



ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 577.112.6

ПОЛУСИНТЕЗ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ

Медведкин В. Н.

Институт белка Академии наук СССР, г. Пушкино Московской обл.

В обзоре представлены данные по полусинтезу белков и пептидов – разделу белковой инженерии, в котором конструирование пептидов, белков и белковых фрагментов осуществляют методами пептидной химии и химии белка. Частным случаем полусинтеза является энзиматический или химический ресинтез белка из фрагментов. В обзоре представлены также данные по полусинтетическим нековалентным комплексам белковых фрагментов с синтетическими пептидами.

Содержание обзора

Введение
I. Инсулин
II. Проинсулин
III. Цитохром с
IV. Миоглобин
V. Рибонуклеаза
VI. Стафилококковая нуклеаза
VII. Соматотропин
VIII. Фосфолипаза A ₂
IX. Ингибиторы протеиназ
X. Другие белки
XI. Полусинтетические пептиды
XII. Незавершенные эксперименты по полусинтезу белков и пептидов

Введение

Белковая инженерия – один из наиболее бурно развивающихся разделов молекулярной биологии. Это не удивительно. Помимо «пассивного» изучения белков, предоставленных исследователям природой, реальной стала возможность получения новых белковых структур. Это осуществляется как направленной модификацией выделенных из природных источников молекул (без затрагивания полипептидной цепи), так и созданием не имеющих аналогов в природе полипептидных последовательностей. Заданные свойства структуры конструируются из полипептидной цепи с привлечением компьютерных расчетов, компьютерной графики и современных представлений физики белка.

Необходимо отметить, что белковую инженерию иногда отождествляют с одним из ее основных методов: методом направленных мутаций. Однако достаточно познакомиться с подбором публикаций в журнале «Protein Engineering», чтобы убедиться, что это не так. Кроме направленного мутагенеза существуют другие, довольно хорошо разработанные подходы к конструированию белковых молекул. Описанию одного из таких

Принятые сокращения: Acim – ацетимидоил, BNPS-скатол – 2-(2-нитрофенилсульфенил)-3-метил-3'-броминдоленин, Eoc – этилоксикарбонил, Msc – 2-метилсульфонилэтилоксикарбонил, ONb – *o*-нитробензилокси, Ptc – фенилтиокарбамоил, (HO₃S)-Ptc – 3-сульфобензилотиоцианат, Tfa – трифторацетил, Pcr – пентахлорфенил, СТИ – соевый трипсиновый ингибитор, ПТИ – панкреатический трипсиновый ингибитор (трипсиновый ингибитор из поджелудочной железы быка).

подходов и посвящен настоящий обзор. Чаще всего этот подход называют «семисинтезом» (от английского semisynthesis [1—11]). Иногда встречаются такие определения, как «метод химического мутагенеза», «полухимический синтез», «частичный синтез». Мы предпочитаем пользоваться дословным переводом наиболее распространенного в литературе обозначения этого метода, и в настоящем обзоре используется термин «полусинтез».

Формально этот термин не является корректным. В самом деле, к полусинтезу можно отнести большую часть методов органической химии и практически все синтетические работы биоорганической химии. Например, можно назвать полусинтезом получение производных аминокислот, так как аминокислоты чаще всего выделяют из природного сырья и уже затем подвергают химическим превращениям. Тем не менее термин «полусинтез» прижился и используется не только в химии белков и пептидов, но и в химии антибиотиков и в геной инженерии.

Что же называется полусинтезом? По нашему мнению, «полусинтез» белков и пептидов объединяет методы, использующие для получения полипептидной цепи более короткие ее фрагменты, из которых хотя бы один фрагмент является природным.

В одном из своих обзоров Оффорд [5] различает полусинтетические эксперименты с белками по характеру образования новых молекул: а) через дисульфидные связи, б) через функционально активные нековалентные комплексы между фрагментами молекулы, в) ступенчатым наращиванием пептидной цепи или конденсацией фрагментов. Мы полагаем, что образование новых молекул через образование дисульфидных связей нельзя считать полусинтезом, так как при этом не происходит изменений в полипептидном остове молекулы.

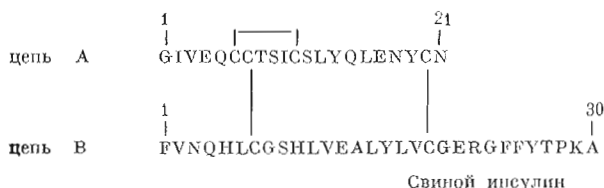
Частным случаем полусинтеза является ресинтез полной белковой молекулы из природных фрагментов. До сих пор результат ресинтеза белков из природных фрагментов невозможно заранее предсказать. Каждый пример ресинтеза важен поэтому сам по себе, так как он раскрывает новые возможности в конструировании белков и их изучении.

По нашему мнению, даже поверхностное ознакомление с работами по полусинтезу дает понимание того факта, что очень многие белки можно изучать не только путем их химической модификации или расщепления на фрагменты, но и получая новые аналоги белков и их фрагментов, содержащие замены отдельных аминокислотных остатков в полипептидной цепи. Очевидно также и то, что полусинтетические исследования не конкурируют с методом направленных мутаций, хотя с помощью полусинтеза можно решать задачи, осуществляемые обычно направленным мутагенезом. Предметом исследований в полусинтезе является химическая модификация полипептидного остова белка, а то, каким путем этот белок получен (из природного источника, методами геной инженерии или направленным мутагенезом), для полусинтеза не имеет значения. Можно, например, представить ситуацию, когда полусинтез и направленный мутагенез взаимно дополняют друг друга для решения задач по изучению свойств белков. Например, методом направленных мутаций можно ввести в нужном месте полипептидной цепи остаток метионина, а затем, расщепив по этому остатку белок, методом полусинтеза селективно присоединить к N-концу полученного фрагмента какой-нибудь зонд — радиоактивный, флюоресцентный и т. д.

Необходимо отличать приемы полусинтеза от методов, используемых в работах, объединенных под общим названием «полусинтетические эпизимы». В этих работах используют химическую модификацию белковой молекулы (не изменяя ее полипептидного остова) для конструирования ферментов с принципиально отличной от исходной биологической активностью. Так, Кайзер с соавт. химической модификацией активного центра папаина превратили его в оксидоредуктазу [12]. Сарасвати и Кейс [13, 14] конформационной модификацией рибонуклеазы превратили ее в эстеразу. Для ознакомления с этими работами можно порекомендовать также обзорные статьи [15, 16].

Ниже приводятся примеры полусинтеза различных белков и пептидов, которые иллюстрируют возможности этого метода. Основное внимание в обзоре уделяется описанию общей схемы полусинтеза. Описание методологии сведено до минимума. Это объясняется тем, что сравнительно недавно опубликована монография Оффорда [1], освещающая методологические вопросы достаточно полно. Отдельные аспекты методологии полусинтеза рассматриваются в обзорах [2—11]. Аминокислотные последовательности в подзаголовках разделов приведены из Атласа белковых последовательностей и структур под ред. Дэйхофф [17].

I. Инсулин



Молекула инсулина состоит из двух полипептидных цепей А и В, соединенных друг с другом двумя дисульфидными связями. Человеческий инсулин отличается от свиного единственным аминокислотным остатком Thr^{B30} вместо Ala^{B30}. Молекула имеет три аминогруппы: α-A1, α-B1 и ε-B29. С-Концевая часть В-цепи имеет два участка, удобных для расщепления трипсином (Arg^{B22}—Gly^{B23} и Lys^{B29}—Ala^{B30}). В N-концевой части молекулы А- и В-цепи имеют соответственно 5 и 6 «внешних» аминокислотных остатков, доступных для деградации по Эдману без разрушения дисульфидных связей.

Работы по полусинтезу аналогов инсулина — наиболее яркий пример, демонстрирующий возможности полусинтетического подхода к получению аналогов белков и пептидов. Их логическим развитием явилось создание промышленной технологии получения человеческого инсулина из инсулина животного происхождения (инсулин свиный). Параллельно с созданием промышленной технологии ведутся поиски аналогов инсулина, обладающих более высокой активностью и (или) пролонгированным действием. При этом в молекулу инсулина встраивают остатки неproteinогенных аминокислот, что невозможно сделать с использованием методов геной инженерии.

I.1. Условно полусинтетические аналоги инсулина

Сразу же после осуществления полного химического синтеза инсулина стало очевидным, что для изучения функциональной активности гормона и ее связи со строением инсулина нет никакой необходимости синтезировать обе цепи молекулы. Вейтцель с соавт. синтезировали аналоги А- и В-цепей инсулина (всего свыше 30 различных аналогов), которые комбинировали с природными цепями путем создания дисульфидных связей и получали таким образом молекулы инсулина, содержащие одну природную и одну синтетическую цепи. Сводную таблицу таких аналогов дает в своем обзоре по химии инсулина Гейгер [18]. Косматос и Катсоянис [19—21] также пошли по пути комбинации природной и синтетической цепи инсулина, причем в двух случаях [19, 20] они включали в состав А-цепи остатки гомоцистеина вместо цистеина.

Оффорд [5] относит гибридные молекулы, полученные путем образования дисульфидных связей, к полусинтетическим. Так, полусинтетическими он называет химерные антитела, полученные образованием дисульфидных связей между фрагментом иммунологически активного антитела и фрагментом белкового токсина, а также описанные выше эксперименты с инсулином. Такая точка зрения не является общепринятой. По нашему мнению, описанные работы не являются полусинтезом,

потому что на стадии рекомбинации фрагментов не происходит изменения полипептидного остова молекулы. В настоящем обзоре они приведены как пример осуществления логичного стремления химиков максимально упростить наработку аналогов инсулина. Все аналоги инсулина, имеющие замены аминокислотных остатков в центральной части молекулы (между дисульфидными связями), получены именно таким путем. Осуществить замены аминокислотных остатков в центральной части А-цепи с помощью полусинтеза сложно, так как инсулин не имеет в этом районе удобных участков расщепления. Из последних публикаций этой серии можно упомянуть работу Йоши с соавт. [22]. А-цепь инсулина комбинировали с синтетической В-цепью, соответствующей В-домену человеческого инсулиноподобного фактора роста I.

1.2. Полусинтетические аналоги отдельных цепей инсулина

Следующим шагом на пути получения полусинтетических аналогов инсулина явилась серия работ по получению полусинтетических аналогов отдельных цепей инсулина. Шимониши [23], Вейнерт с соавт. [24, 25], Бранденбург с соавт. [26], Крайль с соавт. [27, 28] выделяли отдельно А-цепь инсулина, имеющую единственную аминокислотную группу в α -положении, подвергали ее препаративной деградации по Эдману и присоединяли вместо отщепленных аминокислотных остатков другие, в том числе и радиоактивно меченные [28]. Затем комбинацией таких полусинтетических аналогов А-цепи с природной В-цепью инсулина получали полусинтетические аналоги инсулина. Наибольшие трудности при этом возникали на стадии образования дисульфидных связей. Конечный продукт выделяли с низким выходом, и поэтому естественным развитием этих работ явился полусинтез, осуществляемый с использованием целой молекулы инсулина.

1.3. Полусинтетические аналоги инсулина, имеющие модификации в N-концевой части молекулы

1.3.1. Модификация В-цепи инсулина

Впервые полусинтез аналога инсулина, включающий модификацию целой молекулы гормона, осуществили Боррас и Офффорд [29]. Они применили для этой цели селективно модифицированный по α -В1-аминогруппе фенилизотиоцианатом инсулин, который получали разделением продуктов неполной модификации инсулина фенилизотиоцианатом с помощью ионообменной хроматографии. Блокировав оставшиеся две аминокислотные группы (α -А1 и ϵ -В29) Тфа-защитой [30], Боррас и Офффорд отщепили остаток Phe^{B1} деградацией по Эдману и присоединением по единственной аминокислотной группе молекулы производных различных аминокислот получили из целой молекулы инсулина первые полусинтетические аналоги, содержащие замены в В1-положении.

Гейгер с соавт. [31–33] использовали для получения полусинтетических аналогов инсулина различную чувствительность аминокислотных групп инсулина к модифицирующим реагентам. Оказалось, что Вос-азид [32] и Msc-ONSu [33] модифицируют преимущественно α -А1- и ϵ -В29-аминогруппы, тогда как α -В1-аминогруппа остается немодифицированной. Это позволило осуществить различным авторам большое число экспериментов по типовой схеме: модификация α -А1- и ϵ -В29-аминогрупп, деградация по Эдману В-цепи инсулина и, наконец, присоединение методом смешанных ангидридов или активированных эфиров производных аминокислот к укороченной В-цепи с последующим удалением защитных групп и очисткой инсулина [31–43]. Иногда после модификации α -А1- и ϵ -В29-аминогрупп деградацию по Эдману не проводят и присоединяют синтетические пептиды к α -В1-аминогруппе модифицированного инсулина [44], получая таким образом аналоги инсулина с удлиненной В-цепью.

1.3.2. Модификация А-цепи инсулина

Осуществить полусинтез аналогов инсулина с модифицированной А-цепью инсулина на основе интактной молекулы сложнее, чем аналогичные эксперименты с В-цепью или эксперименты с использованием изолированной А-цепи инсулина. Разнообразие схем осуществленных экспериментов свидетельствует скорее не о разнообразии имеющихся возможностей, а о том, что ни одна из предложенных схем не является удовлетворительной. Тем не менее получено значительное количество полусинтетических аналогов инсулина, имеющих модифицируемые А-цепи [45–51]. Вместе с работами по полусинтезу с использованием изолированной А-цепи и по полному химическому синтезу аналогов А-цепи эти эксперименты позволили полностью «картировать» А-цепь по влиянию замен аминокислотных остатков на биологическую активность инсулина.

Во всех экспериментах с А-цепью в составе интактной молекулы инсулина используют различную реакционную способность аминогрупп инсулина по отношению к Вос-азиду [50], фенилизотиоцианату [47], этилтрифтортоацетату [47]. Как правило, α -А1-аминогруппа является наиболее реакционноспособной. Например, обработка инсулина фенилизотиоцианатом в специально подобранных условиях (Саундерс с соавт. [47]) приводит к получению $N^{\alpha-A1}$ -Ptc-инсулина и $N^{\alpha-B1}$ -Ptc-инсулина в соотношении 5:1. После выделения модифицированного по α -А1-аминогруппе инсулина остальные аминогруппы в нем блокируют своеобразной «метиониновой» защитой, например Boc-Met- или Z-Met-, чувствительной к бромциану [47, 48, 50]. Затем деградацией по Эдману (или селективным удалением защиты с α -А1-аминогруппы в зависимости от выбранной схемы полусинтеза) высвобождают α -аминогруппу для осуществления дальнейших экспериментов (ступенчатая деградация по Эдману и затем присоединение вместо отщепленных аминокислотных остатков новых аминокислотных остатков).

1.4. Полусинтетические аналоги инсулина, имеющие модификации в С-концевой части В-цепи молекулы

В отличие от получения ранее описанных аналогов инсулина модификации в С-концевой части В-цепи инсулина в настоящее время осуществляют исключительно с использованием ферментов, чаще всего трипсина. Попытки присоединить вместо отщепленного ферментом фрагмента синтетической С-концевой пептид к остальной части молекулы (после ее модификации) с помощью химических методов конденсации представляют исторический интерес, так как выход целевого продукта очень мал. Сохранили свое значение лишь работы Вейтцель с соавт. [52, 53], получивших с использованием химических методов конденсации полусинтетические аналоги инсулина, в которых остаток Arg^{B22} заменяли на остатки других аминокислот. Для этого инсулин расщепляли трипсином по остатку Arg^{B22}, затем с помощью карбоксипептидазы В отщепляли остаток аргинина и путем химической конденсации присоединяли к полученному дез-(В22–В30)-инсулину различные аналоги инсулин-(В22–В30)-пептида с очень низким выходом. Используя ферментативные методы полусинтеза, получить описанные выше аналоги инсулина сложно. Во всяком случае хорошо известная схема замены остатков Arg и Lys в ингибиторах протеиназ (см. раздел IX обзора) на остатки других аминокислот (Phe, Trp) с инсулином пока не реализована. Для получения аналогов инсулина, содержащих замены в положении В22, удобнее использовать подход, описанный в разделе 1.1. В этой связи уместно упомянуть работу Кнорр с соавт., получивших дез-(В23–В30)-[D-Arg^{B22}]-инсулин [54].

Полусинтез с С-концевой частью В-цепи осуществляют с целью получения аналогов инсулина с заменами в функционально важной области ароматических аминокислотных остатков В25–В27 и для превращения

свиного инсулина в человеческий заменой С-концевого остатка Ala^{B30} на Thr^{B30}. Сначала обе эти задачи решали одинаково. Молекулу инсулина расщепляли в С-концевой части по связи Arg^{B22}—Gly^{B23}, а затем присоединяли с помощью ферментов к дез-(В23-В30)-инсулину синтетический Thr^{B30}-аналог инсулин-(В23-В30)-октапептида или более короткие пептиды [55—64].

Параллельно и независимо Канова-Дэвис, Карпенгер [65] и Раймен с соавт. [66] предложили смешанный химико-ферментативный метод получения аналогов инсулина из дез-(В23-В30)-инсулина. Сущность метода состоит в том, что дез-(В23-В30)-инсулин реагирует в присутствии трипсина с фенилгидразином с образованием соответствующего фенилгидразида (реакция идет селективно по α-карбоксильной группе), который реакцией с BNPS-скатолом превращают в активированное азосоединение, способное ацилировать α-аминогруппу синтетического октапептида (аминогруппы дез-(В23-В30)-инсулина предварительно блокировали Вос-защитой).

Для получения человеческого инсулина из свиного метод, основанный на конденсации дез-(В23-В30)-инсулина с восьмичленным пептидом, в настоящее время не используется. Однако данный прием оказался полезным для наработки аналогов инсулина с остатком лейцина в положении В24 и/или В25. Такой аномальный инсулин Тагер с соавт. [67] обнаружили у некоторых больных сахарным диабетом. Кроме того, дез-(В23-В30)-инсулин используется для наработки аналогов инсулина с укороченной В-цепью (см., например, [68, 69]).

Создание промышленной технологии получения человеческого инсулина из свиного стало возможным после того, как Морихара с соавт. [70] подобрали условия для селективного расщепления инсулина трипсином по остатку Lys^{B29} и обнаружили, что трипсин катализирует присоединение Thr-OBu^t к дез-Ala^{B30}-инсулину свиньи. При этом, как указывают сами авторы, «к их удивлению», в условиях осуществления реакции трипсин не разрушает связь Arg^{B22}—Gly^{B23}. Это сообщение привлекло внимание многих исследователей, поскольку появилась возможность получать остродефицитный человеческий инсулин (и аналоги инсулина с заменами в положении В30) из доступного в большом количестве инсулина свиньи [71—82]. Общим в этих работах является то, что равновесие взаимодействия фермента с инсулином смещают в сторону синтеза, осуществляя реакцию в присутствии большого избытка эфира треонина в водно-органической среде. Йончук и Гаттнер [71], Гаттнер с соавт. [72] модифицировали условия реакции, осуществив трансформацию свиного инсулина в человеческий в одну стадию, минуя выделение дез-Ala^{B30}-инсулина с выходом 50—70%. Роус с соавт. [73], максимально увеличив долю органического растворителя в реакционной смеси, довели выход реакции трансформации свиного инсулина в человеческий инсулин до 99% на стадии реакции дез-Ala^{B30}-инсулина с эфиром треонина. После удаления защитных групп с треонина выход чистого инсулина составил 92%.

Швачкина с соавт. развили этот метод до получения новых структурных аналогов инсулина человека [80]. Взаимодействием свиного инсулина с *tert*-бутиловым эфиром соответствующей аминокислоты в водно-органической среде (25°С, рН 6,3) в присутствии трипсина получены 10 ранее неизвестных аналогов инсулина человека, отличающихся от природного гормона заменой остатка Thr^{B30} на остатки других аминокислот, в том числе и на остаток β-аланина. Получены результаты, создающие необходимые предпосылки для направленного конструирования новых активных аналогов этого гормона, но, пожалуй, самым интересным с методической точки зрения является то, что реакцию триптического трансамидирования удается осуществить с непротеиногенными аминокислотами. Получить аналогичные аналоги, используя метод направленных мутаций, в настоящее время невозможно.

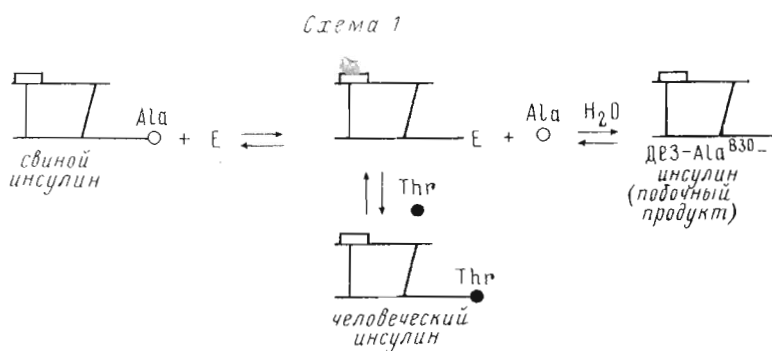
Гаттнер и Наитани [81] получили производное инсулина, предназначенное для последующей его иммобилизации. Для этого свиной инсулин взаимодействием с Thr(Bu^t)NH(CH₂)₆NHВос в присутствии трипсина пре-

вратили в соответствующий аналог человеческого инсулина. Затем модифицировали все аминокруппы полученного производного с помощью Msc-Cl и после деблокирования трифторуксусной кислотой защитных групп трет-бутильного типа получили предназначенное для иммобилизации производное инсулина. В кратком сообщении [81] ничего не говорится о том, зачем инсулин пужно иммобилизовать именно таким образом и к какому носителю будет присоединено полученное производное инсулина.

Области практического применения химических и ферментативных методов конденсации для получения полусинтетических аналогов инсулина обсуждаются в обзоре Цан с соавт. [2]. Опубликован также обзор работ по использованию для получения человеческого инсулина из свиного инсулина иммобилизованного фермента — протеиназы I из штамма *Achromobacter* [10].

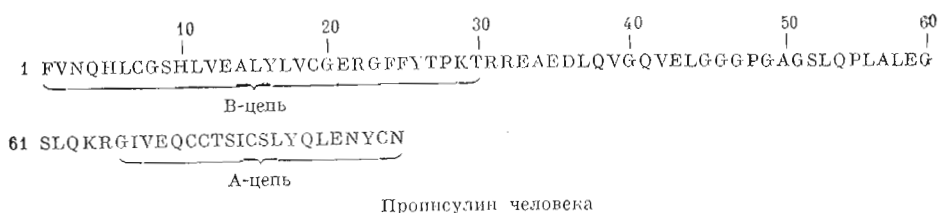
Для ознакомления с термодинамическими и кинетическими аспектами ферментативного полусинтеза можно порекомендовать работы [82, 83]. Зависимость ферментативного полусинтеза инсулина от температуры изучена Морихарой с соавт. [84].

Несмотря на то что получению человеческого инсулина из свиного с помощью трипсина посвящено много работ, механизм этой реакции до конца не ясен. Маркуссен и Шаумбург [85], используя данные ^{17}O -ЯМР, приводят доказательства существования тетраэдрического переходного комплекса ацилфермент — эфир треонина. Из данных анализа ^{18}O -масс-спектров компонентов реакции (Роус с соавт. [86]) следует, что трансформация свиного инсулина в человеческий происходит по схеме 1. Роус с соавт. не оспаривают результатов, полученных Маркуссен и Шаумбург, так как реакцию изучали в различных условиях. Вместе с тем до окончательного выяснения вопроса они предлагают воздержаться от термина «транспептидация» и заменяют его на более нейтральный «трансформация» [86].



Трансформация инсулина свиный в человеческий инсулин [81].
E — фермент

II. Проинсулин



Полусинтез аналогов проинсулина осуществляют в основном с целью выяснения роли выщепляемого при биосинтезе инсулина участка поли-

быть найдено в проинсулине — биологическом предшественнике инсулина, в котором фрагменты, соответствующие А- и В-цепям, образуют единую цепь, соединяясь через 34-членный (для проинсулина человека) участок полипептидной цепи (С-пептид), выщепляемый в ходе биосинтеза инсулина. В проинсулинах из других источников длина С-пептида варьирует от 27 до 35 аминокислотных остатков. Этот очень вариабельный участок молекулы проинсулина облегчает правильное образование дисульфидных связей в молекуле инсулина. Однако только формированием дисульфидных связей кельза объяснить необходимость столь большой длины С-пептида и его вариабельность, поскольку воспроизвести эту функцию можно, используя даже очень короткие шивки между А- и В-цепями инсулина.

Полусинтез проинсулина и его аналогов осуществляют по одной генеральной схеме, включающей в себя несколько этапов:

- 1) выделение А- и В-цепей инсулина,
- 2) модификация карбоксильных групп и аминокрупп В-цепи,
- 3) присоединение к единственной аминокгруппе А-цепи инсулина синтетического пептида, встраиваемого между цепями, причем на N-конце этого пептида аминокислотный остаток соответствует остатку В30 В-цепи инсулина,
- 4) отщепление С-концевой аминокислоты В-цепи инсулина и высвобождение тем самым α -карбоксильной группы В-цепи,
- 5) активация В-цепи, конденсация ее с модифицированной А-цепью, деблокирование и очистка полученного аналога проинсулина.

Типичная схема получения аналогов проинсулина представлена на схеме 2. Осуществляя полусинтез дез-(1-21)-препроинсулина, Наитани с соавт. [87] разработали методику конденсации синтетических пептидов с природными с использованием метода смешанных ангидридов в водном диметилформамиде при рН 5—7. Эта методика была впоследствии использована различными авторами в экспериментах по полусинтезу белков.

Привлекает внимание работа Бюллесбах и Наитани [92]. Разработав схему получения $N^{\epsilon-29}, N^{\epsilon-59}$ -бис(Мsc)-проинсулина быка (аминокислотную последовательность этого проинсулина см. в работе [17], в проинсулине человека С-цепь длиннее на 5 аминокислотных остатков), эти авторы присоединили к α -аминогруппе полученного производного остаток метионина, а затем, выщепив с помощью трипсина и карбоксипептидазы В С-пептид, получили аналог инсулина, у которого В-цепь удлинена на остаток метионина.

Получены полусинтетические аналоги проинсулина, наработанного методами генной инженерии. Основная цель этих исследований — введение радиоактивной метки в проинсулин. Для этого к N-концу проинсулина человека присоединили меченный тритием остаток фенилаланина [93].

III. Цитохром с

Цитохромы с представляют собой небольшой класс белков, содержащих ковалентно связанный гем. Основной функцией этих белков является перенос электронов от цитохром-с-редуктазы до цитохром-с-оксидазы с определенным редокс-потенциалом. Наименьший из цитохромов с (цитохром с *Pseudomonas aeruginosa*) содержит 82, наибольший (*Paracoccus denitrificans*) — 134 аминокислотных остатка. Все эти белки являются, по словам Харбэри, «вариациями одной темы» [94], причем основу составляют цитохромы длиной в 103—104 аминокислотных остатка (цитохромы с человека, быка, лошади).

Полусинтез аналогов цитохрома с осуществляют в основном с цитохромом с из сердца лошади.

1
10
20
30
40
50
60
 Ac-GDVEKGGKKIFVQKCAQCSTVEKGGGKHKKTGPNLHGLFGRKKTGQAPGFYTYTDANKNKGITWK
 61 EETLMEYLENPKKYIPGTCKMIFAGIKKKTEREDLIAYLKKATNE

Цитохром с из сердца лошади

Это небольшой глобулярный белок (104 аминокислотных остатка), к которому через остатки Cys¹⁴ и Cys¹⁷ присоединена группировка гема. Белок однопочечный, дисульфидных связей нет. Атом железа координируется двумя связями с His¹⁸ и Met⁸⁰. Так как остаток Met⁸⁰ участвует в координации с атомом железа, полусинтез планируют и осуществляют таким образом, чтобы этот остаток остался незатронутым. В противном случае активность цитохрома с полностью утрачивается (Харбэри [94]).

Благоприятным обстоятельством является способность бромциановых фрагментов 1–65 и 66–104 образовывать функционально активный комплекс, в котором пептиды связаны между собой с помощью гема. Это свойство цитохрома с, обнаруженное Коррадин и Харбэри [95–97], используется в полусинтезе аналогов цитохрома с [94–110, 111] (см. также обзоры [3, 112, 113]).

Барстоу с соавт. [111] опубликовали первую работу по реконструкции пептидной связи между фрагментами 1–65 и 66–104 цитохрома с раскрытием цикла С-концевого лактона Hse⁶⁵, образующегося при бромциановом расщеплении исходной молекулы и обладающего слабой ацилирующей способностью. Никс и Варме реконструировали цитохром с из двух природных (1–65 и 81–104) и центрального синтетического (66–79) пептидов, присоединив предварительно Met⁸⁰ к пептиду 81–104 [107]. Основной задачей этой работы явилась разработка методологии полусинтеза: удалось подобрать условия, при которых различные алкил-оксикарбонилазиды селективно модифицируют ε-аминогруппы остатков лизина полипептидной цепи фрагментов цитохрома с, практически не затрагивая их α-аминогруппу (Ледден с соавт. [106]). В работах Никс и Варме [107], Бун с соавт. [103–105] по реконструкции цитохрома с основное внимание уделяется демонстрации пригодности для полусинтеза цитохрома с и его аналогов предложенной Тессер с соавт. щелочелазимной Msc-защитной группы, успешно проявившей себя в экспериментах с инсулином (см. обзоры [3, 112, 113]).

Харрис [114] обнаружил способность триптических фрагментов 1–38 и 39–104 цитохрома с образовывать функционально активный комплекс (пептиды в комплексе связаны с помощью гема). Аналогичной способностью обладают и N^ε-ацетимидоилированные фрагменты, что было использовано для получения аналогов фрагмента 39–104, имеющих замену в положении 39, и для получения функционально активных полусинтетических комплексов цитохрома с [115]. Для этого цитохром с подвергали полному ацетимидоилированию, затем его расщепляли трипсином и выделяли (N^ε-Acim)₁₂-фрагмент 39–104 цитохрома с. От этого фрагмента препаративной деградацией по Эдману отщепляли N-концевой остаток лизина и вместо него присоединяли другие аминокислоты с помощью N-оксисукцинимидных эфиров. Однако активность комплекса, образованного фрагментами 1–38 и 39–104, составляла всего 25% активности исходного белка. Невелика также и величина редокс-потенциала – 150 мВ (у исходного цитохрома с эта величина составляет 258 мВ, у ацетимидоилированного цитохрома с – 242 мВ [109]). Праудфут с соавт. предположили, что такое понижение активности связано с «неудачным» участком расщепления цитохрома с трипсином, в результате чего остаток аргинина, играющий, по мнению Праудфут с соавт. [115], важную роль в стабилизации комплекса, оказывается «не с той стороны» от участка расщепления. Для проверки своего предположения Праудфут с соавт., используя методы полусинтеза, получили из фрагментов 1–38 и 39–104 фрагменты 1–37 и 38–104 соответственно [115, 116]. Для этого от аце-

тимидоилированного фрагмента 1—38 с помощью карбоксипептидазы В отщепили С-концевой остаток Arg³⁸, а к N-концу ацетимидоилированного фрагмента 39—104 химической конденсацией с помощью N,N'-дициклогексилкарбодиймида в присутствии N-гидроксисбензотриазола присоединили остаток Вос-аргинина. После удаления Вос-защиты получали полусинтетический комплекс, образованный фрагментами 1—37 и 38—104. Для контроля были получены и другие полусинтетические аналоги указанных фрагментов (всего около 10 аналогов). Как и ожидалось, характеристики полусинтетического комплекса значительно улучшились: комплекс, образованный ацетимидоилированными по ε-аминогруппам фрагментами 1—37 и 38—104, обладает редокс-потенциалом 215 мВ и проявляет 55% биологической активности интактного цитохрома с.

Жюллерат и Хомандберг [117] подобрали условия, при которых цитохром с реконструируется с 30% выходом с помощью кластрипана (в 90% глицерине) из фрагментов 1—38 и 39—104.

Осуществление полусинтеза аналогов цитохрома с со всей очевидностью поставило вопрос о необходимости исследовать условия введения в белки защитных групп и их последующего удаления. Такая работа с цитохромом с проведена для Msc-группы [118] и Acim-группы [119, 120]. Ацетимидоилирование имеет преимущество перед блокированием Msc-группой, которое выражается в том, что блокированный Acim-группой белок полностью сохраняет все свойства нативного белка [119], поскольку положительный заряд на остатках лизина сохраняется. Обнаружено, что ацетимидоилирование белков необходимо проводить в течение 30—40 мин при pH ≥ 10,5, тщательно избегая даже непродолжительного резкого понижения pH в начальный момент реакции, иначе образуется большое количество трудноотделимых продуктов из-за ковалентных сшивок между остатками лизина (механизм этой побочной реакции подробно описан в работе [120]).

На примере полусинтетических экспериментов с цитохромом с Валлэс [121], Валлэс и Роус [122] разработали стратегию селективной модификации функциональных групп (гидроксильной группы тирозина, гуанидиновой группы аргинина) белковых молекул. Стратегия заключается в химической модификации не всего белка, а лишь одного из его фрагментов с последующей реконструкцией молекулы. Так, были получены аналоги цитохрома с с одним модифицированным остатком аргинина, в то время как второй остаток аргинина остается немодифицированным (молекула цитохрома с имеет два остатка аргинина в положении 38 и 91) [121, 122]. Ацетимидоилированный цитохром с обладает, как уже говорилось, полной активностью цитохрома с [119]. Это дало возможность Валлэс получить O-ацетилированный по остатку Tyr⁴⁸ цитохром с [121]. Остатки тирозина в молекуле цитохрома с распределены неравномерно. Большая их часть (три остатка) находятся в С-концевой части молекулы, и лишь один расположен в N-концевом бромциановом фрагменте 1—65. Валлэс выделил ацетимидоилированный фрагмент 1—65 цитохрома с, ацетилировал его по единственному в этом фрагменте остатку Tyr⁴⁸ и затем реконструировал молекулу цитохрома с конденсацией гомосериллактона фрагмента 1—65 с α-аминогруппой фрагмента 66—104. Если для модификации остатка тирозина в фрагменте 1—65 применить подиорвание, необходимость ацетимидоилировать фрагмент 1—65 отпадает [121].

Роус с соавт. использовали цитохром с как объект для отработки стратегии активации полипептидных фрагментов исключительно по α-карбоксильной группе [123]. Активированный эфир аминокислоты, имеющий свободную аминогруппу («защищенную» протонированием), присоединяется с помощью трипсина в водно-органической среде к С-концу белкового фрагмента. Таким образом получают фрагмент белка, удлинённый с С-конца на один аминокислотный остаток, карбоксильная группа которого активирована. Схема очень непривычна для полусинтеза и для пептидного синтеза. Тем не менее она реализована на примере полусинтеза аналога цитохрома с. К ацетимидоилированному фрагменту 1—38 цитохрома с с помощью трипсина присоединили 2,6-дихлорфениловый эфир

L-аланина. Реакцию осуществляли в водном 1,4-бутандиоле, рН реакционной среды 5,5 (верхний предел стабильности активированного эфира), время реакции 120 мин. Полученный активированный эфир аналога фрагмента 1—39, содержащего остаток аланина в положении 39, взаимодействовал в водной среде (рН 8,5) с ацетимидоилированным по ε-аминогруппам фрагментом 40—104 цитохрома с. Соответствующее производное цитохрома с было получено с выходом 45%. Фрагмент 40—104, предназначенный для полусинтеза, получали препаративной деградацией по Эдману ацетимидоилированного по ε-аминогруппам фрагмента 39—104. Разработанную методику получения полусинтетических активированных эфиров пептидов предложено использовать для присоединения к С-концу пептидов различных соединений, которые могут выполнять роль метки, цитотоксической группировки и т. д. [124].

Наметились подходы к получению полусинтетических аналогов апоцитохрома с [125, 126]. Получение апоцитохрома с и его аналогов стало возможным после того, как было установлено, что [Hse⁶⁵]лактон фрагмента 1—65 и фрагмент 66—104 апоцитохрома с из сердца лошади способны к ресинтезу с образованием [Hse⁶⁵]апоцитохрома с. Интересно, что ресинтез фрагментов имеет место только в присутствии третьего фрагмента: гемсодержащего пептида 1—25 цитохрома с [125].

IV. Миоглобин

10
20
30
40
50
60

1 VLSEGEWQLVLHVWAKVEADVAGHGQDILIRLFKSNPETLEKFDRFKHLKTEAEMKASED
61 LKKNHGVTVLTALGAILKKGHNHEAELKPLAQSHATKNKIPKYLEFISEAIIHVLSRNP
121 GNFGADAQGGAMNKALELFRKDIAAKYKELGYQG

Миоглобин кашалота

Полусинтез аналогов миоглобина проведен в основном на миоглобине кашалота (Sperm whale myoglobin) (см. ниже), хотя имеются работы и с миоглобинами из других источников, например из сердца лошади (Боррас-Гуэста с соавт. [127]). Миоглобин кашалота — однопочечный белок, не имеющий дисульфидных связей. Центральную часть молекулы занимает гем, который может быть обратимо удален из молекулы. Миоглобин, не содержащий гема, называется апомиоглобином.

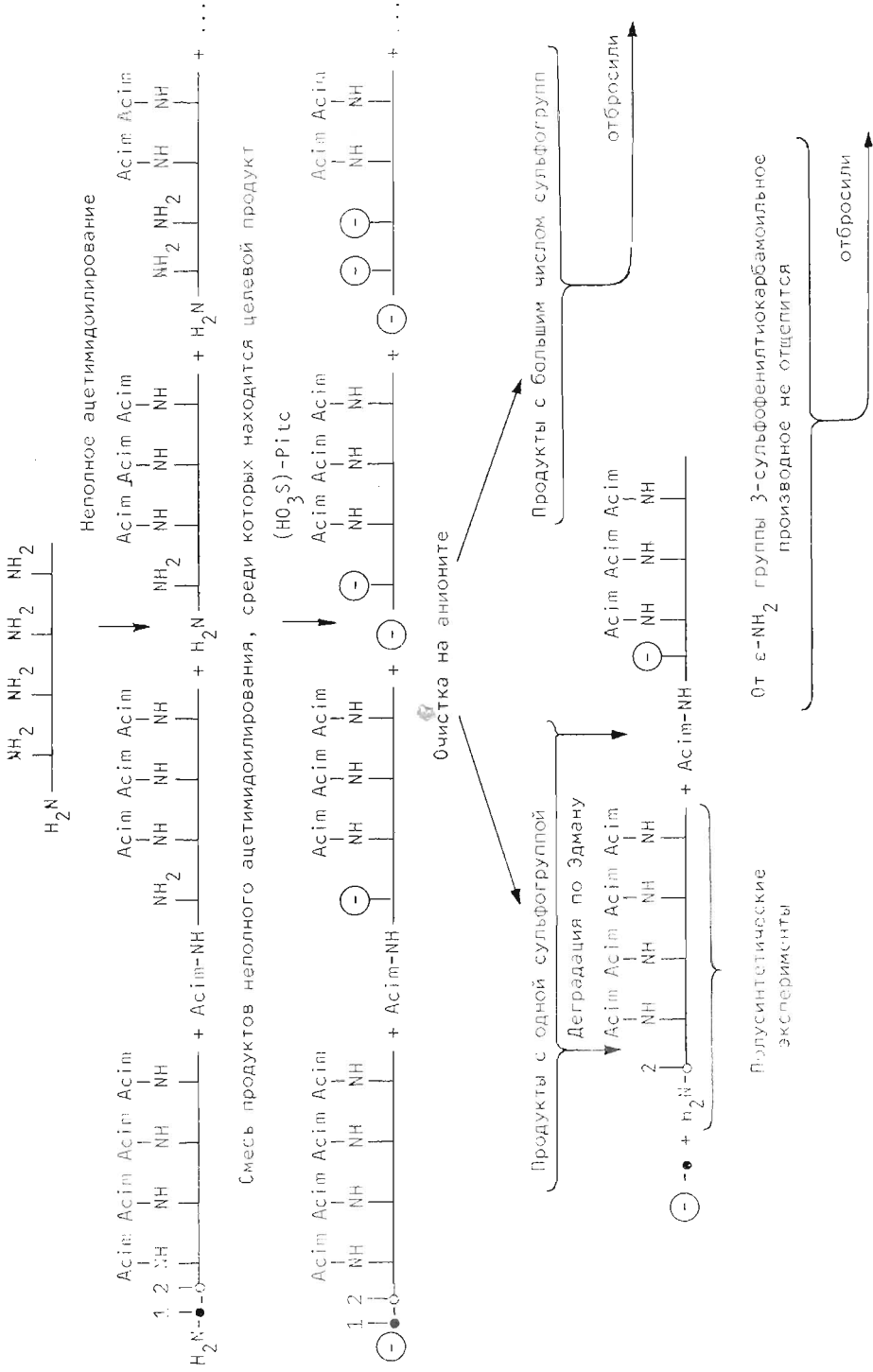
В равных работах с миоглобином Хагенмайер с соавт. [128] решали в основном вопрос о принципиальной возможности полусинтеза этого белка. Эти эксперименты окончились неудачей — не удалось удалить введенные в белок защитные группы, но полезность их для развития методологии полусинтеза несомненна.

Более успешными оказались работы, осуществляемые под руководством Гурда (см. ниже). Основной их целью было изучение N-концевого участка миоглобина введением в него ¹³C-меченых аминокислотных остатков и изучением полученных продуктов полусинтеза методом ЯМР-спектроскопии. Интерес к такого рода экспериментам объясняется тем, что состояние α-аминогруппы миоглобина является определяющим для конформационных изменений α-спирали А, в свою очередь приводящих к пертурбациям в спиновом равновесии атома железа, входящего в состав гема [129].

Гурд с соавт. [130], Ванг с соавт. [131] расщепляли апомиоглобин по остатку Trp¹⁴ с помощью BNPS-скатола, предварительно ацетимидоилировав все 20 аминогрупп белка. Таким путем получили (N^ε-Acim)₁₀-фрагмент 15—153 миоглобина, имеющий единственную неблокированную аминогруппу (α-аминогруппу остатка Ala¹⁵). Выделенный с выходом 60—70% фрагмент [131] использовали для получения различных полу-

Схема 3

АПОМИОГЛОБИН



Получение дез-Val¹-(N^ε-Asim)19-апомиоглобина. У целевого продукта первые две аминокислоты с N-конца отмечены кружками:
 ● - Val, ○ - Leu, ⊖ - 3-сульфобензилтиокарбамильное производное

синтетических аналогов миоглобина [130–138]. По ряду причин, прежде всего из-за плохой растворимости N-концевого фрагмента, реконструкцию миоглобина проводили в несколько стадий. Сначала (N^ε-Acim)₁₉-фрагмент 15–153 взаимодействовал с N-оксисукцинимидным эфиром N-защитенного триптофана. После удаления N^ε-защитной группы к (N^ε-Acim)₁₉-фрагменту 14–153 азидным способом присоединили синтетический пептид 6–13 и, наконец, пептид 1–6 [130]. С небольшими изменениями эта схема используется и в остальных работах этой группы авторов.

Иной подход к получению полусинтетических аналогов миоглобина кашалота реализовали Ди Марчи с соавт. [139–142]. Основной особенностью этого подхода является селективная модификация ε-аминогрупп лизина апомиоглобина метилацетимидатом с получением частично модифицированного белка, у которого блокированы все 19 ε-аминогрупп, но α-аминогруппа остается неблокированной. Решить такую, казалось бы, неразрешимую задачу удалось по схеме 3. Смесь продуктов неполного ацетимидоилирования апомиоглобина обработали большим избытком 3-сульфобензилизотиоцианата. Ионообменной хроматографией отделяли фракцию, содержащую одну сульфогруппу на молекулу белка. В смеси продуктов этой фракции лишь один модифицирован в α-положении, и именно у этого продукта все ε-аминогруппы блокированы ацетимидоильной защитой. Если обработать эту смесь трифторуксусной кислотой, то сульфобензилизотиоцианатильное производное отщепится только у интересующего нас производного апомиоглобина. Выделить из смеси дез-Val¹-(N^ε-Acim)₁₉-апомиоглобин сравнительно несложно, так как у остальных продуктов модификации сульфогруппа не отщепится. Успех такой двухэтапной очистки с помощью ионообменной хроматографии был обеспечен прежде всего тем, что для работы использовали приблизительно по 20 г исходного белка.

К очищенному дез-Val¹-(N^ε-Acim)₁₉-апомиоглобину методом активированных эфиров присоединяли Tfa-[¹⁴C]Gly и после деблокирования и введения гема получали аналог миоглобина, имеющий на N-конце [¹⁴C]глицин вместо валина. Такой аналог использовали для измерения pK α-аминогруппы белка методом ЯМР-спектроскопии [139]. Описанный подход был усовершенствован Ди Марчи с соавт. [141], которые повысили выход (N^ε-Acim)₁₉-миоглобина, подобрав условия модификации метилацетимидатом гемосодержащего белка.

V. Рибонуклеаза

10 20 30 40 50 60

1 KETA AAKFERQH MDSSTSAASSNYCNQMMKSRNLTKDRCKPVNTFVHESLADVQAVCSQ
61 KNVACKNGQTNCYQSYSTMSITDCRETGSSKYPNCA YKTTQANKHIVACEGNPYVPVHF
121 DASV

Рибонуклеаза из поджелудочной железы быка

Дисульфидные связи соединяют остатки 26–84, 40–95, 58–110 и 65–72.

Открытие в 1959 г. Ричардсом с соавт. способности рибонуклеазы А из поджелудочной железы сохранять полную ферментативную активность после расщепления субтилизинном связи Ala²⁰–Ser²¹ с образованием S-пептида и S-белка относится к одной из наиболее ярких страниц химии белка [143]. Часто полусинтетическими аналогами рибонуклеазы называют нековалентные комплексы, образованные между выделенными из природного фермента S-белком и химически синтезированным S-пептидом или его аналогами [144–150]. В настоящем обзоре такие образования определены термином «полусинтетические комплексы».

Работы по изучению полусинтетических комплексов рибонуклеазы

внесли большой удельный вклад в изучение белка, чем эксперименты по дальнейшей реконструкции пептидной связи между расщепленными фрагментами, которые проводились в основном для проверки различных схем полусинтеза на хорошо отработанной, легко тестируемой модели.

Рибонуклеазой S называют нековалентный комплекс S-пептида (1–20) и S-белка (21–124), образующийся после расщепления рибонуклеазы A субтилизинном и содержащий в качестве миноров продукты расщепления по связи Ser²¹–Ser²². Рибонуклеазой S' называют очищенный, не содержащий минорных примесей, нековалентный комплекс S-белка с S-пептидом (или его аналогом). Свыше 10 синтетических аналогов S-пептида и полученных на их основе аналогов рибонуклеазы S' описаны в первом обзоре по этой теме (Чайкен [150]), причем два полусинтетических комплекса — рибонуклеазу S' и ее дез-(16–20)-аналог удалось получить в кристаллическом виде.

Хозс с соавт. [151] использовали тот факт, что дез-(16–20)-аналог рибонуклеазы S' (комплекс между пептидом 1–15 и S-белком) обладает полной ферментативной активностью нативной рибонуклеазы, что важно для изучения роли остатка His¹² в формировании комплекса между S-пептидом и S-белком. Авторами было получено несколько аналогов пептида 1–15, содержащих замены в положении 12, например пептид, содержащий в этом положении остаток β-(4-пиридил)-L-аланина. Такие аналоги необходимы для изучения рибонуклеазы S методом ПМР. Структуру рибонуклеазы S изучали также с помощью метода ¹⁵N-ЯМР. Для этого был синтезирован пептид 1–15, содержащий в положениях 7, 11 и 12 ¹⁵N-меченые аминокислотные остатки [152].

Комория и Чайкен [144], используя данные рентгеноструктурного анализа рибонуклеазы S и метод компьютерной графики, смоделировали пространственную структуру аналога 15-членного S-пептида (1–15), которая, по их мнению, должна образовывать стабильный и энзиматически активный комплекс с S-белком. Молекула смоделированного пептида содержала остатки аланина во всех позициях, кроме Glu², Lys⁷, Phe⁸, Arg¹⁰, His¹² и Met¹³. Пептид был синтезирован твердофазным методом. Оказалось, что в присутствии 12-кратного избытка синтетического пептида его комплекс с S-белком проявляет 36% активности рибонуклеазы. Полусинтетические аналоги рибонуклеазы A с реконструированной пептидной связью получали как химическим, так и ферментативным путем. Хугерхаут с соавт. [153] модифицировали аминокислотные рибонуклеазы метилацетимидатом, причем полученное производное не обладало активностью. Расщеплением субтилизинном получили (N^ε-Acim)₈-S-белок, к которому ковалентно присоединяли различные аналоги S-пептида. Образовавшиеся после удаления защитных групп аналоги рибонуклеазы A были функционально активны.

Интересная схема реконструкции рибонуклеазы предложена Хугерхаут и Керлинг [154, 155]. Они синтезировали 20-членный аналог S-пептида (замены — Ile¹³ и Hse²⁰-лактол). Полусинтетический комплекс, образованный этим пептидом и S-белком, благодаря эффекту близкодества и умеренной ацилирующей способности гомосериллактола при длительной экспозиции спонтанно переходит в [Ile¹³, Hse²⁰]рибонуклеазу A. Степень превращения при этом невелика — 7% за 5 сут.

Иллюстрацией того, насколько неуниверсальны известные в настоящее время методы ферментативного синтеза белковых молекул из фрагментов, являются эксперименты по ферментативному синтезу рибонуклеазы. Хомандберг и Ласковски [143] проинкубировали рибонуклеазу S (рН 6,2) при различных концентрациях глицерина в присутствии субтилизина. При этом образовалась смесь ресинтезированных молекул, среди которых рибонуклеаза A была основным компонентом. В то же время все попытки синтеза аналога рибонуклеазы A из смеси дез-Ala¹⁸, Ala¹⁹-S-пептида и S-белка окончились неудачно.

В описанных выше экспериментах синтезу с помощью субтилизина подвергались фрагменты, образовавшие стабильный нековалентный комплекс. Смещение равновесия в сторону синтеза осуществляли термоди-

намически, добавлением в реакционную смесь органического растворителя. Хомандберг с соавт. [156, 157] осуществили ресинтез фрагмента S-пептида 1—15 из его синтетических фрагментов 1—10 и 11—15, используя стратегию, названную ими «кинетической ловушкой». «Кинетической ловушкой» в данном случае явился S-белок рибонуклеазы. Он способен образовывать нековалентный комплекс с продуктом ресинтеза — пептидом 1—15, в то время как пептиды 1—10 и 11—15 таких комплексов не образуют. Ресинтез пептида 1—15 осуществляли с помощью клострипайна в водном буфере при pH 6 в присутствии S-белка (фрагмент 21—124). При увеличении количества S-белка в реакционной смеси по отношению к исходным пептидам 1—10 и 11—15 выход целевого пептида увеличивается с 7 до 15%.

Ресинтез фрагмента 1—15 рибонуклеазы из пептидов 1—10 и 11—15 и получение различных аналогов этого фермента по описанной выше схеме часто используют как удобную модель для изучения условий реконструкции пептидной связи по ряду причин, основной из которых является способность пептида 1—15 к образованию функционально активного комплекса с S-белком. Кроме того, этот пептид имеет единственный для рибонуклеазы остаток аргинина Arg¹⁰, что позволяет расщеплять его аргининспецифическими протеиназами.

Примером «твердофазного полусинтеза» пептида 1—15 рибонуклеазы из фрагментов 1—10 и 11—15 является работа Ди Белло с соавт. [158]. Карбоксильные группы пептида 1—10, выделенного из природного белка, полностью метилировали с помощью диазометана. Затем α -карбоксильную группу пептида селективно деблокировали трипсином. (Обзор работ по использованию трипсина для этой цели см. в [1, с. 72, 86].) Полученный пептид 1—10 трифторацетилювали по аминок группам и затем конденсировали с синтетическим фрагментом 11—15, закрепленным на полимерном носителе. Обработкой безводным фтористым водородом пептид отщепляли от полимерного носителя; метиловые эфиры остатков Glu² и Glu⁹ гидролизовали одновременно со снятием Tfa-защиты аминок групп обработкой 1 М пиперидином.

Несколько обособленно от уже описанных примеров находятся работы по получению полисинтетических комплексов рибонуклеазы, имеющих расщепленную пептидную связь в C-концевой части молекулы [159—166]. В C-концевом фрагменте рибонуклеазы имеется участок, ответственный за связывание 2',3'-циклических фосфатов цитидина или уридина. Детальное изучение этого участка стало возможным после того, как Лин с соавт. [159, 160], Гутте с соавт. [161] обнаружили, что ферментативно неактивный фрагмент 1—118 рибонуклеазы способен образовывать комплекс с перекрывающимся по последовательности 14-членным синтетическим пептидом (фрагмент 111—124 рибонуклеазы), полностью восстанавливая при этом ферментативную активность. 30% активности сохраняет нековалентный комплекс, состоящий из трех пептидов: S-пептида, фрагмента 21—118 и перекрывающегося с этим фрагментом по последовательности пептида 111—124 [159]. Серия работ по получению нековалентных полусинтетических комплексов позволила прояснить роль конкретных аминокислотных остатков в формировании комплекса и в связывании субстрата. Так, например, остаток Phe¹²⁰ заменяли на остатки Leu [160], Tyr и Ala [162]. Во всех случаях обнаружено резкое падение активности комплекса фрагментов 1—118 и 111—124, причем в случае замены Phe¹²⁰ на Leu¹²⁰ константы Михаэлиса для связывания субстрата — цитидин-2',3'-циклофосфата почти не отличаются, т. е. стадия связывания субстрата не ответственна за понижение активности. Замена Ser¹²³ на Ala [163] устраняет любую возможность образования связи между этим остатком и протоном аминок группы в положении 4 цитозинового кольца в цитидин-2',3'-циклофосфате или карбонилем в соответствующем положении уридин-2',3'-циклофосфата. Ожидаемого резкого сжижения константы связывания субстрата не произошло: комплекс имеет полную активность по отношению к уридин-2',3'-циклофосфату.

Ряд работ [164—166] посвящен выяснению роли остатка His¹¹⁹ в фор-

мировании нековалентного полусинтетического комплекса пептидов 1—118 и 111—124. Остаток гистидина заменяли аналогами His, в том числе и метилированными в различные положения имидазольного кольца производными гистидина. Полученные комплексы изучали методом ПМР. Досгер с соавт. [167, 168] определили методом ПМР рК всех остатков гистидина (His¹², His¹⁰⁵, His¹¹⁹) в комплексе фрагментов 1—113 и 111—124 рибонуклеазы и на основании полученных данных сделали вывод о том, что пространственное окружение этих остатков неотличимо от их окружения в интактной рибонуклеазе.

Полусинтетический комплекс фрагментов 1—118 и 111—124 получен в кристаллическом виде. Методом рентгеноструктурного анализа установлена его пространственная структура и показано, что различие в расположении аминокислотных остатков в комплексе и интактном белке минимальны (за исключением остатка His¹¹⁹, имеющего в комплексе иную конформацию) [169]. В этой же публикации сообщается (со ссылками на ранее опубликованные данные) о том, что получены кристаллы хорошего качества полусинтетического комплекса фрагментов 1—118 и 111—124, содержащих в структуре Leu¹²⁰ или Asn¹²¹.

Помимо изучения полусинтетических аналогов рибонуклеазы и ее полусинтетических нековалентных комплексов имеется работа Сарасвати и Кейс [13, 14] по использованию рибонуклеазы А для получения «полусинтетического фермента», обладающего эстеразной и амидазной активностью. Термин «полусинтетические ферменты» используется для определения предмета обособленной, перспективной серии исследований, целью которых является конструирование ферментов с заданной активностью химической модификацией белковых молекул, ранее такой активностью не обладавших.

VI. Стафилококковая нуклеаза

10 20 30 40 50 60

1 ATSTKKLHKERATLIKAIDGDTYKLMYKGPMTFRLLLVDTPETKHPKKGVEKYGREASA
61 FTKKMVENAKKIEVEFNKGRQRTDKYGRGLAYIYADGKMVNEALVROGLAKVAYVYKPNNT
121 HEQHRLRKSEAQAQKKEKLNWSENDAADSGQ

Стафилококковая нуклеаза (Foggi)

Стафилококковая нуклеаза, как и бычья панкреатическая рибонуклеаза, является одним из наиболее хорошо изученных ферментов. Это второй белок, для которого была обнаружена способность образовывать функционально активные нековалентные комплексы между фрагментами. Ограниченный трипсинолиз в присутствии специфического ингибитора (тимидин-3',5'-дифосфата) приводит к образованию функционально неактивных фрагментов, из которых два фрагмента — 6—48(49) (фрагмент P₂) и 49(50)—149 (фрагмент P₃) — способны к образованию комплекса — нуклеазы Т, обладающего 8% активности интактной нуклеазы [170].

Рекомбинация синтезированного твердофазным методом фрагмента P₂ с природным фрагментом P₃ привела к получению нуклеазы Т с очень низким выходом. Тем не менее твердофазным методом синтезирована серия аналогов фрагмента P₂, позволившая качественно оценить роль тех или иных остатков в образовании нековалентного комплекса и функционировании нуклеазы Т [1, с. 158].

С целью большей доступности фрагмента P₂ он был получен полусинтетически. Ди Белло [171] использовал тот факт, что этот фрагмент имеет только один остаток аргинина (Arg³⁵). После серии контрольных экспериментов с синтетическими пептидными фрагментами нуклеазы [170] природный фрагмент блокировали трифторацетилированием и обработ-

кой фенилдиазометаном этерифицировали все карбоксильные группы этого фрагмента. Затем модифицированный полипептид расщепили трипсином по остатку Arg³⁵ и выделили фрагмент 6—35, у которого защищены все амино- и карбоксильные группы, за исключением С-кошцевой карбоксильной группы. Этот фрагмент конденсировали с синтезированным твердофазным методом и все еще присоединенным к полимерному носителю пептидом 36—47 фрагмента Р₂ нуклеазы. Деблокирование сначала безводным фтористым водородом, а затем 1 М пиперидином приводит к образованию фрагмента 6—47 нуклеазы. Выход нуклеазы Т из полусинтетического фрагмента Р₂ очень мал, но все же он выше, чем при получении нуклеазы Т из полностью синтетического фрагмента Р₂ (см. также [1, с. 182]).

Хомандберг и Чайкен обнаружили, что в присутствии трипсина в 90% глицерине фрагменты 6—48 и 49—149 стафилококковой нуклеазы взаимодействуют друг с другом с образованием дез-Lys⁴⁹-фрагмента 6—149, проявляющего 0,5% активности исходного фермента [172]. Таким образом, неожиданно для авторов получена информация о свойствах аналога стафилококковой нуклеазы с укороченным участком 44—53 полипептидной цепи, расположенным в непосредственной близости от активного центра фермента [172]. Однако основная цель работы — реконструкция фрагмента 6—149 не была решена. Это свидетельствует о неуниверсальности используемых в настоящее время методов ферментативного ресинтеза и непредсказуемости результатов экспериментов.

Комория с соавт. [173] получили полусинтетический аналог нуклеазы Т путем ферментативной конденсации фрагментов — синтетического фрагмента 6—49, имеющего остаток глицина в положении 48, и природного фрагмента 50—149. Конденсацию проводили с помощью трипсина в 90% глицерине. Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре длительное время — до 20 сут. Выход целевого продукта не превышал 40%.

VII. Соматотропин

10 20 30 40 50 60

1 FPTIPLSR¹⁰LF²⁰DNAMLR³⁰AHRLH⁴⁰QLAFD⁵⁰TYQ⁶⁰EFEEAYIPKEQKYSFLQNPQ⁷⁰TSLCFSES⁸⁰IPT⁹⁰

61 PSNREETQ⁷⁰QKSNL⁸⁰QLLRISLLLIQSWLEPVQFLRSV⁹⁰FANSLVYGASNSD¹⁰⁰VYDLLKDL¹¹⁰ELEG¹²⁰

121 IQTLMGRLE¹³⁰DGSPRTGQ¹⁴⁰IFKQTISKEDTNSHNDDALLKNYGLLYCF¹⁵⁰RKDM¹⁶⁰DKVETELR¹⁷⁰IV¹⁸⁰

181 QCRSVEGSCGF

Соматотропин человека

Человеческий соматотропин, белковый гормон, стимулирующий ростовую активность, имеет полипептидную цепь длиной 191 аминокислотный остаток.

Молекула имеет два дисульфидных мостика: Cys⁵³—Cys¹⁶⁵ и Cys¹⁸²—Cys¹⁸⁹. При ограниченном расщеплении плазмином и последующей обработке подацетамидом восстановленных фрагментов получают карбамидометилированные фрагменты: 1—134 и 140—191. Ли с соавт. [174—177] показали, что эти пептиды способны образовывать функционально активный комплекс, и провели серию экспериментов по получению и изучению полусинтетических комплексов соматотропина. В этих комплексах природный фрагмент 1—134 соматотропина взаимодействует с синтетическими фрагментами — аналогами С-концевой части молекулы гормона (фрагменты 140—191, 145—191, 140—182, 141—191 и т. д.). Синтез пептидов осуществляли твердофазным методом, причем, так как было установлено, что для проявления тестируемой активности остатки Cys¹⁶⁵, Cys¹⁸², Cys¹⁸⁹

не важны, их заменяли в более поздних работах на остатки аланина; остаток Met¹⁷⁹ был заменен на остаток норлейцина [175]. Тем самым снимались проблемы, возникающие при химическом синтезе пептидов, с которыми пришлось столкнуться в ранних работах по этой теме [174]. В результате проведенных экспериментов было установлено, что укороченный С-концевой компонент 145–191 образует с фрагментом 1–134 комплекс (145–191)·(1–134), который обладает полной ростстимулирующей активностью и почти полной иммунореактивностью соматотропина. Получить активный комплекс фрагмента 1–134 с пептидом 140–182 соматотропина не удалось. Важно отметить, что при осуществлении полусинтеза соматотропина удельный вклад пептидного синтеза является доминирующим.

Граф и Ли [178] осуществили реконструкцию ковалентной связи между восстановленными и карбамидометилированными тромбиновыми фрагментами 1–134 и 135–191 человеческого соматотропина с помощью тромбина в 90% глицерине. Выход карбамидометилированного соматотропина составил приблизительно 20% (по данным гель-электрофореза).

Недавно установлена пространственная структура соматотропина [179]. Оказалось, что соматотропин имеет уникальное расположение α -спиралей, не встречавшееся ранее в других белках. Появление информации о пространственной структуре соматотропина позволит, по-видимому, объяснить, почему разрушение двух дисульфидных связей не приводит к существенному изменению тестируемой активности белка и его полусинтетических аналогов.

VIII. Фосфолипаза A₂

1 — E E G I S S R A L W Q F E R S M I K C A I P G S H P L M D F N N Y G C Y C G L G G S G T P V N E L N R C E N T D N C Y R D
 61 A K N L N D S C K F L V D N P Y T E S Y S Y C S S N T E I T C N S K N N A C E A F I C N D R N A A I C F S K A P Y N K E
 121 H K N L N T K K Y C

В приведенной структуре профосфолипазы A₂ из поджелудочной железы свиньи дисульфидные связи соединяют остатки 18–83, 34–130, 36–51, 57–111, 68–98 и 91–103.

Фосфолипаза A₂ специфически катализирует гидролиз сложноэфирной связи в положении 2 в 3-*sn*-фосфоглицеридах. Фермент широко распространен в природе. Наиболее часто он встречается в змеиных ядах и в поджелудочной железе млекопитающих. В последнем источнике этот фермент секретируется как зимоген — профосфолипаза A₂, который после отщепления N-концевого гептапептида превращается в активный фермент. Для обозначения фрагментов фосфолипазы и аминокислотных остатков ниже используется нумерация остатков зимогена.

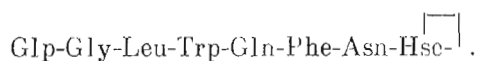
К настоящему времени известны аминокислотные последовательности свыше 30 различных фосфолипаз A₂ и для двух из них установлена пространственная структура (см. ссылки в [17]).

Несмотря на то что в общих чертах механизм действия фосфолипазы A₂ известен, оставалось непонятным, почему она проявляет высокую активность лишь на поверхности мембраны. Полусинтетические эксперименты с фосфолипазой A₂ позволили получить аналоги фермента, имеющие вариации в N-концевой части молекулы — месте его предполагаемого связывания с липидным слоем. В результате предложена модель формирования активного центра фосфолипазы A₂ при ее взаимодействии с мембраной [180]. На рисунке приведен принцип полусинтетических экспериментов, последовательности некоторых полусинтетических аналогов фосфолипазы A₂ и фрагменты белка, из которых они были получены. Приведены также фрагменты фосфолипазы A₂, полученные препаратив-

Более продолжительная обработка ацетимидоилированной по ε-аминогруппам свиной фосфолипазы A₂ трипсином приводит к отщеплению N-концевого пептида 8—13 и (N^εAcim)₈-фрагмента 14—129 фосфолипазы A₂ [184]. Кроме того, как свиную, так и бычью фосфолипазу A₂ расщепляли с помощью бромциана по остатку Met¹⁵ с образованием пептида 8—15 и (N^εAcim)₈-фрагмента 16—129 фосфолипазы A₂ [184]. Полученные фрагменты использовали для получения полусинтетических аналогов фосфолипазы A₂ (рисунок).

Пептиды, предназначенные для присоединения к N-концу фрагментов фосфолипазы A₂, синтезировали твердофазным методом [180—184]. После деблокирования безводным фтористым водородом и очистки пептиды деблокировали по аминокетонам с помощью (Вос)₂O (при отщеплении пептида от полимерного носителя происходит одновременное деблокирование аминокетона, которые приходится вновь блокировать). Индолное кольцо триптофана Trp¹⁰ в ходе этих обработок постоянно блокировано введенной в ходе синтеза пептида формильной группой. Эту защитную группу удаляли с помощью 1 М NaHCO₃ (рН 9) уже после присоединения синтезированного пептида к ацетимидоилированному по ε-аминогруппам фрагменту 14—129 (или 16—129). Конденсацию осуществляли с помощью смешанных ангидридов по методике Найтани с соавт. [87], предложенной для получения полусинтетических аналогов инсулина (смешанные ангидриды пептидов реагируют с фрагментом белка в водно-органической среде при рН 7—7,5). Таким путем было получено более 10 полусинтетических аналогов фосфолипазы A₂, изучение свойств которых наряду с изучением свойств триптического фрагмента 14—129 фосфолипазы A₂ из поджелудочной железы свиньи, бромцианового фрагмента 16—129 фосфолипазы A₂ из поджелудочной железы быка и продуктов препаративной деградации по Эдману позволило создать целостную картину функционирования активного центра белка.

В 1981 г. Кихара с соавт. [185] сообщили о том, что фосфолипаза A₂ из яда кобальголовой змеи хабу (*Trimeresurus flavoviridis*) расщепляется бромцианом на два фрагмента, способных образовывать стабильный нековалентный функционально активный комплекс, причем меньший по величине фрагмент представляет собой N-концевой октапептид:



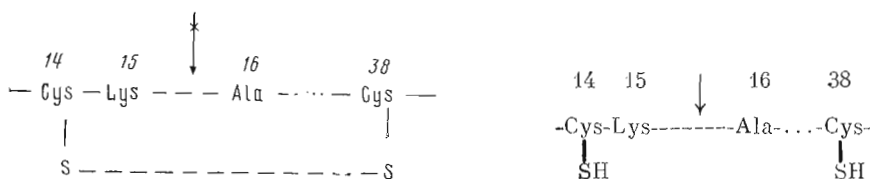
Совершенно очевидно, что осуществление полусинтетических экспериментов в данном случае сталкивается с ограниченной доступностью источника. Аналогичная работа была проделана с фосфолипазой A₂ из поджелудочной железы техасского гремучника *Crotalus atrox* [186]. В этом случае также образуются два фрагмента, причем меньший по величине фрагмент является N-концевым 10-членным пептидом. Однако фрагменты этого белка не способны образовывать ферментативно активный нековалентный комплекс.

IX. Ингибиторы протеиназ

	10	20	30	40	50	60
1						
	DFVLDNEG	NPLENG	GTYI	LSDITAF	GGIRAA	PTGNERC
	PLTVV	QSRNEL	DKGIG	TIISP		
61	SYRIRFIAEGHPLSLKFDFAVIMLCVGIPTWSVVEDLPEGPAVKIGENKDAMDGVFRL					
121	ERVSDDEFNNYKLVFCPQQAEDDKCGDIGISIDDDGHTRRLLVSKNKPLVVQFQKLDKES					
181	L					

Соевый трипсиновый ингибитор (СТИ). Дисульфидные связи соединяют остатки 39—86 и 136—145

ПТИ — небольшая молекула, построенная из 58 аминокислотных остатков, имеющая три дисульфидные связи 5—55, 14—38, 30—51 и отличающаяся повышенным содержанием основных аминокислот — лизина и аргинина. Особенностью этого ингибитора является то, что пептидная связь в области реактивного участка расщепляется только после восстановления дисульфидной связи Cys¹⁴—Cys³⁸ [193]:



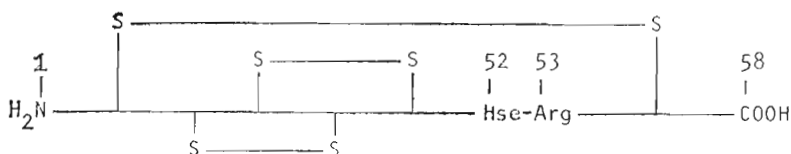
не расщепляется трипсином, сильный ингибитор расщепляется трипсином с потерей ингибирующей активности

Осуществлению полусинтеза аналогов ПТИ предшествовала много-стадийная работа по получению белка с расщепленной связью Lys¹⁵—Ala¹⁶ и реконструированным дисульфидным мостиком, связывающим фрагменты 1—15 и 16—58 (см. ссылки в [193]):



Далее по схеме, использованной Ласковски для СТИ [188], остаток Lys¹⁵ отщепляли карбоксипептидазой В и заменяли его на остаток Arg с использованием того же фермента или на остаток Phe или Tgr (с использованием свиной карбоксипептидазы А) при смещении равновесия в сторону синтеза с помощью органического растворителя. Последующая реконструкция пептидной связи с помощью трипсина (α -химотрипсина) приводит к получению полусинтетических активных аналогов ингибитора.

Дайкс с соавт. [194—196] обнаружили, что пептидная связь, расщепленная бромцианом по остатку Met⁵² в ПТИ, способна к самопроизвольному ресинтезу с образованием Hse⁵²-аналога ПТИ (см. также обзор по полусинтезу ингибиторов протеиназ [1, с. 189—192]):



Бионди с соавт. [197] получили полусинтетический ПТИ, содержащий синтетический 12-членный пептид в N-концевой части молекулы. ϵ -амино-группы расщепленного по связи Lys¹⁵—Ala¹⁶ ПТИ необратимо блокировали гуанидированием. При этом α -аминогруппы Arg¹ и Ala¹⁶ ПТИ модификации почти не подвергаются. После восстановления дисульфидных связей расщепленный ПТИ разделили на N^ε-гуанидированный фрагмент 16—58 и фрагмент 1—15. По свободной α -аминогруппе к фрагменту 16—58 азидным методом присоединили синтетический пептид, соответствующий последовательности 4—15 ПТИ. Удалением защитных групп и реконструкцией дисульфидных связей получили дез-(1—3)-ПТИ, проявляющий после очистки 40—50% активности природного ПТИ.

Большое практическое значение имеют, по-видимому, работы Чеше с соавт. [198]. Предложив общую методику замещения остатка лизина в положении Р₁ реактивного участка ПТИ природными и непротеино-генными аминокислотами, эта группа исследователей применила ее для полусинтеза трипсинового ингибитора аprotинина. Известно, что апро-

тини является сильным ингибитором трипсина, но не ингибирует химо-трипсин и эластазу. Заменой остатка Lys¹⁵ в апротинине на остаток валина удается резко изменить специфичность ингибитора, который становится мощным ингибитором эластазы. Таким образом, по мнению Чеше с соавт. [198], появляется возможность лечить болезни, связанные с деструктивным потенциалом эластазы лейкоцитов.

Х. Другие белки

Х.1. Ферредоксин

Ферредоксин — железосодержащий белок из бактерий, водорослей и некоторых растений. Атом железа связан не в геме, а с остатком цистеина белка и неорганической серой в виде иона гидросульфида. Это наиболее электроотрицательный из всех ферментов, известных в настоящее время. Он участвует в процессах фотосинтеза, фиксации азота, восстановления сульфата и других окислительно-восстановительных процессах. В ферредоксинах практически нет основных аминокислот. Например, ферредоксин из *C. acidi-urici* представляет собой пептидную цепь из 55 аминокислотных остатков:



Он не содержит дисульфидных связей и остатков лизина и имеет один остаток аргинина, в то время как суммарное количество остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот равно девяти.

Ферредоксин из *C. butyricum*, также состоящий из 55 аминокислотных остатков, не имеет ни остатков лизина, ни остатков аргинина, тогда как количество кислых аминокислотных остатков равно семи. Отсутствие остатков лизина упрощает получение полусинтетических аналогов ферредоксина. Остатки цистеина, содержание которых в ферредоксинах обычно равно 8—9 на молекулу белка, «блокируют» окислением с образованием дисульфидных связей.

Исчерпывающие сведения по полусинтезу ферредоксина из различных бактерий приводит Офффорд в своих обзорах [1, с. 168, 180], [9]. В настоящем сообщении можно ограничиться кратким изложением проведенных экспериментов, основанным на работах, обсуждаемых в указанных обзорах.

Хонг и Рабинович (1970) получили 5 аналогов ферредоксина присоединением производных аминокислот по единственной аминогруппе белка.

Лоуд с соавт. (1973) препаративной деградацией по Эдману отщепляли 1—2 аминокислотных остатка в N-концевой части ферредоксина из *C. acidi-urici* и заменяли их на другие аминокислотные остатки.

В дальнейшем полусинтезы аналогов ферредоксина были предприняты с целью изучения роли инвариантного для гомологичных белков остатка Tyr². Кроме продуктов деградации по Эдману двух N-концевых аминокислот в полусинтезах использован также и аналогичный продукт расщепления ферредоксина из *Clostridium m-e* α -химотрипсином по остатку Tyr² (Лоуд с соавт., 1974). В результате экспериментов (в основном работы Лоуд) показано, что для нормального функционирования ферредоксина нет необходимости иметь в положении 2 остаток ароматической аминокислоты. Для поддержания стабильности железосвязывающего кластера достаточно, чтобы остаток был объемным [1, с. 169].

Х. 2. Ацилпереносящий белок *Escherichia coli* E-26) (АПБ)

10 20 30 40 50 60
1 STIEERVVKKIIGEQLGVKQEEVTDNASFVEDLGDADSLDTVELVMALEEEFDTEIPDEEAE
61 KITGVQAAIDYINGHQA

Ацилпереносящий белок (АПБ) — небольшой, кислый, термостабильный белок, выделенный из системы синтеза жирных кислот *E. coli* и других бактерий. Определена первичная структура АПБ из *E. coli* [17]. Через остаток Ser³⁶ белок связан с тиолсодержащей фосфоантетеиновой группировкой, которую ацилируют ацилсубстраты с образованием тиоэфиров с целью использования их для наращивания углеводородной цепи жирной кислоты.

Престиж с соавт. [199] использовали тот факт, что полностью ацетилированный белок сохраняет биологическую активность. АПБ ацетилировали по имеющимся у него аминогруппам (α -аминогруппа и три ϵ -аминогруппы остатков лизина), предварительно блокировав SH-группировку с помощью 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойной кислоты) — широко распространенного SH-реагента. Далее белок расщепляли трипсином по единственному остатку Arg⁶ и к образовавшемуся фрагменту 7–77 присоединяли ацетилированный синтетический пептид, соответствующий последовательности 1–6 АПБ.

Привлекает внимание использованная схема синтеза активированного эфира гексапептида 1–6. Пептид Ac-Ser-Thr-Ile-Glu(ONb)-Glu(ONb)-Arg(NO₂)-ОН синтезировали твердофазным методом. Затем активировали карбоксильную группу пептида превращением ее в пентахлорфениловый эфир. После этого гидрированием над палладиевой чернью в смеси метанола с уксусной кислотой (9 : 1) получали пептид Ac-Ser-Thr-Ile-Glu-Glu-Arg-OPsr. Конденсация этого пептида с фрагментом 7–77 привела к полусинтетическому аналогу АПБ, проявляющему 71% активности исходного белка. Приведенные авторами методы контроля доказывают, что защитные группы пептида после гидрирования полностью удаляются и что активированный эфир при этом не расщепляется (хотя часть атомов хлора в остатке пентахлорфенола замещается на водород). Возможность перэтерификации активированного эфира на карбоксилы остатков глутаминовой кислоты не обсуждается.

Х.3. Парвальбумин III из белых мышц щуки (*Esox lucius*)

Парвальбумины — небольшие кальцийсвязывающие белки, содержащиеся в мышцах позвоночных. Дисульфидных связей белки не имеют. Их пространственная структура сформирована плотной упаковкой шести α -спиральных участков (A–F), между которыми в соединяющих петлях расположены два участка связывания кальция (CD- и EF-кальцийсвязывающие домены, соответствующие участкам 38–74 и 75–108). Высокая степень гомологии между кальцийсвязывающими доменами парвальбумина и аналогичными структурами других кальцийсвязывающих белков послужила доводом в пользу гипотезы о существовании гипотетического предшественника кальцийсвязывающих белков, соответствующего по размеру одному кальцийсвязывающему домену [200].

Экспериментальная проверка этой гипотезы, осуществленная под общим руководством Митина [201], представляет собой, по-видимому, первый пример синтеза белка, сконструированного на основе компьютерных расчетов. При осуществлении этой работы стало ясно, что для понимания особенностей строения кальцийсвязывающих белков (прежде всего для выявления факторов, обеспечивающих сворачивание полипептидной цепи в структуру « α -спираль — петля — α -спираль») необходима дополнительная информация, получить которую можно, изучив свойства полусинтетических фрагментов кальцийсвязывающих белков. Для полусинтеза был выбран парвальбумин III из белых мышц щуки (*Esox lucius*).

1
10
20
30
40
50
60
 Ac—AKDLLKADDIKKALDAVKAEGSPNKKFFALVGLKAMSANDVKVFKAIDADASGFIEEE
 61 ELKPFVLKSFADGRDLTDAETKAFLKAADKDGDKIGIDEFETLVHEA

Белок имеет удобные участки расщепления полипептидной цепи (Met³⁸, Arg⁷⁴). Это позволяет планировать эксперименты как с однодоменным кальцийсвязывающим фрагментом 75—108, так и с фрагментом 38—108, содержащим оба кальцийсвязывающих домена.

Парвальбумин модифицировали различными защитными группами [202]. Выбор был остановлен на Boc- и Acim-группах. Так как после ацетимидоилирования остатков лизина положительный заряд сохраняется, была изучена способность модифицированного белка и его фрагментов связывать ионы кальция. Оказалось, что (Acim)₁₈-парвальбумин, (N^e-Acim)₁₄-фрагмент 1—74 и (N^e-Acim)₁₀-фрагмент 38—108 связывают кальций даже несколько лучше, чем их немодифицированные аналоги. Ацетимидоилированный фрагмент 75—108 парвальбумина полностью теряет способность связывать ионы кальция [202]. Для получения полусинтетических аналогов фрагмента 75—108 (EF-домена) парвальбумин модифицировали Boc-группой по остаткам лизина и полученный (Boc)₁₈-парвальбумин расщепляли трипсином по единственному остатку аргинина Arg⁷⁴. (N^e-Boc)₄-фрагмент 75—108 парвальбумина выделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-75. Затем к N-концу этого фрагмента присоединяли остатки различных аминокислот [204, 205]. Дело в том, что при расщеплении белка трипсином происходит разрушение инвариантной для всех парвальбуминов структуры: солевого мостика между остатком Arg⁷⁴ и Glu⁸⁰. Если присоединить к N-концу фрагмента 75—108 остаток Arg, то получится EF-домен, у которого эта структура реконструирована. Поэтому представлялось интересным выяснить, насколько изменится при этом свойства EF-домена. Оказалось, что константа связывания кальция возрастает на порядок [204].

Присоединение вместо аргинина остатка аланина почти не изменяет кальцийсвязывающих свойств, а присоединенный к N-концу EF-домена остаток триптофана не позволяет измерить константу связывания кальция методом собственной флуоресценции, так как спектр флуоресценции триптофана не реагирует на титрование ионами кальция, маскируя при этом изменение флуоресценции остатков фенилаланина в EF-доме. В то же время остаток триптофана, присоединенный к N-концу (N^e-Acim)₁₀-фрагмента 38—108, реагирует на титрование ионами кальция и отчетливо демонстрирует наличие гидрофобного ядра у двухдоменного фрагмента парвальбумина [205]. В методическом отношении полусинтез с фрагментами парвальбумина интересен тем, что в ряде случаев для полусинтеза использовали растворимые в воде 2-нитро-4-сульфобензиловые эфиры аминокислот, что позволило осуществлять реакции в чисто водных растворах, без добавления органических растворителей.

В результате проделанной работы стало ясно, что при проведении компьютерных расчетов аминокислотной последовательности эволюционного предшественника кальцийсвязывающих белков допущено «смещение рамки», в результате чего N-концевая α-спираль предшественника оказалась слишком короткой и не содержала важного, как оказалось, элемента структуры на N-конце молекулы.

Х.4. Фрагмент F_v молекулы антитела к белку 315 миеломы мышей

Гавиш с соавт. [206, 207] осуществили твердофазный синтез 115-членной полипептидной цепи — переменной области (V_L) антитела к белку 315 миеломы мышей. После отщепления белка от полимерного носителя и деблокирования единственную дисульфидную связь формировали восстановлением в 8 М мочевины. После очистки аффинной хроматографией из синтетической полипептидной цепи V_L и природной

цепи V_H получили нековалентный ассоциат (разбавление буфером раствора смеси фрагментов в 8 М мочеvine). Показано, что полученный полусинтетический нековалентный ассоциат по свойствам идентичен природному фрагменту F_V (фрагменту антитела, составленному из переменных областей легкой и тяжелой цепи). Эта работа — первый пример перспективного направления — получения полусинтетических антител.

Х.5. α-Цепь человеческого гемоглобина

	10	20	30	40	50	60
1						
V L S P A D K T N V K A A W G K V G A N A G E Y G A E A L E R M F L S F P T T K T Y F P H F D L S H G S A Q V K G H G K						
61 K V A D A L T N A V A H V D D M P N A L S A L S D L H A N K L R V D P V N F K L L S H C L L V T L A A H L P A E F T P A						
121 V H A S L D K F L A S V S T V L T S K Y R						

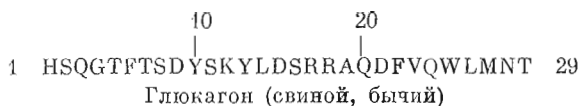
Появились работы по получению полусинтетических аналогов гемоглобина на основе его α-цепи. Наметились два подхода к получению полусинтетических аналогов α-цепи.

Первая группа исследователей (Харрис с соавт., Лайл с соавт., Хефта с соавт. [208—211]) развивает для получения аналогов α-цепи гемоглобина отработанную на миоглобине схему отщепления N-концевой аминокислоты и замены ее на различные аминокислотные остатки. Методически эту работу удается осуществить проще, чем с миоглобином, так как оказалось, что обработка α-цепи гемоглобина небольшим избытком 3-сульфофенилизотиоцианата приводит к преимущественной модификации N-концевой α-аминогруппы [211]. Полусинтетические аналоги α-цепи ассоциировали с гемсодержащими β-цепями с образованием соответствующих ди- и тетрамеров. Основная цель этих исследований — разработка методов селективного введения меченых аминокислот в N-конец α-цепи гемоглобина для последующего изучения полусинтетических аналогов гемоглобина с помощью ЯМР-спектроскопии.

Вторая группа исследователей (Ситхарам, Ачария, Айер с соавт. [212—214]) использует в своей работе с α-цепью обнаруженную ими способность глутаминовой протеиназы из *Staphylococcus aureus* V8 селективно расщеплять α-цепь гемоглобина по связи Glu³⁰—Arg³¹ с образованием фрагментов 1—30 и 31—141. Интересно, что специфичность расщепления α-цепи зависит от концентрации органического растворителя — пропанола [214]. По мнению авторов, органический растворитель изменяет конформацию α-цепи и таким образом как бы имитирует присутствие β-цепи гемоглобина, предотвращая расщепление α-цепи по остаткам Glu²³, Glu²⁷ и Asp⁴⁷. Равновесие реакции удается сместить в сторону синтеза, что было использовано для реконструкции α-цепи гемоглобина больных серповидноклеточной анемией из фрагментов 1—30 и 31—141. Конечная цель исследований этой группы авторов — выяснение механизма ассоциации цепей гемоглобина.

XI. Полусинтетические пептиды

Различают два основных типа диабета: тип 1, характеризующийся утратой способности β-клеток поджелудочной железы вырабатывать инсулин, и тип 2, при котором уровень инсулина нормальный или выше нормального, но при этом содержание глюкозы в крови сильно повышено. Существует мнение, что второй тип диабета связан с повышением содержания глюкозагона в крови [205]. Важным подходом к пониманию механизма действия глюкозагона является изучение структурно-функциональных взаимосвязей с использованием различных аналогов этого пептида.



Хруби в обзоре, посвященном глюкагону [215], указывает, что, не смотря на относительно небольшие размеры пептида, его синтез является сложной задачей. Поэтому при получении аналогов глюкагона предпочтение отдается полусинтезу, тем более что природный глюкагон относительно доступен.

Райт с соавт. [216] изучали аналоги глюкагона, имеющие замены в С-концевой части молекулы. Очищенный глюкагон расщепляли бромцианом по остатку Met²⁷. Полученный Hse²⁷-лактон фрагмента 1—27 глюкагона не реагирует с имеющимися в молекуле глюкагона двумя аминогруппами (N^{α1} и N^{ε12}), но при взаимодействии с большим избытком аминок компонента (аминокислоты или дипептида) с небольшим выходом удается получить полусинтетические аналоги глюкагона. Hse²⁷-лактон фрагмента 1—27 глюкагона может вступать в реакцию также с гидразином с образованием соответствующего гидразида. Поэтому альтернативным способом получения полусинтетических аналогов глюкагона является гидразинолиз Hse²⁷-лактона фрагмента 1—27 глюкагона, аминогруппы которого предвременно блокировали Вос-группой с последующим превращением гидразида в азид и конденсацией азида N^{α1},N^{ε12}-(Вос)₂-[Hse²⁷]-фрагмента 1—27 глюкагона с глицином [216].

Эксперименты по замене N-концевых аминокислот глюкагона (в первую очередь остатка His¹) стали возможны после того, как были подобраны условия для получения N^{ε12}-Асm- [217] и N^{ε12}-Msc-производных [218] глюкагона. Ацетимидоилированное производное глюкагона использовано для полусинтеза различных аналогов глюкагона [219—221].

Ван Ниспен с соавт. [222] применили приемы, используемые для получения полусинтетических аналогов пептидов для замены остатка Trp⁹ в полностью синтетическом производном α-меланоцитстимулирующего гормона (SYSMEHFRWGKPV, α-MSH) на Phe (своеобразный пример «полусинтеза» синтетического пептида). Производное α-MSH Вос-Ser-Trp-Ser-Met-Glu(OBu^t)-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys(Msc)-Pro-Val-NH₂ расщепили трипсином по связи Arg⁸-Trp⁹, после чего N-концевой остаток триптофана фрагмента 9—13 отщепили препаративной деградацией по Эдману и взаимодействием фрагмента 10—13 с N-оксисукцинимидным эфиром Вос-фенилаланина получили Вос-Phe-Gly-Lys(Msc)-Pro-Val-NH₂. После удаления Вос-группы у этого пептида его конденсировали с помощью N,N'-дициклогексилкарбодимида в присутствии N-гидроксibenзотриазола с N-концевым фрагментом 1—8 с образованием «полусинтетического» аналога — производного α-[Phe⁹]MSH.

Бун с соавт. [98], осуществляя полусинтез аналогов цитохрома с, для оценки применимости Msc-группы в полусинтетических исследованиях модифицировали адренокортикотропный гормон.



Msc-защитной группой по всем аминогруппам. Затем пептид расщепили бромцианом по остатку Met^t и по высвободившейся в результате расщепления полипептидной цепи α-аминогруппе фрагмента 5—24 присоединили азидным методом недостающий фрагмент 1—4. После деблокирования и очистки полученный препарат обладал полной липотропной активностью исходного гормона.

Заключение

Имеется несколько публикаций о начале работ по полусинтезу белков и пептидов, которые к моменту написания данного обзора остаются незавершенными. К ним можно отнести работы Фольш [223] по полусинте-

зу человеческой карбоангидразы В, Снслл с соавт. [224] по полусинтезу радиоактивных аналогов С-фрагмента липотропина. Незавершенными можно назвать и работы Хагенмайера с соавт. [128] по полусинтезу миоглобина (не удалось удалить защитные группы с белка), все работы по химической конденсации С-концевого октапептида В-цепи инсулина с дез-(октапептид В23-В30)-инсулином (работы прекращены в связи с явным преимуществом ферментативного полусинтеза для получения таких аналогов инсулина).

Оффорд в своей книге [1] приводит обзор работ по полусинтезу белков, в котором (часто со ссылкой на неопубликованные данные) приводятся другие примеры незавершенных исследований. Некоторые эксперименты незавершены в связи с тем, что прошло сравнительно мало времени с момента начала работы. К ним можно отнести работы по полусинтезу глобомуцина — циклического антибиотика пептидной природы [225], сообщение Оффорда о начале работы с 247-членным белком — триозофосфатизомеразой (см. [1], с. 187).

Незавершенные работы позволяют проследить пути развития методологии полусинтеза. Не все методики полусинтеза одинаково пригодны для работы с различными белками. В этой связи возникает вопрос: насколько вообще перспективно данное направление? Не будет ли оно вытеснено новыми методами белковой инженерии, например методом направленных мутаций? Ответ, по-видимому, однозначен. Даже если такое произойдет, полусинтез в достаточной мере оправдал возлагавшиеся на него надежды. С помощью этого метода получена уникальная информация о строении белков. Однако автор берет на себя смелость утверждать, что скорее всего будет найдено удачное сочетание методов белковой инженерии, в котором полусинтезу будет отведена роль «химического процессинга» белковых препаратов. Нарботка предназначенных для такого процессинга белков будет осуществляться методами, в основе которых лежит трансляция белковых последовательностей с мРНК (генная инженерия в ее классическом варианте, метод направленных мутаций и появившийся совсем недавно метод синтеза полипептидов в бесклеточной системе трансляции [226]). Примеры такого сочетания методов уже появились [93, 227].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Offord R. E.* // *Semisynthetic Proteins*. Chichester — N. Y.: John Wiley & Sons Ltd, 1980.
2. *Zahn H., Naithani V. K., Gattner H. G., Bullesbach E. E., Thamm P. M.* // *Naturwissenschaften*. 1981. В. 68. № 2. S. 56–62.
3. *Tesser G. J., Boon P. J.* // *Rec. trav. chim.* 1980. V. 99. № 10. P. 289–300.
4. *Chaiken I. M.* // *C. R. S. Crit. Rev. Biochem.* 1981. V. 11. № 3. P. 255–301.
5. *Offord R. E.* // *Peptides, 1982*/Eds Blaha K., Malon P. Berlin — N. Y.: Walter de Gruyter, 1983. P. 31–42.
6. *Chaiken I. M., Komoriya A., Ohno M., Widmer F.* // *Appl. Biochem. and Biotechnol.* 1982. V. 7. № 2. P. 385–399.
7. *Chaiken I. M., Komoriya A., Homandberg G. A.* // *Peptides, Struct. Biol. Funct.*, Proc. 6th Amer. Pept. Symp. 1979. Rockford — Illinois: Pierce Chem. Co., P. 587–595.
8. *Sheppard R. C.* // *Peptides, Struct. Biol. Funct.*, Proc. 6th Amer. Pept. Symp. 1979. Rockford — Illinois: Pierce Chem. Co., P. 577–585.
9. *Offord R. E.* // *Semisynthetic Peptides and Proteins*/Eds Offord R. E., Di Bello C. London — N. Y.: Acad. Press, 1978. P. 3–19.
10. *Moriyama K., Muneyuki R., Oka T.* // *Methods Enzymol.* 1987. V. 136. P. 162–170.
11. *Kasche V., Haufler U., Riechmann L.* // *Methods Enzymol.* 1987. V. 136. P. 280–292.
12. *Kaiser E. T., Lawrence D. S.* // *Science*. 1984. V. 226. № 4674. P. 505–511.
13. *Saraswathi S., Keyes M. H.* // *Polymer Mater. Sci. Eng.* 1984. V. 51. № 1. P. 198–203.
14. *Saraswathi S., Keyes M. H.* // *Enzym. and Microb. Technol.* 1984. V. 6. № 3. P. 98–100.
15. *Maugh T. H.* // *Science*. 1984. V. 223. № 4632. P. 154–156.
16. *Maugh T. H.* // *Science*. 1984. V. 223. № 4633. P. 269–271.
17. *Atlas of Protein Sequence and Structure*/Ed. Dayhoff M. O. 1972. V. 5. Suppl. 1 — 1973, Suppl. 2 — 1976, Suppl. 3 — 1978. Washington: Nat. Biomed. Res. Foundation.
18. *Geiger R.* // *Z. Chem.* 1976. В. 100. № 3. S. 111–119.
19. *Cosmatos A., Katsoyannis P. G.* // *J. Biol. Chem.* 1973. V. 248. № 21. P. 7304–7309.

20. *Cosmatos A., Katsoyannis P. G.* // J. Biol. Chem. 1975. V. 250. № 14. P. 5315-5321.
21. *Katsoyannis P. G., Ginos J., Cosmatos A., Schwartz G. P.* // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 1975. V. 5. № 2. P. 464-469.
22. *Joshi S., Burke T., Katsoyannis P. G.* // Biochemistry. 1985. V. 24. № 20. P. 4208-4214.
23. *Shimonishi Y.* // Bull. Chem. Soc. Jap. 1970. V. 43. № 10. P. 3251-3255.
24. *Weinert M., Brandenburg D., Zahn H.* // Hoppe - Seyler's Z. physiol. Chem. 1969. B. 350. № 12. S. 1556-1562.
25. *Weinert M., Kircher K., Brandenburg D., Zahn H.* // Hoppe - Seyler's Z. physiol. Chem. 1971. B. 352. № 5. S. 719-724.
26. *Brandenburg D., Biela M., Herbertz L., Zahn H.* // Hoppe - Seyler's Z. physiol. Chem. 1975. B. 356. № 6. S. 964-979.
27. *Krail G., Brandenburg D., Zahn H.* // Hoppe - Seyler's Z. physiol. Chem. 1975. B. 356. № 6. S. 981-996.
28. *Krail G., Brandenburg D., Zahn H.* // Macromol. Chem. Suppl. 1975. V. 1. № 1. P. 7-22.
29. *Borras F., Offord R. E.* // Biochem. J. 1970. V. 119. № 3. P. 24P-25P.
30. *Borras F., Offord R. E.* // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 716-718.
31. *Geiger R., Teetz V., Konig W., Obermeyer R.* // Semisynthetic Peptides and Proteins./Eds Offord R. E., Di Bello C. London - N. Y.: Acad. Press, 1978. P. 141-159.
32. *Geiger R., Shoene H., Pfaff W.* // Hoppe - Seyler's Z. physiol. Chem. 1971. B. 352. № 11. S. 1487-1490.
33. *Geiger R., Obermeyer R., Tesser G. I.* // Chem. Ber. 1975. B. 108. № 22. S. 2758-2763.
34. *Teetz V., Eckert H. G., Geiger R.* // Peptides. 1976/Ed. Loffet A. Brussels: Univ. Bruxelles, 1976. P. 263-267.
35. *Geiger R.* Par. ÖPT 2.005.658 (1971); C. A. 1971. V. 75. 152087.
36. *Geiger R.* Par. ÖPT 2.038.121 (1972); C. A. 1972. V. 76. 100061.
37. *Geiger R., Langer D.* // Hoppe - Seyler's Z. physiol. Chem. 1973. B. 354. № 10-11. S. 1285-1290.
38. *Saunders D. J., Offord R. E.* // FEBS Lett. 1972. V. 26. № 1. P. 286-288.
39. *Saunders D. J., Offord R. E.* // Biochem. J. 1977. V. 165. № 3. P. 479-486.
40. *Halban P. A., Offord R. E.* // Biochem. J. 1975. V. 151. № 2. P. 219-225.
41. *Assoian R. K., Tager H. S.* // J. Biol. Chem. 1981. V. 256. № 8. P. 4042-4049.
42. *Brandenburg D., Gattner H. G., Wollmer A.* // Hoppe - Seyler's Z. physiol. Chem. 1972. B. 353. № 4. S. 599-617.
43. *Crant K. I., Vonholt C.* // Biochem. Hoppe - Seyler's. 1987. B. 368. № 3. S. 239-248.
44. *Losse G., Raddatz H. H.* // J. pract. Chem. 1987. B. 329. № 1. S. 1-9.
45. *Geiger R., Geisen K. S., Gattner H. G., Langner D.* // Hoppe - Seyler's Z. physiol. Chem. 1975. B. 356. № 10. S. 1635-1651.
46. *Saunders D. J., Offord R. E.* // Hoppe - Seyler's Z. physiol. Chem. 1977. B. 358. № 11. S. 1469-1474.
47. *Saunders D. J., Freude K., Naithani V. K., Brandenburg D.* // Peptides, 1982./Eds Blaha K., Malon P. Berlin - N. Y.: Walter de Gruyter, 1983. P. 371-374.
48. *Saunders D. J., Offord R. E.* // Biochem. J. 1977. V. 165. № 3. P. 479-486.
49. *Trindler P., Brandenburg D.* // Chemistry of Peptides and Proteins. Proc. 3rd USSR-FRG Symp. Berlin: Walter de Gruyter, 1982. P. 307-314.
50. *Saunders D. J.* // Semisynthetic Peptides and Proteins./Eds Offord R. E., Di Bello C. London - N. Y.: Acad. Press, 1978. P. 212-218.
51. *Geiger R., Geisen K., Summ H. D., Langner D.* // Hoppe - Seyler's Z. physiol. Chem. 1975. B. 356. № 11. S. 1487-1490.
52. *Weitzel G., Bauer F. U., Rehe A.* // Semisynthetic Peptides and Proteins./Eds Offord R. E., Di Bello C. London - N. Y.: Acad. Press, 1978. P. 193-200.
53. *Weitzel G., Bauer F. U., Eisele K.* // Hoppe - Seyler's Z. physiol. Chem. 1978. B. 359. № 8. S. 945-958.
54. *Knorr R., Danho W., Bullesbach E. E., Gattner H. G., Zahn H., King G. L., Kahn C. R.* // Hoppe - Seyler's J. physiol. Chem. 1982. B. 363. № 12. S. 1449-1460.
55. *Inouye K., Watanabe K., Morihara K., Tochino V., Kanaya T., Emura J., Sakakibara S.* // J. Amer. Chem. Soc. 1979. V. 101. № 3. P. 751-752.
56. *Inouye K., Watanabe K., Tochino V., Kobayashi M., Shigeta Y.* // Biopolymers. 1981. V. 20. № 6. P. 1846-1858.
57. *Inouye K., Watanabe K., Tochino T., Kanaya M., Kobayashi M., Shigeta Y.* // Experientia. 1981. V. 37. № 8. P. 811-813.
58. *Tager H., Thomas N., Assoian R., Rubenstein A., Salkow M., Olefsky J., Kaiser E. T.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. № 6. P. 3181-3185.
59. *Joncuc A., Keefer L. M., Naithani V. K., Gattner H. G., Demeyts P., Zahn H.* // Hoppe - Seyler's Z. physiol. Chem. 1981. B. 362. № 5. S. 557-561.
60. *Chu S. C., Wang C. C., Brandenburg D.* // Peptides, 1980./Ed. Brunfeldt K. Copenhagen: Scriptor Publisher APS, 1981. P. 359-364.
61. *Chu S. C., Wang C.-C., Brandenburg D.* // Hoppe - Seyler's Z. physiol. Chem. 1981. B. 362. № 4. S. 647-654.
62. *Balogh D., Begley W. J., Bremmer D., Wyratt M. J., Pagnette L. A.* // J. Amer. Chem. Soc. 1979. V. 101. № 3. P. 751-752.
63. *Gattner H.-G., Schmidt E. W., Naithani V. K.* // Semisynthetic Peptides and Proteins./Eds Offord R. E., Di Bello C. London - N. Y.: Acad. Press, 1978. P. 181-191.

64. Krause E., Kaufmann K. D., Niedrich H. // Abstr. 20th European Peptide symp. Tübingen. FRG. Sept. 1988. P. 112.
65. Canova-Davis E., Carpenter F. H. // Biochemistry. 1981. V. 20. № 24. P. 7053–7058.
66. Riemen M. W., Pon L. A., Carpenter F. H. // Biochemistry. 1983. V. 22. № 6. P. 1507–1515.
67. Tager H., Given B., Baldwin D., Mako M., Markese J., Rubenstein A., Olefsky J., Kobayashi M., Kolterman O., Poucer R. // Nature. 1979. V. 281. № 5727. P. 122–125.
68. Kubiak T., Cowburn D. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1986. V. 27. № 5. P. 514–521.
69. Spoden M., Casaretti M., Diacones C., Gattner H. G., Zahn H., Brandenburg B., Wollmer A. // Biol. Chem. Hoppe – Seyler. 1987. B. 368. № 6. S. 709–716.
70. Morihara K., Oka T., Tsuzuki H. // Nature. 1979. V. 280. № 5721. P. 412–413.
71. Jonczyk A., Gattner H.-G. // Hoppe – Seyler's Z. physiol. Chem. 1981. B. 362. № 8. S. 1591–1598.
72. Cattner H.-G., Danho W., Knorr R., Naithani V. K., Zahn H. // Peptides, 1980./Ed. Brunfeldt K. Copenhagen: Scriptor publisher APS, 1981. P. 372–377.
73. Rose K., Depury H., Offord R. E. // Biochem. J. 1983. V. 211. № 3. P. 671–676.
74. Obermeyer R., Seipke G. // Proc. Biochem. 1984. V. 19. № 1. P. 29–32.
75. Brandenburg D. // Perspectives in Peptide Chemistry./Eds Eberle A., Geiger R., Wieland T., Kaiser E. T. Basel: S. Karger A. G., 1981. P. 88–100.
76. Morihara K., Oka T., Tsuzuki H., Tichio Y., Kanaya T. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1980. V. 92. № 2. P. 396–402.
77. Cattner H. G., Danho W., Knorr R., Zahn H. // Chemistry of Peptides and Proteins, Proc. 3rd USSR – FRG Symp. Berlin: Walter de Gruyter, 1982. P. 319–325.
78. Bullesbach E. E., Schmitt E. W., Gattner H. G., Naithani V. K., Foehles J. // Proc. 3rd USSR – FRG Symp. Berlin: Walter de Gruyter, 1982. P. 325–329.
79. Bullesbach E. E., Schmitt E. W., Gattner H. G. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1982. V. 20. № 3. P. 207–217.
80. Швачкин Ю. П., Никитина А. М., Фунтова С. М., Краснощечкова С. П., Федоров В. П., Плавцова А. Н. // Тез. 5 Всесоюзн. биохим. съезда. Киев. 1986. М.: Наука, 1985. Т. 1. С. 49.
81. Cattner H.-G., Naithani V. K. // Abstr. 20th European Peptide symp. Tübingen. FRG. Sept. 1988. P. 104.
82. Petkov O. D. // J. Theor. Biol. 1982. V. 98. № 3. P. 419–425.
83. Riechmann L., Kaschne V. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1984. V. 120. № 2. P. 686–691.
84. Morihara K., Ueno Y., Sakina K. // Biochem. J. 1986. V. 240. № 3. P. 803–810.
85. Markussen J., Schaumburg K. // Peptides, 1982./Eds Blaha K., Malon P. Berlin – N. Y.: Walter de Gruyter, 1983. P. 387–394.
86. Rose K., Gladston J., Offord R. E. // Biochem. J. 1984. V. 220. № 1. P. 189–196.
87. Naithani V. K., Bullesbach E. E., Zahn H. // Hoppe – Seyler's Z. physiol. Chem. 1979. B. 360. № 9. S. 1363–1366.
88. Naithani V. K., Gattner H. G. // Hoppe – Seyler's Z. physiol. Chem. 1981. B. 362. № 6. S. 685–695.
89. Naithani V. K., Gattner H. G., Bullesbach E. E. // Structural Studies on Molecules of Biological Interest./Eds Dodson G., Glusker J. P., Sayre D. Oxford: Clarendon Press, 1981. P. 441–453.
90. Bullesbach E. E. // Tetrahedron Lett. 1982. V. 23. № 18. P. 1877–1880.
91. Bullesbach E. E. // Chemistry of Peptides and Proteins, Proc. USSR – FRG Symp. 4th. Berlin: Walter de Gruyter, 1984. P. 23–28.
92. Bullesbach E. E., Naithani V. K. // Hoppe – Seyler's Z. physiol. Chem. 1980. B. 361. № 5. S. 723–734.
93. Jones R. M. L., Rose K., Offord R. E. // Biochem. J. 1987. V. 247. № 3. P. 785–788.
94. Harbury H. A. // Semisynthetic Peptides and Proteins./Eds Offord R. E., Di Bello C. London – N. Y.: Acad. Press, 1978. P. 73–89.
95. Corradin G., Harbury H. A. // Biochim. et biophys. acta. 1970. V. 221. № 3. P. 489–496.
96. Corradin G., Harbury H. A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1971. V. 68. № 12. P. 3036–3039.
97. Corradin G., Harbury H. A. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1974. V. 61. № 4. P. 1400–1406.
98. Wallace C. J. A. // Semisynthetic Peptides and Proteins./Eds Offord R. E., Di Bello C. London – N. Y.: Acad. Press, 1976. P. 101–114.
99. Wallace C. J. A. // Experientia. 1984. V. 40. № 6. P. 604.
100. Wallace C. J. A., Offord R. E. // Biochem. J. 1979. V. 179. № 1. P. 169–182.
101. Koul A. K., Wasserman G. F., Warme P. K. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1979. V. 89. № 4. P. 1253–1259.
102. Koul A. K., Wasserman G. F., Warme P. K. // Fed. Proc. 1979. V. 38. № 3. P. 347.
103. Boon P. J., Tesser G. I., Nivard R. J. F. // Semisynthetic Peptides and Proteins./Eds Offord R. E., Di Bello C. London – N. Y.: Acad. Press, 1978. P. 115–126.
104. Boon P. J., Van Raay A. J. M., Tesser G. I., Nivard R. J. F. // FEBS Lett. 1979. V. 108. № 1. P. 131–135.
105. Boon P. J., Tesser G. J., Nivard R. J. F. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. № 1. P. 61–65.
106. Iedden D. J., Nix P. T., Warme P. K. // Biochim. et biophys. acta. 1979. V. 578. № 2. P. 401–412.

107. Nix P. T., Warne P. K. // *Biochim. et biophys. acta*. 1979. V. 578. № 2. P. 413-427.
108. Nix P. T., Warne P. K. // *Fed. Proc.* 1978. V. 37. № 6. P. 1513.
109. Wallace C. J. A., Corthesy B. E. // *Prot. Eng.* 1986. V. 1. № 1. P. 23-27.
110. Wallace C. J. A., Mascagni P., Proudfoot A. E. I., Kent S. B. H. // *Abstr. 20th European Peptide Symp.* Tubingen. FRG. Sept. 1988. P. 24.
111. Barstow L. E., Young R. S., Yacali E., Scarp J. J., Brien J. C. O., Berman P. W., Harbury H. A. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1977. V. 74. № 10. P. 4248-4250.
112. Tesser G. I. // *Chimia*. 1980. V. 34. № 7. P. 312-313.
113. Tesser G. I. // *Perspectives in Peptide Chemistry/Eds Eberle A., Wieland T., Scarger A. G.* Basel. 1981. P. 67-79.
114. Harris D. E. // *Semisynthetic Peptides and Proteins./Eds Offord R. E., Di Bello C.* London - N. Y.: Acad. Press, 1978. P. 127-138.
115. Proudfoot A. E. I., Wallace C. J. A. // *Biochem. J.* 1987. V. 248. № 3. P. 965-967.
116. Proudfoot A. E. I., Wallace C. J. A., Harris D. E., Offord R. E. // *Biochem. J.* 1986. V. 239. № 2. P. 333-337.
117. Yullerat M., Homandberg G. A. // *Int. J. Peptide and Protein Res.* 1981. V. 18. № 2. P. 335-342.
118. Boon P. J., Tesser G. I. // *Int. J. Peptide and Protein Res.* 1985. V. 25. № 4. P. 510-516.
119. Wallace C. J. A. // *Biochem. J.* 1984. V. 217. № 3. P. 595-599.
120. Wallace C. J. A., Harris D. E. // *Biochem. J.* 1984. V. 217. № 3. P. 589-594.
121. Wallace C. J. A. // *Peptides. Structure and Biological Function. Proc. 6th Amer. Pept. Symp./Eds Gross E., Meienhofer J.* Rockford - Illinois: Pierce Chem. Comp. 1979. P. 609-612.
122. Wallace C. J. A., Rose K. // *Biochem. J.* 1983. V. 215. № 3. P. 651-658.
123. Rose K., Herrero C., Proudfoot A. E. I., Offord R. E., Wallace C. J. A. // *Biochem. J.* 1988. V. 249. № 1. P. 83-88.
124. Rose K., Yones R. M. L., Sundaram G., Offord R. E. // *Abstr. 20th European Peptide Symp.* Tubingen. FRG. Sept. 1988. P. 114.
125. Gozzini L., Tanuichi H., Di Bello C. // *Fed. Proc.* 1986. V. 45. № 6. P. 1617.
126. Di Bello C. D., Gozzini L., Hong A. // *Abstr. 20th European Peptide Symp.* Tubingen. FRG. Sept. 1988. P. 102.
127. Borras-Guesta F., Pavani M., Romo D., Maalebran P. // *Semisynthetic Peptides and Proteins./Eds Offord R. E., Di Bello C.* London - N. Y.: Acad. Press, 1978. P. 37-43.
128. Hagenmaier H., Ohms J.-P., Jahns J., Anfinson C. B. // *Semisynthetic Peptides and Proteins./Eds Offord R. E., Di Bello C.* London - N. Y.: Acad. Press, 1978. P. 32-35.
129. Арлюк П. И., Агаиасов Б. П., Волькецштейн М. В. // *Молекуляр. биология*. 1977. Т. 11. № 2. С. 410-417.
130. Gurd F. R. N., Garner W. H., Di Marchi R. D., Wang C. C. // *Peptides. Proc. 5th Amer. Pept. Symp./Eds Goodman M., Meienhofer J. N.* Y.: John Wiley, 1977. P. 480-483.
131. Wang C. C., Di Marchi R. D., Gurd F. R. N. // *Semisynthetic Peptides and Proteins./Eds Offord R. E., Di Bello C.* London - N. Y.: Acad. Press, 1978. P. 59-69.
132. Brown H. K., Horwitz E. M., Wang C. C., Gurd F. R. N. // *Fed. Proc.* 1981. V. 40. № 6. P. 1593.
133. Simmerman H. K. B., Wang C. C., Horwitz E. M., Bersofsky J. A., Gurd F. R. N. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1982. V. 79. № 24. P. 7739-7743.
134. Simmerman H. K. B., Bersofsky J. A., Radding J. A., Gurd F. R. N. // *Abstr. of Papers of the Amer. Chem. Soc.* V. 182 (Sep.). P. 32.
135. Bush M. R., Mascal D. G., Neireiter G. W., Harris D. E., Gurd F. R. N. // *Biophys. J.* 1984. V. 45. № 2. P. A248.
136. Mascal D. C., Bush M. R., Neireiter G. W., Harris D. E., Gurd F. R. N. // *Biophys. J.* 1984. V. 45. № 2. P. A31.
137. Brown H. K., Gurd F. R. N. // *Peptides. Synthesis, Structure and Function. Proc. 7th Amer. Pept. Symp./Eds Gross E., Meienhofer J.* Rockford - Illinois: Pierce Chem. Comp., 1981. P. 123-126.
138. Garner W. H., Gurd F. R. N. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1975. V. 63. № 2. P. 262-268.
139. Di Marchi R. D., Garner W. N., Wang C. C., Gurd F. R. N. // *Semisynthetic Peptides and Proteins./Eds Offord R. E., Di Bello C.* London - N. Y.: Acad. Press, 1978. P. 45-57.
140. Di Marchi R. D., Neireiter G. W., Garner W. N., Gurd F. R. N. // *Biochemistry*. 1979. V. 18. № 14. P. 3101-3109.
141. Di Marchi R. D., Neireiter G. W., Heath W. F., Gurd F. R. N. // *Biochemistry*. 1980. V. 19. № 11. P. 2454-2465.
142. Neireiter G. W., Di Marchi R. D., Gurd F. R. N. // *Peptides. Structure and Biological Function. Proc. 6th Amer. Pept. Symp./Eds Gross E., Meienhofer J.* Rockford - Illinois: Pierce Chem. Comp., 1979. P. 621-624.
143. Homandberg G. A., Laskowski M. J. // *Biochemistry*. 1979. V. 18. № 4. P. 586-592.
144. Komoriya A., Chaiken I. M. // *J. Biol. Chem.* 1982. V. 257. № 5. P. 2599-2604.
145. Komoriya A., Chaiken I. M., Taylor H., Richardson J. S., Richardson D. C. // *Peptides. Structure and Biological Function. Proc. 8th Amer. Pept. Symp./Eds Gross E., Meienhofer J.* Rockford - Illinois: Pierce Chem. Comp., 1983. P. 833-836.
146. Taylor H. C., Richards D. C., Richards J. S., Wlodawer A., Komoriya A., Chaiken I. M. // *J. Mol. Biol.* 1981. V. 149. № 2. P. 313-317.

147. Komoriya A., Chaiken I. M. // Abstr. of Papers of the Amer. Chem. Soc. 1978. V. 176 (Sep.). P. 63.
148. Hofmann K., Smithers M. J., Finn F. M. // J. Amer. Chem. Soc. 1966. V. 88. № 17. P. 4107-4109.
149. Rocchi R., Moroder L., Marchiori F., Ferrarese E., Scoffone E. // J. Amer. Chem. Soc. 1968. V. 90. № 21. P. 5885-5889.
150. Chaiken I. M. // Semisynthetic Peptides and Proteins./Eds Offord R. E., Di Bello C. London - N. Y.: Acad. Press, 1978. P. 349-364.
151. Hoes C., Hoogerhout P., Bloemhoff W., Kerling K. E. T. // Rec. trav. chim. 1979. V. 98. № 3. P. 137-139.
152. Ruterian H., Bloemhoff W., Kerling K. E. T. // Eur. J. Biochem. 1988. V. 172. № 2. P. 485-497.
153. Hoogerhout P., Bloemhoff W., Kerling K. E. T. // Rec. trav. chim. 1979. V. 98. № 10. P. 515-520.
154. Hoogerhout P., Kerling K. E. T. // Rec. trav. chim. 1981. V. 100. № 5. P. 215-216.
155. Hoogerhout P., Kerling K. E. T. // Rec. trav. chim. 1982. V. 101. № 7-8. P. 246-253.
156. Homandberg G. A., Komoriya A., Chaiken I. M. // Fed. Proc. 1980. V. 39. № 6. P. 1944.
157. Homandberg G. A., Komoriya A., Chaiken I. M. // Biochemistry. 1982. V. 21. № 14. P. 3385-3389.
158. Di Bello C., Lussiar A., Buso O., Tonnelat M. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1983. V. 23. № 1. P. 61-77.
159. Lin M. C., Gutte B., Moore S., Merrifield R. B. // J. Biol. Chem. 1970. V. 245. № 19. P. 5169-5170.
160. Lin M. C., Gutte B., Caldi D. G., Moore S., Merrifield R. B. // J. Biol. Chem. 1972. V. 247. № 15. P. 4768-4774.
161. Gutte B., Lin M. C., Caldi D. C., Merrifield R. B. // J. Biol. Chem. 1972. V. 247. № 15. P. 4763-4767.
162. Hodges R. S., Merrifield R. B. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1974. V. 6. № 3. P. 397-405.
163. Hodges R. S., Merrifield R. B. // J. Biol. Chem. 1975. V. 250. № 4. P. 1231-1241.
164. Serdjin J., Bloemhoff W., Kerling K. E. T., Havinga E. // Rec. trav. chim. 1984. V. 103. № 2. P. 50-54.
165. Serdjin J., Bloemhoff W., Kerling K. E. T., Havinga E. // Rec. trav. chim. 1984. V. 103. № 12. P. 351-360.
166. Serdjin J., Hoes C., Raap J., Kerling K. E. T. // Rec. trav. chim. 1980. V. 99. № 11. P. 349-352.
167. Doscher M. S., Martin P. D., Edwards B. F. P. // J. Mol. Biol. 1983. V. 166. № 4. P. 685-687.
168. Doscher M. S., Martin P. D., Edwards B. F. P. // Biochemistry. 1983. V. 22. № 18. P. 4125-4131.
169. Martin P. D., Doscher M. S., Edwards B. F. P. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. № 33. P. 15930-15938.
170. Di Bello C., Marigo A., Pandin M. // Semisynthetic Peptides and Proteins./Eds Offord R. E., Di Bello C. L.; N. Y.: Acad. Press, 1978. P. 373-379.
171. Di Bello C. // Peptides, 1974/Ed. Wollman J. Chichester: John Wiley, 1975. P. 173-175.
172. Homandberg G. A., Chaiken I. M. // J. Biol. Chem. 1980. V. 255. № 10. P. 4903-4909.
173. Komoriya A., Homandberg G. A., Chaiken I. M. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1980. V. 16. № 5. P. 433-439.
174. Li C. H., Bewley T. A., Blake J., Hayashida T. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 3. P. 1016-1019.
175. Li C. H., Blake J., Hayashida T. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1978. V. 82. № 1. P. 217-222.
176. Li C. H., Blake J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. № 12. P. 6124-6127.
177. Li C. H., Blake J., Cheng C. H. K., Jibson M. D. // Arch. Biochem. and Biophys. 1981. V. 211. № 1. P. 338-345.
178. Graf L., Li C. H. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 10. P. 6135-6138.
179. Abdel-Meguid S. S., Shien H.-S., Smith W. W., Dayringer H. E., Violand B. N., Bentle L. A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. № 18. P. 6434-6437.
180. Van Scharrenburg G. J. M., Puijk W. C., De Haas G. H., Slotboom A. J. // Eur. J. Biochem. 1983. V. 133. № 1. P. 83-89.
181. Van Scharrenburg G. J. M., Puijk W. C., Egmond M. R., Van der Schaft P. H., Haas G. H., Slotboom A. J. // Biochemistry. 1982. V. 21. № 6. P. 1345-1352.
182. Slotboom A. J., Haas G. H. // Biochemistry. 1975. V. 14. № 25. P. 5394-5399.
183. Van Scharrenburg G. J. M., Puijk W. C., Egmond M. R., De Haas G. H., Slotboom A. J. // Biochemistry. 1981. V. 20. № 6. P. 1584-1591.
184. Slotboom A. J., Jansen E. H. J. M., Pattus F., Haas G. H. // Semisynthetic Peptides and Proteins./Eds Offord R. E., Di Bello C. London - N. Y.: Acad. Press, 1978. P. 315-349.
185. Kihara H., Ishimaru K., Ohno M. // J. Biochem. 1981. V. 90. № 2. P. 363-370.
186. Randolph A., Heinrikson R. L. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 5. P. 2155-2161.
187. Членс Г. И., Полевая Л. Г., Веретенникова Н. И., Крикис А. Ю. // Структура и функции низкомолекулярных пептидов. Рига: Зинатне, 1980. С. 125-141.

188. *Laskowski M., Jr.* // Semisynthetic Peptides and Proteins./Eds Offord R. E., Di Bello C. London — N. Y.: Acad. Press, 1978. P. 255—262.
189. *Sealock R. W., Laskowski M., Jr.* // Biochemistry. 1969. V. 8. № 9. P. 3703—3710.
190. *Kowalski D.* // Semisynthetic Peptides and Proteins./Eds Offord R. E., Di Bello C. London — N. Y.: Acad. Press, 1978. P. 263—282.
191. *Kowalski D., Laskowski M., Jr.* // Biochemistry. 1976. V. 15. № 6. P. 1300—1309.
192. *Kowalski D., Laskowski M., Jr.* // Biochemistry. 1976. V. 15. № 6. P. 1309—1315.
193. *Jering H., Tscesche H.* // Semisynthetic Peptides and Proteins./Eds Offord R. E., Di Bello C. London — N. Y.: Acad. Press, 1978. P. 283—298.
194. *Dyckes D. F., Creighton T., Scheppard R. C.* // Nature. 1974. V. 247. № 543. P. 202—204.
195. *Dyckes D. F., Kini H., Scheppard R. C.* // Int. J. Peptide and Protein Res. 1977. V. 9. № 5. P. 340—348.
196. *Dyckes D. F., Creighton T. E., Scheppard R. C.* // Int. J. Peptide and Protein Res. 1978. V. 11. № 4. P. 258—268.
197. *Biondi L., Filippi B., Filira F., Giormani V., Rocchi R.* // In: Peptides, 1982/Eds Blaha K., Malon P. Berlin — N. Y.: Walter de Gruyter, 1983. P. 361—366.
198. *Tschesche H., Beckmann J., Meclich A., Schnabel E., Truschneil E., Wentzel H. R.* // Biochim. et biophys. acta. 1987. V. 913. № 1. P. 97—101.
199. *Prestidge P. L., Harding D. R. K., Moore C. H., Hancock W. S.* // Bioorg. Chem. 1981. V. 10. № 3. P. 277—282.
200. *Goodman M., Peschere J.-F.* // J. Mol. Evol. 1977. V. 9. № 2. P. 131—158.
201. *Maximov E. E., Zapevalova N. P., Mitin Yu. V.* // FEBS Lett. 1978. V. 88. № 1. P. 80—82.
202. *Медведкин В. Н., Митин Ю. В., Пермьяков Е. А.* // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 2. С. 183—188.
203. *Медведкин В. Н., Митин Ю. В., Пермьяков Е. А.* // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 8. С. 1019—1022.
204. *Медведкин В. Н., Митин Ю. В.* // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 2. С. 177—182.
205. *Медведкин В. Н.* Полусинтетические эксперименты с фрагментами парвальбумина. Автореф. дис. на соискание уч. ст. канд. хим. наук. Киев: Ин-т мол. биол. и ген., 1987.
206. *Gavish M., Zakut R., Wilchek M., Givol D.* // Biochemistry. 1978. V. 17. № 7. P. 1345—1351.
207. *Gavish M., Zakut R., Wilchek M., Givol D.* // Isr. J. Med. Sci. 1979. V. 15. № 1. P. 58.
208. *Harris D. E., Crowpow M. L., Health W. F., Gurd F. R. N.* // Biophys. J. 1983. V. 41. № 2. P. A9.
209. *Lyle S. B., Hefta S. A., Crowpow M. L., Harris D. E., Bush M. R., Gurd F. R. N.* // Biophys. J. 1985. V. 47. № 2. P. 85A.
210. *Hefta S. A., Lyle S. B., Busch M. R., Harris D. E., Gurd F. R. N.* // Biophys. J. 1986. V. 49. № 2. Part 2. P. 537A.
211. *Hefta S. A., Lyle S. B., Busch M. R., Harris D. E., Matthew J. B., Gurd F. R. N.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. № 3. P. 709—713.
212. *Seetharam R., Achariya A. S.* // J. Cell. Biochem. 1986. V. 30. № 1. P. 87—99.
213. *Iyer K. S., Seetharam R., Khan S. A.* // Fed. Proc. 1986. V. 46. № 6. P. 1612.
214. *Achariya A. S.* // J. Cell. Biochem. 1987. V. S11C. P. 212.
215. *Hruby V. J.* // Mol. Cell Biochem. 1982. V. 44. № 1. P. 49—64.
216. *Wright D. E., Hruby V. J., Rodbell M.* // Biochim. et biophys. acta. 1980. V. 631. № 1. P. 49—58.
217. *Flanders K. C., Horwits E. M., Gurd R. S.* // J. Biol. Chem. 1984. V. 259. № 11. P. 7031—7037.
218. *Davies J. G., Garmignac D.* // Experientia. 1984. V. 40. № 7. P. 605.
219. *Flanders K. C., Mar D. H., Folz R. J., England R. D., Coolican S. A., Harris D. E., Floyd A. D., Gurd R. S.* // Biochemistry. 1982. V. 21. № 18. P. 4244—4251.
220. *England R. D., Jenkins W. T., Flanders K. C., Gurd R. C.* // Biochemistry. 1983. V. 22. № 7. P. 1722—1728.
221. *Shetler K. A., Flanders K. C., Horwits E. M., Gurd R. S.* // Fed. Proc. 1984. V. 43. № 3. P. 694.
222. *Van Nispen J. W., Smeets P. J. H., Poll E. H. A., Tesser G. I.* // Int. J. Peptide and Protein Res. 1977. V. 9. № 3. P. 203—212.
223. *Folsch G.* // Semisynthetic Peptides and Proteins./Eds Offord R. E., Di Bello C. L.; N. Y.: Acad. Press, 1978. P. 309—313.
224. *Snell C. R., Austen B. M., Geisow M. J., Smyth D. C.* // Semisynthetic Peptides and Proteins./Eds Offord R. E., Di Bello C. L.; N. Y.: Acad. Press, 1978. P. 301—308.
225. *Glass J. D., Hayes B.* // Peptides, 1982./Eds Blaha K., Malon P. Berlin — N. Y.: Walter de Gruyter, 1983. P. 357—360.
226. *Alakhov Ju. B., Baranov V. I., Ovodov S. Yu., Ryabova L. A.* // Abstr. 20th European Peptide symp. Tubingen. FRG. Sept. 1988. P. 26.
227. *Markussen J., Langkjar L., Norris K., Sorensen A.* // Abstr. 20th European Peptide symp. Tubingen. FRG. Sept. 1988. P. 27.

Поступила в редакцию
18.II.1988

После доработки
7.XII.1988