



ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 547.962.07

ПРОБЛЕМЫ СИНТЕЗА КРУПНЫХ ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ

Вольпина О. М., Михалева И. И., Иванов В. Т.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемлякина Академии наук СССР, Москва

В обзоре рассмотрены особенности, проблемы и перспективы синтеза крупных пептидов и белков. Обсуждаются стратегия и тактика синтеза пептидов, размер которых приближается к белкам, побочные реакции, протекающие в ходе синтеза, проблемы удаления защитных групп и проблемы рацемизации, очистка и оценка степени гомогенности промежуточных и конечных пептидов, а также вопросы правомочности использования специфической активности в качестве критерия гомогенности синтетических пептидов. В свете вышеперечисленных проблем рассмотрен синтез пептидов, размер которых превышает 40 аминокислотных остатков.

Содержание

I. Особенности синтеза крупных пептидов и белков	5
II. Стратегия и тактика синтеза крупных пептидов и белков	6
III. Побочные реакции в пептидном синтезе	15
IV. Побочные реакции, протекающие при обработке пептидов жидким фтористым водородом	20
V. Проблема рацемизации в синтезе крупных пептидов	26
VI. Проблемы очистки и оценки степени гомогенности крупных синтетических пептидов	29
VII. Специфическая активность как критерий индивидуальности синтетических пептидов и белков	32
VIII. Достижения в синтезе крупных пептидов и белков	34

I. Особенности синтеза крупных пептидов и белков

Большим достижением современной биоорганической химии явились успехи в области синтеза пептидов. Блестящие работы по синтезу секретина, кальцитонина, глюкагона, гастрина, инсулина и др. [1–6] обеспечили возможность проведения широких структурно-функциональных исследований этих гормонов, а также стали существенным шагом вперед в развитии методологии пептидного синтеза. Вместе с тем успехи в синтезе крупных пептидов, содержащих более 40–50 аминокислотных остатков, значительно скромнее, и, несмотря на то что уже осуществлен синтез многих пептидов, приближающихся по размеру к белкам, уровень развития методов синтеза, позволяющий получать в больших количествах индивидуальные вещества и их аналоги, еще не достигнут.

Интерес к синтетическим крупным пептидам обусловлен тем фактом, что большое число белков, содержащих 50–200 аминокислотных остатков, представляют собой вещества большой биологической значимости и их структурно-функциональные исследования нуждаются в самом широком наборе синтетических производных этих пептидов. Кроме того, размер синтезированных пептидов прекрасно демонстрирует успехи методологии

Сокращения: Acst – ацетамидометил, Adoc – адамантилоксикарбонил, Bros – 2-(*n*-дифенил)изопропиллоксикарбонил, BzlCl₂ – 2,6-дихлорбензил, DCC-HONSu-метод и DCC-NOBt-метод – способ конденсации с помощью дипциклогексилкарбодимидов в присутствии *N*-оксисукцинимидов и 1-оксибензотриазола соответственно, Ddz – α,α -диметил-3,5-диметоксибензиллоксикарбонил, Fmoc – 9-флуоренилметилоксикарбонил, MBzl – *n*-метоксибензил, 3ClZ – 3-хлорбензиллоксикарбонил, 2ClZ – 2-хлорбензиллоксикарбонил, 4CH₃Bzl – 4-метилбензил, 4ClBzl – 4-хлорбензил, 4BrBzl – 4-бромбензил, Z(OMe) – *n*-метоксibenзиллоксикарбонил.

пептидного синтеза. Синтез крупного пептида требует значительных затрат усилий и времени, которые, безусловно, не пропорциональны числу аминокислотных остатков в пептиде, а резко возрастают с увеличением длины синтезируемого пептида и связаны с серьезными методологическими трудностями и проблемами, требующими своего решения в ходе синтеза. Ряд трудностей является общим для синтеза пептидов любой длины, но при синтезе крупных пептидов возникают осложнения, специфичные именно для таких объектов.

Проблемы синтеза крупных пептидов стимулируют работы в области дальнейшего развития методов синтетической пептидной химии. Естественно, что большинство методологических усовершенствований лишь после успешного применения на коротких пептидах используют в синтезе более крупных молекул. Таким образом, методы синтеза крупных пептидов несколько отстают от самых передовых и новаторских работ в области пептидной химии. Это отставание усугубляется также резким возрастанием временных затрат, необходимых для осуществления синтеза крупных пептидов в растворе. Такие работы часто продолжаются многие годы, и естественно, что выбранная стратегия и тактика синтеза адекватны методическому уровню времени, по крайней мере, начала синтеза. В период завершения работы нередко уже становится возможным оценить недостатки и причины неудач данного синтеза с позиции самых последних методических достижений.

Целью настоящего обзора является рассмотрение особенностей, проблем и перспектив синтеза крупных пептидов. В обзоре будут обсуждаться стратегия и тактика синтеза пептидов, размер которых приближается к белкам (>40 аминокислотных остатков), побочные реакции, протекающие в ходе синтеза, проблемы удаления защитных групп и проблемы рацемизации, очистка и оценка степени гомогенности промежуточных и конечных пептидов, а также вопросы правомочности использования специфической активности в качестве критерия гомогенности синтетических пептидов.

Все крупные пептиды, синтезируемые к настоящему моменту, представлены в табл. 1 и 2. Незавершенные и неудачные работы включены в рассмотрение как наглядные примеры, наиболее ярко демонстрирующие всю сложность предпринятых синтетических исследований. Самым небольшим из рассмотренных пептидов является ингибитор гастрина, содержащий 43 аминокислотных остатка (табл. 1). Сравнительная характеристика работ по синтезу крупных пептидов, представленных в табл. 1 и 2, будет проведена в разделе VIII данного обзора.

II. Стратегия и тактика синтеза крупных пептидов и белков

Правильный выбор стратегии и тактики синтеза — необходимое условие успешного синтеза любого пептида. Существуют два основных стратегических подхода к синтезу пептидов — классический и твердофазный пути. Оба имеют свои преимущества и недостатки, и пока трудно отдать одному из них предпочтение в синтезе крупных пептидов. Основными преимуществами классического метода синтеза являются возможность очистки продукта на стадии проведения каждой реакции, а также широкий выбор методов конденсации и защитных групп. Однако классический путь синтеза более трудоемок и сопряжен с повышенным риском рацемизации как при последовательном наращивании цепи (при наличии избытка основания в реакционной среде), так и при блочной конденсации с активацией остатков оптически деятельных аминокислот. Кроме того, слабым звеном такого пути синтеза становится понижение растворимости продуктов по мере роста цепи, что в свою очередь вызывает серьезные дополнительные осложнения при проведении конденсации и очистке продуктов.

Твердофазный метод остается наиболее продуктивным методом синтеза пептидов. Счет времени, затраченного на твердофазный синтез, идет на дни и месяцы, в то время как синтез крупного пептида классическим методом занимает годы, например синтез ингибитора трипсина (Kazal) [26—36] (табл. 1) завершен за 5 лет, а работы по синтезу рибонукле-

Крупные пептиды, синтезированные классическим методом 1*

Целевой объект (число аминокислотных остатков)	Длина синтезированного пептида, аминокисл. ост.	Особенности аминокислотного состава	Метод синтеза 3*	Характеристика блокировки боковых функциональных аминокислот	Реагент конечного деблокирования	Очистка конечного продукта	Контроль индивидуальности конечного продукта	Методы анализа оптической плотности конечного продукта	Специфическая активность, %	Литературный источник
Δ^5 -Кетостероидизомераза (125) 2*	7, 8, 10, 13, 15, 15, 18, 18, 21	3 Met	A	Максимальное, бензильного типа						[7]
Trp ¹⁰⁷ -Аналог цитохрома с (108) 2*	7, 10, 12, 16, 21, 42	1 Trp, 2 Met	A	Минимальное						[8-20]
Ингибитор гастрилина 2** (43)	16, 27	2 Trp, 1 Met	A	Неполное						[21]
То же	43	2 Trp, 1 Met	B	Минимальное, бензильного типа	HF	ГХ (G-25), СМ-целлюлоза	ГЭФ, ТСХ, АКА	E	400	[22-25]
Ингибитор трипсина II (Kazal) 52	52	6 Cys	A	Минимальное	1) HF 2) 1 M пиперидин, 3) Hg (CH ₃ COO) ₂	ГХ (G-25)	ГЭФ	-	1 (0,006)	[26-36]
α -Бунгаротоксин (74)	74	40 Cys, 1 Trp, 1 Met	A	Максимальное, бензильного типа	HF	СМ-целлюлоза	ГХ (G-50), АКА, КА, УФ-спектр	КД-спектр	0	[37-40]
Проинсулин (86) 2**	45, 41	6 Cys	A	Максимальное, кислотного типа						[41-48]
То же	86	6 Cys	A	Минимальное	Na/жидк. NH ₃	ГХ (G-50), СМ-целлюлоза, DEAE-целлюлоза	АКА, иммунохимич.	-	-	[49]

Таблица 1 (окончание)

Целевой объект (число аминокислотных остатков)	Длина синтезиро- ванного пептида. аминокисл. ост.	Особенности аминокислот- ного состава	Метод синтеза **	Характери- стика блок- ирования бо- ковых функ- ций амино- кислот	Реагент конечного доблокирования	Очистка конеч- ного продукта	Контроль индивидуаль- ности конеч- ного про- дукта	Методы анализа опти- ченности го- мологичного продукта	Специфиче- ская актив- ность ^{5*} , %	Литера- турный источник
Рибонуклеаза T ₁ (104) ^{2*}	23, 81	4 Cys, 1 Trp	A	Минималь- ное	1) HF, 2) Hg(CH ₃ COO) ₂	ГХ (G-75 ^{4*}),	ГЭФ ^{4*} , АКА ^{4*} , СМ-сефа- декс	Е	40	[50-56] [57-62]
Рибонуклеаза S (104)	104	8 Cys, 3 Met	A	»		ГХ (G-75), АХ, СМ-целлюлоза	ГЭФ, АКА, УФ, К _m	Удельное вращение	104-107	[63-66]
Рибонуклеаза А (124)	124	8 Cys, 4 Met	A	Минималь- ное, бен- зильного типа	Метансульфо- новая кислота	ГХ (G-50) ^{4*} , СМ-сефа- декс ^{3*}	АКА ^{4*} , ИЭФ ^{4*}	-	0	[67-81]
Аналог лизоцима (129)	129	8 Cys, 6 Trp	A	Максималь- ное, кисло- толабиль- ного типа	1) CF ₃ COOH, 2) Hg(CH ₃ COO) ₂					

^{1*} АКА — аминокислотный анализ, АХ — аффинная хроматография, ГХ — гель-электрофорез, ГЭФ — ферментативный гидролиз, ИЭФ — изо-
электрофокусирование, КА — N-концевой анализ. ^{2*} Работа не завершена. ^{3*} А — блочный метод, Б — последовательное удлинение цепи с C-конца.
приведены для Асп-пептида. ^{4*} В скобках приведены величины, вычисленные по К_d комплеккса с трипсином [92].

Крупные пептиды, синтезированные твердофазным методом 1*

Целевой объект (число аминокислотных остатков)	Длина синтезированного пептида, аминокислот. ост.	Особенности аминокислотного состава	Метод синтеза 3*	Характеристика блокирования боковых функций, аминокислот	Полимер-носитель 4*	Реагент конечного деблокирования	Очистка конечного продукта	Контроль гомогенности конечного продукта	Метод анализа оптической гомогенности конечного продукта	Специфичность активной группы, %	Литературный источник
Аналог уреагострона 5* (47)	47		A	Неполное, кислотного лабильного типа	PII	CF ₃ COOH					[82]
Ферредоксин (55)	55	8 Cys	B	Максимальное, беззильного типа	PI	Na/хлорид. NH ₃	ГХ (G-50)	АКА, СА	-	+	[83]
Аполипротеин С-1 (57)	57	1 Met, 1 Trp	B	То же	PI	1) HF, 2) рН 12	ГХ (G-50) сефадекс SP-25	ГЭФ, ПК, АКА, иммунохимия.	-	+	[84]
То же	57	1 Met, 1 Trp	B	»	PIII	1) HF, 2) рН 12	ГХ (P-10), DEAE-целлюлоза	ГЭФ, АКА, СФ, СА	КД-спектр	80	[85]
Ингибитор трипсина (Kunitz) (58)	58	6 Cys, 1 Met	B	»	PI	HF	ГХ (G-25)	БЭФ, ГЭФ, ПК, АКА	-	35-39 (>0,001)	[86]
То же	58	6 Cys, 1 Met	A	Неполное, беззильного типа	PI	HF	ГХ (G-25)	ГЭФ, АКА	-	82 (>0,001)	[87-91]
Ингибитор трипсина (Kunitz) (58)	58	6 Cys, 1 Met	B	Максимальное, беззильного типа	PI	HF	ГХ (G-25), АХ	ГЭФ, АКА, ПК	КД-спектр	100 (70)	[92]
Phel ⁶ -Аналог ингибитора трипсина (Kunitz) (58)	58	6 Cys, 1 Met	B	»	PI	HF	ГХ (G-50), АХ	ГЭФ, АКА	»	95 (0,0035)	[93]

Целевой объект (число аминокислотных остатков)	Длина синтезированной пептида, аминокислот, ост.	Особенности аминокислотного состава	Метод синтеза	Характеристика блокировки боковых функций аминокислот	Полимерный носитель**	Реагент конечного деблокирования	Очистка конечного продукта	Контроль гомогенности конечного продукта	Метод анализа оптической гомогенности конечного продукта	Специфическая активность, %	Литературный источник
Кардиооксин (60)	60	8 Cys, 2 Met	A	»	PI	HF	ГХ (G-50), СМ-сефадекс	ГЭФ, ТСХ, АКА, КА	»	91	[94-96]
Кобротоксин (62)	62	8 Cys, 1 Trp	B	»	PI	HF	ГХ (G-25), СМ-целлюлоза	АКА, иммунохимия	-	20	[97, 98]
(1-74)-Аналог ацилпереносящего белка	74	1 Met	B	»	PI	1) HBr/CF ₃ COOH, 2) H ₂ /PdO	DEAE-целлюлоза	ГХ (G-50)	-	55	[99, 100]
Arg(NO) ₂ , Nle-Аналоги ацилпереносящего белка	61-74	1 Met	B	»	PI	1) HBr/CF ₃ COOH, 2) H ₂ /PdO	То же	ГХ (G-50), ГЭФ	-	0,57	[101]
(42-94)-Аналог β-липотропина (50)	50	1 Trp, 1 Met	B	»	PI	1) HF, 2) HCl-NH ₂ OH/ жидк. NH ₃	СМ-целлюлоза, РХ (G-50)	АКА, БЭФ, ГЭФ, УФ-спектр	E	600	[102]
(41-94)-Аналог β-липотропина (51)	51	1 Trp, 1 Met	B	»	PIV	1) HF, 2) NaOH, pH 11,5	То же	АКА, БЭФ, ГЭФ, ТСХ	E	600	[103]
β-Липотропин (91)	91	1 Trp, 2 Met	B	Максимальное, бензильного типа	PV	1) HF, 2) NaOH, pH 11,5	СМ-целлюлоза, РХ (агароза)	АКА, ТСХ, БЭФ, КА, ГЭФ, иммунохимия	E, удельное вращение, КД-спектр	100	[104]
His (Bzl) ^{26,33} , Trp ³² -Аналог цитохрома с	104	2 Met, 2 Cys	B	»	PI	HF	ГХ (G-25), амберлит CG-50	-	-	2	[105]
Рибонуклеаза T ₁ (104) ^{2*}	4, 5, 6, 6, 7, 7, 11	4 Cys, 1 Trp	A	Неполное, бензильного типа	PI	HF	ГХ (G-25), амберлит CG-50	-	-	-	[106-110]

Целевой объект (число аминокислотных остатков)	Длина связанного пептида, аминокисл. ост.	Особенности аминокислотного состава	Метод синтеза	Характеристика блок-кодовых функций аминокислот	Полимерный носитель ^{4*}	Реагент деблокирования	Очистка конечного продукта	Контроль гомогенности конечного продукта	Метод анализа оптической плотности конечного продукта	Специфическая активность ^{5*} , %	Литературный источник
»	104	4 Cys, 1 Trp	Б	Максимальное, бензильного типа	PI	HF	ГХ (G-50), DEAE-целлюлоза, АХ	АКА, БЭФ, ПК	—	44-59	[111]
Тунг ^{3*} -Аналог рибонуклеазы T ₁ (104)	104	4 Cys	Б	То же	PI	HF	То же	То же	—	57-61	[111]
70-членный аналог рибонуклеазы А	70	3 Met	Б	»	PI	HF	ГХ (G-50), СМ-целлюлоза	»	—	8	[112]
Рибонуклеаза А (124)	124	8 Cys, 4 Met	Б	»	PI	HF	ГХ (G-75), обработка трипсином, фракц. в (NH ₄) ₂ SO ₄	АКА, БЭФ, ПК, ИРС-50, К _м , СМ-целлюлоза	Е	78	[113, 114]
Лизоцим (129)	129	6 Trp, 2 Met, 8 Cys	Б	»	PI	HF	СМ-целлюлоза, хитин	АКА, ПК, ЭФ на ацетате целлюлозы	Е	4-6	[115, 116]
Гормон роста (188)	188	1 Trp, 4 Cys	Б	Максимальное, бензильного типа	PI	1) HF, 2) Na/жидк. NH ₃	ГХ (G-700)	АКА	—	5-10	[117]

^{1*} См. примечание ^{1*} к табл. 1; кроме того: БЭФ — электрофорез на бумаге, ПК — метод ионитидных карт, РХ — метод ионитидной хроматография, СА — седиментационный анализ, СФ — спектр флуоресценции.

^{2*} См. примечание ^{2*} к табл. 1.

^{3*} См. примечание ^{3*} к табл. 1.



^{5*} См. примечание ^{5*} к табл. 1.

азы T₁ [50–56] (табл. 1) продолжаются уже более 10 лет. Выигрыш во времени при работе на полимерном носителе дает больше возможностей для проб и вариаций в тактике синтеза, и неудача при твердофазном синтезе не так «трагична», как при классическом пути.

Как уже отмечалось, твердофазный метод в большинстве случаев синтеза крупных объектов обеспечивает меньший риск рацемизации, чем синтез в растворе [118, 119]. Но у твердофазного метода есть и существенные ограничения, и недостатки, несвойственные классическому методу. Широко известной проблемой твердофазного метода является микрогетерогенность конечного продукта, возникающая в результате неполного протекания реакций [120]. Таким образом, неочищенный конечный полипептид представляет собой смесь нужного пептида и побочных продуктов с укороченной длиной цепи, которую практически невозможно разделить с помощью современных методов очистки веществ. Кроме того, существует ряд нежелательных реакций, протекающих исключительно при синтезе пептидов на полимерном носителе.

При выборе тактики синтеза крупных пептидов представляется две возможности: последовательное наращивание цепи с С-конца и блочная конденсация фрагментов. Во всех примерах классического подхода, за исключением синтеза ингибитора гастрина [22–25], предпочтение отдается фрагментной конденсации (табл. 1). Блочный вариант синтеза более благоприятен в смысле возможностей очистки продуктов, но дает повышенный риск рацемизации [121, 122]. При использовании твердофазного метода, наоборот, обычным является последовательное наращивание цепи (табл. 2). Метод блочной конденсации на полимерном носителе представляется перспективным, он применялся для получения таких крупных пептидов, как апалог урогастрона [82], ингибитор трипсина [87–91] и кардиотоксина [94–96], однако наилучшие результаты в твердофазном синтезе крупных пептидов пока получены при последовательном наращивании цепи с С-конца.

Одной из важных тактических задач пептидного синтеза является правильный выбор системы защитных групп. Природа любого синтезируемого пептида предъявляет жесткие требования к используемому набору защитных групп, и если ошибки в выборе защитных групп при синтезе коротких пептидов чаще всего снижают выходы и усложняют выделение продукта, то при синтезе крупного полипептида эти ошибки могут в конечном итоге свести на нет все усилия.

Остановимся подробнее на основных достоинствах и недостатках существующих систем защитных групп. Большинство пептидов, синтезированных классическим методом, получено с использованием минимального числа защитных групп (табл. 1). Преимуществами такого подхода являются простота удаления небольшого числа защитных групп на конечной стадии синтеза и возможность очистки промежуточных соединений в водно-органических средах. Кроме того, синтез с минимальной защитой боковых цепей, безусловно, более экономичен. Однако этот подход ограничивает выбор возможных методов конденсации. Чаще всего при этом используется азидный метод [50–62], а также методы смешанных ангидридов [8–20, 26–36], активированных эфиров [50–62] и N-карбоксиингидридный метод [56–62]. Присутствие большого числа незащищенных функциональных групп вызывает множество побочных реакций. Низкая растворимость пептидов, содержащих одновременно гидрофильные и гидрофобные группировки, и, как следствие этого, низкие выходы продуктов реакций также являются недостатками этого подхода. Низкая растворимость крупных частично защищенных пептидов — серьезная проблема пептидного синтеза, с которой столкнулись при проведении синтезов ингибитора гастрина [21], рибонуклеазы T₁ [50–56], рибонуклеазы S' [57–62].

Максимальная защита боковых функций аминокислот обеспечивает их инертность в ходе синтеза и ограничивает возможности побочных реакций, однако необходимость удаления большого числа защитных группировок на конечной стадии синтеза создает порой непреодолимые трудности.

Целевой объект (число аминокислотных остатков)	Длина синтезированного пептида, аминокислот, аминокислот, ост.	Особенности аминокислотного состава	Метод синтеза ^{3*}	Характеристика блок-ированных функциональных аминокислот	Полимерный носитель ^{4*}	Реагент конечного деблокирования	Очистка конечного продукта	Контроль гомогенности конечного продукта	Метод анализа оптической гомогенности конечного продукта	Специфическая активность, %	Литературный источник
Кардиотоксин (60)	60	8 Cys, 2 Met	A	»	PI	HF	ГХ (G-50), СМ-сефадекс	ГЭФ, ТСХ, АКА, КА	»	91	[94-96]
Коброгтоксин (62)	62	8 Cys, 4 Trp	B	»	PI	HF	ГХ (G-25), СМ-целлюлоза	АКА, иммуннохимич.	-	20	[97, 98]
(1-74)-Аналог адипереносящего белка	74	1 Met	B	»	PI	1) HBr/CF ₃ COOH, 2) H ₂ /PdO	DEAE-целлюлоза	ГХ (G-50)	-	55	[99, 100]
Arg(NO) ₂ , Nle-Аналоги адипереносящего белка	61-74	1 Met	B	»	PI	1) HBr/CF ₃ COOH, 2) H ₂ /PdO	То же	ГХ (G-50), ГЭФ	-	0,57	[101]
(42-91)-Аналог β-липтопролина (50)	50	1 Trp, 1 Met	B	»	PI	1) HF, 2) HCl-NH ₂ OH/жидк. NH ₃	СМ-целлюлоза, РХ (G-50)	АКА, БЭФ, ГЭФ, УФ-спектр	E	600	[102]
(41-91)-Аналог β-липтопролина (51)	51	1 Trp, 1 Met	B	»	PIV	1) HF, 2) NaOH, pH 11,5	То же	АКА, БЭФ, ГЭФ, ТСХ	E	600	[103]
β-Липотропин (91)	91	1 Trp, 2 Met	B	Максимальное, бензильного типа	PV	1) HF, 2) NaOH, pH 11,5	СМ-целлюлоза, РХ (агароза)	АКА, ТСХ, БЭФ, КА, ГЭФ, иммуннохимич.	E, удельное вращение, КД-спектр	100	[104]
His (Bzl) ^{26,33} , Tug ⁵² -Аналог цитохрома с	104	2 Met, 2 Cys	B	»	PI	HF	ГХ (G-25), амберлит CG-50	-	-	2	[105]
Рибонуклеаза T ₁ (104) ^{2*}	4, 5, 6, 6, 7, 7, 11	4 Cys, 1 Trp	A	Неполное, бензильного типа	PI	HF					[106-110]

азы T_1 [50–56] (табл. 1) продолжают уже более 10 лет. Выигрыш во времени при работе на полимерном носителе дает больше возможностей для проб и вариаций в тактике синтеза, и неудача при твердофазном синтезе не так «трагична», как при классическом пути.

Как уже отмечалось, твердофазный метод в большинстве случаев синтеза крупных объектов обеспечивает меньший риск рацемизации, чем синтез в растворе [118, 119]. Но у твердофазного метода есть и существенные ограничения, и недостатки, несвойственные классическому методу. Широко известной проблемой твердофазного метода является микрогетерогенность конечного продукта, возникающая в результате неполного протекания реакций [120]. Таким образом, неочищенный конечный полипептид представляет собой смесь нужного пептида и побочных продуктов с укороченной длиной цепи, которую практически невозможно разделить с помощью современных методов очистки веществ. Кроме того, существует ряд нежелательных реакций, протекающих исключительно при синтезе пептидов на полимерном носителе.

При выборе тактики синтеза крупных пептидов представляется две возможности: последовательное наращивание цепи с С-конца и блочная конденсация фрагментов. Во всех примерах классического подхода, за исключением синтеза ингибитора гастрипа [22–25], предпочтение отдается фрагментной конденсации (табл. 1). Блочный вариант синтеза более благоприятен в смысле возможностей очистки продуктов, но дает повышенный риск рацемизации [121, 122]. При использовании твердофазного метода, наоборот, обычным является последовательное наращивание цепи (табл. 2). Метод блочной конденсации на полимерном носителе представляется перспективным, он применялся для получения таких крупных пептидов, как аналог урогастрола [82], ингибитор трипсина [87–91] и кардиотоксина [94–96], однако наилучшие результаты в твердофазном синтезе крупных пептидов пока получены при последовательном наращивании цепи с С-конца.

Одной из важных тактических задач пептидного синтеза является правильный выбор системы защитных групп. Природа любого синтезируемого пептида предъявляет жесткие требования к используемому набору защитных групп, и если ошибки в выборе защитных групп при синтезе коротких пептидов чаще всего снижают выходы и усложняют выделение продукта, то при синтезе крупного полипептида эти ошибки могут в конечном итоге свести на нет все усилия.

Остановимся подробнее на основных достоинствах и недостатках существующих систем защитных групп. Большинство пептидов, синтезированных классическим методом, получено с использованием минимального числа защитных групп (табл. 1). Преимуществами такого подхода являются простота удаления небольшого числа защитных групп на конечной стадии синтеза и возможность очистки промежуточных соединений в водно-органических средах. Кроме того, синтез с минимальной защитой боковых цепей, безусловно, более экономичен. Однако этот подход ограничивает выбор возможных методов конденсации. Чаще всего при этом используется азидный метод [50–62], а также методы смешанных ангидридов [8–20, 26–36], активированных эфиров [50–62] и N-карбоксиянгидридный метод [56–62]. Присутствие большого числа незащищенных функциональных групп вызывает множество побочных реакций. Низкая растворимость пептидов, содержащих одновременно гидрофильные и гидрофобные группировки, и, как следствие этого, низкие выходы продуктов реакций также являются недостатками этого подхода. Низкая растворимость крупных частично защищенных пептидов — серьезная проблема пептидного синтеза, с которой столкнулись при проведении синтезов ингибитора гастрипа [21], рибонуклеазы T_1 [50–56], рибонуклеазы S' [57–62].

Максимальная защита боковых функций аминокислот обеспечивает их инертность в ходе синтеза и ограничивает возможности побочных реакций, однако необходимость удаления большого числа защитных группировок на конечной стадии синтеза создает порой непреодолимые трудности.

В связи с этим следует подробнее остановиться на условиях удаления защитных групп. Все системы защитных групп можно разделить по методам их удаления на конечном этапе синтеза на четыре группы [123].

1. Каталитическое гидрирование над Pd. Оно протекает в очень мягких условиях, но, к сожалению, использование этого метода ограничено для пептидов с серосодержащими аминокислотами (недавно предложенный метод гидрирования в жидком аммиаке [124] в целом не решает проблемы).

2. Обработка натрием в жидком аммиаке. Это метод часто приводит к столь глубокой деструкции пептида, что в последнее время практически не применяется для получения крупных пептидов. Исключение составляет лишь синтез проинсулина [49] (табл. 1).

3. Обработка жидким фтористым водородом. В первую очередь этот реагент применяется для удаления защитных групп бензильного типа. Такие защитные группы были использованы в классических синтезах Δ^5 -кетостероидизомеразы [7], ингибитора гастрина [22–25], α -бунгаротоксина [37–40], рибонуклеазы А [63–66] (табл. 1). В случае рибонуклеазы А был использован близкий к HF, но более мягкий реагент — метансульфокислота. Самое широкое применение защитные группы бензильного типа, и соответственно фтористый водород, нашли в твердофазном методе синтеза пептидов (табл. 2).

Конечное деблокирование всех длинных пептидов, полученных твердофазным методом, осуществлено с помощью фтористого водорода, и лишь в одной работе, незавершенном синтезе аналога урогастрона [82], удаление защитных групп и отделение от полимерного носителя было проведено с помощью трифторуксусной кислоты. Жидкий фтористый водород нашел применение в синтезах огромного числа пептидов, однако выяснилось, что этот реагент вызывает множество нежелательных реакций, связанных как с удалением защитных групп, так и с имеющей место в ряде случаев необратимой деструкцией полипептидной цепи. Побочные реакции пептидов, вызываемые жидким HF, будут рассмотрены в разделе IV.

4. Обработка трифторуксусной кислотой в течение 0,5–1 ч при комнатной температуре. Такая обработка является одним из самых мягких методов удаления защитных групп с синтезированного пептида. При выборе трифторуксусной кислоты в качестве конечного деблокирующего реагента для боковых функций аминокислот обычно применяют защитные группы трет-бутильного типа. При такой схеме синтеза в качестве N^α-защитной группы возможно применение бензилоксикарбонильной группы (при отсутствии в полипептидной цепи остатков серосодержащих аминокислот) или таких кислотоллабильных групп, как Bpsc, Adoc, Ddz, либо щелочнолабильной Fmoc-группы.

Естественно, что работа со столь кислотоллабильными производными предопределяет свои сложности в ходе синтеза и очистки промежуточных соединений, однако синтез пептидов с использованием максимума кислотоллабильных группировок является в настоящее время одним из самых перспективных направлений. Максимальное блокирование функциональных групп кислотоллабильными защитными группировками пока еще не нашло широкого применения в синтезе крупных пептидов (в основном из-за коммерческой недоступности производных аминокислот и их чрезвычайной чувствительности к кислотам) и было использовано лишь в двух синтезах: незаконченном синтезе проинсулина [41–48] и синтезе аналога лизоцима [67–81] (табл. 1), неудачное завершение которого, по-видимому, не связано с использованным типом защитных группировок.

Следует остановиться на особенностях некоторых аминокислотных остатков, присутствие которых в пептидной цепи влечет за собой ряд осложнений.

Цистеин. Сложности в синтезе цистеинсодержащих пептидов (помимо затруднений с гидрированием) связаны с отсутствием удовлетворительных защитных групп для этой аминокислоты. Наиболее широко в синтезе крупных пептидов использовались S-бензильная, S-метоксибензильная и S-ацетамидометильная группы. Бензильная группа требует слишком жест-

ких условий удаления — обработки жидким HF при комнатной температуре или Na в жидком NH₃. Применение S-метоксибензильной группы может сопровождаться рядом нежелательных процессов (например, N→S-миграция при обработке HF [125] или окисление в ходе синтеза и последующая модификация в присутствии HF [126]) и, по-видимому, требует дальнейшего изучения. Еще недавно наиболее перспективной казалась Асм-группа, селективно удаляемая ацетатом ртути либо окислением, однако в последние годы выяснилось, что эта защитная группа также не лишена недостатков. Например, при не завершившихся успехом синтезах ингибитора трипсина (Kazal) [26—31] и аналога лизоцима [67—81] Асм-группу не удалось полностью удалить на конечной стадии синтеза.

В большинстве случаев синтез цистеинсодержащих пептидов подразумевает проведение на конечной стадии синтеза замыкания дисульфидных связей. Осуществление этой сложной реакции в случае пептидов и белков, неспособных к самостоятельной рекомбинации, может стать одной из критических стадий синтеза, приводящей к крайне низким выходам.

Проблема правильного замыкания дисульфидных связей с высоким выходом не является специфичной именно для крупных пептидов; протекание реакции зависит от числа остатков цистеина и от аминокислотной последовательности пептида. Самыми известными примерами пептидов, для которых замыкание мостиков протекает с низкими выходами, являются окситоцин, содержащий 9 аминокислотных остатков и одну S—S-связь, и инсулин, содержащий 2 цепи из 30 и 21 аминокислотного остатка и 3 S—S-мостика. Эта сложная и самостоятельная проблема хорошо освещена в обзорах Болдвина [127], Анфинсена и Шераги [128], Немети и Шераги [129] и в данной работе рассматриваться не будет.

Метионин. Присутствие в аминокислотной последовательности синтезируемого пептида остатков метионина (так же, как и остатков цистеина) во многом определяет тактику синтеза в связи с вышеупомянутыми осложнениями, возникающими при гидрировании, и, следовательно, исключает этот широко используемый метод деблокирования из арсенала способов удаления как «временных», так и «постоянных» защитных групп. Синтез метионинсодержащих пептидов также осложняется склонностью тиоэфирной группы к алкилированию и окислению.

Триптофан. Присутствие в полипептидной цепи остатков триптофана влечет за собой ряд осложнений, связанных с его окислительной деструкцией при обработке кислотами и алкилированием при удалении защитных групп. Особую трудность представляют твердофазные синтезы триптофансодержащих пептидов. Использование N^m-формильной защитной группы для триптофана предотвращает протекание этих реакций [130—133]. Однако это производное еще не получило широкого распространения и нашло применение лишь в твердофазном синтезе аполипопротеина С-1 [84, 85] и липотропина и его фрагментов [102—104] (табл. 2).

Гистидин. Отсутствие подходящих защитных групп для гистидина значительно осложняет синтез пептидов, в состав которых входит эта аминокислота. Предложенные в настоящее время защитные группы для гистидина либо удаляются в слишком жестких условиях, как, например, N^m-бензильная группа, либо лабильны в ходе синтеза (тозилльная и динитрофенильная группы); синтез же с незащищенным остатком гистидина сильно повышает вероятность побочных реакций и рацемизации [134, 135].

Таким образом, сложность и в ряде случаев даже сам успех предпринятого синтеза во многом зависят от числа и взаимного расположения в пептидной цепи остатков Cys, Met, Trp и в меньшей степени His, поэтому в табл. 1 и 2 приведено число остатков Cys, Met и Trp, входящих в состав каждого синтезируемого полипептида.

При рассмотрении основных стратегических проблем, которые приходится решать в ходе синтеза, необходимо остановиться на присущей лишь твердофазному методу синтеза проблеме выбора полимерного носителя. Наиболее широко используемый в пептидном синтезе сополимер стирола с 1—2% дивинилбензола [136] имеет ряд недостатков, например протекающие ацидолитического отщепления синтезируемого пептида от полимерно-

го носителя при удалении N^α-Вос-группы [114], присоединение аминокислот к полимерному носителю в ходе синтеза [137] и т. д., что инициирует работы по созданию и использованию новых полимерных носителей. Применение модифицированного полимерного носителя, например, бывает предпочтительным при синтезе амидов пептидов. В некоторых случаях использование нестандартного полимера позволяет избежать обработки жидким HF для отделения синтезируемого пептида от твердой фазы.

В настоящее время предложены десятки разнообразных полимерных носителей и методов присоединения первой аминокислоты к полимеру, однако при синтезе крупных пептидов преимущественно использовался стандартный полимерный носитель (табл. 2).

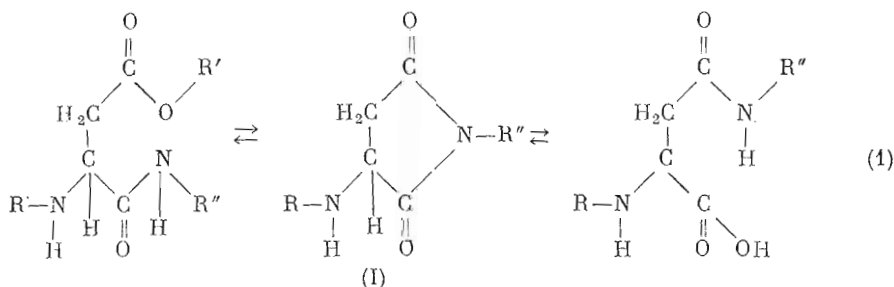
Модифицированный полимерный носитель был применен лишь в незаконченном синтезе урогастрола [82], чтобы избежать обработки пептидполимера жидким HF, в синтезе (41—91)-фрагмента липотропина [103] для отделения пептида от полимерного носителя в виде амида, а также в синтезах аполипопротеина С-1 [85] и β-липотропина [104]. Иногда применению нестандартных полимерных носителей предшествовали менее удачные синтезы с использованием сополимера стирола с дивинилбензолом, как, например, в случае аналога липотропина [102]. В случае аполипопротеина С-1 [84, 85] синтезы на стандартном полимере и на модифицированных полимерных носителях были осуществлены параллельно.

III. Побочные реакции в пептидном синтезе

В этом разделе будут рассмотрены основные побочные реакции, представляющие опасность при конденсации и удалении защитных групп в ходе синтеза пептидов. Безусловно, побочные реакции имеют место при синтезе пептидов любого размера, однако условия конденсации крупных блоков по стерическим причинам благоприятствуют протеканию нежелательных процессов из-за снижения скоростей реакции конденсации. Кроме того, отсутствие удовлетворительных методов аналитического контроля не позволяет в случае длинных пептидов не только четко идентифицировать побочные реакции, но часто даже установить факт их протекания. Проблеме образования нежелательных продуктов в ходе синтеза крупных пептидов обостряет отсутствие достаточно эффективных методов очистки нужного пептида от близкородственных продуктов побочных реакций. Еще более серьезные трудности аналогичного порядка возникают при твердофазном синтезе пептидов, когда очистка синтетического продукта возможна лишь на конечной стадии синтеза. Отсюда понятно, в сколь большой степени успехи синтетической пептидной химии зависят от систематических исследований побочных реакций с целью поиска оптимальных условий, сведения нежелательных процессов к минимуму.

Далее будут рассмотрены основные побочные реакции, протекающие в ходе синтеза пептидов.

1. Обработка аспартилсодержащих пептидов кислотами и щелочами приводит к образованию сукцинимидного производного, которое гидролизует с образованием смеси α- и β-пептидов (уравнение 1) [138—140].



Реакция протекает как в случае незащищенного остатка аспарагиновой кислоты, так и в случае его эфиров [141, 142], особенно бензильного [143],

Так, реакция Вос-Asp(OBzl)-Gly-OH с HBr/AcOH приводит к сукцинимидному производному (I) [141] с 70%-ным выходом, а при обработке Вос-Glu(OBzl)-Asp(OBzl)-Gly-Thr(Bzl)-P жидким HF в стандартных условиях образование этого производного происходит на 99% [144]. Реакция также катализируется основаниями, и скорость ее в большой степени зависит от появления в реакционной смеси избытков основания. Для ограничения этой реакции предлагается использовать при нейтрализации раствор 4-диметиламинопиридина [141].

Таблица 3

Скорость образования побочного продукта из нафтиламида Вос-Asp(OBzl)-X

X	$\tau_{1/2}$, ч	X	$\tau_{1/2}$, ч
Thr, Ser, Gly Ala, Leu, Phe, Trp, Ser(Bzl), Nle	$\frac{1}{2}$ -3 10-20	Glu, Asp, Tyr Val, Ile, Met	48-80 100-730

Скорость образования побочного продукта сильно зависит от природы следующей за аспарагиновой кислотой аминокислоты. Эта зависимость изучена в работе Бодански и Квей [143]. Результаты обработки β -нафтиламида Вос-Asp(OBzl)-X эквивалентом триэтиламина в диметилформамиде при 25° С приведены в табл. 3, $\tau_{1/2}$ — время, за которое нафтиламид Вос-Asp(OBzl)-X наполовину превращается в побочный продукт (контроль ТСХ).

Хороших результатов для подавления транспептидации удалось добиться добавками фенолов или 1-оксibenзотриазола [145]. Чтобы уменьшить образование побочного продукта в жидком HF, предложено использовать не бензиловые, а *трет*-бутиловые эфиры аспарагиновой кислоты, которые гидролизуются в присутствии HF [146], либо *n*-нитробензиловые эфиры, которые предварительно расщепляют гидроированием над Pd/C или обработкой цинком в 80% уксусной кислоте [147]. Янг и Меррифилд предложили решить проблему транспептидации применением β -фенациловых эфиров, которые почти не образуют сукцинимидных производных в HF [144]. Однако, по наблюдениям Бодански и Мартинез [148], β -фенациловые эфиры с высокой скоростью подвергаются перегруппировке в сукцинимидное производное в щелочной среде. Бодански с сотр. [141], анализируя возможности минимизации транспептидации, не смогли дать иных рекомендаций, кроме предложения работать с бензиловыми эфирами, но в тщательно контролируемых условиях.

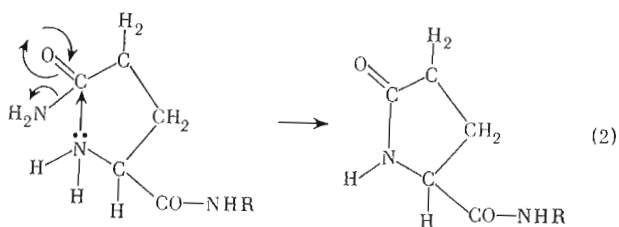
Аналогичная реакция транспептидации, приводящая к образованию β -разветвленных пептидов, имеет место и при работе с аспарагинсодержащими пептидами; следует отметить, что β -пептидная связь образуется даже в ходе мягких обработок, сопровождающих установление первичной структуры [149-152].

Природный тип связи Asp-Gly [51] и в Asp-Ser [153] расщепляется аминопептидазой M с меньшей скоростью, чем в других звеньях Asp-X; это обстоятельство может затруднить определение β -пептидов с помощью ферментативного гидролиза.

2. Аспарагин- и глутаминсодержащие пептиды претерпевают дезамидирование в самом широком диапазоне условий. Побочная реакция протекает как при обработках, сопровождающих выделение природных белков [154, 155], так и в ходе синтеза [156, 157]. Показано, что при синтезе аспарагинсодержащих пентапептидов степень дезамидирования варьирует от 0 до 20% в зависимости от природы пептидов. Максимальное количество продукта дезамидирования образуется, если остатку аспарагина предшествует в цепи остаток аргинина или лизина [156]. В ходе исследований по синтезу лизоцима [115, 116] (табл. 2), содержащего 13 остатков аспарагина и 3 остатка глутамина, предпринята попытка оценить степень дезамидирования в ходе синтеза [157]. Авторы полагают, что синтетиче-

ский лизоцим на 56–68% должен представлять собой продукт дезамидирования. В этой же работе отмечается, что дезамидирование глутамина протекает в меньшей степени, чем аналогичное превращение аспарагина [157].

3. N-Концевой остаток глутамина или бензильного эфира глутаминовой кислоты под действием кислых реагентов претерпевает перегруппировку в соответствующий пирролидон (реакция 2) [140, 158].



Впервые с трудностями в работе с глутамилсодержащими пептидами столкнулись в ходе твердофазного синтеза, когда после присоединения трех остатков Вос-Glu(OBzl) осталось лишь 50% исходных аминогрупп. Этот факт авторы объяснили образованием пирролидона глутаминовой кислоты в ходе удаления Вос-группы под действием HCl/AcOH [158].

4. Количественная оценка устойчивости защитных групп боковых функций аминокислот в условиях удаления N^α-Вос-группы в ходе твердофазного синтеза (20 мин, 50% CF₃COOH/CH₂Cl₂, 20° C) проведена Эриксоном и Меррифилдом [159, 160]. Лабильность Cys(MBzl) и Tyr(Bzl) в кислых условиях также отмечена Ямаширо и сотр. [161]. Частичная потеря боковых защитных групп в ходе синтеза приводит к разветвлению растущей пептидной цепи и к загрязнению синтезируемого пептида продуктами разветвления (табл. 4).

Таблица 4

Потеря боковых защитных групп в условиях твердофазного синтеза

Производные аминокислот	Потери на цикл, %	Производные аминокислот	Потери на цикл, %
Tyr(Bzl)	0,76	Ser(Bzl)	0,013
Lys(Z)	0,47	Asp(OBzl)	0,011
Tyr(Z)	0,11	Glu(OBzl)	0,009
Cys(MBzl)	0,098	Thr(Bzl)	0,0083

При удалении бензильной защитной группы с остатка Tyr(Bzl) кроме незащищенного тирозина образуется некоторое количество продукта алкилирования [159] (подробно эта реакция обсуждается в разделе IV, посвященном побочным реакциям во фтористом водороде).

Полученные данные свидетельствуют о неудовлетворительности ряда широко применяемых защитных групп для синтеза пептидов. В первую очередь это касается твердофазного метода, для которого проблема очистки от продуктов разветвления стоит наиболее остро. Эриксон и Меррифилд предлагают самые лабильные боковые защитные группы заменить на более устойчивые в условиях удаления N^α-Вос-группы [159]:

производное аминокислоты	% потери на цикл
Lys(3ClZ)	0,00062
Tyr(BzlCl ₂)	0,00014
Cys(4CH ₃ Bzl)	0,00004

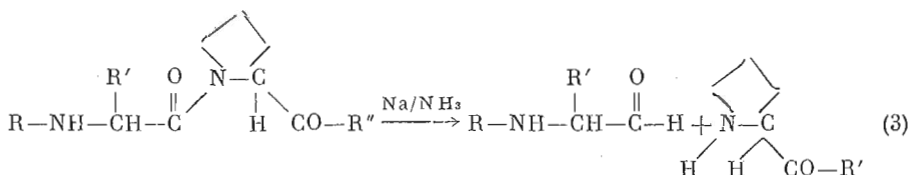
Очевидно, что степень гомогенности крупного синтетического пептида, особенно полученного твердофазным методом, сильно зависит от устойчивости используемых в ходе синтеза защитных групп. Рассмотренный материал приводит к выводу, что твердофазный синтез крупного пептида

с использованием традиционной системы защитных групп вряд ли можно считать удовлетворительным. Обсуждение с этой точки зрения осуществленных синтезов будет проведено в разделе VIII, посвященном синтетическим работам.

5. Реакция *трет*-бутилирования триптофана благодаря детальным работам групп Вюнша и Кишфалуди [130, 162–165] в настоящее время достаточно хорошо изучена. Этот процесс протекает при удалении защитных групп *трет*-бутильного типа такими реагентами, как трифторуксусная кислота, трис(трифторацетат) бора, жидкий фтористый водород и др. Продуктами реакции являются различные C^{1, 2, 3, 5, 7}, Nⁱⁿ-Bu'-производные триптофана [164]. Их выход в стандартных условиях удаления защитных групп колеблется от 0% в случае использования HCl до 95% в случае трис(трифторацетата) бора [165]. Однако следует иметь в виду, что применение HCl в различных растворителях влечет за собой значительную окислительную деструкцию триптофана [129]. Аналогичная реакция метоксибензилирования триптофана протекает и при удалении N²-метоксибензилоксикарбонильной группы [166].

Предложены различные добавки, понижающие скорость образования побочного продукта алкилирования: этандитиол для подавления реакции *трет*-бутилирования [167, 168] и тиоанисол или диметилсульфид в смеси со скатолом или этандитиолом для метоксибензилирования [166]. Для ограничения степени алкилирования триптофана рекомендовано защитные группы *трет*-бутильного типа удалить перед обработкой вещества HF, в ходе которой особенно велика скорость алкилирования [162]. Как уже отмечалось, наилучшим образом предохраняет триптофан от *трет*-бутилирования использование Nⁱⁿ-формильной группы [130]. Nⁱⁿ-Формильное производное триптофана является также самым предпочтительным в плане подавления реакции окислительного разрушения индольного кольца [131–133].

6. Высокая скорость расщепления связи X-Pro, протекающего по уравнению (3)



при обработке пептидов Na в жидком NH₃ [169, 170], ограничивает использование этого реагента в синтезе пептидов. Степень расщепления зависит от времени обработки. Так, расщепление связи Thr-Pro в случае B-цепи инсулина протекало на 20–25% за 15 с и на 80% за 60 с [170].

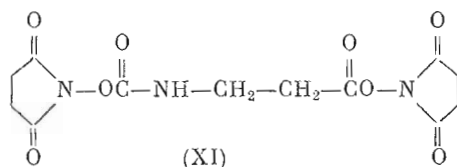
7. Реакция ацилирования незащищенных гидроксильных групп тирозина, серина и треонина в ходе синтеза пептидов с использованием минимума защитных групп является источником большого количества побочных продуктов [171, 172]. Неоднократно отмечалось, что точная дозировка основания снижает протекание побочных реакций [52, 173–176]. Так, реакция Z-Val-ONp с HCl·Tyr-OMe в присутствии 2 экв. триэтиламина приводит к O-пептиду с 40–50%-ным выходом, в то время как при проведении реакции в присутствии эквивалента триэтиламина депептид образуется в следовых количествах [176].

Реакция O-ацилирования протекает при использовании для конденсации как дициклогексилкарбодимид, так и активированных эфиров [171, 177]. Присутствие в пептидной цепи незащищенного остатка гистидина катализирует эту реакцию [171]. В то же время добавки пентахлорфенола и 2,4-динитрофенола снижают степень протекания этого процесса [172].

Скорость O-ацилирования треонина гораздо ниже скорости ацилирования серина и тирозина [172]. Незащищенная гидроксильная группа серина способна, кроме того, вступать в реакцию O-ацилирования и при

остается непонятным, насколько полно происходит разложение побочного продукта, как велико количество примесей в основных продуктах реакции и какова их природа.

10. Коротко остановимся на некоторых нежелательных реакциях, связанных с использованием дициклогексилкарбодимидов. а) При синтезе пептидов DCC/HONSu-методом, в том случае, если затруднено образование нормального N-оксисукцинимидного производного, из трех молекул HONSu образуется сукцинимидный эфир сукцинимидооксикарбонил-β-аланина (XI) [188], и в результате в пептидную цепь включается остаток β-аланина:



б) При синтезе Nps-пептидов DCC/HOBT-методом происходит отщепление 1-оксибензотриазолом N^α-Nps-группы и бывший Nps-пептид выступает в качестве N-компонента [189].

в) Реакция конденсации дициклогексилкарбодимидным методом в случае удаления N^α-защитной группы трифторуксусной кислотой и последующей нейтрализации сопровождается трифторацетилизацией аминоконпонента. Этот побочный процесс подавляется добавлением 1-оксибензотриазола [190].

Настоящий обзор нежелательных реакций, сопровождающих пептидный синтез, безусловно, не претендует на полноту и охватывает лишь наиболее важные, с нашей точки зрения, в плане синтеза крупных пептидов процессы. Специфические побочные реакции, связанные с синтезом пептидов на полимерном носителе, хорошо освещены в обзоре Эриксона и Меррифилда [140].

Побочные реакции, протекающие при удалении защитных групп жидким фтористым водородом, составляют большую и самостоятельную группу реакций, обсуждение которых тесно связано с вопросами применимости фтористого водорода в пептидной химии, поэтому они будут рассмотрены в разделе IV. Проблема рацемизации, которая формально представляет побочную реакцию пептидного синтеза, будет обсуждаться в разделе V.

Как следует из рассмотренного в данной главе материала, практически невозможно полностью избежать протекания побочных реакций в ходе синтеза крупных пептидов, можно лишь пытаться создать условия максимального их подавления. Кроме того, нет сомнений, что нам известны еще далеко не все нежелательные процессы, поскольку побочные продукты синтеза не всегда идентифицируются. Следовательно, принимая во внимание, что образование в ходе синтеза побочных продуктов практически неизбежно, со всей очевидностью на первый план выдвигается проблема выделения нужного продукта из смеси близкородственных веществ.

IV. Побочные реакции, протекающие при обработке пептидов жидким фтористым водородом

Фтористый водород, один из самых широко используемых реагентов в пептидной химии, впервые был применен Сакакибарой и Шимониши в 1965 г. [191]. Уникальные свойства фтористого водорода сделали его незаменимым при удалении защитных групп бензильного типа. Большинство работ по синтезу длинных пептидов было проведено с помощью этого реагента (см. табл. 1, 2).

Применение жидкого HF имеет следующие преимущества по сравнению с другими методами деблокирования [123, 125]:

удаление защитных групп возможно независимо от того, присутствует ли в молекуле атом серы или щелочнолабильные связи;

разнообразные защитные группы, удаление которых ранее проводили многоступенчато, этим реагентом отщепляются одновременно;

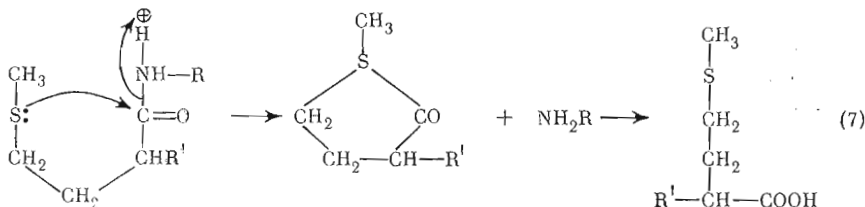
открывается возможность использования защитных групп повышенной стабильности, не затрагиваемых в ходе удлинения пептидной цепи;

сравнительная доступность продажных производных Вос-аминокислот с боковыми защитными группами, удаляемыми HF.

Свойства и использование жидкого HF в пептидной химии подробно рассмотрены в обзорах Сакакибары [125] и Ленарда [192]. Безусловно, своими достижениями пептидный синтез во многом обязан использованию фтористого водорода, открывшему широкие возможности для интенсивного развития методов синтеза пептидов. Однако в результате все повышающихся требований к гомогенности конечного продукта и в связи с накопленным опытом работы с этим реагентом стало выявляться все больше побочных реакций, протекающих в HF, и оказалось, что фтористый водород не является столь идеальным реагентом для пептидного синтеза, как казалось ранее.

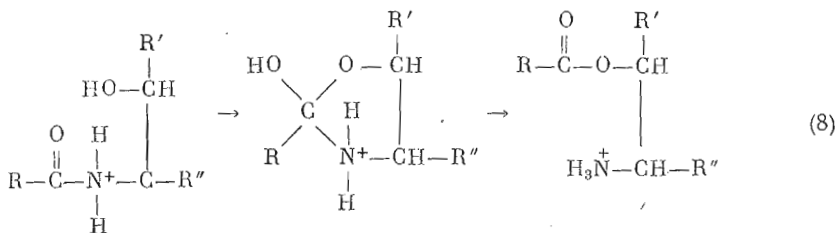
Ниже будут рассмотрены данные о нежелательных превращениях в жидком HF, которым подвергаются отдельные аминокислотные остатки, а также данные о неидентифицированных реакциях, протекающих при обработке HF природных белков. Рассмотрим основные реакции первого типа.

1. При длительной обработке пептидов HF при 30° С происходит расщепление связи Met-X, протекающее по механизму (7) [192, 193]:



В стандартных условиях удаления защитных групп (1 ч, 0° С) эта реакция может протекать лишь в незначительной степени.

2) N→O-ацильная миграция пептидов, содержащих остатки серина и треонина при обработке HF, идет по схеме (8) [193, 194]:



N→O-миграция в HF изучена лишь в условиях, обеспечивающих ее высокий выход (12–24 ч, 20–30° С) [195–197]. В стандартных условиях обработки пептидов эта реакция должна протекать в небольшой степени, но ею нельзя пренебрегать, учитывая высокое содержание в природных белках остатков серина и треонина. N→O-Миграция обратима, и обработкой O-пептида раствором бикарбоната натрия количественно проводят O→N-миграцию, в ходе которой, что очень важно, не наблюдается рацемизации [195, 197].

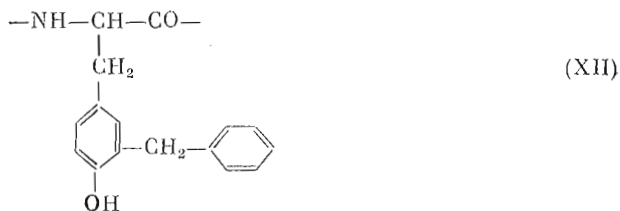
Из сказанного следует, что все Thr,Ser-содержащие пептиды, подвергнутые контакту с жидким HF, должны быть немедленно обработаны бикарбонатом натрия. Если же проведение O→N-миграции отложить до более поздней стадии, то имеющиеся в некоторых количествах O-пептиды могут подвергаться гидролизу в ходе дальнейших обработок и выделения [195].

3. При контакте триптофансодержащих пептидов с жидким HF протекает деструкция остатка триптофана [195], осложняющая деблокирование триптофансодержащих пептидов. Реакция в некоторой степени подавляется

добавлением в среду меркаптоэтанола [125] или триптофана [111, 125], однако полностью избежать деструкции можно лишь при использовании Nⁱⁿ-формилтриптофана [131—133].

4. Побочные реакции алкилирования, вызываемые карбокатионами, которые образуются при отщеплении защитных групп HF, в большой степени подавляются добавлением в систему анизола [191]. В последние годы с целью ограничения этой побочной реакции стали использовать более эффективные акцепторы карбокатионов, например в синтезе β-липотропина был использован 2,4-диметиланизол [104]. Реакция алкилирования включенного в пептидную цепь метионина подавляется добавлением в реакционную смесь больших количеств свободного метионина [60].

В результате реакции внутримолекулярного алкилирования остатка тирозина, протекающей при отщеплении O-бензильной защитной группы, образуется устойчивый к действию HF остаток 3-бензилтирозина (XII)



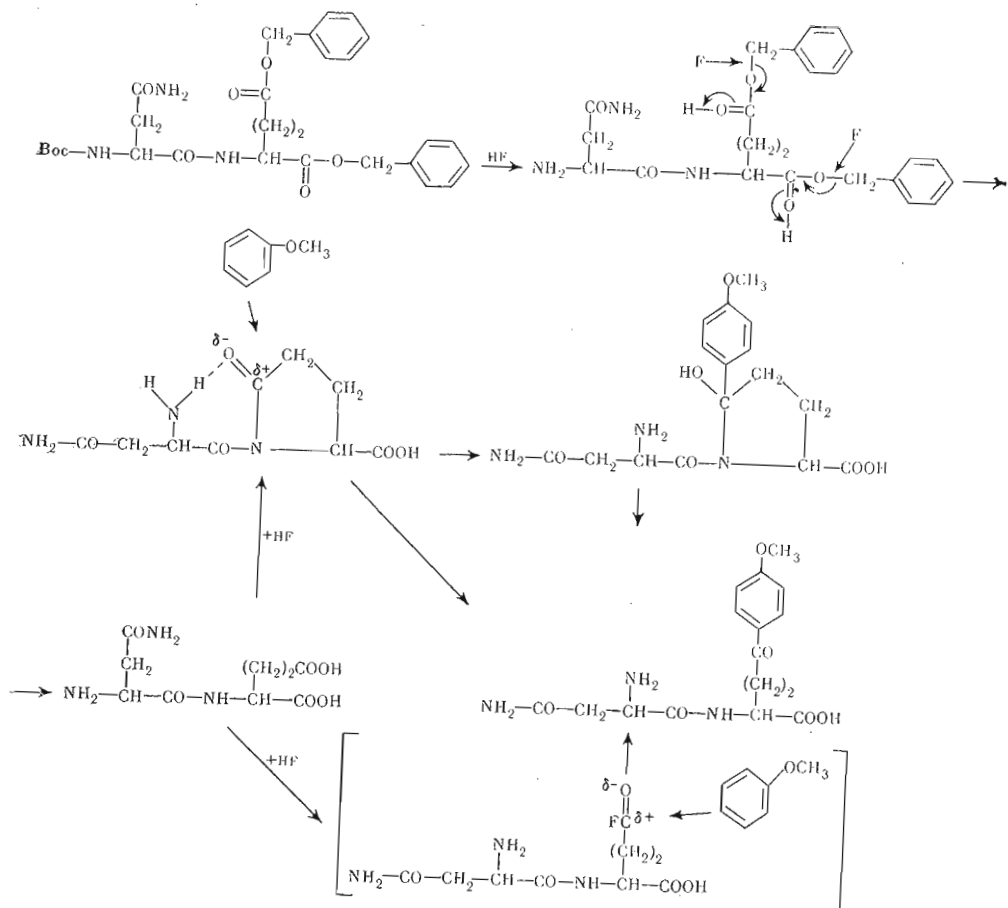
Алкилирование тирозина обнаружено и тщательно исследовано Эриксоном и Меррифилдом [159, 160]. Авторами предложена новая, 2,6-дихлорбензильная защитная группа для фенольного гидроксила тирозина. Образующиеся при ее отщеплении хлорсодержащие арилалкилы менее склонны к образованию продуктов алкилирования, чем бензильные производные. Обработка жидким HF в течение 10 мин при 0° С в присутствии анизола Вос-Тур (Bzl)-ОН приводит к образованию 15% побочного продукта, в то время как при аналогичной обработке Вос-Тур (BzlCl₂)-ОН образуется 5% продукта алкилирования. Для синтеза длинных пептидов с высоким содержанием тирозина этот уровень алкилирования слишком велик, поэтому Энгельгард и Меррифилд предложили, кроме того, использовать O-циклогексилтирозин, степень алкилирования которого при обработке HF составляет менее 0,5% [198].

5. Из остатка γ-бензилового эфира глутаминовой кислоты в жидком HF возможно образование либо пирролидона, либо продукта апилирования глутаминовой кислоты [199—201]. Эта реакция, как и реакция алкилирования тирозина, относится к числу немногих детально изученных побочных реакций. Основной вклад в ее изучение и идентификацию внесли Сано и Каваниши [199, 200], Фейнберг и Меррифилд [201]. Последовательность происходящих реакций отражена на схеме (см. с. 23).

Скорость образования побочного продукта зависит от состава и конфигурации пептида. Имеется ряд рекомендаций, как избежать образования побочных продуктов либо снизить скорость их появления. Фейнберг и Меррифилд [201] предложили уменьшить время обработки HF до 30 мин, однако не все защитные группы могут быть удалены за столь короткий срок.

Японские исследователи предлагают использовать для защиты γ-карбоксила глутаминовой кислоты *n*-нитробензиловый эфир, устойчивый к действию HF и удаляемый обработкой цинком в уксусной кислоте [202]. Сугано и сотр. [203] описали более мягкий по сравнению с HF реагент для удаления защитных групп — пиридин в HF. При обработке защищенных пептидов 5—30%-ным пиридином в HF сохраняются, по данным аминокислотного анализа, высокие выходы глутаминовой кислоты, однако этот реагент недостаточно эффективен для удаления гидрофобных групп с длинных пептидов.

6. Нежелательные процессы протекают также и с пептидами, содержащими остаток S-бензилцистеина. По данным Сакакибары [125, 204], S-бензильная группа с остатка цистеина отщепляется жидким HF количественно за 0,5 ч при 20° С. Бензильная группа для защиты меркаптофункции



цистеина неоднократно использовалась в ходе синтеза крупных пептидов [87–91, 94–96, 105, 113, 114, 117] (табл. 2, синтеза ингибитора трипсина (Kunitz), кардиотоксина, аналога цитохрома *c*, рибонуклеазы А и гормона роста), несмотря на жесткие условия ее удаления.

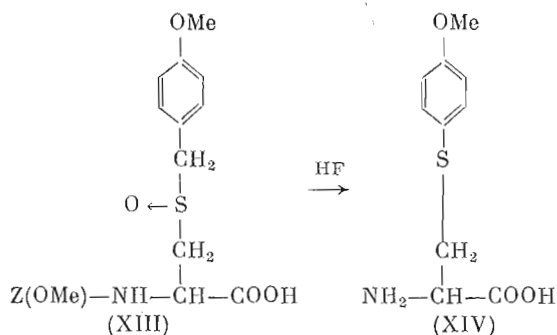
Ввиду широкого применения этой защитной группы в синтезах крупных пептидов имеет смысл описать интересные исследования поведения остатка Cys(Bzl) при обработке HF [116], проведенные в ходе синтеза лизоцима (табл. 2), содержащего 8 остатков цистеина. Данные аминокислотного анализа синтетического лизоцима, полученного твердофазным методом с использованием S-бензильной защитной группы, после обработки жидким HF в течение 90 мин при 0° С и окисления показали присутствие 2,7 остатка Cys(Bzl) и следы цистеина, после повторной обработки HF при 20° С обнаружено 0,5 остатка Cys(Bzl) и следы цистеина.

Для выяснения причин низкого выхода цистеина Boc-Cys(Bzl)-ОН обрабатывали жидким HF при 20° С и полученное вещество подвергли кислотному гидролизу. При аминокислотном анализе 86% продукта обнаруживалось на месте выхода пролина в виде пика с плечом. Основываясь на том, что поглощение нингидринового производного этого продукта при 440 нм больше, чем при 560 нм, авторы предполагают, что полученное вещество представляет собой имин. 5% от общего материала составлял цистеин и 10% — S-бензилцистеин. Проведенное исследование ставит под сомнение результаты многих работ по синтезу крупных пептидов с использованием S-бензильной защитной группы.

7. На возможность протекания нежелательных реакций по остатку S-метоксибензилцистеина Сакакибара обратил внимание в 1971 г. [125]. Хотя S-метоксибензильная группа с цистеина, по данным Сакакибары, количественно удаляется HF за 0,5 ч при 0° С, автор обнаружил, что в результате обработки H-Gly-Cys(MBzl)-ОН жидким HF число SH-групп составляло

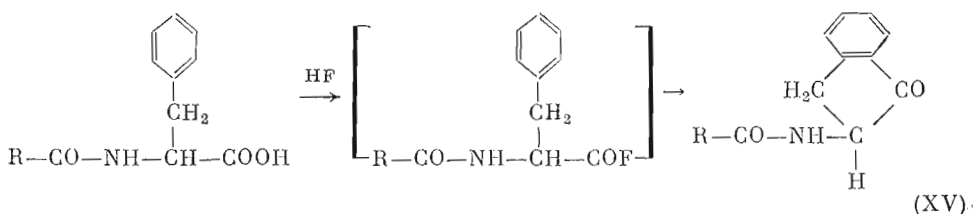
лишь 70% от теоретического, щелочная обработка реакционной смеси повышала выход SH-групп до 80%. Сакакибара это явление объясняет возможным протеканием N→S-миграции в присутствии HF, в щелочной же среде S-пептид превращается вновь в N-пептид. Однако в отличие от N→O-миграции (см. раздел IV.2) N→S-миграция протекает с образованием промежуточного тиазолина, что влечет за собой рацемизацию как остатка цистеина, так и остатка соседней аминокислоты [20].

8. Еще одной возможной побочной реакцией остатка S-метоксибензилцистеина является образование в ходе синтеза сульфоксида (XIII), который в жидком HF превращается в S-*n*-метоксифенилцистеин (XIV) [126].



Вновь образованный остаток S-*n*-метоксифенилцистеина устойчив к действию HF. Степень окисления производных цистеина в ходе синтеза не исследована, но авторы предлагают синтетические цистеинсодержащие пептиды перед обработкой HF восстанавливать тиофенилом [126, 206].

9. Длительная обработка HF пептидов, содержащих C-концевой фенилаланин, приводит к образованию циклического производного (XV) [125]



При обработке пептидов жидким HF также возможны реакции транспептидации, дезамидирования и алкилирования (триптофана), рассмотренные в предыдущем разделе как общие побочные реакции пептидного синтеза.

Таковы основные нежелательные реакции, протекающие при удалении защитных групп с синтетических пептидов жидким HF. Следует отметить, что степень протекания этих реакций сильно зависит от природы пептида. По-видимому, этим можно объяснить имеющиеся в ряде работ указания на отсутствие побочных реакций в ходе удаления защитных групп [207–209]. Безусловно, для того чтобы иметь возможность прогнозировать на основе первичной структуры пептида и его системы защитных групп протекание тех или иных побочных реакций при обработке HF, необходимы детальные и тщательные кинетические исследования этих реакций, а также накопление большого фактического материала с целью установления зависимости скорости побочных реакций от природы пептида.

Большой интерес в связи с обсуждаемой проблемой представляют данные об отношении природных пептидов и белков к действию жидкого фтористого водорода. Ряд белков, такие, как кобротоксин [98] и ингибитор трипсина (Kunitz) [210], устойчивы в стандартных условиях обработки HF. Рибонуклеаза А проявляет 90% активности после обработки HF при -78°C в течение 2 ч, однако аналогичная обработка при 0°C вызывает па-

денне активности до 44–80% [211]. Данные аминокислотного анализа рибонуклеазы А, обработанной HF в течение 1,5 ч при 0–15° С, отличаются от данных анализа нативного белка [114].

Существуют белки, претерпевающие значительные модификации в HF. Например, урогастрон, хотя и сохраняет после обработки HF свою функциональную активность, отличается от природного белка по электрофоретической подвижности [82]. Ацилпереносящий белок полностью дезактивируется под действием HF [99, 100]. Явления деструкции белков в HF мало изучены и не нашли своего объяснения.

В ходе синтеза некоторых крупных пептидов более глубоко исследовано поведение белков в жидком HF. В работе группы Хиршмана была сделана попытка моделирования условий удаления защитных групп с синтетической рибонуклеазы S [60]. Несмотря на то что S-белок устойчив к действию HF (0° С, 1 ч), его обработка (после размыкания S–S-связей) ацетамидометанолом в жидком HF, удаление Асм-группы действием Hg(II), окисление и тщательная очистка приводят к получению продукта с хроматографическими характеристиками нативного белка, но с активностью 90% [212]. Аналогично был исследован ингибитор трипсина (Kunitz) [210]. Авторы показали полную стабильность белка в нативном виде к действию HF, при обработке же восстановленного белка с разомкнутыми S–S-связями образуется продукт с 50% активности (нормальное реокисление протекает количественно).

Интересные работы проведены по моделированию условий удаления защитных групп в ходе твердофазного синтеза лизоцима [116]. После обработки HF нативный лизоцим сохраняет 70% активности. Аналогичная обработка восстановленного лизоцима и последующее реокисление приводят к 10% активности. Реакцией восстановленного лизоцима с жидким HF в присутствии набора производных аминокислот с защитными группами бензильного типа в количествах, эквивалентных их соотношению в лизоциме, получен продукт лишь с 2–3% активности. При интерпретации этих результатов надо иметь в виду, что выход лизоцима на стадии восстановления-реокисления составляет 25%.

Японскими исследователями [213–216] в плане поиска оптимального набора защитных групп детально исследовано действие HF на природный и модифицированный лизоцим, причем полученные результаты несколько отличаются от приведенных выше. Обработка жидким HF лизоцима с разомкнутыми мостиками приводит к 5%-ному выходу активной фракции. Этот выход можно повысить добавлением к реакционной смеси веществ тиольной природы. В присутствии 1,4-бутандитиола или L-цистеина выход достигает 33 и 29% соответственно.

Удивительные результаты получены при обработке восстановленного лизоцима в присутствии набора всех защищенных аминокислот. В этом случае выход достигает 25%, в то время как при обработке в присутствии отдельно взятых защищенных аминокислот выходы варьируют от 3 до 10%. Анализируя выходы продукта после обработки HF модифицированного лизоцима с введенными в него различными защитными группами, авторы дают рекомендации относительно применимости различных защитных групп в синтезе лизоцима. Наиболее удобным оказалось использование 2-хлорбензильноксикарбонильной группы для защиты аминофункции и 4-метилбензильной группы для защиты сульфгидрильной функции цистеина.

Заканчивая обсуждение нежелательных реакций, протекающих в HF, отметим, что основную опасность эти реакции представляют при синтезе больших пептидов, так как в этом случае удаление частично модифицированных продуктов крайне затруднительно.

К сказанному можно добавить, что в настоящее время наблюдается известный скептицизм по отношению к HF как деблокирующему агенту в противоположность оптимизму, имевшему место 9–10 лет назад, во времена успешного, как тогда казалось, завершения синтезов различных белков: рибонуклеазы А [113, 114], рибонуклеазы S [57–62] и т. д. Сейчас наиболее перспективные подходы к синтезу крупных пептидов не связаны с применением HF.

В заключение приведем достаточно объективную оценку жидкого фтористого водорода, данную Сакакибарой [125], внедрившим этот реагент в практику пептидного синтеза: «... безводный HF, бесспорно, является уникальным и полезным реагентом в пептидном синтезе, и ряд сложнейших пептидов был синтезирован с его помощью. Однако нельзя игнорировать тот факт, что HF является сильнейшей из известных кислот, а также мощным катализатором обычных ионных реакций. Из этого следует, что HF в ходе синтеза пептидов всегда должен применяться осторожно, особенно в том случае, когда он способствует протеканию различных побочных реакций».

У. Проблема рацемизации в синтезе крупных пептидов

Проблема рацемизации представляет собой одну из самых серьезных задач, которые приходится решать в ходе синтеза строго индивидуальных в оптическом и химическом плане крупных полипептидов. Освещение всех вопросов рацемизации в пептидном синтезе далеко выходит за рамки настоящего обзора литературы, и в данном разделе будут обсуждаться лишь дополнительные сложности, обусловленные спецификой синтеза крупных полипептидов. Самые различные аспекты процесса рацемизации прекрасно освещены в обзорах Кемпа и Ковача [217, 218], причем очень хорошо продемонстрировано специфическое значение этой проблемы именно для синтеза крупных пептидов. Показателен в этом отношении следующий пример, приведенный Кемпом [217]: хорошей моделью пептида, синтезированного классическим методом — конденсацией шести блоков, является 50-членный пептид, в котором 44 аминокислотных остатка содержат 0,2% *D*-энантиомера и 5 аминокислотных остатков содержат 5% *D*-энантиомера. Такой продукт состоит из полностью-*L*-пептида на 70,8%. Остальные 29,2% представляют собой примесь 280 самых различных эпимерных продуктов; очевидно, что выделить из этой смеси нужный продукт крайне сложно.

Строго говоря, все известные методы образования пептидной связи сопряжены в большей или меньшей степени с риском рацемизации [219]. При последовательном наращивании пептидной цепи, в том числе и твердофазным методом, рацемизация протекает в небольшой степени (<0,1% эпимерного продукта) [118, 119]. Исключение составляет введение остатка гистидина, сильно подверженного рацемизации [134, 135]. Менее благоприятна ситуация при конденсации фрагментов, поскольку в этом случае соотношение скоростей аминолиза и рацемизации может уменьшаться за счет снижения скорости конденсации по мере роста пептидной цепи [218].

В азидном методе конденсации фрагментов рацемизация может достигать 4—16% [121], хотя традиционно этот метод всегда считался благоприятным в отношении рацемизации [220]. В случае синтеза DCC/HONSu методом рацемизация может достигать 19—46%, а в случае DCC/HOBT-метода — 30% [122]. Хотя приведенные цифры являются самыми высокими из описанных в литературе, они иллюстрируют, в сколь высокой степени может протекать рацемизация при конденсации фрагментов при наличии стерически затрудненных N- и C-концевых аминокислотных остатков. В среднем при фрагментной конденсации уровень рацемизации, конечно, ниже и колеблется от сотых долей до нескольких процентов [122, 221—223]. Степень рацемизации в ходе синтеза зависит не только от метода конденсации, но также от природы и аминокислотной последовательности пептидов [224], характера и природы используемых защитных групп [225], растворителя [226], основания [12], температуры [227], соотношения реагентов [228] и многих других факторов.

Существенная рацемизация может протекать во время удаления защитных групп щелочным омылением [229] и натрием в жидком аммиаке [230]. По имеющимся в литературе данным [231], карбодимидный метод синтеза пептидов в растворе относится к наиболее опасным в отношении рацемизации (до 90%), несмотря на удовлетворительные результаты по применению этого реагента в твердофазном синтезе [718]. По данным Сакакибары [123], в ходе конденсации методом активированных эфиров протекает значительная рацемизация (до 40%) C-концевой аминокисло-

ты аминокомпонента в случае защиты ее карбоксильной группы солеобразованием.

Таким образом, нельзя полностью избежать рацемизации в ходе синтеза крупного пептида. Представляется возможным лишь принять все меры для ее понижения, т. е. проводить фрагментную конденсацию по С-концевым остаткам глицина или пролина, использовать наименее опасные в плане рацемизации азидный или дициклогексилкарбодиимидный (с различными добавками) метод конденсации. Кроме того, необходимо исключить конденсацию в растворе карбодиимидным методом без добавок, исключить присутствие избытков основания в реакционной смеси, особенно триэтиламина, максимально понизить температуру реакции, по возможности исключить процесс омыления и обработки Na в жидком NH_3 и т. д.

Обычно в ходе синтеза пептидов остается открытым вопрос об оптической однородности исходных аминокислот и их производных. На этом дополнительном источнике гетерогенности пептидов акцентируют внимание Эриксон и Меррифилд в обзоре по твердофазному синтезу [140]. Авторы подчеркивают необходимость контроля оптической чистоты продажных аминокислот, поскольку они часто не соответствуют стандартам и степень содержания рацематов в них достигает 0,2–2,7%.

Таким образом, в ходе синтеза крупного полипептида с большой вероятностью происходит загрязнение нужного продукта эфирными примесями и на первый план выходят проблемы выделения конечного продукта из смеси близкородственных диастереомеров и доказательства оптической чистоты синтетического пептида.

Одним из самых популярных и традиционных методов очистки является кристаллизация. Но этот метод эффективен лишь для некоторых коротких пептидов. Кроме того, эффективность кристаллизации как метода очистки падает с понижением содержания примесей в основном продукте [221]. В ряде случаев эфирные примеси ди- и трипептидов удается отделить с помощью традиционной колоночной хроматографии. Возможность применения этого метода очистки дает большие преимущества классическому методу синтеза перед твердофазным. В общем случае выделение синтетического пептида из смеси эфирных продуктов представляет собой сложную проблему, не обещающую своего окончательного решения. Новаторские работы, в которых с помощью эффективных методов очистки удалось разделить диастереомерные смеси секретина [232], окситоцина [233], кальцитонина [123], эндорфинов [234] и инсулина [235], в основном демонстрируют широкие возможности распределительной хроматографии, высокоэффективной обратнофазной хроматографии и других современных методов очистки, но ни в коей мере не предлагают достаточно разработанных общих методик разделения эфирных смесей.

Остановимся на оптической чистоте крупных синтетических пептидов, перечисленных в табл. 1 и 2. Ни в одном из приведенных примеров не была применена какая-либо эффективная очистка продуктов с целью получения оптически гомогенного конечного пептида независимо от того, насколько щадящими в плане рацемизации были условия синтеза. Исключения, возможно, составляют синтезы β -липотропина [104] и его укороченных аналогов [102, 103] (табл. 2), в которых выделение конечного продукта проводилось с помощью распределительной хроматографии. Поскольку эффективность используемых условий хроматографии для разделения эфирных производных липотропина не была исследована, можно говорить лишь о вероятном удалении рацематов.

Для установления оптической чистоты синтетических пептидов используются следующие методы: сравнение оптических свойств синтетического и природного продуктов; анализ данных ферментативного гидролиза; обнаружение D-аминокислот в кислотном гидролизате. Для характеристики двух крупных синтетических пептидов проводилось сравнение удельного вращения синтетического и природного продукта — рибонуклеазы А, синтезированной Яджимой и сотр. [63–66], и β -липотропина, полученного Ямаширой и Ли [104] (табл. 1, 2). Однако совпадение удельного вращения является неудовлетворительным тестом оптической гомогенности про-

дукта из-за низкой чувствительности этого метода [140]. Сравнение спектров КД синтетических и природных продуктов — более надежный критерий идентичности. Такой анализ был проведен в случае α -бунгаротоксина [40], аполипопротеина С-1 [85], ингибитора трипсина (Kunitz) [92] и его Phe-аналога [93], кардиотоксина [94–96] и β -липотропина [104] (синтез 6, табл. 2). Различия в КД-спектрах синтетического и природного α -бунгаротоксина объясняются присутствием большого количества примесей, отличающихся от нативного белка в первую очередь химическими, а не оптическими свойствами. Синтетические β -липотропин, кардиотоксин и аполипопротеин имели КД-спектры, близкие к спектрам природных полипептидов, а в случае ингибитора трипсина наблюдалось полное совпадение КД-спектров. Однако следует иметь в виду, что КД-спектр является аддитивной характеристикой и его чувствительность к небольшим изменениям в молекуле зависит от природы данного белка. Так, КД-спектры ингибитора трипсина и его неактивного Phe-аналога идентичны, что не свидетельствует в пользу высокой чувствительности этой характеристики к модификациям данного белка, и вряд ли совпадение в данном случае КД-спектров синтетического и природного ингибитора является, как утверждают авторы, доказательством отсутствия сколько-нибудь значительной рацемизации в ходе синтеза. При оценке КД-спектров кардиотоксина как характеристики оптической гомогенности следует помнить о довольно высокой конформационной устойчивости кардиотоксинов [236].

Второй метод оценки оптической чистоты синтетических пептидов — это ферментативный гидролиз с последующим аминокислотным анализом, самый популярный подход к анализу оптической гомогенности синтетических пептидов. Как следует из табл. 1 и 2, ферментативный гидролиз конечного продукта проводился лишь для 7 из 20 синтезированных пептидов: β -липотропина [104] и его укороченных аналогов [102, 103], рибонуклеазы А [114], лизоцима [116], а также рибонуклеазы S [62] и ингибитора гастрина [25]. Однако хорошее совпадение данных аминокислотного анализа с теорией наблюдалось лишь в случае (42–91)- и (41–91)-фрагментов липотропина. В ряде случаев для пептидов, синтезированных в растворе, приведены результаты ферментативного гидролиза фрагментов [26–36, 50–56, 57–62]. Однако для оценки оптической чистоты конечного продукта такая информация недостаточна, так как она не отражает результатов рацемизации, протекающей при фрагментной конденсации.

Ценность данных ферментативного гидролиза длинных пептидов весьма относительна [140], поскольку получаемая информация зависит как от специфичности ферментов к гидролизу исключительно связей между L-аминокислотами, так и от ошибки аминокислотного анализа; в результате точность полученных данных оказывается ниже допустимых пределов рацемизации. Относительная ценность гидролиза аминопептидазой M продемонстрирована на примере анализа оптической чистоты синтетического кальцитонина в работе Сакакибары [123]. По данным гидролиза синтетического кальцитонина аминопептидазой M, в молекуле присутствует 3,00 остатка L-фенилаланина, что совпадает с теорией, однако обработка кислото гидролизата L-аминооксидазой и последующий аминокислотный анализ указывают на присутствие в гидролизате 15% D-фенилаланина. Учитывая степень рацемизации фенилаланина в ходе кислотного гидролиза, автор заключает, что в ходе синтеза образуется 10,5% D-фенилаланина.

Формально к ферментативным методам анализа оптической чистоты можно отнести сравнительное изучение пептидных карт синтетического и природного продуктов. Однако, как будет показано в разделе VI, этот подход часто оказывается нечувствительным к гораздо менее тонким изменениям в структуре, так что вряд ли, основываясь на совпадении пептидных карт, можно судить о хиральной целостности синтетического пептида.

Третий метод анализа гомогенности пептидов — обнаружение D-аминокислот в кислом гидролизате [237]. В настоящее время разработаны тонкие методы анализа диастереомерных смесей аминокислот, такие, как газожидкостная хроматография [238], гидролиз L-аминооксидазой [239] и т. д., но существенным ограничением метода является рацемизация ами-

нокислот в ходе кислотного гидролиза, поэтому точность метода ограничена точностью определения процента образования *D*-аминокислот в ходе гидролиза. Самые корректные результаты, естественно, получаются при сравнении гидролизатов синтетического и природного продуктов [140]. Этот подход не был применен ни в одном из синтезов, описанных в табл. 1 и 2. В ходе синтеза α -бунгаротоксина [37] был использован газофазный хроматографический анализ гидролизатов, однако лишь для некоторых защищенных фрагментов.

Итак, отсутствие абсолютно свободных от рацемизации методов конденсации и тот факт, что ни один из крупных синтетических пептидов не был подвергнут надежной очистке от примесей эпитимических продуктов, а также отсутствие надежного контроля оптической чистоты конечного продукта позволяют сделать вывод, что получение строго оптически гомогенного крупного полипептида остается делом будущего.

VI. Проблемы очистки и оценки степени гомогенности крупных синтетических пептидов

Как следует из рассмотренного выше материала, результатом всех встречающихся в ходе синтеза методических сложностей и несовершенства стратегических и тактических подходов является накопление по мере удлинения пептидной цепи некоторого количества примесей. Именно поэтому большинство проблем пептидного синтеза в конечном счете сводится к необходимости отделения этих примесей от целевого продукта. Проблема очистки неразрывно связана с вопросами контроля гомогенности синтетических пептидов. Очистка и оценка индивидуальности необходимы как для промежуточных защищенных пептидов, так и для конечного продукта синтеза. Как уже было отмечено, характеристика промежуточных пептидов возможна только в случае классического подхода, при использовании твердофазного метода очищать можно лишь конечный продукт. Очистка и анализ коротких защищенных пептидов в подавляющем большинстве случаев не являются сложной проблемой. Под «короткими пептидами» в общем случае подразумеваются полностью заблокированные ди- — декапептиды и минимально защищенные ди- — пентадекапептиды. Однако эти границы условны, и возможности очистки небольших защищенных пептидов методами классической пептидной химии в большой степени зависят от их аминокислотной последовательности и природы защитных групп.

Наибольшие трудности встречаются при выделении и оценке степени чистоты крупных защищенных пептидов, поскольку для этих объектов оказываются неприемлемыми многие методы, используемые для коротких пептидов (экстракция, кристаллизация, тонкослойная и колоночная адсорбционная хроматография, электрофорез и т. д.). С увеличением длины анализируемого пептида падает информативность данных аминокислотного анализа и практически сводится к нулю информация, получаемая из данного элементного анализа. Часто результаты синтеза крупных пептидов оцениваются по соотношению «диагностических аминокислот», т. е. аминокислот, присутствующих в одном и не присутствующих в другом из конденсируемых фрагментов и устойчивых в условиях гидролиза [56].

Необходимо сказать несколько слов о кристаллизации как об одном из самых широко используемых методов очистки. Прием, часто называемый в синтетических работах кристаллизацией, является фактически пересаживанием и вряд ли может служить эффективным методом очистки. Типичной в этом отношении является работа Яджимы и сотр. [22—25] по синтезу ингибитора гастриана.

Ограниченные возможности очистки можно проиллюстрировать рядом примеров. В ходе анализа защищенных фрагментов рибонуклеазы А [64] (табл. 1) методом тонкослойной хроматографии большинство пептидов оставалось на старте. В работе по синтезу рибонуклеазы T₁ группой Гофмана [56] (табл. 1) отмечалось, что при тонкослойной хроматографии подвижность фрагментов Н-(48—65)-ОН и Н-(24—104)-ОН была одинакова в нескольких системах. Некоторые защищенные фрагменты рибонуклеазы

T₁, неоднородные при тонкослойной хроматографии, имели удовлетворительные данные аминокислотных анализов как после кислотного, так и после ферментативного гидролиза, а также совпадающие с теоретическими значениями элементного анализа [51].

Возможности очистки защищенных пептидов во многом определяются природой используемых защитных групп. В случае крупных пептидов, содержащих небольшое число защитных групп, возможно применение ионообменной, распределительной, обратнофазной хроматографии, гель-фильтрации и противоточного распределения. Набор методов очистки частично защищенных пептидов ограничен их низкой растворимостью в органических и водноорганических растворителях. Так, крайне низкая растворимость некоторых частично защищенных фрагментов отмечалась в работах по синтезу рибонуклеазы T₁ группы Гофмана [50—56] и рибонуклеазы S группы Хиршмана [57—62] (табл. 1).

Наименее благоприятно обстоит дело с методами разделения максимально защищенных крупных пептидов, не имеющих заряженных групп и нерастворимых в водноорганических средах. Колоночная гель-хроматография в сущности единственный способ очистки таких пептидов. Большое развитие этот метод получил в работах группы Кеннера [68—70] по разделению защищенных фрагментов аналога лизоцима. Разделение продуктов фрагментных конденсаций проводилось на носителях Enzacyl K2 и сефадексах LH-20 и LH-60 в диметилформамиде или N-метилпирролидоне. Однако, как следует из анализа экспериментальных результатов этих работ, недостаточной высокой эффективности колонки и низкая селективность носителя позволяют отделять лишь продукты фрагментных конденсаций от исходных компонентов, к тонким же изменениям структуры этот подход нечувствителен.

Принимая во внимание ограниченный набор методов очистки промежуточных продуктов синтеза, а также учитывая отсутствие промежуточной очистки в ходе твердофазного синтеза, исключительное значение следует уделить выделению синтетического пептида после удаления защитных групп. Для этих целей можно использовать весь арсенал методов белковой химии. Естественно, что качество очистки зависит от эффективности используемых методов разделения и от природы пептида. Обсуждая вопросы выделения и доказательства индивидуальности конечного синтетического продукта, следует иметь в виду:

1) характеристика конечного пептида является фактически оценкой результатов синтеза;

2) гомогенность может быть продемонстрирована только негативным путем, т. е. доказательством отсутствия примесей с помощью различных аналитических методов;

3) нет ни одного метода, который давал бы исчерпывающую информацию о гомогенности пептида, поэтому для надежной характеристики конечного продукта необходимо применение целого набора методов, причем, как справедливо отметил Гофман [56], «степень гомогенности пропорциональна числу независимых методов, используемых для ее оценки».

В табл. 1 и 2 перечислены используемые авторами рассмотренных работ методы выделения и доказательства индивидуальности крупных синтетических пептидов. Несовершенства различных методов контроля гомогенности пептидов довольно часто обсуждаются в работах по синтезу крупных пептидов. Так, в ходе твердофазного синтеза рибонуклеазы T₁ отмечалось совпадение пептидных карт нативного белка и синтетического продукта, обладающего 3% активности [111] (табл. 2). Сходные пептидные карты получены также для природного и синтетического неочищенного лизоцима [115]. Часто упоминается низкая чувствительность метода электрофоретического разделения пептидов. Синтетическая рибонуклеаза T₁ (табл. 2) с 3% специфической активности совпадала по подвижности при бумажном электрофорезе и при диск-гель-электрофорезе с природным белком [111], синтетический ингибитор трипсина (Kunitz) (табл. 2) с 82% активности обладал одинаковой подвижностью с нативным белком [91], фрагменты 1—14 и 2—14 ингибитора трипсина (Kazal) (табл. 1) после уда-

ления защитных групп жидким HF имели неудовлетворительные данные аминокислотного анализа (после ферментативного гидролиза) и в то же время были гомогенны при электрофорезе [34].

Модифицированная рибонуклеаза S с 8–10% специфической активности не отличалась по хроматографическому поведению на сефадексе G-50 от природного белка [60], а синтетический α -бушгаротоксин, не обладающий биологической активностью, совпадал по хроматографическому поведению на колонках с CM-целлюлозой и сефадексом G-50 с нативным белком [40].

Интересное исследование по твердофазному синтезу (1–34)-фрагмента паратироидного гормона (активный фрагмент), демонстрирующее как ограничения твердофазного метода синтеза, так и относительность большинства общепринятых критериев гомогенности, было проведено Треже [240, 241]. Твердофазный синтез был осуществлен со стандартным набором защитных групп и в обычных условиях. Полноту конденсаций проверяли с помощью нингидрина и флуорескамина, на конечной стадии синтеза пептидиолполимер был обработан жидким HF. Продукт был очищен хроматографией на биогеле Р-6 и двукратной хроматографией на CM-целлюлозе. Синтетический аналог паратироидного гормона был индивидуален по данным тонкослойной хроматографии в нескольких системах, тонкослойного электрофореза при нескольких значениях pH; данные аминокислотного анализа после ферментативного и кислотного гидролизом соответствовали вычисленным; пептидные карты, УФ-спектр, биологические и иммунные тесты соответствовали ожидаемым. Однако результаты анализа синтетического пептида на секвенаторе показали, что выход на каждой стадии конденсации составлял лишь 99,5%, а на стадии присоединения Gln²⁹ к Asp³⁰ — 75%. Таким образом, хотя имелось множество доказательств гомогенности синтетического фрагмента 1–34 паратироидного гормона, в конечном продукте пупжиного пептида содержалось не более 68,5%.

Из табл. 1 и 2 видно, сколь скуден и неполон список методов, используемых для очистки и характеристики большинства синтетических пептидов, особенно в случае пептидов, полученных классическим методом. Конечно, гомогенность пептида, синтезированного в растворе, обеспечивается всем ходом синтеза и очисткой промежуточных продуктов, однако это не снимает необходимости тщательной характеристики конечного продукта. Отсутствие возможности промежуточной очистки в случае твердофазного метода объясняет тот факт, что пептиды, полученные этим методом, охарактеризованы несколько подробнее. Из рассмотрения приведенных данных становится очевидной незаурядность работы Ямаширо и Ли [104], осуществивших синтез β -липотропина, для конечной характеристики которого было использовано в общей сложности 12 различных тестов [104].

Таким образом, по мере роста пептидной цепи степень гомогенности защищенного пептида падает в связи с отсутствием удовлетворительных методов разделения и анализа крупных защищенных пептидов. Кроме того, введение в конденсацию двух индивидуальных фрагментов не гарантирует индивидуальности конечного пептида даже при отсутствии в нем примесей исходных фрагментов.

Коротко остановимся на наиболее перспективных направлениях в области очистки пептидов, еще не нашедших широкого применения в синтезе, но с развитием которых, по-видимому, связаны будущие достижения синтетической пептидной химии. В последние годы широкое развитие получила распределительная хроматография в классическом варианте. С помощью этого высокочувствительного метода были разделены отличающиеся небольшими модификациями аналоги β -эндорфинов [242], адрепокортicotропного гормона [243], кальцитонина [123], липотропина [104]. Распределительная хроматография была использована при очистке синтетического липотропина [104] и его укороченных аналогов [102, 103].

Очень перспективен метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, занимающий все более прочные позиции в различных областях химии. С помощью этого метода возможно разделение самых сложных сме-

сей веществ. В пептидно-белковой химии высокоэффективная хроматография нашла применение преимущественно в ее обратнoфазном варианте. С использованием этого метода были разделены смеси аналогов рибонуклеазы А [244], вазопрессина, ангиотензина, меланоцитстимулирующего гормона, нейротензина [245], соматостатина [245, 246] и других гормонов [247]; он применен также при выделении интерферона [248].

Однако перечисленные подходы нашли применение только при разделении свободных пептидов и белков, и всего лишь в трех работах описана высокоэффективная очистка защищенных пептидов: обратнoфазная хроматография защищенного секретина и его фрагментов на носителе Lichrosorb RP 18 [232] и адсорбционная хроматография на силикагеле Si-60 различных защищенных пептидов, содержащих до 14 аминокислотных остатков [249, 250]. Использование как адсорбционной, так и обратнoфазной хроматографии ограничено низкой растворимостью крупных защищенных фрагментов в обычных для этих методов растворителях: спиртах, хлороформе, уксусной кислоте, водноорганических средах. Возможно, что более перспективным для этих целей окажется развитие высокоэффективной эксклюзионной хроматографии с использованием диметилформамида и других биполярных апротонных растворителей.

VII. Специфическая активность как критерий индивидуальности синтетических пептидов и белков

Проявление синтетическим пептидом полной специфической активности часто расценивается как самое убедительное доказательство его идентичности природному образцу. Безусловно, пептид или белок, претендующий на индивидуальность, должен обладать 100%-ной активностью, однако совпадение специфической активности синтетического и природного продуктов не всегда означает идентичность их структур. Такую неоднозначность можно объяснить рядом причин. Среди множества белков известно явление гомологии, когда целые классы веществ с небольшими различиями в структуре проявляют одинаковую биологическую активность, как, например, гемоглобины, цитохромы и т. д. Кроме того, чувствительность используемых тестов может оказаться недостаточной для обнаружения определенных изменений в структуре. В работе Тана и Кайзера по синтезу ингибитора трипсина (Kunitz) [92] (табл. 2) показано, сколь различной может быть чувствительность тестов, используемых для определения активности ингибитора трипсина. Синтетический ингибитор трипсина обладал 100%-ной активностью природного белка при изучении кинетики ингибирующего эффекта гидролиза субстрата трипсина. Однако константа диссоциации (K_d) его комплекса с трипсином составляла $8,4 \cdot 10^{-14}$ моль/л, в то время как аналогичный комплекс с природным ингибитором имеет K_d $6 \cdot 10^{-14}$ моль/л, т. е. активность синтетического белка по этому тесту составляет 70%. Авторы отмечают, что только определение константы диссоциации комплекса дает представление о чистоте синтезированного ингибитора, поскольку 100%-ное ингибирование характерно для всех веществ с $K_d < 10^{-10}$ моль/л. Поэтому активности 35–39 и 82%, полученные в синтезах ингибитора трипсина (Kunitz) группами Изумии [86] и Яджими [87–91] соответственно (табл. 2), означают, что синтетические ингибиторы по тесту Тана и Кайзера обладают активностью $< 0,001\%$.

Совпадение специфической активности синтетического и природного белков не всегда означает 100%-ную активность и потому, что стандарт, с которым производится сравнение, может обладать пониженной активностью в результате содержания в белке некоторого количества солей, неотделенных гомологов, а также частично денатурированных продуктов. Например, при синтетических исследованиях рибонуклеазы T_1 группой Изумии [111] природный белок при аффинной хроматографии вышел в виде двух пиков, совпадающих по биологической активности, но различающихся по аминокислотному составу. Синтетический фрагмент (1–34) паратироидного гормона человека обладал 200%-ной активностью, как пред-

полагают авторы, в результате частичной денатурации в ходе очистки природного белка, используемого как эталон сравнения [240].

Строго говоря, степень активности синтетического препарата не соответствует истинной степени чистоты белка или пептида. Примером может служить сравнение данных, полученных при анализе специфической активности синтетического фрагмента (1—34) паратиреоидного гормона быка и степени его гомогенности, определенной с помощью секвенатора [240, 241]: в этом случае степень чистоты 68,5% соответствует 77,2% активности, а пептид 95%-ной чистоты обладает 97,3%-ной активностью. В ходе синтеза рибонуклеазы А [114] при обработке синтетического продукта трипсином из 1 мг пептида получилось 0,69 мг продукта, а активность повысилась с 9 до 61%. Синтетический пептид может содержать как примеси, имеющие более высокую активность, чем природный пептид, так и примеси, оказывающие ингибирующее влияние. Синтетические фрагменты (41—91) и (42—91) β -липотропина обладают активностью, в 6 раз превышающей активность самого липотропина [102, 103] (табл. 2), и, наоборот, известно, что пептид с последовательностью 3—34 паратиреоидного гормона абсолютно неактивен и действует как конкурентный ингибитор [240]. Гормон роста человека [117] был синтезирован с ориентацией, как оказалось впоследствии, на неправильно установленную аминокислотную последовательность, где 15-членный пептид последовательности 77—91 был ошибочно приписан последовательности 17—31 [251], и такой синтетический аналог обладал 5—10% специфической активности. При этом надо принимать во внимание, что многие фрагменты гормона роста обладают значительной активностью [252—254].

Ингибитор гастрина, синтезированный группой Яджимы [22—25], обладал 400%-ной активностью (табл. 1), а синтетический фрагмент (15—43) проявил 100%-ную активность. Однако существуют свидетельства в пользу того, что структура ингибитора гастрина была установлена неправильно [255]. В работе Гутте [112] по синтезу 70-членного аналога рибонуклеазы S продемонстрировано отсутствие высокой структурной специфичности рибонуклеазы S по отношению к ее биологической функции. Гутте был синтезирован аналог S-белка рибонуклеазы А, в последовательности которого были пропущены сегменты 21—25, 36—40, 58—73, 113—114, а вместо этих делеций введены четыре аминокислотных остатка.

В то же время остатки цистеина, не вошедшие в делеции, были заменены на остатки аланина или лейцина. Синтетический пептид был выделен гель-фильтрацией в виде мономера и димера. Димерный белок обладал 4% активности при гидролизе РНК и был неактивен при гидролизе цикло-2,3-цитидинфосфата. Смесь мономерного аналога или его димера с S-пептидом обладала 8% активности при гидролизе цикло-2,3-цитидинфосфата. Однако активность возрастала до 151% в случае мономера и до 74% в случае димера при добавлении S-белка. В ходе синтетических исследований аналога урогастрона показано, что обработка этого белка жидким HF вызывает большие изменения в электрофоретической подвижности, однако специфическая активность остается при этом неизменной [82].

Существуют примеры очень высокой зависимости специфической активности от незначительных изменений структуры: например, окисление одного атома серы в адренокортикотропном гормоне свиньи полностью нарушает его биологические функции [256]. Значительное падение активности наблюдается в случае длинных нейротоксинов при избирательном восстановлении одной из пяти присутствующих в молекуле дисульфидных связей [257, 258], хотя, например, восстановление одного S—S-мостика у ингибитора трипсина (Kunitz) не отражается на его ингибирующей активности [259]. Естественно предположить, что высокая чувствительность специфической активности к изменениям строения пептида свидетельствует о том, что эти изменения затрагивают либо функциональные центры активной молекулы, либо те элементы структуры, которые ответственны за поддержание «биологически активной» конформации пептида или белка.

Таким образом, специфическая активность синтетического пептида не является надежным показателем степени его соответствия природному

продукту, и информативность этого теста может выявляться лишь в комплексе с различными другими критериями однородности полученного продукта и его идентичности природному образцу.

VIII. Достижения в синтезе крупных пептидов и белков

Чтобы оценить реальные достижения в синтезе крупных пептидов, в настоящем разделе будут детально рассмотрены наиболее интересные работы этой области и проведен их сравнительный анализ.

Из 12 синтезов, предпринятых классическим методом (табл. 1), доведено до конца лишь семь, при этом среди незаконченных работ, по-видимому, можно ожидать продолжения исследований по синтезу проинсулина [41—48] и рибонуклеазы T₁ [50—56]. Долгое отсутствие дополнительных сообщений по синтезу Δ^5 -кетостероидизомеразы [7], аналога цитохрома с [8—20] и ингибитора гастрина [21] вызывает сомнения относительно возможного окончания этих работ. С сожалением приходится отмечать факт отсутствия в случае неудачных синтезов завершающих статей с анализом возможных причин неудач. Такой критический анализ собственных работ представлял бы ценность, едва ли меньшую, чем собственно описание синтеза. При рассмотрении незаконченных работ мы можем делать лишь предположительные выводы о возможных трудностях, не позволивших довести синтез до конца.

В ходе синтеза Δ^5 -кетостероидизомеразы [7] авторы столкнулись с крайне низкой растворимостью большинства фрагментов в органических растворителях. Это явление связано, по-видимому, с присутствием в аминокислотной последовательности изомеразы в соответствии с планом синтеза 10 незащищенных остатков аспарагина и 4 остатков глутамина в сочетании с полной защитой остальных полифункциональных аминокислотных остатков гидрофобными группами бензильного типа. Контроль гомогенности синтезированных фрагментов проводился по результатам анализа деблокированных с помощью жидкого HF производных, при этом из 10 синтезированных фрагментов только 5 были гомогенны. Более детальный анализ по синтезу Δ^5 -кетостероидизомеразы, к сожалению, невозможен из-за отсутствия экспериментальных данных.

Следующей незавершенной работой является синтез Thr¹⁰⁷-аналога цитохрома с [8—20], проводившийся несколько лет. В большой серии статей детально описаны экспериментальные подробности синтеза, сложности и побочные реакции, с которыми столкнулись авторы в ходе работы. Описано несколько вариантов синтеза фрагментов 93—101 и 102—108, и выбран оптимальный путь [12, 13]. Кроме того, тщательность проведенного синтеза выражается в подробной характеристике промежуточных фрагментов. Однако рассматриваемая работа имеет недостатки, одни из них связаны с общим несовершенством методологии пептидного синтеза, другие же присущи именно данной работе.

Главным недостатком данной работы, общим для всех работ с использованием минимальной защиты боковых функций аминокислот, когда возможно протекание большого числа побочных реакций, являются недостаточно эффективная очистка и характеристика промежуточных соединений. Применение для выделения коротких пептидов экстракции и переосаждения явно не обеспечивает достаточную степень гомогенности, в то время как более надежные методы очистки минимально защищенных пептидов были использованы в ходе синтеза крупных фрагментов цитохрома с лишь несколько раз; это хроматография на силикагеле, СМ-целлюлозе и других ионообменниках, например AG-I-X2, AG-50W-X2. По-видимому, этими недостатками обусловлен тот факт, что ряд деблокированных С-концевых фрагментов пришлось подвергнуть многократной очистке для получения в индивидуальном состоянии [14].

Вызывает удивление подход к делению на фрагменты последовательности цитохрома. Из семи крупных фрагментов (восьмой С-концевой) в шести С-концевой аминокислотой является оптически активная, подверженная рацемизации аминокислота, при этом два сегмента оканчиваются

особо чувствительным к рацемизации гистидином. В то же время в молекуле цитохрома *s* присутствуют 12 остатков глицина и 4 остатка пролина, предпочтительные при фрагментной конденсации [8]. Тактическим просчетом является запланированное авторами применение жидкого фтористого водорода для удаления N^{α} -Z-группы с метионинсодержащих крупных фрагментов [9, 14], при котором теряется одно из преимуществ синтеза с минимальной защитой боковых функций аминокислот — отсутствие обработок агрессивными реагентами. Кроме того, после обработки фтористым водородом фрагмента 82—108 [14] отсутствует стадия проведения $O \rightarrow N$ -ацильной миграции. Надо полагать, что не самым удачным является выбор трифторацетильной группы для блокирования N^{ϵ} -аминофункции лизина, поскольку уже в случае 42-членного пептида 67—108 наблюдалось ее неполное удаление при обработке пиперидином [14]. Перечисленные недочеты, по-видимому, в существенной мере препятствовали завершению работы.

Обсуждение незаконченной работы по синтезу ингибитора гастрина [21] представляет определенную трудность, связанную с отсутствием экспериментальных деталей этой работы. Обращает на себя внимание необычный подход к выбору защитных групп, когда часть фрагментов максимально защищена группами бензильного типа, а другая часть защищена группами *трет*-бутильного типа, при этом остаток аргинина был защищен солеобразованием. Работа по синтезу ингибитора гастрина остановилась на стадии конденсации фрагментов 1—16 и 17—43.

Более успешен другой синтез ингибитора гастрина [22—25], синтез 4, проведенный группой Яджимы. Несмотря на видимость удачного исхода синтеза (активность синтетического препарата составляла 400%), работа имеет множество спорных моментов. Во-первых, не самым удачным представляется использование группировок бензильного типа для боковых $COOH$ - и NH_2 -функций наряду с незащищенными боковыми функциями серина, треонина, гистидина, аспарагина и глутамина. В подобном случае существует необходимость конечного деблокирования таким агрессивным реагентом, как HF, и в то же время отсутствуют известные преимущества синтеза с максимумом защитных групп (минимизация побочных реакций, хорошая растворимость фрагментов в органических средах).

В работе широко используется DCC-метод синтеза, причем в самом недопустимом с точки зрения рацемизации варианте: реакции проводились при комнатной температуре с триэтиламиноном. Далее, многократное удаление N^{α} -защитной Z(OMe)-группы с триптофансодержащих пептидов трифторуксусной кислотой, даже в присутствии анизол с этандитиолом, приводит к алкилированию и окислительной деструкции остатков триптофана [166—168]. Нельзя считать вполне удачной выбранную стратегию наращивания цепи с C-конца конденсацией мелких блоков и аминокислот. Удаление исходного непрореагировавшего аминокислотного компонента, мало отличающегося по свойствам от нужного продукта, — сложная задача, и используемые в работе экстракция, переосаждение и перекристаллизация, особенно в случае крупных пептидов, явно недостаточны.

Для очистки конечного защищенного полипептида 1—43 применена хроматография на сефадексе LH-20, а после деблокирования используется сефадекс G-25 [22] — в обоих случаях молекулярный вес полипептида превышает предел эксклюзии этих носителей. Удивительно, что в случае описанного в статье [22] первого варианта синтеза, когда была использована несколько другая схема синтеза полипептида и отсутствовала очистка на сефадексе LH-20, данные аминокислотного анализа после ферментативного гидролиза синтетического ингибитора гастрина с точностью до сотых совпадают с данными, полученными в результате повторного синтеза [25], причем эти данные плохо согласуются с теорией. Как отмечалось в разделе VII [255], имеются доказательства того, что синтез ингибитора гастрина был осуществлен с ориентацией на неправильно установленную структуру.

Синтез ингибитора трипсина II (Kazal), осуществленный группой Рокки [26—36], представляет собой тщательную и трудоемкую работу, про-

должавшуюся более пяти лет. Авторы не достигли намеченной цели, поскольку синтетический ингибитор трипсина проявил активность на несколько порядков ниже активности природного белка. В заключительной статье [36] авторы приводят подробный анализ причин неудачного завершения синтеза. Во-первых, они допускают возможность присутствия в конечном продукте некоторого количества примесей, несмотря на тщательный аналитический контроль промежуточных соединений: кроме стандартной характеристики фрагментов было применено удаление защитных групп и использована характеристика свободных пептидов методами белковой химии. Во-вторых, необходимость двукратного использования фтористого водорода для удаления N^{α} , Z -группы с крупных полипептидов влечет за собой протекание побочных реакций. И основной причиной неудавшегося синтеза является тот факт, что ацетамидометильную группу с SH-функции цистеина на конечной стадии синтеза удалось удалить только на 70%. В этом случае, естественно, крайне затруднительно получение препарата с правильно замкнутыми S—S-мостиками.

Еще одной работой, закончившейся получением неактивного продукта, является синтез α -бунгаротоксина, осуществленный авторами настоящего обзора [37—42]. Синтетический продукт отличался от природного образца не только отсутствием биологической активности, но и характером КД- и УФ-спектров. Основной причиной неудачного завершения синтеза явилась полная деструкция продукта при удалении защитных групп жидким HF. Такой же результат наблюдался при обработке в аналогичных условиях природного токсина с восстановленными дисульфидными связями. Найденные авторами защитные добавки, ограничивающие деструкцию в жидком HF природного α -бунгаротоксина с восстановленными S—S-мостиками, в целом не решили проблему, поскольку выход активного продукта в этом случае составил лишь 4%. При анализе результатов работы отмечается возможная химическая и оптическая неоднородность защищенного α -бунгаротоксина, обусловленная отсутствием удовлетворительных методов выделения и анализа гомогенности крупных защищенных пептидов.

Исследования по синтезу проинсулина, проводимые группой Цана [41—48], находятся на стадии конденсации двух защитных фрагментов проинсулина 1—45 и 46—86; SH-функции цистеина в ходе этого синтеза были защищены тритильной группой, а для защиты α -NH₂-функции использованы Bros- или Trt-группы, остальные полифункциональные аминокислоты защищены группировками *трет*-бутильного типа, за исключением гуанидиновой группы аргинина, защищенной солеобразованием. Синтез отличает высокий экспериментальный уровень, и здесь, безусловно, сказался большой опыт, накопленный этой группой в работах по синтезу инсулина.

Необходимо отметить широкое применение в работе метода противоточного распределения для очистки крупных полностью защищенных пептидов. Гомогенность крупных фрагментов подробно доказывалась после удаления защитных групп. Однако работа не лишена некоторых недостатков, характерных для большинства крупных синтезов. Неубедительны доказательства оптической гомогенности полученных фрагментов. Авторы столкнулись с низкой растворимостью и низкой реакционной способностью ряда защищенных фрагментов. Попытка провести конденсацию фрагментов 1—45 и 46—86 привела, несмотря на крайне жесткие условия реакции (дициклогексилкарбодимид, 72 ч, 40°С), лишь к 2%-ному выходу индивидуального продукта. Однако авторы надеются преодолеть эти трудности использованием других конденсирующих агентов.

Синтез проинсулина человека успешно завершён группой японских ученых [49], являющихся также авторами широких исследований по синтезу фрагментов проинсулина различных видов [260, 261]. Использованная в ходе синтеза бензоильная группа для защиты SH-функции цистеина и тозилльная группа для ϵ -NH₂-функции лизина предопределило обработку на конечном этапе синтеза натрием в жидком аммиаке — реагентом, вызывающим ряд побочных реакций. Как и в других работах этой группы по синтезу фрагментов проинсулина, в данных исследованиях большое вни-

продукту, и информативность этого теста может выявляться лишь в комплексе с различными другими критериями однородности полученного продукта и его идентичности природному образцу.

VIII. Достижения в синтезе крупных пептидов и белков

Чтобы оценить реальные достижения в синтезе крупных пептидов, в настоящем разделе будут детально рассмотрены наиболее интересные работы этой области и проведен их сравнительный анализ.

Из 12 синтезов, предпринятых классическим методом (табл. 1), доведено до конца лишь семь, при этом среди незаконченных работ, по-видимому, можно ожидать продолжения исследований по синтезу проинсулина [41—48] и рибонуклеазы T₁ [50—56]. Долгое отсутствие дополнительных сообщений по синтезу Δ^5 -кетостероидизомеразы [7], аналога цитохрома с [8—20] и ингибитора гастриина [21] вызывает сомнения относительно возможного окончания этих работ. С сожалением приходится отмечать факт отсутствия в случае неудачных синтезов завершающих статей с анализом возможных причин неудач. Такой критический анализ собственных работ представлял бы ценность, едва ли меньшую, чем собственно описание синтеза. При рассмотрении незаконченных работ мы можем делать лишь предположительные выводы о возможных трудностях, не позволивших довести синтез до конца.

В ходе синтеза Δ^5 -кетостероидизомеразы [7] авторы столкнулись с крайне низкой растворимостью большинства фрагментов в органических растворителях. Это явление связано, по-видимому, с присутствием в аминокислотной последовательности изомеразы в соответствии с планом синтеза 10 незащищенных остатков аспарагина и 4 остатков глутамина в сочетании с полной защитой остальных полифункциональных аминокислотных остатков гидрофобными группами бензильного типа. Контроль гомогенности синтезированных фрагментов проводился по результатам анализа деблокированных с помощью жидкого HF производных, при этом из 10 синтезированных фрагментов только 5 были гомогенны. Более детальный анализ по синтезу Δ^5 -кетостероидизомеразы, к сожалению, невозможен из-за отсутствия экспериментальных данных.

Следующей незавершенной работой является синтез Thr¹⁰⁷-аналога цитохрома с [8—20], проводившийся несколько лет. В большой серии статей детально описаны экспериментальные подробности синтеза, сложности и побочные реакции, с которыми столкнулись авторы в ходе работы. Описано несколько вариантов синтеза фрагментов 93—101 и 102—108, и выбран оптимальный путь [12, 13]. Кроме того, тщательность проведенного синтеза выражается в подробной характеристике промежуточных фрагментов. Однако рассматриваемая работа имеет недостатки, одни из них связаны с общим несовершенством методологии пептидного синтеза, другие же присущи именно данной работе.

Главным недостатком данной работы, общим для всех работ с использованием минимальной защиты боковых функций аминокислот, когда возможно протекание большого числа побочных реакций, являются недостаточно эффективная очистка и характеристика промежуточных соединений. Применение для выделения коротких пептидов экстракции и пересаживания явно не обеспечивает достаточную степень гомогенности, в то время как более надежные методы очистки минимально защищенных пептидов были использованы в ходе синтеза крупных фрагментов цитохрома с лишь несколько раз; это хроматография на силикагеле, СМ-целлюлозе и других ионообменниках, например AG-I-X2, AG-50W-X2. По-видимому, этими недостатками обусловлен тот факт, что ряд деблокированных С-концевых фрагментов пришлось подвергнуть многократной очистке для получения в индивидуальном состоянии [14].

Вызывает удивление подход к делению на фрагменты последовательности цитохрома. Из семи крупных фрагментов (восьмой С-концевой) в шести С-концевой аминокислотой является оптически активная, подверженная рацемизации аминокислота, при этом два сегмента оканчиваются

должавшуюся более пяти лет. Авторы не достигли намеченной цели, поскольку синтетический ингибитор трипсина проявил активность на несколько порядков ниже активности природного белка. В заключительной статье [36] авторы приводят подробный анализ причин неудачного завершения синтеза. Во-первых, они допускают возможность присутствия в конечном продукте некоторого количества примесей, несмотря на тщательный аналитический контроль промежуточных соединений; кроме стандартной характеристики фрагментов было применено удаление защитных групп и использована характеристика свободных пептидов методами белковой химии. Во-вторых, необходимость двукратного использования фтористого водорода для удаления N^{α} , Z -группы с крупных полипептидов влечет за собой протекание побочных реакций. И основной причиной неудавшегося синтеза является тот факт, что ацетамидометильную группу с SH-функции цистеина на конечной стадии синтеза удалось удалить только на 70%. В этом случае, естественно, крайне затруднительно получение препарата с правильно замкнутыми S—S-мостиками.

Еще одной работой, закончившейся получением неактивного продукта, является синтез α -бунгаротоксина, осуществленный авторами настоящего обзора [37—42]. Синтетический продукт отличался от природного образца не только отсутствием биологической активности, но и характером КД- и УФ-спектров. Основной причиной неудачного завершения синтеза явилась полная деструкция продукта при удалении защитных групп жидким HF. Такой же результат наблюдался при обработке в аналогичных условиях природного токсина с восстановленными дисульфидными связями. Найденные авторами защитные добавки, ограничивающие деструкцию в жидком HF природного α -бунгаротоксина с восстановленными S—S-мостиками, в целом не решили проблему, поскольку выход активного продукта в этом случае составил лишь 4%. При анализе результатов работы отмечается возможная химическая и оптическая неоднородность защищенного α -бунгаротоксина, обусловленная отсутствием удовлетворительных методов выделения и анализа гомогенности крупных защищенных пептидов.

Исследования по синтезу проинсулина, проводимые группой Цана [41—48], находятся на стадии конденсации двух защищенных фрагментов проинсулина 1—45 и 46—86; SH-функции цистеина в ходе этого синтеза были защищены тритильной группой, а для защиты α -NH₂-функции использованы Bros- или Trt-группы, остальные полифункциональные аминокислоты защищены группировками *tert*-бутильного типа, за исключением гуанидиновой группы аргинина, защищенной солеобразованием. Синтез отличает высокий экспериментальный уровень, и здесь, безусловно, сказан большой опыт, накопленный этой группой в работах по синтезу инсулина.

Необходимо отметить широкое применение в работе метода противоточного распределения для очистки крупных полностью защищенных пептидов. Гомогенность крупных фрагментов подробно доказывалась после удаления защитных групп. Однако работа не лишена некоторых недостатков, характерных для большинства крупных синтезов. Неубедительны доказательства оптической гомогенности полученных фрагментов. Авторы столкнулись с низкой растворимостью и низкой реакционной способностью ряда защищенных фрагментов. Попытка провести конденсацию фрагментов 1—45 и 46—86 привела, несмотря на крайне жесткие условия реакции (дициклогексилкарбодимид, 72 ч, 40°С), лишь к 2%-ному выходу индивидуального продукта. Однако авторы надеются преодолеть эти трудности использованием других конденсирующих агентов.

Синтез проинсулина человека успешно завершен группой японских ученых [49], являющихся также авторами широких исследований по синтезу фрагментов проинсулина различных видов [260, 261]. Использование в ходе синтеза бензоильной группы для защиты SH-функции цистеина и тозилльной группы для ϵ -NH₂-функции лизина предопределило обработку на конечном этапе синтеза натрием в жидком аммиаке — реагентом, вызывающим ряд побочных реакций. Как и в других работах этой группы по синтезу фрагментов проинсулина, в данных исследованиях большое вни-

мание уделяется иммунохимическому изучению промежуточных фрагментов и конечного продукта. Иммунохимические исследования, безусловно, имеют самостоятельную ценность, но дают очень небольшую информацию о гомогенности синтетического препарата. В работе не изучена специфическая активность и отсутствует анализ оптической однородности продукта.

Фундаментальное исследование по синтезу рибонуклеазы T_1 проводится группой Гофмана [50—56]. В ходе синтеза осуществлен тщательный аналитический контроль промежуточных пептидов, анализ и рассмотрение возможных побочных реакций. Подробное описание эксперимента в работах Гофмана сочетается с теоретическим осмыслением результатов. Итогом работ, проводимых с 1969 по 1974 г., явился синтез крупных фрагментов рибонуклеазы T_1 : 1—47, 48—80, 66—104, и после пятилетнего перерыва, в 1979 г., опубликован синтез 81-членного пептида 24—104 [56].

В соответствии с новыми достижениями в методологии пептидного синтеза, а также, по-видимому, исходя из результатов собственных исследований, в ходе работы была несколько изменена схема синтеза. Первоначально планировалось синтезировать амид N^{ϵ} -формил-Lys⁴¹-аналога рибонуклеазы T_1 , однако, согласно последним данным, подобный аналог неактивен. Кроме того, авторы пришли к выводу о непригодности N^{α} -Z-группы для защиты крупных фрагментов, поскольку в случае Cys-содержащих пептидов невозможно удаление этой группы гидрированием, а при наличии в пептидной цепи остатка триптофана невозможна обработка HBr в трифторуксусной кислоте.

В соответствии с этими выводами вместо ранее синтезированных фрагментов Z-(48—65)-NHNH₂ был получен фрагмент Boc-(48—65)-NHNH₂, а фрагмент Z-(24—47)-NHNH₂ превращен в Msc-(24—47)-NHNH₂ путем гидрирования и последующей реакции с метилсульфонилэтоксикарбонил-N-оксисукцинимидным эфиром (MscONSu). Оказавшаяся непригодной для защиты SH-функции цистеина этоксикарбамоильная группа заменена Асм-группой, а Et₃N повсеместно заменен более щадящим в отношении рацемизации диизопропилэтиламин.

В работе обсуждаются проблемы низких выходов при фрагментных конденсациях азидным методом (большинство конденсаций протекало с выходами 20—50%, а при реакции фрагментов 24—47 и 48—104 выход составил лишь 5%). Осложнения, сопровождающие всю работу по синтезу рибонуклеазы T_1 , заключаются в понижении растворимости частично защищенных пептидов с ростом пептидной цепи, что в свою очередь влечет за собой понижение выходов реакций и трудности очистки. Показано, что использование 8 M мочевины не решает проблемы растворимости, так как приводит к ряду нежелательных явлений. Основные недостатки работы, как и в случае уже рассмотренных синтезов с использованием минимума защитных групп, связаны с недостаточно эффективной очисткой и отсутствием убедительных доказательств гомогенности промежуточных фрагментов. Очистка коротких пептидов проводилась кристаллизацией, пересаживанием и экстракцией; гель-фильтрация, распределительная и ионообменная хроматография применялись лишь для выделения некоторых крупных фрагментов. Отсутствие тщательного аналитического контроля больших защищенных полипептидов можно продемонстрировать на примере характеристики крупных фрагментов рибонуклеазы T_1 . Так, фрагмент 48—104 охарактеризован одним значением R_f , углом удельного вращения (обе характеристики неинформативны) и данными аминокислотного анализа кислого гидролизата, а фрагмент 24—104 охарактеризован одними лишь данными аминокислотного анализа, причем в обоих случаях не наблюдалось хорошего совпадения этих данных с теоретическими значениями.

Работы группы Хиршмана [57—62] по синтезу S-белка рибонуклеазы А были первой попыткой синтеза крупного полипептида классическим методом. В работе был использован принцип минимальной защиты боковых функций. Отличительной чертой синтеза явилось использование N-карбонксиангидридного метода для наращивания пептидной цепи, одна-

ко в последующих работах по синтезу крупных пептидов этот метод не нашел применения. Впервые в ходе синтеза крупного пептида использована получившая впоследствии большую популярность ацетамидометильная SH-защитная группа. Стратегия синтеза Хиршмана и соотр. предопределила использование на конечной стадии синтеза жидкого фтористого водорода, что свело на нет такое преимущество минимальной защиты боковых функций, как отсутствие обработок агрессивными реагентами в ходе синтеза. В процессе синтеза авторы столкнулись с пониженной растворимостью ряда крупных фрагментов в органических растворителях, что связано с выбором тактики минимальной защиты боковых функций аминокислот. Синтетическая рибонуклеаза обладала 2—3% специфической активности [61], но, согласно более поздним данным [62], активность синтетического препарата после дополнительной очистки удалось повысить до 40%. В сообщениях по синтезу рибонуклеазы полностью отсутствуют экспериментальные детали синтеза, очистки и измерения специфической активности, что исключает подробное обсуждение полученных результатов.

В синтезе рибонуклеазы А, осуществленном группой Яджимы [63—66], использовали те же подходы, что и в синтезе ингибитора гастрина [22—25], т. е. минимальную защиту полифункциональных аминокислот группами бензильного типа и наращивание пептидной цепи с С-конца присоединением коротких пептидов азидным методом. Сложности, связанные с применением этой тактики синтеза, обсуждались при описании синтеза ингибитора гастрина. Как видно из табл. 1, синтетическая рибонуклеаза А является самым тщательно охарактеризованным белком, получаемым в растворе, неотличимым от природного по многим тестам, включая специфическую активность. Однако детальный анализ результатов этой работы вызывает ряд сомнений.

Использованная тактика синтеза в сочетании с такой очисткой продуктов фрагментных конденсаций, как переосаждение и промывки осадка, не гарантирует отсутствия исходного аминокислотного компонента и продуктов различных побочных реакций в синтетических пептидах. Сами авторы отмечают ограниченную информативность методов контроля гомогенности синтетических пептидов. Вызывают удивление описанные в работе сложности, возникшие при очистке защищенного полипептида последовательности 69—124 от исходного карбоксильного компонента 69—70 [64].

Эти два столь различных по молекулярному весу пептида не удалось разделить ни с помощью колоночной хроматографии на сефадексе LH-20, ни на сефадексе G-100, и лишь на сефакриле S-200 или сефарозе CL-6B в N-метилпирролидоне или диметилсульфоксиде был получен чистый 56-членный пептид. Однако ни сефакрил, ни сефароза не набухают и не предназначены для работы в вышеперечисленных растворителях; кроме того, приведенный в работе профиль элюции с колонки с сефакрилом S-200 (неразрешенные пики 56-членного пептида и дипептида) позволяют усомниться в гомогенности как пептида 69—124, так и других пептидов, очищенных аналогичным образом. Для законченности работе не хватает доказательств индивидуальности синтетической рибонуклеазы А и ее оптической гомогенности.

На самом высоком уровне, с использованием новейших достижений синтетической пептидной химии при выборе системы защитных групп в ходе проведения синтеза, а также при выборе методов очистки и характеристики степени гомогенности синтетических пептидов выполнен группой Кеннера синтез аналога лизоцима [67—81]. Основываясь на данных рентгеноструктурного анализа, в аминокислотной последовательности лизоцима авторы запланировали 28 замен, включая замену всех остатков Arg, His и Met. В ходе синтеза была использована самая перспективная в настоящее время система защитных групп *tert*-бутильного типа, для защиты α -аминофункции были использованы Z- или Wros-группы, для SH-функции — Asp-группа. Дополнительные сложности в синтезе лизоцима были вызваны отсутствием защитных групп на остатках аспарагина, глутамина и триптофана, что значительно повысило вероятность протекания

ния побочных процессов (см. раздел III). Кроме того, авторы отмечают взаимосвязь между пониженной растворимостью защищенных фрагментов и высоким содержанием незащищенных амидных функций [73]. Подавляющее большинство фрагментных конденсаций было проведено по С-концевым остаткам глицина.

В работе изучены различные варианты синтеза пептидов, получение которых представляло трудности, и выбран оптимальный из них, в ходе синтеза использовано много методических усовершенствований. Очень серьезно авторы подошли к вопросу очистки и характеристики синтетических пептидов. Все продукты фрагментных конденсаций были очищены на сефадексе LH-20 или LH-60 либо на носителе Елзасил К2, хроматографическая часть работы отражена в специальной серии статей [68—70]. Кроме эксклюзионной хроматографии для очистки синтетических пептидов были применены и другие методы. Гомогенность продуктов фрагментных конденсаций кроме стандартных характеристик (температура плавления, $[\alpha]_D$), данных аминокислотного анализа, а в некоторых случаях и данных ЯМР-спектров была показана и анализом деблокированных пептидов. Для анализа свободных пептидов использовали тонкослойную хроматографию, бумажный электрофорез, электрофокусировку, ионообменную хроматографию на СМ-сефадексе и данные ферментативного гидролиза.

По синтезу аналога лизоцима пока опубликована лишь серия статей с описанием получения фрагментов 1—37 и 38—75 [73—81], однако на VI Американском пептидном симпозиуме в 1979 г. были доложены отрицательные итоги всего синтеза [72]. Самая последняя стадия синтеза — удаление ацетамидометильных групп с SH-групп цистеина — протекала лишь с выходом 75%, и после замыкания дисульфидных связей был выделен неактивный продукт. Имеются две наиболее вероятные причины неудачного окончания столь прекрасно выполненной работы. Во-первых, был предпринят синтез не природной последовательности, а аналога с 28 заменами; при этом нельзя однозначно сказать, является ли отсутствие специфической активности результатом ошибок синтеза или последствием производешных замен в последовательности фермента. Во-вторых, не могла не сказаться неполнота удаления ацетамидометильной группы.

Следует отметить, что ацетамидометильная группа была использована в четырех крупных синтезах: аналога цитохрома с, рибонуклеазы S, ингибитора трипсина (Kazal) и аналога лизоцима. В двух из четырех работ неудачи непосредственно связаны с неполным удалением этой группы на последней стадии синтеза [36, 72]. Последние исследования показали, что при удалении S-Acm-группы с помощью $Hg(CH_3COO)_2$ с пептидов, содержащих остаток тирозина, образуется С-ацетортутное производное [262], при этом не исключена и аналогичная модификация остатка триптофана. Вопрос о пригодности S-Acm-защитной группы ждет своего решения, и поэтому необходимы работы по детальному изучению поведения этой группы в условиях пептидного синтеза и деблокирования.

Таким образом, как следует из рассмотрения работ, суммированных в табл. 1, полный синтез химически гомогенного белка с использованием классического метода является задачей будущего.

Перейдем теперь к рассмотрению работ по синтезу крупных пептидов, полученных твердофазным методом (приведены в табл. 2).

Одно из преимуществ твердофазного метода синтеза перед классическим, привлекающее внимание исследователей, состоит в том, что закрепленность растущей пептидной цепи на полимерном носителе и сравнительно с классическим методом небольшое время проведения синтеза создают меньше возможностей для протекания побочных реакций и деструкции столь лабильных структур, как пептиды. Твердофазный метод на ранних этапах своего развития привлекал также отсутствием очевидных ограничений длины синтезируемых пептидов. Вероятно, поэтому число исследований по синтезу на полимерном носителе более чем в 2 раза превышает число пептидов, полученных классическим методом. Однако анализ полученных результатов (табл. 2) показывает, что твердофазный путь имеет

свои недостатки, которые вместе с общими трудностями пептидного синтеза не позволили авторам практически всех работ достичь намеченной цели.

Ряд синтезов имеет такие общие недостатки, как отщепление растущей пептидной цепи от полимера, характерное для стандартного полимерного носителя — сополимера стирола с дивинилбензолом [114, 136], неполное протекание реакции конденсации [263, 266], алкилирование растущей пептидной цепи [127], аминолиз пептидов, вызываемый триэтиламиноном при нейтрализации [264], алкоголиз растущей пептидной цепи при промывке пептидилполимера спиртами [265], использование стандартного набора защитных групп, недостаточно стабильных в условиях удаления N^ε-Вос-группы [159, 160], работа с подверженными окислительной деструкции и алкилированию незащищенными остатками триптофана [130, 164, 165].

В ранних работах практически не осуществляется контроль полноты протекания реакций конденсации и удаления защитных групп, в более поздних исследованиях авторы использовали для этих целей нингидрип и флуорескамни, хотя, как показано Треже [241], эти методы анализа не всегда обеспечивают возможность получения высокой степени гомогенности конечного продукта. Ацилирование, используемое для блокирования непрореагировавших аминогрупп, как и реакция конденсации, может не протекать полностью [120], т. е. проведение ацилирования не гарантирует отсутствия в синтетическом пептиде близкородственных примесей.

К работам, имеющим перечисленные недостатки, относятся синтезы ферредоксина [83], ингибитора трипсина (Kunitz) [86], кобротоксина [97, 98], аналога цитохрома *c* [105], рибонуклеазы T₁ и ее T_{ur}⁵⁹-аналога [111], 70-членного аналога рибонуклеазы A [112], рибонуклеазы A [113, 114], лизоцима [116] и гормона роста человека [117]. Синтез рибонуклеазы A [113, 114] принадлежит к ранним работам группы Меррифилда. По тщательности изучения условий отщепления синтетического пептида с полимерного носителя, условий деблокирования и подбора методов очистки, а также по числу тестов гомогенности синтетической рибонуклеазы A эта работа явилась образцом тщательности и корректности в ряду других твердофазных синтезов того времени, несмотря на то что ни по результатам ферментативного гидролиза, ни по результатам анализа пептидных карт и проявления ферментативной активности синтетическая рибонуклеаза A не является гомогенным продуктом. Во всех остальных обсуждаемых работах очистка синтетического продукта недостаточна и отсутствуют подробные доказательства его однородности. Мощный метод очистки — аффинная хроматография была применена лишь в случае рибонуклеазы T₁ и ее аналога [111]. Из числа названных работ выгодно отличаются исследования по получению лизоцима [115, 116]: авторы проанализировали возможные побочные процессы, провели поиск оптимальных условий синтеза, деблокирования, причем твердофазный синтез лизоцима выполнен по двум схемам.

Далее следует остановиться на рассмотрении синтезов, проведенных с некоторыми методическими усовершенствованиями. В ходе синтеза апOLIпопротеина группой Ханкокка [84] были использованы такие новые защитные группы, как 2ClZ для N^ε-лизина и формильная для Nⁱⁿ-триптофана. Низкая нагрузка пептида на полимерный носитель (0,086 ммоль/г), а также использование симметричных ангидридов обеспечили более полное протекание реакций. Полученный продукт несколько отличался от природного по данным анализа пептидных карт. К сожалению, в работе отсутствуют количественная оценка специфической активности и описание экспериментальных деталей. В ходе синтеза ацилпереносящего белка и его аналогов [99—101] авторы использовали для промывки пептидилполимера *трет*-бутанол (во избежание переэтерификации первичными спиртами) и двукратную конденсацию карбодимидным методом.

Подробного рассмотрения заслуживают синтезы ингибитора трипсина и его Phe¹⁰-аналога, осуществленные Тапом и Кайзером [92, 93]. Получен

синтетический ингибитор, обладающий высокой биологической активностью: 100% по тесту с использованием субстрата трипсина и 70% при определении константы диссоциации K_d (см. раздел VII), причем авторы считают, что различия в K_d природного и синтетического пептидов лежат в пределах ошибки опыта. В ходе синтеза были использованы стабильные в условиях удаления Вос-группы защищенные производные Lys(*o*-ClZ) и Tyr(BzlCl₂). В работе проведен контроль полноты протекания конденсаций, однако для работ Тана и Кайзера характерны типичные методические недостатки твердофазных синтезов: стандартный полимерный носитель, нейтрализация триэтиламино, промывки метанолом и т. д. При проведении конденсации 2,5-кратному избытку Вос-аминокислоты соответствовал 3-кратный избыток дидицлогексилкарбодимида, что повышало вероятность протекания побочных реакций. В работах отсутствует оценка оптической однородности продуктов. Отмеченные погрешности ставят под сомнение правильность вывода авторов о полной идентичности природного и синтетического ингибитора трипсина.

Существует три синтеза, осуществленных на полимерном носителе блочным методом. Это синтезы аналога урогастрола [82], ингибитора трипсина (Kunitz) [87—91] (группа Яджимы) и синтез кардиотоксина [94—96]. В работе по синтезу аналога урогастрола [82] использован неординарный для твердофазного метода подход. Растущая пептидная цепь была присоединена к полимерному носителю через *n*-алкоксибензилэфирную связь, для защиты боковых функций аминокислот использованы защитные группы *трет*-бутильного типа, SH-функции цистеина защищены Асм-группами, а остаток аргинина — протонированием, в связи с чем стадию нейтрализации проводили с недостатком основания, что могло вызвать неполноту конденсации [104]. Работа не завершена, последний описанный этап — получение пептида, отделенного от полимерного носителя и защищенного лишь Асм-группами.

Ингибитор трипсина (Kunitz) получен конденсацией на полимерном носителе пяти блоков, синтезированных классическим методом [87—91]. Серьезные замечания касаются прежде всего синтеза самих фрагментов. В ходе синтеза традиционно для работ этой группы оставались незащищенными остатки Thr, Ser, Tyr, Asn, Gln, что создавало высокую опасность образования различных побочных продуктов, причем использованные методы очистки (промывки и переосаждение) не гарантировали их удаление. Не проведена оценка степени рацемизации, несмотря на широкое использование в синтезе дидицлогексилкарбодимида. Очистка синтетического полипептида, отделенного от полимерного носителя, неудовлетворительна. Так, кривая элюции, полученная при хроматографическом разделении синтетического продукта на колонке с сефадексом G-25 (предел эксклюзии которого ниже молекулярного веса пептида), представляет собой сложную огибающую молекулярно-весавого распределения; для выделения синтетического ингибитора была отобрана фракция, обладающая биологической активностью и не соответствующая какому-либо пику.

Синтез кардиотоксина [94—96] осуществлен блочной конденсацией на полимерном носителе 15 фрагментов, экспериментальные подробности получения которых не описаны; приведены лишь такие характеристики, как удельное вращение, температура плавления, подвижность при хроматографии, данные аминокислотного анализа, причем крайне некорректно описано поведение пептидов при ТСХ (из пяти используемых систем растворителей две совпадают, а две имеют сходный состав; ряд приведенных значений *R_f* близок к нулю и т. д.). Достоинства работы также умаляет отсутствие данных ферментативного гидролиза синтетического продукта и подробной характеристики его химической однородности.

К этой же группе работ относится и незавершенный синтез рибонуклеазы T₁ [106—110], явившийся первой попыткой синтеза блочным методом на полимерном носителе столь крупного пептида и приостановленный на ранних стадиях работы.

Представляет интерес работа Сиглера и др. [85] по синтезу аполипопротенна С-1, отличающаяся как использованием нестандартного поли-

мерного носителя, так и рядом усовершенствований в методике проведения синтеза. При сравнении с нативным белком синтетический аполипопротеин имел небольшие различия в спектрах флуоресценции, спектрах КД, в данных седиментационного анализа, кроме того, в работе отсутствует характеристика полученного продукта данными ферментативного гидролиза.

Наиболее корректно выполненной представляется работа Ли и Ямаширо по синтезу β -липотропина [104], осуществленная с учетом последних новшеств в методологии пептидного синтеза. Синтезу β -липотропина предшествовала большая работа по получению двух его укороченных аналогов [102, 103], в ходе которой обрабатывались новые методические усовершенствования. Остановимся на этом цикле работ более подробно. (42—91)-Фрагмент β -липотропина был синтезирован в 1974 г. Отличия от стандартной методики заключались в использовании формильной защитной группы для триптофана, BrZ-группы для фенольного гидроксила тирозина и для ϵ -аминогруппы лизина. На стадии нейтрализации использовали диизопронилэтиламин, в присутствии которого проводили также конденсации методом симметричных ангидридов. В работе определена степень рацемизации, происходящей при твердофазном синтезе методом симметричных ангидридов, причем эта часть работы выполнена менее тщательно. Для очистки конечного продукта использован высокочувствительный и эффективный метод распределительной хроматографии. Работа по синтезу аналогов β -липотропина продолжена в 1978 г. Фрагмент 41—91 β -липотропина был синтезирован на бензгидриламином полимере. При проведении конденсации методом симметричных ангидридов в реакционный сосуд добавляли для повышения эффективности реакции до 20% трифторэтанола. Перед обработкой пептидполимера жидким HF была удалена N^α-Вос-группа во избежание *трет*-бутилирования.

Завершающим в этой серии работ явился полный синтез β -липотропина. Синтез проведен на бромполимере, используемые защитные группы такие же, как и в предыдущих синтезах, за исключением 4ClVzl-группы для остатков треонина 76, 72, 66 и 4BrVzl-группы для остатка глутаминовой кислоты 68. Таким образом, была использована более стабильная блокировка аминокислотных остатков, находящихся в C-концевой части молекулы и многократно подвергающихся обработке трифторуксусной кислотой. На стадии конденсации диизопронилэтиламин был заменен на N-метилморфолин. При обработке пептидполимера жидким HF в качестве защитной добавки был использован вместо анизола более мощный акцентор карбокатионов — 2,6-диметиланизол. Особенно примечательна в этой работе стадия очистки и доказательства гомогенности синтетического β -липотропина. Очистку проводили с помощью ионообменной хроматографии на CM-целлюлозе и распределительной хроматографии на агарозе. Синтетический β -липотропин был практически неотличим от природного белка по 12 различным тестам. Небольшие различия обнаружены в КД-спектрах и величинах оптического вращения и несколько более существенные — в данных аминокислотного анализа после ферментативного гидролиза. Отмечая синтез липотропина как качественно новый этап развития твердофазного метода, следует принять во внимание, что последовательность β -липотропина выгодно отличается от других белков отсутствием в ней остатков цистеина, вносящих большие дополнительные сложности в ход синтеза.

В плане перспективности подхода к синтезу пептидов твердофазным методом представляет интерес работа группы Меррифилда [267] по синтезу переменного района тяжелой цепи иммуноглобулина M603. Стратегия синтеза заключается в получении твердофазным методом небольших блоков, их отщеплении в защищенном виде от полимерного носителя, очистке и последующей блочной конденсации на полимерном носителе. Этот новый подход к твердофазному синтезу пептидов позволяет проводить очистку промежуточных соединений в ходе синтеза и, таким образом, нивелирует основной недостаток твердофазного метода. Работы по синтезу фрагмента иммуноглобулина только начаты, и пока описан лишь синтез 16-членного пептида последовательности 27—42 на 2-бромполимере. Синтез

проведен самым тщательным образом с изучением побочных реакций и поиском путей их устранения. Защищенный гексадекапептид отщеплен от полимерного носителя фотолизом и очищен пересаживанием и хроматографией на колонке с сефадексом LH-60 в ДМФА. Однако слишком низкая селективность сефадекса LH-60 вряд ли позволила полностью отделить нужный пептид от близкородственных продуктов твердофазного синтеза.

При рассмотрении работ, осуществленных твердофазным методом, необходимо отметить следующее. Неудачные примеры синтеза пептидов на полимерном носителе при явных достоинствах самого подхода инициировали более бурное развитие методологии твердофазного метода по сравнению с классическим. Это касается не только специфических для твердофазного синтеза проблем подходящего полимерного носителя, методов конденсации и т. д., но и общих проблем устойчивости защитных групп в условиях проведения синтеза, очистки и доказательства гомогенности синтетических пептидов.

Из сравнительной характеристики твердофазного и классического подходов к синтезу пептидов, которую мы пытались проводить при обсуждении проблем синтеза крупных пептидов, следует, что будущее, по-видимому, не за одним из этих методов, а за их разумным сочетанием, и наибольшие успехи будут достигнуты синтетиками, овладевшими тонкостями как одного, так и другого метода синтеза пептидов. Кроме того, рассмотрение сложившегося к настоящему времени положения в синтезе крупных пептидов приводит к выводу, что наблюдаемый сейчас и ожидаемый в будущем прогресс пептидного синтеза сводится не к какому-либо отдельно взятому открытию, которое сделает синтетические белки легко доступными, а состоит в методическом и кропотливом разрешении всего комплекса проблем и задач, стоящих перед одной из самых трудоемких областей биоорганической химии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wunsch E., Jaeger E., Deffner M., Scharf R., Lehnart P. Chem. Ber., 1972, B. 105, № 8, S. 2515-2522.
2. Sieber P., Riniker B., Brugger M., Kamber B., Rittel W. Helv. chim. acta, 1970, B. 53, № 8, S. 2135-2150.
3. Wunsch E., Wendlberger G. Chem. Ber., 1968, B. 101, № 11, S. 3659-3663.
4. Wunsch E., Diemer K.-H. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1972, B. 353, № 8, S. 1246-1254.
5. Jaeger E., Thamm P., Schmidt I., Knof S., Moroder L., Wunsch E. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1978, B. 359, № 2, S. 155-164.
6. Sieber P., Kamber B., Hartmann A., Jöhl A., Riniker B., Ritter W. Helv. chim. acta, 1974, B. 57, № 8, S. 2617-2626.
7. Kisfaludy L., Löw M., Schön I., Szirtes T., Nyeki O., Vezér Cs., Keresztessy P., Korenczki F., Sajgó M. In: Peptides 1976/Ed. A. Loffet. Belgium: Editions de l'Université de Bruxelles, 1976, p. 239-246.
8. Moroder L., Borin G., Marchiori F., Scoffone E. Biopolymers, 1972, v. 11, № 10, p. 2191-2194.
9. Moroder L., Borin G., Marchiori F., Scoffone E. Biopolymers, 1973, v. 12, № 3, p. 477-492.
10. Moroder L., Marchiori F., Borin G., Scoffone E. Biopolymers, 1973, v. 12, № 3, p. 493-505.
11. Moroder L., Borin G., Marchiori F., Scoffone E. Biopolymers, 1973, v. 12, № 3, p. 507-520.
12. Borin G., Moroder L., Marchiori F., Scoffone E. Biopolymers, 1973, v. 12, № 3, p. 521-534.
13. Borin G., Moroder L., Marchiori F., Scoffone E. Biopolymers, 1973, v. 12, № 4, p. 693-700.
14. Moroder L., Marchiori F., Borin G., Scoffone E. Biopolymers, 1973, v. 12, № 4, p. 701-720.
15. Moroder L., Borin G., Marchiori F., Scoffone E. In: Peptides 1972/Eds. H. Hanson, H. D. Jakubke. Amsterdam: North-Holland Publ., 1973, p. 223-226.
16. Moroder L., Borin G., Marchiori F., Scoffone E. Biopolymers, 1973, v. 12, № 4, p. 721-728.
17. Moroder L., Marchiori F., Borin G., Scoffone E. Biopolymers, 1973, v. 12, № 4, p. 729-750.
18. Moroder L., Borin G., Marchiori F., Scoffone E. Liebigs Ann. Chem., 1974, № 3, S. 213-224.
19. Moroder L., Filippi B., Borin G., Marchiori F. Biopolymers, 1975, v. 14, № 10, p. 2061-2074.

20. Moroder L., Filippi B., Borin G., Marchiori F. *Biopolymers*, 1975, v. 14, p. 2075-2093.
21. Camble R. In: *Chemistry and Biology of Peptides*/Ed. J. Meienhofer. Michigan: Ann. Arbor Sci. Publ., 1972, p. 281-286.
22. Yajima H., Ogawa H., Kubota M., Tobe T., Fujimura M., Henmi K., Torizuka K., Adachi H., Imura H., Taminato T. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1975, v. 97, № 19, p. 5593-5594.
23. Ogawa H., Kubota M., Yajima H. *Chem. Pharm. Bull.*, 1976, v. 24, № 10, p. 2428-2434.
24. Kubota M., Ogawa H., Yajima H. *Chem. Pharm. Bull.*, 1976, v. 24, № 10, p. 2435-2446.
25. Ogawa H., Kubota M., Yajima H., Tobe T., Fujimura M., Henni K., Torizuka K., Adachi H., Imura H., Taminato T. *Chem. Pharm. Bull.*, 1976, v. 24, № 10, p. 2447-2456.
26. Rocchi R., Benassi C. A., Guarneri M., Guggi A., Tomatis R. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1974, v. 6, № 6, p. 391-395.
27. Rocchi R., Benassi C. A., Guarneri M., Guggi A., Tomatis R. In: *Peptides 1974* /Ed. I. Wolmann. Jerusalem: Israel Universities Press, 1975, p. 9-15.
28. Tomatis R., Guggi A., Benassi C., Salvadori S., Rocchi R. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1976, v. 8, № 1, p. 65-77.
29. Guggi A., Tomatis R., Periotto V., Rocchi R. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1976, v. 8, № 1, p. 79-85.
30. Tomatis R., Guggi A., Ferroni R., Rocchi R. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1976, v. 8, № 1, p. 87-95.
31. Guggi A., Tomatis R., Benassi C. A., Rocchi R. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1976, v. 8, № 2, p. 97-105.
32. Tomatis R., Guggi A., Menegatti E., Rocchi R. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1976, v. 8, № 2, p. 107-113.
33. Guggi A., Tomatis R., Salvadori S., Rocchi R. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1976, v. 8, № 2, p. 115-124.
34. Tomatis R., Guggi A., Salvadori S., Rocchi R. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1977, v. 9, № 2, p. 137-147.
35. Tomatis R., Guggi A., Salvadori S., Peritto V., Rocchi R. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1978, v. 11, № 3, p. 269-281.
36. Tomatis R., Guarneri M., Guggi A., Salvadori S., Rocchi R. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1979, v. 14, № 4, p. 347-353.
37. Михалева И. И., Мязгова М. А., Жуклова Г. Ф., Иванов В. Т. *Биоорган. химия*, 1980, т. 6, № 7, с. 982-1007.
38. Вольпина О. М., Дейгин В. И., Михалева И. И., Иванов В. Т. *Биоорган. химия*, 1980, т. 6, № 7, с. 1133-1154.
39. Вольпина О. М., Дешко Т. Н., Михалева И. И., Иванов В. Т. *Биоорган. химия*, 1980, т. 6, № 7, с. 1155-1162.
40. Михалева И. И., Вольпина О. М., Уткин Ю. Н., Иванов В. Т. *Биоорган. химия*, 1981, т. 7, № 6, с. 805-818.
41. Föhles J., Berndt H., Danho W., Naithani V. K., Sasaki A., Zahn H. In: *Abstracts of the 15th European Peptide Symposium*. Gdansk Scientific Society, 1978, p. 65.
42. Berndt H. Hoppe-Seyler's Z. *Physiol. Chem.*, 1979, B. 360, № 6, S. 747-760.
43. Sasaki N. A. Hoppe-Seyler's Z. *Physiol. Chem.*, 1979, B. 360, № 6, S. 761-764.
44. Berndt H. Hoppe-Seyler's Z. *Physiol. Chem.*, 1979, B. 360, № 6, S. 765-772.
45. Danho W., Föhles J. Hoppe-Seyler's Z. *Physiol. Chem.*, 1980, B. 36, № 6, S. 839-847.
46. Föhles J., Danho W. Hoppe-Seyler's Z. *Physiol. Chem.*, 1980, B. 361, № 6, S. 849-856.
47. Danho W., Naithani V. K., Sasaki A. N., Föhles J., Berndt H., Büllsbach E. E., Zahn H. Hoppe-Seyler's Z. *Physiol.*, 1980, B. 361, № 6, S. 857-863.
48. Büllsbach E. E., Danho W., Helbig H.-J., Zahn H. Hoppe-Seyler's Z. *Physiol. Chem.*, 1980, B. 361, № 6, S. 865-873.
49. Yanaihara N., Sakagami M., Sakura N., Hashimoto T., Yanaihara C. In: *Peptide Chemistry 1977*/Ed. T. Shiba. Protein Research Foundation, Japan, 1978, p. 195-200.
50. Yanaihara N., Yanaihara C., Dupuis C., Beacham J., Camble R., Hofmann K. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1969, v. 91, p. 2184-2185.
51. Beacham J., Dupuis G., Finn F. M., Storey H. T., Yanaihara C., Yanaihara N., Hofmann K. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1971, v. 93, № 21, p. 5526-5538.
52. Camble R., Dupuis G., Kawasaki K., Romovacek H., Yanaihara N., Hofmann K. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1972, v. 94, № 6, p. 2091-2100.
53. Storey H. T., Beacham J., Cernosek S. F., Finn F. M., Yanaihara C., Hofmann K. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1972, v. 94, № 17, p. 6170-6178.
54. Kawasaki K., Camble R., Dupuis G., Romovacek H., Storey H., Yanaihara C., Hofmann K. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1973, v. 95, № 20, p. 6815-6824.
55. Romovacek H., Drabarek S., Kawasaki K., Down S. R., Obermeier R., Hofmann K. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1974, v. 6, № 6, p. 435-445.
56. Romovacek H., Dowds R., Kawasaki K., Nishi N., Hofmann K. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1979, v. 101, № 20, p. 6081-6091.
57. Denkewalter R. G., Veber D. F., Holly F. W., Hirschmann K. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1969, v. 91, № 10, p. 502-503.
58. Denkewalter R. G., Veber D. F., Holly F. W., Hirschmann R. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1969, v. 91, № 10, p. 503-505.

59. *Strachan R. G., Paleveda W. J., Nutt R. F., Vitali R. A., Veber D. F., Dickinson M. J., Garsky V., Deak J. E., Walton E., Jenkins S. R., Holly F. W., Hirschmann R. J.* Amer. Chem. Soc., 1969, v. 91, № 2, p. 505-506.
60. *Veber D. F., Varga S. L., Milkowski J. D., Joshua H., Conn J. B., Hirschmann R., Denkwalter R. C. J.* Amer. Chem. Soc., 1969, v. 91, № 2, p. 506-507.
61. *Hirschmann R., Nutt R. F., Veber D. F., Vitali R. A., Varge S. L., Jacob T. A., Holley F. W., Denkwalter R. G. J.* Amer. Chem. Soc., 1969, v. 91, № 2, p. 507-508.
62. *Hirschmann R., Denkwalter R. G.* Naturwiss., 1970, v. 4, № 3, p. 146-151.
63. *Fujii N., Koyama K., Yajima H.* In: Peptide Chemistry, 1976/Ed. T. Nakajima. Protein Research Foundation, Osaka, 1977, p. 77-80.
64. *Fujii N., Koyama K., Yajima H.* In: Peptide Chemistry, 1977/Ed. T. Shibo. Protein Research Foundation, Osaka, 1977, p. 201-204.
65. *Yajima H., Fujii N. J.* Chem. Soc. Chem. Commun., 1980, № 3, p. 115-116.
66. *Fujii N.* Faculty pharmaceut. sci., 1980, Kyoto university.
67. *Galpin I. J., Handa B. K., Hudson D., Jackson A. G., Kenner G. W., Ohlsen S. R., Ramage R., Singh B., Tyson R. G.* In: Peptides 1976/Ed. A. Loffet. Editions de l'Universite de Bruxelles, Belgium, 1976, p. 247-256.
68. *Galpin I. J., Kenner G. W., Ohlsen S. R., Ramage R. J.* Chromatogr., 1975, v. 106, № 1, p. 125-129.
69. *Galpin I. J., Handa B. K., Kenner G. W., Moore S., Ramage R. J.* Chromatogr., 1976, v. 123, № 1, p. 237-242.
70. *Galpin I. J., Jackson A. G., Kenner G. W., Noble P., Ramage R. J.* Chromatogr., 1978, v. 147, № 2, p. 424-428.
71. *Kenner G. M., Ramage R., Galpin I. Y.* In: Abstr. of 6-th American peptide symposium, Georgetown University, Washington, 1979, p. 41.
72. *Kenner G. W., Galpin I. J., Ramage R.* In: Peptides structure and biological function/Eds. E. Gross, J. Meienhofer. Pierce Chemical Company, 1979, p. 431-438.
73. *Kenner G. W., Ramage R., Sheppard R. C.* Tetrahedron, 1979, v. 35, № 23, p. 2767-2769.
74. *Galpin I. J., Hancock F. E., Handa B. K., Jackson A. G., Kenner G. W., Ramage R., Singh B.* Tetrahedron, 1979, v. 35, № 23, p. 2771-2778.
75. *Galpin I. J., Hancock F. E., Handa B. K., Jackson A. G., Kenner G. W., Ramage R., Singh B., Tyson R. G.* Tetrahedron, 1979, v. 35, № 23, p. 2779-2783.
76. *Galpin I. J., Kenner G. W., Ohlsen S. R., Ramage R., Sheppard R. C., Tyson R. G.* Tetrahedron, 1979, v. 35, № 23, p. 2785-2790.
77. *Galpin I. J., Hancock F. E., Handa B. K., Jackson A. G., Kenner G. W., Ramage R., Singh B.* Tetrahedron, 1979, v. 35, № 23, p. 2791-2794.
78. *Galpin I. J., Kenner G. W., Ramage R.* Tetrahedron, 1980, v. 36, № 15, p. 2241-2245.
79. *Galpin I. J., Handa B. K., Kenner G. W., Ohlsen S. R., Ramage R.* Tetrahedron, 1980, v. 36, № 15, p. 2247-2253.
80. *Galpin I. J., Hudson D., Jackson A. G., Kenner G. W., Ramage R.* Tetrahedron, 1980, v. 36, № 15, p. 2255-2257.
81. *Galpin I. J., Handa B. K., Jackson A. G., Kenner G. W., McDowell P., Ohlsen S. R., Ramage R.* Tetrahedron, 1980, № 36, p. 2259-2262.
82. *Gamble R., Petter N. N.* In: Peptides 1976/Ed. A. Loffet. Editions de l'Universite de Bruxelles, Belgium, 1976, p. 299-307.
83. *Bayer E., Jung P., Hagenmaier H.* Tetrahedron Lett., 1968, v. 24, № 13, p. 4853-4866.
84. *Harding D. R. K., Battersby J. E., Husbands D. R., Hancock W. S. J.* Amer. Chem. Soc., 1976, v. 98, № 9, p. 2664-2665.
85. *Sigler F. G., Soutar A. K., Smith L. C., Gotto A. M., Sparrow J. R.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, v. 73, № 5, p. 1422-1426.
86. *Noda K., Terada S., Mitsuyasu N., Waki M., Kato T., Izumiya N.* Naturwis., 1971, v. 58, № 3, p. 147-148.
87. *Yajima H., Kiso Y.* Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 1976, v. 22, № 5, p. 1061-1066.
88. *Yajima H., Okoda Y., Watanabe H., Kiso Y.* Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 1976, v. 22, № 5, p. 1067-1074.
89. *Yajima H., Mizokami N., Kiso M., Jinnouchi T., Kai Y., Kiso Y.* Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 1976, v. 22, № 5, p. 1075-1079.
90. *Yajima H., Kiso Y., Katagawa K.* Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 1974, v. 22, № 5, p. 1079-1086.
91. *Yajima H., Kiso Y.* Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 1976, v. 22, № 5, p. 1087-1094.
92. *Tan N. H., Kaiser E. T. J.* Org. Chem., 1976, v. 41, № 17, p. 2787-2793.
93. *Tan N. H., Kaiser E. T.* Biochemistry, 1977, v. 16, № 8, p. 1531-1541.
94. *Wang K. T., Wong C. H.* In: Peptides: Proceedings of the Fifth American Peptide Symposium/Eds. M. Goodman, J. Meienhofer. N. Y.: Wiley, 1977, p. 528-534.
95. *Wong C. H., Chen S. T., Ho C. L., Wang K. T.* Biochim. et biophys. acta, 1978, v. 536, № 2, p. 376-389.
96. *Wong C. H., Ho C. L., Wang K. T. J.* Chromatogr., 1978, v. 154, № 1, p. 25-32.
97. *Izumiya N., Aoyagi H., Noda K., Yonezawa H., Takahashi N., Waki M., Kato T., Yang C. C.* Jap. J. Med. Sci. and Biol., 1972, v. 25, № 3, p. 215-225.
98. *Aoyagi H., Yonezawa H., Takahashi N., Kato K., Izumiya N., Yang G.* Biochim. et biophys. acta, 1972, v. 263, № 3, p. 823-826.
99. *Hancock W. S., Prescott D. J., Nutty W. L., Weintraub J., Vagelos P. R., Marshall G. R. J.* Amer. Chem. Soc., 1971, v. 93, № 7, p. 1799-1800.

100. Hancock W. S., Prescott D. J., Marshall G. R., Vagelos P. R. *J. Biol. Chem.*, 1972, v. 247, № 19, p. 6224-6233.
101. Hancock W. S., Marshall G. R., Vagelos P. R. *J. Biol. Chem.*, 1973, v. 248, № 3, p. 2424-2434.
102. Yamashiro D., Li C. H. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, v. 7, № 12, p. 4945-4949.
103. Lemaire S., Yamashiro D., Li C. H. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1978, v. 11, № 2, p. 179-184.
104. Yamashiro D., Li C. H. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1978, v. 100, № 16, p. 5174-5179.
105. Sano S., Kurihara M. *Hoppe-Seyler's Z. Phys. Chem.*, 1969, B. 350, № 10, S. 1183-1187.
106. Ohno M., Kato T., Mitsuyasu N., Waki M., Makisumi S., Izumiya N. *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 1967, v. 40, № 1, p. 204-208.
107. Waki M., Mitsuyasu N., Kato T., Makisumi S., Izumiya N. *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 1968, v. 41, № 3, p. 669-672.
108. Kato T., Mitsuyasu N., Waki M., Makisumi S., Izumiya N. *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 1968, v. 41, № 10, p. 2480-2489.
109. Mitsuyasu N., Waki M., Kato T., Makisumi S., Izumiya N. *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 1970, v. 43, № 5, p. 1556-1560.
110. Terada S., Mitsuyasu N., Waki M., Kato T., Izumiya N. *Memoirs of the Faculty of Science, Kyushu University*, 1973, v. 8, № 2, p. 179-190.
111. Waki M., Mitsuyasu N., Terada S., Matsuura S., Kato T., Izumiya N. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1974, v. 61, № 2, p. 576-582.
112. Gutte B. *J. Biol. Chem.*, 1975, v. 250, № 3, p. 889-904.
113. Gutte B., Merrifield R. B. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1969, v. 91, № 2, p. 501-502.
114. Gutte B., Merrifield R. B. *J. Biol. Chem.*, 1971, v. 246, № 6, p. 1922-1941.
115. Barstow L. E., Hruby V. I., Robinson A. B., Rubley J. A., Sharp J. J., Shimoda T. *Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exptl. Biol.*, 1971, v. 30, № 3, Abstr. 1287.
116. Sharp J. J., Robinson A. B., Kamen M. P. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1973, v. 95, № 18, p. 6097-6108.
117. Li C. H., Yamashiro D. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1970, v. 92, № 26, p. 7608-7609.
118. Bayer E., Gil-av E., König W. A., Nakaparsin S., Oro J., Parr W. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1970, v. 92, № 6, p. 1738-1740.
119. Rebek J., Feitler D. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1975, v. 7, № 2, p. 167-169.
120. Bayer E., Eckstein H., Hügèle K., König W. A., Brüning W., Hagenmaier H., Parr W. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1970, v. 92, № 6, p. 1735-1740.
121. Rapaka R. S., Bhatnagar R. S., Nitecki D. E. *Biopolymers*, 1976, v. 15, № 8, p. 1585-1590.
122. König W., Geiger R. *Chem. Ber.*, 1970, B. 103, № 7, S. 2024-2033.
123. Sakakibara S. In: *Peptides: Proceedings of the Fifth American Peptide Symposium* / Eds. M. Goodman, J. Meienhofer. N. Y.: Wiley, 1977, p. 436-447.
124. Felix A. M., Jimenez M. H., Meienhofer J. In: *Peptides: Proceedings of the Fifth American Peptide Symposium* / Eds. M. Goodman, J. Meienhofer. N. Y.: Wiley, 1977, p. 532-535.
125. Sakakibara S. In: *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins* / Ed. B. Weinstein. N. Y.: Dekker, 1971, v. 1, p. 51-85.
126. Yajima H., Funavoshi S., Fujii N., Akaji K., Irie H. *Chem. Pharm. Bull.*, 1979, v. 27, № 5, p. 1060-1061.
127. Baldwin R. L. *Ann. Rev. Biochem.*, 1975, v. 44, p. 453-475.
128. Anfinsen C. B., Scheraga H. A. *Adv. Protein Chem.*, 1975, v. 29, p. 205-300.
129. Nemethy G., Scheraga H. A. *Quart. Rev. Biophys.*, 1977, v. 10, № 3, p. 239-418.
130. Low M., Kisfaludy L. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1979, B. 360, № 1, S. 13-18.
131. Ohno M., Tsukamoto S., Makisumi S., Izumiya N. *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 1972, v. 45, № 9, p. 2852-2955.
132. Ohno M., Tsukamoto S., Izumiya N. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1972, № 11, p. 663-664.
133. Ohno M., Tsukamoto S., Sato S., Izumiya N. *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 1973, v. 46, № 10, p. 3280-3285.
134. Windridge G. C., Jorgensen E. S. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1971, v. 93, № 23, p. 6318-6319.
135. Shin M., Inouye K. In: *Peptide Chemistry 1977* / Ed. T. Shiba. Protein Research Foundation, Osaka, 1977, p. 67-72.
136. Merrifield R. B. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1963, v. 85, № 14, p. 2149-2154.
137. Christensen M., Schou O. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1978, v. 12, № 3, p. 121-129.
138. Battersby A., Robinson J. C. *J. Chem. Soc. (London)*, 1955, № 1, p. 259-269.
139. Ondetti M. A., Deer A., Sheehan J. T., Plušćec J., Kocý O. *Biochemistry*, 1968, v. 7, № 11, p. 4069-4075.
140. Erickson W., Merrifield R. B. In: *Proteins, Third Edition* / Eds. H. Neurath, R. L. Hill. Acad. Press, 1976, v. 2, p. 397-432.
141. Bodanszky M., Tolle J. C., Deshamene S. S., Bodanszky A. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1978, v. 12, № 2, p. 57-68.
142. Schön I., Kisfaludy L. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1979, v. 14, № 5, p. 485-494.
143. Bodanszky M., Kwei I. Z. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1978, v. 12, № 1, p. 69-74.
144. Yang C. C., Merrifield R. B. *J. Org. Chem.*, 1976, v. 41, № 6, p. 1082-1041.
145. Martinez J., Bodanszky M. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1978, v. 12, № 5, p. 277-283.
146. Wang S. S. In: *Chemistry and Biology of Peptides* / Ed. J. Meienhofer. Michigan: Ann. Arbor Sci. Publ., 1973, p. 179-182.

147. Suzuki K., Endo N. In: Peptide Chemistry 1977 / Ed. T. Shiba. Osaka: Protein Research Foundation, 1977, p. 33-36.
148. Bodanszky M., Martinez J. J. Org. Chem., 1978, v. 43, № 15, p. 3071-3073.
149. Pietta P. G., Cavallo P. J. Org. Chem., 1971, v. 36, № 25, p. 3966-3970.
150. Haley E. E., Corcoran B. J. Biochemistry, 1967, v. 6, № 9, p. 2668-2672.
151. Weber K., Konigsberg W. J. Biol. Chem., 1967, v. 242, № 15, p. 3563-3578.
152. Izelin B., Schwyzer R. Helv. chim. acta, 1962, v. 45, № 5, p. 1499-1509.
153. Hoffmann K., Finn F. M., Limetti M., Montibeller J., Zanetti G. J. Amer. Chem. Soc., 1966, v. 88, № 15, p. 3633-3639.
154. McKerrow J. H., Robinson A. B. Anal. Biochem., 1971, v. 42, № 2, p. 565-568.
155. McKerrow J. H., Robinson A. B. Science, 1974, v. 183, № 4121, p. 85.
156. Robinson A. B., McKerrow J. H., Cary P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1970, v. 66, № 3, p. 753-757.
157. Robinson A. B., Tedro S. Int. J. Pept. Prot. Res., 1974, v. 5, № 4, p. 275-278.
158. Polzhofer R. P., Ney K. H. Tetrahedron, 1970, v. 26, № 13, p. 3221-3226.
159. Erickson B. W., Merrifield R. B. J. Amer. Chem. Soc., 1973, v. 95, № 11, p. 3750-3756.
160. Erickson B. W., Merrifield R. B. In: Chemistry and Biology of Peptides / Ed. J. Meienhofer. Michigan: Ann Arbor Sci. Publ., 1972, p. 191-195.
161. Yamashiro D., Noble R., Li C. H. In: Chemistry and Biology of Peptides / Ed. J. Meienhofer. Michigan: Ann Arbor Sci. Publ., 1972, p. 197-202.
162. Wünsch E., Jäger E., Kisfaludy L., Löw M. Angew. Chem., 1977, B. 89, № 5, S. 330-331.
163. Jaeger E., Thamm P., Knof S., Wünsch E. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1978, B. 359, № 12, S. 1617-1628.
164. Jaeger E., Thamm P., Knof S., Wünsch E. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1978, B. 359, № 12, S. 1629-1636.
165. Löw M., Kisfaludy L., Sohar P. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1978, B. 359, № 12, S. 1643-1651.
166. Ogawa H., Sasaki T., Irie H., Yajima H. Chem. Pharm. Bull., 1978, v. 26, № 10, p. 3144-3149.
167. Chino N., Masui Y., Sakakibara S. In: Peptide Chemistry 1977 / Ed. T. Shiba. Osaka: Protein Research Foundation, 1977, p. 27-32.
168. Lundt B., Johansen N., Volund A., Markusen J. Int. J. Pept. Prot. Res., 1978, v. 12, № 5, p. 258-268.
169. Benesek W. E., Cole R. D. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1965, v. 20, № 5, p. 655-660.
170. Marglin A., Merrifield R. B. J. Amer. Chem. Soc., 1966, v. 80, № 21, p. 5051-5052.
171. Bodanszky M., Fink M. L., Klausner Y. A., Natarajan S., Tatemoio K., Yiotakis A. E., Bodanszky A. J. Org. Chem., 1977, v. 42, № 1, p. 149-152.
172. Martinez J., Tolle J. C., Bodanszky M. Int. J. Pept. Prot. Res., 1979, v. 13, № 1, p. 22-27.
173. Agarwa K. L., Kenner C. W., Sheppard R. C. J. Chem. Soc., 1968 C, № 11, p. 1384-1391.
174. Mehlis B., Apelt H., Bergmann J., Nidrich M. J. Prog. Chem., 1972, B. 314, S. 390-400.
175. Schafer P. J., Young G. T., Elliot D. F., Wade R. J. Chem. Soc. (C), 1971, № 1, p. 46-49.
176. Ramachandran J., Li C. M. J. Org. Chem., 1963, v. 28, № 1, p. 173-177.
177. Shalitin Y., Bernhard S. J. Amer. Chem. Soc., 1966, v. 88, № 20, p. 4711-4721.
178. Tilak M., Hoffman J. J. Org. Chem., 1977, v. 42, № 12, p. 2098-2100.
179. Sheehan J. C., Hasspacher K., Yeh Y. L. J. Amer. Chem. Soc., 1959, v. 81, № 22, p. 6086.
180. DeTar D. F., Silverstein R., Rogers F. F., Jr. J. Amer. Chem. Soc., 1966, v. 80, № 5, p. 1024-1030.
181. Natarajan S., Bodansky M. J. Org. Chem., 1976, v. 41, № 7, p. 1269-1272.
182. Paul R., Kende A. S. J. Amer. Chem. Soc., 1976, v. 86, № 4, p. 741-742.
183. Kachelikar D., Ressler C. J. Amer. Chem. Soc., 1964, v. 86, № 12, p. 2467-2473.
184. Meienhofer J. In: Peptides: Analysis, Synthesis, Biology / Eds. E. Gross, J. Meienhofer. N. Y.: Acad. Press, 1979, v. 1, p. 198-241.
185. Шредер Э., Любке К. Пептиды. М.: Мир, 1969, т. 1, с. 124-127.
186. Inouye K., Watanabe K., Shin M. J. Chem. Soc. Perkin Trans I, 1977, № 17, p. 1905-1911.
187. Inouye K., Watanabe K. J. Chem. Soc. Perkin Trans I, 1977, № 17, p. 1911-1915.
188. Weygand F., Steglich W., Chytil N. Z. Naturforsch., 1968, B. 23, № 10, S. 1391-1392.
189. Geiger R., Treuth G., Burow F. Chem. Ber., 1973, B. 106, № 7, S. 2339-2346.
190. Fletcher G., Low M., Young G. T. J. Chem. Soc. Perkin Trans., 1973, № 11, p. 1162-1164.
191. Sakakibara S., Shimonishi Y. Bull. Chem. Soc. Jap., 1965, v. 38, p. 1412-1413.
192. Lenard J. Chem. Rev., 1969, v. 69, № 5, p. 625-638.
193. Lenard J., Shelly A. V., Hess G. P. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1964, v. 14, № 5, p. 493-502.
194. Iwai K., Ando T. In: Methods in Enzymology / Ed. C. H. W. Hirs, N. Y.: Acad. Press, 1967, v. 11, p. 263-282.
195. Lenard J., Hess G. P. J. Biol. Chem., 1964, v. 239, № 10, p. 3275-3281.

196. Sakakibara S., Shin K. H., Hess G. P. J. Amer. Chem. Soc., 1962, v. 84, № 24, p. 4921—4928.
197. Shin K. H., Sakakibara S., Schneider W. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1962, v. 8, № 4, p. 288—293.
198. Engelhard M., Merrifield R. B. J. Amer. Chem. Soc., 1978, v. 100, № 11, p. 3559—3563.
199. Sano S., Kowanishi S. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1973, v. 51, № 1, p. 46—51.
200. Sano S., Kowanishi S. J. Amer. Chem. Soc., 1975, v. 97, № 12, p. 3480—3484.
201. Feinberg R. S., Merrifield R. B. J. Amer. Chem. Soc., 1975, v. 97, № 12, p. 3485—3496.
202. Suzuki K., Endo N., Sasaki Y. Chem. Pharm. Bull., 1976, v. 24, № 12, p. 3025—3033.
203. Sugano H., Taguchi Y., Konai H., Miyoshi M. In: Peptide Chemistry 1977 / Ed. T. Shiba. Osaka: Protein Research Foundation, 1977, p. 23—26.
204. Sakakibara S., Shimonishi Y., Kishida Y., Okada M., Sugihara H. Bull. Chem. Soc. Jap., 1967, v. 40, № 9, p. 2164—2167.
205. Hirotsu Y., Shiba T., Kaneko T. Bull. Chem. Soc. Jap., 1967, v. 40, № 12, p. 2945—2949.
206. Yajima H., Akaji K., Funakoshi S., Fujii N., Irie H. Chem. Pharm. Bull., 1980, v. 28, № 6, p. 1942—1945.
207. Lenard J., Robinson A. B. J. Amer. Chem. Soc., 1967, v. 89, № 1, p. 181—182.
208. Sakakibara S., Nakamizo N., Kishida Y., Yoshimura S. Bull. Chem. Soc. Jap., 1968, v. 41, № 6, p. 1477—1479.
209. Baba T., Sugiyama H., Seto S. Chem. Pharm. Bull., 1973, v. 21, № 1, p. 207—209.
210. Rocchi R., Benassi C. A., Tomatis R., Ferroni R., Menegatti E. Int. J. Pept. Prot. Res., 1976, v. 8, № 1, p. 167—175.
211. Koch A. L., Lamont W. A., Katz J. J. Arch. Biochem. and Biophys., 1956, v. 63, № 1, p. 106—116.
212. Veber D. F., Milkowski J. D., Varga S. L., Denkwalter R. G., Hirschmann R. J. Amer. Chem. Soc., 1972, v. 94, № 15, p. 5456—5461.
213. Okamoto M., Aimoto S., Shimonishi Y. In: Peptide Chemistry 1977 / Ed. T. Shiba. Osaka: Protein Research Foundation, 1977, p. 205—208.
214. Aimoto S., Shimonishi Y. Bull. Chem. Soc. Jap., 1975, v. 48, № 11, p. 3293—3297.
215. Aimoto S., Shimonishi Y. Bull. Chem. Soc. Jap., 1976, v. 49, № 1, p. 317—320.
216. Aimoto S., Shimonishi Y. Bull. Chem. Soc. Jap., 1978, v. 51, № 1, p. 205—218.
217. Kemp D. S. In: Peptides: analysis, synthesis, biology / Eds. E. Gross, J. Meienhofer. N. Y.: Acad. Press, 1979, v. 1, p. 315—384.
218. Kovacs J. In: Peptides: analysis, synthesis, biology / Eds. E. Gross, J. Meienhofer. N. Y.: Acad. Press, 1980, v. 1, part A, p. 486—540.
219. Finn F. M., Hofmann K. The synthesis of peptides by solution methods with emphasis on peptide hormones / Eds. H. Neurath, R. L. Hill. N. Y.: Acad. Press, 1976, p. 180.
220. Taschner E., Lubiewska L., Smulkawski M., Wojciechowska H. Experientia, 1968, v. 24, № 4, p. 521—523.
221. Kemp P. S., Wang S. W., Busby G., Hugel G. J. Amer. Chem. Soc., 1970, v. 92, № 4, p. 1043—1055.
222. Weygand F., Hoffmann D., Prox A. Z. Naturforsch., 1968, B. 23b, № 2, p. 279—281.
223. König W., Geiger R. Chem. Ber., 1970, v. 103, № 7, p. 2034—2040.
224. Fujino M., Kitada C., Yoshida C. In: Peptide Chemistry 1976 / Ed. T. Nakajima, Osaka: Protein Research Foundation, 1977, p. 28—31.
225. Matsuo H., Kawazoe Y., Sato M., Ohnishi M., Tatsuno T. Chem. Pharm. Bull., 1967, v. 15, № 4, p. 391—398.
226. Williams M. W., Young G. T. J. Chem. Soc., Perkin Trans I, 1972, № 11, p. 1194—1200.
227. Kemp D. S., Wang S.-W., Rebek J., Mollen R. C., Banquer C., Subramangam G. Tetrahedron, 1974, v. 30, № 22, p. 3955—3962.
228. Meienhofer J. In: The Peptides. Analysis, synthesis, biology / Eds. E. Gross, J. Meienhofer. N. Y.: Acad. Press, 1979, v. 1, p. 280.
229. Mihara S., Takaya T., Morikawa T., Emura J., Sakakibara S. In: Peptide Chemistry 1976 / Ed. T. Nakajima. Osaka: Protein Research Foundation, 1976, p. 32—35.
230. Brenner M., Pfister R. W. Helv. chim. acta, 1951, B. 34, № 7, p. 2085—2096.
231. Bosshard H. R., Schechter I., Berger A. Helv. chim. acta, 1973, B. 56, № 2, p. 717—723.
232. Bakum J. T. M., Beyerman H. C., Hoogerhout P., Olieman C., Voskamp D. Recueil, 1977, v. 96, № 12, p. 301—306.
233. Larsen B., Fox B. L., Burke M. F., Hruby V. J. Int. J. Pept. Prot. Res., 1979, v. 13, № 1, p. 12—21.
234. Yamashiro D., Tseng L., Doneen D., Loh H., Li C. H. Int. J. Pept. Prot. Res., 1977, v. 10, № 2, p. 159—166.
235. Siber P., Kamber B., Hartmann A., Jöhl A., Riniker B., Rittel W. Helv. chim. acta, 1977, B. 60, № 1, S. 27—37.
236. Lauterwein J., Wüthrich K., Schweitz H., Wincent J. P., Lazdunski M. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1977, v. 76, № 4, p. 1071—1078.
237. Manning J. M., Moore S. J. Biol. Chem., 1968, v. 243, № 21, p. 5591—5597.
238. Parr W., Howard I. Y. J. Chromatogr., 1972, v. 67, № 2, p. 227—235.
239. Jorgensen E. C., Windridge G. C., Lee T. C. J. Med. Chem., 1970, v. 13, № 4, p. 744—745.
240. Tregear G. W. In: Peptides 1974 / Ed. J. Wolman. Jerusalem: Israel Universities Press, 1975, p. 177—189.

241. *Tregear G. W., Potts J. T.* Biochemistry, 1977, v. 16, № 13, p. 2817—2823.
242. *Yamashiro D.* Int. J. Pept. Prot. Res., 1979, v. 13, № 1, p. 5—11.
243. *Ranova-Davis E., Ramachandran J.* Biochemistry, 1976, v. 15, № 4, p. 921—927.
244. *Rubinstein M.* Analyt. Biochem., 1979, v. 98, № 1, p. 1—7.
245. *Burgus R., Rivier J.* In: Peptides 1976 / Ed. A. Loffet. Edition de l'Universite de Bruxellus, 1976, p. 85—94.
246. *Rivier J., Spiess J., Perrin M., Vale W.* In: Peptides, structure and biological function / Eds E. Gross, J. Meienhofer. Pierce Chemical Company, 1979, p. 125—128.
247. *Bennett H. P. J., Broune C. A., Goltzman D., Solomon S.* In: Peptides, structure and biological function / Eds E. Gross, J. Meienhofer. Pierce Chemical Company, 1979, p. 121—124.
248. *Rubinstein M., Rubinstein S., Familetti P. C., Brink L. D., Hershberg R. D., Gutterman J., Hester J., Pestka S.* In: Peptides, structure and biological function / Eds E. Gross, J. Meienhofer. Pierce Chemical Company, 1979, p. 99—103.
249. *Gabriel T. F., Jimenez M. H., Felix A. M., Michalewsky J., Meienhofer J.* Int. J. Pept. Prot. Res., 1977, v. 9, № 2, p. 129—136.
250. *Gabriel T. F., Michalewsky J., Meienhofer J. J.* Chromat., 1976, v. 129, № 2, p. 287—294.
251. *Niall H. D.* Nature New Biol., 1971, v. 230, № 11, p. 90—91.
252. *Yamasaki N., Kikutani M., Sonenberg M.* Biochemistry, 1970, v. 9, № 5, p. 1107—1114.
253. *Chillemi F., Pecile A.* Experientia, 1971, v. 27, № 4, p. 385—386.
254. *Noble R. L., Yamashiro D., Li C. H.* Int. J. Pept. Prot. Res., 1977, v. 10, № 4, p. 385—393.
255. *Moroder L., Hallett A., Thamm P., Wilschowitz L., Brown J. C., Wunsch E.* In: Proceedings of the second FRG — USSR Symposium on Chemistry of Peptides and Protein, Munich, 1978, p. 155—157.
256. *Dedman M. L., Farmer T. H., Morris G. J. O. R.* Biochem. J., 1961, v. 78, № 2, p. 348—352.
257. *Chicheportiche R., Vincent J.-P., Kopeyan C., Schweitz H., Lazdunski M.* Biochemistry, 1975, v. 14, № 10, p. 2081—2091.
258. *Botes D. P.* Biochim. et biophys. acta, 1974, v. 359, № 2, p. 242—247.
259. *Harina B. M., Dyckes D. F., Willcott III M. R., Jones W. C.* In: Peptides, structure and biological function / Eds E. Gross, J. Meienhofer. Pierce Chemical Company, 1979, p. 177—179.
260. *Yanaihara N., Sakura N., Yanaihara C., Hashimoto T. J.* Amer. Chem. Soc., 1972, v. 94, № 23, p. 8243—8244.
261. *Yanaihara N., Hashimoto T., Yanaihara C., Sakagami M., Steiner D. F., Rubinstein A. H.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1974, v. 59, № 3, p. 1124—1130.
262. *Williams B. J., Young G. T.* In: Peptides, structure and biological function / Eds E. Gross, J. Meienhofer. Pierce Chemical Company, 1979, p. 321—323.
263. *Stewart J. M., Matsueda G. R.* In: Chemistry and biological of peptides / Ed. J. Meienhofer. Ann Arbor Science Publishers, 1972, p. 221—224.
264. *Rothe M., Mazanek J.* Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1972, v. 11, № 4, p. 293.
265. *Beyerman H. C., Hidriks H., Hirt J., de Leer E. W. B.* In: Peptides 1969 / Ed. E. Scoffone. Amsterdam: North-Holland Publ., 1971, p. 87—91.
266. *Hagenmaier H., Frank H.* Hoppe-Seyler's Z. Phys. Chem., 1972, v. 353, № 12, p. 1973—1976.
267. *Tjoeng F. S., Tam J. D., Merrifield R. B.* Int. J. Pept. Prot. Res., 1979, v. 14, № 3, p. 262—274.

Поступила в редакцию
10.VI.1981

SYNTHESIS OF LARGE PEPTIDES AND PROTEINS: MAIN PROBLEMS

VOL'PINA O. M., MIKHALEVA I. I., IVANOV V. T.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

The review covers the peculiarities, problems, perspectives and limitations of the synthesis of large peptides and proteins. Within its scope are the strategy and tactics employed for peptides whose size approaches that of proteins, as are the side reactions in peptide synthesis. A special emphasis is laid on the removal of protecting groups, racemization, purification and the homogeneity control for the intermediates and the final products. The correctness of relying upon a specific activity as a criterion for homogeneity of synthetic peptides is discussed. In lighth of aforementioned problems, syntheses of peptides with the size of over 40 residues is considered.