



ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 577.112.6 : 577.152.34'14 : 542.953.2

СИНТЕЗ ПЕПТИДОВ В ВОДНЫХ СРЕДАХ

*Самойлова Н. А., Давидович Ю. А., Рогожин С. В.**Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова
Академии наук СССР, Москва*

В обзоре рассмотрены вопросы пептидного синтеза в водной среде: использование ферментов для образования пептидной связи, введения и удаления защитных групп, поиск новых гидрофильных защитных групп, а также развитие химических методов синтеза в водной среде с применением низкомолекулярных реагентов и полимерных носителей.

Соединения белковой природы нашли широкое применение в таких сферах человеческой деятельности, как сельское хозяйство, пищевая промышленность, медицина. Они являются объектами разнообразных научных исследований.

Существуют два пути получения этих соединений — выделение из природных источников и синтез. Выделение индивидуальных веществ, присутствующих обычно в незначительных количествах, из сложных смесей сопряжено со значительными трудностями. Перспективными в этом направлении являются микробиологические методы, в частности методы «генной инженерии», с помощью которых в последние годы стали доступными такие биологически важные белки, как инсулин и интерферон [1]. Наиболее часто для получения пептидов все же используются синтетические методы, с помощью которых можно прийти практически к любым структурам, в том числе и к пептидам с последовательностями, не встречающимися в природе.

Задача перенесения пептидного синтеза в среду, которая не обладает денатурирующим воздействием на соединения белковой природы (в оптимальном варианте это водная среда, физиологические значения рН), весьма актуальна. В последнее время проводятся интенсивные исследования в плане использования ферментов для образования пептидной связи, введения и удаления защитных групп, в поиске новых гидрофильных защитных групп, а также в области химических методов синтеза в водной среде с применением низкомолекулярных реагентов и полимерных носителей. Рассмотрение этих вопросов и составляет основное содержание обзора.

I. Применение ферментов в пептидном синтезе

I.1. Катализ образования пептидной связи

Протеолитические ферменты в отличие от ферментных систем, участвующих в биосинтезе белка, не требуют затраты энергии (АТФ) на гидролиз (синтез) пептидной связи. Такие реакции обратимы, поэтому можно выделить два самостоятельных аспекта применения протеолитических ферментов — в качестве гидролаз и в качестве синтетаз.

Возникновение интереса к проблеме использования протеолитических ферментов для пептидного синтеза было обусловлено выяснением механизма биосинтеза белка и роли в нем протеиназ. Начало таким исследованиям было положено работами Бергмана и др. [2—4], которые исполь-

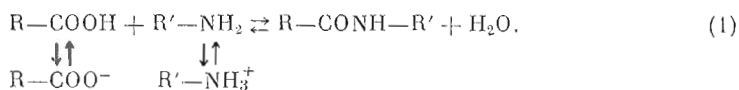
зовали папаин и α -химотрипсин для катализа образования пептидной связи. Работы в этом направлении были продолжены в 50-х годах [5–7]. После того как было показано, что матричный синтез белков в рибосомах так же, как и нерибосомный биосинтез пептидов, осуществляется по пути, более сложному и отличному от реакции, обратной протеолизу, дальнейшие исследования были посвящены преимущественно синтезу с помощью ферментов высокомолекулярных белковоподобных соединений — пластенов [8].

В последние годы интерес к ферментативному синтезу пептидов вновь возрос. Применение ферментов для катализа образования пептидной связи сулит такие преимущества, как мягкие условия проведения реакции (водные растворы), отсутствие побочных реакций в случае использования для получения пептидов исходных компонентов с незащищенными боковыми функциональными группами. Кроме того, высокая специфичность протеиназ должна гарантировать получение оптически чистых продуктов. Немаловажную роль играет также тот факт, что многие ферментные препараты стали более доступными, так как выпускаются в промышленном масштабе.

Наиболее часто в пептидном синтезе использовались эндопептидазы: сериновые — α -химотрипсин [3, 6, 7, 9–26], трипсин [26–35], субтилизин [23, 36–38], тиоловая протеиназа — папаин [2, 5, 10, 11, 18, 20, 30, 36–43], кислая протеиназа — пепсин [36, 38, 40, 44–47], металлопротеиназы [36, 37, 48–52]. Есть данные о применении экзопептидаз — карбоксипептидаз [53–59]. Как правило, это были высокочистые препараты, однако показано, что возможно использование и технических ферментных концентратов [48, 49].

Обычно ферменты функционируют в водных средах, поэтому естественно создание такой же среды и для реакций *in vitro* с участием ферментов. Но проведение реакций синтеза в типичных для протеолиза условиях дает обычно весьма низкие выходы.

Если рассмотреть равновесие реакции образования пептидной связи в воде (1), то окажется, что в обычно используемом диапазоне pH 3–10 оно практически нацело смещено в сторону исходных реагентов; это происходит прежде всего вследствие ионизации реагирующих групп [15] и существования хотя бы одного из реагентов в нереакционноспособной заряженной форме:

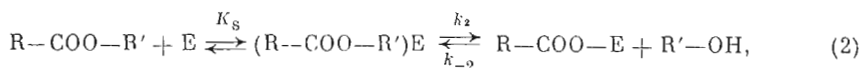


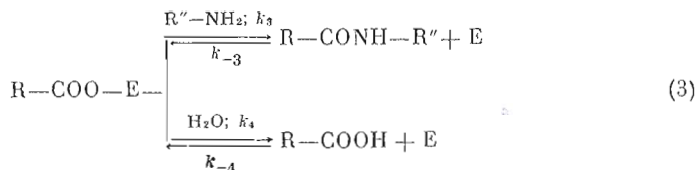
Возможно несколько вариантов повышения выхода целевого продукта в реакции (1), нашедших применение в ферментативном синтезе пептидов.

1. В качестве исходных соединений используют хорошо растворимые в реакционной смеси реагенты, из которых в результате реакции получают продукты с растворимостью ниже, чем равновесная концентрация. Таким образом, продукт реакции выводится из реакционной смеси, и равновесие реакции (1) смещается вправо. Это условие соблюдается в большинстве ранних работ по ферментативному синтезу пептидов [10, 36, 37].

2. Другой вариант заключается в снижении содержания воды в системе. Этого можно достичь введением значительного количества органического растворителя, который смешивается с водой, либо проведением реакции в двухфазной водно-органической системе. Последний прием находит все больше последователей [24, 25, 43, 52, 60–63].

3. Еще один подход предполагает использование карбоксильного компонента в активированной форме, обычно в виде сложного эфира $\text{R}-\text{COO}-\text{R}'$:





Показано [64], что при этом ускоряется самая медленная стадия реакции (2), характеризуемая константой K_2 . Далее ацилизим может подвергаться атаке нуклеофила $\text{R}''\text{-NH}_2$ или гидролизоваться (3); при $k_3 > k_{-3}$ и $k_4 > k_{-4}$ соотношение скоростей аминлиза и гидролиза (k_3/k_4) зависит от природы нуклеофила, который конкурирует с водой, и его концентрации. Такой подход позволяет получать пептиды с довольно высокими выходами независимо от растворимости продуктов реакции. Неудобство состоит в необходимости этерифицировать карбоксильный компонент перед синтезом. Кроме того, не все протеиназы образуют промежуточный активный комплекс с субстратом в виде сложного эфира.

Более подробно основные подходы к применению ферментов в органическом синтезе рассмотрены в работах К. Мартинека с сотр. [60, 65].

Специфичность протеолитических ферментов в реакции образования пептидной связи обычно та же, что и в гидролизе. Большое разнообразие используемых ферментов позволило вовлечь в реакцию пептидообразования практически все природные аминокислоты; исключение составил пролин [17, 27, 43, 54]. Что касается стереоспецифичности ферментов, то она в большинстве случаев была весьма высокой [6, 9, 39, 48, 66], но неабсолютной [27]. Специальное исследование рацемизации при ферментативном синтезе пептидов [67] показало, что максимальная степень рацемизации составляла 0,04%.

В отличие от пептидного синтеза с использованием химических реагентов для реакций синтеза, катализируемых ферментами, в общем случае трудно предсказать эффективность — решающее значение имеет подбор экспериментальных условий. Кроме таких факторов, как концентрация реагентов и их соотношение, время, температура, pH среды, на ход реакции влияет также природа используемого буфера [17, 41, 49], его молярность [41], количество солей в системе [13, 14, 41], наличие соразработителей, кроме воды, их природа и содержание в смеси [11, 12, 15, 28, 40, 49, 68, 69], наличие защитных групп и их тип [27, 38, 40, 50, 56], величина и строение сочетаемых фрагментов [11, 49, 58] и т. п. При этом сообщения о действии этих факторов в ряде случаев противоречивы [70].

Устойчивость ферментов к денатурирующим воздействиям среды — высокой температуре, pH и т. п. — может быть повышена в результате их иммобилизации [71]. Однако в ферментативном синтезе пептидов иммобилизованные ферментные препараты применяли сравнительно редко [11, 22, 23, 52, 55, 72–74], при этом не всегда достигались положительные результаты [55].

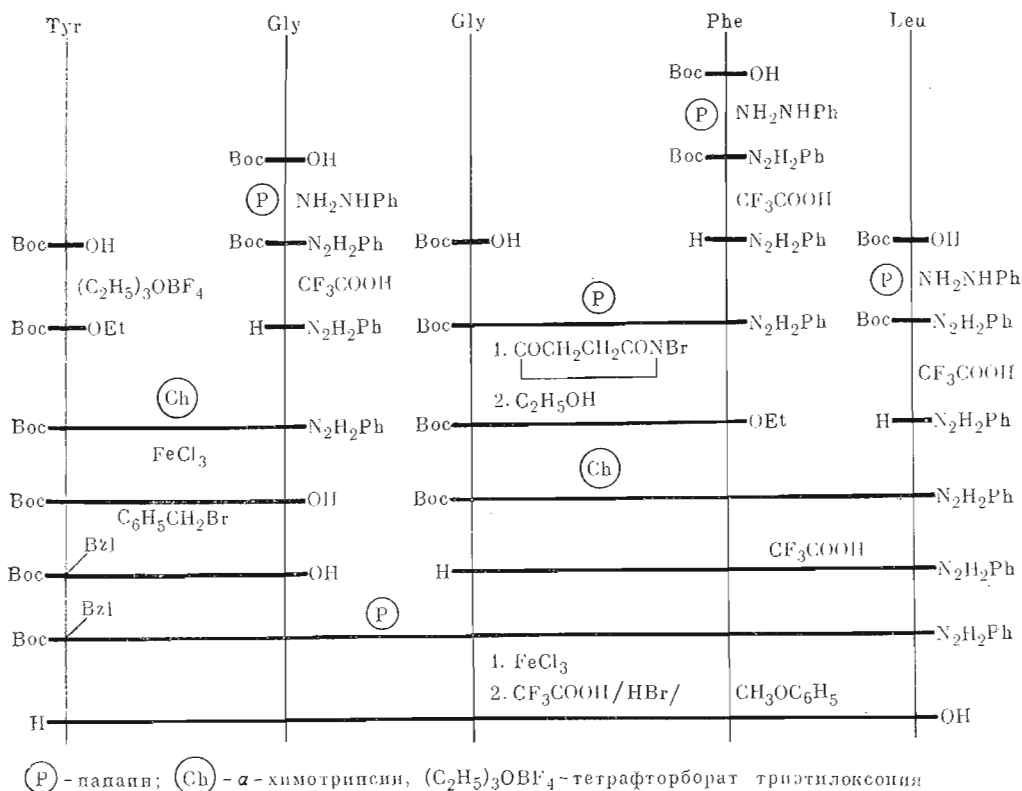
Большинство публикаций по ферментативному синтезу пептидов посвящено получению модельных соединений. Наибольший интерес, однако, представляют те работы, в которых получали пептиды, практически ценные или обладающие биологической активностью.

Так, например, «сладкий дипептид» H-Asp-Phe-OMe был получен с хорошим выходом (96%) и в оптически чистом виде с помощью катализируемой термолизином конденсации Z-Asp-OH и H-Phe-OMe и последующего гидрогенолиза [48]. Сохранность эфирной группы пептида была обусловлена отсутствием эстеразной активности у фермента. Реакция проходила исключительно по α -карбоксильной группе аспарагиновой кислоты. В данном синтезе применяли рацемические исходные реагенты и технические препараты фермента [48, 51].

Значительно более низкие постадийные выходы (21–40%) наблюдали при использовании папаина и кислой протеиназы из *Irpex lacteus* в синтезе производного изоглутатиона [75].

Возможность применения ферментов во фрагментной конденсации пептидов может быть продемонстрирована на примере получения хромоген-

Схема 1



ных субстратов сериновых протеиназ [76, 77], защищенных физиологически активных пептидов: [Asp¹(NH₂), Val⁵]ангиотензин II [22], фрагментов секретина (24—27) и (23—27) [49], энкефалинов [10, 18, 40]. Протеолитические ферменты также использовали в синтезе фрагмента (1—8) динорфина [26], С-концевого октапептида холецистокинина [78].

Весьма наглядным с точки зрения тактики ферментативного пептидного синтеза представляется получение Leu-энкефалина [10]. Попытка воспроизвести схему, описанную в работе [40], последним этапом которой явилась конденсация Boc-Tyr(Bzl)-(Gly)₂-OH и триметилбензилового эфира H-Phe-Leu-OH, была неудачной; по данным аминокислотного анализа, конечный продукт содержал только один остаток глицина. Более успешным оказался вариант получения пентапептида, приведенный на схеме 1. Выход продукта составлял 82%. В данном случае протеолитические ферменты использовали на всех стадиях пептидообразования.

Выбор защитных групп для синтеза [10] был не случаен: они обеспечивали растворимость исходных компонентов в реакционной смеси, не препятствовали применению ферментов на стадиях пептидообразования, легко удалялись после конденсации. Фенилгидразидная защитная группа вводилась в Boc-аминокислоты также ферментативно — с помощью папаина [5]. Выбранный путь синтеза должен был гарантировать получение на каждой стадии нерастворимых продуктов.

Исходные фрагменты для конечной конденсации получали следующим образом. Дипептид, карбоксильный компонент, синтезировали через ряд последовательных операций: сначала конденсировали Boc-Tyr-OEt с Gly-N₂H₂Ph (выход 72% в водно-органическом буфере, pH 10,1, при катализе α-химотрипсином), затем обрабатывали хлорным железом и бензилировали. Непосредственно реакцию Boc-Tyr(Bzl)-OEt с H-Gly-N₂H₂Ph α-химотрипсин не катализирует, а Boc-Tyr-Gly-OH нельзя было использовать на следующей стадии, так как это привело бы к получению растворимого продукта.

Все попытки получить *Woc-Gly-Phe-Leu* в виде *трет*-бутилового, три-метилсилилового эфира или фенилгидразида при катализе папаином или термолизином были безуспешны из-за расщепления связи *Phe-Leu*. Поэтому сначала конденсировали *N-трет*-бутоксикарбонилглицин с фенилгидразидом фенилаланина в присутствии папаина (выход 80%), далее фенилгидразид переводили в этиловый эфир и осуществляли катализируемую α -химотрипсином конденсацию полученного пептида с фенилгидразидом лейцина (выход 70%).

Известно применение протеиназ в так называемом «полусинтетическом» методе (*semisynthesis*) получения аналогов белков. Суть его состоит в том, что в белке гидролизуют ферментативно одну из связей, затем, обычно с помощью того же фермента, но в других условиях, связь ресинтезируют [29]. При этом на промежуточной стадии может быть заменена одна из аминокислот, образующих связь («энзиматическая мутация») [53, 79–81], или даже целый фрагмент белка [28, 82].

Таким методом получали, например, инсулин человека из инсулина свиньи. Эти разновидности гормона различаются одной аминокислотой: в человеческом инсулине в положении 30 В-цепи находится треонин, в свином — аланин. В работе [28] из свиного инсулина получали сначала триптическим гидролизом [дез-(23–30)-октапептид]-В-инсулин с последующим введением в него защиты по аминогруппам. Затем его конденсировали с синтетическим октапептидом последовательности (23–30) В-цепи человеческого инсулина. За 20 ч при 37° С, рН 6,5, в водно-органической среде в присутствии трипсина прореагировало 58% дез-октапептид-инсулина. Полученный после очистки гель-хроматографией и удаления защитных групп кристаллический инсулин человека обладал полной гипогликемической активностью.

Инсулин и его аналоги остаются в настоящее время, пожалуй, наиболее популярными объектами полусинтеза с использованием протеиназ [83–90].

1.2. Введение и снятие защитных групп с помощью ферментов

Поскольку пептидный синтез, как химический, так и ферментативный, нуждается в легко вводимых и селективно удаляемых защитных группах, предприняты шаги по использованию для этой цели фермент-лабильных защитных групп.

Так, традиционно применяемая защитная группа карбоксильной функции — сложноефирная может быть обратимо введена с помощью субтилизина [91], α -химотрипсина — растворимого [21] либо иммобилизованного на двуокиси кремния [20, 21] или сефадексе [19]. Иммобилизованная на сефарозе карбоксипептидаза Y [92] успешно использовалась для расщепления этилового эфира в жидкофазном методе синтеза пептидов.

Показана возможность применения трипсина для получения гидразидов пептидов [93, 94], а также для превращения соответствующих пептидных субстратов (содержащих на С-конце *Lys* или *Arg*) в метиловые эфиры, незащищенные гидразиды, а также защищенные — *Woc*- или *Z*-гидразиды [95]. Последнее исследование было предпринято с целью отработки промежуточных стадий в селективном превращении α -карбоксильной группы пептидов в азид (для конденсации пептидов азидным методом).

Фенилгидразиды *N*-защищенных аминокислот и пептидов получали с помощью папаина [5]. Такое введение фенилгидразидной группы было успешно использовано в синтезе энкефалинов [10].

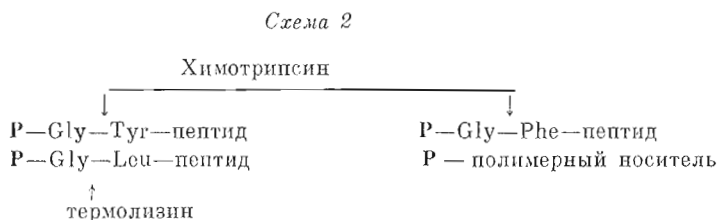
Согласно данным работы [96], возможно отщепление *S*-ацетамидометильной защиты сульфгидрильной группы цистеина с помощью *N*^ε-ациллизин—деацилазы; расщепление *S*-(хлорацетамидометил)-*L*-цистеина идет с более высокой скоростью. Эта реакция изучена пока на уровне *S*-защищенной аминокислоты.

Для снятия фенилацетильной группы предложен фермент, не обладающий протеиназной активностью, — пенициллинамидогидролаза [97]; этот способ деблокирования испытан в синтезе дез-амино-[*Lys*]^ε-вазопрессина.

В классических методах пептидного синтеза использовали отщепляемую ферментативно бензилоксикарбониларгинильную N-защитную группу [98].

Стереоселективность триптического деблокирования была изучена на моделях [99]; при этом показано, что бензилоксикарбониларгинильная защита может быть отщеплена не только от *L*-, но и от *D*-аминокислот. В первом случае расщепление пептидной связи проходило на 95% за 5 ч, во втором — на 50% за 10 ч. Такое различие, с одной стороны, позволяет производить разделение оптических изомеров, которые могут образоваться при рацемизации в процессе синтеза, но с другой — оно не настолько велико, чтобы исключить возможность ферментативного деблокирования при введении в пептидную цепь *D*-аминокислоты.

Энзиматическое отщепление пептида от носителя в твердофазном методе синтеза пептидов было впервые осуществлено Анфинсеном [100] (схема 2).



В дальнейшем использовали трипсин-лабильную полимер-N^α-аргининозащиту карбоксильной группы аминокислоты или пептида в жидкофазном и твердофазном методах синтеза пептидов [98, 99, 101, 102]; выход на деблокировании мог достигать количественного уровня [102]. Остаток аргинина мог быть затем отщеплен от пептида с помощью карбоксипептидазы.

Метод отщепления пептида от полимера с помощью ферментов является наиболее мягким из известных методов, однако его применение накладывает на аминокислотный состав синтезируемого пептида известные ограничения, обусловленные субстратной специфичностью фермента.

Подводя итог вышеизложенному, необходимо отметить, что широкому использованию ферментативного метода синтеза пептидов, по-видимому, будет препятствовать следующее:

1) узкая ферментная специфичность диктует необходимость использования целого набора ферментов для синтеза пептидов, содержащих различные аминокислоты [10, 18], причем не все аминокислоты могут участвовать в образовании связи при катализе ферментами [17, 27, 43, 54];

2) возможность образования трудноотделимых продуктов ферментативного расщепления химических связей в синтезируемом пептиде, а также продуктов автолиза самого фермента; с другой стороны, не исключена возможность образования пластеиноподобных олигопептидов [10, 13, 36, 37, 54, 56, 59, 103, 104];

3) в отличие от химических методов синтеза необходим четкий подбор экспериментальных условий в каждом конкретном случае образования пептидной связи.

Тем не менее протеолитические ферменты могут оказаться полезными, например, при получении сравнительно простых соединений типа «сладкого дипептида» [48] из рацемических и полифункциональных аминокислот. Некоторые перспективы наметились в применении ферментов в полусинтетическом методе получения аналогов белков.

Что касается применения ферментов для введения и снятия защитных групп в пептидном синтезе, то эта проблема представляет, по-видимому, частный интерес, причем более целесообразно использование ферментов, не обладающих протеиназной активностью.

Значительный интерес исследователей к проблеме использования ферментов для синтеза пептидов подтверждается появлением в печати в последнее время также обзорных работ на эту тему [105—107].

II. Химические методы синтеза пептидов в водных средах

Обзорные статьи, касающиеся химических методов синтеза пептидов в водных средах, в литературе отсутствуют.

Осуществление реакции пептидообразования в водных средах влечет за собой появление специфических проблем, в большинстве случаев еще требующих своего разрешения. Так, при применении в водных системах известных методов пептидного синтеза, разработанных для безводных сред, могут наблюдаться осложнения, обусловленные конкурирующим с аминлизом процессом гидролиза карбоксильного компонента. На ход реакций в водной системе в значительной степени влияет рН среды за счет изменения степени ионизации реагирующих групп и, возможно, конформационного состояния крупных сочетаемых пептидных фрагментов и т. п. Лишь для немногих методов пептидного синтеза часть таких проблем решена [108—114].

Химический синтез пептидов в водных средах обычно предполагает использование аминок компонента в свободном виде — при основных рН карбоксильные группы защищены солеобразованием, а боковые функциональные группы, обладающие низкой нуклеофильностью, нереакционноспособны. В большинстве случаев блокировка необходима лишь для аминных и тиольных групп.

Минимальное экранирование функциональных групп в сравнении с тотальной защитой ведет к резкому увеличению гидрофильности пептида, что устраняет проблему растворимости и позволяет очищать промежуточные фрагменты и конечные продукты также в водной среде методами ионообменной и гель-хроматографии, а также с помощью электрофореза. Кроме того, сведение к минимуму числа защитных групп снижает затраты труда и потери на стадиях получения исходных компонентов для реакции пептидообразования, а также свободного пептида — продукта реакции.

II.1. Методы синтеза пептидов в водном растворе с использованием низкомолекулярных реагентов

Еще на заре развития пептидной химии при использовании таких, ставших уже классическими, методов, как хлорангидридный или азидный [115, 116], реакцию образования пептидной связи осуществляли в водных средах. И если хлорангидридный метод из-за опасности протекания побочных процессов и рацемизации практически не применяется в настоящее время, то азидный используется в водных системах довольно широко [117—119]. Суть метода состоит в том, что гидразид N-защитенной аминокислоты или пептида превращают в азид действием нитрита натрия в соляной кислоте. Реакционную смесь нейтрализуют и без выделения азидов проводят конденсацию с аминок компонентом. При этом рН поддерживают близким к нейтральному, реакцию проводят при пониженной температуре, время конденсации составляет от нескольких часов до нескольких суток. Этот метод был успешно применен для синтеза кортикотропина [117], Lys-вазопрессина [118], секретина [119]. Азидным методом в водном растворе можно получать полиаминокислоты [120]. Несмотря на наличие ряда побочных процессов при получении и применении азидов [121], метод, по-видимому, будет и в дальнейшем использоваться при синтезе пептидов в водных средах. Азидный метод не вызывает рацемизации при отсутствии избытка оснований; боковые функциональные группы оксиаминокислот, гистидина и аргинина не нуждаются в защите.

Метод смешанных ангидридов также один из наиболее известных методов синтеза пептидов в растворе [115, 116]. Однако последние сообщения о его использовании в водных средах относятся к 50—60-м годам [115, 116]; более широкому применению метода препятствует низкий выход продуктов вследствие протекания побочных реакций — диспропорционирования и гидролитического расщепления смешанного ангидрида [122].

Недавно появилось сообщение [123] о пригодности симметричных ангидридов N-ациламино кислот для ацилирования эфиров аминокислот и

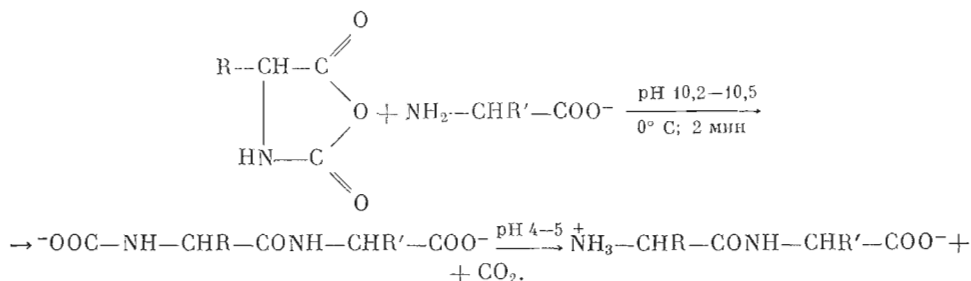
пептидов в водном диметилформамиде. Таким способом ступенчатым наращиванием пептидной цепи без рацемизации был получен пептид Leu-Ala-Gly-Val с общим выходом 63,5%. Применение метода симметричных ангидридов все же ведет к значительному нецелевому расходованию N-ациламиноокислот; возможно, и в водных средах его целесообразно использовать в твердофазном варианте синтеза пептидов и при ацилировании белков, где применение значительных избытков ацилирующего агента допустимо.

II.1.1. Метод с использованием 2,5-оксазолидиндионов (N-карбоксиянгидридов) аминокислот

Синтез N-карбоксиянгидридов детально описан в монографии [116]. Соединения этого класса чрезвычайно реакционноспособны, они склонны к реакциям аминолитиза, алкоголиза и гидролиза.

До недавнего времени N-карбоксиянгидриды использовались в основном для получения полиаминокислот [124]. Если строго контролировать условия реакции, то их можно применять и для ступенчатого синтеза пептидов [112] (схема 3).

Схема 3



Следует подчеркнуть, что это один из немногих методов, в котором пептидный синтез может быть осуществлен в водной среде без добавления органического растворителя.

В N-карбоксиянгидридах карбоксильная группа аминокислоты активирована за счет образования внутреннего ангидрида, а защита α -аминогруппы обеспечивается в процессе реакции вследствие возникновения карбаматного иона. Карбамат достаточно устойчив в диапазоне pH 10,2–10,5; при pH < 10 карбамат теряет CO₂, а при pH > 10,5 имеет место гидролиз N-карбоксиянгидридов и образование гидантоиновых кислот. Если же строго поддерживать pH 10,2–10,5, то синтез пептидов протекает с очень большой скоростью. Вместе с тем было установлено, что карбаматная защитная группа все же не настолько стабильна, чтобы можно было выполнять без очистки промежуточных соединений более пяти последовательных стадий синтеза [102].

Успешное протекание реакции в большой степени зависит от соотношения реагентов — избыточное количество N-карбоксиянгидрида способствует образованию побочных продуктов [125].

Необходимо отметить, что карбоксиянгидридным методом короткие пептиды удастся синтезировать с хорошим выходом и гораздо быстрее, чем любым другим известным методом пептидного синтеза.

В реакцию конденсации с N-карбоксиянгидридами аминокислот могут вводиться практически все аминокислоты, в защите нуждаются ϵ -аминогруппа лизина и сульфгидрильная группа цистеина; в качестве промежуточной защитной группы для гидроксильной функции серина и треонина рекомендована триметилсилильная группа, которая отщепляется в процессе образования пептидной связи [126].

Рацемизации при использовании метода практически не обнаружено. N-Карбоксиянгидриды, несущие заместитель при азоте, оказались гораздо стабильнее незамещенных аналогов; они не полимеризуются и в то же

время легко реагируют с аминокомпонентами с образованием N-защищенных пептидов [127, 128].

С помощью N-карбоксиянгидридов возможно селективное ацилирование (при подобранных pH, отличающихся от оптимальных для пептидного синтеза) ε-аминогруппы лизина или α-аминогруппы в белках, а также получение полностью ацилированных белков [129].

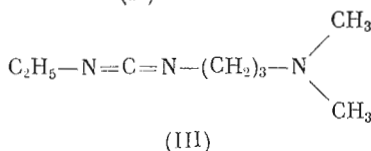
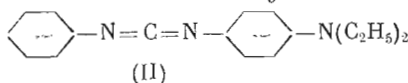
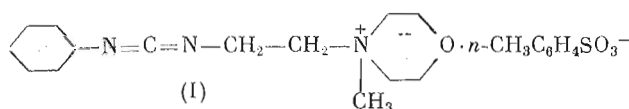
Тиоаналоги N-карбоксиянгидридов — тиазолидиндионы-2,5 — гораздо устойчивее N-карбоксиянгидридов при pH < 10,2 и > 10,5 [130, 131], однако они использовались лишь в ограниченном числе случаев [132].

II.1.2. Использование конденсирующих средств

Проведение реакции пептидообразования при практически одновременном введении реагентов существенно упрощает методику пептидного синтеза вообще и в водных средах в частности. Для синтеза пептидов в водной среде применяли конденсирующий агент — N,N'-карбонилдиимидазол [133]. Реакцию начинали в органическом растворителе смешением карбоксильного компонента с N,N'-карбонилдиимидазолом, затем без выделения полученного N-ацилимидазола прибавляли водный раствор натриевой соли аминок компонента. Метод проиллюстрирован синтезом дипептида Z-Gly-L-Phe, выход составлял 40% [134]. При использовании данного конденсирующего средства рацемизация, согласно тесту Андерсона, достигала 5–8% в водном тетрагидрофуране и 0,5% в водном диметилформамиде при охлаждении.

С помощью N,N'-карбонилдиимидазола также в водном растворе был синтезирован ряд низкомолекулярных олигомеров аминокислот [135].

Карбодиимиды, содержащие третичный или четвертичный атом азота, например (I) — (III), приобретают способность растворяться в воде (соответствующие N,N'-замещенные мочевины также водорастворимы), поэтому они нашли применение для пептидного синтеза в водных средах [115, 136–140].



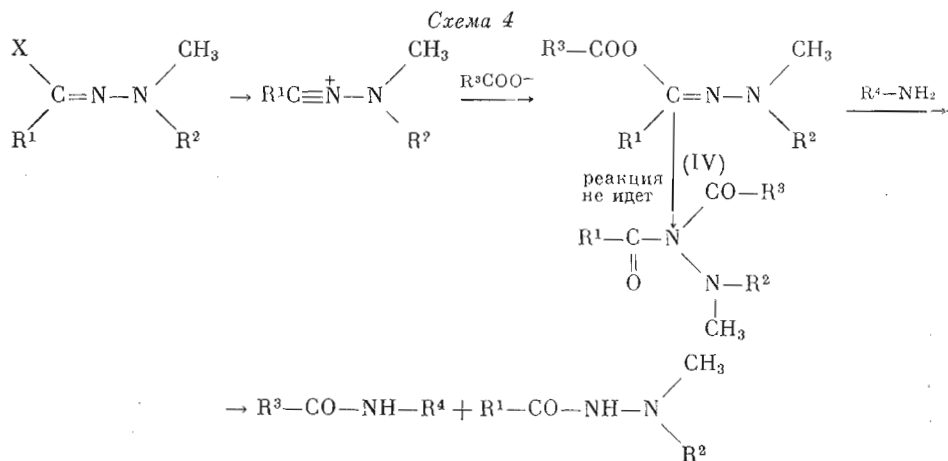
Согласно механизму карбодиимидного синтеза пептидов в апротонных растворителях [141], на первой стадии — стадии образования О-ацилмочевины — требуется участие двух протонов. При этом тормозится образование побочных продуктов, в частности N-ацилмочевины. Потому методика карбодиимидного пептидного синтеза в воде также включала подкисление до pH 3,9 [137]. Однако в работе [113] 100%-ный выход пептида получали в более кислой среде — в 0,1 М соляной кислоте. Исследование зависимости выхода лейциллейцина от концентрации соляной кислоты при использовании агента (II) показало, что заметные количества продукта могут образовываться в присутствии значительных избытков кислоты [113]; конкретных данных о механизме реакции в водной среде не приводится.

Несколько модельных дипептидов [136] (с карбодиимидом (II)), а также тетра- — гексапептидов [137] (с помощью соединения (I)) было получено в воде или водно-диоксановом растворе с выходом 50–71%. Рацемизация составляла 3–5% [138]. Интересно, что все операции помимо син-

теза (очистку промежуточных пептидов и омыление сложноэфирной группы) также проводили в водной среде [137].

Биологически активный ангиотензин II с выходом 74% (на защищенный октапептид) был получен всего за 34 ч без выделения промежуточных пептидов в двухфазной водно-органической системе при использовании конденсирующего агента (III) в присутствии эквимольного количества 1-оксибензотриазола [139]. Пептиды переходили в органическую фазу и легко отделялись от водорастворимых примесей. Таким же методом были получены брадикинин и пептид, индуцирующий дельта-фазу сна [140].

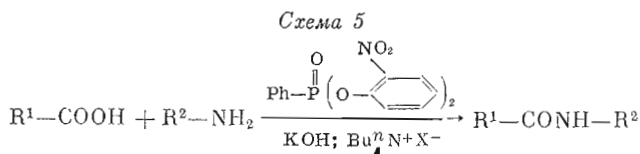
Для пептидного синтеза в водных средах предложены также имидогалоидные конденсирующие агенты, получаемые из соответствующих гидразидов [142]. В отличие от карбодиимидов они образуют при отщеплении галоида ион нитрилия, который способен при всех значениях pH реагировать с нуклеофилами с образованием ацилпроизводного (IV) (схема 4).



X — галогид; R¹, R² — арил, алкил; R³, R⁴ — остатки аминокислоты.

Соединение (IV) образуется в водном ацетоне при pH 7 за несколько минут, причем показано, что константа скорости взаимодействия ионов нитрилия с нуклеофилом R³COO⁻ на три порядка выше, чем с водой (pH 6). При pH 8 соединение (IV) быстро реагирует с аминокислотами или их эфирами, образуя пептиды с выходом 75–95%; O→N-ацильной перегруппировки не происходит. Степень рацемизации может колебаться от 0 до 21% в зависимости от характера радикалов, галоидов и pH среды.

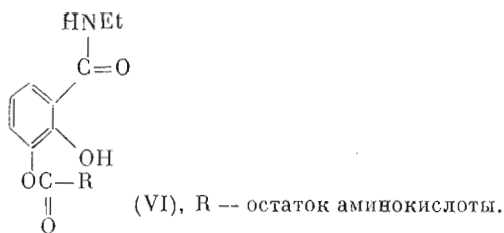
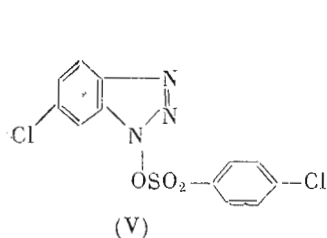
В случае использования конденсирующего агента — бис(о-нитрофенил)-фенилфосфоната [143]



X — галогид; R¹, R² — остаток аминокислоты.

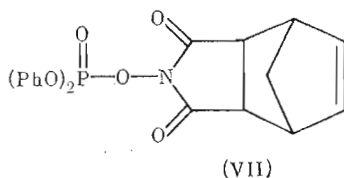
добавление воды к органическому растворителю способствовало лучшему прохождению реакции аминолиза. Таким образом (схема 5) был получен ряд защищенных ди- и трипептидов с выходом 73–95% за 1,5–24 ч. Карбоксильный компонент может применяться в виде сложного эфира. Сведений относительно возможности рацемизации не приводится.

Практически отсутствовала рацемизация при осуществлении синтеза пептидов в присутствии конденсирующего агента — 6-хлор-1-(n-хлорфенилсульфонил)бензотриазола (V) [144]. Однако выход пептидов при его использовании в водной среде в отличие от органической был невелик (<20%).



Попытка применить реакционноспособный реагент Кемпа — фторборат 2-этил-7-оксibenзизоксазолия [114], позволяющий осуществлять внутримолекулярную активацию карбоксильного компонента, для синтеза пептидов в водной среде оказалась не совсем удачной. 3-Ацилокси-2-окси-N-этилбензамиды (VI) получались с хорошим выходом, аминолиз практически не сопровождался рацемизацией (проверено в среде органического растворителя), однако в водной среде скорость гидролиза этих соединений сравнима со скоростью аминолиза. 5-Нитро-3-ацилокси-2-окси-N-этилбензамид, а также аналогичное ацилпроизводное оксихинолина [145] гидролитически более устойчивы. Отмечено также, что активированные соединения указанного типа реагируют со свободными аминокислотами в водных средах быстрее, чем с соответствующими сложными эфирами [145].

Предложенный в работе [146] норборн-5-ен-2,3-дикарбоксимидодифенилфосфат (VII) использовали для активации N-ациламинокислот в процессе конденсации, а также перед ней, с выделением или без выделения получающегося активированного эфира. Показано, что синтез пептидов с помощью реагента (VII)



успешно протекал за короткое время в водно-органической среде без выделения промежуточного активированного соединения с выходом ~70%. Удобно, что стадия активации (взаимодействие реагента (VII) с N-ациламинокислотой) не требует охлаждения. В отличие от N-оксисукцинимидных эфиров (см. ниже) указанные активированные эфиры благодаря наличию в структуре жесткого кольца не подвержены побочной реакции при атаке амина на карбонильную группу имида [147]. Однако мало вероятно, что такие производные окажутся достаточно конкурентоспособными по сравнению с N-оксисукцинимидными эфирами из-за сложности их получения, большой стерической затрудненности и гидрофобности, которая особенно нежелательна при синтезе в водных средах.

II.1.3. Метод активированных эфиров

Некоторые сложные эфиры N-ациламинокислот за счет содержащегося в спиртовом компоненте электроноакцепторного заместителя могут обладать ярко выраженной ацилирующей способностью. Их называют активированными. Они широко используются в пептидном синтезе не только в безводных, но также в водных и водно-органических средах. Например, сложные эфиры производных фенола и гидроксилamina, обладающих слабосукцинимидными свойствами, можно также отнести к смешанным ангидридам. Соответствующие эфиры N-ациламинокислот в отличие от традиционно применяемых смешанных ангидридов все же не настолько реакционноспособны, чтобы реагировать со спиртовыми группами. Это позволяет N-ацилировать с их помощью оксиаминокислоты с незамещенным гидроксильным

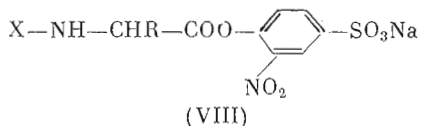
Очень широко в настоящее время используются нитрофениловые эфиры [148], особенно *para*-нитрофениловые (Np), так как в отличие от *meta*- и *ortho*-производных они легче кристаллизуются. Np-эфиры ряда N-ациламино кислот являются коммерчески доступными соединениями. Вследствие довольно высокой гидрофобности Np-эфиров аминолиз с солями аминокислот и пептидов обычно ведут не в воде, а в водно-органической среде.

Таким путем был осуществлен синтез фрагментов аналогов брадикинина [149—151], тафцина [152, 153], модельных дипептидов [154]. В случае использования в качестве аминок компонента свободного аргинина [151—153] реакцию начинали в водно-диоксановой среде, через 1—2 ч растворители упаривали и продолжали реакцию в диметилформамиде; выход на стадии конденсации был практически количественным. Обычно pH в реакции аминолиза поддерживали равным 8,5—9,5 [149, 150], добавляя раствор неорганического основания, или 7,8—10 [154], используя избыток (до трех эквивалентов) триэтиламина. Рацемизации при этом не замечено, хотя ранее было показано [155], что даже небольшие избытки триэтиламина при синтезе в органической среде могут вызывать заметную рацемизацию Np-эфиров. В работе [156] на примере конденсации Z-Gly-L-Phe-ONp с H-Gly-OEt исследовали влияние полярности среды на степень рацемизации. Отмечено, что, чем полярнее растворители, тем выше рацемизация; в частности, для системы диметилсульфоксид — вода она достигает 5—7%.

Реакцию пептидообразования с Np-эфирами в водно-органической среде можно катализировать 1-оксибензотриазолом [157]; таким образом, пептид Z-Arg-Tyr-OEt был получен за 30 мин с выходом 80%.

К достоинствам Np-эфиров следует отнести наличие поглощения в УФ-области спектра, отличного от поглощения *p*-нитрофенола. Благодаря этому оказалось возможным исследовать кинетику реакций гидролиза и аминолиза Np-эфиров N-ациламинокислот в водно-органической системе (pH 8,8—10,5) спектрофотометрически [110, 158]. Для всех случаев [110] константы скорости бимолекулярной реакции аминолиза (аминок компонент один и тот же) превышали соответствующие константы гидролиза. Низкие абсолютные величины констант скорости аминолиза, отмеченные для Np-эфиров пролина, валина и изолейцина, объяснялись стерически затрудненной конфигурацией указанных аминокислот.

Возможность использования 2-нитро-4-сульфофениловых (Nsp) эфиров N-ациламинокислот для синтеза пептидов в водной среде была продемонстрирована разными авторами практически одновременно [109, 111, 159]. Активированные эфиры N-защищенных аминокислот (VIII)



получали с выходом 60—90% из натриевой соли соответствующего фенола с применением известных методов активации: дидиклогексилкарбодимидного [109, 111, 159], метода смешанных [111] и симметричных [109] ангидридов, трифторацетатного [109], а также с использованием N-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолина [109]; отмечена хорошая растворимость Nsp-эфиров в воде. В отличие от данных [109] в работах [111, 159] Nsp-эфиры N-ациламинокислот не выделяли в аналитически чистом виде.

Реакционная способность Nsp-эфиров выше, чем *p*- и *o*-нитрофениловых эфиров [109] (сравнение проводилось в диметилформамиде). Значительное преобладание аминолиза над гидролизом в реакции пептидообразования с использованием Nsp-эфиров в водной среде выявлено в работе [109]. Изучение кинетики реакции Z-Leu-ONsp с глутаминовой кислотой в воде при pH 9 и 9,7 дало времена полуреакций соответственно 4,5 и

2,1 мин; добавление эквивалента 1-оксибензотриазола ускоряло процесс вдвое [109].

Аминолиз N_{sp}-эфиров проводили при pH 8–9 в воде, выход модельных пептидов [111] и постадийный выход в синтезе фрагмента (11–14) кортикотропина [109] составлял 50–80%. В последнем случае аминокомпоненты использовались в виде этиловых эфиров; если конденсацию осуществляли в диметилформамиде, выход был выше. Рацемизации в процессе синтеза не замечено.

Работа в направлении использования N_{sp}-эфиров N-ациламинокислот в водных средах продолжается, в частности их предложено применять для модификации белков [111].

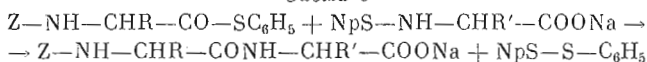
Галоидфениловые эфиры [160], особенно 2,4,5-трихлорфениловые (Tcr) и пентафторфениловые (Pfp) [161] также в настоящее время часто используются в пептидном синтезе благодаря относительной простоте процедуры их получения и высокой реакционной способности [160, 162]. Галоидфениловые эфиры N-ациламинокислот с хорошим выходом ацилируют амины в водно-органической среде. Так, полупериод реакции Tcr-эфира бензилоксикарбонилфенилаланина с бензиламином в водном диоксане составлял всего 3,3 мин — меньше, чем в хлороформе, диоксане и N-этилморфолине при тех же концентрациях реагирующих веществ [160]. Если в качестве аминокомпонентов использовали ди-, три- и пентапептиды, то полупериод реакции не превышал 2 ч [160]; pH в реакции аминолиза составлял 8–9 [163].

Pfp-эфиры применялись в синтезе фрагментов тафцина [152], Leu- и Met-энкефалинов [162] в водной среде; выход на стадиях конденсации составлял 60–80%.

Для целей пептидного синтеза в водных средах использовали также тиофениловые [164] и *n*-нитротииофениловые [165] эфиры N-защищенных аминокислот.

Тиофениловые эфиры устойчивы к щелочному гидролизу и алкоголизу [164]; с их помощью с выходом 40–75% получали рацемические [164] и оптически активные [166] ди-, трипептиды в водно-органической среде в присутствии основания при 60–90°С за несколько часов. Интересно, что в тех же условиях тиофениловые эфиры могут реагировать и с N-защищенным аминокомпонентом («short cut»-метод) [167]. «Реагирующей» защитной группой при этом может быть только *o*-нитрофенилсульфенильная (NpS). Таким способом были синтезированы простые оптически активные пептиды с выходом 56–76% (схема 6); наилучшие результаты были достигнуты в случае двукратного избытка тиоэфира.

Схема 6



R, R' — боковой радикал.

Попытка использовать в такой реакции эфиры NpS-аминокислот вместо их Na-солей была неудачной.

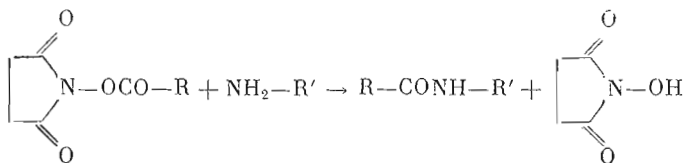
n-Нитротииофениловые эфиры гораздо более реакционноспособны, чем тиофениловые и нитрофениловые [165], что позволяет проводить их аминолиз в мягких условиях с почти количественным выходом. Так, скорости реакций аланина с Z-Gly-X, где X — фенилтио-, *n*-нитрофеноксипи- и *n*-нитрофенилтиогруппы соотносились как 1 : 16 : 140 (18°С, водно-диоксановая среда, pH 6,8).

Недостатком способа синтеза с помощью тиофениловых эфиров является трудность удаления примеси тиофенолов из смеси продуктов реакции: обычно реакционную смесь подвергают действию окислителей с последующей экстракцией этилацетатом [168].

II.1.3.2. Производные гидроксиламина

N-Оксисукуцинимидные (ONSu) эфиры N-ациламинокислот и пептидов изначально предполагалось использовать для пептидного синтеза в водных

средах [169]:



R, R' — остаток аминокислоты, пептида.

В настоящее время ONSu-эфиры являются наиболее популярными из активированных эфиров. Причина этого в легкости их получения [169–171], возможности в ряде случаев применения готовых реагентов (часть ONSu-эфиров выпускается некоторыми зарубежными фирмами), в практическом отсутствии рацемизации [170] в реакции аминолиза, высокой реакционной способности в органических [162, 172] и водных [173, 174] средах.

ONSu-эфиры относятся также к наиболее изученным активированным эфирам в отношении возможности протекания побочных реакций на стадии их получения [175, 176], а также в процессе пептидного синтеза [147].

К настоящему времени с использованием ONSu-эфиров получено уже несколько десятков модельных и биологически активных пептидов в водно-органических и водных [177] системах при щелочных pH, поддерживаемых органическими [173, 174] или неорганическими основаниями [169, 173, 178–181]. В реакции конденсации обычно используют эквивольные соотношения реагирующих веществ, если же берут избыток активированного эфира, то по окончании реакции от него избавляются, как правило, переводя его в водорастворимый амид [175].

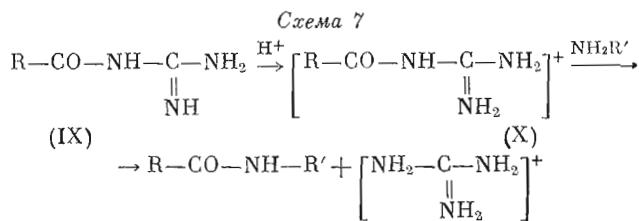
ONSu-эфиры N-ациламино кислот и пептидов успешно использовали для модификации белков в водных средах — термолизина [182], фосфолипазы A₂ [183], казеина [184].

N-Оксифталимидные эфиры N-ациламино кислот и пептидов были предложены раньше, чем N-оксисукцинимидные [185, 186]. Они довольно реакционноспособны при взаимодействии с эфирами аминокислот в органической среде (более реакционноспособные, чем Np-эфиры [172]), синтез пептидов с их помощью проходит без рацемизации, однако в водной среде пептидообразование идет менее успешно [172], по-видимому, из-за относительно высокой гидрофобности и стерической затрудненности N-оксифталимидных эфиров.

Использование для реакции аминолиза в водных средах активированных эфиров таких производных гидроксилamina, как гидроксамовые кислоты [187, 188] и 1-оксипиперидин [189, 190], довольно ограничено: описан синтез лишь нескольких простых дипептидов.

II.1.3.3. Прочие активированные производные N-ациламино кислот

Для образования пептидной связи в водной среде были предложены растворимые в полярных растворителях ацилгуанидины (IX) — [191]:

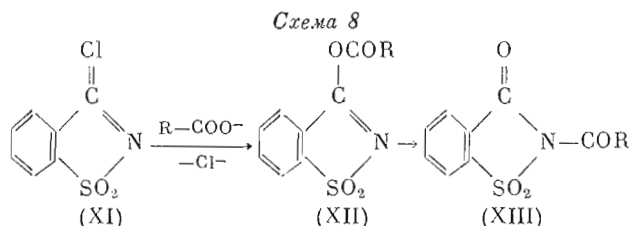


Нуклеофильная атака амином этих соединений облегчена вследствие образования ими промежуточного резонансно-стабилизированного гуанидиниевого иона (X) (схема 7). Согласно приведенной схеме, в водно-органической среде, pH 8, было получено, например, ~90% дипептида

Z-Gly-Gly-OEt; аминокомпонент использовался в виде сложного эфира. Реакции пептидообразования с помощью производных (IX) в чисто водной среде не описаны, хотя возможность их осуществления декларируется.

Описано также применение для синтеза пептидов 5-хлор-8-хинолиновых эфиров [192]; в смеси вода — тетрагидрофуран был получен дипептид Z(OMe)-Pro-Arg(Tos)-OH с выходом ~60%. В органическом растворителе результаты были лучше.

Есть данные [193] об использовании в пептидном синтезе N-аминоацилсахариновых производных (XIII). Стадия активации N-ациламинокислот может осуществляться с помощью традиционно применяемых конденсирующих средств; кроме того, можно исходить не из сахарина, а из его имидхлорида (XI) (схема 8).



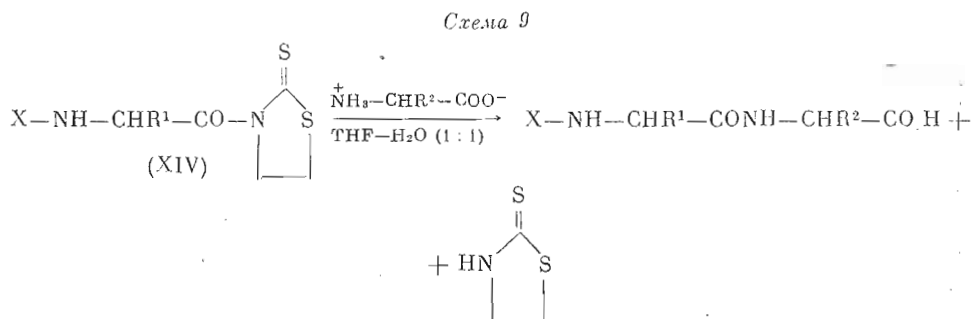
R — остаток N-ациламинокислоты.

При этом возможно образование значительного количества симметричного ангидрида за счет взаимодействия аниона активируемой N-ациламинокислоты с промежуточным O-ацилированным сахарином (XII).

N-Ацилсахарины (XIII) — кристаллические, стабильные при хранении, устойчивые к гидролизу соединения, что оказалось весьма полезным для синтеза пептидов в водных средах. Их аминолиз осуществляли в мягких условиях: смешение реагентов производили при 0° С, далее вели реакцию при 20° С, выходы составляли 60—90%. Рацемизации не обнаружено. Боковые функциональные группы вводимого в реакцию аминокомпонента нуждались в защите. Выделяющийся в процессе синтеза пептидной связи сахарин может быть регенерирован.

В работах [7, 194] показано, что O- и N-аминоацильные производные нуклеозидов способны вступать в реакцию образования пептидной связи с аминокомпонентом в водно-спиртовой среде при pH 8, причем эта реакция протекает более эффективно с участием α-химотрипсина. В работе [195] отмечена возможность неферментативной конденсации пептидов в водной среде в присутствии различных полинуклеотидов.

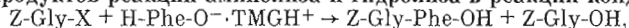
3-Ацил-1,3-тиазолидин-2-тионы (XIV), получаемые обычно с помощью дициклогексилкарбодимида, реагируют в водно-органической среде со свободными аминокислотами [196] (схема 9) с довольно высоким выходом пептидов (~90%).



X — N-защитная группа; R¹, R² — боковой радикал аминокислоты.

При использовании в качестве аминокомпонентов трифункциональных аминокислот — серина, лизина, аргинина, метилового эфира цистеина — происходило селективное ацилирование производными (XIV) α-аминогруппы. За ходом аминолиза удобно наблюдать по исчезновению желтой окраски,

Выход продуктов реакции аминолитза и гидролизза в реакции конденсацииз



где X – активизирующая группа, TMG – тетраметилгуанидин (DMSO* – H₂O, 8 : 2) [114]

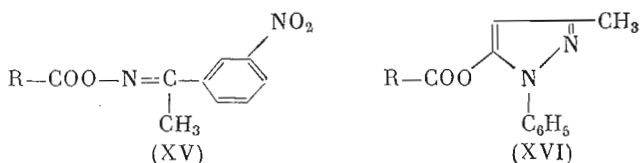
Активирующая группа (X)	Концентрация реагентов, 10 ⁻² М	Выход, %	
		Z-Gly-Phe-OH	Z-Gly-OH
Азидо	2	60	1,2
Аццлоксиз	2	65	4,7
<i>n</i> -Нитрофеноксиз	8	98	0,9
»	2	96	1,3
Сукцинимидооксиз	8	99	0,6
Пиперидиноксиз	»	86	14
Пиперидин-2-тиоло	»	99	0,2
Хинолин-8-оксиз	»	97	0,6
<i>N</i> -Этилбензамид-2-оксиз	»	62	2,2
»	2	28	1,6
2-Оксиз- <i>N</i> -этилбензамид-3-оксиз	8	40	59
»	2	19	80
2-Оксиз-5-нитро- <i>N</i> -этилбензамид-3-оксиз	8	96	4

* В реакциях с азидами и смешанными ангидридами органический растворитель CH₃CN.

свойственной тионам (XIV); продукты реакции не окрашены. Рацемизации в ходе реакции пептидообразования не обнаружено.

В работах [197, 198] для «активации» карбонилтиольных групп пептидов, полученных твердофазным методом, использовали ионы Ag⁺. Такие пептиды далее применяли во фрагментной конденсации в водно-органической среде, pH 7–7,5. В этих условиях выход декапептида в реакции взаимодействия Ac-Tyr-Arg-Arg-Glu-Arg-Gly-SH с H-Phe-Ala-Glu-Gly-OH за 1 ч составил 40% [197]; в отсутствие ионов Ag⁺ за 48 ч было получено <5% декапептида. Если С-компонент содержал не карбонилтиольную, а карбокисильную группу, то образования пептидной связи не наблюдали. В отсутствие органического растворителя выход не превышал 15%. β-[Gly¹⁷]эндорфин был получен, таким образом, с выходом 40% фрагментной конденсацией в водной среде в системе AgNO₃/HOSu [198].

Ряд дипептидов был синтезирован из свободных аминокислот и *N*-ациламинокислотных активированных производных 3-нитроацетофеноксиа (XV) или 1-фенил-3-метилпипразолона-5 (XVI) в водно-органической системе с выходом 50–70% [199]



R – остаток *N*-ациламинокислоты.

В органических растворителях выход был на том же уровне. Согласно тесту Андерсона, в случае применения соединения (XV) степень рацемизации составляла 21%, для (XVI) – 8%.

Сопоставление на основе литературных данных различных методов пептидного синтеза в водной среде с использованием низкомолекулярных реагентов провести сложно, так как в качестве иллюстрации эффективности в каждом случае приводился синтез самых разнообразных пептидов; условия реакции пептидообразования также широко варьировались. Однако в работе [114] проведен сопоставительный анализ реакционной способности и устойчивости к гидролизу ряда активированных производных (таблица). При анализе таблицы обращает на себя внимание тот факт, что такие традиционно применяемые для пептидного синтеза в органических средах активированные производные, как *N*-оксисукцинимидные эфиры, являются одними из лучших и в реакции аминолитза в водных системах.

Специальное исследование рацемизации С-концевой аминокислоты при

конденсации различных активированных эфиров со свободными аминокислотами и пептидами проведено в работе [200]. Наилучшие результаты были получены для N-оксисукуцинимидных эфиров. Показано, что наличие воды в системе снижает рацемизацию. На степень рацемизации влияет также соотношение исходных реагентов; так, использование менее одного эквивалента активированного эфира на один эквивалент аминок компонента снижает оптическую чистоту продукта.

II.2. Методы синтеза пептидов в водных средах с использованием полимеров

II.2.1. Твердофазный и жидкофазный методы

Твердофазный [201] и жидкофазный [202] методы пептидного синтеза предполагают применение полимера в качестве постоянной (до окончания синтеза всей последовательности) защиты С-концевой группы растущего пептида; в соответствии с названиями методов в первом случае используют нерастворимый полимер, а во втором — растворимый.

Что касается твердофазного метода, то в литературе обсуждаются лишь основные подходы к перенесению синтеза пептидов в водные среды. Предложены, например, полярные гидрофильные носители [99, 203], использовались ферментативные методы отщепления пептидов от полимера в водных средах [98, 100]. Пример проведения пептидного синтеза в водной среде приведен лишь в работе [204]. В этой работе присоединение остатков аминокислот и пептидов к носителю было зафиксировано только при наличии на полимере «ножки», соответствующей по длине не менее семи остаткам аминокислот. Конденсацию осуществляли с помощью ферментов; при этом из-за стерических затруднений остаток Z-Phe- удалось ввести с выходом 60% (термолизин), а Z-Phe-Leu- — с выходом 20% (α -химотрипсин) и 0% (папаин).

В жидкофазном методе синтеза оказалось возможным проведение в водной среде всех стадий: пептидообразования, очистки и отделения пептида от полимера. Такая задача была решена [102] при получении фрагмента [122—125] лизоцима на носителе, представляющем собой полиэтилен-имин, содержащий аргинин:



Синтез проводили N-карбоксиянгидридным методом (постадийные выходы 70—73%), а отщепление от подложки — ферментативным (выход 100% при pH 7,8—8,0 за 1—2 ч).

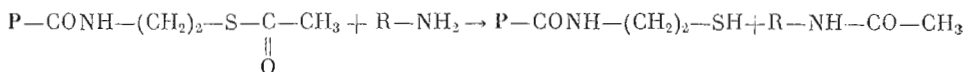
Аналогичный подход к решению проблемы был продемонстрирован в работе [92]. На карбоксиметилированном полиэтиленгликоле как носителе с использованием водорастворимого 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимиды был получен ряд ди-, три- и тетрапептидов (выход 42—64%). Отщепление промежуточной защиты С-конца — этоксигруппы — осуществляли также в водной среде с помощью иммобилизованной карбоксипептидазы Y. Показано, что данный метод синтеза позволяет получить оптически чистые продукты; максимальная степень рацемизации составляла 0,7%.

II.2.2. Метод полимерных реагентов

В последнее время внимание исследователей стала привлекать возможность использования для синтеза пептидов в водных средах еще одного известного метода, основанного на применении полимеров — метода полимерных реагентов [205]. В этом случае полимер является активатором карбоксильной группы N-защитенной аминокислоты или пептида.

Предложено несколько полимерных реагентов для синтеза амидной связи в водных средах [206–208]. Так, для этой цели применяли ацетилированный нерастворимый полистирольный сульфокислотный ионообменник [206]. Исследование реакции взаимодействия данного полимера с анилином показало, что в использованном диапазоне рН 3,5–5,5 аминолиз протекал недостаточно эффективно — выход ацетанилида не превышал 26%. Этот факт объясняли потерей ацилирующего агента за счет его гидролиза и низкой концентрацией анилина в полимерной фазе (3% от концентрации во внешнем растворе).

Интересные результаты получены при использовании для образования амидной связи в водной среде полимерного тиоэфира [207, 208]:



где P — сшитый сополимер серосодержащего акриламида с акриламидом.

Ацетилированный уксусным ангидридом политиоспирт обладал высоким содержанием ацетильных групп — 2,2 ммоль/г полимера [207]. Несмотря на то что в работе [207] в качестве аминокомпонентов использовали алифатические амины, полученные результаты заслуживают внимания. Так, например, отмечено, что реакция аминолиза зависит от рН следующим образом: наибольшие скорости аминолиза получены при рН > 10 и рН < 2,5; в реакции ацетилирования метиламина выход амида составлял 94,7% (рН 13,2) и 34,8 (рН 1,6), при всех промежуточных рН — ниже этих значений. Минимальный выход (15%) наблюдали при рН 7,55. Такая экстремальная зависимость выхода от рН объяснялась катализом аминолиза ОН⁻- и Н⁺-ионами.

На реакцию аминолиза влияло соотношение реагентов, а также природа аминокомпонента. Наибольший выход получали при мольном избытке амина. Определяющее значение в случае использования различных алифатических аминов имела не их основность, а наличие объемных конформационно затрудненных групп.

В дальнейшем [208] с помощью указанного полимерного реагента проводили ацетилирование ряда аминокислот. Выход продукта зависел от природы аминокислоты и увеличивался с увеличением времени контакта, рН среды, а также при наличии в системе имидазола, ионов Н₂ВО₃⁻ и Ag⁺. Отмечено также, что при рН > 12 наблюдалось падение выхода вследствие гидролиза полимерного реагента.

Разработан метод синтеза пептидов в водной среде с помощью нерастворимых поли-N-оксисукцинимидных эфиров N-защищенных аминокислот и пептидов [209–212]. В качестве полимеров-активаторов были использованы водонабухающие, сшитые, сферически гранулированные полимерные N-оксисукцинимиды, в состав полимерной цепи которых входили остатки гидрофильного сополимера N-винилпирролидона; с целью регулирования свойств полимеров (набухаемости, механической прочности и т. п.) в состав полимеров вводили также остатки стирола [210, 211]. Соответствующие поли-N-оксисукцинимидные эфиры N-ациламинокислот, содержащие значительные количества активированного карбоксильного компонента (до 1,8 ммоль/г эфира), получали методом смешанных ангидридов, дициклогексилкарбодимидным и трифторацетатным способами [210]. Исследование закономерностей аминолиза и конкурирующего с ним гидролиза при использовании таких полимерных реагентов в водных средах позволило выявить оптимальные условия проведения реакции пептидообразования: щелочная среда, высокие концентрации аминокомпонента [212]. Гидрофильные поли-N-оксисукцинимидные реагенты были применены в синтезе диастереомерных дипептидов с целью анализа оптической чистоты аминокислот. Анализируемую аминокислоту использовали в свободном виде; аминолиз проводили в воде или водно-спиртовой среде, рН 8,5–9,0 (выход 55–98%), удаление N-защитной (Boc) группы с полученного пептида также осуществляли в водной среде [209]. Рацемизации и стереоселективности при использовании данного метода не наблюдали.

С помощью указанных гидрофильных полимерных N-оксисукцинимидных реагентов получали также более сложные пептиды: биологически активный тафцин [213] и защищенный C-концевой октапептид холецистокинина [210, 211]. Эти пептиды синтезировали в водной среде, pH 8–9, как правило, в режиме pH-стагирования; октапептид — фрагмент холецистокинина — получали для контроля метода также в диметилформамиде. При использовании как водной, так и органической сред выходы при конденсации составляли 60–86%; общий выход тафцина (Thr-Lys-Pro-Arg) составлял 42% (синтез осуществляли, исходя из свободного аргинина, оксигруппа треонина также не блокировалась). Отмечено [210], что при использовании данного метода могут возникать трудности с очисткой конечного продукта от примеси гидролизованного карбоксильного компонента.

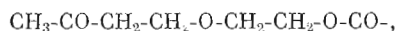
III. Гидрофильные защитные группы

Пептидный синтез предъявляет к защитным группам следующие требования: они должны легко и с хорошим выходом вводиться в аминокислоту, не затруднять синтеза при использовании различных методов конденсации, так же легко и селективно удаляться, обеспечивать хорошую растворимость исходных компонентов в реакционной смеси. В частности, последняя проблема актуальна в случае водных сред, особенно при использовании низкомолекулярных реагентов.

В недавно опубликованных обзорах по защитным группам, применяемым в пептидном синтезе [214, 215], не содержится глав по гидрофильным защитным группам.

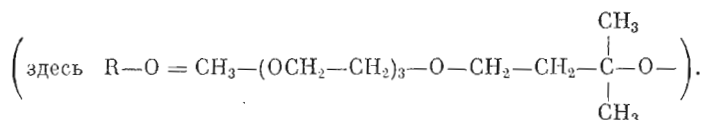
Из наиболее часто употребляемых N-защищенных аминокислот в водной среде растворимы некоторые *трет*-бутилоксикарбонил-, а также формил- и ацетиламинокислоты, однако в двух последних случаях N-защитные группы (ацильного типа) обладают рядом известных недостатков и практически не используются в настоящее время для пептидного синтеза.

Необходимость применения N-защитных групп, которые, обладая гидрофильностью, так же легко отщеплялись бы в нейтральной, слабокислой или щелочной среде, была отмечена еще Виландом [216]. Он предложил полиоксиэтиленовую группу



вводимую через метилдигликольоксикарбонилхлорид. Пептиды с указанной защитой получали в безводной среде, но они были растворимы и в воде.

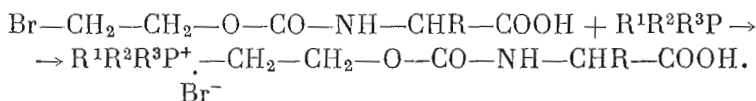
Варианты такого типа защитных групп были предложены как для карбоксильной (R-O-), так и для аминогруппы (R-O-CO-) [217]



В данной работе констатируется, что предложенные защиты повышают растворимость аминокислот и пептидов в органической среде и воде и являются кислотолабильными. Примеров пептидного синтеза не приведено.

Сравнительно недавно была предложена 2-фосфониоэтоксикарбонильная Реос-группа [218]: $\text{R}^1\text{R}^2\text{R}^3\text{P}^+\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CO-}$, где R¹, R², R³ —

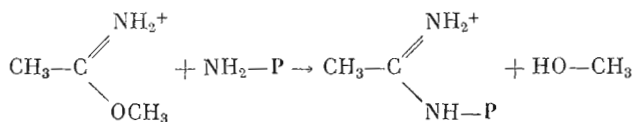
арил, метил. Она вводится в аминокислоту в две стадии, через 2-бромэтоксикарбонильную защитную группу:



Данная группа была использована для синтеза ряда дипептидов (выход 70–85%) в воде в присутствии водорастворимого карбодимида с добавлением 1-оксибензотриазола [219]. Аминоконпоненты применялись в виде сложных эфиров. Рацемизации замечено не было. Реос-группа устойчива в условиях отщепления *трет*-бутоксигруппы и удаляется в течение 1 ч при обработке 0,01 н. щелочью в водно-органической среде. Простота отщепления этой защитной группы в некотором роде компенсирует трудоемкость ее введения; в дальнейшем предполагалось проводить наращивание пептидной цепи с С-конца и удалять Реос-группу в конце синтеза.

Для пептидного синтеза в водной среде предназначена метилсульфонил-этилоксикарбонильная (Msc) группа $\text{CH}_3\text{—SO}_2\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—O—CO—}$ [220]. Введение ее осуществлялось через соответствующий азид, N-оксисукцинимидный или N-оксифталиимидный эфир. Эта группа чрезвычайно устойчива в системах, применяемых для удаления традиционно используемых N-защитных групп: 90% CF_3COOH (2 недели), 12 н. HCl (1 ч, 40° С), $\text{H}_2/\text{Pd/C}$. Msc-группа отщеплялась за 5 с в смеси диоксан — метанол — 4 н. щелочь, 7,5 : 2,25 : 0,25 (объемные соотношения); в таких условиях *трет*-бутиловые эфиры также расщепляются. Msc-группа использовалась в синтезе единственного дипептида [220] в водно-органической среде (за 30 мин выход составил 65%), а также в полусинтезе аналогов белков, в частности [Phe⁹]- α -меланотропина [221].

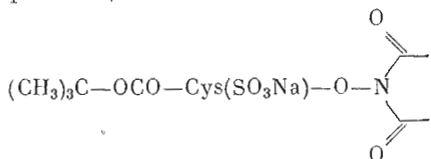
В инсулине ϵ -аминогруппу лизина защищали обработкой белка метилацетимидатом [222]:



P — белок.

Степень замещения контролировали путем обработки полученного продукта трипсином. В триптическом гидролизате не было обнаружено фрагментов с С-концевым лизином, следовательно, замещение проходило на 100%. Удаление защитной группы осуществляли смесью $\text{NH}_4\text{OH}/\text{CH}_3\text{COOH}$ (15 : 1).

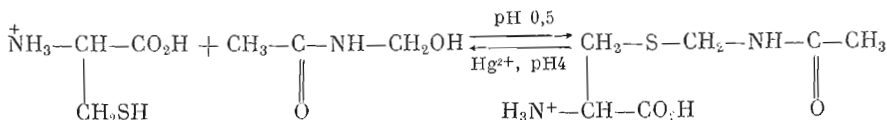
Использование цистеиновой кислоты в качестве N^α-защитной группы аминокислоты для пептидного синтеза в водных средах [223] было обусловлено тем, что это сильная кислота, обладающая отрицательным зарядом в широком диапазоне pH; такая защитная группа инертна в отношении конденсирующих агентов — карбодимидов. Наилучшим способом введения защиты являлась обработка аминокислоты N-оксисукцинимидным эфиром *трет*-бутилоксикарбонилцистеиновой кислоты:



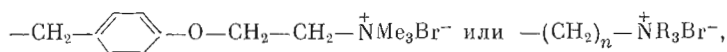
Эта защита была применена в синтезе фрагментов инсулина; все полученные пептиды, за исключением 8- и 16-членного, растворялись в воде, что позволило применить для их очистки противоточное распределение.

Недостатком такой защиты является то, что при синтезе пептидов методом смешанных ангидридов возможно параллельное образование сульфонамидной связи; не исключается также сульфирование ароматического кольца тирозина. Удаление указанной защитной группы рекомендовалось проводить по Эдману.

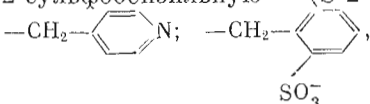
Предложено несколько типов гидрофильных SH-защитных групп для цистеина [224–227]. Первая [224] вводится с ацетамидометанолом:



и является весьма устойчивой в условиях отщепления обычно применяемых в пептидном синтезе защитных групп, даже при действии HF при 0° С; количественное удаление происходит в присутствии ионов двухвалентной ртути. Две другие разновидности полярных защитных групп для цистеина [225]:



где $n=1-2$; R=Me, Et, нашли применение в синтезе защищенного фрагмента (30–130) лизоцима человека; отщепление этих групп возможно действием натрия в жидком аммиаке. В работах Рудингера с соавт. по получению S-защитенного инсулина использовали 4-пиридилметильную [226] или 2-сульфобензильную (S-2-(сульфометил)бензильную) [227] группы:



которые вводились в восстановленный инсулин в одних и тех же условиях (50% водный пропанол, pH 8,3) действием 4-пиридилметилхлорида или толуилсульфона соответственно. В результате получали полностью S-замещенные и хорошо растворимые в полярных средах производные. После удаления защитных групп электролизом в слабокислой среде (в случае пиридилметильной группы) или Na/NH₃ (для сульфобензильной группы) и замыкания S–S-связей в обоих случаях был получен исходный инсулин с тем же выходом и биологической активностью, что и в контрольном эксперименте.

Химические методы синтеза пептидов, по-видимому, в настоящее время следует считать более перспективными, чем ферментативные. Химические реакции в общем случае более эффективны, чем энзиматические, при использовании доступных и относительно дешевых реагентов, результаты химических реакций легче прогнозируются. С помощью ферментативных методов пептидного синтеза достаточно успешно решается лишь довольно узкий круг задач.

Тенденция к применению в пептидном синтезе систем, в той или иной степени моделирующих биосинтез пептидов, интенсивно развивается; это касается не только использования водных сред, но также реагентов и самих подходов к синтезу. Например, предложено использовать для синтеза пептидов аминокладенилаты [228], описана модель аминокл-тРНК [229], обсуждена аналогия нерибосомного биосинтеза с синтезом пептидов с помощью алкилтиоэфиров [230]; есть данные о получении ацилирующих реагентов на основе липоевой кислоты, участвующей в ацилтрансферных реакциях *in vivo* [231]. Осуществлен синтез пептидов из N- и C-компонентов, одновременно присоединенных к молекуле краун-эфира, обсуждена аналогия такой системы с ферментативным синтезом пептидов [232].

ЛИТЕРАТУРА

1. Perspectives in Peptide Chemistry/Eds Eberle A., Geiger R., Wieland T. Basel: S. Karger, 1981, p. 156–167.
2. Bergmann M., Frankel-Conrat H. J. Biol. Chem., 1937, v. 119, № 2, p. 707–720.
3. Bergmann M., Fruton J. S. J. Biol. Chem., 1938, v. 124, № 1, p. 321–329.
4. Behrens O. K., Bergmann M. J. Biol. Chem., 1939, v. 129, № 2, p. 587–602.
5. Milne H. B., Halver J. E., Don So Ho, Mason M. S. J. Amer. Chem. Soc., 1957, v. 79, № 3, p. 637–639.
6. Ботвиник М. М., Остославская В. И. Докл. АН СССР, 1958, т. 123, № 2, с. 285–288.
7. Шабарова З. А., Соколова Н. П., Прокофьев М. А. Докл. АН СССР, 1959, т. 128, № 4, с. 740–743.
8. Великов В. М., Гололобов М. Ю. Успехи химии, 1979, т. 48, вып. 9, с. 1684–1710.
9. Ботвиник М. М., Остославская В. И., Иванов Л. И., Горшенина Г. К. Ж. общ. химии, 1961, т. 31, № 10, с. 3234–3242.
10. Kullman W. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1979, v. 91, № 2, p. 693–698.
11. Kuhl P., Koennecke A., Döring G., Däumer A., Yakubke H.-D. Tetrahedron Lett., 1980, v. 21, № 10, p. 893–896.

12. Homandberg G. H., Mattis J. A., Lascowski M. *Biochemistry*, 1978, v. 17, № 24, p. 5220-5227.
13. Luisi P. L., Saltman R., Vlach D., Guarnaccia R. J. *Mol. Catal.*, 1977, v. 2, № 2, p. 133-138.
14. Saltman R., Vlach D., Luisi P. L. *Biopolymers*, 1977, v. 16, № 3, p. 631-638.
15. Маргулек К., Семенов А. Н., Березин И. В. Докл. АН СССР, 1980, т. 254, № 1, с. 121-123.
16. Oka T., Morihara K. *Biochem. J.*, 1978, v. 84, № 5, p. 1277-1283.
17. Morihara K., Oka T. *Biochem. J.*, 1977, v. 163, № 3, p. 531-542.
18. Kullmann W. J. *Biol. Chem.*, 1980, v. 255, № 17, p. 8234-8238.
19. Kapune A., Kasche V. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1978, v. 80, № 3, p. 955-962.
20. Tarquis D., Monsan P., Durand G. *Bull. Soc. chim. France*, 1980, part 2, № 1, p. 76-79.
21. Маргулек К., Клубанов А. М., Самохин Г. П., Семенов А. Н., Березин И. В. *Био-орган. химия*, 1977, т. 3, № 5, с. 696-702.
22. Koeppecke A., Bullerjahn R., Jacobke H.-D. *Monatsh. Chem.*, 1981, B. 112, № 4, S. 469-481.
23. Ingalls R. G., Squires R. G., Butler L. G. *Biotechnol. and Bioeng.* 1975, v. 17, № 11, p. 1627-1637.
24. Antonini E., Carrea G., Cremonesi P. *Enzyme and Microbiol. Technol.*, 1981, v. 3, № 4, p. 291-296.
25. Kuhl P., Walpuski J., Jakubke H.-D. *Pharmazie*, 1982, v. 37, № 11, p. 766-768.
26. Kullmann W. J. *Org. Chem.*, 1982, v. 47, № 27, p. 5300-5303.
27. Oka T., Morihara K. J. *Biochem.*, 1977, v. 82, № 4, p. 1055-1062.
28. Inouye K., Watanabe K., Morihara K., Tochino J., Kanaya T. J. *Amer. Chem. Soc.*, 1979, v. 101, № 3, p. 751-752.
29. Quast U., Engel J., Steffen E., Tsehesche H., Kupfer S. *Biochemistry*, 1978, v. 17, № 8, p. 1675-1682.
30. Tsuzuki H., Oka T., Morihara K. J. *Biochem.*, 1980, v. 88, № 3, p. 669-675.
31. Oka T., Morihara K., Ohgaku S., Kobayashi M., Iwasaki M., Shigeta Y. *Pept. Chem.*, 1979 (Pub. 1980), v. 18, p. 157-162.
32. Jonczyk A., Keefer L. M., Nathani V. K., Galtner H. G., De Meyts P., Zahn H. Z. *Physiol. Chem.*, 1981, B. 362, № 5, S. 557-561.
33. Chu S.-C., Wang C.-C. Z. *Physiol. Chem.*, 1981, B. 362, № 6, S. 647-654.
34. Cao Q. P., Cui D. F., Zhang Y. S. *Nature*, 1981, v. 292, № 2825, p. 774-775.
35. Nagait K., Enoki Y., Tomita S., Techima T. J. *Biol. Chem.*, 1982, v. 257, № 4, p. 1622-1625.
36. Isowa J., Ohmori M., Ichikawa T., Kurita H., Sato M., Mori K. *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 1977, v. 50, № 10, p. 2762-2765.
37. Isowa J., Ohmori M., Sato M., Mori K. *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 1977, v. 50, № 10, p. 2766-2772.
38. Morihara K., Oka T. J. *Biochem.*, 1981, v. 89, № 2, p. 385-395.
39. Shon S.-H., Chen S.-T., Wong S.-H., Wang K.-T. J. *Chin. Chem. Soc.*, 1978, v. 25, № 4, p. 215-218.
40. Wong C.-H., Chen S.-T., Wang K.-T. *Biochim. et biophys. acta*, 1979, v. 576, № 1, p. 247-249.
41. Anderson G., Luisi P. L. *Helv. chim. acta*, 1979, v. 62, № 2, p. 488-494.
42. Sluyterman L. A., Wijdenes J. *Biochim. et biophys. acta*, 1972, v. 289, № 1, p. 195-202.
43. Döring G., Kuhl P., Jakubke H. *Monatsh. Chem.*, 1981, B. 112, № 10, S. 1165-1173.
44. Pellegrini A., Luisi P. L. *Biopolymers*, 1978, v. 17, № 11, p. 2573-2580.
45. Tseng M.-J., Wu S.-H., Chen S.-T., Wang K.-T. J. *Chin. Biochem. Soc.*, 1981, v. 10, № 1, p. 36-42.
46. Bozler H., Wayne S. I., Fruton J. S. *Int. J. Peptide and Protein Res.*, 1982, v. 20, № 2, p. 102-109.
47. Tseng M.-J., Wu S.-H., Wang K.-T. *Tetrahedron*, 1983, v. 39, № 1, p. 61-66.
48. Isowa J., Ohmori M., Ichikawa T., Mori K. *Tetrahedron Lett.*, 1979, v. 128, p. 2611-2612.
49. Isowa J., Ichikawa T., Ohmori M. *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 1978, v. 51, № 1, p. 271-276.
50. Oka T., Morihara K. J. *Biochem.*, 1980, v. 88, № 4, p. 807-813.
51. Oyama K., Kihara K., Nonaka Y. J. *Chem. Soc. Perkin Trans II*, 1981, № 2, p. 356-360.
52. Oyama K., Nishimura S., Nonaka Y., Kihara K. J. *Org. Chem.*, 1981, v. 46, № 25, p. 5241-5242.
53. Sealock R. W., Laskowsky M. *Biochemistry*, 1969, v. 8, № 9, p. 3703-3710.
54. Widmer F., Johansen J. T. *Carlsberg Res. Commun.*, 1979, v. 44, № 1, p. 37-46.
55. Vann W. P., Weetall H. H. *Solid-Phase Biochem.*, 1976, v. 1, № 4, p. 297-306.
56. Widmer F., Breddam K., Johansen J. T. *Carlsberg Res. Commun.*, 1980, v. 45, № 6, p. 453-463.
57. Widmer F., Breddam K., Johansen J. T., *Carlsberg Res. Commun.*, 1981, v. 46, № 1-2, p. 97-106.
58. Breddam K., Widmer F., Johansen J. T. *Carlsberg Res. Commun.*, 1980, v. 45, № 5, p. 361-367.

59. *Breddam K., Widmer F., Johansen J. T.* Carlsberg Res. Commun., 1980, v. 45, № 4, p. 237-247.
60. *Semenov A. N., Berezin I. K., Martinek K.* Biotechnol. and Bioeng., 1981, v. 23, № 2, p. 355-360.
61. *Kuhl P., Gosselet S., Jakubke H.-D.* Pharmazie, 1981, v. 36, № 7, p. 463-465.
62. *Kuhl P., Jakubke H.-D.* Z. Chem., 1982, B. 22, № 11, S. 407.
63. *Antonini E., Carrea G., Cremonesi P.* Enzyme Microbiol. Technol., 1981, v. 3, № 4, p. 291-296.
64. *Fastrez J., Ferscht A. R.* Biochemistry, 1973, v. 12, № 5, p. 2025-2034.
65. *Мартинец К., Семенов А. Н.* Успехи химии, 1981, т. 50, вып. 8, с. 1376-1401.
66. *Ohmori M., Mori K., Isowa J.* Pept. Chem., 1978 (pub. 1979), v. 16, p. 135-140.
67. *Ohmori M., Isowa J., Mori K.* Pept. Chem., 1977 (publ. 1978), v. 15, p. 73-78.
68. *Клибанов А. М., Семенов А. Н., Самохин Г. П., Мартинец К.* Биооргани. химия, 1978, т. 4, № 1, с. 82-88.
69. *Isowa Y., Kakutani M., Yaguchi M.* Pept. Chem., 1981 (pub. 1982), v. 19, p. 25-30.
70. *Britnik F., Yost K.* Chem. Industry, 1980, v. 74, № 9, p. 951-964.
71. *Березин И. В., Антонов В. К., Мартинец К.* Иммуобилизованные ферменты. М.: МГУ, 1976, т. 2, с. 7-70.
72. Pat. of Japan 77:51089. C. A., 1977, v. 87, 85250a.
73. *Könnecke A., Hänslер M., Schellenberger V., Jakubke H.-D.* Monatsh. Chem., 1983, B. 114, № 4, S. 433-444.
74. *Klibanov A. M., Samokhin G. P., Martinek K., Berezin I. V.* Biotechnol. and Bioeng., 1977, v. 19, № 2, p. 1351-1361.
75. *Hayashi M., Misawa M., Isowa Y.* Agric. Biol., 1981, v. 45, № 12, p. 2723-2729.
76. *Люблинская Л. А., Воюшина Т. Л., Срепанов В. М.* Биооргани. химия, 1982, т. 8, № 12, с. 1620-1624.
77. *Bizzozero S. A., Rovagnati B. A., Guller H.* Helv. chim. acta, 1982, v. 65, № 6, p. 1707-1719.
78. *Kullmann W.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, № 9, p. 2840-2844.
79. *Komoriya A., Homandberg G. A., Chaiken I. M.* Int. J. Peptide and Protein Res., 1980, v. 16, № 5, p. 433-439.
80. *Tager H., Thomas N., Assoian K., Rubenstein A., Seakow M., Olefsky J., Kaiser E. T.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, № 6, p. 3181-3185.
81. *Morihara K., Oka T., Tsuzuki H.* Nature, 1979, v. 280, № 5721, p. 412-413.
82. *Westerhuis L. W., Tesser G. I., Nivard R. J. F.* Recueil, 1980, v. 99, № 12, p. 400-403.
83. *Zahn H., Naithani V. K., Gattner H. G., Buellсbach E. E., Thamm P. M.* Naturwissenschaften, 1981, B. 68, № 2, S. 56-62.
84. *Jonczyk A., Keefer L. M., Naithani V. K., Gattner H. G., De Meyts P., Zahn H.* Z. Physiol. Chem., 1981, B. 362, № 5, S. 557-561.
85. *Shimizu S., Yamada H.* J. Synth. Org. Chem., Japan, 1981, v. 39, № 6, p. 467-476.
86. *Chu S.-C., Wang C.-C.* Z. Physiol. Chem., 1981, B. 362, № 6, S. 647-654.
87. *Cao Q. P., Cui D. F., Zhang Y. S.* Nature, 1981, v. 292, № 5825, p. 774-775.
88. *Inouye K., Watanabe K., Tochino Y., Kobayashi M., Shigeta Y.* Biopolymers, 1981, v. 20, № 9, p. 1845-1868.
89. *Jonczyk A., Gattner H. G.* Z. Physiol. Chem., 1981, B. 362, № 12, S. 1591-1598.
90. *Breddam K., Widmer F., Johansen J. T.* Carlsberg Res. Commun., 1981, v. 46, № 6, p. 361-372.
91. Pat. USA 4293648. C. A., 1982, v. 96, 20471q.
92. *Royer G. P., Anantharmaiah G. M.* J. Amer. Chem. Soc., 1979, v. 101, № 12, p. 3394-3396.
93. *Jones R. M. L., Offord R. E.* Biochem. J., 1982, v. 203, № 1, p. 125-129.
94. *Reimen M. W., Pon L. A., Carpenter F. H.* Biochemistry, 1983, v. 22, № 6, p. 1507-1515.
95. *Yagisawa S. J.* Biochem., 1981, v. 89, № 2, p. 491-501.
96. *Вицлардт И., Павлюковский К., Германн П.* V Всес. симпозиум по химии и физике белков и пептидов. Тез. докл. (Окт. 1980), Баку, с. 191.
97. *Поур К., Бртник Ф., Шимек П., Барт Т.* См. ссылку [96], с. 157.
98. *Glass J. D., Pande C. S., Pelzig M.* 15 Eur. Peptide Symp. (Sept. 1978). Gdansk, Poland, Abstracts, p. 7.
99. *Glass J. D., Meyers C., Schwartz I. L., Walter R.* 13 Eur. Peptide Symp. (Apr.-May 1974): Kiryat Anavim, Israel. Abstracts, p. 141-152.
100. *Anjinsen C. B.* Pure Appl. Chem., 1968, v. 17, № 3, p. 461-487.
101. *Meyers C., Glass J. D.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, v. 72, № 6, p. 2193-2196.
102. *Pfaender P., Pratzel H., Blecher H., Gorka G., Hansen G.* Ref. [99], p. 137-143.
103. *Silver M. S., James S. L. T.* Biochemistry, 1981, v. 20, № 11, p. 3183-3189.
104. *Kullmann W. J.* Biol. Chem., 1981, v. 256, № 3, p. 1301-1304.
105. *Chaiken I. M., Komoriya A., Ohno M., Widmer F.* Appl. Biochem. and Biotechnol., 1982, v. 7, № 5, p. 385-399.
106. *Petkov D. D.* J. Theor. Biol., 1982, v. 98, № 3, p. 419-245.
107. *Konopinska D., Muzalewski F.* Mol. and Cell. Biochem., 1983, v. 51, № 2, p. 165-175.
108. *Gosselet M., Sebille B., Buvet R.* Eur. Polym. J., 1979, v. 15, № 12, p. 1079-1082.
109. *Klausner J. S., Meiri T. H., Schneider E.* 5 Amer. Pept. Symp. (June 1977). San Diego, California, USA. Abstracts, p. 536-538.
110. *Khurgin Yu. I., Dmitrieva M. G.* Tetrahedron, 1965, v. 21, № 10, p. 2305-2312.

111. Гершкович А. А., Серебряный С. Б. Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 8, с. 1129–1132.
112. Hirschmann R., Strachan R. G., Schwam H., Schoenewaldt E. F., Joshua H., Barkemeyer H., Veber D. F., Paleveda W. J., Jacob T. A., Beesley T. E., Denkwalter R. G. J. Org. Chem., 1967, v. 32, № 11, p. 3415–3425.
113. Addy M. E., Steinman G., Mallette M. F. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1973, v. 52, № 3, p. 1034–1038.
114. Kemp D. S., Wang S.-W., Rebek J., Mollan R. C., Banquer C., Subramayam G. Tetrahedron, 1974, v. 30, № 22, p. 3955–3967.
115. Шредер Э., Любке К. Пептиды. М.: Мир, 1967, т. 1, 2.
116. Гринштейн Д., Випиц М. Химия аминокислот и пептидов. М.: Мир, 1965, с. 1–824.
117. Medzihradsky K., Bruckner V., Kajtar M., Löw M., Bajusz S., Kisfaludy L. Acta chim. Acad. sci. hung., 1962, v. 30, № 1, p. 105–108.
118. Zaoral J. M., Sörm F. Coll. Czech. Chem. Commun., 1965, v. 30, № 6, p. 1853–1868.
119. Ondetti M. A., Natarayanan V. L., Saltza M., Sheehan J. T., Sabo E. F., Bodansky M. J. Amer. Chem. Soc., 1968, v. 90, № 17, p. 4711–4716.
120. Bailey W. J., Reinart G. E. Polymer Prep., 1965, v. 6, № 2, part 2, p. 740–746.
121. Klausner J. S., Bodansky M. Synthesis, 1974, № 8, p. 549–559.
122. Emery A. R., Gold V. J. Chem. Soc., 1950, № 6, p. 1443–1447.
123. Benoist N. L., Chen F. M. F. FEBS Lett., 1981, v. 125, № 1, p. 104–106.
124. Kricheldorf H. R., Mülhaupt R. Makromol. Chem., 1979, B. 180, № 6, S. 1419–1434.
125. Kirher K., Bernal H., Zahn H. J. Liebigs Ann. Chem., 1980, № 2, S. 275–284.
126. Wies R., Pfaender P. J. Liebigs Ann. Chem., 1973, № 8, S. 1269–1274.
127. Kricheldorf H. R. Angew. Chem. Int. Ed., 1973, B. 12, № 1, S. 73–74.
128. Kataikai R. J. Org. Chem., 1975, v. 40, № 19, p. 2697–2702.
129. Мирошников А. И., Демьяшкин Е. Д., Куделин А. Б., Овчинников Ю. А. Биоорган. химия, 1975, т. 1, № 12, с. 1702–1706.
130. Dewey R. S., Schoenewaldt E. F., Joshua H., Paleveda W. J., Schwam H., Barkemeyer H., Arison B. H., Veber D. F., Denkwalter R. G., Hirschmann R. J. Amer. Chem. Soc., 1968, v. 90, № 12, p. 3254–3255.
131. Dewey R. S., Schoenewaldt E. F., Joshua H., Paleveda W. J., Schwam H., Barkemeyer H., Arison B. H., Veber D. F., Strachan R. G., Mikowski J., Denkwalter R. G., Hirschmann R. J. Org. Chem., 1971, v. 36, № 1, p. 49–59.
132. Vinick J., Jung S. Tetrahedron Lett., 1982, v. 23, № 13, p. 1315–1318.
133. Paul R., Anderson G. J. Amer. Chem. Soc., 1960, v. 82, № 17, p. 4596–4600.
134. Anderson G., Paul R. J. Amer. Chem. Soc., 1958, v. 80, № 16, p. 4423.
135. Ehler K. W., Girard E., Orgel L. E. Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 491, № 1, p. 253–264.
136. Sheehan J. C., Hlavka J. J. J. Org. Chem., 1956, v. 21, № 4, p. 439–441.
137. Кноппе Д. Г., Шубина Т. Н. Ж. общ. химии, 1966, т. 36, № 4, с. 656–660.
138. Knorre D. G., Shubina T. N. Acta chim. Acad. sci. hung., 1965, v. 44, № 1–2, p. 77–80.
139. Nozaki S., Kimura A., Muramatsu I. Chem. Lett., 1977, № 10, p. 1057–1058.
140. Muramatsu I., Hashimoto C., Kimura A., Salka Y., Nozaki S. Rept. Chem., 1977 (publ. 1978), v. 15, p. 61–66.
141. Steinman G., Kenyon D. H., Calvin M. Biochim. et biophys. acta, 1966, v. 124, № 2, p. 339–350.
142. Hagarty A. F., McCarty D. G. J. Amer. Chem. Soc., 1980, v. 102, № 13, p. 4537–4538.
143. Watanabe Y., Mukaiyama T. Chem. Lett., 1981, № 3, p. 285–288.
144. Itoh M., Nojima H., Notani J., Hagawara D., Takai K. Bull. Chem. Soc. Jap., 1978, v. 51, № 11, p. 3320–3329.
145. Kemp D. S., Wang S.-W., Mollan R. G., Hsia S.-L., Confalone P. N. Tetrahedron, 1974, v. 30, № 20, p. 3677–3688.
146. Kiso Y., Miyazaki T., Satomi M., Hiraiwa H., Kita T. A. J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1980, № 7, p. 1029–1030.
147. Savrda J. J. Org. Chem., 1977, v. 42, № 19, p. 3199–3200.
148. Bodansky M. Nature, 1955, v. 175, № 4459, p. 685.
149. Guttman S., Boissonnas R. A. Helv. chim. acta, 1961, v. 44, № 6, p. 1713–1723.
150. Guttman S., Pless J., Boissonnas R. A. Helv. chim. acta, 1962, v. 45, № 1, p. 170–177.
151. Вировец С. И., Маргшиов В. Ф., Титов М. И. Ж. общ. химии, 1968, т. 38, № 10, с. 2337.
152. Веретенникова Н. И., Агаре Э. А., Приеднице Э. А., Чипенс Г. И. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 11, с. 1615–1619.
153. Лавреуца Э. Ф., Ашмарин И. П., Калихевич В. Н., Чаморовская Л. Т., Балабан П. М., Леонтьева Л. И., Захаров И. С. Хим.-фарм. ж., 1981, т. 15, № 1, с. 20–23.
154. Nowak K., Siemion J. Z. Roczn. Chem., 1963, v. 37, № 6, p. 693–697.
155. Bodansky M., Birkhimer C. A. Chimia, 1960, B. 14, № 11, S. 368.
156. Kemp D. S. In: Peptides 1971/Ed. Nesvadba H. North-Holland, Amsterdam, 1973, p. 1–20.
157. Glass J. D., Pelzig M. Int. J. Peptide and Protein Res., 1978, v. 12, № 1, p. 75–80.

158. Порошин К. Т., Хурган Ю. И., Дмитриева М. Г. Докл. АН СССР, 1960, т. 132, № 3, с. 623–625.
159. Гершкович А. А., Серебряный С. В. Биоорг. химия, 1978, т. 4, № 8, с. 1129–1131.
160. Pless J., Boissonnas R. A. Helv. chim. acta, 1963, v. 46, № 5, p. 1609–1625.
161. Kisfaludy L., Roberts J. E., Johnson R. H., Mayers G. L., Kovacz J. J. Org. Chem., 1970, v. 35, № 10, p. 3563–3565.
162. Kovacz J., Cover R. E., Johnson R. H., Kalas T. J., Mayers G. L., Roberts J. E. J. Org. Chem., 1973, v. 38, № 14, p. 2518–2521.
163. Ondetti M. A., Pluščec J., Sabo E. F., Sheehan J. T., Williams N. J. Amer. Chem. Soc., 1970, v. 92, № 1, p. 195–199.
164. Wieland T., Schäfer W., Bockelmann E. J. Liebigs Ann. Chem., 1951, B. 573, № 1, S. 99–104.
165. Farrington J. A., Hextall P. J., Kenner G. W., Turner J. M. J. Chem. Soc., 1957, v. 166, № 3, p. 1407–1413.
166. Wieland T., Heinke B. J. Liebigs Ann. Chem., 1958, B. 615, № 1–3, S. 184–202.
167. Savrda I., Veyrat D. H. Tetrahedron Lett., 1968, № 60, p. 6253–6254.
168. Bryant P. M., Moore R. H., Pimlott P. J., Young G. T. J. Chem. Soc., 1959, № 12, p. 3868–3873.
169. Anderson G. W., Zimmerman J. E. J. Amer. Chem. Soc., 1963, v. 85, № 19, p. 3039.
170. Anderson G. W., Callahan F. M., Zimmerman J. E. J. Amer. Chem. Soc., 1967, v. 89, № 1, p. 178.
171. Sakakibara S., Inukai N. Bull. Chem. Soc. Japan, 1965, v. 38, № 11, p. 1979–1984.
172. Maassen Van den Brink W. Acta chim. Acad. sci. hung., 1965, v. 44, № 1–2, p. 101.
173. Anderson G. W., Zimmerman J. E., Callahan F. M. J. Amer. Chem. Soc., 1964, v. 86, № 9, p. 1839–1842.
174. Hofmann K., Haas W., Smithers M. Y., Zanetti G. J. Amer. Chem. Soc., 1965, v. 87, № 3, p. 631–639.
175. Löw M., Kisfaludy L. Acta chim. Acad. sci. hung., 1965, v. 44, № 1–2, p. 61–66.
176. Gross H., Bilk L. Tetrahedron, 1968, v. 24, № 24, p. 6935–6939.
177. Андреев С. М., Галкин О. М., Рогожин С. В. 5 Всес. симпозиум по химии и физике белков и пептидов. Октябрь 1980, Баку. Тез. докл. с. 177.
178. Suzuki K., Sasaki J. Chem. Pharm. Bull., 1973, v. 21, № 12, p. 2634–2638.
179. Yaron A., Tal N., Berger A. Biopolymers, 1972, v. 11, № 12, p. 2461–2481.
180. Katakai R., Oga M., Toda F., Uno K., Iwakura J. Macromolecules, 1973, v. 6, p. 827–831.
181. Stabinsky J., Gottlieb P., Zakuth V., Spierer Z., Fridkin M. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1978, v. 83, № 2, p. 599–606.
182. Blumberg S., Vallee B. L. Biochemistry, 1975, v. 14, № 11, p. 2410–2419.
183. Slotboom A. J., de Haas G. M. Biochemistry, 1975, v. 14, № 25, p. 5394–5399.
184. Puigserver A. J., Sen L. C., Gonzales-Flores E., Feeney R. E., Whitaker J. R. J. Agric. Food Chem., 1979, v. 27, № 5, p. 1098–1104.
185. Nefkens G. H. L., Tesser G. I. J. Amer. Chem. Soc., 1961, v. 83, № 5, p. 1263.
186. Nefkens G. H. L., Tesser G. I., Nivard R. J. F. Rec. trav. chim., 1962, B. 81, № 7, S. 683–690.
187. Rajappa S., Nagarajan K., Iyer V. S. Tetrahedron, 1967, v. 23, № 12, p. 4805–4809.
188. Jeschkeit H. Z. Chem., 1969, B. 9, № 12, S. 266–267.
189. Beaumont S. M., Handford B. O., Jones J. H., Young G. T. J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1965, № 4, p. 53–54.
190. Handford B. O., Jones J. H., Young G. T., Johnson T. F. J. Chem. Soc., 1965, № 12, p. 6814–6816.
191. Hoffman E., Diller D. Can. J. Chem., 1965, v. 43, № 11, p. 3103–3104.
192. Yajima H., Ogawa H., Watanabe H., Fujii N., Kurobe M., Miyamoto S. Chem. Pharm. Bull., 1975, v. 23, № 2, p. 371–374.
193. Micheel F., Manfred L. J. Liebigs Ann. Chem., 1966, B. 698, № 8, S. 242–252.
194. Соколова Н. И., Баканова В. А., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. Ж. общ. химии, 1963, т. 33, № 8, с. 2480–2486.
195. Basu H. S., Podder S. K. Indian J. Biochem. and Biophys., 1981, v. 18, № 4, p. 251–253.
196. Nagao J., Miyasaka T., Seno K., Yagi M., Fujita E. Chem. Lett., 1981, № 4, p. 463–466.
197. Blake J. Int. J. Peptide and Protein Res., 1981, v. 17, № 2, p. 273–274.
198. Blake J., Li C. H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, № 7, p. 4055–4058.
199. Losse G., Hoffmann K. H., Heyzer G. J. Liebigs Ann. Chem., 1965, B. 684, № 4, S. 236–242.
200. Takaya T., Ohnishi T., Sakakibara S. Pept. Chem., 1978, (pub. 1979), № 16, p. 61–66.
201. Merrifield R. B. J. Amer. Chem. Soc., 1963, v. 85, № 14, p. 2149–2154.
202. Bayer E., Mutter M. Nature, 1972, v. 237, № 5357, p. 512–513.
203. Smith G. W., Stahe G. L., Walter R. Int. J. Peptide and Protein Res., 1979, v. 13, № 2, p. 109–112.
204. Könnecke A., Dettlaff S., Jakubke H.-D. Monatsh. Chem., 1982, B. 113, № 3, S. 331–337.
205. Fridkin M., Patchornic A., Katchalski E. J. Amer. Chem. Soc., 1965, v. 87, № 20, p. 4646–4648.
206. Laird R. M., Spence M. J. J. Appl. Chem. Biotechnol., 1977, v. 27, № 4, p. 214–218.

207. *Gosselet M., Sebille B., Buvet R.* Eur. Polym. J., 1979, v. 15, № 12, p. 1079-1082.
208. *Gosselet M., Sebille B.* J. Chem. Technol. and Biotechnol., 1981, v. 31, № 6, p. 341-344.
209. *Самойлова Н. А., Андреев С. М., Цырякин В. А., Давидович Ю. А., Рогожин С. В.* Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 6, с. 725-728.
210. *Самойлова Н. А., Андреев С. М., Галкин О. М., Давидович Ю. А., Рогожин С. В.* Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 11, с. 1627-1637.
211. *Самойлова Н. А., Андреев С. М., Галкин О. М., Давидович Ю. А., Рогожин С. В.* 4 Всес. конференция «Методы получения и анализа биохимических препаратов». Тез. докл. Рига, 1982, с. 45.
212. *Самойлова Н. А., Давидович Ю. А., Рогожин С. В.* Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 3, с. 358-364.
213. *Каменский А. А., Антонова Л. В., Самойлова Н. А., Галкин О. М., Андреев С. М., Ашмарин И. П.* Бюл. эксперим. биол. и мед., 1980, № 7, с. 43-45.
214. *Буров С. В., Смирнова М. П.* Успехи химии, 1982, т. 51, № 9, с. 1567-1578.
215. *Hardy P. M.* Chem. Ind., 1979, № 18, p. 617-624.
216. *Wieland T.* Acta chim. Acad. sci. hung., 1965, v. 44, № 1, p. 5-9.
217. *Auzinger H., Mutter M., Bayer E.* Angew. Chem. Int. Ed., 1979, B. 18, № 9, S. 686-687.
218. *Kunz H. J.* Liebigs Ann. Chem., 1976, № 9, S. 1674-1679.
219. *Kunz H.* Angew. Chem. Int. Ed., 1978, B. 17, № 1, S. 67-68.
220. *Tesser G. I., Balvert-Geers I. C.* Int. J. Peptide and Protein Res., 1975, v. 7, № 4, p. 295-305.
221. *Tesser G. I., Boon P. J.* Rec. trav. chim., 1980, v. 99, № 10, p. 289-300.
222. *Ludwig M. L., Byrne R. J.* Amer. Chem. Soc., 1962, v. 84, № 11, p. 4160-4162.
223. *Hubbich A., Danho W., Zahn H.* Proc. 5 Amer. Pept. Symposium / Eds Goodman M., Meinhofer J. N. Y.: Wiley, 1977, p. 540-542.
224. *Veber D. F., Milkowski J. D., Denkwalter R. G., Hirschmann R.* Tetrahedron Lett., 1968, № 26, p. 3057-3058.
225. *Aimoto S., Ikemura H., Okamoto M., Shimonishi J.* Pept. Chem., 1978 (publ. 1979), № 16, p. 29-34.
226. *Rüegg U. T., Jarvis D., Rudinger J.* Biochem. J., 1979, v. 179, № 1, p. 119-126.
227. *Rüegg U. T., Jarvis D., Rudinger J.* Biochem. J., 1979, v. 179, № 1, p. 127-134.
228. *Paecht-Horowitz M., Berger J., Katchalsky A.* Nature, 1970, v. 228, № 14, p. 636-639.
229. *Yamada S., Yokouama J., Shioiri T.* Experientia, 1976, v. 32, № 8, p. 967-968.
230. *Harpold M. A., Calvin M.* Biochim. et biophys. acta, 1973, v. 308, № 1, p. 117-128.
231. *Nambu J., Endo T., Okawara M.* J. Polym. Sci., Polym. Ed., 1980, v. 18, № 9, p. 2793-2802.
232. *Sasaki S., Shionoya M., Koga K.* Heterocycles. 1983, v. 20, № 1, p. 124.

Поступила в редакцию
7.IX.1983
После доработки
1.XI.1983

PEPTIDE SYNTHESIS IN AQUEOUS MEDIA

SAMOILOVA N. A., DAVIDOVICH Yu. A., ROGOZHIN S. V.

*A. N. Nesmeyanov Institute of Organo Element Compounds, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

Within the scope of the review is the enzyme-catalyzed peptide bond formation and introduction or removal of protecting groups, as well as a search for new hydrophilic protecting groups. Chemical methods involving low molecular weight reagents and polymeric supports are also discussed.