор	Мышь	26 520	2 <sup>a</sup>	13 260
Репрессор лактозы	<i>E. coli</i>	150 000	4 <sup>a</sup>	39 000
Каталаза	Печень теленка	240 000	4 <sup>a</sup>	60 000
Алкогольдегидрогеназа	Дрожжи	141 000	4 <sup>a</sup>	35 000
Люцифераза	<i>Renilla</i>	34 000	3 <sup>a</sup>	12 000
Малатдегидрогеназа	Нейроспора	54 000	4 ( $\alpha_2\beta_2$ )	13 500
Аспартаткиназа	<i>Vac. polyleuca</i>	116 000	4 ( $\alpha_2\beta_2$ )	$\alpha$ : 17 000 $\beta$ : 43 000
Лейцинаминопептидаза	Хрусталик глаза, почки свиньи	30 000 255 000	6 <sup>a</sup> 4 <sup>a</sup>	58 000 63 500
Глутаминосинтетаза	Мозг свиньи, почки свиньи	370 000 370 000	8 <sup>a</sup> 4 <sup>a</sup>	46 000 90 000
Фосфофрукто-киназа	Дрожжи	770 000	6 <sup>a</sup>	130 000
Аргининдекарбоксилаза	<i>E. coli</i>	850 000	10 <sup>a</sup>	82 000

<sup>a</sup> Идентичные субъединицы.

Построение из субъединиц дает, наконец, значительную экономию генетического материала.

Принципы организации олигомерных ферментов рассмотрены в обзоре [175].

Установление четвертичной структуры возможно непосредственно с помощью электронной микроскопии и рентгеноструктурного анализа. В то

же время известны различные методы диссоциации олигомерного белка на субъединицы для последующего их изучения. Диссоциация возможна при обработке 1%-ным додецилсульфатом натрия, 6 М гуанидингидрохлоридом и 8 М мочевиной. Часто уже достаточно изменения ионной силы, pH, концентрации белка, температуры, добавления или удаления кофактора или других химических модификаций.

Большое значение при доказательстве и определении молекулярной массы субъединиц имеют ультрацентрифугирование, ДСН-электрофорез в поликариламиде, гель-фильтрация и другие уже рассмотренные ранее методы (разд. 3.5.4). В этой связи надо упомянуть, что в условиях диссоциации не только регуляторные, но и катализитические функции ферментов сильно повреждаются или совершенно теряются.

В табл. 3-8 приведены примеры белков, имеющих четвертичную структуру.

### 3.7. Биосинтез белков [176 — 179]

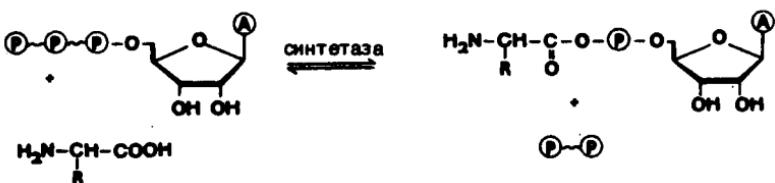
Несмотря на то что существует еще много неясных вопросов, в выяснении механизма биосинтеза белка в последние годы достигнуты значительные успехи. Различают в основном три основные стадии процесса:

- 1) активации аминокислот и их связывание с tРНК;
- 2) образование полипептидной цепи на рибосоме;
- 3) отделение готового белка от рибосомы.

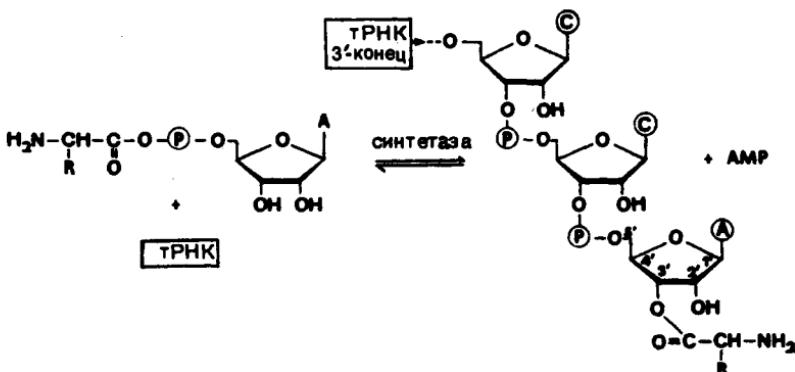
Для протекания каждой стадии процесса необходимы специфические ферменты и кофакторы.

#### 3.7.1. Активация аминокислот и их связывание с tРНК

Активация карбоксильных групп аминокислот осуществляется в цитоплазме под действием специфических аминоацил-tРНК-сингтетаз при участии аденоизнтрифосфата и Mg<sup>2+</sup>. Сначала при элиминировании пирофосфата образуется смешанный ангидрид аминокислоты и фосфатного остатка адениловой кислоты, который существует только в виде комплекса с ферментом.



На последующей стадии реакции активированная аминоацильная группа переносится на тРНК, причем действует та же синтетаза и при отщеплении аденоzinмонофосфата образуется сложнозефирная связь с рибозой 3'-концевого аденоцина тРНК:



Для каждой из 20 аминокислот имеется особая тРНК и особая аминоацил-тРНК-синтетаза. Структуры ряда синтетаз известны. Их молекулярные массы соответствуют интервалу 46 000 — 140 000 для одно- и двухцепочных ферментов и 220 000 — 290 000 для четырехцепочных  $\alpha_2\beta_2$ -типа. Они построены из субъединиц симметрично, но в противоположность другим глобуллярным белкам — ферментам — обладают менее компактной структурой. Места связывания аминокислоты и тРНК могут быть локализованы на различных субъединицах.

Димерный белок *тироазил-тРНК-синтетаза*, для которой сделан рентгеноструктурный анализ с разрешением 0,27 нм, характеризуется  $M \approx 90\ 000$  и размером молекулы 13 нм. Узнавание ферментом нужной аминокислоты и тРНК происходит с исключительной точностью. Комплекс фермент — аминокислота образуется путем электростатического взаимодействия с элементами белковой структуры, а также за счет полярных и гидрофобных связей с боковой цепью аминокислоты. Условием для образования комплекса является наличие правильной конфигурации аминокислоты.

Транспортная РНК, функционирующая в качестве переносчика аминокислоты, состоит из 73 — 93 нуклеотидных остатков и соответственно  $M \approx 25\ 000$ . В состав тРНК помимо обычных нуклеиновых оснований (A, U, G, C) входит ряд редких оснований, часть из которых образуется путем метилирования обычных. Редкие элементы структуры могут препятствовать спариванию оснований в неспариваемых областях петель и защищать молекулу от гидролитического разрушения нуклеазами.

Известны нуклеотидные последовательности более чем 120 тРНК. Они имеют похожие вторичные структуры, условно названные структурами клеверного листа.

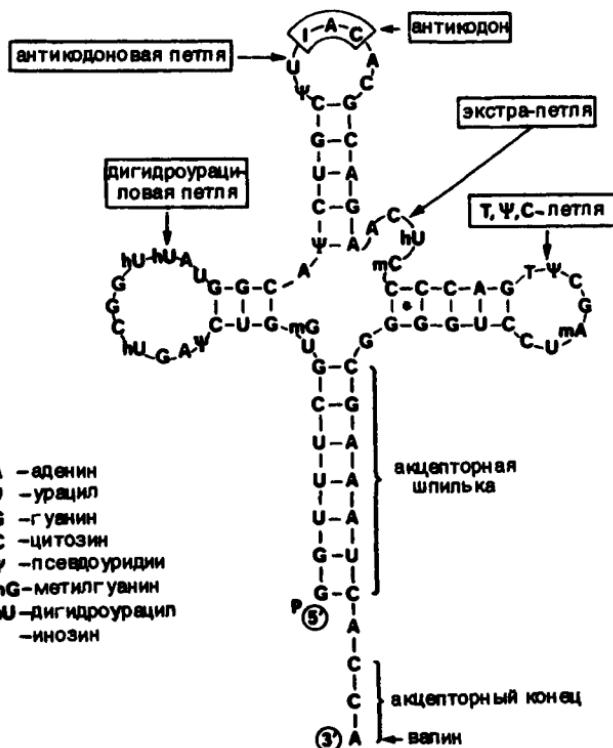


Рис. 3-17. Вторичная структура тРНК<sup>Val</sup> из дрожжей (структуря клеверного листа).

Все тРНК имеют аминоацил-акцепторную «шпильку» (7 пар оснований), заканчивающуюся общей для всех аминокислот последовательностью -С-С-А, дигидроуридиновую «шпильку» (3—4 пары оснований), антикодоновую «шпильку» (5 пар оснований) и T<sub>Ψ</sub>C-«шпильку» с 4—5 парами оснований (рис. 3-17).

Петли, находящиеся на шпильках, символизируют структуру клеверного листа; шпильки и петли образуют в каждом отдельном случае своеобразную «руку». Анти-кодоновая и  $T\psi C$ -петля состоят из 7 оснований каждая, дигидроурациловая из 7 — 10 и экстра-петля из 4 — 21 основания; последняя образует вариабельную «руку».

Рентгеноструктурным анализом была определена третичная структура фенилаланиновой tРНК из дрожжей [182, 183]. Согласно этим данным, молекула имеет форму буквы L. Угол буквы образован дигидроурациловой, T<sub>4</sub>C- и вариабельной «руками». Все области шпилек имеют структуру двойных спиралей.

На рис. 3-18 рибозофосфатная цепь показана как сплошная полоса. Можно увидеть заштрихованные «руки» tРНК и водородные мостики между парами оснований. В фермент-субстратном комплексе внутренняя часть L и поверхность фермента находятся в тесном контакте (пунктирная линия).

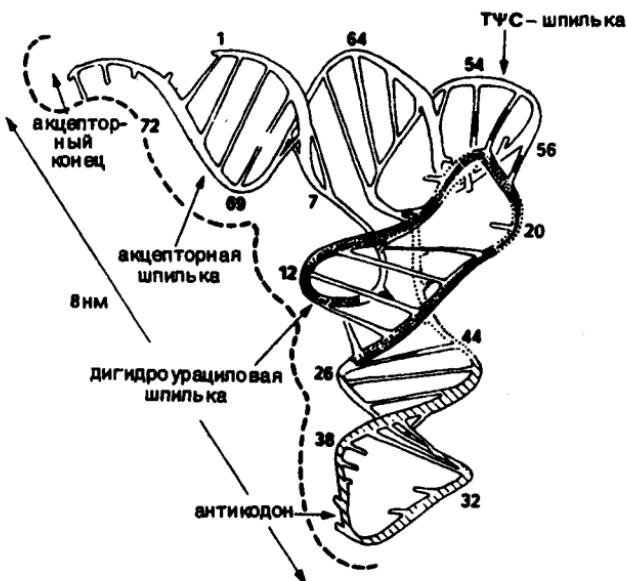


Рис. 3-18. Третичная структура тРНК<sup>Phe</sup> из дрожжей.

Если тРНК этерифицируется какой-либо «неправильной» аминокислотой, тогда такая сложноэфирная связь снова расщепляется необычно быстро работающим корректирующим механизмом [186, 187]. Гидролиз сложноэфирной связи («неправильных» эфиров), катализируемый синтетазой, протекает еще до диссоциации комплекса фермент — тРНК. Об этапах активации аминокислот при биосинтезе белка сообщает Хаар [188].

### 3.7.2. Образование полипептидной цепи на рибосоме

Информация, необходимая для построения определенной аминокислотной последовательности, содержится в дезоксирибонуклеиновой кислоте (ДНК). Молекула ДНК является полинуклеотидом, образованным основаниями аденином (А), гуанином (Г), цитозином (С), тимином (Т), остатками фосфорной кислоты и 2-дезоксирибозой в качестве углеводного компонента. Все ДНК построены как регулярные двойные спирали, структура которых стабилизирована водородными связями между комплементарными парами оснований А — Т и Г — С. В ДНК каждые три следующих один за другим нуклеотида (триплетный код) кодируют одну аминокислоту [189 — 192]. Для 20 протеиногенных аминокислот существуют 64 кодовые единицы (кодона), из которых по 6 приходится на аминокислоты Leu,

Таблица 3-9. Генетический код

	1-е основание		2-е основание		3-е основание	
	U	C	A	G		
U	Phe	Ser	Tyt	Cys	U	
	Phe	Ser	Tyt	Cys	C	
	Leu	Ser	term	term	A	
	Leu	Ser	term	Trp	G	
C	Leu	Pro	His	Arg	U	
	Leu	Pro	His	Arg	C	
	Leu	Pro	Gln	Arg	A	
	Leu	Pro	Gln	Arg	G	
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U	
	Ile	Thr	Asn	Ser	C	
	Ile	Thr	Lys	Arg	A	
	Met	Thr	Lys	Arg	G	
G	Val	Ala	Asp	Gly	U	
	Val	Ala	Asp	Gly	C	
	Val	Ala	Glu	Gly	A	
	Val	Ala	Glu	Gly	G	

Arg, Ser, по 4 — на Pro, Thr, Val, Ala и Gly, 3 — на Ile, 2 — на Phe, Tyt, Cys, His, Gln, Asn, Glu, Asp, Lys и по одной приходится на Met и Trp.

Содержащиеся в генетическом коде триплеты UAG, UAA и UGA не кодируют какую-либо аминокислоту, а определяют конец цепи. Ранее они были названы «бессмысленными» (nonsense) кодонами.

Для начала биосинтеза белка информация, содержащаяся в ДНК, должна быть прежде всего перенесена к рибосоме. Это осуществляется через матричную (информационную) РНК (мРНК), представляющую собой однозпеченную рибонуклеиновую кислоту, содержащую рибозу на месте дезоксирибозы и урацил на месте тимина. Построение мРНК осуществляется по принципу идентичной репликации на локально расплетенном участке ДНК (рис. 3-19) и называется транскрипцией.

Помимо модели Уотсона — Крика процесс репликации может быть объяснен моделью Родлес («side-by-side»-модель, SBS-модель). Процесс начинается с параллельной укладки цепей ДНК. Нити, связанные друг с другом водородными связями комплементарных оснований, принимают форму волнистой ленты. Каждая цепь образует сначала на длине полупериода повторяемости (10 оснований) правовращающую спираль, затем переламывается и далее идет обратно как левовращающая спираль. Характерные свойства (спаривание и укладка оснований, период повторяемости) остаются в модели SBS. Модель, ставящая под сомнение уникальность модели Уотсона — Крика, помимо прочего, лучше интерпретирует репликацию

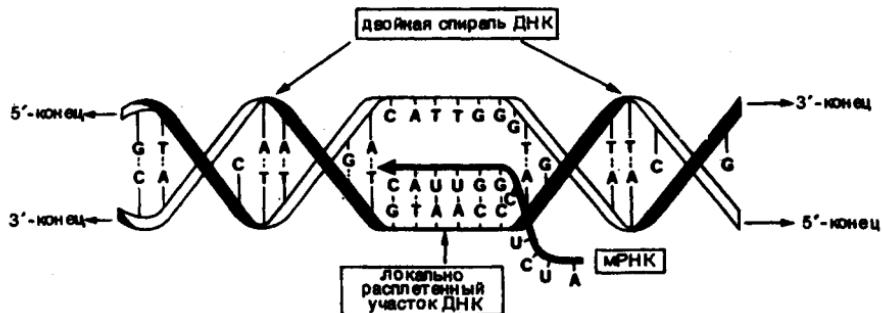


Рис. 3-19. Ферментативный синтез мРНК на матрице ДНК (асимметричная транскрипция ДНК).

длинных цепей ДНК, а также бактериальных кольцевых ДНК. Последние конформационные исследования на двухцепочечных ДНК допускают возможность переходов между двойной спиралью и расплетенной структурой.

Расплетенная переходная конформация названа *цис-лестничной*. В ней сахарофосфатные цепи находятся в *цис*-положении по отношению к парам оснований, которые в свою очередь располагаются как ступеньки лестницы. Нити ДНК могут без разрыва переходить из *цис-лестничной* конформации в другие, и наоборот.

При транскрипции генетическая информация одного или нескольких генов (участков ДНК) копируется и переносится на мРНК. Молекула мРНК затем идет в цитоплазму, связывается с рибосомой и образует матрицу для синтеза полипептидной цепи. С молекулой мРНК связано множество рибосом, образующих подобие ожерелья. Образуется структура, называемая полирибосомой и полисомой.

Рибосомы сами по себе являются рибонуклеопротеинами с содержанием нукleinовых кислот ~60%. Они находятся в свободном состоянии прежде всего в цитоплазме и в связанном — в эндоплазматическом ретикулуме. Все рибосомы состоят из двух субъединиц, на которые они диссоциируют в зависимости от концентрации  $Mg^{2+}$ . У наиболее хорошо изученных рибосом *E. coli* большая (50 S) субъединица включает 5 S- и 23 S-рибосомные РНК, а также 34 различных белка; малая (30 S) субъединица состоит из 16 S-рибосомной РНК и 21 белка. Рибосомы зукарният образованы 60 S- и 40 S-субъединицами.

На рис. 3-20 схематически показаны в рибосоме *E. coli* главные места связывания аминоацил- и пептидил-tРНК, расположенные на большой субъединице. Молекула мРНК движется в «желобе» между субъединицами.

На следующей ступени биосинтеза белка нуклеотидная последовательность мРНК переводится на язык аминокислотной последовательности. Этот процесс, получивший название «трансляции» [193], начинается со связывания мРНК и инициирующей аминоацил-tРНК с 30 S-субъединицей рибосомы (инициация).

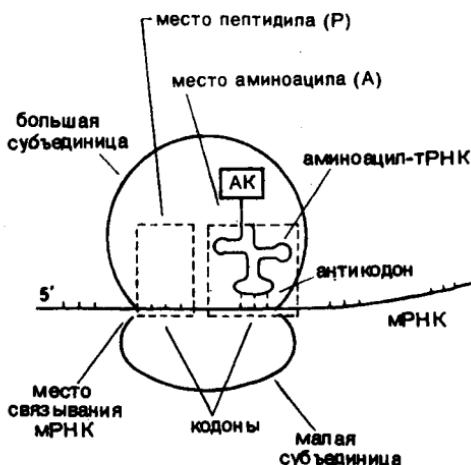


Рис. 3-20. Схема структуры рибосомы *E. coli* с местами связывания аминоацила и пептидила (по Ленинджею).

В прокариотах, а также, вероятно, во всех остальных организмах в роли инициирующей аминокислоты выступает метионин, кодируемый кодоном AUG [194]. Соответствующая метионил-тРНК перед началом процесса ферментативным трансформилированием переводится в формилметионил-тРНК.

В сложном начальном процессе принимают участие три белковых фактора инициации IF<sub>1</sub>, IF<sub>2</sub> и IF<sub>3</sub>. Сначала мРНК ассоциируется с комплексом IF<sub>3</sub> — 30 S-субъединица, затем при участии IF<sub>2</sub> и GTP идет присоединение формилметионил-тРНК. Образовавшийся инициирующий комплекс вместе с большой субъединицей формирует готовый к синтезу белка 70 S-рибосомный комплекс.

В процессе удлинения цепи (элонгации) новая аминоацил-тРНК присоединяется к активному 70 S-рибосомному комплексу. Своей антикодоновой петлей она входит во взаимодействие с соответствующим кодоном мРНК (образование водородных связей), причем правильное положение аминоацил-тРНК на аминоацильсвязывающем месте (A-место) обеспечивает фактор элонгации Tu (EF — Tu). Процесс обеспечивается предварительным специфическим связыванием молекулы аминоацил-тРНК с комплексом GTP с EF — Tu и последующим гидролизом GTP до GDP и неорганического фосфата.

Замыкание первой пептидной связи идет через нуклеофильную атаку аминогруппой аминоацил-тРНК сложноэфирной группы соседней формилметионил-тРНК и катализируется пептидилтрансферазой, относящейся к большой субъединице. Для подготовки к присоединению следующей аминокислоты пептидил-тРНК, еще связанная на A-месте, должна пе-

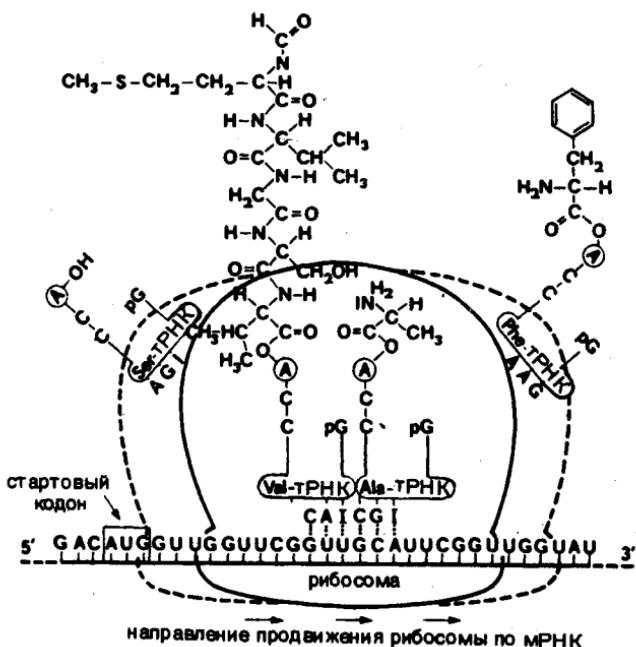


Рис. 3-21. Схема транслокации.

реместиться на Р-место (транслокация). В транслокации принимают участие особый белковый фактор транслокации G (EF-G) и молекула GTP. В результате транслокации осуществляется продвижение рибосомы к следующему кодону мРНК.

Освободившееся таким образом место кодонспецифически занимает следующая аминоацил-тРНК. Начинается новый цикл наращивания полипептидной цепи. Схема процесса приведена на рис. 3-21.

### 3.7.3. Отделение полипептидной цепи от рибосомы

Трансляция, т. е. «переписывание» нуклеотидной последовательности аминокислот полипептидной цепи, продолжается до тех пор, пока А-место рибосомы не достигнет терминирующего кодона. Затем в несколько отдельных стадий протекает процесс отщепления связанный на рибосоме полипептидил-тРНК. Сначала осуществляется сдвиг пептидил-тРНК с места связывания А на место связывания Р (пептидил). Затем под влиянием так называемых терминаторных белков («release factors» RF<sub>1</sub>, RF<sub>2</sub>, RF<sub>3</sub>) пептидилтрансфераза катализирует гидролитическое расщепление сложно-

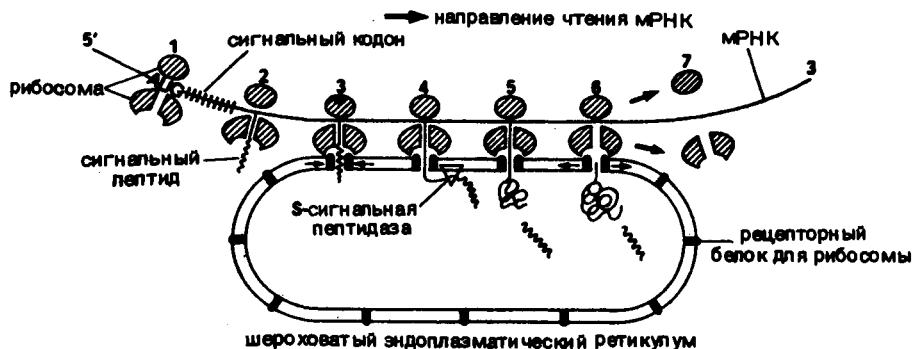


Рис. 3-22. Сигнальная гипотеза — схема протекания процесса биосинтеза секреторных белков.

эфирной связи между С-концевой карбоксильной группой пептида и гидроксильной группой остатка рибозы. Одновременно освобождаются последняя tРНК и мРНК, рибосома диссоциирует на субъединицы, и может начинаться новый цикл синтеза белка. Сегодня считается достоверным, что синтезированные полипептидные цепи покидают рибосому в биологически активной форме. Об этом, помимо прочего, говорят ферментативные активности, которые могут быть показаны на последней фазе синтеза белка на рибосоме. Формильная группа и не требующийся более метионин отщепляются ферментативно. Непосредственно после отщепления происходит замыкание дисульфидных мостиков и другие ковалентные модификации, например гидроксилирование, метилирование или фосфорилирование. Биосинтез покидающих клетку секреторных белков протекает на мембране эндоплазматического ретикулума. По «сигнальной» гипотезе [195, 196] информация об особом пути и месте синтеза содержится в так называемых «сигнальных» кодонах мРНК, следующих непосредственно за стартовым кодоном AUG и кодирующих последовательность сигнального пептида.

Сигнальный пептид, состоящий обычно из 15 — 20 гидрофобных аминокислот, вступает через рибосомный рецепторный белок во взаимодействие с эндоплазматическим ретикулумом и начинает локально-специфический синтез белка. Еще до завершения синтеза он отщепляется «сигнальной пептидазой» от остальной цепи. Полипептидная цепь секреторного белка выводится через систему каналов эндоплазматического ретикулума и вслед за этим сворачивается в нативную конформацию.

Сравнение сигнальных последовательностей белков, продуцируемых одной железой, показывает поразительное сходство. Так, сигнальные последовательности панкреатических ферментов трипсина и химотрипсина различаются лишь в положении 6:



В последние годы было проведено направленное выделение и установление структуры ряда препробелков: препроинсулина [197], препропаратиреоидного гормона [198], препролактина [199] и др. Таким образом, «сигнальная» гипотеза существенно способствовала пониманию тонких механизмов биосинтеза белка.

### 3.7.4. Регуляция биосинтеза белка [200]

Регуляция биосинтеза белка, протекающего с исключительно высокой (до 100 пептидных связей в секунду!) скоростью и точностью, осуществляется на уровнях транскрипции и трансляции. Механизм экспрессии гена был выяснен Жакобом и Моно [201] на примере лактозной системы *E. coli*. Являясь источником углерода для *E. coli*, лактоза действует как индуктор для синтеза трех ферментов — пермеазы,  $\beta$ -галактозидазы и трансацетилазы, делающих возможным использование необычных питательных веществ. Информация, необходимая для биосинтеза ферментов, содержится в трех структурных генах, которые вместе с ответственным за транскрипцию операторным геном образуют единый комплекс — оперон. Индуктор действует через ранее включенный регуляторный ген на операторный ген. В отсутствие лактозы репрессор (аллостерический белок) вступает во взаимодействие с регуляторным геном и таким образом блокирует синтез ферментов.

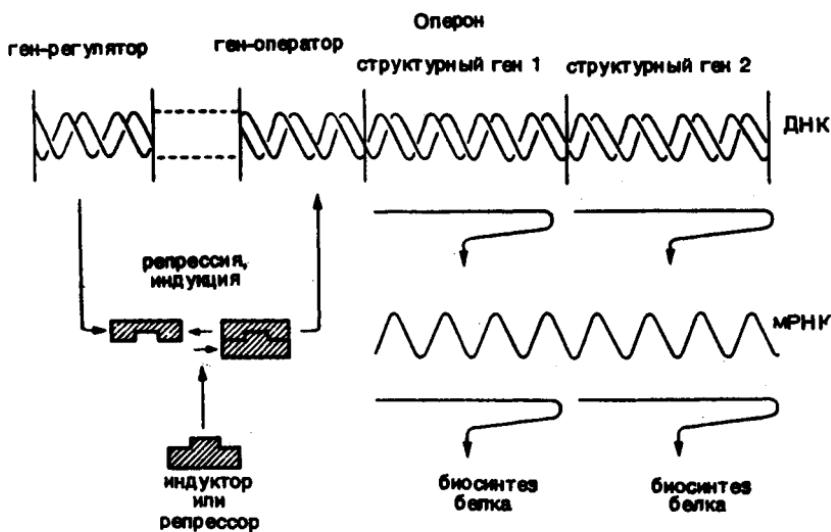


Рис. 3-23. Регуляция процесса биосинтеза белков [3].

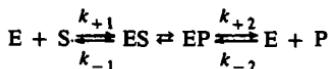
На специфическом подавлении отдельных стадий биосинтеза белка основано действие ряда антибиотиков (разд. 2.3.5). Так, актиномицин интеркаляцией и рифамицин селективным подавлением РНК-полимеразы нарушают процесс транскрипции. Хлорамфеникол нарушает трансляцию, блокируя реакцию переноса пептидилла в рибосоме. Стрептомицин ассоциирует с 30 S-субъединицей рибосомы и ведет к ошибкам в переносе, а очень похожий на аминоацильный конец тРНК пуромицин вызывает преждевременный обрыв синтезируемой цепи.

### 3.8. Избранные примеры функциональных белков

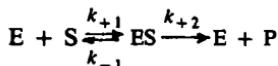
#### 3.8.1. Ферменты [202 — 211]

Ферментами называются простые или сложные, состоящие из нескольких субъединиц белки, которые, будучи высокоспецифичными биокатализаторами, ускоряют наступление равновесия химической реакции вне или внутри клетки, снижая энергию активации соответствующей реакции. Многие ферменты для осуществления каталитического действия помимо белкового компонента нуждаются в кофакторе, например ионе металла ( $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ), и/или коферменте (простетическая группа). Коферменты действуют как переносчики электронов и функциональных групп: атомов водорода, ацетильных, метильных и аминогрупп. Они часто идентичны с витаминами — необходимой составной частью пищи высших организмов.

Ферментативный катализ характерен образованием фермент-субстратного комплекса (ES), который переходит в комплекс фермент — продукт (EP) и затем диссоциирует на фермент и продукт:



В оптимальных условиях, т. е. при определенных температуре и pH, образование комплекса фермент — продукт происходит спонтанно, и этим процессом, как и обратной реакцией, можно пренебречь:



Существование фермент-субстратного комплекса было надежно установлено экспериментально. При данном количестве фермента повышение концентрации субстрата ведет к увеличению скорости реакции, максимум которой достигается при насыщении фермента субстратом.

Количественную взаимосвязь между скоростью реакции и концентрацией субстрата описывает уравнение Михаэлиса — Ментен:

$$V_0 = \frac{V_{\max}S}{K_M + S}$$

где  $V_0$  — начальная скорость,  $V_{\max}$  — максимальная скорость,  $S$  — концентрация субстрата,  $K_M$  — константа Михаэлиса.

Константа Михаэлиса соответствует концентрации субстрата, при которой скорость равна половине максимальной.  $K_M$  и  $V_{\max}$  можно найти графически, используя выражение, обратное уравнению Михаэлиса — Ментен и называемое уравнением Лайнувера — Берка

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Для построения графика используют координаты  $1/V_0$  и  $1/S$ .

У аллостерических ферментов, состоящих из нескольких субъединиц [213 — 215], кривая зависимости скорости реакции от концентрации субстрата имеет характерный сигмоидный вид. Такой фермент независимо от наличия субстрата имеет две различные конформации, находящиеся в равновесии. Активность этого фермента контролируется аллостерическими эффекторами (обычно несложными органическими веществами). Связывание эффектора происходит на одной из субъединиц в аллостерическом центре, пространственно отделенном от места связывания субстрата, и вызывает конформационные изменения других субъединиц. Фермент активируется, если эффектор является активатором, и ингибируется, если с аллостерическим центром связывается ингибитор. Аллостерические ферменты обычно участвуют в контроле первых ступеней мультиферментных цепей.

Различают конкурентные и неконкурентные ингибиторы ферментов. Конкурентные ингибиторы структурно подобны субстрату и занимают его место в субстратсвязывающем центре. Избыtkом субстрата они могут быть снова удалены. Неконкурентные ингибиторы реагируют с другими важными структурными частями фермента, например с группой SH, и не могут быть удалены избыtkом субстрата.

В качестве международной единицы ферментативной активности принят катал; 1 кат равен ферментативной активности, обусловливающей превращение 1 моль субстрата в 1 с.

По специфичности действия ферменты разделяют на 6 основных классов, которые в свою очередь подразделяются на подклассы и подгруппы.

В настоящее время известно около 2000 ферментов, из которых десятая часть получена в кристаллическом состоянии. Общие принципы их высокоспецифичного катализитического действия известны, но, однако, многие вопросы молекулярного механизма действия, тонкой регуляции и генетического контроля еще неясны.

В последние годы использование ферментов для технологических процессов превращения веществ, например в химической и фармацевтической промышленности, приобрело большое значение. При этом прежде всего

Таблица 3-10. Классификация ферментов по специфичности действия

Основные классы и важнейшие подклассы	Катализируемая реакция	Примеры
<b>1. Оксидоредуктазы</b>	Реакции окисления и восстановления	
Дегидрогеназы (с NAD <sup>+</sup> или NADP <sup>+</sup> )		Лактат-, алкоголь-, малат-, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы
Оксидазы (с кислородом в качестве акцептора)		Глюкозо- и моноаминооксидаза, оксидазы аминолот
Гидроксилазы (обеспечивают встраивание кислорода)		Фенилаланин-4-гидроксилаза, стеронид-II-β-гидроксилаза
<b>2. Трансферазы</b>	Перенос групп	
C <sub>1</sub> -Трансферазы		Метил-, гидроксиметил-, карбомилтрансферазы
Альдегидо- и кетотрансферазы		Трансальдолаза, транскетолаза
Ацилтрансфераза		Ацетилтрансферазы, тиолаза
Аминотрансферазы		Все трансаминазы
Фосфотрансферазы		Гексо-, глюко-, фософруктокиназы, РНК-полимеразы, РНКазы
<b>3. Гидролазы</b>	Гидролитическое расщепление связей	
Эстеразы	Расщепление сложнозифирных связей	Ацетилхолинэстераза, липазы
Гликозидазы	Расщепление гликозидов	α-Гликозидазы ( $\alpha$ -амилаза, глюкоамилаза), $\beta$ -гликозидазы (целлюлазы, $\beta$ -глюкуронидаза), нуклеозидазы
Экзопептидазы	Расщепление пептидной связи	Дипептидилпептидазы, амино- и карбоксипептидазы
Эндопептидазы	Расщепление амидных связей	Трипсин, химотрипсин
Амидазы	Расщепление ангидридных связей кислот	Аспарагиназа, глутаминаза, уреаза, аргиназа
	Элиминирование и присоединение по двойной связи	АТРазы, пирофосфатаза
<b>4. Лиазы</b>		
C-C-Лиазы		Декарбоксилазы аминокислот, пируватдекарбоксилаза, альдолазы

Продолжение табл. 3.10

Основные классы и важнейшие подклассы	Катализируемая реакция	Примеры
С-О-Лиазы		Аконитаза, карбоангидраза
С-N-Лиазы		Енолаза, фумараза, аспартаза
5. Изомеразы: Рацемазы	Изомеризация	
Эпимеразы		Пролинацемаза, рацемазы других аминокислот
цис-транс-Изомераза		Рибулозофосфат-3-эпимераза
6. Лигазы (синтетазы)	Соединение двух молекул субстрата с участием АТР	Изомераза малеилацетоуксусной кислоты
С-О-Лигазы		Все тРНК-синтетазы аминокислот
С-N-Лигазы		Аспарагин-, глутамин-, глутатионсинтетазы
С-C-Лигазы		Пируваткарбоксилаза
С-S-Лигазы		Ацетил- и сукцинат-СоА-сингтетазы

используются *иммобилизованные ферменты*, что имеет следующие преимущества: возможность повторного применения, непрерывное проведение процесса при низких температурах и легкую отделяемость продукта. Иммобилизацию осуществляют за счет *адсорбции на носителе* (синтетические или природные полимеры, стекло, активированный уголь), *включением в носитель* (микрокапсулирование), *ковалентным связыванием с носителем* через подходящую функциональную группу и *ковалентной сшивкой* молекул фермента би- или полифункциональными реагентами (например, при обработке диальдегидами, диаминами, производными дикарбоновых кислот и др.). В процессе иммобилизации биологическая активность фермента должна максимально сохраняться.

Далее будут более детально описаны структура и действие некоторых наиболее важных ферментов.

### 3.8.1.1. Рибонуклеаза [216]

Рибонуклеаза А из поджелудочной железы теленка состоит из одной полипептидной цепи, включающей 124 аминокислотных остатка и сшитой четырьмя дисульфидными мостиками. Фермент относится к фосфодиэстера-

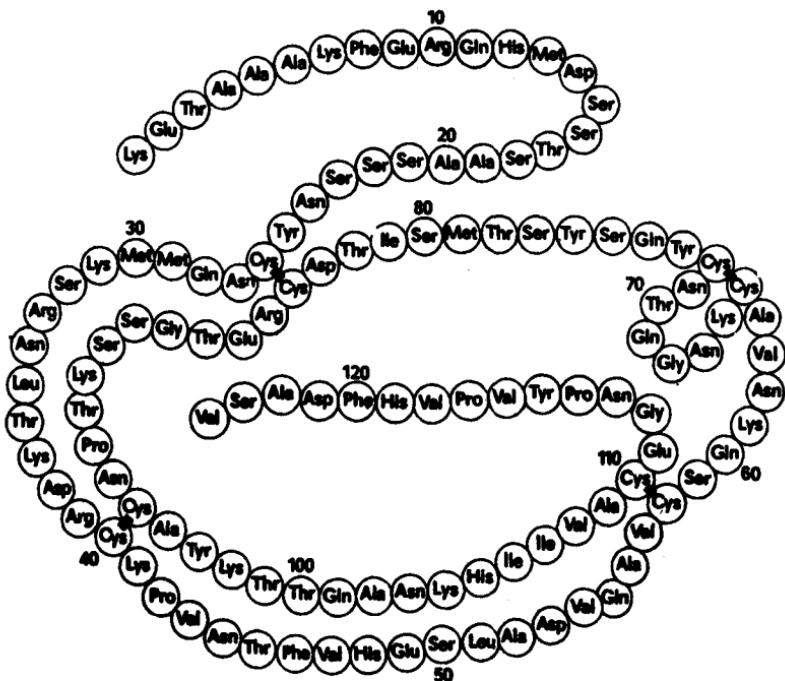


Рис. 3-24. Первичная структура рибонуклеазы А из поджелудочной железы теленка [217].

зам и катализирует гидролитическое расщепление молекулы РНК по фосфоэфирной связи между пиримидин-3'-fosфатом и 5'-гидроксигруппой соседнего остатка рибозы. Продуктами гидролиза являются 3'-рибонуклеозидмонофосфаты и олигонуклеотиды, имеющие на конце остаток пиримидин-3'-fosфата.

Фермент выделен Дюбо. В 1940 г. Кунитц смог получить его в кристаллической форме, а в 1963 г. Смит, Штейн и Мур опубликовали полную первичную структуру. Третичная структура была установлена Карлисле с сотр. (рентгеноструктурный анализ с разрешением 0,55 нм), а также в лаборатории Карты [218].

Рибонуклеаза по модели, описанной Картой и полученной с разрешением 0,2 нм в результате синтеза Фурье для семи различных производных с тяжелыми атомами (7294 измерения), представляет собой молекулу почкообразной формы размером  $3,8 \times 2,8 \times 2,2$  нм. Активный центр фермента находится в «почечной борозде» — характерной щели, разделяющей молекулу на две половины и содержащей ответственные за каталитическую активность остатки гистидина (положения 12 и 119) и лизина (положения 41 и 7).

При восстановлении меркаптоэтанолом в 8 М растворе мочевины молекула рибонуклеазы разворачивается в биологически неактивную неупорядо-

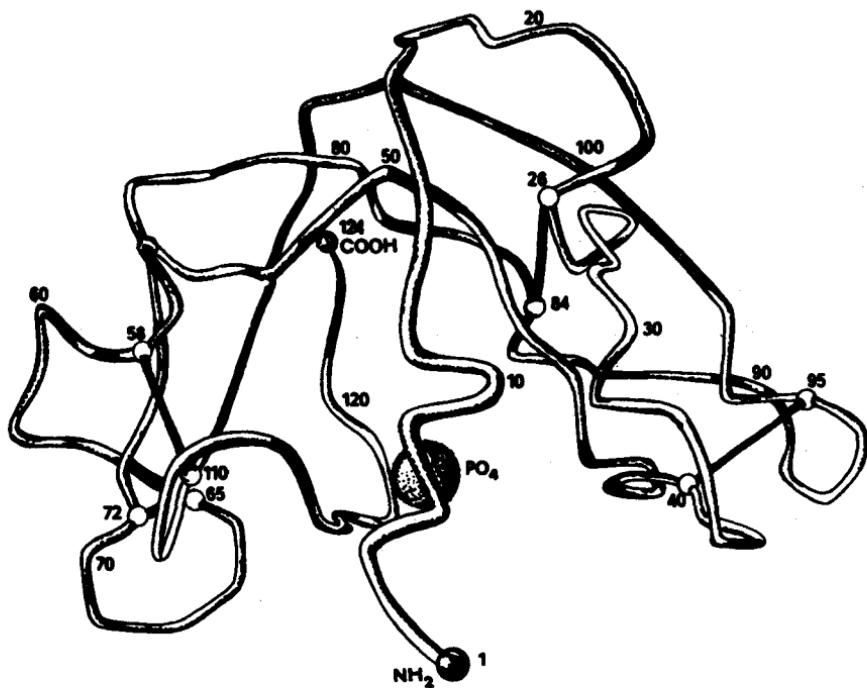


Рис. 3-25. Модель пространственной структуры рибонуклеазы А [218].

ченную структуру. Большое значение имело открытие, что при реокислении восстанавливается нативная конформация и вместе с этим полная биологическая активность фермента. Из 105 возможных вариантов замыкания дисульфидных связей при ренатурации реализуется только один, т. е. пространственная структура белка предопределена его аминокислотной последовательностью.

По данным Рихардса [219], рибонуклеаза А при обработке бактериальной протеазой субтилизином расщепляется между остатками Ala-20 и Ser-21 на так называемый *S*-пептид (1 — 20) и *S*-белок с последовательностью 21 — 124, содержащей 4 дисульфидных мостика. Оба компонента после разделения показывают ничтожную биологическую активность. Однако, если смешать их один с другим, биологическая активность восстанавливается, т. е. *S*-пептид и *S*-белок с помощью невалентных связей «собираются» в так называемую *рибонуклеазу S*, обладающую пространственной структурой, близкой к нативной конформации.

Для рибонуклеазы S пространственная структура определена с разрешением 0,35 нм [220, 221]. Результаты совпадают с моделью Карты. Найдено, что около половины *S*-пептида находится в виде  $\alpha$ -спирали. Вся молекула содержит ~ 15% спиральной и ~ 75%  $\beta$ -структур.

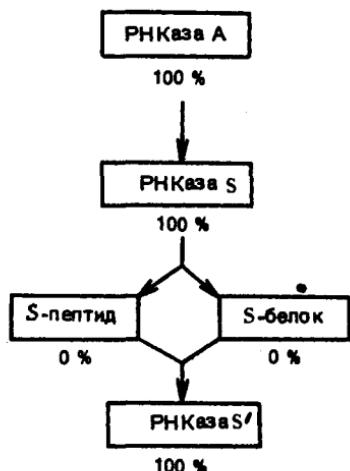


Рис. 3-26. Схема ферментативного расщепления рибонуклеазы А и рекомбинации продуктов расщепления.

По данным Скоффоне и сотр. [222], синтезировавших большое число аналогов S-пептида, он, будучи один, образует статистический клубок. Спиральная конформация возникает лишь после соединения с S-белком. Для связывания S-пептида и S-белка существен остаток фенилаланина в положении 8. Для полного достижения биологической активности достаточно участка 1 — 14 S-пептида.

Рибонуклеаза была первым ферментом, который удалось получить полным химическим синтезом. Гутт и Меррифилд синтезировали цепь с С-конца на твердой фазе с использованием автоматического синтезатора (разд. 2.2.7.1). Концепция группы Мерка (разд. 2.2.5.3) состояла в построении фрагментной конденсацией S-белка и соединении его с синтетическим S-пептидом. Невысокая (20 — 30%) величина полученной биологической активности объясняется неоднородностью конечного продукта синтеза.

В поджелудочной теленка помимо рибонуклеазы А присутствуют рибонуклеазы В, С и D. Эти ферменты относятся к гликопротеинам и имеют различное содержание углеводов. Например, рибонуклеаза В соединена через остаток аспарагина в положении 34 с пятью остатками маннозы и двумя остатками глюкозы. Для ряда рибонуклеаз, найденных в грибах и бактериях, определена структура, описан синтез рибонуклеазы T<sub>1</sub>, состоящей из 104 аминокислотных остатков.

### 3.8.1.2. Лизоцим

Лизоцим — бактериолитическая гидролаза, широко распространенная в бактериях, растениях, позвоночных и беспозвоночных. Фермент катализи-

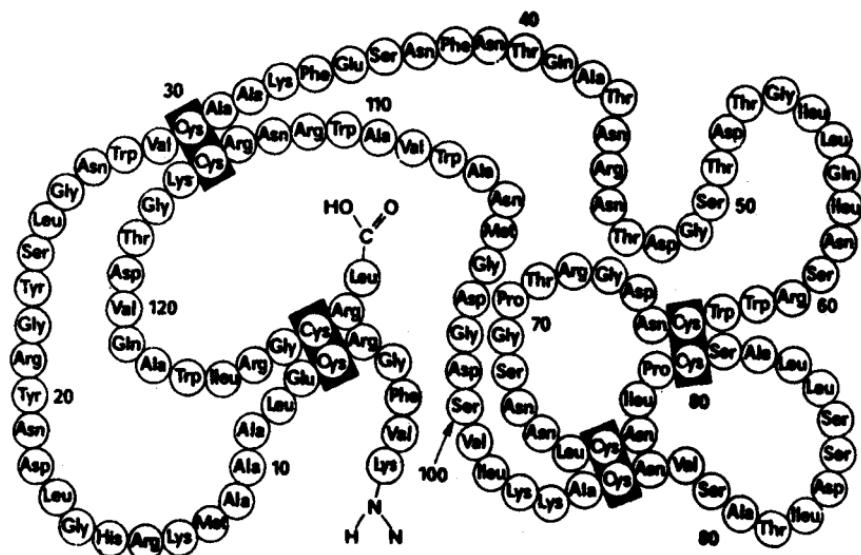


Рис. 3-27. Первичная структура лизоцима из куриного яйца [223].

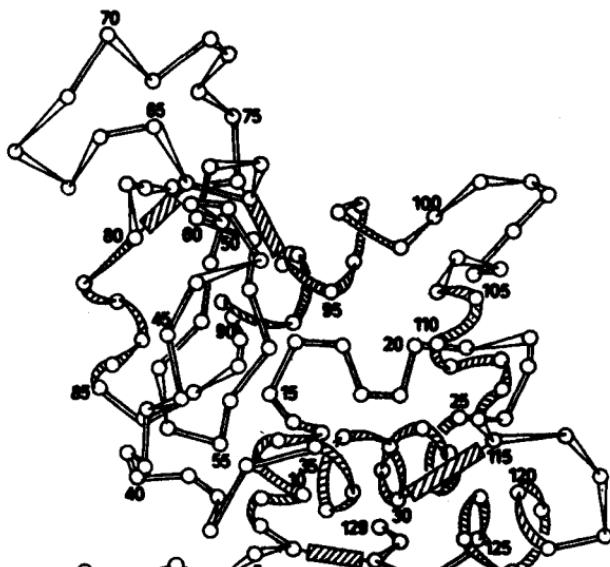


Рис. 3-28. Модель пространственной структуры лизоцима из куриного яйца [224].

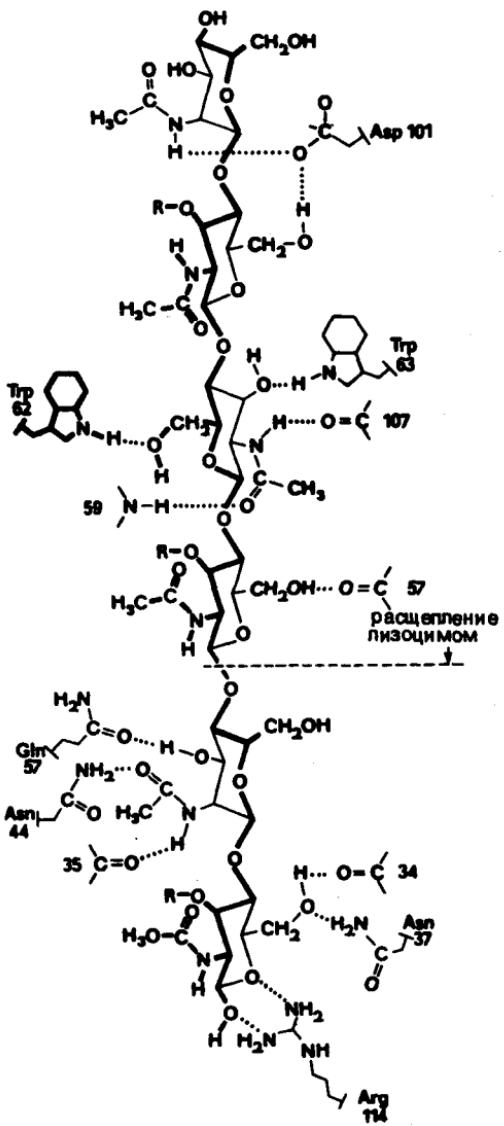


Рис. 3-29. Аминокислоты, принимающие участие в образовании активного центра лизоцима [4].

рует гидролитическое расщепление пептидоглюканов бактериальных мембран по  $\beta$ -1,4-связи между N-ацетилглюкозамином и N-ацетилмураминовой кислотой, выполняя тем самым важную защитную функцию против проникновения бактерий в организм.

Животные лизоцимы состоят из одной полипептидной цепи, включающей 129 аминокислотных остатков, гомологичны между собой и, как и в случае рибонуклеазы, при участии 4 дисульфидных мостиков сворачиваются в характерные третичные структуры.

Для установления пространственной структуры выполнен рентгеноструктурный анализ лизоцима из куриного яйца [224].

Поскольку кристалл лизоцима характеризуется тетрагональной сингонией (пространственная группа  $P 4_3 2_1 2$ ) и большая часть углов равна 0 или  $180^\circ$ , потребовалось измерить «всего» 9000 рефлексов. 42% полипептидной цепи представляют собой  $\alpha$ -спираль, некоторые участки цепи в неспиральной области образуют  $\beta$ -структуры. Так, например, участок 41 — 54 дает антипараллельную структуру складчатого листа. Субстратсвязывающий центр фермента лежит в длинном желобе на внешней стороне и охватывает минимум 12 совместно действующих аминокислотных остатков (рис. 3-29).

Рентгеноструктурными исследованиями комплексов лизоцими с ингибиторами, например комплекса, состоящего из лизоцима и конкурентного ингибитора N-аце-

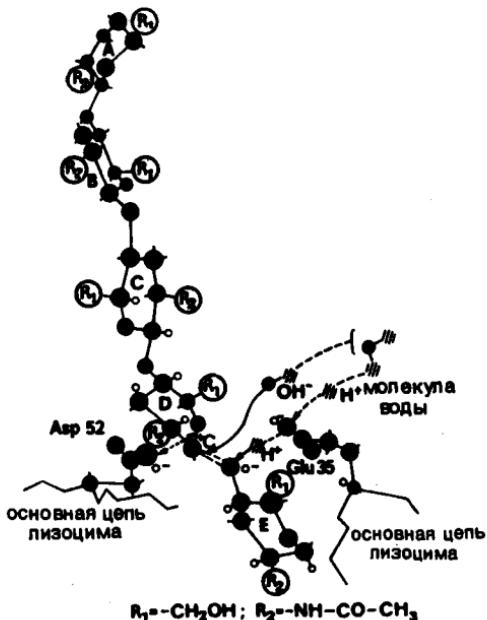


Рис. 3-30. Механизм катализа лизоцимом по Филлипсу.

тилглюкозаминтрисахарида, были получены более детальные представления об активном центре фермента [225]. Распределение электронных плотностей получено из данных так называемого *дифференциального синтеза Фурье*; для трех различных ингибиторных комплексов были получены совпадающие максимумы электронной плотности.

Связывание субстрата изучалось на примере гексасахарида, построенного из N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмураминовой кислоты (рис. 3-29). Модельный субстрат укладывается в глубокий разрез молекулы лизоцима и фиксируется водородными связями. Расцепляемая гликозидная связь субстрата встраивается между карбоксильными функциями глутаминовой кислоты (положение 35) и аспарагиновой кислоты (положение 52); это позволяет закончиться синхронному процессу расщепления связи (рис. 3-30).

### 3.8.1.3. Химотрипсин

Химотрипсин — наиболее хорошо изученный протеолитический фермент. Он катализирует гидролитическое расщепление пептидной (или сложно-эфирной) связи, в образовании которой принимают участие фенилаланин, тирозин или триптофан. Образование химотрипсина происходит в поджелудочной железе; первоначально образуется неактивный химотрипсиноген (зимоген) — резервная форма фермента. Основной компонент, химотрипсиноген А, представляет собой полипептидную цепь из 245 аминокислотных остатков и 5 дисульфидных мостиков. Активация и образование активного  $\alpha$ -химотрипсина осуществляются сложным путем. После триптического расщепления связи Arg<sup>15</sup>-Ile<sup>16</sup> последовательно один за другим из молекулы отщепляются дипептиды Ser<sup>14</sup>-Arg<sup>15</sup> и Thr<sup>147</sup>-Asn<sup>148</sup>. В результате одиопечочный предшественник переходит в трехцепочечную молекулу фермента. Цепи А, В и С химотрипсина соединены исключительно дисульфидными связями. Рис. 3-32 показывает пространственную модель химотрипсина, установленную на основе рентгеноструктурных данных.

Ферментативное действие химотрипсина, как и других панкреатических протеаз (трипсина, эластазы), соответствует механизму общего кислотно-основного катализа, в котором принимают участие в качестве «системы переноса заряда» остатки аминокислот His<sup>57</sup>, Asp<sup>102</sup> и Ser<sup>195</sup>. Передача электронной плотности от заряженной при pH 8 отрицательно карбоксильной группы аспарагиновой кислоты через имидазольное кольцо гистидина к кислороду боковой цепи серина обусловливает повышение его нуклеофильности настолько, что может осуществляться нуклеофильное воздействие на карбонильный углеродный атом пептидной связи. На промежуточно образующемся О-ацильном производном серина перенос заряда обрывается, но на последующей стадии деацилирования снова немедленно восстанавливается. Гидролитическое расщепление пептидной связи может быть рассмотрено как перенос ацила, при котором осуществляется перемещение ацильного остатка с аминогруппы на молекулу воды (рис. 3-31).

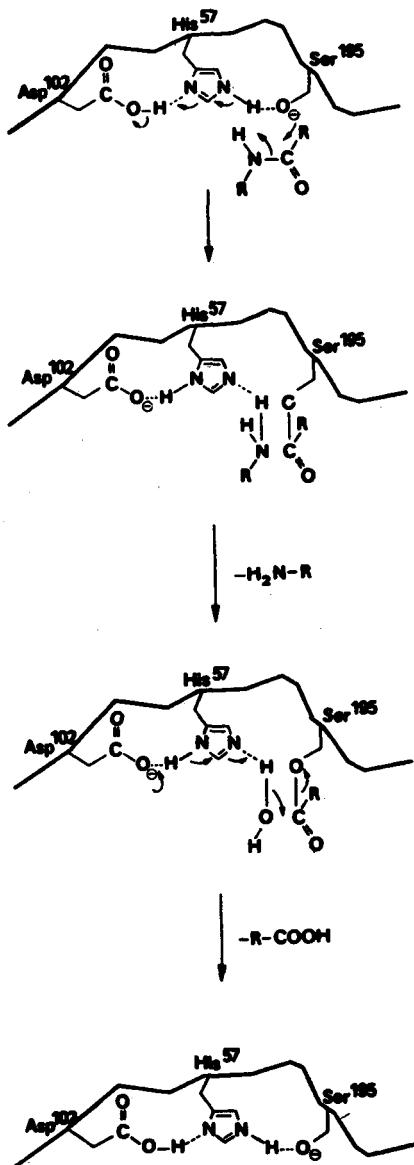


Рис. 3-31. Протеолиз, катализируемый химотрипсином.

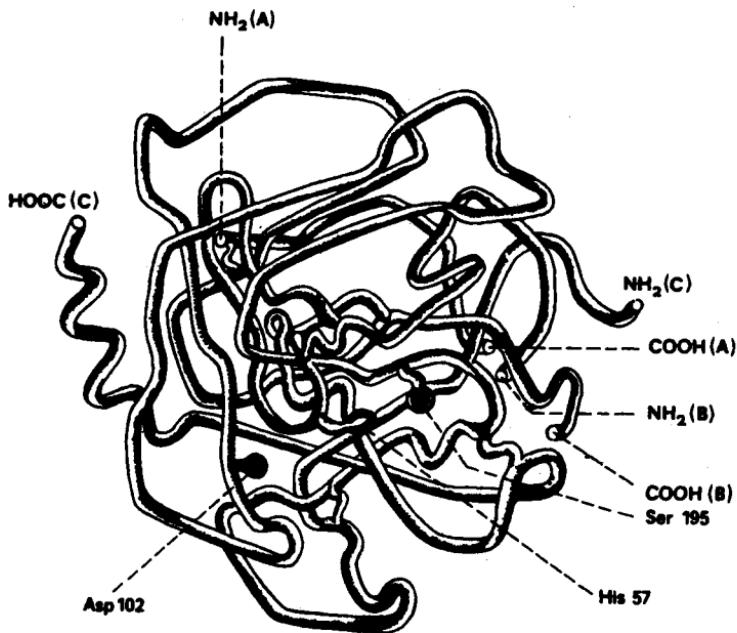


Рис. 3-32. Трехмерная структура химотрипсина [226, 227].

### 3.8.1.4. Карбоксипептидаза А

Карбоксипептидаза А — это металлофермент, который, будучи экзопептидазой, гидролитически отщепляет С-концевые, прежде всего ароматические, остатки аминокислот. Для работы фермента необходим ион  $Zn^{2+}$ , который с некоторыми ограничениями может быть замещен на ионы других переходных металлов.

Карбоксипептидаза А образуется под действием трипсина из неактивного предшественника — прокарбоксипептидазы ( $M_r$  87 000). Полипептидная цепь фермента состоит из 307 аминокислот ( $M_r$  34 409) и содержит один дисульфидный мостик.

По данным рентгенографического анализа [228, 229] молекула фермента имеет эллиптическую форму размером  $5,2 \times 4,4 \times 4,0$  нм. Внутри молекулы находится  $\beta$ -структура, состоящая из 8 параллельных и 8 антипараллельных участков и обрамленная с обеих сторон 8 спиралью.

Ион цинка лежит в одной из складок на поверхности и принимает активное участие в катализическом процессе. Он образует координационные связи с остатками гистидина (положения 69 и 196), глутаминовой кислоты (положение 72), а также с карбонильным кислородом расцепляемой пеп-

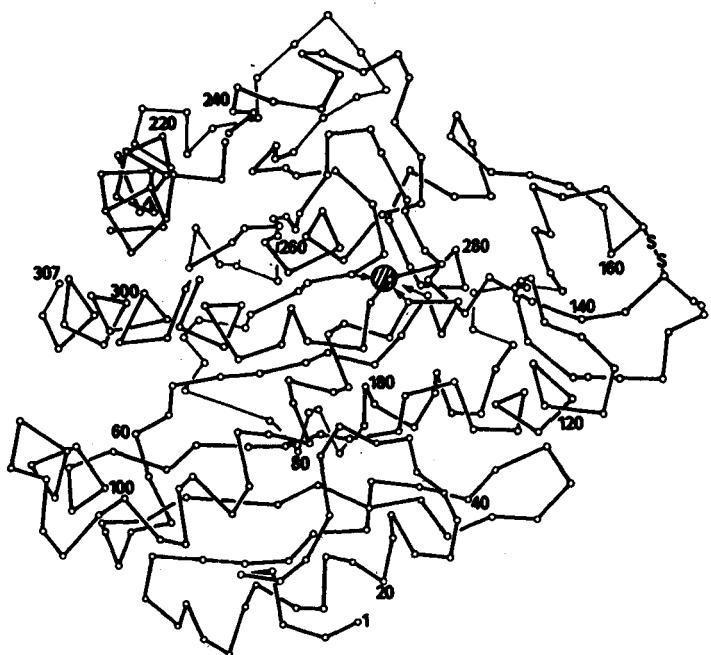


Рис. 3-33. Укладка полипептидной цепи в карбоксипептидазе А.

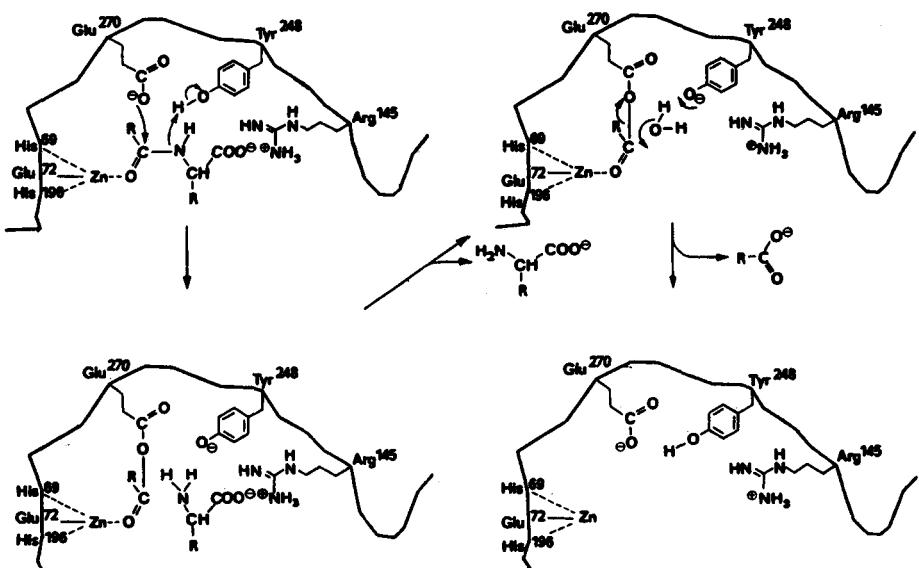


Рис. 3-34. Каталитическое отщепление С-концевой аминокислоты карбоксипептидазой А.

тидной связи. Дисульфидный мостик, идентифицированный рентгеноструктурным анализом с разрешением 0,2 нм, связывает цистеины в положениях 138 и 168 [223]. Из рентгеновских данных далее очевидно, что остаток аргинина-145 связывает С-концевой карбоксилатный анион субстрата. Одновременно благодаря тому, что позиция аргинина изменяется, остаток тирозина-248 может принять роль донора протона для группы NH расщепляемой цепи. Остаток глутаминовой кислоты-270 благоприятствует нуклеофильной атаке молекулы воды на карбоксильную группу пептидной связи, сильно поляризованную координацией с ионом цинка. Механизм действия карбоксипептидазы поясняет рис. 3-34.

### 3.8.2. Транспортные и резервные белки

#### 3.8.2.1. Миоглобин

Миоглобин — первый глобулярный белок, пространственная структура которого установлена рентгенографически [231]. Поскольку к моменту начала исследований первичная структура миоглобина была еще не известна, установление первичной и третичной структур должно было проходить параллельно. По Эдмундсону [232], миоглобин состоит из одной полипептидной цепи, включающей 153 аминокислотных остатка, и одной железопорфириновой группы (гем) на молекулу. Миоглобин относится к гемопротеинам,ющим обратимо связывать кислород; в клетках скелетной мышцы он

Val - Leu - Ser - Glu - Gly - Glu - Trp - Gln - Leu - Val - Leu - His - Val - Trp - Ala - Lys -	1      2      3      4      5      6      7      8      9      10     11     12     13     14     15     16
Val - Glu - Ala - Asp - Val - Ala - Gly - His - Gly - Gln - Asp - Ile - Leu - Ile - Arg - Leu -	17     18     19     20     21     22     23     24     25     26     27     28     29     30     31     32
Phe - Lys - Ser - His - Pro - Glu - Thr - Leu - Glu - Lys - Phe - Asp - Arg - Phe - Lys - His -	33     34     35     36     37     38     39     40     41     42     43     44     45     46     47     48
Leu - Lys - Thr - Glu - Ala - Glu - Met - Lys - Ala - Ser - Glu - Asp - Leu - Lys - Lys - His -	49     50     51     52     53     54     55     56     57     58     59     60     61     62     63     64
Gly - Val - Thr - Val - Leu - Thr - Ala - Leu - Gly - Ala - Ile - Leu - Lys - Lys - Lys - Gly -	65     66     67     68     69     70     71     72     73     74     75     76     77     78     79     80
His - His - Glu - Ala - Glu - Leu - Lys - Pro - Leu - Ala - Glu - Ser - His - Ala - Thr - Lys -	81     82     83     84     85     86     87     88     89     90     91     92     93     94     95     96
His - Lys - He - Pro - Ile - Lys - Tyr - Leu - Glu - Phe - Ile - Ser - Glu - Ala - Ile - Ile -	97     98     99     100     101     102     103     104     105     106     107     108     109     110     111     112
His - Val - Leu - His - Ser - Arg - His - Pro - Gly - Asn - Phe - Gly - Ala - Asp - Ala - Glu -	113     114     115     116     117     118     119     120     121     122     123     124     125     126     127     128
Gly - Ala - Met - Asn - Lys - Ala - Leu - Glu - Leu - Phe - Arg - Lys - Asp - He - Ala - Ala -	129     130     131     132     133     134     135     136     137     138     139     140     141     142     143     144
Lys - Tyr - Lys - Glu - Leu - Gly - Tyr - Gln - Gly	145     146     147     148     149     150     151     152     153

Рис. 3-35. Первичная структура миоглобина кашалота [232].

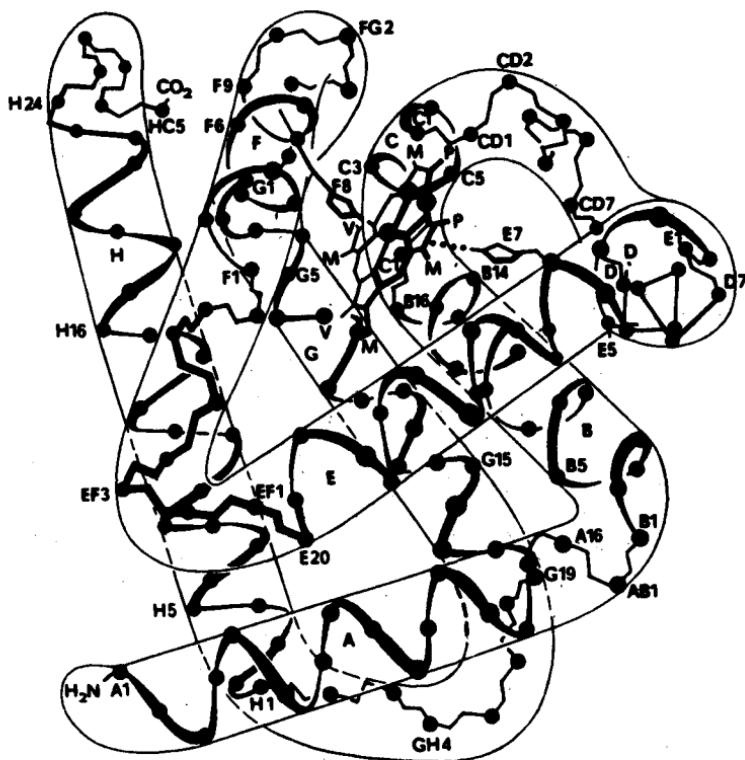


Рис. 3-36. Схема структуры миоглобина кашалота с выделением спиральных областей [233].

ответствен за резервирование кислорода, а также за увеличение скорости его диффузии через клетки. Филогенетически миоглобин — предшественник гемоглобина.

Рентгеноструктурный анализ, проведенный с разрешением 0,6, 0,4 и 0,2 нм, дал форму сплющенной сферы размером  $2,5 \times 4,4 \times 4,4$  нм с «карманом» для гема. Молекула не содержит дисульфидных связей и характеризуется  $\alpha$ -спиральностью на 77%. Выделяют 8 спиральных областей (A — H), в построении которых принимает участие в сумме 121 аминокислотный остаток.

При разрешении 0,2 нм впервые удалось наблюдать «визуально» правовращающий  $\alpha$ -вит. Рис. 3-37 показывает распределение электронной плотности в цилиндрической проекции среза одной из цепей миоглобина. На верхней части рисунка на карту электронной плотности нанесена  $\alpha$ -спираль ( $a$ ), а ниже дано пояснение расположения атомов в  $\alpha$ -спирале, причем точки  $\beta$  и  $\beta'$  соответствуют двум возможным местам расположения  $\beta$ -углеродных атомов ( $b$ ).



Рис. 3-37. Распределение электронных плотностей на одном из участков полипептидной цепи миоглобина (по Кендрю и др.).

Гем, ответственный за связывание кислорода, находится в «гидрофобном кармане», образованном особыми, для этого предназначенными аминокислотами. Гем представляет собой макроциклический протопорфирина с координационно связанным ионом двухвалентного железа, находящимся в центре молекулы. Ион железа координационно связан с четырьмя расположенными по сфере атомами азота протопорфирина и двумя остатками гистидина (F8 и E7), относящимися к глобиновому компоненту. Такая пространственная фиксация гема делает возможным связывание молекулы кислорода в качестве шестого лиганда со стороны гема, повернутой к гистидину F8. Имидазольное кольцо гистидина E7 непрямо, через молекулу кислорода, координирует с центральным ионом железа ( $\text{II}$ ) (рис. 3-38).

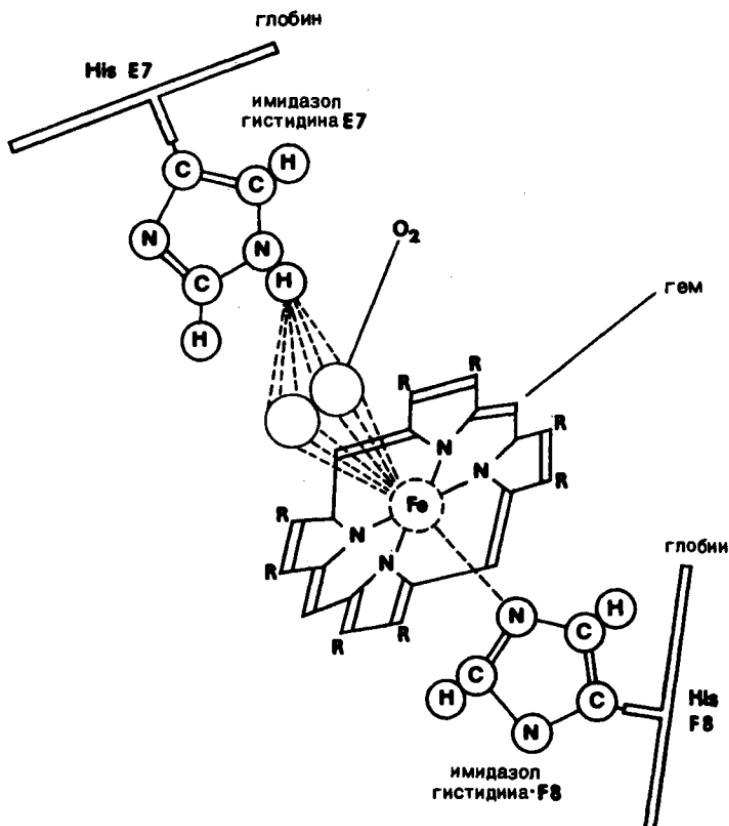


Рис. 3-38. Схема связывания кислорода миоглобином.

### 3.8.2.2. Гемоглобин [234, 235]

Гемоглобин — «дыхательный» белок крови. Он осуществляет транспорт кислорода по кровеносной системе легких к другим органам и центрам потребления. Например, в мускульных тканях транспортируемый кислород передается миоглобину, который осуществляет его накопление.

Гемоглобин по своему строению гомологичен миоглобину и практически представляет собой тетramer миоглобина — оба белка действуют взаимосвязанно в биологических системах. Такая кооперация в действии, помимо прочего, требует от гемоглобина высокого сродства к кислороду при его высоком парциальном давлении и низкого сродства при недостатке кислорода. Рис. 3-39 графически демонстрирует связывание кислорода гемоглобином и миоглобином. Форма кривой симмоидная для гемоглобина и гиперболическая с крутым подъемом для миоглобина.

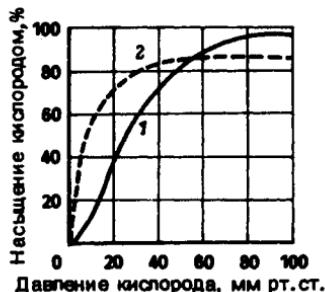


Рис. 3-39. Кривая связывания кислорода гемоглобином и миоглобином при 37 °C и pH 7,4. 1 — гемоглобин человека, 2 — миоглобин человека.

Вследствие этого миоглобин насыщается кислородом уже при низком парциальном давлении, таким образом при сокращении мышц может быть компенсирован недостаточный приток кислорода из кровеносной системы.

Молекула гемоглобина состоит из четырех попарно идентичных полипептидных цепей, каждая из которых несет гем. Сворачивание полипептидной цепи и фиксирование гема осуществляются по тем же принципам, что и в миоглобине.  $M_r 64\,500$ , содержание железа 0,334%. В крови взрослого человека содержится ~ 1 кг гемоглобина.

Полипептидные цепи гемоглобина называют  $\alpha$  и  $\beta$ , а двойное симметричное строение молекулы записывают как  $\alpha_2\beta_2$ . Цепи  $\alpha$  и  $\beta$  химически сходны или, обобщая, гомологичны. В крови взрослых помимо основного гемоглобина  $HbA$  (96,5 — 98,5 %) присутствует в незначительных концентрациях гемоглобин  $HbA_1$  ( $\alpha_2\delta_2$ ). Кроме того, в процессе индивидуального развития (онтогенеза) человека образуются два других гемоглобина. Так, в первые недели после оплодотворения доказано образование так называемого эмбрионального гемоглобина, или прегемоглобина ( $HbP$ ,  $\alpha_2\varepsilon_2$ ), а в крови плода обнаружен так называемый гемоглобин плода ( $HbF$ ,  $\alpha_2\gamma_2$ ). Последний вследствие своего повышенного сродства к кислороду облегчает передачу кислорода из материнской крови к плоду. Нужно отметить, что в зависимости от условий развития в молекуле гемоглобина помимо постоянных  $\alpha$ -цепей присутствуют две другие идентичные цепи.

В первичной структуре  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -цепей находят многочисленные гомологичные области.  $\beta$ -,  $\gamma$ -, а также  $\delta$ -цепь построены каждая из 146 аминокислотных остатков;  $\alpha$ -цепь на 5 остатков короче. Для анализа степени гомологичности различных полипептидных цепей необходимо рассматривать более короткие последовательности. Различие между  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепями гемоглобина незначительно, в то время как между этими цепями и цепью миоглобина оно намного существеннее (рис. 3-40).

Гемоглобины людей разной расовой принадлежности, а также гемоглобины шимпанзе одинаковы. Точканые мутации приводят иногда к аномалиям

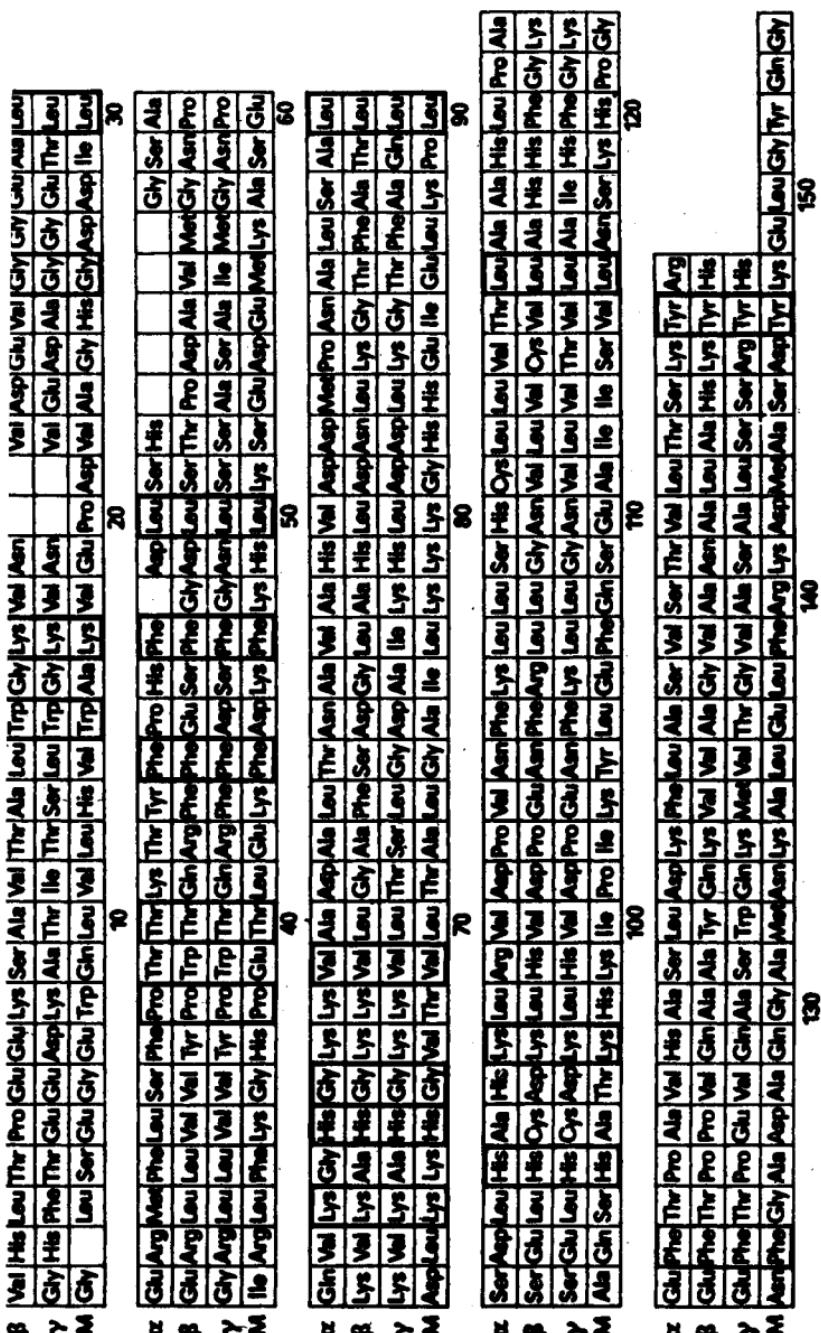


Рис. 3-40. Сопоставление гомологичных участков первичных структур  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -цепей гемоглобина и миоглобина человека [236].

ям, чаще всего патологическим. Наиболее известен гемоглобин серповидных эритроцитов, возникающий при замене глутаминовой кислоты в положении 6 на валин и вызывающий деформацию клеток и их агрегацию.

Структура оксигемоглобина лошади при грубом разрешении установлена Перутцем с сотр. [237, 238]. Хотя при разрешении 0,55 нм (6 изоморфных производных, 1200 рефлексов) оказалась невозможной непосредственная локализация отдельных аминокислотных остатков, было однозначно показано тетрамерное строение молекулы и положение четырех гемов. На основании этих данных  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи обладают почти идентичной третичной структурой, очень близкой структуре миоглобина.

В более уточненной модели (0,2 нм) Перутц описал положение всех ~ 10 000 атомов с погрешностью  $\pm 0,1$  нм. Из всех имеющихся структурных данных для оксигенированного и неоксигенированного гемоглобинов можно сделать вывод, что третичная структура гемоглобина не имеет видоспецифичности.

Образование четвертичной структуры осуществляется прежде всего путем гидрофобных взаимодействий между отдельными полипептидными цепями. Возникают расширенные области контактов между  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепями, которые вместе с этим являются предпосылкой для обратимого кооперативного связывания гемоглобином четырех молекул кислорода. При присоединении кислорода к гему образуется оксигемоглобин, четвертичная структура которого лишь незначительно отличается от неоксигенированной формы.  $\alpha$ -Гемы взаимно сближаются на 0,1 нм, а  $\beta$ -гемы удаляются один от другого на 0,65 нм.

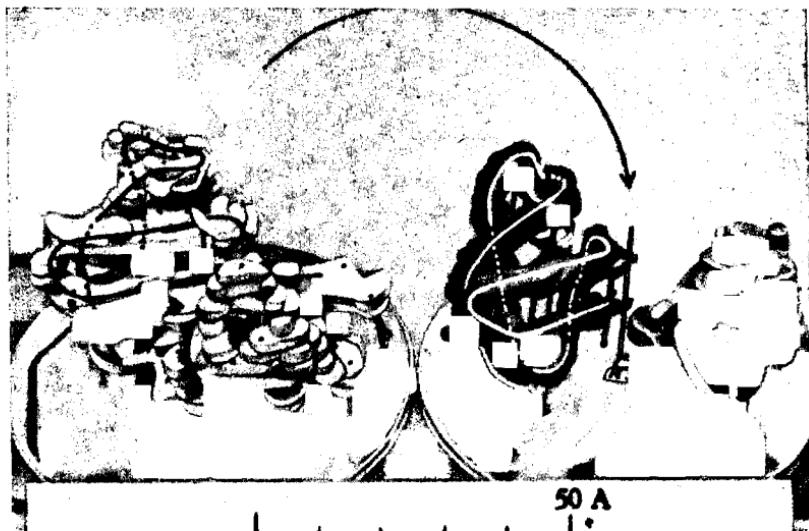


Рис. 3-41. Модели четырех протомерных полипептидных цепей гемоглобина [237, 238].

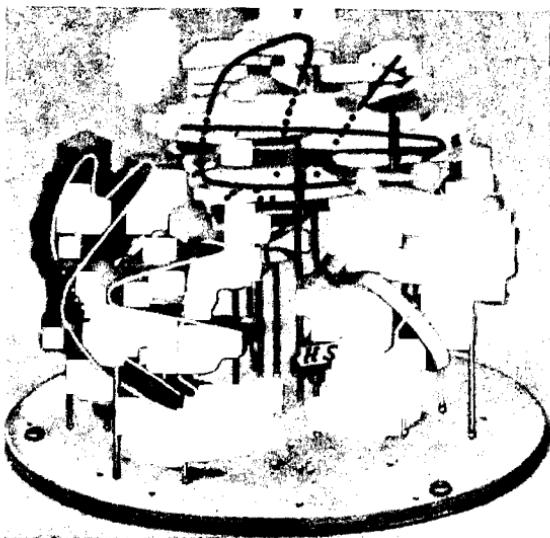


Рис. 3-42. Модель структуры оксигемоглобина лошади (разрешение 0,55 нм) [237, 238].

Структурные изменения одной субъединицы влияют на пространственное строение всей молекулы и тем самым на другие пространственно удаленные гемы. Контактные области дают возможность обеим димерам ( $\alpha_1\beta_1$  и  $\alpha_2\beta_2$ ) в процессе связывания кислорода скользить один по другому. Этот аллостерический эффект объясняет симметричную форму кривой оксигениации [239, 240].

Большое сходство в третичной структуре с гемоглобином и миоглобином показывает выделенный из личинок одного из видов комара *Chryogonotus* эритрокруорин, пространственная структура которого установлена Хубером и др. [241]. Высокая способность этого гемопротеина связывать кислород позволяет личинкам комара находиться в водной среде, бедной кислородом.

### 3.8.2.3. Металлопротеины

Ряд белков характерен своей способностью специфично связывать ионы металла. Ионы металла находят прежде всего в качестве функционирующей составной части ферментов, например ион меди в группе оксидоредуктаз (фенолоксидазы, цитохромоксидазы и др.) и ион марганца в аргиназе и

фосфотрансферазах. Особый интерес вызывают содержащие ионы железа и молибдена белковые компоненты *нитрогеназы* — мультиферментного комплекса, имеющегося в микроорганизмах, способных связывать атмосферный азот. В качестве примера цинкодержащего фермента можно назвать карбоангидразу.

Типичными накапливающими железо белками млекопитающих являются *ферритин* и *гемозидерин*, несущие четверть всего железа, содержащегося в организме. Лишний железа апоферритин имеет форму чашки и состоит из 24 субъединиц ( $M \approx 445\,000$ ). Железо в ферритине представлено в форме железогидроксидоксидных мицелл, причем на молекулу может приходить до 4300 атомов Fe(II). С помощью ферритина избыточное железо накапливается внутри клеток в различных органах (печень, костный мозг, селезенка) и при появлении потребности мобилизуется действием NADH-зависимой ферридуктазы.

Функционально очень близок к ферритину гемозидерин, образующийся, в частности, при определенных заболеваниях и откладываемый прежде всего в печени и селезенке. Содержание железа в гемозидерине, например, из селезенки лошади может составлять до 34%.

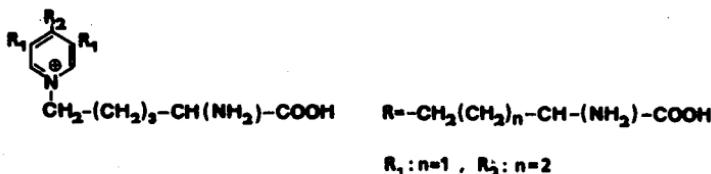
Важными металлотранспортными белками являются *цидерофилины* и *циерулоплазмин*. В первом случае речь идет о безгемовых связывающих железо гликопroteинах (трансферрин плазмы, лактоферрин, кональбумин), выполняющих преимущественно транспортные функции и действующих бактериостатически. Трансферрин относится к  $\beta$ -глобулинам плазмы крови и ответствен за транспорт принятых с пищей ионов железа к органам, осуществляющим его хранение. Окрашенный в голубой цвет церулоплазмин осуществляет как транспорт, так и накопление ионов. Это состоящий из четырех цепей  $\alpha_2\beta_2$ -гликопротеин, содержащий 8 ионов меди на молекулу. Белок, существующий в плазме млекопитающих, имеет  $M \approx 140\,000$  и содержание углеводов 16%.

### 3.8.3. Структурные белки

Структурные белки объединяют те фибрillлярные белки, которые в животных организмах выполняют типичные опорную и каркасную функции. Они имеют характерный аминокислотный состав, нерастворимы в воде и не атакуются протеолитическими ферментами. Вследствие плохой усвояемости и низкого содержания важных аминокислот они не подходят в качестве пищевых белков.

У структурных белков находят следующие типы конформаций полипептидных цепей:  *$\alpha$ -спираль*,  *$\beta$ -структур складчатого листа* и *суперспираль*. Важнейшие представители этих белков — кератины, белки шелка и коллагены. В ряде других структурных белков особые физические свойства достигаются благодаря трехмерным сшивкам полипептидных цепей ковалентными мостиками. *Резилин*, белковый компонент хитиновых пластинок, содержащийся, в частности, в местах прикрепления крыльев насекомых,

придает, например, наружному скелету специфическую гибкость. Поперечная сшивка цепей осуществляется через три остатка тирозина. Эластин, структурный белок «эластичных» компонентов сухожилий, сосудов и др., характеризуется высоким содержанием гидрофобных аминокислот (суммарное содержание валина, лейцина и изолейцина равно 27%). В данном случае прочность и эластичность вызваны сшивками через пиридинамино-кислоту дезмозин.



Сшивка осуществляется после биосинтеза белка при участии боковой цепи лизина. В кислом гидролизате эластина найдена другая «сшивающая» аминокислота — *изодезмозин*, имеющий остаток R<sub>2</sub> в положении 2 (а не в 4) пиридинового кольца.

### 3.8.3.1. Кератины

Кератин шерсти и волос имеет в качестве основного структурного элемента  $\alpha$ -спиральные полипептидные цепи, стабилизированные водородными связями и межспиральными дисульфидными мостиками. Аминокислотный состав этого  $\alpha$ -кератина обнаруживает высокое (11%) содержание цистеина и гидрофобных аминокислот.

Каждые три правовращающих  $\alpha$ -спирали навиты одна на другую в стержнеобразную структуру, получившую название *protoфибрилла* и имеющую диаметр 2 нм. Из-за скручивания период идентичности сокращается от 0,54 нм для нормальной  $\alpha$ -спирали до 0,51 нм. С помощью электронной микроскопии удалось показать, что каждые 9 протофибрилл накладываются кольцевыми витками на 2 других, образуя при этом структуру, похожую на кабель, называемую *микрофибрillой* и имеющей диаметр 8 нм. Многие сотни микрофибрилл, уложенных для увеличения механической прочности в богатую цистеином белковую матрицу, снова образуют так называемые *макрофибрillы* с диаметром 200 нм. Макрофибрillы лежат параллельно оси волокна в отмерших клетках шерсти. Конечный диаметр всей структуры достигает 20 000 нм.

Исключительными свойствами волокна шерсти являются растяжимость и эластичность. При сильном растяжении  $\alpha$ -спирали растягиваются с разрывом водородных связей до длины, равной удвоенной первоначальной. Эластичность основана на сшивке спиралей дисульфидными мостиками.

В противоположность волокнам шерсти волокна природного шелка растягиваются незначительно. Полипептидные цепи *фиброна* шелка содержат в основном глицин, аланин и серин (~87%). Другие аминокислоты

присутствуют в незначительных концентрациях, а цистеин и метионин отсутствуют полностью. Фибронин шелка — представитель  $\beta$ -кератинов.

В антипараллельных, прилегающих одна к другой полипептидных цепях преобладает повторяющаяся последовательность -Gly-Ser-Gly-Ala-Gly-Ala-. Цепи образуют антипараллельную  $\beta$ -структуру, стабилизированную оптимальным образованием водородных связей между CO- и NH-группами. При этом остатки глицина выступают с одной, а серина и аланина — с другой стороны складчатого листа. Расстояния между отдельными листами равны примерно 0,35 и 0,57 нм.

Совместная укладка пар полипептидных цепей приводит к образованию пространственно вытянутого белкового комплекса, укрепленного серином — вторым (однако водорастворимым) белком шелка. Характерные свойства волокна шелка — незначительная растяжимость и высокая эластичность объясняются прочными ковалентными связями вытянутых полипептидных цепей и слабыми вандерваальсовыми взаимодействиями между листами  $\beta$ -структур.

### 3.8.3.2. Коллагены [243 — 247]

Коллагены — наиболее часто встречающиеся белки животных организмов (составляют 25 — 30%). Они входят в состав сухожилий, кожи, хрящей,

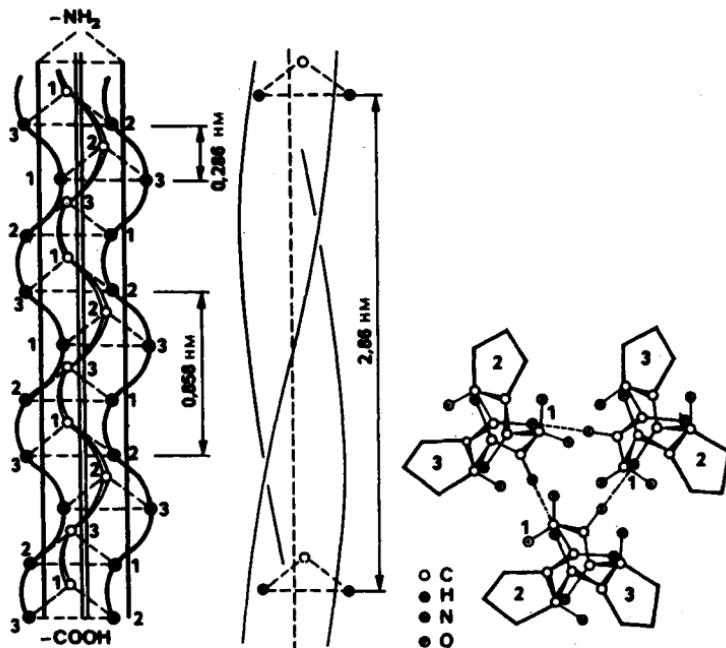


Рис. 3-43. Структура коллагена (по Ричу и Крику).



Рис. 3-44. Электронно-микроскопический снимок фибрилл коллагена [248].

стенок сосудов и связывающих тканей. Содержание пролина и гидроксипролина необычайно высоко и составляет 9 — 12%, но больше всего в коллагенах глицина (35%) и аланина (11%), цистеин и метионин содержится только в коллагенах беспозвоночных. Примечательно присутствие гидроксилизина и 1 — 2% углеводов.

Основной структурный элемент коллагена — палочкообразные молекулы *тропоколлагена* ( $M_r$  300 000, длина 3000 нм и диаметр 1,5 нм). Тропоколлаген построен из трех полипептидных цепей примерно равной длины, из которых две обычно идентичны и называются  $\alpha_1$ -цепями. Коллаген хрящей содержит три идентичные  $\alpha_1$ -цепи, в то время как все цепи коллагена

из кожи тунца различны. Установление аминокислотной последовательности показало, что  $\alpha_1$ -цепь состоит из 1012 аминокислотных остатков и имеет  $M \approx 1000\ 000$ . Цепи тропоколлагена находятся в форме левовращающей вытянутой спирали, причем каждые три аминокислотных остатка образуют один виток; период идентичности 0,86 нм. Структуру определяют последовательности  $(\text{Gly-X-Pro})_n$ ,  $(\text{Gly-X-Hурго})_n$  и  $(\text{Gly-Pro-Hурго})_n$ , которые обусловливают скручивание трех отдельных цепей в *правовращающую суперспираль*. Спиральная структура в этом случае стабилизируется водородными связями между пептидными группами отдельных цепей. Эти связи могут относительно легко разрушаться, например, при нагревании водного раствора. Из охлажденного раствора, застывающего подобно желатине, можно выделить  $\alpha_1$ -цепи.

Тропоколлаген укладывается в фибриллы диаметром до 500 нм. В каждой фибрилле отдельные молекулы уложены параллельно и смешены одна относительно другой на 1/4 длины, при этом на поверхности фибриллы образуется типичный *поперечноСолосатый рисунок*. В зависимости от типа коллагена расстояние между полосками равно от 60 до 70 нм.

Фибриллы можно сделать видимыми в электронном микроскопе после окрашивания солями тяжелых металлов или наблюдать с помощью малоуглового рентгеновского рассеяния. Реакцией с фосфорновольфрамовой кислотой, солями уранила или хрома(III) полярные области соседних основных элементов коллагена сшиваются между собой на многих участках.

В процессе биосинтеза коллагена в фибробластах сначала образуется водорастворимый протоколлаген, не содержащий гидроксипролина и гидроксилизина. Обе гидроксимикинокислоты образуются позднее при действии на молекулу белка особой проколлагенгидроксилазы. После спонтанного образования трехспиральной структуры в молекулу через OH-группы гидроксилизина встраивается углеводный компонент (галактоза, глюкоза). Окончательное формирование коллагеновой фибриллы происходит во внеклеточном пространстве после секреции предшественника.

### 3.8.4. Белки с защитными функциями

#### 3.8.4.1. Иммуноглобулины

При проникновении посторонних белков или других антигенных компонентов, например макромолекулярных углеводов, в организме животных начинает действовать защитный *механизм антиген — антитело* (иммунный ответ). В процессе этой оборонительной реакции индуцируется биосинтез особых белков, так называемых *антител*, которые посредством высокоспецифичных рецепторов соединяются с антигенами с образованием нерастворимого комплекса *антиген — антитело*, делая проникший антиген безопасным для организма [249 — 252].

Реакция антиген — антитело наиболее подробно изучена на иммуноглобулинах — антителях, образующихся в плазме крови. Эти «защитные белки» находятся в  $\gamma$ -глобулиновой фракции плазмы. Речь идет о гли-

Таблица 3-11. Классификация иммуноглобулинов человека (Ig) [253]

Свойство	IgG	IgM			IgA	IgD	IgE
			сыворот- ка	секрет			
Коэффициент седиментации	6,5—7S	19S	7S	11S	6,8—7,9S	8,2S	
Мол. масса (L-цепь, всегда 23 000)	155 000	940 000 Пентамер	170 000 Димер	380 000	185 000	196 000	
Тип H-цепей и мол. масса	$\gamma_1-\gamma_4$ 50 000— 60 000	$\mu$ 71 000		$\alpha$ 64 000	$\delta$ 60 000— 70 000	$\epsilon$ 75 500	
Состав $L_2\gamma_2$ ( $L = \kappa$ или $\lambda$ )		$(L_2\mu_2)_5$	$L_2\alpha_2$	$(L_2\alpha_2)_2$	$L_2\delta_2$	$L_2\epsilon_2$	
Содержание углеводов, %	2—3	10—12		8—10	12,7	10—12	
Доля относительно иммуноглобулинов сыворотки, %	70—75	7—10		10—22	0,03—1	0,05	
Концентрация в сыворотке (мг/100 мл)	1300 (800—1800)	140 (60—280)	210 (100— 450)		3 (1—40)	0,03 (0,01— 0,14)	
Валентность при связывании	2	5(10)	1	2	?	2	
Полупериод биологического действия, сут	8(IgG 3)—21	5,1	5,8		2,8	2—3	
Связывание комплемента	Да	Да	Нет		Нет	Нет	

копротеинах с различными молекулярными массами и различным содержанием углеводов, которые можно в значительной степени разделить иммуноэлектрофорезом и разбить на пять основных групп.

Каждый иммуноглобулин построен из двух легких и двух тяжелых полипептидных цепей, которые в каждом случае соединены одна с другой двумя дисульфидными связями.

IgG-глобулины ( $\gamma_7S$ ), называемые ранее легкими антителами, имеют  $M 155\ 000$  и коэффициент седиментации 7S. С помощью протеолиза папаином и последующего

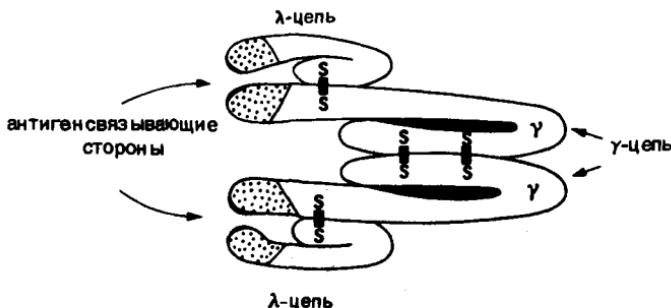


Рис. 3-45. Структура иммуноглобулина IgG.

восстановления они могут быть расщеплены на две полипептидные λ-цепи с  $M_r$  23 000 (ранее называемые L-цепями, от light — легкий) и две полипептидные γ-цепи с  $M_r$  50 000 + 60 000 (ранее называемые H-цепями от heavy — тяжелый). Расщепление обратимо, так как после разделения λ- и γ-цепей они могут вновь соединяться в интактную иммунологически активную молекулу  $\gamma_2\lambda_2$ . Специфичность молекулы достигается характерной аминокислотной последовательностью в N-концевой области полипептидной цепи до 107 остатка (вариабельная область). В C-концевой области цепи находится в основном константный участок последовательности.

Известна первичная структура ряда иммуноглобулинов IgG- и IgM-типов, а также белка Бенса — Джонса (иммуноглобулина L-типа), появляющегося в моче при определенных заболеваниях (например, при миеломе). Этот белок, находящийся в растворе в виде димера, содержит 214 аминокислот. В нем отсутствуют метионин и спиральная структура. Некоторое представление о третичной структуре антитела удалось дать Эдмунсону и Хилшману [254]; они сделали рентгеноструктурный ана-

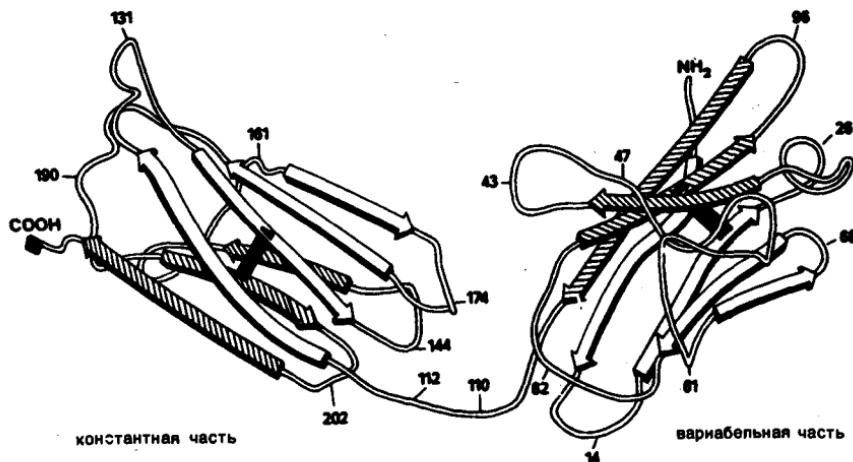


Рис. 3-46. Схема конформации белка Бенса — Джонса L-типа (разрешение 0,35 нм).

лиз белка Бенса — Джонса с разрешением 0,35 нм (рис. 3-46). Можно видеть оба домена с вариабельной областью (всего 11 аминокислотных остатков) и константной областью (всего 105 аминокислотных остатков). Каждый из доменов содержит по два слоя антипараллельных отрезков цепи, представляющих собой  $\beta$ -структуры и показанных на рисунке стрелками. Оба домена добавочно стабилизируются дисульфидными связями (показаны черными) и связаны между собой через растянутую структуру.

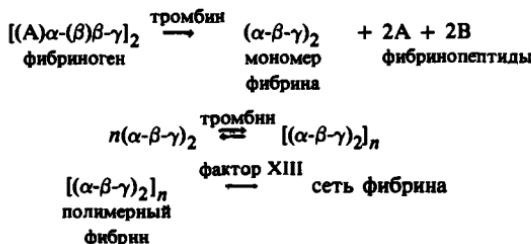
Полного понимания молекулярного механизма образования антител пока не существует. По матричной теории Полинга каждая клетка, образующая антитела, может синтезировать неограниченное число различных структур, а по теории выбора клона, предложенной Бурнетом, генетическая информация о числе и структуре молекул антител содержится в ДНК. Современные представления о структурных основах образования и действия антител изложены в работе [255].

### 3.8.4.2. Фибриноген — фибрин

Особенно важную защитную функцию выполняют белки в процессе свертывания крови у позвоночных. На последней стадии этого сложного процесса, включающего 12 факторов (из них 11 белковых) и начинающегося при повреждении сосуда, растворимый белок плазмы **фибриноген**, синтезируемый в печени, переходит в фибрин, закрывающий рану.

Фибриноген содержится в человеческой плазме в концентрации 200 — 300 мг на 100 мл и составляет приблизительно 3 — 4% суммарного содержания плазменных белков. В образовании молекулы, состоящей из двух идентичных субъединиц, принимают участие три пары полипептидных цепей ( $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ ), лежащих параллельно одна другой и сшитых между собой в N-концевой области многими дисульфидными связями. Отдельные цепи имеют различный размер (для  $\alpha$ -цепи  $M$  67 000, для  $\beta$ -цепи — 56 000 и  $\gamma$ -цепи — 47 000). Фибриноген имеет  $M$  340 000 (по данным малоуглового рентгеновского рассеяния в растворе  $335\ 000 \pm 25\ 000$ ). Предполагается, что его пространственная структура имеет вид вытянутого цилиндра длиной 45 нм и диаметром 9 нм. Гидратация фибриногена (5 г воды на 1 г белка) необычно высокая для белков.

Переход фибриногена в фибрин осуществляется под влиянием протеазы тромбина в присутствии ионов кальция по следующей схеме:



Сначала от N-концов  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей отщепляются один за другим так называемые фибринопептиды A и B, причем отщепление всегда протекает по связи Arg — Gly.

*Фибринопептид A* человека имеет последовательность Ala-Asp-Ser-Gly-Glu-Gly-Asp-Phe-Leu-Ala-Glu-Gly-Gly-Val-Arg; для *фибринопептида B* человека определена последовательность Prg-Glu-Gly-Val-Asn-Asp-Glu-Gly-Phe-Ser-Ala-Arg. Физиологическая функция фибринопептидов, помимо прочего, заключается во временном связывании факторов свертывания крови на месте их действия.

Мономерный фибрин, образующийся при расщеплении, агрегируется в пучки волокон, переходящие затем в стабилизированные водородными связями фибриновые сгустки. Трансспептидаза, образующаяся под действием фактора свертывания крови XIII из четырехцепочечного  $\alpha_2$ -глобулина M 350 000, осуществляет ковалентную связку сгустков фибрина, замыкая изопептидные связи между  $\gamma$ -карбоксильными и  $\varepsilon$ -аминогруппами боковых цепей остатков глутаминовой кислоты и лизина. Образующийся полимер фабрина нерастворим в воде и 8 М растворе мочевины. Обратный процесс растворения сгустков фибрина идет под действием *плазмина* (фибринолизина) — трипсиноподобной протеазы, протеолитически расщепляющей фибрин до растворимых продуктов. Сам плазмин образуется из неактивного предшественника плазминогена при его специфической активации урокиназой почек (M 53 000) или стрептокиназой (M 47 000) из  $\beta$ -гемолитических стрептококков.

### 3.8.4.3. Лектины

*Лектины* (от лат. *legere* — выбирать) — гликопротеины, в отдельных случаях безуглеводные белки, прежде всего растительного происхождения, характеризующиеся особыми способностями связывать углеводы и углеводсодержащие поверхности клеток. Из-за их способности агглютинировать эритроциты и другие клеточные структуры они также имеют название *фитогемагглютины*. Белковый компонент обычно состоит из нескольких субъединиц. Характерным в аминокислотном составе является отсутствие серусодержащих аминокислот и повышенное содержание серина и треонина. Через эти аминокислоты осуществляется связывание углеводного компонента, среднее содержание которого составляет 5% и состав ограничивается в основном моносахаридами галактозой, маннозой, фукозой и N-ацетилглюкозамином.

Молекулярное взаимодействие между лектинами и посторонними углеводами сравнимо с реакцией антиген — антитело в человеческом и животных организмах. Однако специфичность лектинов шире, и, что является наиболее важным отличием, они содержатся в соответствующем растении постоянно, т. е. их образование не индуцируется контактом с остатком сахара.

Биологические функции лектинов многообразны и еще не выяснены во всех деталях. Их защитное действие у семян заключается в частичной защите от поедания насекомыми. Лектины, связывающие N-ацетилглюкозамин, препятствуют образованию хитина при синтезе клеточных стенок в грибах и таким образом защищают растения от инфекции.

Как было показано на примере инфицирования листьев табака непатогенным штаммом бактерии *Pseudomonas solanacearum*, лектины обусловливают фиксацию бактерий на клеточных стенках инфицированных растений.

Похожие бактерии агглютинируются лектином картофеля. Этот лектин с  $M 92\ 000$  состоит из двух субъединиц и проявляет специфичность к остаткам N-ацетилглюкозамина; имеет необычно высокое содержание углеводов (~ 50%) и содержит гидроксипролин

Многочисленные представители лектинов находятся в растениях из семейства бобовых. Функция этих легуминозных лектинов состоит в узнавании и фиксации симбиотических бактерий, связывающих азот воздуха. Известный *конканавалин A* (*Con A*) из бобов был получен в кристаллическом состоянии уже в 1919 г. Он состоит из четырех субъединиц по 238 аминокислот каждая с суммарией  $M 110\ 000$ . Каждая субъединица содержит ион кальция и ион магния. Ионы металлов необходимы как для осуществления процесса связывания углеводов, так и для стабилизации пространственной структуры белка. *Вицилин* из бобов *Phaseolus aureus Roxb.* — гликопротеин с содержанием 0,2% глюкозамина и 1% маннозы. Каждая из четырех субъединиц содержит боковую углеводную цепь из 13 углеводных остатков.

Большое значение для медицины имеет применение лектинов для определения группы крови. Метод основан на избирательном взаимодействии лектинов с эритроцитами систем АВО и MN. Так, например, лектин из *Dolichos biflorus* специфически связывает N-ацетилгалактозамин рецепторов, определяющих группу крови A<sub>1</sub>. Предпочтительная агглютинация раковых клеток по сравнению со здоровыми используется для определения раковых трансформаций в клеточных культурах. Так, безуглеводный лектин из земляных орехов ( $M 120\ 000$ , 4 субъединицы) лучше связывается с раковыми клетками молочной железы, чем с соответствующими нормальными клетками.

### 3.8.4.4. Белки, препятствующие замерзанию

Белки, защищающие от замерзания (гликопротeinовые антифризы), — общее название для ряда родственных гликопротеинов, содержащихся в плазме крови антарктических рыб и вместе с солями, прежде всего хлоридом натрия, снижающих точку замерзания плазмы. Присутствие этих белков препятствует застыванию крови и сохраняет жизнедеятельность организма до температуры  $-1,85^{\circ}\text{C}$ .

При разделении гликопротеинов плазмы электрофорезом получают активную фракцию этих белков, состоящую из 5 компонентов с  $M 11\ 000 + 32\ 000$ . Все компоненты содержат только аланин и треонин, структура углеводной части соответствует дисахариду D-галактозил-D-N-ацетилгалактозамину.

Анализ аминокислотных последовательностей компонентов активной фракции обнаружил наличие в полипептидных цепях повторяющегося участка -Ala-Ala-Thr- с двумя дополнительными остатками аланина на C-конце полипептидной цепи. Для этих белков предполагается гибкая вытянутая структура, образующая в воде неидеальные и нерегулярные формы и тем самым нарушающая нормальный рост кристаллов льда. Гидрофильная

сторона молекулы гликопroteина образует специфические водородные связи, идущие прежде всего от гидроксильных групп углеводной части.

Помимо активного, защищающего от замораживания белка в плазме содержатся три меньших, неактивных гликопroteина ( $M_r$  2700 — 7800), у которых в молекуле на каждые два остатка треонина приходится дополнительно один остаток пролина. Их концентрация в крови рыб составляет 10 — 15 мг/мл при суммарном содержании гликопротеинов 25 мг/мл. Их функция, по-видимому, состоит в стимуляции антифризной активности беспролиновых белков плазмы.

### 3.8.4.5. *Интерфероны*

Интерфероны — это гликопротеины, состоящие из белкового компонента (~ 160 аминокислотных остатков) и специфического углеводного компонента. Они синтезируются в животных клетках после возбуждения экзогенным стимулятором и отличаются антивирусным, клеточно- и иммунорегуляторным действием, а также особыми антиопухолевыми свойствами. Оптимальный эффект достигается в гомологичной или близкородственной системе, поэтому для человека наиболее действенны человеческие интерфероны.

Особое значение имеет антивирусное действие интерферонов, на котором основан главный защитный механизм у человека и животных, действующий против многочисленных вирусных возбудителей. После проникновения вируса в клетку активируется в нормальном состоянии неактивный ген интерферона клетки. Следует перенос информации на мРНК и инициация рибосомного биосинтеза белка в цитоплазме. После завершения синтеза присоединяется углеводный компонент и полная молекула интерферона секретируется клеткой. Взаимодействием со специфическим рецептором на поверхности клетки интерферон индуцирует образование внутриклеточных ферментов, которые препятствуют копированию вирусной информации, т. е. блокируя синтез вирусных белков, прерывают цепь инфекционного процесса.

В противоположность антителам, нейтрализующим чуждую молекулу путем прямого контакта и часто появляющимся во внеклеточном пространстве даже через годы, интерфероны действуют лишь несколько часов. В какой степени кооперируют обе системы одна с другой, в настоящее время еще трудно сказать.

К другим примерам действия интерферона относятся благоприятное влияние на иммунную реакцию организма, например при инфекции и трансплантации органов, активация специфических иммунных клеток, а также подавление очень быстро делящихся клеток, например опухолевых.

Успех при применении интерферона в клинической практике был достигнут при лечении вирусных заболеваний, например хронического гепатита. Применение при терапии рака пока оценивается сдержанно. Успешным было послеоперационное лечение пациентов с остеосаркомой.

Для получения интерферона используются клеточные линии лейкоцитов, фибробластов, побуждаемые к синтезу и выделению интерферона вирусной инфекцией или такими индукторами, как поли(I:C), DEAE-декстран и cGMP-аскорбиновая кислота. Так как в данном процессе выход нужного белка в высшей степени незначителен, особое внимание уделяется генной технологии. Однако в этом случае может образовываться лишь чисто белковый компонент интерферонид.

В зависимости от происхождения интерфероны различаются по аминокислотной последовательности, содержанию сахара, молекулярной массе, антигенной специфичности и фармакологическим свойствам.

Для интерферона из фибробластов человека ( $M_r$  20 000) известна полная аминокислотная последовательность белкового компонента. Установление первичной структуры осуществлено бельгийскими [256] и японскими [257, 258] учеными, причем обе лаборатории исходили из выделенной из фибробластов соответствующей мРНК. По нуклеотидной последовательности была выведена соответствующая аминокислотная последовательность:

1	Met-Ser-Tyr-Asn-Leu-Leu-Gly-Phe-Leu-Gln-Arg-Ser-Ser-Asn-Phe-	10
	20	30
	Gln-Cys-Gln-Lys-Leu-Leu-Trp-Gln-Leu-Asn-Gly-Arg-Leu-Glu-Tyr	40
	50	60
	Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-Met-Asn-Phe-Asp-Ile-Pro-Glu-Glu-Ile-Lys-	70
	80	90
	Gln-Leu-Gln-Gin-Phe-Gln-Lys-Glu-Asp-Ala-Ala-Leu-Thr-Ile-Tyr-	100
	110	120
	Val-Tyr-His-Gln-Ile-Asn-His-Leu-Lys-Thr-Val-Leu-Glu-Glu-Lys-	130
	140	150
	Lys-Glu-Tyr-Ser-His-Cys-Ala-Trp-Thr-Ile-Val-Arg-Val-Glu-Ile-	160
	Leu-Arg-Asn-Phe-Tyr-Phe-Ile-Asn-Arg-Leu-Thr-Gly-Tyr-Leu-Arg-Asn	166

Бросается в глаза высокое содержание гидрофобных аминокислот лейцина, изолейцина, тирозина и наличие всего одного остатка пролина. Связывание углеводной части осуществляется, по всей вероятности, через N-гликозидную связь с остатком аспарагина-80 либо через O-гликозидную связь с остатками треонина или серина.

Аминокислотной последовательности интерферона предшествует типичная для секреторных белков сигнальная последовательность, селективно отщепляемая во время или сразу после прохождения мембранны. Первичная структура сигнального пептида следующая:

Met-Thr-Asn-Lys-Cys-Leu-Leu-Gln-Ile-Ala-Leu-Leu-Cys-Phe-

Ser-Thr-Thr-Ala-Leu-Ser

*Литература*

1. Advances in Protein Chemistry, Vol. 1—32, Academic Press, New York, 1944—1978.
2. Neurath H., The Proteins-Composition, Structure and Function, Vol. 1—5, Academic Press, New York, London, 1963—1970.
3. Lübbe K., Schröder E., Kloss G., Chemie und Biochemie der Aminosäuren, Peptide und Proteine, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, 1975.
4. Dickerson R. E., Geis I., Struktur und Funktion der Proteine, Verlag Chemie, Weinheim, 1975.
5. Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry (S. J. Leach, Ed.), Part B, Academic Press, New York, 1970.
6. Fasold H., Die Struktur der Proteine, Verlag Chemie, Weinheim, 1972.
7. Legget-Bailey J., Techniques in Protein Chemistry, Elsevier, Amsterdam, 1969.
8. Hoffmann S., Molekulare Matrizen, Bd.II: Proteine, Academic-Verlag, Berlin, 1978.
9. Haurowitz F., The Chemistry and Function of Proteins, Academic Press, New York, 1963.
10. Pröve P., Faust U., Chemistry in Britain, **14**, 552 (1978).
11. Crahmer R., Wiss. Fortschr., **22**, 368 (1972).
12. Müller H. G., Ruckpaul K., Wiss. Fortschr., **22**, 227 (1972).
13. Voss G., Erdöl-Kohle-Erdgas-Petrochemie m.Brennstoffchemie, **26**, 249 (1973).
14. Bauch J. et al., Chem. Techn., **30**, 284 (1978).
15. MacLaren D. D., Food prod. Dev., **9**, 26 (1975).
16. Faust U. et al., J. Ferment. Technol., **55**, 6 (1977).
17. Hofmeister F., Naturw. Rundsch., **17**, 529, 545 (1902).
18. Fischer E., Chem. Ztg., **26**, 935 (1902).
19. Fischer E., Ber., **40**, 1754 (1907).
20. Ryle A. P. et al., Biochem. J., **60**, 541 (1955).
21. Sanger F., Endeavour, **16**, 48 (1957).
22. Alexander P., Block R. J., Analytical Methods of Protein Chemistry, Pergamon Press, Oxford, 1961.
23. Haschemeyer R. H., Haschemeyer A. E. V., Proteins, Wiley, New York, 1973.
24. Niederwieser A., Pataki G., New Techniques in Amino Acid, Peptide and Protein Analysis, Humphrey, Ann Arbor, Michigan, 1971.
25. Work T. S., Work E., Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 1—3, North-Holland Publishing Co., Amsterdam, London, 1975.
26. Schwenke K. D. et al., Nahrung, **21**, 395 (1977).
27. Cohn E. J., J. Am. Chem. Soc., **68**, 459 (1946).
28. Cohn E. J., Edsall J. T., Proteins, Amino Acids and Peptides, Reinhold, New York, 1958.
29. Tavel P. V., Sigher R., Adv. Protein. Chem., **11**, 237 (1956).
30. Schwenke K. D., Z. Chem., **5**, 322 (1965).
31. Hausmann W., Craig L. C., J. Am. Chem. Soc., **80**, 2703 (1958).
32. Strathmann H., Chem. Techn., **7**, 333 (1978).
33. Determann H., Gelchromatographie, Springer Verlag, Berlin-New-York-Heidelberg, 1967.
34. Ackers G.-K., Adv. Protein. Chem., **24**, 343 (1970).
35. Friedli H., Kistler P., Chimia, **26**, 25 (1972).
36. Fischer L., An Introduction to Gel Chromatography, Elsevier, North-Holland, New York, 1972.
37. Curling J., Int. Lab., **1976**, 37.
38. Galpin I. J. et al., J. Chromatogr., **106**, 125 (1975).

39. *Gordon A. H.*, Electrophoresis of Proteins on Polyacrylamid and Starch Gels, Elsevier, North-Holland, 1971.
40. *Maurer H. R.*, Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis, 2 Aufl., W. de Gruyter, Berlin, New York, 1971.
41. *Maurer H. R.*, Disk-Electrophorese, W. de Gruyter, Berlin, 1968.
42. *Radola B. J.*, Biochem. Biophys. Acta, **295**, 412 (1973); **386**, 181 (1974).
43. *Wellner D.*, Electrofocussing in Gels, Anal. Chem., **43**, 597 (1971).
44. *Allen R. C.*, *Maurer H. R.*, Electrophoresis and Isoelectric Focussing in Polyacrylamid Gels, W. de Gruyter, New York, 1974.
45. *Arbuthnot J. P.*, *Beeley J. A.*, Isoelectric Focussing, Butterworths, London, 1975.
46. *Wagner H.*, *Speer W.*, J. Chromatog., **157**, 259 (1978).
47. *Everaerts F. M. et al.*, Isotachophoresis-Theory, Instrumentation and Applications, Elsevier, New York, 1976.
48. *Beckers J. L.*, *Everaerts F. M.*, J. Chromatog., **68**, 207 (1972); **69**, 165.
49. *Backhausz R.*, Immunodiffusion und Immunoelektrophorese; Grundlagen, Methoden und Ergebnisse, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1967.
50. *Clausen J.*, Immunochemical Techniques for the Identification and Estimation of Macromolecules, Elsevier, North-Holland, New York, 1971.
51. *Grabar P.*, *Burtin P.*, Immunoelektrophoretische Analyse, Elsevier, North-Holland, 1964.
52. *Shung-Ho Chang et al.*, Anal. Chem., **48**, 1839 (1976).
53. *Dozy A. M.*, *Huisman T. H. J.*, J. Chromatog., **40**, 62 (1969).
54. *Axen R. et al.*, Nature, **214**, 1302 (1967).
55. *Cuatrecasas P. et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **61**, 636 (1968).
56. *Cuatrecasas P.*, J. Biol. Chem., **245**, 3059 (1970).
57. *Cuatrecasas P.*, Nature, **228**, 1327 (1970).
58. *Cuatrecasas P.*, *Parikh I.*, Biochemistry, **11**, 2291 (1972).
59. *Cuatrecasas P.*, Adv. Enzymol., **36**, 29 (1972).
60. *Porath J.*, Biochimie, **55**, 943 (1973).
61. *Scouten W. H.*, Int. Lab., **1974**, 13.
62. *Lowry O. et al.*, J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).
63. *Bradford M. M.*, Anal. Biochem., **72**, 248 (1976).
64. *Tanford C.*, Physical Chemistry of Macromolecules, Wiley, New York, 1961.
65. *Edsall J. T.*, *Wyman J.*, Biophys. Chemistry, Vol. 1, Academic Press, New York, 1958.
66. *Tanford C.*, Protein Denaturation, Adv. Protein Chem., **23**, 121 (1968); **24**, 1 (1970).
67. *Svedberg Th.*, *Pedersen K. O.*, The Ultracentrifuge, Oxford, University Press, London, 1940.
68. *Schachmann H. K.*, Ultracentrifugation in Biochemistry, Academic Press, New York, 1959.
69. *Schachmann H. K.*, Biochemistry, **2**, 887 (1963).
70. *Whittaker J. R.*, Anal. Chem., **35**, 1950 (1963).
71. *Andrews P.*, Biochem. J., **91**, 222 (1964).
72. *Auricchio F.*, *Bruni C. B.*, Biochem. Z., **340**, 321 (1964).
73. *Determann H.*, Gelchromatography, Springer-Verlag, Berlin — Heidelberg — New York, 1968.
74. *Swank R. T.*, *Munkres K. D.*, Anal. Biochem., **39**, 462 (1971).
75. *Tanford C.*, Adv. Protein Chem., **23**, 122 (1968).
76. *Reynolds J. A.*, *Tanford C.*, J. Biol. Chem., **245**, 5161 (1970).
77. *Frenkel M. J.*, *Blagrove.*, J. Chromatog., **111**, 397 (1975).

78. *Dickerson R. E., Geis I.*, Funktion und Struktur der Proteine, Verlag Chemie, Weinheim, 1971.
79. *Fasold H.*, Die Struktur der Proteine, Verlag Chemie, Weinheim, 1972.
80. *Hess G. P., Rupley J. A.*, Structure and Function of Proteins, Ann. Rev. Biochem., **40**, 1013 (1971).
81. *Schulz G. E.*, Angew. Chem., **89**, 24 (1977).
82. *Kirschenbaum D. M.*, Anal. Biochem., **53**, 223 (1973); **56**, 208 (1974); **61**, 567; **66**, 123, 303 (1975); **83**, 521 (1977).
83. *Dayhoff M. O.*, Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington, 1969 u. ff.
84. *Hill R. L.*, Adv. Protein Chem., **20**, 37 (1965).
85. *Toi K. et al.*, J. Biol. Chem., **242**, 1036 (1967).
86. *Brown J. R., Hartley B. S.*, Biochem. J., **89**, 59 (1963).
87. *Witkop B.*, Adv. Protein Chem., **16**, 221 (1961).
88. *Witkop B.*, Science, **162**, 318 (1968).
89. *Gross E., Witkop B.*, J. Am. Chem. Soc., **83**, 1510 (1961).
90. *Stark G. R.*, J. Biol. Chem., **248**, 6583 (1973).
91. *Degani Y., Patchornik A.*, Biochemistry, **13**, 1 (1974).
92. *Edman P.*, Mol. Biol. Biochem. Biophys., **8**, 211 (1970).
93. *Blackburn S.*, Protein Sequence Determination Methods and Techniques, M. Dekker, New York, 1970.
94. *Groft L. R.*, Handbook of Protein Sequences, Suppl. A, Joynson — Bruvers, Oxford, 1974.
95. *Bridgen J.*, Sci. Tool., **24**, 1 (1977).
96. *Tsernoglou D. et al.*, Biochem. Biophys. Acta, **491**, 605 (1977).
97. *Sanger F.*, Biochem. J., **39**, 507 (1945).
98. *Gray W. R., Hartley B. S.*, Biochem. J., **89**, 59 (1963).
99. *Akabori S. et al.*, Bull. Chem. Soc. Japan, **29**, 507 (1956).
100. *Edman P.*, Acta Chem. Scand., **4**, 277 (1950).
101. *Downing M. R., Mann K. G.*, Anal. Biochem., **74**, 298 (1976).
102. *Frank G., Strubert W.*, Chromatographia, **6**, 522 (1973).
103. *Zeeuws R., Strasberg A. D.*, FEBS Letters, **85**, 68 (1978).
104. *Fairwell T., Barness U. T., Lovins R. F.*, Biochemistry, **9**, 2260 (1970).
105. *Hagenmair H. et al.*, Z. Naturforsch., **256**, 681 (1970).
106. *Sun T., Lovins R. E.*, Anal. Biochem., **45**, 176 (1972).
107. *Creaser E. H., Bentley K. W.*, Biochem. J., **153**, 607 (1976).
108. *Gray W. R.*, Methods in Enzymology, Vol. 11, pp. 139, 469, Academic Press, New York, 1967.
109. *Gray W. R., Smith J.*, Anal. Biochem., **33**, 36 (1970).
110. *Gray W. R., Hartley B. S.*, Biochem. J., **89**, 379 (1963).
111. *Lequin R. M., Niall H. D.*, Biochem. Biophys. Acta, **257**, 76 (1972).
112. *Edman P., Begg C.*, Eur. J. Biochem., **1**, 80 (1967).
113. *Edman P.*, Protein Sequence Determination (S. B. Needleman, Ed.), Springer-Verlag, New York, 1970.
114. *Braunitzer G. et al.*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **354**, 867 (1973).
115. *Braunitzer G. et al.*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **354**, 1563 (1973).
116. *Kleinschmidt T., Braunitzer G.*, Annalen, **1978**, 1060.
117. *Laursen R. A., Bonner A. G.*, Chem. Engng. News., **48**, 52 (1970).
118. *Laursen R. A.*, Eur. J. Biochem., **20**, 89 (1971).
119. *Schellenberger A. et al.*, Z. Chem., **12**, 63 (1972).
120. *Mech C., Jeschkeit H., Schellenberger A.*, Eur. J. Biochem., **66**, 133 (1976).

121. *Laursen R. A. et al.*, FEBS Letters, **21**, 67 (1972).
122. *Previero A. et al.*, FEBS Letters, **33**, 135 (1973).
123. *How-Ming Lee, Riordan J. F.*, Anal. Biochem., **89**, 136 (1978).
124. *Herbrink P. et al.*, FEBS Letters, **60**, 313 (1975).
125. *Niall H. D. et al.*, FEBS Letters, **41**, 62 (1974).
126. *Wachter E. et al.*, FEBS Letters, **35**, 97 (1973).
127. *Loudon G. M., Parham M. E.*, Tetrahedron Letters, **5**, 437 (1978).
128. *Stark G. R.*, Meth. Enzymol., **25**, 369 (1972).
129. *Rangarajan M., Darbre A.*, Biochem. J., **157**, 307 (1976).
130. *Deyl Z.*, J. Chromatog., **127**, 91 (1976).
131. *Lindley H.*, Biochem. J., **126**, 683 (1972).
132. *Ovchinnikov Yu. A., Kiryushkin A. A.*, FEBS Letters, **21**, 200 (1972).
133. *Callahan P. X. et al.*, Fed. Proc., **31**, 1105 (1972).
134. *Sheinblatt M.*, J. Am. Chem. Soc., **88**, 2597 (1966).
135. *Heyns K., Grützmacher H. F.*, Fortschr. Chem. Forschg., **6**, 536 (1966).
136. *Biemann K. et al.*, J. Am. Chem. Soc., **88**, 2845 (1966).
137. *Schier G. M. et al.*, Biomed. Mass. Spectrom., **3**, 32 (1976).
138. *Kelly J. A., Biemann K.*, Biomed. Mass. Spectrom., **2**, 326 (1975).
139. *Nau H.*, Angew. Chem., **88**, 74 (1976).
140. *Nau H., Biemann K.*, Anal. Biochem., **73**, 139 (1976).
141. *Kendrew J. C.*, The Three-Dimensional Structure of the Protein Molecule, Sci. Am., **205**, 96 (1961).
142. *Anfinsen C. B.*, Angew. Chem., **85**, 1065 (1973).
143. *Levinthal C.*, Sci. Am., **214**, 42 (1966).
144. *Tanaka Seiji, Scheraga H. A.*, Macromolecules, **10**, 291 (1977).
145. *Baldwin R. L.*, Ann. Rev. Biochem., **44**, 453 (1975).
146. *Tanaka Seiji, Scheraga H. A.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **72**, 3802 (1975).
147. *Wetlauffer D. B., Ristow S.*, Ann. Rev. Biochem., **42**, 135 (1973).
148. *Ramachandran G. N., Sasisikharan V.*, Adv. Protein Chem., **23**, 282 (1968).
149. *Venkatachalan C. M., Ramachandran G. N.*, Ann. Rev. Biochem., **38**, 45 (1969).
150. *Pauling L. et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **37**, 205 (1951).
151. *Pauling L., Corey R. B.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **37**, 735 (1951).
152. *Perutz M. F.*, Nature, **1951**, 1053.
153. *Lippert J. L. et al.*, J. Am. Chem. Soc., **98**, 7075 (1976).
154. *Levitt M., Green J.*, J. Mol. Biol., **114**, 181 (1977).
155. *Chothia C. et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 4130 (1977).
156. *Davies K.*, Educ. Chem., **13**, 71 (1976).
157. *Neves D. E., Scott R. A.*, Macromolecules, **10**, 339 (1977).
158. *Teramoto A., Fujita H.*, J. Macromol. Sci.; Rev. Macromol. Chem. C 15 (2), 165 (1976).
159. *Holmes K. C., Blow D. M.*, The Use of X-Ray Diffraction in the Study of Protein and Nucleic Acid Structure, Wiley, New York, 1966.
160. *Fruberg S.*, Naturw. Rundsch., **20**, 185 (1967).
161. *Hoppe W.*, Naturwiss., **55**, 65 (1968).
162. *Hoppe W. et al.*, Naturwiss., **55**, 333 (1968).
163. *Schulz G. E.*, Nachr. Chem. Techn., **22**, 20 (1974).
165. *Hagler A. T., Honig B.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **75**, 554 (1978).
166. *Schulz G. E. et al.*, Nature, **250**, 140 (1974).
167. *Wetlauffer D. B.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **70**, 697 (1973).
168. *Schulz G. E., Schirmer R. H.*, Nature, **250**, 142 (1974).
169. *Wüthrich K.*, Chimia, **24**, 409 (1970).

170. *Bovey F. A.*, Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, Academic Press, New York, 1969.
171. *Jirgensons B.*, Optical Rotatory Dispersion of Proteins and Other Macromolecules, 2 Aufl., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1972.
172. *Beyschok S.*, *Science*, **154**, 1288 (1966).
173. *Klotz I. M. et al.*, *Ann. Rev. Biochem.*, **39**, 25 (1970).
174. *Darnall D. W., Klotz I. M.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **166**, 651 (1975)..
175. *Jaenicke R.*, *Naturwiss.*, **65**, 569 (1978).
176. *Campbell P. N., Sargent J. R.*, Techniques in Protein Biosynthesis, Academic Press, New York, 1967.
177. *Träger L.*, Einführung in die Molecularbiologie, VEB Gustav Fischer-Verlag, Jena, 1969.
178. *Lucas-Lenard J., Lipmann F.*, *Ann. Rev. Biochem.*, **40**, 409 (1971).
179. *Holler E.*, *Angew. Chem.*, **90**, 682 (1978).
180. *Zachau H. G.*, *Angew. Chem.*, **81**, 645 (1969).
181. *Holley R. W.*, *Angew. Chem.*, **81**, 1039 (1969).
182. *Rich A., Rajhandary U. L.*, *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 805 (1976).
183. *Kim S. H.*, *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **17**, 181 (1976).
184. *Rich A.*, *Biochemie*, **56**, 1441 (1974).
185. *Shoemaker H. J. P., Schimmel P. R.*, *J. Biol. Chem.*, **251**, 6823 (1976).
186. *Eldred E. W., Schimmel P. R.*, *J. Biol. Chem.*, **247**, 2961 (1972).
187. *Igloi G. L. et al.*, *Biochemistry*, **16**, 1696 (1977).
188. *Haar F.*, *Naturwiss.*, **63**, 519 (1976).
189. *Wittmann G., Jokusch H.*, Molekularbiologie-Bausteine des Lebendigen (Th. Wieland, G. Pfleiderer, Eds.), p.49, Umschau-Verlag, Frankfurt/M., 1967.
190. *Ochoa S.*, *Naturwiss. Rundsch.*, **19**, 483 (1968).
191. *Mirenberg M.*, *Angew. Chem.*, **81**, 1017 (1969).
192. *Khorana H. G.*, *Angew. Chem.*, **81**, 1027 (1969).
193. *Ochoa S.*, *Naturwiss.*, **55**, 506 (1968).
194. *Smith A. E., Marcker K. A.*, *Nature*, **226**, 607 (1970).
195.  *Blobel G.*, 11th FEBBS Meeting, Kopenhagen, 1977.
196. *Zwilling R.*, *Umschau*, **78**, 170 (1978).
197. *Chan S. J. et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 1964 (1976).
198. *Kemper B. et al.*, *Biochemistry*, **15**, 15 (1976).
199. *Maurer R. S. et al.*, *Biochem. J.*, **161**, 189 (1977).
200. *Wallenfels K., Weil R.*, cm.[189], strp.67.
201. *Jacob F., Monod J.*, *J. Mol. Biol.*, **3**, 318 (1961).
202. *Barman T. E.*, Enzyme Handbook, Vol. I, II, Springer-Verlag, Berlin — Heidelberg — New York, 1969.
203. *Betz A.*, Enzyme — Gewinnung, Analyse, Regulation, Verlag Chemie, Weinheim, 1974.
204. *Jencks W. P.*, Catalysis in Chemistry and Enzymology, McGraw-Hill, New York, 1969.
205. *Blow D. M., Seitz T. A.*, *Ann. Rev. Biochem.*, **39**, 63 (1970).
206. *Bell R. M., Koshland D. E.*, *Science*, **172**, 1253 (1971).
207. *Kirsch J.*, *Ann. Rev. Biochem.*, **42**, 205 (1973).
208. *Lienhard G. E.*, *Science*, **180**, 149 (1973).
209. *Page M. I.*, *Angew. Chem.*, **89**, 456 (1977).
210. *Richter O.*, *Umschau*, **1976**, 581.
211. *Jaenicke R.*, *Naturwiss.*, **65**, 569 (1978).
212. *Gutfreund H.*, Enzymes: Physical Principles, Wiley, New York, 1972.

213. Koshland D. E. in: *the Enzymes*, 3 ed., Vol. 1. p. 341, Academic Press, New York, 1970.
214. Koshland D. E., *Sci. Am.*, **229**, 52 (1973).
215. Monod J. et al., *J. Mol. Biol.*, **12**, 88 (1965).
216. Richards F. M., *Structure and Activity of Ribonuclease*, in: *Structure and Activity of Enzymes*, Academic Press, London, 1964.
217. Smyth D. G., Stein W. H., Moore S., *J. Biol. Chem.*, **238**, 227 (1963).
218. Kartha G. et al., *Nature*, **213**, 862 (1967); *ibid.*, **214**, 234 (1967).
219. Richards F. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **44**, 162 (1958).
220. Wyckoff H. M. et al., *J. Biol. Chem.*, **242**, 3984 (1967).
221. Wyckoff H. M. et al., *J. Biol. Chem.*, **245**, 305 (1970).
222. Scöffone E. et al., *Chem. Commun.*, **1967**, 1273.
223. Canfield R. E., Liu A. K., *J. Biol. Chem.*, **240**, 1997 (1965).
224. Blake C. C. F. et al., *Nature*, **206**, 757 (1965).
225. Johnson L. N., Phillips D. C., *Nature*, **206**, 762 (1965).
226. Sigler B. P. et al., *J. Mol. Biol.*, **35**, 143 (1968).
227. Blow D. M. et al., *Nature*, **221**, 337 (1969); **225**, 802, 811.
228. Lipscomb W. N. et al., *J. Mol. Biol.*, **19**, 423 (1966).
229. Quiocho F. A., Lipscomb W. N., *Adv. Protein Chem.*, **25**, 1 (1971).
230. Lipscomb W. N., International Congress of Biochemistry, Abstracts 128, 1970.
231. Kendrew J. C. et al., *Nature*, **185**, 422 (1960).
232. Edmundson A. E., *Nature*, **205**, 883 (1965).
233. Dickerson R. E. in: *The Proteins* (H. Neurath, Ed.), Vol. 2, p.603, Academic Press, New York, 1964.
234. Antonini E., Brunori M., *Ann. Rev. Biochem.*, **39**, 977 (1970).
235. Buse G., *Angew. Chem.*, **83**, 735 (1971).
236. Braunitzer G., *Naturwiss.*, **54**, 407 (1967).
237. Perutz M. F. et al., *Nature*, **185**, 416 (1960).
238. Cullis A. F. et al., *Proc. Roy. Soc. (London)*, **265**, 161 (1961).
239. Sund H., Weber K., *Angew. Chem.*, **78**, 217 (1966).
240. Fermi G., *J. Mol. Biol.*, **97**, 237 (1975).
241. Huber R. et al., *Naturwiss.*, **56**, 262 (1969).
242. Bradbury J. H., *Adv. Protein Chem.*, **27**, 111 (1973).
243. Rich A., Crick F. H., *J. Mol. Biol.*, **3**, 483 (1961).
244. Grassmann W., *Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe*, **23**, 196 (1965).
245. Nemetschek Th., *Chem. Labor Betrieb*, **20**, 433 (1969).
246. Reich G., *Kollagen. Eine Einführung in Methoden, Ergebnisse und Probleme der Kollagenforschung*, Theodor Steinkopff-Verlag, Dresden, 1967.
247. Traub W., Piez K. A., *Adv. Protein Chem.*, **25**, 243 (1971).
248. Kühn K., *Naturwiss.*, **54**, 101 (1967).
249. Kabat E. A., *Einführung in die Immunochemie und Immunologie*, Springer-Verlag, Berlin — Heidelberg — New York, 1971.
250. Edelmann G. M., Gall W. E., *Ann. Rev. Biochem.*, **38**, 425 (1969).
251. Kleine T. O., *Z. Klin. Chem.*, **7**, 313 (1969).
252. Sela M., *Science*, **166**, 1365 (1969).
253. ABC Biochemie, S. 290, VEB Brockhaus Verlag, Leipzig, 1976.
254. Hilschmann N., *Nova Acta Leopoldina*, **39/1**, 15 (1973).
255. Kabat E. A., *Adv. Protein Chem.*, **32**, 1 (1978).
256. Deryck R. et al., *Nature*, **285**, No 5766, 542 (1980).
257. Taniguchi T. et al., *Gene*, **10**, 11, 15 (1980).
258. Taniguchi T. et al., *Nature*, **285**, 547, 549 (1980).

# Предметный указатель

- Агматин 72  
1-(1-Адамантил)-1-метилэтоксикарбонильная группа 109  
Аденозилгомоцистеин 71  
Аденозилметионин 70  
Адренокортикотропный гормон см.  
Кортикотропин  
Азетидин-2-карбоновая кислота 22  
Азидный метод 99, 138—141, 172, 178  
Азлактонный синтез 43  
Азлактоны 43, 44, 170—172  
Акромегалия 244, 260  
АКТГ см. Кортикотропин  
Активированные эфиры 146 и сл.  
— полимеры 198, 199, 200  
Актин 340  
Актиномицины 201, 299 и сл., 398  
Аламетицин 305, 306  
Аланин 14, 17, 20, 27, 28  
— абсолютная конфигурация 26  
— биосинтез 50  
— ИК-спектроскопия 35  
— молекулярное вращение 23, 24  
— наличие 20, 48  
— пространственное расположение 26  
β-Аланин 20, 155  
DL-Аланин, изопропиловый эфир 52  
Алафосфин 298  
Алитензин 89, 236, 284  
2-Алкоксиоксазолоны 172  
Алкогольдегидрогеназа 387  
N-Алкиламиноциклоты 11  
Алкилирование шиффовых оснований 44  
N-Алкилтио-тиокарбониламиноциклоты 29  
Аллиин 21  
Альбуимины 340, 343, 345, 355, 357  
α-Аманин 299, 311  
Аматоксин 299, 309 и сл.  
Амелетин 289  
Амидазы 400  
1-Амидино-3,5-диметилпиразол 128  
Амидирование 128  
*трем*-Амилоксикарбонильная группа 108  
Аминоадипиновая кислота 11, 23  
δ-Аминоадипилшистенилвалин 232  
L-2-Амино-4-(4'-амино-2',5'-циклогексадиенил)масляная кислота 21, 22  
Аминоацилсвязывающее место 394 и сл.  
Аминоацил-тРНК-сингтетазы 388, 389  
Аминоацильная перегруппировка 164 и сл.  
6-Аминогексановая кислота 9, 32  
Аминозащитные группы 101 и сл.  
α-Аминокарбоновых кислот нитрилы 42  
α-Аминокапролактам 41  
L-Аминокапролактамгидролаза 41  
α-Аминокапролактамрацимаза 41  
ε-Аминокапроновая кислота см. 6-Аминогексановая кислота  
Аминокислоты 9 и сл.  
— abiогенное образование 48, 49  
— абсолютная конфигурация 26  
— алкилирование 70  
— амфотерность 30  
— анализ 55 и сл.  
— антагонисты 20, 22  
— асимметрический синтез 47 и сл.  
— ацилирование 71  
— биосинтез 49 и сл.  
— вкусовые качества 29  
— выделение из белковых гидролизатов 38, 39  
— групповое разделение 39  
— изоэлектрические точки 32  
— комплексообразование с металлами 67  
— конфигурация 25  
— константы диссоциации, рK 31, 32  
— кривые титрования 31

- микробиологический синтез 39
- молекулярное вращение 23, 24
- незаменимые 18
- непротеиногенные 20, 232
- номенклатура 10, 11
- получение 38
  - меченых 45 и сл.
  - пребиотический синтез 48
  - пространственная модель 26
  - протеиногенные 17 и сл.
  - разделение рацематов 51, 52
  - растворимость 30
  - рацемизация 51 и сл.
  - D-соединения 9, 23
  - сокращения 12, 13
  - спектры ДОВ 24, 25
  - ИК 35—36
  - КД 24—26
  - УФ 35
  - ЯМР 35 и сл.
  - стереохимия 20 и сл.
  - стерическая корреляция 27
  - температуры разложения 33
  - удельное вращение 23, 24
  - эфиры 39, 73
- Аминокомпонент 95, 96
- Аминолиз эфиров 147 и сл.
- Аминомасляная кислота 9, 11
- L-2-Амино-4-(метилfosфино)масляная кислота 22
- Аминопропионовая кислота 9
- $\alpha$ -Амино-3-хлор-2-изоксалин-5-уксусная кислота 21
- 1-Аминоциклогексанкарбоновая кислота 20
- Анализ аминокислотной последовательности 65, 367 и сл.
- Аналитические автоматы 56, 59, 60
- Ангиотензин 234, 278 и сл.
- Ангиотензин II 89, 168, 194, 229, 240, 278
  - Андерсона—Каллахана тест 175
- Антаманид 194, 305, 309, 312
- Антитело антигена 240, 424
- Аламин 313, 314
- Апоферритин 420
- Аргинин 10, 15, 17, 18, 34, 96, 125
- Аргининдекарбоксилаза 387
- Аспарагин 10, 11, 16, 17, 121, 188
  - биосинтез 50
  - наличие 16
  - расщепление рацемата 53
- Аспарагинил 11
- Аспарагиновая кислота 15, 17, 96, 188, 210
  - биосинтез 50
  - декарбоксилирование 71
  - применение 38
  - проекция Ньюмена 29
  - семиальдегид 40
  - ферментативный синтез 40
  - ЯМР-спектры 36, 37
- L-Аспартаза 41
- Аспартаткиназа 387
- Аспартатил 11
- Аспартоцин 249
- Аспроханин 316
- Аффинная хроматография 353, 354
- Ацетамидометильная группа 135, 205
- N-Ацетилимидазол 191
- Ацетиллизин 12
- Ацетоацетильная группа 110
- Ацетуровая кислота 43
- N-Ациламинокислоты 55, 71, 102
  - анилины 54
  - фенилгидразиды 54
- Ацилмочевина 153 и сл., 158
- Ацилпереносящий белок 194
- Бассианолид 317
- Бейтса реагент 161
- Бацитрацин 232, 298
- Беауверицин 304
- Белки 340 и сл.
  - амфолитный характер 356
  - анализ аминокислотной последовательности 367 и сл.
  - антифризы 429, 430
  - бактерий 343
  - Бенса—Джонса 426, 427
  - биологическая значимость 19
  - биосинтез 341, 388 и сл.
  - корректирующий механизм 391
  - буферное действие 357
  - водорослей 343
  - выделение 343, 345 и сл.
  - высаливание 358
  - гидратация 358
  - гидролиз 38, 39
  - глобулярные 344, 364
  - денатурация 358 и сл.
  - изоэлектрические точки 356, 357

- классификация 344 и сл.
- количественное определение 355, 356
- конформация 364
- скелета 383
- критерий чистоты 354
- листьев 342
- методы фракционирования 346 и сл.
- микробиологический синтез 341, 342
- молекулярные массы 359 и сл.
- незаменимых аминокислот содержание 19
- обнаружения реакции 355
- одноклеточных 341, 342
- определение концевых групп 367 и сл.
- пространственной структуры 383 и сл.
- плазмы 344, 353
- резервные 340, 344, 412 и сл.
- рентгеноструктурный анализ 383, 384
- структура вторичная и третичная 374 и сл.
- первичная 364 и сл.
- четвертичная 363, 386 и сл.
- субъединицы 387
- фибрillярные 345
- Белковый секвенатор 370 и сл.
- Бензидриловые эфиры см. Дифенилметиловые эфиры
- Бензилоксалол-5-метиленоксикарбонильная группа 109
- Бензильная группа 113, 128, 129, 132, 135, 187, 193
- Бензил-(4-нитрофенил)карбонат 151
- Бензиловые эфиры 117, 118
- Бензилоксикарбониларгинин гидробромид 127
- Бензилоксикарбониласпарагиновая кислота- $\beta$ -бензиловый эфир 37
- $\alpha$ -бензиловый- $\beta$ -*трет*-бутиловый эфир 12
- Бензилоксикарбонил-S-бензилцистеин 4-нитрофениловый эфир 174
- 1-Бензилоксикарбониламинно-2,2,2-трифторэтильная группа 129, 132
- Бензилоксикарбонильная группа 100, 102 и сл., 107, 114, 124, 129 и сл., 187, 223
- Бензилсульфонильная группа 110
- O-Бензилтреонин 133
- 1-Бензил-3-этилкарбодимид 155
- S-Бензилцистеин 12
- Бензоильная группа 99, 112
- Бензотриазолилокситрис-(диметиламино)fosfonийгексафтрафосфат 161
- Бергера—Шехтера—Босхарда тест 177
- Бетанины 70
- «Бессмысленные» кодоны 392
- «Биг»-гастрин 94, 276, 277
- Биогенные амины 72 и сл.
- 1,2-Бисацилгидразины 140
- Бис-L-гистидината никеля(II) гидрат 68
- Бисглицинаты меди(II) гидрат 68
- Бис-D,L-пролината меди(II) дигидрат 68
- Биуретовая реакция 355
- 2-[Бифенил-(4)]пропил-2-оксиарбонильная группа 106, 109
- Бодански тест 176
- Бомбезин 89, 236, 282 и сл.
- Бомбинин 315
- Боотрис(трифторацетат) 126, 188, 193
- Брадикинин 94, 190, 194, 281, 284 и сл.
- 5-Бром-7-нитроиндолинильная группа 163
- Бунгаротоксин 221, 226, 316
- трет*-Бутил-5-[4,6-диметилпиримидил-2-тио]карбонат 105
- трет*-Бутил-(4-нитрофенил)карбоат 151
- трет*-Бутиловые эфиры 118, 120
- трет*-Бутилоксикарбонилазид 105
- трет*-Бутилоксикарбонильная группа 104—106, 108, 114, 124, 129, 131, 187, 188
- трет*-Бутилтиольная группа 134, 135
- трет*-Бутильная группа 112, 132, 193
- Бумажная хроматография 57
- Бухера синтез 42
- Вазопрессин 89, 91, 93, 94, 204, 222, 229, 238, 247 и сл., 286
- Вазотоцин 249, 250
- Валин 11, 13, 14, 17
- биосинтез 50
- проекции Ньюмена 29
- *трет*-бутиламид 64
- Валиномицин 208, 303 и сл., 305
- Валитоцин 249, 250
- Вейганда тест 176
- Вещество A 297
- Вещество P 94, 194, 233, 238, 255, 279 и сл., 281, 282, 286, 287
- Вилкинсона комплексный катализатор 47
- Виниловые эфиры 149
- Виомицин 302

- Вирусные белки 344  
 Вициалин 426  
 Вторичная структура 363, 364, 374 и сл..  
 Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) 60, 226
- Габриэля** синтез 42  
 Газовая хроматография 55, 61  
 — разделение энантиомеров 62, 63  
 — получение производных 61  
 α-Галогенкарбоновых кислот хлорангидриды 99, 105°  
**Галлерн**—**Вайнштейна** тест 176  
 Гастрин 89, 94, 239, 260, 273, 275 и сл., 278, 286  
 Гель-фильтрация 349, 361, 388  
 Гель-хроматография 349  
 — коммерчески доступные гели 350  
 Гель-электрофорез 351  
 Гемоглобин 344, 387, 415 и сл.  
 — первичная структура 417  
 — пространственная модель 418  
 — связывание кислорода 416  
 Гемозидерин 420  
**Гендерсона**—**Хассельбаха** уравнение 32  
 Генетический код 17, 392  
 Генная технология 244, 261, 270  
 Ген-оператор 397  
 N-Гептафторбутирилпропиловые эфиры аминокислот 61, 62  
 Гетерополиаминокислоты 209  
 Гидантонины 44, 73, 74  
 Гидроксиацильная перегруппировка 206  
 1-Гидроксибензотриазол 128, 156  
 Гидроксибензотриазоловые эфиры 150  
 N-Гидроксиглутарилимидные эфиры 150  
 2-Гидроксимино-2-цианускусной кислоты этиловый эфир 156  
 Гидроксилазы 400  
 Гидроксизизин 11, 19  
 N-Гидроксиморфолиновые эфиры 150  
 Гидроксиметиламинокислоты 32  
 N-Гидрокси-5-норборнен-2,3-дикарбоксимиид 150, 156  
 — эфир 150  
 3-Гидрокси-4-оксо-3,4-дигидро-1,2,3-бензотриазин 156  
 3-Гидрокси-4-оксо-3,4-дигидрохиназолин 157  
 — эфир 150
- N-Гидроксипиридиновые эфиры 147, 149, 173  
 3-Гидроксипиридазон-6, эфир 150  
 N-Гидроксипиридин-2,3-карбоксимидные эфиры 150  
 Гидроксипролин 11, 19, 131, 423, 424  
 — алло-модификация 27  
 N-Гидроксисукинимидные эфиры 113, 127, 149, 151  
 N-Гидроксиуретановые эфиры 150  
 2-Гидроксифениловые эфиры 150  
 N-Гидроксифталимидные эфиры 150  
 2-Гидрокси-3-этиламинокарбонилфениловые эфиры 150  
 7-Гидрокси-2-этил-(бензо-1,2-оксазолий)тетрафторборат 173  
 2-Гидроксизилсульфонилметильный носитель 186  
 Гидролазы 166, 400  
 Гидрофобные взаимодействия 383  
 Гипафорин 70  
 Гипоталамуса гормоны 89, 252 и сл.  
 Гиппуровая кислота 43, 98, 99, 141, 166  
 Гистамин 72  
 Гистидин 15, 17, 18, 96, 129, 221  
 Гнетоны 345  
 Глиадин 240  
 Гликоаминокислоты 75  
 Гликопротеины 75, 345  
 Гликозидазы 400  
 Глицилглицин 92, 99  
 Глицин 14, 17, 99, 154, 172, 233  
 — биосинтез 50  
 — вкусовые качества 29  
 — кривая титрования 31  
 — наличие 48, 421  
 — этиловый эфир 12  
 Глобулины 353  
 Глутамитоцин 249, 250  
 Глутамат натрия (моно) 29, 38, 43  
 Глутамил 11  
 Глутамин 10, 11, 16, 121, 188, 217  
 — биосинтез 50  
 — номенклатура 11  
 — расщепление 17  
 Глутаминил 11  
 Глутаминовая кислота 10, 11, 16, 17, 85, 187, 210  
 — биосинтез 42  
 — выделение 39  
 — применение 41

- микробиологический синтез 41
- кривая титрования 31
- *Штрекера* синтез 43
- Глутаминынитетаза 387
- Глутатион 86, 87, 100, 231
- Глюкагон 89, 94, 194, 221, 226, 239, 259, 260, 270 и сл.
- Гомополиаминокислоты 209
- Гомосерин 21, 40
- Гомосерингидрогеназа 40
- Гомоцистеин 21
- Гонадолиберин 156, 229, 253, 254, 257, 260, 288
- Гонадотропин 235
- Гонадотропина рилизинг-гормон см. Гонадолиберин
- Гормон роста 93, 193, 194, 204, 214, 243 и сл., 254, 260, 280
- Гормоны тканей 89
- Грамицидин S 306
  
- Дансиламинокислоты** 29
- Дансильный метод 51, 367
- Дегидроаланин 183, 297
- Дегидрогеназы 400
- Дезаминирование 69
- Дезмозин 19, 421
- Декстрановые гели 349
- Денатурация 358 и сл.
- Депептиды 204
- Деструксины 317
- Диабет 249, 252, 260, 262
- Диагональный электрофорез 365, 366
- Диазоуксусный эфир 69
- Диализ 349
- Диаминомасляная кислота 11, 21
- Диаминопимелновая кислота 23
- Диаминопропионовая кислота 21
- L-транс-2,3-Дикарбоксиизиридин 22
- 4-N,N-Диметиламиноазобензил-4-изотиоцианат 370
- α,α-Диметил-3,5-диметоксибензилоксикарбонильная группа 104
- 5,5-Диметил-3-оксоциклогексен-1-ильная группа 114
- N,N-Диметилтриптамин 72
- 3,5-Диметоксибензилоксикарбонильная группа 104
- 2,4-Динитрофениловые эфиры 132, 149
- 3,4-Диоксифенилаланин см. ДОФА
- Диоксолиперазины 74, 84, 99, 203, 211
  
- Дипептидиламинопептидаза I 373
- Дипиридил-2-дисульфид 160
- Диск-электрофорез 351
- Дисульфидная связь 87, 88, 204
- расщепление 364
- Дитиосукциноильная группа 185
- Ди-трем-бутилкарбонат 105
- Дифенилметиловые эфиры 119
- Дифенилметильная группа 121, 122, 129, 132, 135, 205
- 4,6-Дифенилтиено[3,4-*d*][1,3]диоксол-2-он-5,5-диоксид 148
- Дифенилтиофосфонильная группа 115
- 2,4-Дихлорбензилоксикарбонильная группа 107
- 5,7-Дихлор-8-оксихинолин 156
- 1,3-Дициклогексил-2,4-бис-(циклогексилимино)1,3-диазетидин 157
- N,N-Дизтилтриптамин 72
- Домены 364
- ДОФА 20, 47
- Дофамин 72
  
- Желатина** 424
  
- Защитные группы** 96, 100 и сл.
- амидных функций 115 и сл.
- аминных функций 101—115
- временные 96
- карбоксильных функций 115 и сл.
- отщепление и стабильность 107—110, 223, 224
- постоянные 96
- Зизифин 319
  
- Изоаспарагин 12
- Изоборнилоксикарбонильная группа 109
- Изобутириламидометильная группа 135
- 1-Изобутилоксикарбонил-2-изобутилокси-1,2-дигидрохинолин (ИИДХ) 143
- Изодезмозин 19, 421
- алло-Изолейцин 11, 27, 176
- Изолейцин 14, 17
- микробиологический синтез 40
- эпимеризация 52
- Изомеразы 401
- Изомочевина 152
- Изоникотинилоксикарбонильная группа 108
- Изонитрозомалонодинитрил 156
- Изопептидная связь 86
- Изотахофорез 351

- Изотопного разбавления метод 66  
 Изотоцин, 249, 250  
 5-(О-Изоурендо)-L-норвалин 22  
 Изозелектрическая точка 32, 351  
 Изозелектрическое фокусирование 351  
*Изумия* тест 176  
 $\alpha$ -*(2-Иминогексагидро-4-пиримидия)глицин* 21  
 Иминодинитрилы 42  
 Иммикислоты 15  
 Иммунный ответ 424 и сл.  
 Иммуноглобулины 340, 364, 424 и сл.  
 Иммуноэлектрофорез 352  
 Ингибиторы ферментов 399  
 Индуктор 397  
 Инициированные факторы 394  
 Инсулин 87, 89, 100, 194, 205, 206, 214,  
     217, 218, 222, 234, 239, 260, 262 и сл.,  
     286, 343  
 Интергеррени 319  
 Интергеррессии 319  
 Интерколляция 398  
 Интерфероны 340, 430 и сл.  
 2-Иодэтоксикарбонильная группа 108  
 Ионообменная хроматография 59 и сл.,  
     352
- Кадаверин 72  
 Казени 340  
 $\beta$ -Казоморфин 291  
 Каллидин 281  
 Калликреин 281  
 Канаванин 22  
 Капреомицин 302  
 Карбоаналоги 250  
 Кальцитонин 239, 273 и сл.  
 Карбоангидраза В 219  
 Карбодимидный метод 138, 153 и сл.  
 N-Карбоксиглутамиды 74, 141, 144, 145  
 $\alpha$ , $\gamma$ -Карбоксиглутаминовая кислота 23  
 Карбоксикомпонент 95, 96  
 Карбоксипептидазы 169, 368, 372, 380,  
     410 и сл.  
 N,N-Карбонилдиимидацол 186  
 Карбэтоксигруппа 100, 102  
 Кардиотоксины 315  
 Карнозин 100, 286  
 Кассинин 236, 282, 283  
 Катал 399  
 Каталаза 387  
 Катализаторы рутенийфосфиновые 47
- Катепсин 211  
*Кемпа* тест 142, 176  
 Кератины 378, 420 и сл.  
 Кинины плазмы 281  
 Киоторфин 286, 291  
 Клеверного листа структура 389 и сл.  
 Кобротоксин 194, 315  
 Коламин 72  
 Коллистин 308  
 Коллагены 357, 422 и сл.  
 Комплекс фермент — продукт 398  
     — фермент — субстрат 398  
 Конденсации методы 137 и сл.  
 Конканавалин А 387, 429  
 Константа катализа 399  
 Коинформационный анализ 30, 384, 385  
 Коинформационная стабилизация 381  
 Кормовые белки 19, 341  
 Кортикотропин 89, 93, 94, 156, 194, 215,  
     226, 227, 229, 230, 234, 237, 240 и сл.,  
     245, 246, 260, 273, 286, 287  
 Кортиколиберин 253, 254  
*Коттона* эффект 24, 29, 385  
 Креатин 71  
 Ксантопротеиновая реакция 355  
*Курциуса* перегруппировка 140
- $\beta$ -Лактоглобулины 357, 387  
 Лантионин 21, 297  
*Лаури* метод 355  
 N-Лауроилглутаминовая кислота 71  
 Льюиса кислоты 158, 174  
 Лейкокинин 295  
 Лейцин 14, 17, 51  
 Лейцинаминопептидаза 177, 368, 373, 387  
 Лектины 428, 429  
*Леттсингера* синтез 195, 212  
 Лизазы 400  
 Либерины 253  
 Лигазы 401  
 Лигандообменная хроматография 63  
 Лизин 15, 17, 18, 19, 86, 96, 103, 187, 210  
     — биосинтез 50  
     — кривые титрования 31  
     — микробиологический синтез 39, 40  
     — применение 38  
     — ферментативный синтез 41  
 Лизоцим 194, 219, 226, 344, 348, 351, 378,  
     380, 404 и сл.  
     — активный центр 405 и сл.  
     — комплекс с ингибитором 407

- механизм действия 408
- первичная структура 405
- Липопротеины** 345
- Липотропин 242, 245 и сл., 286, 291
- Литорин 236
- Люлиберин 156, 253, 254
- Люстропин** см. Пролактин
- Лютенизирующий гормон 254, 257, 280
- Лиотеотропный гормон см. Пролактин
- Лютропин** см. Лютенизирующий гормон
- Люцифераза 387
- Макропептиды** 84
- Макрофибрилы** 421
- Максимальной защиты тактика 221, 222
- Малатдегидрогеназа 387
- Малоивовый эфир в синтезе 45 и сл.
- Малформин 313
- Маннха** конденсация 163
- Масс-спектрометрический анализ аминокислот 64, 65
- Мастопаран 315
- Матричная РНК 392 и сл.
- Мезитилен-2-сульфонильная группа 126
- Мезотоцин 249, 250
- Меланолиберин 246, 253, 254, 258
- Меланостатин 246
- Меланотропин см. Меланоцитстимулирующий гормон
- Меланотропина рилизинг-гормон см. Меланолиберин
- Меланоцитстимулирующий гормон 89, 90, 220, 237, 242, 246 и сл., 258, 260, 286
- Мелатонин 72
- Меллитин 313, 314
- Мембранные белки 344
- Меррифилда** синтез 98, 100, 120, 131, 179 и сл., 214, 215
- Металлокомплексы 67, 355
- Металлопротеины 345, 419, 420
- Метеорит мерчинсонский, присутствие аминокислот 48
- N-Метиламинокислот синтез 47, 70
- 1-Метил-2-бензоилвинильная группа 114
- N-Метилвалин 11
- Метиловые эфиры 104, 117, 118
- Метилсульфонилэтоксикарбонильная группа 108
- 4-Метилсульфонилфениловый эфир 124, 149
- 2-(Метилятио)-этоксикарбонильная группа 115
- Метилтиометильная группа 132
- 4-Метилтиофениловый эфир 124
- α-Метил-2,4,5- trimethylbenzilosikarbonsильная группа 109
- Метиониллизилбрадикинин 281
- Метионин 10, 15, 17, 18, 19, 46, 104, 106, 188
- биосинтез 51
- защита 136, 137
- применение 38
- спектры КД 25
- Штрекера синтез 43
- Метод**
- Аджиномото 43
- Акабори 368
- активированных эфиров 146—150, 173, 190, 210, 213, 221, 225
- ангидридов 132, 141 и сл.
- симметричных 143, 144
- смешанных 112, 123, 138, 141 и сл., 178, 202, 225
- Бредфорда 356
- водородно-дейтериевого обмена 385, 386
- Вюнша—Вейганса 155, 178
- Гейгера—Кёнига 156, 178, 217, 269
- двухфазный 213
- дициклогексилкарбодинмидный (ДЦГК) 113, 114, 130, 153 и сл., 178, 186, 189, 190, 225
- Дормана 190
- ДЦГК с добавками 138, 155 и сл., 174
- Дюопона 43
- жидкофазный 195 и сл.
- нзоксазолиевых солей 114, 152
- N-карбоксиангидридов 144 и сл., 196, 209
- квадрольный 371
- кристаллизации 195, 197
- Камбера 134
- Лаури 355
- Митина 159
- Мукамы 159, 178
- тионилхлоридный 117
- Уги 162, 163, 173
- фосфатный 208

- фосфоразо 158
- *Хиски* 134, 205
- хлорангидридный 99, 105, 115, 133, 208
- 4-Метоксибензиловый эфир 118
- 4-Метоксибензилооксикарбонильная группа 104
- 4-Метоксибензилсульфонильная группа 126
- 4-Метоксибензильная группа 121, 122, 135
- 2-Метокси-4-нитрофениловый эфир 150
- 4-Метоксифенациловый эфир 118
- Механизм индукции — репрессии ферментов** 397
- Микамицин** 302
- Микросом белки** 344
- Микрофибриллы** 421
- Миллона реакция** 355
- Минимальной защиты тактика** 221, 222
- Минифаллотоксин** 311
- Миоглобин** 218, 219, 357, 412 и сл.
  - пространственная структура 413
  - связывание кислорода 414, 415
  - электронных плотностей распределение 414
- Миозин** 340
- Михаэлиса — Ментон уравнение** 398, 399
- Модель «site-by-site»** 392
- Молочная кислота** 28
  - молекулярное вращение различных производных 28
- Монамицин** 308, 309
- Мотилин** 93, 274, 278
- Мышечные белки** 344
- Нагароза** 167
- Налоксон** 294
- Натрия додецилсульфат** 359, 362
- Нейропептиды** 89, 90, 233, 285 и сл.
- Нейротеазин** 255, 280, 286
- Нейротоксины** 315, 316
- Нейротрансмиттеры** 72, 89, 90, 233, 247, 260, 280, 286, 287, 294
- Нейтральными солями осаждение** 346
- Нейрофизины** 248, 286
- Неокарциностатин** 297
- $\alpha$ -Неозандрий 293
- Нервный ростовой фактор** 387
- Низин** 297
- Нингидринная реакция** 56, 190
- 3-Нитро-4-аминометилбензоиламидный носитель** 185
- Нитроаргинин** 104, 126
- 4-Нитробензиловые эфиры** 118, 119, 193
- Нитробензилоксикарбонильная группа** 104, 127
- 4-Нитробензосульфидроксамовая кислота** 156
- 6-Нитровератрилоксикарбонильная группа** 104, 107
- Нитрогеназы** 420
- 2-Нитро-4-сульфофениловый эфир** 149
- 2-Нитрофениловые эфиры** 149
- 4-Нитрофениловые эфиры** 114, 127, 149, 151
- 2-Нитрофенилтиогруппа** 110, 111, 120, 130, 131, 205
- 2-Нитрофеноксиацительная группа** 110
- 3-Нитрофталевой кислоты ангидрид** 191
- Норвалин** 11
- Норлейцин** 11
- Нуклеоаминокислоты** 75
- Нуклеопротеины** 345
- Овальбумин**, 340
- 1,3-Оксазолидиндоны см. N-Карбоксиангидриды**
- Оксигемоглобин** 418
- Оксидазы** 400
  - D-аминокислот 18
- Оксидоредуктазы** 400
- Окситоцин** 89, 94, 100, 194, 204, 216, 222, 226, 229, 247 и сл.
- Олигомеризация цванидов** 48
- Оперон** 397
- Оpiатные пептиды** 90, 289 и сл.
- Оpiатные рецепторы** 230, 289, 294
- Определение аминокислот по Van Стайку** 68
- Оптического вращения дисперсия** 24, 25, 385
- Орнитин** 23, 85, 101
- Пандамин** 318
- Папанин** 167, 168, 365
- Паратиреоидный гормон** 89, 94, 194, 235, 271 и сл.
- Пассерини реакция** 163, 207

- Паули реакция** 355  
**Пелликуллярная смола** 181  
**Пельветин** 232  
**Пенициллин** 298  
**Пентагастрин** 229, 276  
**Пентаметилбензиловый эфир** 118  
**Пентафторфениловые эфиры** 149, 152  
**Пентафторфенилизотиоцианат** 370  
**Пентахлорфениловые эфиры** 149, 152  
**Пепсин** 54, 167, 169, 178, 211, 260, 357,  
365  
**Пептиазы** 400  
**Пептидильсвязывающее место** 394 и сл.  
**Пептидилтрансфераза** 166, 395  
**Пептидная связь** 83, 84, 85  
**Пептиды** 83 и сл.  
— циклические 204 и сл.  
— гетеромерные 87  
— гомодетные 87  
— циклические 83, 90, 201 и сл.  
**Пептидный путь** 89  
**Пептидный синтез** 92 и сл.  
— быстрый 214  
— в водной среде 196  
— жидкокфазный 195 и сл.  
— на полимерном носителе 98, 178 и сл.  
— с полимерными реагентами 199 и сл.  
— стратегия 98, 211 и сл.  
— тактика 98, 220 и сл.  
— ферментативный 166 и сл.  
— чередующийся твердофазно-жидкокфазный 197, 215  
— «*in situ*» 213  
**Пептидные алкалоиды** 318 и сл.  
**Пептидные антибиотики** 90, 206, 298  
**Пептидные гормоны** 90, 232 и сл., 236  
**Пептидные инсектициды** 316 и сл.  
**Пептидные лактоны** 90, 206  
**Пептидные токсины** 309 и сл.  
**Пептидный синтезатор** 191, 192  
**Пептоиды** 89  
**Пептолиды** 89, 201, 207  
**Первичная структура** 86, 358, 363 и сл.  
**Переаминирование** 69  
**Пивалиновая кислота** 142  
**Пипеколиновая кислота** 22  
**Пиперидинкарбонильная группа** 129  
**Пиперидинокарбонильная группа** 109  
**β-Пиразолилаланин** 20, 21  
**Пиридиндифенилметильная группа** 129,  
135  
**Пиридин-4-метиловые эфиры** 118  
**Пиридин-2-тиоэфир** 150  
**Пироглутамилпептиды** 121, 231, 232  
**Пирролинон** 29  
**Плазмин** 428  
**Плазминоген** 428  
**Пластиновая реакция** 166, 211  
**Полиакриламидный электрофорез** 351,  
361, 362, 388  
**Полиаминокислоты** 209 и сл.  
**Полигексаметиленкарбодимид** 155  
**Полиглутаминовая кислота** 210, 378  
**Полизотиоцианат** 372  
**Полилизин** 209, 378  
**Полимерный носитель нерастворимый**  
179 и сл.  
— растворимый 195 и сл., 200  
**Полимиксины** 21, 307, 308  
**Поли[1-оксibenзотриазол]стирол** 200  
**Полипептиды** 84  
**Полистескинин** 285, 314  
**Полиэтилениминовый носитель** 196  
**Поли(1-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-ди-**  
гидрохинолин) 200  
**Пребиотические конденсирующие реагенты** 49  
**Пребиотический синтез аминокислот** 48  
**Прегемоглобин** 416  
**Препробелки** 397  
**Препроинсулин** 265  
**Препролактин** 245  
**Препромеллитин** 313  
**Препропаратиреоидный гормон** 273  
**Пристинациин I** 302  
**Проинсулин** 226, 263 и сл.  
**Проктолин** 288  
**Пролактин** 235, 245, 257, 260  
**Пролактина ингибирующий выделение**  
гормон 245, 253, 254, 258  
**Пролактолиберин** 245, 253, 254, 258  
**Проламины** 344  
**Пролизин** 167  
**Пролил-тРНК-синтетаза** 22  
**Пролин** 11, 13, 15, 22, 154, 172, 217  
— биосинтез 50  
— прерывание спирали 379  
**Промеллитин** 313, 314  
**Проопиомеланокортин** 242, 246  
**Пропаноламин** 72

- Протеиды 345  
 Протеиногенные аминокислоты 17  
 Протофибриллы 421  
 Псилоцин 72  
 Пул аминокислот 10  
 Пуромицин 398  
 Путресцин 72
- Радиоиммунное определение** 230, 236, 240  
**Рамачандрана диаграмма** 377  
**Ранатензин** 89, 236  
**Распределение по Крейгу** 347  
**Растворителями осаждение** 346, 347  
**Расщепление N-бромсукцинимидом** 366  
 — бромцианом 90, 219, 261, 366  
**Рацемизация аминокислот** 51  
 — в пептидном синтезе 169 и сл.  
 — методы определения 175 и сл., 216  
**Резилин** 420  
**Релаксин** 239  
**Ренатурация** 358  
**Ренин** 279  
**Репрессор** 397  
**Рецепторные белки** 340, 344  
**РИА см. Радиоиммунное определение**  
**Рибонуклеаза** 87, 100, 146, 193, 194, 204, 214, 218, 344, 357, 401 и сл.  
**Рибосомы** 341, 393 и сл.  
**Рилизинг-факторы** 230  
**Рифамицин** 398  
**Роданиновый синтез** 44  
**РНК-полимеразы подавление** 398  
**tРНК-третичная структура** 391  
**Руггли—Циглера принцип разбавления** 201
- Сакагучи реакция** 355  
**Саркозин** 21, 48, 84  
**Свеберга единица** 360, 361  
**Секреция** 89, 94, 213, 226, 270, 274, 277  
**Селенофениловый эфир** 149  
**Семисинтез** 169, 218 и сл.  
**Серин** 10, 14, 17, 90, 104, 132, 133, 141, 187, 221  
 — биосинтез 50  
 — в фиброне шелка 421  
 — стерическая корреляция 27  
 — применение 38  
 — проекции Ньюмена 29  
**Сериниды** 422  
**Серотонин** 72
- Серратомолид** 208, 304  
**Сефадекс** 349, 350, 352, 361  
**Сефароза** 350  
**Сиалоген** 279  
**Сигнальная гипотеза** 265, 313, 396, 397  
**«Сигнальные» пептиды** 265, 313, 396  
**Сиднонимы** 68, 69  
**Сидноны** 68, 69  
**Синтез через гидантоины** 44  
**Синтетазы** 401  
**Скотофобин** 93, 288  
**Скутиамин** 319  
**Сладкие пептиды** 90, 276  
**Соматолиберин** 244, 253, 254  
**Соматомедины** 244  
**Соматостатин** 194, 204, 253, 256 и сл., 288  
**Соматостатин-28** 259  
**Соматотропина рилизинг-гормон см.**  
**Соматолиберин**  
**Соматотропный гормон см. Гормон роста**  
**Спираль — клубок переход** 381  
**Спиральные структуры** 378 и сл., 383, 385  
**Спонтанная кристаллизация** 52, 53  
**Споридезмолиды** 304  
**Стабилизирующие спираль аминокислоты** 378  
**Статины** 253  
**Стафилокковая нуклеаза** 194, 218, 219  
**Стафиломицин S** 302  
**Стахидрин** 70  
**N-Стеарилглутаминовая кислота** 71  
**Стекло как носитель в аффинной хроматографии** 354  
**Стоп-кодоны** 392, 395  
**Стрептограмин В** 301  
**Стрептокиназа** 428  
**Стрептомицин** 398  
**Структурные белки** 344  
**Субтилидин** 167, 365, 403  
**Субтилидин** 297  
**Сузукациллин A** 305  
**S-Сульфогруппа** 137  
**Суперспираль** 424  
**Сферон** 354
- Табачной мозаики вирус** 387  
**Таурин** 233, 286  
**Тафцин** 295

- Тахикнинны 282 и сл.  
 Тациназа N 167  
 Тентоксин 90  
 Терминаторные белки 395  
 Термическая конденсация 48, 49  
 Термолизин 167, 365  
 Тетрагидропиридинильная группа 132, 133  
 1,3-Тиазолидин-2,5-дион см. N-Тиокарбоновой кислоты ангидрид  
 Тимозин  $\alpha_1$  295, 296  
 Тимопоэтин II 295  
 Тиогидантоновый синтез 44  
 Тиогидантонины 74  
 N-Тиокарбоновой кислоты ангидрид 146, 213, 221  
 Тиоредоксин 218  
 Тиофениловые эфиры 114, 147, 149  
 Тирамин 72  
 Тиреолиберин 229, 253, 254 и сл., 260, 288  
 Тиреотропин 257, 280  
 Тирозин 10, 13, 16, 17  
 — выделение 38  
 — биосинтез 50  
 — УФ-спектр 35  
 Тирозил-тРНК-сингтетаза 389  
 Тирозина бензиловый эфир 133  
 — *трем*-бутиловый эфир 133  
 Тироксин 20  
 Тироцидин 298, 307  
 Титрования кривые 31, 32, 356  
 Тозиламинокарбонильная группа 115  
 Тозильная группа см. 4-Толуолсульфонильная группа  
 4-Толилметилсульфонильная группа 110  
 2-(4-Толилсульфонил)этоксикарбонильная группа 108  
 2-(Толуол-4-сульфонил)этиловый эфир 118  
 4-Толуолсульфонильная группа 100, 103, 111 и сл., 126, 129  
 Тонкослойная хроматография 58 и сл.  
 Тонкослойный электрофорез 58  
 Трансаминирование см. Переаминирование  
 Транскрипция 393  
 Транслокация 395  
 Транспортная РНК 389 и сл.  
 Транспортные белки 344, 412 и сл.  
 Трансферазы 400  
 Трансферрин 240
- Треонин 11, 15, 17, 89, 96, 104, 111, 132, 133, 141, 187  
 — биосинтез 51  
 — масс-спектры 65  
 — применение 38  
 Третичная структура 363, 381 и сл.  
 2,4,6-Триметилбензиловый эфир 118  
 Триметилсилиловый эфир 119  
 Триметилсилильная группа 132  
 2,4,6-Тринитробензолсульфокислотой окрашивание 57  
 Триостин A 301  
 Трипсин 168, 211, 219, 244, 365  
 Трипсина ингибитор 194, 214, 220  
 Триптамин 72  
 Триптофан 10, 11, 16, 17, 18, 19, 33, 104, 111, 131  
 — защита 130  
 — применение 38  
 — УФ-спектр 35  
 Тритиевая метка 46  
 Трифенилметильная (тритильная) группа 103, 113, 120, 124, 129, 135, 205  
 Трифторацетилглицин 12  
 N-Трифторацетил-LL-депептида эфир 64  
 Трифторацетильная группа 110, 112, 171  
 2,2-Трихлор-*трем*-бутилоксикарбонильная группа 108  
 2,4,5-Трихлорфениловые эфиры 149, 152  
 Тромбин 340, 427  
 Тропоколлаген 423  
 Туберактиномицин 302  
 Туберин 340
- Ультрафильтрация 347, 349  
 Ультрафиолетовая дифференциальная спектроскопия 385  
 Ультракарбонатная фракция 343, 360, 361, 388  
 Улеролеин 282, 283  
 Уреаза 343, 357  
 Урогастрон 275  
 Урокиназа 428
- Фаллацидин 309, 310  
 Фаллицин 309, 310  
 Фаллоидин 309, 310  
 Фаллоин 309, 310  
 Фаллотоксины 309 и сл.  
 Фенациловые эфиры 118  
 Фенацильная группа 130

- 4-Фенилазобензилоксикарбонильная группа 104, 108  
 (4-Фенилазофенил)изопропилоксикарбонильная группа 109  
 Фенилазофениловый эфир 149  
 Фенилаланин 16, 17, 46, 51  
 Фениловые эфиры 119  
 Фенилтиогидантоины 76, 369  
 Ферментативные электроды 67  
 Ферменты 344, 398 и сл.  
 — аллостерические 399  
 — иммобилизованные 54, 55, 169, 401  
 — классификация 400, 401  
 Фибронectин 14, 380, 421  
 Физалемин 89, 94, 236, 282, 283  
 Филлокинин 285  
 Филломедузин 236, 282, 283  
 Филлоперулеин 236, 284  
 Фитогемагглютинины 428  
 Фосфатидиламинокислоты 74, 75  
 Фосфолипаза A2 219  
**Фосфонийэтоксикарбонильная группа 115**  
 Фосфонопептиды 298  
 Фосфопротеины 345  
 Фосфорилазид 161  
 Фосфориламинокислоты 74  
 Фосфофруктокиназа 387  
 Фрагментная конденсация 216, 217, 225  
 Фракционирование по Кону 347, 348  
 Франгуланин 319, 320  
 Фталильная группа 104, 112  
 Фталимидометиловый эфир 119  
 ФТГ-аминокислоты 369
- Хенопсин 280  
 Херцинин 70  
 Химостатины 21  
**Химотрипсин 168, 169, 211, 364, 365, 381, 408 и сл.**  
 Химотрипсиноген 357  
 8-Хинолиловые эфиры 149, 173  
 Хиноксалин 301  
 Хиномицин 301  
 Хиразил-Val 64  
 Хламидоцин 90  
 Хлорамфеникол 398  
 Хлорацетамидометильная группа 135  
 N-Хлорацетиламинокислоты 54, 71
- Хлорацетильная группа 100, 102, 110  
 Хлорбензилоксикарбонильная группа 104  
 Хлорметильная группа 183, 186  
 N-(5-Хлорсалицилал)-группа 114  
 Хлоругольной кислоты алкиловые эфиры 141, 142  
 5-Хлор-8-хинолиловые эфиры 149  
 Холецистокининпанреозимин 89, 94, 260, 274, 277, 284  
**Хопкинс-Коле реакция 355**  
 Хориогонадотропин человека  
 Хориосоматомамотропин человека 243  
 Хроматография высокого давления 60  
 Хромодиопсин 289  
 Хромопротеины 345  
 Цвигтерионная структура 20, 30, 356  
 Центрифужный реактор 192  
 Центрифугирование, использование процесса 349, 360, 361  
 Церулеин 89, 236, 284  
 Церулоплазмин 420  
**4-Цианбензилоксикарбонильная группа 104**  
**2-Циан-*трем*-бутилоксикарбонильная группа 108**  
 Цианметиловые эфиры 149  
 Цибернины 253  
 1-Циклогексил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимиидметилиодид 155  
 Циклодимеризация 203  
**Циклопентилоксикарбонильная группа 109**  
 D-Циклосерин 22  
 Циклотрипролил 84, 203  
 Циркулины 308  
 Циркулярный дихронизм 24—26, 385  
 Цистеин 10, 15, 17, 38, 87, 221  
 — биосинтез 50  
 — защита 134 и сл.  
 — применение 38  
 Цистин 10, 27, 38, 214, 218, 219  
 — мезоформа 27  
 Цитохром с 190, 194, 357  
 Цитруллин 23
- Частичный гидролиз 365  
**Четырехкомпонентная конденсация 162—163, 173**

- Шерсти волокно 421  
*Штрекера* синтез 42 и сл., 47
- Щеточная смола 181
- Эден А 301  
 Эдмана деградация 369  
 — секвенатор 343  
 Эйзенин 232  
 Эластаза 365  
 Эластин 421  
 Эледоизин 89, 94, 236, 282, 283  
 Электроды с оксидазой аминокислот 67  
 Электрофорез 34, 350, 351  
 — без носителя 351  
 — с додецилсульфатом натрия 362  
 Элонгации процесс 394  
 Эндорфины 231, 243, 248, 286, 289 и сл.  
 Энкефалины 168, 230, 243, 246, 289 и сл.
- Энниатин 304  
 Энтеротоксин 387  
 Эргозин 318  
 Эритроруорин 419  
 Эстеразы 400  
 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил)карбо-  
 дииimidгидрохлорид 155  
 Этилкарбамоильная группа 135  
 N-Этил-N-метилглицин 12  
 Этиловые эфиры 104, 117, 118  
 N-Этил-5-фенилизоксазолий-3-сульфо-  
 нат (*Вудворда* реагент К) 152  
 Этионин 21  
 N-Этоксикарбонилфталимид 112  
 1-Этоксикарбонил-2-этоксн-1,2-дигидро-  
 хинолин (ЭЭДХ) 143
- Ювенильных гормонов аналоги 317
- Янга* тест 175

# *Содержание*

Предисловие редактора перевода .....	5
Предисловие к третьему изданию .....	7
<b>1. Аминокислоты .....</b>	<b>9</b>
1.1. Номенклатура аминокислот .....	10
1.2. Природные аминокислоты .....	13
1.2.1. Протеиногенные аминокислоты .....	17
1.2.2. Непротеиногенные аминокислоты .....	20
1.3. Стереохимия аминокислот .....	23
1.3.1. Оптическая активность аминокислот .....	23
1.3.2. Конфигурация и конформация аминокислот .....	26
1.4. Физико-химические свойства аминокислот .....	30
1.4.1. Растворимость .....	30
1.4.2. Кислотно-основные свойства .....	30
1.4.3. Спектры поглощения аминокислот .....	35
1.5. Получение аминокислот .....	38
1.5.1. Выделение из белковых гидролизатов .....	38
1.5.2. Микробиологические методы .....	39
1.5.3. Ферментативные методы .....	41
1.5.4. Методы химического синтеза .....	41
1.5.4.1. Аминолиз галогенкарбоновых кислот .....	42
1.5.4.2. Синтез Штрекера .....	42
1.5.4.3. Азлактоныльный синтез по Эрлейнмейеру — Плётлю .....	43
1.5.4.4. Гидантоиновый синтез .....	44
1.5.4.5. Алкилирование шиффовых оснований .....	44
1.5.4.6. Синтезы с малоионным эфиrom .....	45
1.5.4.7. Синтез меченных аминокислот .....	45
1.5.4.8. Асимметрические синтезы .....	47
1.5.4.9. Преобiotические синтезы .....	48
1.5.4.10. Биосинтез аминокислот .....	49
1.6. Разделение рацематов аминокислот .....	51
1.6.1. Методы кристаллизации .....	52
1.6.2. Химические методы .....	53
1.6.3. Ферментативные методы .....	53
1.7. Анализ аминокислот .....	55
1.7.1. Хроматографические методы .....	55
1.7.1.1. Бумажная хроматография .....	57
1.7.1.2. Тонкослойная хроматография .....	58
1.7.1.3. Ионообменная хроматография .....	59
1.7.1.4. Газовая хроматография .....	61
1.7.1.5. Хроматографическое разделение энантиомеров .....	62
1.7.2. Масс-спектрометрический анализ аминокислот .....	64

1.7.3.	Методы анализа с использованием изотопов .....	66
1.7.4.	Ферментативные методы .....	67
1.8.	Специфические реакции аминокислот .....	67
1.8.1.	Образование комплексов с металлами .....	67
1.8.2.	Реакции с азотистой кислотой .....	68
1.8.3.	Окислительное дезаминирование .....	69
1.8.4.	Переаминирование .....	69
1.8.5.	N-Алкилирование .....	70
1.8.6.	N-Ацилирование .....	71
1.8.7.	Декарбоксилирование .....	71
1.8.8.	Этерификация .....	73
1.9.	Циклические производные аминокислот .....	73
1.10.	Фосфорил- и фосфатидаминокислоты .....	74
1.11.	Гликоаминокислоты .....	75
1.12.	Нуклеоаминокислоты .....	75
	Литература .....	76
2.	<b>Пептиды .....</b>	83
2.1.	Общие свойства пептидов .....	83
2.1.1.	Что такое пептиды? Их строение .....	83
2.1.2.	Классификация и номенклатура .....	84
2.1.3.	Нахождение пептидов в природе и их значение .....	89
2.2.	<b>Пептидный синтез .....</b>	92
2.2.1.	Основные положения .....	92
2.2.2.	Основной принцип пептидного синтеза .....	95
2.2.3.	История развития пептидного синтеза .....	98
2.2.4.	Защитные группы .....	100
2.2.4.1.	Защитные группы для аминной функции .....	101
2.2.4.1.1.	Защитные группы ацильного типа .....	102
2.2.4.2.	Защитные группы для карбоксильных и амидных функций .....	115
2.2.4.2.1.	Истинные карбоксизащитные группы .....	116
2.2.4.2.2.	Тактические карбоксизащитные группы .....	122
2.2.4.3.	ω-Защитные группы трифункциональных аминокислот .....	125
2.2.4.3.1.	Защита гуанидиновой функции аргинина .....	125
2.2.4.3.2.	Защита имидазольной функции гистидина .....	128
2.2.4.3.3.	Защита индолевой функции триптофана .....	130
2.2.4.3.4.	Защита алифатической гидроксильной функции .....	131
2.2.4.3.5.	Защита ароматической гидроксильной функции .....	133
2.2.4.3.6.	Защита тиольной функции цистеина .....	134
2.2.4.3.7.	Защита тиозэфирной функции метионина .....	136
2.2.5.	Методы образования пептидной связи .....	137
2.2.5.1.	Азидный метод .....	138
2.2.5.2.	Ангидридный метод .....	141
2.2.5.2.1.	Метод смешанных ангидридов .....	141
2.2.5.2.2.	Метод симметричных ангидридов .....	143
2.2.5.2.3.	N-Карбоксиангидриды (НКА) .....	144
2.2.5.3.	Метод активированных эфиров .....	146
2.2.5.4.	Карбодинимидный метод .....	153
2.2.5.4.1.	Применение дициклогексилкарбодинимида .....	154
2.2.5.4.2.	Применение модифицированных карбодинимидов .....	154
2.2.5.4.3.	Применение карбодинимидов с добавками .....	155
2.2.5.5.	Пептидные синтезы с применением соединений фосфора .....	158
2.2.5.5.1.	Метод Митина .....	159
2.2.5.5.2.	Метод Мукаяма .....	159
2.2.5.5.3.	Применение других производных фосфора .....	160

2.2.5.6.	Методы конденсации, представляющие теоретический интерес .....	162
2.2.5.7.	Ферментативный синтез белков .....	166
2.2.6.	Проблемы рацемизации при пептидных синтезах .....	169
2.2.6.1.	Механизмы рацемизации .....	170
2.2.6.1.1.	Азлактонный механизм .....	170
2.2.6.1.2.	Рацемизация при прямом $\alpha$ -депротонировании .....	174
2.2.6.2.	Определение степени рацемизации .....	175
2.2.7.	Пептидные синтезы на полимерных носителях .....	178
2.2.7.1.	Синтез пептидов на твердой фазе (синтез Меррифилда) .....	179
2.2.7.2.	Жидкофазные методы .....	195
2.2.7.3.	Чередующийся твердофазно-жидкофазный пептидный синтез .....	197
2.2.7.4.	Пептидный синтез с применением полимерных реагентов .....	199
2.2.8.	Синтез циклических пептидов .....	201
2.2.8.1.	Синтез гомодетальных циклических пептидов .....	201
2.2.8.2.	Синтез гетеродетальных циклических пептидов .....	204
2.2.9.	Синтез полипептидных и регулярных полипептидов .....	208
2.2.9.1.	Синтезы гомо- и гетерополиаминокислот .....	209
2.2.9.2.	Синтез регулярных полипептидов .....	210
2.2.10.	Стратегия и тактика пептидного синтеза .....	211
2.2.10.1.	Стратегия пептидного синтеза .....	211
2.2.10.1.1.	Ступенчатое наращивание пептидной цепи .....	212
2.2.10.1.2.	Стратегия фрагментной конденсации .....	216
2.2.10.1.3.	Семисинтез .....	218
2.2.10.2.	Тактика пептидного синтеза .....	220
2.2.10.2.1.	Выбор комбинации защитных групп .....	220
2.2.10.2.2.	Метод конденсации .....	225
2.2.10.3.	Возможности и ограничения пептидного синтеза .....	226
2.3.	Биологически активные пептиды .....	230
2.3.1.	Пептидные и белковые гормоны .....	232
2.3.1.1.	Кортикотропин .....	240
2.3.1.2.	Соматотропный гормон .....	243
2.3.1.3.	Пролактин .....	245
2.3.1.4.	Липотропин .....	245
2.2.1.5.	Меланоцитстимулирующий гормон .....	246
2.3.1.6.	Окситоцин и вазопрессин .....	247
2.3.1.7.	Гормоны гипоталамуса .....	252
2.3.1.7.1.	Тиреолиберин .....	255
2.3.1.7.2.	Гонадолиберин (рилизинг-фактор гонадотропина) .....	257
2.3.1.7.3.	Кортиколиберин .....	257
2.3.1.7.4.	Пролактолиберин и пролактостатин (рилизинг-фактор пролактина и гормон, ингибирующий выделение пролактина) .....	258
2.3.1.7.5.	Меланолиберин и меланостатин (рилизинг-фактор меланотропина и гормон, ингибирующий выделение меланотропина) .....	258
2.3.1.7.6.	Соматолиберин (рилизинг-фактор соматотропина) .....	259
2.3.1.7.7.	Соматостатин (гормон, ингибирующий выделение соматотропина) .....	259
2.3.1.8.	Инсулин .....	262
2.3.1.9.	Глюкагон .....	270
2.3.1.10.	Паратиреоидный гормон .....	271
2.3.1.11.	Кальцитонин .....	273
2.3.1.12.	Гормоны желудочно-кишечного тракта .....	274
2.3.1.12.1.	Гастрин .....	275
2.3.1.12.2.	Секретин .....	277
2.3.1.12.3.	Холецистокининпанкреозин .....	277
2.3.1.12.4.	Мотилин .....	278
2.3.1.13.	Ангиотензин .....	278
2.3.1.14.	Вещество P .....	279

2.3.1.15.	Нейротеизин .....	280
2.3.1.16.	Кинины плазмы крови .....	281
2.3.2.	Пептиды животного происхождения с гормоноподобными активностями .....	281
2.3.2.1.	Тахикинины .....	282
2.3.2.2.	Группа бомбезина .....	283
2.3.2.3.	Группа церуленина .....	284
2.3.2.4.	Брадикинины амфибий .....	284
2.3.3.	Нейропептиды .....	285
2.3.3.1.	Пептиды, осуществляющие «перенос памяти» .....	288
2.3.3.2.	Эндорфины .....	289
2.3.4.	Пептиды с иммунологическим действием .....	295
2.3.5.	Пептидные антибиотики .....	296
2.3.5.1.	Пептидные антибиотики, подавляющие биосинтез клеточных стенок бактерий .....	298
2.3.5.2.	Пептидные антибиотики, подавляющие синтез и функционирование нуклеиновых кислот .....	299
2.3.5.3.	Мембранные антибиотики .....	302
2.3.6.	Пептидные токсины .....	309
2.3.7.	Пептидные инсектициды .....	316
2.3.8.	Пептидные алкалоиды .....	318
	Литература .....	320
3.	Белки .....	340
3.1.	Значение. Исторический аспект .....	340
3.2.	Классификация белков .....	344
3.3.	Выделение и очистка .....	345
3.4.	Обнаружение и количественное определение .....	355
3.5.	Физико-химические свойства .....	356
3.5.1.	Цвиттер-ионная природа белковой молекулы .....	356
3.5.2.	Растворимость .....	357
3.5.3.	Денатурация .....	358
3.5.4.	Молекулярная масса .....	359
3.5.5.	Форма молекул .....	362
3.6.	Принципы структурной организации белковых молекул .....	363
3.6.1.	Первичная структура .....	364
3.6.1.1.	Селективное расщепление полипептидных цепей .....	365
3.6.1.2.	Установление аминокислотной последовательности .....	367
3.6.1.2.1.	Определение концевых аминокислот .....	367
3.6.1.2.2.	Ступенчатая деградация полипептидной цепи .....	369
3.6.2.	Вторичная и третичная структуры .....	374
3.6.2.1.	Пространственное расположение полипептидной цепи .....	375
3.6.2.1.1.	Спиральные структуры .....	378
3.6.2.1.2.	Структура складчатого листа .....	379
3.6.2.1.3.	Неупорядоченные конформации полипептидной цепи .....	381
3.6.2.1.4.	Третичная структура глобулярных белков .....	381
3.6.2.2.	Методы установления пространственной структуры белков .....	383
3.6.3.	Четвертичная структура .....	386
3.7.	Биосинтез белков .....	388
3.7.1.	Активация аминокислот и их связывание с tРНК .....	388
3.7.2.	Образование полипептидной цепи на рибосоме .....	391
3.7.3.	Отделение полипептидной цепи от рибосомы .....	395
3.7.4.	Регуляция биосинтеза белка .....	397

Избранные примеры функциональных белков .....	398
Ферменты .....	398
Рибонуклеаза .....	401
Лизоцим .....	404
Химотрипсин .....	408
Карбоксипептидаза А .....	410
Транспортные и резервные белки .....	412
Миоглобин .....	412
Гемоглобин .....	415
Металлопротеины .....	419
Структурные белки .....	420
Кератины .....	421
Коллагены .....	422
Белки с защитными функциями .....	424
Иммуноглобулины .....	424
Фибриноген — фибрин .....	427
Лектины .....	428
Белки, препятствующие замерзнанию .....	429
Интерфероны .....	430
Литература .....	432
Предметный указатель .....	438

## **УВАЖАЕМЫЙ ЧИТАТЕЛЬ!**

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присыпать по адресу: 129820, Москва, И-110, ГСП, 1-й Рижский пер., д. 2, издательство «Мир».

**Ханс-Дитер Якубке, Ханс Ешкайт**

**· Аминокислоты, пептиды, белки**

Научный редактор Т. И. Почкаева

Мл. научный редактор И. А. Колчин

Художник И. И. Каледин

Художественный редактор М. Н. Кузьмина

Технические редакторы: Н. Б. Панфилова и Л. С. Тимофеева

Корректор Н. В. Башкирева

**ИБ № 3937**

Подписано к печати 28.03.85. Формат 60×90 $\frac{1}{16}$ . Бумага офсетная № 2.

Гарнитура таймс. Печать офсетная.

Объем 14,25 бум. л. Усл. печ. л. 28,50. Усл. кр.-отт. 28,50.

Уч.-изд. л. 33,73. Изд. № 3/2904. Тираж 2700 экз.

Зак 334. Цена 5 р. 40 к.

Набрано в издательстве «Мир»

на фотонаборном комплексе «Компьюографик»

129820, ГСП Москва, 1-й Рижский пер., 2.

Тульская типография Союзполиграфпрома

при Государственном комитете СССР по делам издательств,

полиграфии и книжной торговли.

300600, Тула, проспект им. В. И. Ленина, 109.