

УДК 547.964.4

## УСПЕХИ И ПРОБЛЕМЫ ТВЕРДОФАЗНОГО ПЕПТИДНОГО СИНТЕЗА

*Г. П. Мишин, Г. А. Коршунова и Ю. П. Швачкин*

Рассмотрено современное состояние твердофазного метода пептидного синтеза, проанализированы его достоинства и недостатки, а также показаны тенденции и перспективы его дальнейшего развития. Особое внимание уделено проблемам совершенствования полимерных носителей, получения аминокцилполимеров, а также проблеме образования ошибочных последовательностей при твердофазном пептидном синтезе.

Библиография — 376 наименований.

### ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	2014
II. Полимерный носитель	2015
III. Присоединение первой аминокислоты к полимеру-носителю	2021
IV. Защита и деблокирование $\alpha$ -аминогрупп	2023
V. Защита и деблокирование функциональных групп боковой цепи трифункциональных аминокислот	2026
VI. Методы образования пептидной связи	2028
VII. Проблема образования ошибочных последовательностей при твердофазном пептидном синтезе	2030
VIII. Методы отделения пептидов от полимера-носителя	2033
IX. Автоматизация твердофазного синтеза пептидов	2036

### I. ВВЕДЕНИЕ

В 1973 г. исполнилось 10 лет с момента опубликования сообщения Меррифила<sup>1</sup> о синтезе пептидов на нерастворимом полимерном носителе. Предложенный метод, названный твердофазным методом, получил широкое распространение в области синтеза не только пептидов, но и ряда соединений других классов.

Уже опубликовано около 500 работ по твердофазному синтезу пептидов, среди них несколько обзоров, наиболее полными из которых являются работы Меррифила<sup>2</sup>, Лоссе и Нойберта<sup>3</sup>, а также монография Стюарта и Янг, переведенная на русский язык<sup>4</sup>.

Перечисленные обзоры<sup>2-4</sup> охватывают литературу до начала 1969 г. обобщая примерно 150 экспериментальных статей. Представляется целесообразным дать обзор литературы за период с 1969 года до начала 1972 г. Имеющиеся обзоры Марглина и Меррифила<sup>5</sup>, Гайгера<sup>6</sup>, Вюнша<sup>7</sup>, а также Ваки и Идзумия<sup>8</sup>, Кишида и Сакакибара<sup>9,10</sup>, Лоссе<sup>11</sup> отражают лишь отдельные аспекты твердофазного синтеза пептидов. На русском языке имеется только одна обзорная статья Веса<sup>12</sup>, опубликованная в 1968 г. Более поздние работы отражены в монографии Стюарта и Янг<sup>4</sup>, обзорах Меррифила<sup>2</sup> и Лоссе и Нойберта<sup>3</sup>. Настоящую публикацию мы рассматриваем как продолжение указанных работ.

## Принятые сокращения

Сокращения аминокислот даны в соответствии с рекомендациями комиссии по номенклатуре IUPAC — IUB, см. Biochemistry, 5.2485 (1966).

АОК (АОС)	— трет.-амилоксикарбонил;
БОК (ВОС)	— трет.-бутилоксикарбонил;
БМВ (ВМВ)	— N-(2-бензоил-1-метилвинил);
ДВБ	— <i>p</i> -дивинилбензол;
ДИПОК (ВРОС)	— 2-( <i>p</i> -дифенил)изопропилоксикарбонил;
ДМСО	— диметилсульфоксид;
ДМФА	— диметилформамид;
ДНФ (DNP)	— 2,4-динитрофенил;
ДЦГА	— дициклогексилламин (или аммоний);
ДЦГК (DCC)	— N,N'-дициклогексилкарбодимид;
КБЗ (κ)	— карбобензоксид (бензилоксикарбонил);
КДИ (CDI)	— N,N'-карбонилдиимидазол;
МБГ (Mbh)	— 4,4-диметоксibenзгидрил;
МКБЗ (MZ)	— <i>p</i> -метоксibenзилоксикарбонил;
НФС (NPS)	— <i>o</i> -нитрофенилсульфенил;
ТГФ	— тетрагидрофуран;
ТФА	— трифторацетил;
ФОК (FOC)	— фурфурилоксикарбонил;
ФТ (Ph (t))	— фталил;
Ⓟ	— полимер-носитель

## II. ПОЛИМЕРНЫЙ НОСИТЕЛЬ

Полимерный носитель — главный компонент твердофазного пептидного синтеза, и понятно, что подбор носителя имеет весьма важное значение для успешного проведения всего процесса синтеза.

Предложенный Меррифилдом<sup>1</sup> сополимер стирола с 1—2% ДВБ полностью нерастворим в обычных растворителях, но хорошо набухает в хлористом метиле, ДМФА, диоксане и хлороформе. Это очень важно, так как позволяет использовать для реакций практически весь объем полимерного зерна<sup>18</sup>.

Указанный носитель<sup>1, 14</sup> и в настоящее время используется наиболее часто. То же самое можно сказать и о «якорной» группе, с помощью которой осуществляется присоединение первой аминокислоты к полимеру-носителю: хлорметильная группировка, как это видно из данных, приведенных в табл. 1, заметно доминирует.

Хотя в подавляющем большинстве работ<sup>15–227</sup> авторы использовали хлорметилированный сополимер стирола с 1—2% ДВБ, именно модификации «якорной» группы посвящена значительная часть исследований по твердофазному пептидному синтезу. Это связано с рядом трудностей получения аминокислотного полимера по Меррифилду (см. следующий раздел обзора).

Предпринимались попытки использовать в качестве носителя бром- и иодметилированные сополимеры стирола с ДВБ. Однако такие носители удается получать лишь в два этапа\*. Так, Тилак<sup>228</sup> сначала конденсировал хлорметилированный полимер с карбоновой кислотой, а затем разрушал образующиеся сложноэфирные связи раствором бромистого или иодистого водорода в уксусной кислоте. Вероятно, именно труднодоступностью можно объяснить сравнительно редкое использование та-

\* Существует малоизвестный, но предельно простой способ получения иодметилированных полимеров и сополимеров стирола путем обработки хлорметилированного полимера раствором NaI в ацетоне; см. В. В. Коршак, С. В. Рогожин, В. А. Даванков, Изв. АН СССР, сер. хим., 1965, 1912; Высокомолек. соед. 8, 1686 (1966). [Прим. ред.]

ТАБЛИЦА 1

## Полимерные носители

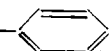
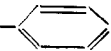
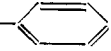
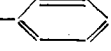
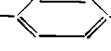
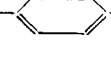
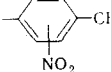


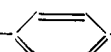
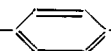
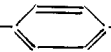
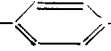
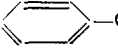
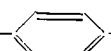
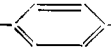
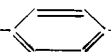
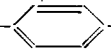
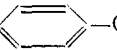
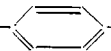
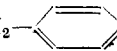
Тип полимера	Функциональная группа	Ссылки на литературу
Гелевый сополимер стирола с 1—2% ДВБ	 -CH <sub>2</sub> Cl	13—105, 106 <sup>a</sup> , 107—227
	 -CH <sub>2</sub> Br	143, 228, 230—233
	 -CH <sub>2</sub> I	228, 229
	 -CH <sub>2</sub> Cl + NaI (кат.)	229, 234—238
	 -CO-CH <sub>2</sub> Cl (Br)	239—245
	 -CO-CHBr Me	240—241
	 -CH <sub>2</sub> Cl	1, 246—248
	 -CHCl (Br)  R (R=H, Cl)	249—251
	 -CH <sub>2</sub> S <sup>+</sup> Me <sub>2</sub>	218, 252, 253
	 -CH <sub>2</sub> OH	65, 209, 233, 254—260
	 -(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -CH <sub>2</sub> OH	261
	 -CH <sub>2</sub> -O-CO-CH <sub>2</sub> -  -OH	262
	 -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -C(OH)(Me) <sub>2</sub>	263
	 -CH <sub>2</sub> -N(CO-Me)-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -OH Me (n=2, 6)	264—266
	 -CO-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -OH	264, 267
	 -CH <sub>2</sub> -S-  -OH	268, 269
	 -CH <sub>2</sub> NHCH <sub>2</sub> -  -C(OH)(Ph)-CH <sub>2</sub> OH	270

ТАБЛИЦА 1 (продолжение)

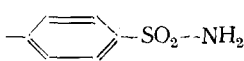
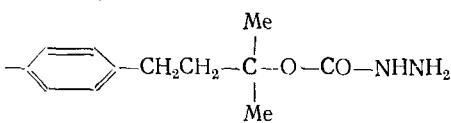
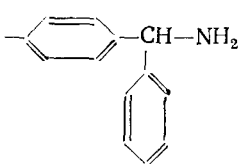
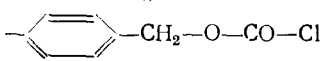
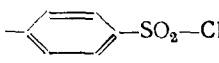
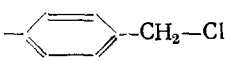
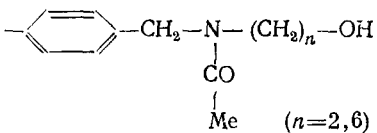
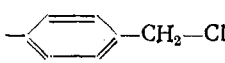
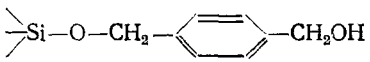
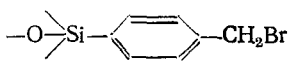
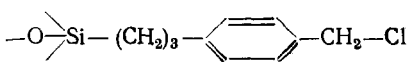
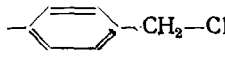
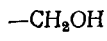
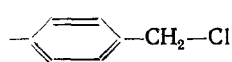
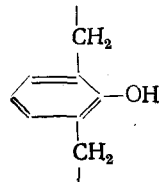
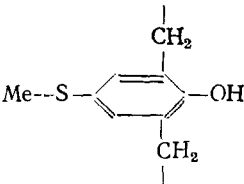
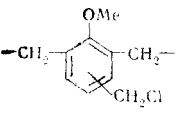
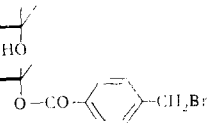
Тип полимера	Функциональная группа	Ссылки на литературу
Гелевый сополимер стирола с 1—2% ДВБ		271
		263, 272
		273—282
		283 <sup>б</sup> , 284—287
		288, 289
Макропористый сильносшитый со- полимер стирола с ДВБ (до 12%)		173, 199, 294—297
		296
Стеклянные грану- лы, покрытые слоем полисти- рола		53, 173, 199, 298, 299
«Щеточный» носи- тель		62, 300—302
		302, 303
		304
Полистирол, мол. вес 200 тыс.		305—309
Полиэтиленгли- коль, мол. вес 10—20 тыс.		310—312
Привитой сополи- мер поли (три- фторхлорэтилена) и хлорметилсти- рола		313
Полифенол		314, 315

ТАБЛИЦА 1 (окончание)

Тип полимера	Функциональная группа	Ссылки на литературу
Полифенол		269
Резитол		93,115,316
Сефадексы: LH-20 G-25		317,318 317,318

<sup>а</sup> Сополимер стирола с 5% ДВБ.

<sup>б</sup> Сополимер стирола с 0,5% ДВБ типа «попкорн».

ких носителей, особенно иодметилированного полимера<sup>143, 229–233</sup>. Поэтому весьма привлекателен метод промежуточного получения иодметилполистиролов при взаимодействии хлорметилированных производных с N-защищенными аминокислотами в присутствии иодистого натрия в качестве катализатора<sup>234</sup>. Позднее эта методика успешно применялась в ряде других лабораторий<sup>229, 235–238</sup>.

Бейганд<sup>239</sup> и независимо от него Мизогучи с сотр.<sup>240, 241</sup> предложили использовать галоидоацетилполимер, улучшающий условия присоединения первой аминокислоты к полимеру-носителю, но не позволяющий применять для отделения пептида от носителя кислотные реагенты. Используемые для этого щелочные реагенты<sup>239–243</sup> увеличивают опасность рацемизации пептида. По этой причине галоидоацетильные полимеры чаще применяют для получения амидов, гидразидов и эфиров защищенных пептидов<sup>240, 241, 244, 245</sup>. То же самое можно сказать и об α-бромпропионилполимере, предложенном Мизогучи с сотр.<sup>240, 241</sup>.

Рассмотренные полимеры-носители имеют те же недостатки, что и нитроанный по ароматическим кольцам хлорметилированный сополимер Меррифила<sup>1</sup>. Повышенная устойчивость сложноэфирной связи пептида к кислотным реагентам делает нитроанный носитель более пригодным для получения защищенных амидов и гидразидов пептидов<sup>246</sup>. Так, используя для отделения пептидов от полимера-носителя аммиак или амины, Такашима с сотр.<sup>247, 248</sup> получили ряд аналогов окситоцина.

Предложенный Созардом с сотр.<sup>249–251</sup> бензгидрилполимер позволяет применять при отделении пептида от носителя мягкие кислотные реагенты, но требует использования в процессе синтеза весьма кислотолабильных защитных групп, что также связано с определенными трудностями.

Интересный вариант получения аминоксилполимеров без использования конденсирующих агентов и третичных аминов предложен Дорманом с сотр.<sup>252</sup>. Используемый этими авторами диметил(арилметил)сульфоний-полимер позднее применяли для синтеза ряда биологически активных пептидов<sup>218, 253</sup>.

Несомненный интерес представляют полимеры-носители, в состав «якорной» группы которых входит гидроксил. Это прежде всего оксиметилированный полимер стирола, предложенный Бодански и Шиэном<sup>254</sup>, который, несмотря на ряд существенных недостатков, неоднократно применяли при твердофазном синтезе пептидов<sup>65, 209, 233, 250–260</sup>. К той же группе носителей относятся оксигексаметиленполимер, предложенный Байером<sup>261</sup>, *p*-оксифенилацетилоксиполимер, исследованный Блейком и Ли<sup>262</sup>, и *трет*-оксиалкилполимер Ванга и Меррифилда<sup>263</sup>. Удобен также оксиалкиламинополимер, разработанный Тилаком и Холлинденем<sup>264–266</sup>, который можно успешно использовать в сочетании с КБЗ-защитой по  $\alpha$ -аминогруппе аминокислот. Аналогичными свойствами обладает и оксibuтирилполимер<sup>264, 267</sup>. К недостаткам указанных носителей следует отнести невозможность применения кислотных реагентов на стадии отщепления пептида от носителя.

Ряд гидроксилсодержащих носителей позволяет в конце синтеза превратить пептидил-полимер в полимерный активированный эфир пептида, что открывает широкие возможности для дальнейшего его использования (см. раздел VII). Это прежде всего полимер с оксифенилсульфидными группами, предложенный Маршаллом с сотр.<sup>268</sup> и независимо от них Флэнгином с сотр.<sup>269</sup>. Окисление сульфидной группы в соответствующий сульфон приводит к получению активированного эфира пептида. Носитель с аналогичными свойствами получен Виландом с сотр.<sup>270</sup> взаимодействием 4'-аминометил-2,2-дифенилэтандиола с хлорметилированным носителем. Путем дегидратации его также можно превратить в активированный, виниловый эфир пептида. Подобными же свойствами обладает и полимер-носитель, содержащий сульфамидную группировку<sup>271</sup>. N-Алкилирование сульфамидной группы облегчает щелочной гидролиз, аммонолиз и гидразинолиз «якорной» связи.

Для получения амидов и гидразидов пептидов в условиях кислотного расщепления пептидил-полимеров применяют специальные носители, «якорные» участки которых уже содержат соответствующие функциональные группы. Это *трет*-алкилоксикарбонилгидразид-полимер Ванга и Меррифилда<sup>263, 272</sup> и бензгидриламинополимер, предложенный Пьетта и Маршаллом<sup>273</sup>. Монахэн и Ривьер с сотр.<sup>274–276</sup>, а также другие исследователи<sup>280–282</sup> неоднократно применяли бензгидриламинополимер для получения ряда биологически активных амидов пептидов.

Наряду с полимерными носителями, функциональные группы которых способны взаимодействовать с карбоксилком присоединяемой аминокислоты, иногда используют носители, позволяющие вести синтез пептидов с N-конца. Так, Летсингер<sup>283</sup> предложил носитель алкилоксикарбонилхлоридного типа, способный взаимодействовать с  $\alpha$ -аминогруппой аминокислоты. Однако предложенный подход не нашел широкого распространения в практике твердофазного синтеза из-за опасности рацемизации при активации карбоксильной группы пептида. Тем не менее носитель алкилоксикарбонилхлоридного типа удалось эффективно использовать для присоединения к полимеру-носителю пептидов, содержащих  $\omega$ -аминогруппы в остатках диаминокислот<sup>284–286</sup>. Полученные при этом пептидил-полимеры можно циклизовать непосредственно на носителе<sup>284, 285</sup>.

Оригинальную методику твердофазного синтеза пептидов с N-конца разработали Феликс и Меррифилд<sup>287</sup>, предложившие использовать для синтеза БОК-гидразиды аминокислот. Активация карбоксила синтезируемого пептида азидным методом практически исключает возможность рацемизации на стадии пептидообразования. Для синтеза пептидов с N-конца Дальманс с сотр.<sup>288, 289</sup> предложили использовать также сульфохлорированный полимер-носитель, вводя аминокислотные остатки в цепь в виде их *трет*-бутиловых эфиров. Однако этот метод пока не нашел распространения, как и рассмотренный подход в целом.

Для проведения твердофазного синтеза важна не только якорная группа носителя, но и физико-химические свойства самой полимерной матрицы. Предложенный Меррифилдом полимер-носитель за счет набухания в ряде органических растворителей обеспечивает диффузию растворенных реагентов внутрь гранул, позволяя использовать весь объем полимерного зерна, и имеет достаточно высокую механическую прочность. В то же время он не свободен от ряда недостатков. Исследования по структуре сополимеров стирола с ДВБ продолжаются<sup>290–293</sup>. Изменение набухаемости гелевого полимера-носителя в зависимости от химической природы растворителя, а также недостаточные размеры ячеек полимерной сетки осложняют процесс диффузии. Для улучшения доступа растворенных веществ внутрь полимерной гранулы и стабилизации структуры полимера некоторые исследователи предлагают использовать макропористые, жесткошпигованные носители на основе полистирола. Преимущества последних отмечались уже давно<sup>294</sup>, но практическое их применение началось позже<sup>173, 199, 295–297</sup>. Сравнительная оценка различных носителей<sup>173</sup> позволяет считать макропористые носители весьма перспективными.

Большой скорости диффузии растворов в гранулы носителя можно добиться путем применения мелкозернистых полимеров, но такие носители неудобны в работе. Поэтому Байер с сотр.<sup>53</sup> предложили использовать в качестве носителя силикатные гранулы, покрытые тонким слоем полимера. Возможность использования таких гибридных носителей была показана и другими исследователями<sup>173, 199, 298, 299</sup>. Недостатками указанных носителей являются их малая удельная емкость и возможность постепенного разрушения внешнего органического слоя, что приводит к заметной потере синтезируемого пептида. Последний недостаток в значительной мере устраняется в случае ковалентного закрепления якорных органических молекул на силикатных гранулах<sup>60, 300–304</sup>. Подобные «щеточные» носители можно, по мнению авторов, использовать для колоночного твердофазного синтеза пептидов.

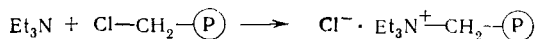
Эффективность взаимодействия полимера-носителя с растворами реагентов низка из-за наличия гетерогенной системы. Здесь преимущества твердофазного синтеза порождают существенный его недостаток. Выход может быть найден на пути сочетания возможностей твердофазного метода синтеза и синтеза пептидов в растворе. С этой целью Шемякин, Овчинников и др.<sup>305</sup> разработали метод синтеза пептидов на растворимом полимерном носителе. Было предложено использовать полистирол ( $M=2 \cdot 10^5$ ), растворимый в органических растворителях и нерастворимый в воде. Это позволяет проводить пептидный синтез в гомогенной среде, а очистку пептидил-полимера — в гетерогенной. Однако при этом наблюдаются потери пептидил-полимера при его осаждении из раствора, а также некоторые другие осложнения. Тем не менее, указанным методом удалось синтезировать ряд биологически активных пептидов, в том числе грамицидин S<sup>306–309</sup>.

Предложенное направление развивает в настоящее время группа Байера с сотр.<sup>310–312</sup>, используя в качестве носителя полиэтиленгликоль ( $M=1-2 \cdot 10^4$ ). Для очистки промежуточных продуктов авторы используют ультрацентрифугирование и ультрафильтрование через мембраны.

Кроме полиэтиленгликоля, отличного по своей природе от традиционных носителей на основе полистирола, описаны попытки использовать для твердофазного синтеза и другие полимеры, в частности, привитой политрифторхлорэтилен, хлорметилированный полистирол<sup>313</sup>, различные полифенолы<sup>269, 314, 315</sup>, а также метилированный по фенольному гидроксилу и хлорметилированный по ароматическому кольцу резитол<sup>93, 115, 316</sup>. Были также предприняты попытки применить для этой цели полимеры на основе декстранов<sup>2</sup>, например, сефадексы LH-20 и G-25<sup>317, 318</sup>.

### III. ПРИСОЕДИНЕНИЕ ПЕРВОЙ АМИНОКИСЛОТЫ К ПОЛИМЕРУ-НОСИТЕЛЮ

Методика присоединения N-защищенных аминокислот к хлорметилированному полимеру-носителю в органических растворителях в присутствии третичных аминов остается наиболее распространенной. С целью уменьшения возможности образования на носителе ионогенных групп за счет взаимодействия третичного амина с хлорметилполимером по схеме:



предлагается заменять триэтиламин другими основаниями, например, диизопропилэтиламином<sup>23</sup>. Еще больший эффект достигается при использовании четвертичных тетраметиламмонийных оснований, предложенных для этой цели Лоффетом<sup>133, 152</sup>. Определенный эффект наблюдается также при замене растворителя, в котором протекает реакция образования сложного эфира. Наиболее перспективным здесь считается *трет*-бутиловый спирт<sup>207, 208</sup>.

Стандартные методики получения aminoacyl-полимеров предусматривают взаимодействие компонентов при высоких температурах (50–80°), что не всегда приемлемо. Так, Марглин<sup>176</sup> наблюдал ряд побочных эффектов в этих условиях и предложил для их устранения проводить реакцию получения aminoacyl-полимеров в ДМФА с триэтиламином в течение 24 часов при 25°. Полученные при этом результаты несколько неожиданны, так как до сих пор удавалось применять ДМФА на этой стадии лишь при 50–75°<sup>23, 220</sup>.

Поскольку характер и условия взаимодействия N-защищенной аминокислоты с полимером-носителем определяются прежде всего природой «якорной» группы последнего, понятно, что все сказанное применимо и ко всем другим носителям, содержащим хлорметильную группу в ароматическом ядре.

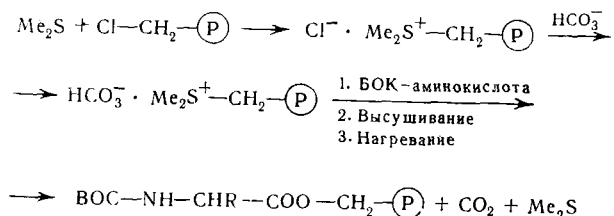
В более мягких условиях происходит присоединение N-защищенных аминокислот к бром- и иодметилированным носителям. Обычно реакцию проводят в ДМФА с триэтиламином при 20–30° в течение 36–72 час.<sup>228, 230–233</sup>. Иногда вместо триэтиламина используют дициклогексиламин<sup>231, 232</sup>. В еще более мягких условиях присоединяют C-концевую аминокислоту к хлорметилированному носителю в присутствии иодистого натрия в качестве катализатора<sup>234, 236–238</sup>.



Аналогичные условия присоединения требуются и в случае галоидоацетилованных носителей. В качестве растворителей чаще всего используют этилацетат, хлористый метилен или ДМФА<sup>239-245</sup>, а в качестве оснований — триэтиламин или диизопропилэтиламин<sup>239, 242</sup>.

В случае применения бензгидрилполимера Созард с сотр.<sup>249, 250</sup> использовали при получении аминокацилполимеров ДЦГА-соли БМВ-аминокислот и других N-защищенных аминокислот. Реакцию проводили в хлороформе при кипячении в течение 12 час.<sup>249</sup> или же в хлористом метиле при 20° в течение 4 дней<sup>250</sup>.

В очень мягких условиях без использования третичного амина получают аминокацилполимер в случае применения диметил(арилметил)-сульфоний-полимера<sup>252</sup>:



При этом выход продукта реакции составляет 87—96%<sup>248, 253</sup>, в то время как при использовании хлорметилированных носителей он, как правило, не превышает 25—30%.

Для присоединения первой аминокислоты к носителям, в состав «якорной» группы которых входит гидроксил, используют такие конденсирующие агенты как КДИ и ДЦГК. При этом необходимо блокировать оставшиеся свободными оксигруппы в случае использования конденсирующих агентов на стадии пептидообразования, что не очень удобно.

Иногда в качестве конденсирующего агента на стадии получения аминокацилполимера применяют *p*-толуолсульфохлорид<sup>263, 265, 266</sup>.

Конденсирующие агенты используют и в случае присоединения первой аминокислоты к носителям, «якорная» группа которых содержит амино- или гидразиногруппу. Здесь чаще используют ДЦГК<sup>263, 272-282</sup>. В случае сульфамидного носителя использовали соответствующие 2,4,5-трихлорфениловые эфиры<sup>271</sup> аминокислот.

При синтезе пептидов с N-конца первую аминокислоту присоединяют к полимеру-носителю в виде эфира, амида или другого производного по карбоксильной группе в присутствии триэтиламина<sup>283-289</sup>.

Интересен вариант присоединения аминокислоты к носителю за счет боковой функциональной группы. Так, Глэсс с сотр.<sup>226</sup> использовала имидазольное кольцо гистидина для взаимодействия с динитрофторфенильной группой полимера-носителя.

В тех случаях, когда величина пор носителя изменяется в процессе синтеза, аминокислота может присоединяться к полимеру в таких его участках, которые в дальнейшем окажутся труднодоступными для химической атаки другими реагентами<sup>13</sup>. В результате экранирования носителем эти аминокислоты не вступают в реакции пептидообразования, что приводит к появлению ошибочных последовательностей. Количество подобных труднодоступных остатков может достигать 40%<sup>319</sup>.

Одним из путей преодоления указанных недостатков является присоединение к полимеру-носителю не отдельных аминокислот, а коротких пептидов, не способных проникать в слишком мелкие поры носителя. Для этого пытались использовать полимеры с модифицированными функциональными группами, в частности галоидоацетильными<sup>239, 242</sup> и бромметильными<sup>230—232</sup>. Хлорметилированный носитель удавалось использовать лишь при взаимодействии с депсипептидами в условиях кипячения в этилацетате<sup>320, 321</sup> или же с простейшим дипептидом  $\text{BOC-Gly-Gly-OH}$ <sup>227</sup>. Хорошие перспективы открываются, на наш взгляд, при использовании йодистого натрия в сочетании с хлорметилполимером. При этом удастся присоединять к носителю ди-, тетра- и пентапептиды с нагрузкой порядка 0,12—0,32 ммоль/г<sup>237, 238</sup>.

#### IV. ЗАЩИТА И ДЕБЛОКИРОВАНИЕ $\alpha$ -АМИНОГРУПП

Впервые примененная Меррифилдом<sup>1</sup> КБЗ-защитная группа оказалась малопригодной в условиях твердофазного синтеза<sup>4</sup>. Поэтому ее применение ограничено, если не считать работ, где КБЗ-аминокислоты применяли для введения N-концевого остатка синтезируемого пептида. В этих случаях КБЗ-группа удаляется при кислотном отделении пептида от носителя или же позволяет получать более стабильные производные в случае проведения аммонолиза, гидразинолиза или переэтерификации пептидил-полимера.

Возможно использование КБЗ-аминокислот в сочетании с оксикаламинополимером<sup>264—266, 296</sup> и оксибутирилполимером<sup>264, 267</sup>. При этом КБЗ-группу удаляют 30%-ным раствором бромистого водорода в уксусной кислоте без потерь пептида с носителя. КБЗ-аминокислоты применимы также для пептидного синтеза на полимере сульфамидного типа<sup>271</sup>. Интересной особенностью обладает полимер-носитель на основе полиэтиленгликоля<sup>310, 312</sup>, позволяющий удалять КБЗ-группу гидрированием, что не удавалось сделать в случае применения нерастворимых носителей.

Тем не менее основной группировкой, применяемой для защиты  $\alpha$ -аминогруппы при синтезе пептидов на полимерном носителе, продолжает оставаться БОК-группа (см. табл. 2). Доступность и устойчивость БОК-аминокислот, возможность отщепления БОК-группы мягкими кислотными реагентами и ряд других преимуществ делают ее практически незаменимой на современном этапе развития твердофазного метода пептидного синтеза.

Для удаления БОК-группы обычно используют 1*N* раствор хлористого водорода в уксусной кислоте<sup>14</sup>, несмотря на возможную опасность ацетилирования аминогрупп пептида следовыми количествами уксусной кислоты на последующей стадии пептидообразования. Однако тщательная нейтрализация и промывка сводят эту опасность к минимуму.

Все чаще начинают применять для удаления БОК-группы 4*N* раствор хлористого водорода в диоксане, впервые предложенный Стюартом и Вулли<sup>322</sup>. Диоксан способствует набуханию полимера, что повышает эффективность деблокирования. Это важно, так как неполное удаление N-защитной группировки может служить одной из причин пропусков аминокислотных остатков в цепи<sup>189</sup>.

В 1966—1967 гг. для удаления БОК-группы было предложено применять трифторуксусную кислоту<sup>242, 323</sup> или 50%-ный раствор ее в хлористом метиле, как это делали Гутте и Меррифилд<sup>324</sup> при синтезе рибонуклеазы А. Кроме того, трифторуксусная кислота позволяет исключить

ТАБЛИЦА 2

N<sup>α</sup>-Защитные группы и методы их удаления в процессе твердофазного пептидного синтеза

Защитная группа	Метод деблокирования	Ссылки на литературу
КБЗ (Z)	30%-ный р-р НВг в АсОН Гидрирование над Pd/C	264—267, 271, 296 310, 312
БОК (BOC)	1 N р-р HCl в АсОН, 30 мин.  1,2—1,5 N р-р HCl в АсОН, 30 мин. 4 N р-р HCl в диоксане, 30 мин.  1 N р-р HCl в диоксане, 30—45 мин. 2 N р-р HCl в диоксане, 20—30 мин.  5,6 N р-р HCl в диоксане 30%-ный р-р HCl в диоксане, 20 мин. CF <sub>3</sub> COOH, 30—40 мин. 50%-ный р-р CF <sub>3</sub> COOH в CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 15—30 мин.  50%-ный р-р CF <sub>3</sub> COOH в хлороформе 0,8 N р-р HCl в EtCOOH 5,35 N р-р HCl в смеси ДМСО—CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (1:1) 1 N р-р HCl в MeOH, 30—40 мин.	16, 17, 19, 22, 29, 32—34, 38, 39, 43, 44, 47, 48, 52—55, 57, 59, 60, 62—64, 67, 70—72, 74, 75 <sup>a</sup> , 76, 78, 81—83, 86, 89, 90, 94, 95, 97, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 111, 112, 116—119, 122 <sup>b</sup> , 123—125, 127, 131, 132, 137—145, 153, 155, 156, 159, 161, 165, 166, 170, 172, 174, 177, 178, 184, 188, 195, 198, 201—203, 205, 214—217, 220, 221, 224, 225, 233, 235, 247, 248, 253, 255, 257, 261, 269, 273, 297, 300, 301, 308  80, 96, 107, 135, 175, 240, 241, 312  24, 30, 31, 36, 37, 41, 42, 45, 49, 51, 60, 65, 66, 73, 79, 85, 87, 92, 105, 110, 113, 129, 126, 146, 147, 157, 160, 179, 180, 182, 200, 212, 222, 236, 238, 280, 299 <sup>b</sup> , 310, 311, 313  21 <sup>г</sup> , 88, 161, 231  284—286  134  50  46, 74, 226, 242, 253, 271, 278, 317, 318  42, 60, 84, 97, 128, 129, 134, 148, 157, 165, 167, 168, 190, 191, 193, 194 <sup>d</sup> , 196, 197, 202, 209 <sup>c</sup> , 211, 213 <sup>ж</sup> , 218, 223, 233, 258—260, 262, 268, 275—277, 281, 282  101, 103, 183 <sup>3</sup>  97  134  206
БОК (BOC) при наличии ос- татка Tgr	20%-ный р-р HSCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> H в АсОН, 30 мин. 0,1 N р-р HCl в HCOOH	162 221
АОК (AOC)	10%-ный р-р HCl в MeOH или диок- сане, 1—2 часа 1 N р-р HCl в АсОН, 40 мин. 50%-ный р-р CF <sub>3</sub> COOH в CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	241, 245, 315 28, 241, 244 121
НФС (NPS)	0,1—1 N р-р HCl в органическом растворителе, 10—20 мин.	71, 99, 131, 222, 235, 284, 285
ДИПОК (BPOC)	*0,5—1,5%-ный р-р CF <sub>3</sub> COOH в CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 10—15 мин. 0,05—0,1 N р-р HCl в хлороформе, 5—10 мин. Лед. АсОН, 8 час.	42, 263, 272 191, 197, 262 156, 159

ТАБЛИЦА 2 (продолжение)

Защитная группа	Метод деблокирования	Ссылки на литературу
БМВ (BMV)	0,4 N водный р-р HCl в ТГФ, 30 мин.	249
	1 N р-р <i>p</i> -толуолсульфокислоты в ТГФ	250
ФОК (FOC)	1 N р-р HCl в AcOH или диоксане	115,330
МКБЗ (MZ)	1 N р-р HCl в AcOH, 30 мин.	149
	50%-ный р-р CF <sub>3</sub> COOH в CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 30 мин.	232
ФТ (Pht)	N <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ·AcOH в ДМФА, 24 часа	263
Me <sub>3</sub> Si	1%-ный р-р AcOH в этаноле.	309

<sup>a</sup> 0,5 N р-р HCl в AcOH. <sup>б</sup> 15 мин. вместо 30 мин.; <sup>в</sup> 78 сек. вместо 30 мин.; <sup>г</sup> диоксан — CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1); <sup>А</sup> 12,5—25%-ный р-р CF<sub>3</sub>COOH в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; <sup>е</sup> 75 мин. вместо 15—30 мин.; <sup>ж</sup> CF<sub>3</sub>COOH—CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4:1); <sup>з</sup> 25%-ный р-р CF<sub>3</sub>COOH в хлороформе.

образование остатка пироглутаминовой кислоты из остатка БОК-глутамина в момент удаления БОК-группы, как это имеет место при использовании 1 N хлористого водорода в уксусной кислоте <sup>325</sup>. С этой целью можно использовать также 4 N раствор хлористого водорода в диоксане. Эту методику нам удалось успешно применить при твердофазном синтезе ряда фрагментов А-цепи инсулина <sup>126</sup>.

В случае удаления БОК-группы из остатка триптофана используют смесь стандартных реагентов с меркаптоэтанолом. Показана также возможность использования при этом 20%-ного раствора меркаптоэтилсульфокислоты в уксусной кислоте <sup>162</sup>, а также 0,1 N раствора хлористого водорода в муравьиной кислоте <sup>221</sup>.

Проблемам удаления БОК-группы посвящены специальные работы <sup>60, 97</sup>. Исследованы возможности использования на этой стадии растворов хлористого водорода в пропионовой кислоте <sup>97</sup>, в смеси хлористого метилена и ДМСО <sup>134</sup>, в метаноле <sup>206</sup>. Интересны результаты Чоу с сотр. <sup>134</sup>, демонстрирующие зависимость степени удаления БОК-группы от длины цепи синтезируемого пептида, природы деблокируемого аминокислотного остатка и его расположения в пептидной цепи, что является, по данным авторов, наиболее существенным.

Близкой по химическим свойствам к БОК-группе является АОК-группа, впервые примененная в твердофазном синтезе Инукаи с сотр. <sup>314</sup>. Ее использование, вероятно, будет расширяться по мере увеличения производства АОК-аминокислот.

Практически одновременно в трех лабораториях в практику твердофазного синтеза была введена НФС-группа <sup>326–328</sup>, легко удаляемая слабыми растворами хлористого водорода в инертном растворителе <sup>328</sup>, а также тиацетамидом в смеси уксусной кислоты и метанола <sup>327</sup>. Указанная группа оказывается весьма полезной в ряде специальных случаев, связанных с ее высокой лабильностью <sup>71, 99, 131, 222, 235, 284, 285</sup>.

Еще более лабильной является ДИПОК-группа, предложенная Зибром и Изелином <sup>329</sup>. Она в 2000 раз чувствительнее БОК-группы к кис-

лотному расщеплению и может быть удалена 75%-ной трихлоруксусной кислотой в течение 1,5 часа<sup>329</sup>, 0,5—1,5%-ным раствором трифторуксусной кислоты в хлористом метиле<sup>42, 263, 272</sup>, 0,05—0,1 *N* раствором хлористого водорода в хлороформе в течение 8—10 мин.<sup>191, 197, 262</sup>, а также ледяной уксусной кислотой в течение 8 час.<sup>158, 159</sup>.

Следует отметить также БМВ-группировку, предложенную Созардом с сотр.<sup>249, 250</sup> в сочетании с бензгидрилполимером. Она может быть удалена 0,4 *N* водным раствором хлористого водорода в ТГФ или 1 *N* раствором *p*-толуолсульфокислоты в том же растворителе.

В процессе твердофазного пептидного синтеза применяют также ФОК-группу<sup>115, 330</sup> и МКБЗ-группу<sup>149, 232</sup>, близкие по своей устойчивости к БОК-группе. Имеются сообщения об использовании ФТ-группы в сочетании с трет.-оксикалкимполимером<sup>263</sup>, а также триметилсилильной группы<sup>309</sup>, пригодной для синтеза пептидов с использованием *N*-карбоксиянгидридов аминокислот.

При подборе *N*<sup>α</sup>-защитной группы особое внимание исследователи уделяют стадии деблокирования<sup>99</sup>.

#### У. ЗАЩИТА И ДЕБЛОКИРОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП БОКОВОЙ ЦЕПИ ТРИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ АМИНОКИСЛОТ

В настоящее время для всех трифункциональных аминокислот имеются достаточно удобные защитные группы, удовлетворяющие требованиям твердофазного метода, которые в основном совпадают с требованиями классических методов синтеза пептидов.

**Аргинин.** Чаще всего используют нитроаргинин\* с последующим гидрированием отделенного от носителя пептида. При обработке пептидил-полимера безводным фтористым водородом эту стадию можно исключить. В случае пептидов, содержащих цистеин и метионин, обычно используют *N*<sup>ε</sup>-тозиларгинин<sup>70, 71, 76, 92, 107, 121, 172, 179, 191, 194, 197, 212, 262</sup>.

**Аспарагиновая и глутаминовая кислоты.** ω-Карбоксильные группы этих аминокислот успешно защищают бензиловыми эфирами\*\*, которые легко расщепляются при кислотной обработке пептидил-полимера. Иногда используют трет.-бутиловые эфиры<sup>95, 100, 102, 151, 156, 159, 205, 209, 238, 262</sup>, более лабильные в кислой среде, но устойчивые при проведении гидролиза. С целью сохранения ω-карбоксила защищенным даже после кислотного отделения пептида от полимера-носителя применяют нитробензиловые эфиры этих аминокислот<sup>90, 113, 120, 194</sup>.

**Аспарагин и глутамин.** Обычно для введения остатков аспарагина и глутамина применяют *p*-нитрофениловые эфиры их БОК-производных, так как применение ДЦГК приводит к образованию соответствующих нитрилов. Если же необходимо применение ДЦГК, то амидные группы аспарагина и глутамина необходимо защищать, например, МБГ-группой, удаляемой кипячением с трифторуксусной кислотой<sup>131</sup>.

**Гистидин.** Для защиты имидазольного кольца гистидина чаще всего используют *N*<sup>1m</sup>-бензильную группу\*\*\*, удалить которую можно либо каталитическим гидрированием, либо натрием в жидком аммиаке. Проведение деблокирования *N*<sup>1m</sup>-группы гистидина одновременно с отде-

\* Литературу см. 18, 22, 24, 36, 37, 42, 44, 51, 52, 54, 59, 69, 88, 95, 120, 124, 128, 129, 131, 139, 140, 142, 144, 145, 148, 160, 161, 165, 168, 175, 186, 191, 193, 200, 201, 206, 211, 215, 216, 218, 220, 223, 225, 233, 250, 263, 268, 275—278, 280, 281.

\*\* Литературу см. 19—21, 24, 27, 32, 36, 37, 42, 44, 51, 55, 57, 59, 76, 78, 88, 94, 124, 127—129, 142, 143, 145, 148, 161, 167, 172, 175, 188, 190, 197, 198, 206, 220, 231, 233, 250, 263, 268, 282.

\*\*\* Литературу см. 21, 33, 37, 44, 59, 76, 80, 81, 92, 95, 96, 100, 102, 117, 120, 121, 137, 139, 140, 142, 157, 161, 169, 172, 175, 188, 190, 192, 194, 198, 201, 211, 212, 215, 216, 225, 233, 262, 263.

лением пептида от полимера-носителя возможно при использовании  $N^{im}$ -тозилгистидина<sup>183, 186, 200, 277, 278</sup>.

Наиболее удобной защитной группой для бокового радикала гистидина следует считать ДНФ-группу, удаляемую действием тиолов при рН 8 и комнатной температуре<sup>47, 63, 124, 146, 153, 165, 181, 196, 206, 281, 282, 332</sup>. Показана также возможность удаления этой группы в условиях щелочного омыления, аминолиза и гидразинолиза пептидил-полимеров<sup>181</sup>. Выбор защитной группы для имидазольного кольца гистидина служил предметом специального рассмотрения в работах Лоссе<sup>331, 332</sup>.

**Лизин.** Для защиты  $N^\alpha$ -аминогруппы лизина обычно используют КБЗ-группу\*, легко удаляемую при кислотном расщеплении пептидилполимера, но вполне устойчивую в сочетании с  $N^\alpha$ -БОК-защитной группой. Имеются, однако, данные о частичном отщеплении  $N^\alpha$ -КБЗ-групп при удалении  $N^\alpha$ -БОК-группы. Более надежной в этом отношении является *p*-Вг-БКЗ-защитная группа<sup>213</sup>. Иногда для защиты боковой функции лизина применяют тозильную группировку<sup>40, 92, 114, 117, 179, 194, 203, 262</sup>, удаляемую действием натрия в жидком аммиаке, а также ТФА-группу<sup>24, 36, 37, 45, 51, 296</sup>, отщепляемую действием 1 М раствора пиперидина.

**Метионин.** Метионин обычно используют без защиты боковой функциональной группы, однако при этом необходимо применять специальные протекторы на стадии отщепления пептида от носителя (что не всегда приводит к успеху). Поэтому для синтеза метионинсодержащих пептидов иногда используют ВОС-Met(O)—ОН<sup>124, 128, 145</sup>.

**Орнитин.** Боковую аминогруппу орнитина, как и в случае лизина, защищают КБЗ-группой<sup>275, 284, 285</sup>, тозильной группировкой<sup>93</sup>, также использовали MZ—Orn(*p*-NO<sub>2</sub>—Z)—ОН<sup>149</sup>.

**Серин и треонин.** Для защиты гидроксильных групп серина и треонина обычно применяют простые бензильные эфиры\*\*, расщепляемые в условиях кислотной обработки пептидил-полимеров. В случае использования активированных эфиров на стадии пептидообразования серин и треонин вводят в пептидную цепь без защиты гидроксила. Имеется сообщение об использовании защиты Вейганда (1-карбобензоксамино-2.2.2-трифторэтила) для боковой цепи серина и треонина<sup>38</sup>.

**Тирозин.** Гидроксильную группу тирозина чаще всего защищают в форме простого бензильного эфира\*\*\*. Последний легко расщепляется бромистым водородом в трифторуксусной кислоте или гидрированием, но в отличие от аналогичных производных серина и треонина относительно устойчив в безводном фтористом водороде, что не очень удобно. Полагают, что более подходящими в этом отношении являются *p*-метоксибензильная и *m*-бромбензильная группы<sup>213</sup>.

**Цистеин.** В большинстве случаев для защиты SH-функции цистеина использовали бензильную группу\*\*\*\*, которую можно удалить из остатка цистеина только натрием в жидком аммиаке в строго контролируемых условиях (из-за возможных побочных процессов).

\* Литературу см. 16, 29—31, 33, 44, 47, 49, 50, 63, 76, 87, 88, 102, 124, 127, 128, 129, 144, 145, 148, 151, 153, 155, 156, 159, 161, 172, 176, 182, 188, 194, 196, 197, 206, 220, 221, 231, 253, 275, 280, 282.

\*\* Литературу см. 21, 24, 33, 36—38, 51, 52, 76, 92, 94, 104, 112, 124, 128, 129, 132, 143—145, 148, 151, 153, 156, 159, 161, 168, 172, 174, 176, 186—188, 193, 194, 196—198, 200, 206, 212, 213, 215, 216, 220, 223, 241, 253, 262, 268, 276—287, 282.

\*\*\* Литературу см. 20, 24, 32, 33, 36, 39—41, 43, 44, 47, 48, 51, 57, 59, 63, 74, 76, 80, 92, 104, 110, 112, 114, 120, 121, 124, 126, 128, 137—140, 142, 143—145, 155, 156, 159, 167, 170, 172, 174, 175, 184, 186, 188, 193, 197, 200, 203, 205—208, 210, 212, 213, 233, 235, 237, 238, 240, 241, 243, 247, 248, 262, 263, 275—278, 282.

\*\*\*\* Литературу см. 33, 39, 41, 43, 44, 48, 70, 71, 74, 76, 79, 81, 104, 107, 110, 112, 128, 129, 131, 138, 143, 155, 167, 170, 172, 174, 184, 194, 198, 203, 236—238, 247, 248, 255.

Использование безводного фтористого водорода также может быть затруднено из-за N→S-ацильной миграции. Для устранения ее предложено использовать *S-p*-метоксибензилцистеин<sup>69, 81, 145, 151, 220, 282</sup>.

Иногда для защиты SH-группы цистеина применяют тритильную<sup>15, 81</sup> и КБЗ-группы<sup>235</sup>, но наибольший интерес в настоящее время представляют два подхода к синтезу цистеиновых пептидов. Это, прежде всего, использование различных алкилмеркаптозащитных групп (например, этилмеркаптогруппы), предложенных Вебером с сотр.<sup>20, 32, 57, 150</sup>. Эти группы удаляются сульфитолизом. Второй подход к решению проблемы основан на предложении Лункенхаймера и Цана<sup>61, 111</sup> использовать для пептидного синтеза *бис*-БОК-цистин, что позволяет исключить специальную защиту SH-группы. Оба эти подхода еще требуют дополнительного изучения, как и проблема защиты SH-группы в целом. Этим вопросам посвящены работы Цана с сотр.<sup>81</sup> и Вебера с сотр.<sup>144, 150</sup>.

## VI. МЕТОДЫ ОБРАЗОВАНИЯ ПЕПТИДНОЙ СВЯЗИ

Стадия пептидообразования является ключевой в процессе пептидного синтеза, что особенно справедливо в отношении твердофазного метода. Отсутствие промежуточных стадий очистки синтезируемого пептида вынуждает добиваться на этом этапе 100%-ного выхода.

В качестве конденсирующего агента наиболее распространенным продолжает оставаться ДЦГК (см. табл. 3). С помощью этого реагента все белковые аминокислоты (кроме аспарагина и глутамина) можно успешно вводить в пептидную цепь, присоединенную к полимеру-носителю. Иногда наблюдаются затруднения при введении в пептидную цепь остатков валина и изолейцина<sup>167</sup>, что связано с их пространственной структурой. Определенное влияние на полноту реакции пептидообразования оказывает и структура полимера-носителя<sup>199</sup>.

Очень важна также природа растворителя; он должен быть малополярным. Поэтому на стадии конденсации чаще всего применяют хлористый метилен, иногда с небольшими добавками ДМФА. При этом используют 2,5—3-кратные избытки реагентов, проводя реакцию в течение 2—4 час. при перемешивании в минимальном объеме растворителя. Иногда конденсацию с ДЦГК проводят в других органических растворителях, в частности в хлороформе<sup>101, 103, 160, 250</sup> или ТГФ<sup>30, 31, 49, 50, 87</sup>.

Неоднократно при твердофазном синтезе пытались использовать метод активированных эфиров, и не безуспешно. Так, Бодански и Шизн<sup>246, 254</sup> исследовали применение *p*-нитрофениловых эфиров аминокислот. Однако, несмотря на ряд преимуществ по сравнению с карбодиимидным, этот метод в целом более трудоемок, так как требует большого времени конденсации и предварительного получения производных аминокислот. Тем не менее с использованием *p*-нитрофениловых эфиров получен ряд важных пептидов, включая А-цепь инсулина и ее аналоги<sup>333, 334</sup>. Бейерман с сотр.<sup>335</sup> исследовали каталитическое влияние 1,2,4-триазола при использовании активированных эфиров. Этот подход был использован и рядом других исследователей<sup>116, 117, 161, 215, 216</sup>, несмотря на утверждение Рагнассона<sup>136</sup> об отсутствии каталитического действия 1,2,4-триазола.

Все шире на стадии пептидообразования используются N-оксисукцинимидные эфиры, впервые примененные Шемякиным и Овчинниковым с сотр.<sup>305</sup> в сочетании с растворимым носителем. Этот метод оказался пригодным и для нерастворимых полимеров<sup>44, 70, 106, 107, 116, 192, 318</sup>. Часто

ТАБЛИЦА 3

## Методы пептидообразования в твердофазном синтезе

Метод	Условия конденсации	Ссылки на литературу
Дициклогексилкарбодимид	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 25°, 2—4 часа  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ — ДМФА, 25°, 2—4 часа ДМФА, 25°, 12—14 час.  $\text{CHCl}_3$ , 25°, 2 часа ТГФ, —20° (до набухания), 20° (12 час.)	17, 19, 21, 24, 25, 28, 29, 32—48, 51, 53—55, 57, 59—61, 63, 65, 69—71, 73, 74, 76—83, 85, 86, 88—94, 96, 97, 99, 104, 107, 108, 110, 112, 114—118, 120—124, 126—129, 131, 132, 135, 137—146, 148, 149, 153—157, 159, 161, 163, 164, 166, 167, 169, 171, 172, 174, 175, 177—179, 182—184, 186, 188, 190—193, 196—201, 205—207, 209—216, 218, 220, 222, 223, 225, 227, 233, 235, 236, 238, 240, 247—249, 253, 255—257, 259—263, 268, 269, 272, 273, 275—277, 280—282, 286, 289, 296, 297, 299—301, 303, 304, 312, 313  97, 111, 113, 244  16, 95, 96, 100, 102, 105 <sup>а</sup> , 119, 127, 147, 231 <sup>б</sup> , 245, 278, 308  101, 103, 160, 250 <sup>в</sup> 30, 31, 49, 50, 87
Активированные эфиры <i>p</i> -нитрофениловые	ДМФА, 25°, 8—24 часа  с 1, 2, 4-триазолом в ДМФА, 25°, 12—24 часа	54, 81, 107, 118, 127, 156, 159, 167, 172, 180, 235, 300, 301, 308 <sup>г</sup> , 317, 318  116, 117, 136, 161, 203 <sup>д</sup> , 215, 216, 255
N-оксисукцинимидные	с 1, 2, 4-триазолом N-оксисукцинимид + ДЦГК в ДМФА, 25°, 8—12 час.	44, 70, 106, 107, 192, 317, 318  116 78, 117, 127, 242, 284, 285
пентахлорфениловые	ДМФА, 25°, 12 час. с N-метилморфолином в ДМФА, 25°, 20 час.	52, 56, 95, 100, 102 226
трихлорфениловые	ДМФА— $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ с 1, 2, 4-триазолом в ДМФА, 25°, 20—65 час. с 2, 6-лутидином в ДМФА, 25°, 24 часа	67, 69, 111 157 271
2-пиридиловые	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 25°, 12 час.	170
Смешанные ангидриды с изо-бутилхлоркарбонатом	ДМФА	27, 310—312
с N-этокси-карбонил-2-этокси-1, 2-дигидрохинолином	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 25°, 2—12 час.	168
Симметричные ангидриды	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 25°, 2 часа	158, 207
N-Карбоксиангидриды	ДМФА, 25°, 24 часа $\text{CHCl}_3$ , 25°, 1, 5 часа	16 309
Водорастворимый карбодимид	$\text{H}_2\text{O}$	310

<sup>а</sup> 5 час; <sup>б</sup> 72 час.; <sup>в</sup> 12 час.; <sup>г</sup>  $\text{CHCl}_3$  вместо ДМФА; <sup>д</sup> 1-оксibenзотриазол вместо 1, 2, 4-триазола.



указанные эфиры получают непосредственно в момент конденсации, используя N-оксисукцинимид и ДЦГК<sup>78, 117, 127, 242, 284, 285</sup>.

Известны также случаи использования трихлор- и пентахлорфениловых эфиров (см. табл. 3), иногда с добавками 1,2,4-триазола<sup>157</sup>, а также N-метилморфолина<sup>226</sup> и 2,6-лутидина<sup>271</sup>. Имеется также сообщение об использовании 2-пиридиловых эфиров<sup>170</sup>. Сравнению некоторых из перечисленных методов посвящена работа Бодански с сотр.<sup>56</sup>.

Среди других методов образования пептидной связи необходимо отметить метод смешанных ангидридов с изобутилхлоркарбонатом, применяемый как для синтеза с N-конца<sup>283</sup>, так и для синтеза с C-конца<sup>27, 310—312</sup>. Сообщалось также об использовании смешанного ангидрида N-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолина и БОК-аминокислоты<sup>168</sup>.

Возможно также применение симметричных ангидридов БОК-аминокислот<sup>158, 207</sup> и N-карбоксиангидридов аминокислот<sup>16</sup>. Правда, в последнем случае не удается пока четко контролировать количество присоединяемых аминокислотных остатков, что ограничивает применение этого метода. Показана возможность взаимодействия N-карбоксиангидридов с N-триметилсилильными производными аминокислот, присоединенных к несшитому полистиролу<sup>309</sup>.

В случае применения для твердофазного синтеза полиэтиленгликоля возможно наращивание пептидной цепи с использованием водорастворимого карбодиимида<sup>310</sup>.

#### VII. ПРОБЛЕМА ОБРАЗОВАНИЯ ОШИБОЧНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ПРИ ТВЕРДОФАЗНОМ ПЕПТИДНОМ СИНТЕЗЕ

Следует отметить, что ни один из рассмотренных выше методов пептидообразования не может гарантировать протекания реакции конденсации на 100%. Положение все более осложняется по мере роста синтезируемой цепи. Для обеспечения достаточной полноты протекания реакции конденсации необходимо использовать все увеличивающиеся избытки аминокислот. Так, при синтезе 104-членного аналога апопротеина цитохрома С из сердца лошади на последних стадиях использовались 30—70 кратные избытки БОК-аминокислот<sup>44, 88</sup>. Несколько улучшает выходы, но не устраняет принципиальных трудностей практика повторных конденсаций<sup>104, 112, 121, 148, 169, 198, 207, 209, 211, 233, 259, 260</sup>. Все это приводит к пропускам отдельных аминокислотных остатков в цепи.

Проблеме возникновения ошибочных последовательностей, связанных с пропусками аминокислотных остатков из-за неполного протекания стадий деблокирования и пептидообразования, большое внимание уделяют Байер и Хагенмайер с сотр.<sup>53, 62, 86</sup>. При этом они дают не только качественную и количественную оценку возможных примесей родственных пептидов, но и предлагают ряд методов контроля указанных побочных процессов, в частности методы, основанные на использовании масс-спектропии и ЯМР с <sup>19</sup>F<sup>132, 302, 312</sup>. Для количественной оценки возможных примесей Баасом, Бейерманом и сотр.<sup>336</sup> даже предложена специальная формула, учитывающая выход на каждой стадии пептидообразования.

Из всего вышесказанного с очевидностью вытекает важность повышения выхода на стадии конденсации и необходимость тщательного и четкого контроля этой стадии, равно как и стадии удаления N<sup>α</sup>-защитных групп. Существует ряд методов контроля этих процессов. Наиболее традиционны из них: количественный гидролиз пептидил-полимеров с

ТАБЛИЦА 4

## Методы определения свободных аминогрупп при твердофазном пептидном синтезе

Реагент	Ссылки на литературу
Дансил-хлорид или ДНФ-хлорид + $\text{H}_2\text{N}-(\text{P})$	73, 185, 215, 216, 312
$\text{Et}_3\text{N} + \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{N}-(\text{P})$	29, 38, 70, 81, 90, 94, 107, 108, 111, 113, 142, 159, 253, 284, 285
$\text{Et}_3\text{N} + \text{HX} \cdot \text{H}_2\text{N}-(\text{P})$ (HX из $\text{Py} \cdot \text{HX}$ ) (X = Cl, Br)	35, 62, 67, 78, 86, 132, 151, 164, 198, 199, 253
$\text{P}_3\text{N} + \text{O}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_2(\text{NO}_2)_2-\text{OH} \cdot \text{H}_2\text{N}-(\text{P})$	258—260
2-окси-1-нафталальдегид + $\text{H}_2\text{N}-(\text{P})$	60, 77, 84, 99, 129, 191, 257
2-амино-1-нафталальдегид + $\text{H}_2\text{N}-(\text{P})$	223
Инигидрин + $\text{H}_2\text{N}-(\text{P})$	78, 134, 168, 169, 200, 203, 211, 226, 277, 278, 280—282, 310, 312, 313
Бромкрезоловый пурпурный (индикатор)	337
Потенциометрическое титрование с $\text{HClO}_4 + \text{AcOH}$	58, 68, 195, 214

последующим аминокислотным анализом<sup>4</sup>, отделение промежуточных пептидов от полимера-носителя и анализ их однородности различными методами, а также метод спектрофотометрического определения какого-либо продукта реакции, количество которого пропорционально выходу на стадиях конденсации или деблокирования. Так, например, можно определять *p*-нитрофенол, образующийся при использовании *p*-нитрофениловых эфиров аминокислот<sup>254, 308, 333</sup>, НФС-хлорид в случае использования НФС-аминокислот<sup>284, 285</sup> или бензоилацетон в случае применения БМВ-защитной группы<sup>250</sup>.

Для определения свободных аминогрупп иногда используют методы дансирования или динитрофенилирования<sup>73, 185, 215, 216, 312</sup>, однако эти методы трудоемки, что не способствует их широкому распространению.

Полноту реакции конденсации анализируют также путем определения хлорид-иона в хлоргидрате триэтиламина, образующемся на стадии нейтрализации аминокептидил-полимера (см. табл. 4). Однако при этом невозможно установить, связано ли пониженное содержание хлорид-иона с неполным протеканием реакции конденсации или же с неполным деблокированием  $\alpha$ -аминогрупп.

Более удобным в этом отношении является метод Дормана<sup>35</sup>, предусматривающий обработку реакционной смеси после стадии пептидооб-

разования галоидгидратом пиридина с целью образования галоидгидратов по аминок группам, не вступившим в конденсацию. (При этом БОК-группа введенной аминокислоты остается незатронутой). Полученную соль аминокислоты обрабатывают триэтиламином, промывают и анализируют фильтраты на содержание хлорид-иона<sup>62, 67, 78, 86, 132, 151, 164, 198, 199, 253</sup>. Вместо галоидгидрата пиридина можно использовать, например, пикриновую кислоту<sup>258-260</sup>. Образующийся пикрат разрушают подходящим амином и анализируют раствор спектрофотометрически на содержание пикриновой кислоты.

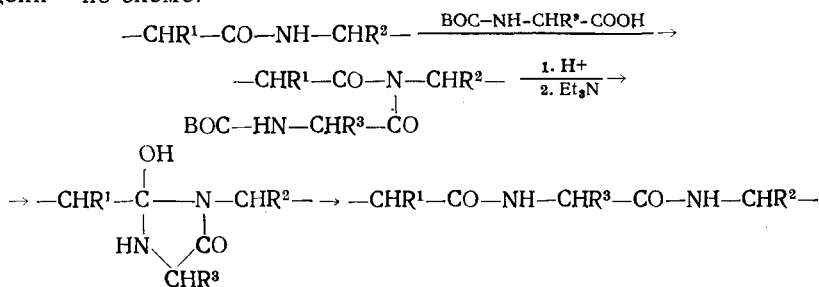
Существует ряд других качественных и количественных методов контроля свободных аминок групп. К ним относится применение 2-окси-1-нафталальдегида<sup>60, 77, 84, 99, 129, 191, 257</sup>, 2-амино-1-нафталальдегида<sup>223</sup>, индикатора бромкрезолового пурпурного<sup>337</sup>, а также нингидрина (см. табл. 4).

Оценке некоторых из приведенных методов контроля посвящены специальные работы<sup>164, 338</sup>. По нашему мнению, наиболее быстрым, точным и, главное, поддающимся автоматизации методом контроля является предложенное Брунфельдом с сотр.<sup>58, 68, 195, 214</sup> потенциометрическое титрование свободных аминок групп хлорной кислотой в присутствии уксусной кислоты.

Наряду с проблемой контроля полноты реакции конденсации, заслуживает рассмотрения проблема блокирования аминок групп, не вступивших в реакцию пептидообразования. Так, Меррифилд<sup>1</sup> после каждой стадии конденсации проводил ацетилирование непрореагировавших аминок групп уксусным ангидридом, что часто применяют и в настоящее время\*. Для этого используют также N-ацетилимидазол<sup>91, 282</sup>.

Для создания больших различий в кислотно-основных свойствах целевого пептида и побочных продуктов удобно использовать в качестве блокирующих агентов 3-нитрофталевоый<sup>55, 177, 203, 207</sup> и 3-сульфопропионоый<sup>131</sup> ангидриды. Образующиеся при этом производные более коротких пептидов имеют дополнительную кислотную группу, что облегчает их отделение от целевого пептида.

Если проблема контроля твердофазного синтеза в какой-то мере решена, то вопрос повышения выхода на стадии пептидообразования в целом остается открытым. Дублирование стадий конденсации и использование больших избытков N-защищенных аминокислот его не решают. Более того, большие избытки БОК-аминокислот могут приводить к дополнительному количеству ошибочных последовательностей за счет включения аминокислотных остатков внутрь синтезируемой пептидной цепи<sup>46</sup> по схеме:



Избытки N-ацелированных аминокислот не выгодно применять и из чисто экономических соображений, так как их регенерация малоэффективна и требует дополнительных разработок<sup>339</sup>.

\* Литературу см. 62, 86, 91, 92, 116, 117, 139, 148, 179, 197, 198, 212, 215, 216, 280, 281, 313.

С этой точки зрения наиболее интересным способом экономичного ведения твердофазного синтеза является метод Эско и Карлссона<sup>77</sup>, основанный на явлении сорбции БОК-аминокислоты аминоацилполимером. Сорбированного количества реагента оказывается достаточно для проведения стадии пептидообразования, а избыток БОК-аминокислоты можно удалить из реакционного сосуда еще до введения конденсирующего агента. Указанное явление сорбции было использовано Эллиотом с сотр.<sup>218</sup> при синтезе аналогов брадиканина.

Низкая эффективность реакции конденсации связана, вероятно, с тем, что по мере роста синтезируемой цепи на носителе возникает возможность свертывания пептидной цепи в неупорядоченный клубок, что приводит к экранированию N-концевой аминогруппы. Существенную роль в этом процессе могут играть водородные связи. Это предположение подтверждается тем, что добавление в реакционную смесь мочевины, разрушающей водородные связи, приводит к увеличению скорости и степени деблокирования БОК-групп<sup>134</sup>, а также к повышению выходов на стадии пептидообразования<sup>97, 148, 282</sup>.

Одним из возможных способов, препятствующих свертыванию пептидной цепи, может быть, по нашему мнению, дополнительное (сегментное) закрепление отдельных участков растущей пептидной цепи на носителе за счет взаимодействия с ним боковых функциональных групп пептида<sup>236</sup>.

Тем не менее проблема твердофазного синтеза длинных пептидных цепей остается открытой. На данном этапе наиболее рациональным в этом отношении является путь сочетания возможностей твердофазного метода (синтез коротких цепей) и классического соединения их в растворе. Такой подход принято называть твердофазно-фрагментным методом.

Кроме того, следует иметь в виду возможность блочного варианта пептидного синтеза на носителе. Этот метод был впервые исследован Вейгандом и Рагнарссоном<sup>340</sup> и более детально изучен Оменном и Анфинсеном<sup>341</sup>. Впоследствии блочный синтез в различных вариантах использовали и в других лабораториях<sup>96, 102, 117, 127, 147, 215, 227, 231, 232, 257, 297</sup>. Однако проведение блочной конденсации на полимерном носителе связано с рядом специфических трудностей, что пока ограничивает применение этого метода на практике.

## VIII. МЕТОДЫ ОТДЕЛЕНИЯ ПЕПТИДОВ ОТ ПОЛИМЕРА-НОСИТЕЛЯ

Наиболее широко применяемым методом отделения пептидов от полимера-носителя является использование бромистого водорода в трифторуксусной кислоте (см. табл. 5). При этом также удаляется ряд защитных группировок, кроме S- и N<sup>im</sup>-бензильной, N<sup>G</sup>-нитро- и тозилльной групп, а также O-*p*-нитробензильной. В этом процессе в последнее время довольно часто применяют в качестве растворителя смесь трифторуксусной кислоты с хлористым метилом (1 : 1)<sup>65, 77, 128, 168, 176, 179, 188, 194</sup>, что повышает набухаемость полимера.

При отсутствии в составе пептида остатков серина и треонина можно отделять пептид от носителя действием бромистого водорода в уксусной кислоте<sup>116, 260, 284, 285, 301</sup>. Для защиты остатков некоторых других аминокислот (цистеина, метионина, тирозина) от алкилирующего действия бромистого бензила, образующегося в процессе реакции, в реакционную смесь добавляют такие протекторы, как анизол, метилэтилсульфид или метионин.

ТАБЛИЦА 5

## Методы отделения пептидов от полимера-носителя

Реагент	Условия реакции	Ссылки на литературу
<i>Кислотные реагенты</i>		
HBr в $CF_3COOH$	25°, 60—90 мин.	17, 19, 21, 27 <sup>a</sup> , 32, 34, 35, 37, 38, 40, 45—47, 52—55, 57, 59, 63, 74, 76, 79—83, 86, 90, 91, 93—95, 100, 102, 106, 111, 114—117, 119, 120, 122, 126, 130, 132, 135, 137, 139—143, 148, 153, 154, 158, 161, 166, 170, 172, 175, 176, 180, 190, 196, 201, 207, 208, 210, 211, 215, 216, 218 <sup>b</sup> , 224, 225, 227, 233, 235, 238, 241, 253, 256, 257, 260, 286, 287, 299, 301, 303, 304
HBr в смеси $CF_3COOH-CH_2Cl_2$ (1:1)	20—25°, 60—90 мин.	65, 77, 128, 168, 176, 179, 188, 194
HBr в AcOH (40—60%-ный раствор)	20—25°, 20—60 мин.	116, 260, 284, 285, 301
HF (жидкий)	0°, 30—60 мин.	24, 28, 36, 37, 42, 44 <sup>b</sup> , 51, 71, 77, 85, 88, 98, 113, 121, 124, 127—129, 145, 154, 160, 167, 169, 176, 182, 183, 186, 191, 194, 197, 198, 206, 213 <sup>b</sup> , 216, 220, 221, 223, 231, 232 <sup>b</sup> , 273—282, 297, 313
50%-ная $CF_3COOH$ в $CH_2Cl_2$ или $CHCl_3$	25°, 30 мин.	249, 250, 263, 272
0,03 <i>N</i> $BF_3$ в эфире + $-AcOH-CHCl_3$	—	250
<i>Щелочные реагенты</i>		
1—2 <i>N</i> NaOH в ROH (R=Me, Et)	25°, 30—60 мин.	30, 31, 40, 49, 50, 87, 114, 116 <sup>f</sup> , 243, 296, 315
0,5 <i>N</i> NaOH в диоксане	25°, 6 час.	240, 241
2—4 <i>N</i> NaOH в диоксане	20—25°, ~1 час.	238, 261
2 <i>N</i> NaOH в смеси диоксан-этанол	—	25, 171
0,05 <i>N</i> водный NaOH	—	310—312
1 <i>M</i> MeONa в MeOH	—	312
~10%-ный PhSNa в ДМФА	20—25°, 5—10 час.	241, 242
<i>Аммонолиз</i>		
Насыщ. р-р $NH_3$ в ROH (R=Me, Et)	0—4°, 12—24 часа	29, 39, 43, 48, 69, 71, 73 <sup>d</sup> , 104 <sup>e</sup> , 112 <sup>e</sup> , 123 <sup>ж</sup> , 138, 144, 146 <sup>g</sup> , 147 <sup>g</sup> , 155 <sup>e</sup> , 176, 178, 184, 194, 240, 241, 244, 245, 248, 255
$NH_3$ (жидкий)	—	29
Жидк. $NH_3$ в ДМФА	~20°, 5—10 дней в ампуле	156, 159, 174, 205, 209, 261
Насыщ. р-р $NH_3$ в смеси ДМФА—ROH (1:1) (R=Me, Et)	~20°, 24—72 часа	41, 105, 107, 110, 192, 193, 200 <sup>h</sup>
MeNH <sub>2</sub> или Me <sub>2</sub> NH в MeOH	0—4°, 20—24 часа	203, 247
<i>Гидразиолиз</i>		
$N_2H_4$ или $N_2H_4 \cdot H_2O$ в ROH (R=Me, Et)	20—25°, 3—15 час.	42, 118 <sup>k</sup> , 240, 241
$N_2H_4$ или $N_2H_4 \cdot H_2O$ в ДМФА	20—25°, 1—3 дня	118, 126, 149, 212, 221

ТАБЛИЦА 5 (продолжение)

Реагент	Условия реакции	Ссылки на литературу
<i>Перезэтерификация</i>		
MeOH—Et <sub>3</sub> N или др. третичный амин	20—25°, 16—48 час.	18, 61 <sup>Л</sup> , 132, 157, 163, 170, 177, 222, 241, 255
MeOH—Et <sub>3</sub> N или др. третичный амин в ДМФА	~20°, 18—48 час.	92 <sup>М</sup> , 107, 159
MeOH — анионит	20—25°, 2 часа	33, 64

<sup>а</sup> 3—6 мин.; <sup>б</sup> при 5°; <sup>в</sup> 1,5 часа; <sup>г</sup> 1%-ный р-р NaOH; <sup>д</sup> насыщение при —20°, 48 час при 5°; <sup>1</sup> 2,5 часа при —10°, 18 час при 22°; <sup>ж</sup> 70 час.; <sup>з</sup> насыщение при 0°, 48 час. при 20°; <sup>и</sup> 20°, диоксан + MeOH (4:1); <sup>к</sup> 48 час; <sup>л</sup> MeOH, EtOH, i — PrOH + различные третичные амины; <sup>м</sup> 22 часа при 42°.

Для отделения пептидов от полимера-носителя все шире применяют безводный фтористый водород, впервые использованный для этого Ленардом и Робинсоном<sup>342</sup>. При этом удаляются также все защитные группировки, кроме N<sup>1</sup>-бензильной.

Из других кислотных реагентов необходимо отметить применение 50%-ного раствора трифторуксусной кислоты в хлористом метиле и раствора трехфтористого бора в эфире, используемых в специальных случаях (см. табл. 5). Использование бромистого водорода в трифторуксусной кислоте в течение длительного времени (более 1 часа) может приводить к частичной деструкции пептида, особенно при наличии в цепи остатков пролина<sup>116, 343, 344</sup>.

На стадии расщепления пептидил-полимера применяют также щелочные реагенты, например, раствор едкого натра в водных спиртах<sup>1, 30, 31, 49, 50, 87</sup>. Применяют также водно-диоксановые или водно-спиртово-диоксановые растворы едкого натра<sup>25, 171, 238, 240, 241, 310—312</sup>. Описано применение метилата натрия<sup>312</sup> и тиофенолята натрия<sup>241, 242</sup>.

С целью получения амидов пептидов широко используют обработку пептидил-полимеров аммиаком в различных условиях (см. табл. 5). Имеется сообщение о возможности межцепочечного аминолиза<sup>227</sup>, что может приводить к возникновению ошибочных последовательностей. Иногда наблюдается и внутрицепочечный аминолиз, особенно на стадии дипептидов, с образованием дикетопиперазинов. Этот процесс облегчается в том случае, когда С-концевой аминокислотой является пролин или N-метилованная аминокислота<sup>202, 214, 233, 259, 260</sup>.

Часто для отделения пептида от носителя используют гидразин или гидразингидрат, особенно при получении фрагментов для дальнейшей блочной азидной конденсации в растворе (см. табл. 5).

Сравнительно недавно на стадии расщепления пептидил-полимера стали применять метод перезэтерификации в присутствии третичных аминов или сильного анионита (см. табл. 5). В этой связи следует опасаться частичной потери пептида с полимера-носителя при промывке пептидил-полимера спиртом после стадии нейтрализации<sup>64</sup>, а также перехода ω-бензиловых эфиров в метиловые или этиловые<sup>345</sup>.

Проводилась сравнительная оценка различных методов отделения пептидов от полимера-носителя<sup>346</sup>, а также изучалось влияние различных растворителей на полноту отщепления пептида<sup>98</sup>.

Для удаления пептидов, присоединенных к носителю через N-концевую аминогруппу, используют бромистый водород в трифторуксусной

кислоте в случае полимера алкилоксикарбонилхлоридного типа<sup>287</sup> и щелочные реагенты или 36%-ный раствор бромистого водорода в уксусной кислоте в случае сульфохлорированного полимера<sup>288</sup>.

В аналогичных условиях отделяют пептид, присоединенный к носителю за боковую аминогруппу<sup>284-286</sup>.

Как уже отмечалось в разделе II, существует ряд носителей, позволяющих превратить пептидил-полимер в конце синтеза в полимерный активированный эфир<sup>268-271</sup>. Этот эфир может взаимодействовать с любой аминокислотой, например, с эфиром С-концевой аминокислоты<sup>268</sup> или же деблокированной  $\alpha$ -аминогруппой синтезированного пептида (циклизация на носителе)<sup>269</sup>. Аналогичная ситуация возникает и при использовании гидразидов и 4-карбоксифенилгидразидов на стадии получения аминокислотного полимера<sup>108</sup>. Указанные производные в конце синтеза также могут быть активированы.

## IX. АВТОМАТИЗАЦИЯ ТВЕРДОФАЗНОГО СИНТЕЗА ПЕПТИДОВ

Отсутствие нестандартных операций при твердофазном методе синтеза позволяет механизировать и автоматизировать весь процесс пептидного синтеза. Сообщения о первых автоматах-синтезаторах появились уже в 1965—1966 гг.<sup>347, 348</sup>. Обсуждение особенностей конструкций подобных автоматов может, вероятно, служить темой специального обзора, поэтому здесь мы ограничимся лишь рассмотрением основных тенденций в области создания подобных приборов.

Интересный вариант автомата-синтезатора с программой на перфоленте предложен Брунфельдом с сотр.<sup>349-351</sup>. Они же предложили специальный прибор, позволяющий автоматически контролировать процесс синтеза с помощью потенциометрического титрования<sup>68, 214</sup>. Ряд исследований посвящен разработке и совершенствованию отдельных узлов автомата. Так, принципиально новую конструкцию реакционного сосуда разработали Бирр и Лохингер<sup>166, 352</sup>. Реактор сделан ими в виде ротора с пористыми стенками, что позволяет отделять растворители от носителя методом центробежного фильтрования. Совершенствуются также системы замера и подачи растворов, методы перемешивания компонентов реакции в сосудах и т. д.<sup>211, 219, 353-356</sup>.

Трудно еще говорить об оптимальном варианте автомата-синтезатора. Однако уже сейчас ясно, что такой прибор в ближайшее время станет доступен для многих исследователей.

\* \*  
\*

Резюмируя изложенное, можно заключить, что твердофазный метод пептидного синтеза находится в состоянии интенсивного развития.

Обладая рядом важных преимуществ по сравнению с классическими методами синтеза, этот метод не свободен от недостатков, ограничивающих его практическое использование. При оценке его современного состояния и перспектив развития неуместны как чрезмерный энтузиазм, так и излишний скептицизм. В этом вопросе необходим, прежде всего, трезвый критический подход.

Однако рассмотренные выше данные показывают, что многие несовершенства твердофазного метода — это типичные болезни роста, которые, как известно, излечиваются в дальнейшем. Свидетельством этого

могут, в частности, служить недавние публикации по улучшению условий пептидообразования<sup>357</sup>, по разработке новых защитных групп для остатков трифункциональных аминокислот<sup>358</sup>, по применению модифицированных полимерных носителей<sup>359</sup>. Совершенствуются также способы присоединения первой аминокислоты к полимеру-носителю<sup>360, 361</sup>, успешно развивается твердофазно-фрагментный метод синтеза пептидов<sup>362</sup>.

Указанные тенденции нашли отражение и в некоторых публикациях самого последнего времени<sup>363-376</sup>, появившихся во время подготовки данного обзора к печати.

Все это позволяет надеяться на быстрое совершенствование существующих вариантов твердофазного синтеза пептидов и на преодоление серьезных недостатков, пока еще присущих этому методу.

В целом же твердофазный метод следует рассматривать как один из весьма перспективных и многообещающих методов пептидного синтеза.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. R. B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85, 2149 (1963).
2. R. B. Merrifield, Adv. Enzymol., 32, 221 (1969).
3. G. Losse, K. Neubert, Ztschr. Chem., 10, 48 (1970).
4. J. M. Stewart, J. D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis, San Francisco, 1969; Дж. Стюарт, Дж. Янг, Твердофазный синтез пептидов, «Мир», М., 1971.
5. A. Marglin, R. B. Merrifield, Ann. Rev. Biochem., 39, 841 (1970).
6. R. Geiger, Angew. Chem., 83, 155 (1971).
7. E. Wünsch, Там же, 83, 773 (1971).
8. M. Waki, N. Izumiya, Chemistry (Japan), 25, 588 (1970).
9. Y. Kishida, S. Sakakibara, Protein, Nucl. Acid and Enzyme, 16, 384 (1971).
10. Y. Kishida, S. Sakakibara, Protein, Nucl. Acid and Enzyme, 16, 459 (1971).
11. G. Losse, Acta physica chemica, 18, 63 (1972).
12. B. C. Becca, Усп. химии, 37, 246 (1968).
13. R. B. Merrifield, V. Littau, Peptides, 1968. Actes du 9<sup>me</sup> Symposium Europeen sur les Peptides, Orsay, 1968, North-Holland publishing comp., Amsterdam, 1968, стр. 179.
14. R. B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 86, 304 (1964).
15. E. Bondi, M. Fridkin, A. Patchornik, Israel J. Chem., 6, 22 (1968).
16. R. T. Ingwall, H. A. Scheraga, N. Lotan, A. Berger, E. Katchalski, Biopolymers, 6, 331 (1968).
17. G. Gabor, Там же, 6, 809 (1968).
18. M. E. Lombardo, R. N. Piasio, J. A. Bill, Пат. ФРГ 1804021 (1969); С. А., 72, 121935d (1970).
19. P. Jolles, J. Jolles, Helv. chim. acta, 51, 980 (1968).
20. G. Weitzel, U. Weber, S. Hörnle, F. Schneider, см. 13, стр. 222.
21. M. A. Ondetti, A. Deer, J. T. Sheehan, J. Plušec, O. Kocy, Biochemistry, 7, 4069 (1968).
22. E. Benjamini, M. Shimizu, J. D. Young, C. Y. Leung, Там же, 8, 2242 (1969).
23. B. Mehlis, W. Fischer, Пат. ГДР 69115 (1969); С. А., 72, 90876d (1970).
24. D. A. Ontjes, C. B. Anfinsen, Peptides: chemistry and biochemistry. Proceedings of the 1<sup>st</sup> American peptide symposium, N. Y., 1970, стр. 79.
25. В. Д. Смирнов, Г. А. Хангулов, Э. А. Шабарова, М. А. Прокофьев, Вестн. МГУ, сер. хим., 1969, 118.
26. E. C. Jorgensen, G. C. Windridge, W. Patton, T. C. Lee, J. Med. Chem., 12, 733 (1969).
27. C. L. Krumdieck, C. M. Baugh, Biochemistry, 8, 1568 (1969).
28. S. Ebihara, Y. Kishida, Nippon Kagaku zasshi, J. Chem. Soc. Japan., Pure Chem. Sect., 90, 819, A45 (1969).
29. J. Halstrom, K. Brunfeldt, J. Thomsen, K. Kovacs, Acta chem. scand., 23, 2335 (1969).
30. Е. А. Морозова, М. А. Зеваиль, Г. Ф. Жукова, ЖОХ, 40, 1376 (1970).
31. Е. А. Морозова, М. А. Зеваиль, Там же, 40, 1379 (1970).
32. U. Weber, Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol. Chem., 350, 1421 (1969).
33. W. Pereira, V. A. Close, E. Jellum, W. Patton, B. Halpern, Austral. J. Chem., 22, 1337 (1969).
34. T. Wieland, C. Birr, F. Flor, Lieb. Ann., 727, 130 (1969).
35. L. C. Dorman, Tetrahedron Letters, 1969, 2319.
36. D. A. Ontjes, C. B. Anfinsen, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 64, 428 (1969).



37. *J. Kato, C. B. Anfinsen*, *J. Biol. Chem.*, **244**, 5849 (1969).
38. *K. P. Polzhofer*, *Tetrahedron*, **25**, 4127 (1969).
39. *J. W. M. Baxter, M. Manning, W. H. Sawyer*, *Biochemistry*, **8**, 3592 (1969).
40. *Р. Г. Вдовина, А. К. Грачева, М. Г. Позняк, Ю. П. Швачкин*, Матер. II Всес. симп. по химии пептидов, изд. «Дониш», Душанбе, 1969, стр. 12.
41. *О. С. Пансевич, М. Р. Бука, Г. И. Чипенс*, Там же, стр. 31.
42. *S. S. Wang, R. B. Merrifield*, *Int. J. Protein Res.*, **1**, 235 (1969).
43. *J. W. M. Baxter, T. C. Wu, M. Manning, W. H. Sawyer*, *Experientia*, **25**, 1127 (1969).
44. *S. Sano, M. Kurihara*, *Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol. Chem.*, **350**, 1183 (1969).
45. *M. Ohno, A. Eastlake, D. Ontjes, C. B. Anfinsen*, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 6842 (1969).
46. *A. R. Mitchell, R. W. Roeske*, *J. Org. Chem.*, **35**, 1171 (1970).
47. *F. Chillemi, R. B. Merrifield*, *Biochemistry*, **8**, 4344 (1969).
48. *W. Fraefel, V. du Vigneaud*, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 1030 (1970).
49. *М. А. Зеваиль, Н. А. Морозова*, *ЖОХ*, **40**, 2760 (1970).
50. *М. А. Зеваиль, Е. А. Морозова*, Вестн. МГУ, сер. хим., **1971**, 246.
51. *D. A. Ontjes, C. B. Anfinsen*, *J. Biol. Chem.*, **244**, 6316 (1969).
52. *B. J. Johnson, W. P. May*, *J. Pharmac. Sci.*, **58**, 1568 (1969).
53. *E. Bayer, H. Eckstein, K. Hägele, W. A. König, W. Brüning, H. Hagenmaier, W. Parr*, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 1735 (1970).
54. *E. Bayer, E. Gil-Av, W. A. König, S. Nakaparksin, J. Oró, W. Parr*, Там же, **92**, 1738 (1970).
55. *T. Wieland, C. Birr, H. Wissenbach*, *Angew. Chem.*, **81**, 782 (1969).
56. *M. Bodanszky, R. J. Bath*, *Chem. Commun.*, **1969**, 1259.
57. *U. Weber, K. H. Herzog, H. Grossman, S. Hörnle, G. Weitzel*, *Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol. Chem.*, **350**, 1425 (1969).
58. *K. Brunfeldt, P. Roepstorff, J. Thomsen*, *Acta chem. scand.*, **23**, 2906 (1969).
59. *N. C. Chaturvedi, W. K. Park, R. R. Smeby, F. M. Bumpus*, *J. Med. Chem.*, **13**, 177 (1970).
60. *S. Karlsson, G. Lindeberg, J. Porath, U. Ragnarsson*, *Acta chem. scand.*, **24**, 1010 (1970).
61. *W. Lunkheimer, H. Zahn*, *Angew. makromol. Chem.*, **10**, 69 (1970).
62. *E. Bayer, H. Hagenmaier, G. Jung, H. Eckstein, P. Hunziker, R. E. Sievers*, *Peptides 1969. Proceedings of the 10th European Peptide Symposium, Abano Terme, Italy, North-Holland publishing comp., Amsterdam, 1971*, стр. 65.
63. *F. Chillemi*, Там же, стр. 84.
64. *H. C. Beyerman, H. Hindriks, J. Hirt, E. W. B. de Leer*, Там же, стр. 87.
65. *A. Loffel, J. Close*, Там же, стр. 92.
66. *C. B. Anfinsen, D. A. Ontjes, I. M. Chaiken*, Там же, стр. 121.
67. *B. Mehlis, W. Fischer, H. Niedrich*, Там же, стр. 146.
68. *K. Brunfeldt, P. Roepstorff, J. Thomsen*, Там же, стр. 148.
69. *K. Lübke*, Там же, стр. 154.
70. *J. Meienhofer, A. Trzeciak, T. Douša, O. Hechter, R. T. Havran, I. L. Schwartz, R. Walter*, Там же, стр. 157.
71. *R. T. Havran, C. Meyer, I. L. Schwartz, R. Walter*, Там же, стр. 161.
72. *M. Rothe, R. Theysohn, K. D. Steffen, M. Kostrzewa, M. Zamani*, Там же, стр. 179.
73. *Г. Ф. Жукова, Г. А. Равдель, Л. А. Шукина*, *ЖОХ*, **40**, 2753 (1970).
74. *H. Takashima, V. du Vigneaud*, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 2501 (1970).
75. *S. E. Ostroy, N. Lotan, R. T. Ingwall, H. A. Scheraga*, *Biopolymers*, **9**, 749 (1970).
76. *G. Weitzel, K. Eisele, H. Zollner, U. Weber*, *Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol. Chem.*, **350**, 1480 (1969).
77. *K. Esko, S. Karlsson*, *Acta chem. scand.*, **24**, 1415 (1970).
78. *E. Kaiser, R. L. Colosco, C. D. Bossinger, P. I. Cook*, *Anal. Biochem.*, **34**, 595 (1970).
79. *R. K. Olsen, J. Heterocycl. Chem.*, **7**, 435 (1970).
80. *E. C. Jorgensen, G. C. Windridge, T. C. Lee*, *J. Med. Chem.*, **13**, 352 (1970).
81. *K. Hammerström, W. Lunkheimer, H. Zahn*, *Makromol. Chem.*, **133**, 41 (1970).
82. *R. L. Smith, F. W. Dunn*, *J. Biol. Chem.*, **245**, 2962 (1970).
83. *R. L. Smith, E. G. Archer, F. W. Dunn*, Там же, **245**, 2967 (1970).
84. *S. Karlsson, G. Lindeberg, U. Ragnarsson*, *Acta chem. scand.*, **24**, 337 (1970).
85. *I. M. Chaiken, C. B. Anfinsen*, *J. Biol. Chem.*, **245**, 2337 (1970).
86. *H. Hagenmaier*, *Tetrahedron Letters*, **1970**, 283.
87. *Е. А. Морозова, М. А. Зеваиль*, *Хим. природн. соед.*, **1970**, 359.
88. *H. Yajima, H. Kawatani, H. Watanabe*, *Chem. Pharm. Bull.*, **18**, 1279 (1970).
89. *G. Weitzel, U. Weber, K. Eisele, H. Zollner, J. Martin*, *Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol. Chem.*, **351**, 263 (1970).
90. *K. Brunfeldt, J. Halstrom*, *Acta chem. scand.*, **24**, 3013 (1970).
91. *L. D. Markley, L. C. Dorman*, *Tetrahedron Letters*, **1970**, 1787.
92. *J. J. Blake, R. W. Crooks, G. H. Li*, *Biochemistry*, **9**, 2071 (1970).
93. *G. Losse, K. Neubert*, *Tetrahedron Letters*, **1970**, 1267.
94. *K. P. Polzhofer, K. H. Ney*, *Tetrahedron*, **26**, 3221 (1970).

95. S. Visser, J. Raap, K. E. T. Kerling, E. Havinga, Rec. trav. chim., 89, 865 (1970).
96. E. C. Jorgensen, G. C. Windridge, T. C. Lee, J. Med. Chem., 13, 744 (1970).
97. F. C. Westall, A. B. Robinson, J. Org. Chem., 35, 2842 (1970).
98. J. Scotchler, R. Lozier, A. B. Robinson, Там же, 35, 3151 (1970).
99. U. Ragnarsson, S. Karlsson, G. Lindeberg, Acta chem. scand., 24, 2821 (1970).
100. S. Visser, K. E. T. Kerling, E. Havinga, Rec. trav. chim., 89, 876 (1970).
101. A. M. Tometsko, J. Garden II, J. Tischio, Rev. Sci. Instrum., 42, 331 (1971).
102. S. Visser, K. E. T. Kerling, Rec. trav. chim., 89, 880 (1970).
103. A. M. Tometsko, J. Tischio, J. Garden II, J. Pharm. Sci., 59, 1655 (1970).
104. M. Manning, W. H. Sawyer, Nature, 227, 715 (1970).
105. G. Flouret, J. Med. Chem., 13, 843 (1970).
106. A. Orłowska, S. Brabarek, Roczn. Chem., 45, 339 (1971).
107. J. Meienhofer, A. Trzeciak, R. T. Havran, R. Walter, J. Am. Chem. Soc., 92, 7199 (1970).
108. T. Wieland, J. Lewalter, C. Birr, Lieb. Ann., 740, 31 (1970).
109. F. C. Westall, A. B. Robinson, J. Caccam, J. Jackson, E. H. Eylar, Nature, 229, 22 (1971).
110. О. С. Пансевич, Г. И. Чупенс, ЖОХ, 40, 2768 (1970).
111. W. Lunkenheimer, H. Zahn, Lieb. Ann., 740, 1 (1970).
112. M. Manning, E. Coy, W. H. Sawyer, Biochemistry, 9, 3925 (1970).
113. J. Meienhofer, P. M. Jacobs, H. A. Codwin, I. H. Rosenberg, J. Org. Chem., 35, 4137 (1970).
114. Р. Г. Вдовина, А. К. Грачева, М. Г. Позняк, Ю. П. Швачкин, ЖОХ, 41, 239 (1971).
115. Г. Лоссе, К. Нойберг, 7-й Междунар. симп. по химии природн. соедин. «Зинатне», Рига, 1970, стр. 11.
116. В. М. Кожуховская, С. Д. Львова, Р. П. Евстигнеева, Хим. природн. соедин., 1970, 599.
117. В. М. Кожуховская, С. Д. Львова, Р. П. Евстигнеева, Уч. записки Моск. ин-та тонкой хим. технологии, 1, 154 (1971).
118. G. R. Pettit, W. R. Jones, J. Org. Chem., 36, 870 (1971).
119. L. C. Dorman, L. D. Markley, D. A. Mapes, Anal. Biochem., 39, 492 (1971).
120. Н. К. Романовская, Г. И. Чупенс, ЖОХ, 41, 1856 (1971).
121. T. Fujii, S. Sakakibara, Bull. Chem. Soc. Japan, 43, 3954 (1970).
122. R. J. Weinkam, E. C. Jorgensen, J. Am. Chem. Soc., 93, 7033 (1971).
123. K. Norris, J. Halstrom, K. Brunfeldt, Acta chem. scand., 25, 945 (1971).
124. F. Chillemi, A. Pecile, Experientia, 27, 385 (1971).
125. M. Rothe, R. Theysohn, K. D. Steffen, Tetrahedron Letters, 1970, 4063.
126. Г. П. Мишин, Л. А. Александрова, Ю. П. Швачкин, Вестн. МГУ, сер. хим., 1972, 612.
127. K. Noda, S. Terada, N. Mitsuyasu, M. Waki, T. Kato, N. Izumiya, Mem. Fac. Sci. Kyushu Univ., C7, 189 (1970).
128. B. Gutte, R. B. Merrifield, J. Biol. Chem., 246, 1922 (1971).
129. C. H. Li, D. Yamashiro, J. Am. Chem. Soc., 92, 7608 (1970).
130. R. Paruszewski, Roczn. Chem., 45, 289 (1971).
131. H. Wissmann, R. Geiger, Angew. Chem., 82, 937 (1971).
132. E. Bayer, P. Hunziker, M. Mutter, R. E. Sievers, R. Uhmman, J. Am. Chem. Soc., 94, 265 (1972).
133. A. Loffet, Int. J. Protein. Res., 3, 297 (1971).
134. F. C. H. Chou, R. K. Chawla, R. F. Kibler, R. Shapira, J. Am. Chem. Soc., 93, 267 (1971).
135. D. Regoli, W. K. Park, F. Rioux, C. S. Chan, Rev. an. Biol., 30, 319 (1971).
136. U. Ragnarsson, G. Lindeberg, S. Karlsson, Acta chem. scand., 24, 3079 (1970).
137. E. C. Jorgensen, G. C. Windridge, T. C. Lee, J. Med. Chem., 14, 631 (1971).
138. W. Fraefel, V. du Vigneaud, J. Am. Chem. Soc., 92, 4426 (1970).
139. E. C. Jorgensen, S. R. Rapaka, G. C. Windridge, T. C. Lee, J. Med. Chem., 14, 899 (1971).
140. E. C. Jorgensen, S. R. Rapaka, G. C. Windridge, T. C. Lee, Там же, 14, 904 (1971).
141. T. Wieland, C. Birr, A. von Dungen, Lieb. Ann., 747, 207 (1971).
142. R. H. Andreatta, H. A. Scheraga, J. Med. Chem., 14, 489 (1971).
143. U. Weber, K. H. Herzog, H. Grossman, P. Hartter, G. Weitzel, Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol. Chem., 352, 419 (1971).
144. Y. Miura, H. Sugiyama, Y. Maki, S. Seto, Chem. Pharm. Bull., 20, 215 (1972).
145. K. Noda, S. Terada, N. Mitsuyasu, M. Waki, T. Kato, N. Izumiya, Naturwiss., 58, 147 (1971).
146. P. Rivaille, G. Milhaud, Helv. chim. acta, 54, 355 (1971).
147. J. K. Chang, H. Sievertsson, C. Bogentoft, B. Currie, K. Folkers, C. D. Daves, мл. J. Med. Chem., 14, 481 (1971).

148. W. S. Hancock, D. J. Prescott, W. L. Nulty, J. Weintraub, P. R. Vagelos, G. R. Marshall, J. Am. Chem. Soc., 93, 1799 (1971).
149. M. Ohno, K. Kuromizu, H. Ogawa, N. Izumiya, Там же, 93, 5251 (1971).
150. U. Weber, P. Hartter, Belgian-German Joint Biochemical Meeting: Peptides and Proteins and Antigens and Immunogenicity, Liege 1971; Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol. Chem., 352, 3 (1971).
151. E. Schaich, F. Schneider, Там же, стр. 4.
152. A. Loffet, Там же, стр. 4.
153. K. P. Polzhofer, Там же, стр. 4.
154. W. Voelter, J. D. Young, M. Shimizu, C. Y. Leung, E. Benjamini, Там же, стр. 6.
155. M. Manning, J. W. M. Baxter, T. C. Wu, V. Smart-Abbey, K. Morton, E. J. Coy, W. H. Sawyer, J. Med. Chem., 14, 1143 (1971).
156. G. Ungar, D. M. Desiderio, W. Parr, Nature, 238, 198 (1972).
157. H. C. Beyerman, P. Kranenburg, J. L. M. Syrier, Rec. trav. chim., 90, 791 (1971).
158. T. Wieland, C. Birr, F. Flor, Angew. Chem., 83, 333 (1971).
159. W. Parr, G. Holzer, Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol. Chem., 352, 1043 (1971).
160. F. W. Dunn, J. M. Stewart, J. Med. Chem., 14, 779 (1971).
161. С. Д. Львова, В. М. Кожуховская, М. Н. Аверин, Р. П. Евстигнеева, Хим. природн. соед., 1971, 466.
162. A. Loffet, C. Dremier, Experientia, 27, 1003 (1971).
163. T. Wieland, A. V. Dungen, C. Birr, FEBS Letters, 14, 299 (1971).
164. G. Losse, R. Ulbrich, Ztschr. Chem., 11, 346 (1971).
165. M. A. Ondetti, N. J. Williams, E. F. Sabo, J. Plušes, E. R. Weaver, O. Kocy, Biochemistry, 10, 4033 (1971).
166. C. Birr, W. Lechinger, Synthesis, 1971, 319.
167. U. Ragnarsson, S. Karlsson, B. Sandberg, Acta chem. scand., 25, 1487 (1971).
168. F. Sipos, D. W. Gaston, Synthesis, 1971, 321.
169. R. Shapira, F. C. H. Chou, S. McKneally, E. Urban, R. F. Kibler, Science, 173, 736 (1971).
170. A. S. Dutta, J. S. Morley, J. Chem. Soc (C), 1971, 2896.
171. В. Д. Смирнов, Т. Н. Бочарова, З. А. Шабарова, М. А. Прокофьев, Вестн. МГУ, сер. хим., 1972, 3.
172. G. Weitzel, U. Weber, J. Martin, K. Eisele, Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol. Chem., 352, 1005 (1971).
173. A. Losse, Ztschr. Chem., 11, 386 (1971).
174. M. Manning, E. J. Coy, W. H. Sawyer, Experientia, 27, 1372 (1971).
175. D. Regoli, W. K. Park, Can. J. Physiol. Pharm., 50, 99 (1972).
176. A. Marglin, Tetrahedron Letters, 1971, 3145.
177. T. Wieland, A. von Dungen, C. Birr, Lieb. Ann., 752, 109 (1971).
178. M. A. Wille, V. du Vigneaud, W. Y. Chan, J. Med. Chem., 15, 11 (1972).
179. C. H. Li, B. Hemmami, J. Med. Chem., 15, 217 (1972).
180. M. H. Jimenez, D. P. Winter, A. M. Felix, J. Chromatogr., 63, 167 (1971).
181. Ю. П. Швачкин, М. Н. Рябцев, А. П. Крымов, ЖОХ, 8, 655 (1972).
182. R. J. Freer, J. M. Stewart, J. Med. Chem., 15, 1 (1972).
183. T. B. Paiva, A. C. M. Paiva, R. J. Freer, J. M. Stewart, J. Med. Chem., 15, 6 (1972).
184. R. J. Vavrek, M. F. Ferger, G. A. Allen, D. H. Rich, A. T. Blomquist, V. du Vigneaud, J. Med. Chem., 15, 123 (1972).
185. J. Garden II, A. M. Tometsko, Anal. Biochem., 46, 216 (1972).
186. H. Sievertsson, J. K. Chang, C. Bogentoft, B. L. Currie, K. Folkers, C. Y. Bowers, Biochem. Biophys. Res. Commun., 44, 1566 (1971).
187. D. F. Veber, C. D. Bennett, J. D. Milkowski, G. Gal, R. G. Denkwalter, R. Hirschmann, Там же, 45, 235 (1971).
188. J. K. Givas, A. H. Sehon, M. Manning, Biochemistry, 11, 1351 (1972).
189. A. Arimura, H. Matsuo, Y. Baba, A. V. Schally, Science, 174, 511 (1971).
190. G. C. Windridge, E. C. Jorgensen, J. Am. Chem. Soc., 93, 6318 (1971).
191. D. Yamashiro, J. Blake, C. H. Li, Там же, 94, 2855 (1972).
192. Ю. П. Швачкин, А. П. Смирнова, ЖОХ, 42, 483 (1972).
193. H. Matsuo, A. Arimura, R. M. G. Nair, A. V. Schally, Biochem. Biophys. Res. Commun., 45, 822 (1971).
194. A. Marglin, Int. J. Protein, Res., 4, 47 (1972).
195. K. Brunfeldt, T. Christensen, FEBS Letters, 19, 345 (1972).
196. K. P. Polzhofer, Tetrahedron, 28, 855 (1972).
197. J. Blake, K. T. Wang, C. H. Li, Biochemistry, 11, 438 (1972).
198. T. Baba, H. Sugiyama, S. Seto, Sci. Repts. Res. Inst. Tohoku Univ., A23, 85 (1971).
199. A. Losse, Tetrahedron Letters, 1971, 4989.
200. H. Sievertsson, J. K. Chang, A. von Klaudy, C. Bogentoft, B. Currie, K. Folkers, C. Bowers, J. Med. Chem., 15, 222 (1972).
201. M. C. Khosla, S. Kumar, R. R. Smeby, F. M. Bumpus, Там же, 15, 627 (1972).

202. M. Rothe, J. Mazanek, *Angew. Chem.*, **84**, 290 (1972).
203. J. D. Glass, V. du Vigneaud, *J. Med. Chem.*, **15**, 486 (1972).
204. G. Weitzel, K. Eisele, H. Gugliemi, W. Stock, R. Renner, *Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol. Chem.*, **352**, 1735 (1971).
205. W. Parr, C. Yang, G. Holzer, *Tetrahedron Letters*, 1972, 101.
206. F. Chillemi, A. Aiello, A. Pecile, *Nature New. Biology*, **238**, 243 (1972).
207. T. Wieland, C. Birr, R. Frodl, W. Lochinger, G. Stahnke, *Lieb. Ann.*, **757**, 136 (1972).
208. T. Wieland, B. Penke, C. Birr, Там же, **759**, 71 (1972).
209. W. Voelter, K. Zech, G. Jung, *Tetrahedron*, **28**, 2649 (1972).
210. T. Wieland, C. Rietzel, A. Seeliger, *Lieb. Ann.*, **759**, 63 (1972).
211. M. C. Khosla, R. A. Leese, W. L. Maloy, A. T. Ferreira, R. R. Smeby, F. M. Bumpus, *J. Med. Chem.*, **15**, 792 (1972).
212. C. H. Li, B. Hemmami, Там же, **15**, 697 (1972).
213. D. Yamashiro, C. H. Li, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **4**, 181 (1972).
214. K. Brunfeldt, T. Christenson, P. Villemoes, *FEBS Letters*, **22**, 238 (1972).
215. В. М. Кожуховская, Н. Н. Монапова, Н. Л. Аларкон, С. Д. Львова, Р. П. Евстигнеева, *Хим. природн. соед.*, 1972, 510.
216. В. М. Кожуховская, С. Д. Львова, Р. П. Евстигнеева, Там же, 1972, 514.
217. W. Parr, G. Holzer, *Experientia*, **28**, 884 (1972).
218. D. F. Elliott, P. Moritz, R. Wade, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 1972, 1862.
219. W. K. Park, D. Regoli, *Cand. J. Biochem.*, **50**, 755 (1972).
220. H. Aoyagi, H. Yonezawa, N. Takahashi, T. Kato, N. Izumiya, C. C. Yang, *Biochim. biophys. acta*, **163**, 823 (1972).
221. M. Ohno, S. Tsukamoto, N. Izumiya, *Chem. Commun.*, 1972, 663.
222. Н. В. Федосеева, Г. В. Чельцова, А. Б. Силаев, *Хим. природн. соед.*, 1972, 686.
223. L. Corley, D. H. Sachs, C. B. Anfinsen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 1353 (1972).
224. K. Brunfeldt, T. Christensen, P. Roepstorff, *FEBS Letters*, **25**, 184 (1972).
225. D. C. Fessler, F. Sipos, G. S. Denning, мл., D. T. Pals, F. D. Massucci, *J. Med. Chem.*, **15**, 1015 (1972).
226. J. D. Glass, I. L. Schwartz, R. Walter, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 6209 (1972).
227. H. C. Beyerman, E. W. B. de Leer, W. van Vossen, *Chem. Commun.*, 1972, 929.
228. M. A. Tilak, *Tetrahedron Letters*, 1968, 6323.
229. В. С. Веса, Н. В. Диравянские, *Тр. АН Лит.ССР*, сер. Б, **2(53)**, 59 (1968).
230. В. П. Подвязный, Ю. К. Подвязная, Г. П. Сандимирова, К. Х. Зихерман, *Тр. Иркутского политехн. ин-та*, 1970, вып. 44, 73.
231. H. Yajima, H. Kawatani, H. Watanabe, *Chem. Pharm. Bull.*, **18**, 1333 (1970).
232. H. Yajima, H. Kawatani, *Chem. Pharm. Bull.*, **19**, 1905 (1971).
233. M. C. Khosla, R. R. Smeby, F. M. Bumpus, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 4721 (1972).
234. В. А. Даванков, С. В. Рогожин, В. В. Коршак, М. П. Цюрупа, *Изв. АН СССР, сер. хим.*, 1967, 1612.
235. В. С. Веса, П. И. Шилейкене, *Тр. АН ЛитССР*, сер. Б, **1(64)**, 145 (1971).
236. Г. П. Мишин, Ю. П. Швачкин, *ЖОХ*, **41**, 2341 (1941).
237. Г. А. Коршунова, Г. П. Мишин, Ю. А. Семилетов, Ю. П. Швачкин, Там же, **42**, 482 (1972).
238. Г. А. Коршунова, Г. П. Мишин, Ю. А. Семилетов, Н. А. Воскова, Ю. П. Швачкин, *Хим. природн. соед.*, 1971, 799.
239. F. Weygand, *См.*<sup>13</sup>, стр. 183.
240. T. Mizoguchi, K. Shigezane, N. Takamura, *Chem. Pharm. Bull.*, **17**, 411 (1969).
241. T. Mizoguchi, K. Shigezane, N. Takamura, Там же, **18**, 1465 (1970).
242. Farbwerke Hoechst A. G., *Англ. пат.* 1178364 (1970); С. А., **72**, 101118 m (1970).
243. N. Takamura, T. Mizoguchi, *Японск. пат.* 7130829 (1971); С. А., **75**, 141177 y (1971).
244. K. Shigemi, M. Muraki, T. Mizoguchi, *Японск. пат.* 7033045 (1970); С. А., **75**, 6352m (1971).
245. Y. Yamamura, T. Koki, N. Takamura, T. Mizoguchi, *Японск. пат.* 7130, 828 (1971); С. А., **75**, 141176x (1971).
246. M. Bodanszky, J. T. Sheehan, *Chem. a. Ind.*, 1964, 1423.
247. H. Takashima, W. Fraefel, V. du Vigneaud, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 6182 (1969).
248. H. Takashima, V. J. Hruby, V. du Vigneaud, Там же, **92**, 677 (1970).
249. G. L. Southard, G. S. Brooke, J. M. Petree, *Tetrahedron Letters*, 1969, 3505.
250. G. L. Southard, G. S. Brooke, J. M. Petree, *См.*<sup>62</sup>, стр. 95.
251. G. L. Southard, G. S. Brooke, J. M. Petree, *Tetrahedron*, **27**, 2701 (1971).
252. L. C. Dorman, J. Love, *J. Org. Chem.*, **34**, 158 (1969).
253. L. C. Dorman, L. D. Markley, *J. Med. Chem.*, **14**, 5 (1971).
254. M. Bodanszky, J. T. Sheehan, *Chem. a. Ind.*, 1966, 1597.
255. H. C. Beyerman, R. A. in t'Veld, *Rec. trav. chim.*, **88**, 1019 (1969).
256. П. И. Шилейкене, А. Б. Паулюконис, В. С. Веса, *Тр. АН ЛитССР*, сер. Б, **2(61)**, 93 (1970).

257. G. Losse, H. Klengel, *Tetrahedron*, 27, 1423 (1971).
258. B. F. Gisin, *Anal. chim. acta*, 58, 248 (1972).
259. B. F. Gisin, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 94, 3102 (1972).
260. B. F. Gisin, R. B. Merrifield, Там же, 94, 6165 (1972).
261. E. Bayer, E. Breitmaier, G. Jung, W. Parr, *Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol. Chem.*, 352, 759 (1971).
262. J. Blake, C. H. Li, *Int. J. Protein. Res.*, 3, 185 (1971).
263. S. S. Wang, R. B. Merrifield, *См.*<sup>62</sup>, стр. 74.
264. M. A. Tilak, C. S. Hollinden, *Tetrahedron Letters*, 1968, 1297.
265. P. A. Жагат, М. Р. Бука, Г. И. Чипенс, *см.*<sup>40</sup>, стр. 17.
266. М. Р. Бука, P. A. Жагат, *Изв. АН Латв.ССР, сер. хим.*, 1969, 503.
267. M. A. Tilak, C. S. Hollinden, *Пат. США* 3518240 (1970); *С. А.*, 73, 110485 b (1970).
268. D. L. Marshall, I. E. Liener, *J. Org. Chem.*, 35, 867 (1970).
269. E. Flanigan, G. R. Marshall, *Tetrahedron Letters*, 1970, 2403.
270. T. Wieland, C. Birr, P. Flekstein, *Lieb. Ann.* 756, 14 (1972).
271. G. W. Kenner, J. R. McDermott, R. C. Sheppard, *Chem. Commun.*, 1971, 636.
272. S. S. Wang, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 91, 6488 (1969).
273. P. G. Pietta, G. R. Marshall, *Chem. Commun.*, 1970, 650.
274. M. Monahan, J. Rivier, R. Burgus, M. Amoss, R. Blackwell, W. Vale, R. Guillemin, *С. г.*, *Acad. Sci. Paris*, D273, 508 (1971).
275. J. Rivier, W. Vale, M. Monahan, N. Ling, R. Burgus, *J. Med. Chem.*, 15, 479 (1972).
276. M. W. Monahan, J. Rivier, W. Vale, R. Guillemin, R. Burgus, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 47, 551 (1972).
277. J. Rivier, M. Monahan, W. Vale, G. Grant, M. Amoss, R. Blackwell, R. Guillemin, *R. Burgus, Chimia*, 26, 300 (1972).
278. M. W. Monahan, J. Rivier, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 48, 1100 (1972).
279. R. Guillemin, M. Amoss, R. Blackwell, J. Rivier, N. Ling, W. Vale, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 48, 1093 (1972).
280. G. W. Tregear, H. D. Niall, J. T. Potts, *мл.*, S. E. Leeman, M. M. Chang, *Nature New Biology*, 232, 87 (1971).
281. P. Rivaille, A. Robinson, M. Kamen, G. Milhaud, *Helv. chim. acta*, 54, 2772 (1971).
282. P. Rivaille, G. Milhaud, Там же, 55, 1617 (1972).
283. R. L. Letsinger, M. J. Kornet, *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 3045 (1963).
284. Л. Ю. Скляр, И. В. Шашкова, *ЖОХ*, 39, 2778 (1969).
285. Л. Ю. Скляр, *см.*<sup>40</sup>, стр. 37.
286. J. Meinkofer, A. Trzeciak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68, 1006 (1971).
287. A. M. Felix, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 92, 1385 (1970).
288. J. J. Dahlmans, P. L. Kerkhoffs, *Пат. ФРГ* 2052212 (1971); *С. А.*, 75, 366693r (1971).
289. J. J. Dahlmans, P. L. Kerkhoffs, *Пат. ФРГ* 2106139 (1971); *С. А.*, 75, 141178z (1971).
290. Г. И. Чипенс, И. К. Балтия, О. С. Пасуевич, *Тезисы I Всес. симп. по химии пептидов, Рига 1967, «Зинатне», 1967, стр. 8.*
291. И. К. Балтия, О. С. Пасуевич, Г. И. Чипенс, *Изв. АН Латв. ССР, сер. хим.*, 1969, 370.
292. И. К. Балтия, О. С. Пасуевич, Г. И. Чипенс, *Изв. АН Латв.ССР, сер. хим.*, 1969, 370.
293. R. Paruszewski, *Roczn. Chem.*, 44, 2039 (1970).
294. R. B. Merrifield, *Endeavour*, 24, 3 (1965).
295. P. L. De Benneville, *Пат. ФРГ* 1950969 (1970); *С. А.*, 73, 15248t (1970).
296. M. A. Tilak, C. S. Hollinden, *Org. Prep. Proced. Int.*, 3, 183 (1971).
297. S. Sano, R. Tokunaga, K. A. Kun, *Biochim. biophys. acta*, 244, 201 (1971).
298. C. Horvath, S. R. Lipsky, *Пат. ФРГ* 2109027 (1971); *С. А.*, 76, 4165 z (1972).
299. R. P. W. Scott, K. K. Chan, P. Kucera, S. Zoltny, *J. Chromatogr. Sci.*, 9, 577 (1971).
300. Г. Юнг, Э. Байер, *см.*<sup>115</sup>, стр. 9.
301. E. Bayer, G. Jung, I. Halasz, I. Sebastian, *Tetrahedron Letters*, 1970, 4503.
302. G. Jung, E. Breitmaier, W. Voelter, E. Bayer, *Angew. Chem.*, 83, 911 (1971).
303. W. Parr, K. Crothmann, *Tetrahedron Letters*, 1971, 2633.
304. W. Parr, K. Grothmann, *Angew. Chem.*, 84, 266 (1972).
305. М. М. Шемьякин, Ю. А. Овчинников, А. А. Кирюшкин, I. V. Kozhevnikova, *Tetrahedron Letters*, 1965, 2323.
306. Ю. А. Овчинников, А. А. Кирюшкин, И. В. Кожеевникова, *ЖОХ*, 38, 2631 (1968).
307. Ю. А. Овчинников, А. А. Кирюшкин, И. В. Кожеевникова, Там же, 38, 2636 (1968).
308. J. J. Maher, M. E. Furey, L. J. Greenberg, *Tetrahedron Letters*, 1971, 27.
309. J. J. Maher, M. E. Furey, L. J. Greenberg, Там же, 1972, 1581.
310. M. Mutter, H. Hagenmaier, E. Bayer, *Angew. Chem.*, 83, 883 (1971).
311. E. Bayer, D. Gillissen, H. Kuenzi, M. Mutter, R. Studer, *Пат. ФРГ* 2047413 (1972); *С. А.*, 77, 20023c (1972).

312. E. Bayer, M. Mutter, *Nature*, **237**, 512 (1972).
313. J. T. Potts, мл., G. W. Tregear, H. T. Keutmann, H. D. Niall, R. Sauer, L. J. Deftos, B. F. Dawson, M. L. Hogan, G. R. Aurbach, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 63 (1971).
314. N. Inukai, K. Nakano, M. Murakami, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **41**, 182 (1968).
315. M. Murakami, N. Inukai, K. Nakano, Японск. пат. 7026, 722 (1970); *C. A.*, **74**, 142358z (1971).
316. G. Losse, C. Madlung, P. Lorenz, *Chem. Ber.*, **101**, 1257 (1968).
317. Г. П. Власов, А. Ю. Булибин, *Изв. АН СССР, сер. хим.*, **1969**, 1400.
318. А. Ю. Булибин, Г. П. Власов, см.<sup>40</sup>, стр. 8.
319. F. F. Richards, R. W. Sloane, мл., E. Haber, *Biochemistry*, **6**, 476 (1967).
320. B. F. Gisin, R. B. Merrifield, см.<sup>24</sup>, стр. 65.
321. B. F. Gisin, R. B. Merrifield, D. C. Tosteson, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 2691 (1969).
322. J. M. Stewart, D. W. Woolley, *Nature*, **206**, 619 (1965).
323. P. Kusch, *Kolloid. Ztsch. Polymere*, **208**, 138 (1966).
324. B. Gutte, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 501 (1969).
325. H. Takashima, V. du Vigneaud, R. B. Merrifield, Там же, **90**, 1323 (1968).
326. Л. А. Щукина, Л. Ю. Скляр, *Хим. природн. соед.*, **1966**, 200.
327. W. Kessler, B. Iselin, *Helv. chim. acta*, **49**, 1330 (1966).
328. V. A. Najjar, R. B. Merrifield, *Biochemistry*, **5**, 3765 (1966).
329. P. Sieber, B. Iselin, *Helv. chim. acta*, **51**, 622 (1968).
330. G. Losse, K. Neubert, Пат. ГДР 79022 (1971); *C. A.*, **76**, 100063k (1972).
331. G. Losse, U. Krychowski, *J. prakt. Chem.*, **312**, 1097 (1970).
332. G. Losse, U. Krychowski, *Tetrahedron Letters*, **1971**, 4121.
333. S. Hörnle, *Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol. Chem.*, **348**, 1355 (1967).
334. U. Weber, S. Hörnle, G. Grieser, K. H. Herzog, G. Wetzel, *Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol. Chem.*, **348**, 1715 (1967).
335. H. C. Beyerman, C. A. M. Boers-Boonekamp, H. Maassen van den Brink-Zimmermannova, *Rec. trav. chim.*, **87**, 257 (1968).
336. J. W. A. Baas, H. C. Beyerman, B. van de Graaf, E. W. B. de Leer, См.<sup>62</sup>, стр. 173.
337. H. C. Beyerman, H. Hindricks, см.<sup>62</sup>, стр. 145.
338. В. Ф. Кривцов, Г. А. Цитовская, Ю. П. Швачкин, см.<sup>40</sup>, стр. 25.
339. А. С. Карсакевич, В. Э. Калис, *Изв. АН Латв.ССР, сер. хим.*, **1971**, 595.
340. E. Weygand, U. Ragnarsson, *Naturforsch.*, **21b**, 1141 (1966).
341. G. S. Omenn, C. B. Anfinsen, *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 6571 (1968).
342. J. Lenard, A. B. Robinson, Там же, **89**, 181 (1967).
343. G. R. Marshall, R. B. Merrifield, *Biochemistry*, **4**, 2394 (1965).
344. M. C. Khosla, R. R. Smeby, F. M. Bumpus, Там же, **6**, 754 (1967).
345. G. L. Southard, см.<sup>62</sup>, стр. 168.
346. А. П. Смирнова, Т. В. Андрусенко, Ю. П. Швачкин, см.<sup>40</sup>, стр. 37.
347. R. B. Merrifield, J. M. Stewart, *Nature*, **207**, 522 (1965).
348. R. B. Merrifield, J. M. Stewart, N. Jernberg, *Anal. Chem.*, **38**, 1905 (1966).
349. K. Brunfeldt, J. Halstrom, P. Roepstorff, см.<sup>13</sup>, стр. 194.
350. K. Brunfeldt, J. Halstrom, P. Roepstorff, *Acta chem. scand.*, **23**, 2830 (1969).
351. K. Brunfeldt, P. Roepstorff, J. Halstrom, Пат. США 3557077 (1971); *C. A.*, **75**, 6361p (1971).
352. C. Birr, Пат. ФРГ 2017351 (1971); *C. A.*, **76**, 60068g (1972).
353. T. Kubodera, T. Hara, H. Makabe, Пат. ФРГ 1933846 (1970); *C. A.*, **72**, 111817 c (1970).
354. R. Boni, G. M. Bonora, L. Ciceri, A. Gambini, A. Scatturin, E. Scoffone, *Chem. Ind. (Milan)*, **53**, 10 (1971).
355. L. D. Holubee, H. C. Faigh R. B. Samuels, Пат. ФРГ 2048882 (1971); *C. A.*, **75**, 36696 u (1971).
356. V. J. Hruby, L. E. Barstow, T. Linhardt, *Anal. Chem.*, **44**, 343 (1972).
357. H. Hagenmaier, H. Frank, *Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol. Chem.*, **353**, 1973 (1972).
358. D. Yamashiro, C. H. Li, *J. Org. Chem.*, **38**, 591 (1973).
359. S. S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 1328 (1973).
360. R. Matsueda, E. Katayama, H. Maruyama, H. Takahagi, T. Mukaiyama, *Chem. Letters*, **1972**, 379.
361. T. Mukaiyama, *Synth. Commun.*, **2**, 243 (1972).
362. S. S. Wang, R. B. Merrifield, *Int. J. Peptide and Protein. Res.*, **4**, 309 (1972).
363. L. Corley, D. H. Sacks, C. B. Anfinsen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 1353 (1972).
364. Y. Kiso, H. Yajima, *Chem. Commun.*, **1972**, 942.
365. A. Losse, *Tetrahedron*, **29**, 1203 (1973).
366. B. W. Erickson, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 3750 (1973).

367. *H. Blecker, P. Pfaender*, Lieb. Ann., 1973, 1263.  
368. *R. H. Andreatta, H. Rink*, Helv. Chim. acta, 56, 1205 (1973).  
369. *J. J. Sharp, A. B. Robinson, M. D. Kamen*, J. Am. Chem. Soc., 95, 6097 (1973).  
370. *B. F. Gisin*, Helv. chim. acta, 56, 1476 (1973).  
371. *E. Schaich, A. M. Fretzdorff, F. Schneider*, Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol. Chem., 354, 897 (1973).  
372. *D. H. Rich, S. K. Gurwara*, Chem. Communs., 1973, 610.  
373. *R. B. Merrifield, A. R. Mitchell, J. E. Clarke*, J. Org. Chem., 39, 660 (1974).  
374. *J. Halström, K. Brunfeldt, K. Kovacs*, Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol. Chem., 355, 82 (1974).  
375. *S. Takahashi, Y. Shimonishi*, Chem. Letters, 1974, 51.  
376. *B. Hemmasi, E. Bayer*, Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol. Chem., 355, 481 (1974).

Межфакультетская лаборатория  
биоорганической химии МГУ,  
Химический факультет МГУ

---