



Aminosäuren, Peptide, Proteine

Eine Einführung

Prof.Dr.sc.nat. **Hans-Dieter Jakubke**

Karl-Marx-Universität Leipzig

Dozent Dr.rer.nat.habil. **Hans Jeschkeit**

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

3., bearbeitete und erweiterte Auflage

Akademie-Verlag · Berlin ·

1982

Х.-Д. Якубке
Х. Ешкайт

Аминокислоты Пептиды Белки

Перевод с немецкого
канд. хим. наук Н. П. Запеваловой
и канд. хим. наук Е. Е. Максимова
под редакцией
д-ра хим. наук, проф. Ю. В. Митина

Москва «Мир» 1985

ББК 24.239

Я49

УДК 547.9 + 571.1

Якубке Х.-Д., Ешкайт Х.

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

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

Для специалистов в области биоорганической химии и химии белка.

Я $\frac{1803000000-171}{041(01)-85}$ 89-85, ч. I

ББК 24.239

547

Редакция литературы по химии

1199982

© Akademie-Verlag, Berlin, 1981

© Перевод на русский язык, «Мир», 1985

Предисловие редактора перевода

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

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

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

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

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

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

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

Ю. Митин

Предисловие к третьему изданию

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

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

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

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

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

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

Лейпциг и Галле
Ноябрь 1980 г.

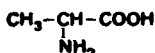
*Х.-Д. Якубке
Х. Ешкайт*

1. Аминокислоты

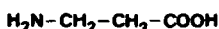
Аминокислоты существуют на нашей планете более трех миллиардов лет. Это доказано исследованием ископаемых микроорганизмов углеродсодержащих кремниевых остатков из докембрийского геологического периода с помощью рубидиево-цезиевого метода датирования. Существуют они и вне Земли, что показано хроматографическим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

Аминокислоты — это органические соединения, физико-химическое поведение и разнообразные реакции которых объясняются одновременным присутствием в молекуле основной аминогруппы NH_2 — и кислой карбоксильной группы $-\text{COOH}$.

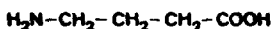
Различают α -аминокислоты, у которых амино- и карбоксильная группы соединены с одним и тем же атомом углерода, и β -, γ -, δ -аминокислоты, функциональные группы которых разделены несколькими атомами углерода:



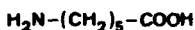
α -аминопропионовая кислота



β -аминопропионовая кислота

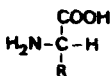


γ -аминомасляная кислота



ϵ -аминокапроновая кислота

В природе встречаются главным образом α -аминокислоты. Они имеют общую формулу



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

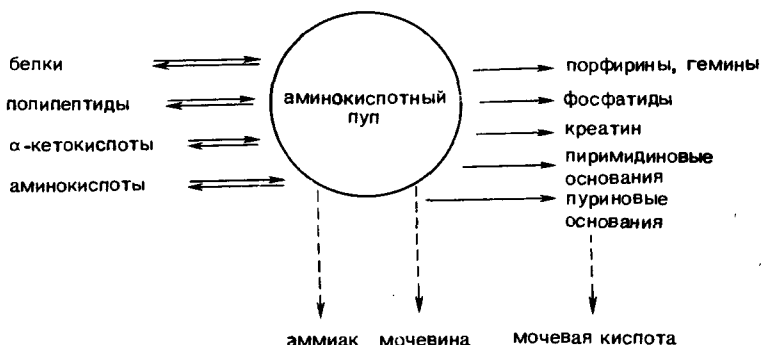


Рис. 1-1. Схематическое представление превращений аминокислот.

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

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

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

1.1. Номенклатура аминокислот

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

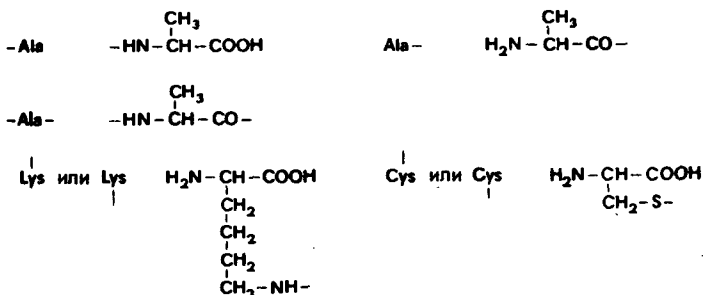
мощью трипсина. Структурные связи с другими природными соединениями также внесли вклад в названия некоторых аминокислот. Так, валин назван как производное валериановой кислоты, треонин структурно связан с моносахаридом треозой. Название «пролин» происходит от рационального обозначения пирролидин-2-карбоновой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

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

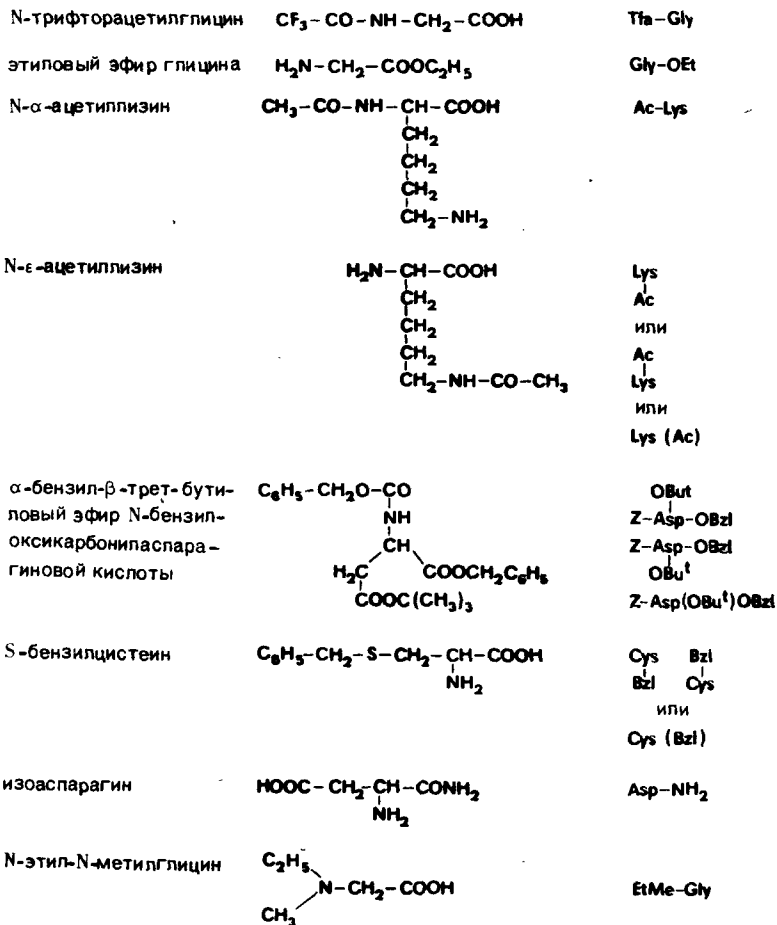
Для удобства написания пептидных фрагментов предложено пользоваться сокращенными названиями аминокислотных остатков, которые состоят из первых трех букв тривиального названия аминокислоты, например Ala для L-аланина и Met для L-метионина (сокращения для других аминокислот см. в табл. 1-1). Оптическая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

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

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



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



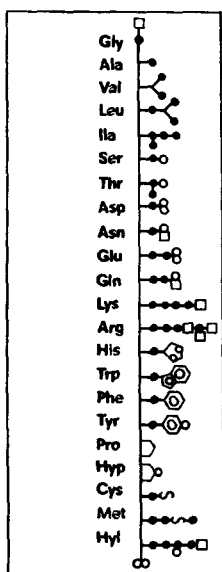


Рис. 1-2. Структурные символы аминокислот по Веллнеру и Мейстеру.

Принятая система сокращений помогает наглядно изображать схемы пептидных синтезов.

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

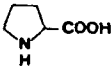
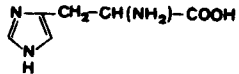
Первая система сокращений для аминокислот и пептидов была опубликована Брандом и Эдсалом в 1947 г. Система графического изображения аминокислот, предложенная Веллнером и Мейстером, учитывает структурные особенности аминокислотных цепей (рис. 1-2).



1.2. Природные аминокислоты

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

Таблица 1-1. 20 аминокислот белкового происхождения

Тип аминокислоты	Тривиальные названия аминокислот	Сокращение согласно IUPAC—IUB ^a	Структурная формула	Открыватель и исходный материал, из которого выделена (год)	Материалы с наиболее высоким содержанием аминокислоты и содержание, %	
Алифатические, нейтральные аминокислоты	Глицин	Gly G	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$	Браконно, шелк (1820)	Фиброин шелка Желатин	43,6 25,7
	Алаанин	Ala A	$\text{CH}_3-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	Вейль, фиброин шелка (1888)	Фиброин шелка	29,7
	Валин	Val V	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \text{H}_3\text{C} \end{array} \text{CH}-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	Горуп-Безане, экстракт желез (1856)	Эластин Сухожилия быка Аорта быка	17,4 17,6
	Лейцин	Leu L	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \text{H}_3\text{C} \end{array} \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	Пруст, творог (1819)	Сывороточный альбумин быка Кукуруза Пепсиноген свиньи	12,8 19,0 20,0
	Изолейцин	Ile I	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2 \\ \text{H}_3\text{C} \end{array} \text{CH}-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	Эрлих, патока (1904)	Сывороточный альбумин быка Белок овса	2,6 4,3
Алифатические гидроксикаминокислоты	Серин	Ser S	$\text{HOH}_2\text{C}-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	Крамер, шелковый клей (1865)	Фиброин шелка Трипсиноген Пепсин	16,2 16,7 12,2

Аминокислоты, содержащие серу	Треонин	Thr T	$\text{H}_3\text{C}-\text{CH}(\text{OH})-\overset{*}{\text{CH}}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	Розе и др., фибрин (1935)	Кератин волоса человека	8,5
	Цистин	Cys C	$\text{HSCH}_2\text{C}-\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	Бауман, цистин (восстановлением) (1884)	Авидин (яичный белок)	10,5
	Метионин	Met M	$\text{H}_3\text{C}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	Мюллер, казеин (1921)	Кератин волос Кератин перьев Кератин шерсти	14,4 8,2 11,9
Иминокислоты	Пролин	Pro P		Фишер, казеин (1901)	γ -Казеин Овальбумин β -Лактоглобулин	4,1 5,2 3,2
	Лизин	Lys K	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	Дрехсель, казеин (1899)	Сальмин Желатин	6,9 10,6 16,3
Основные аминокислоты	Аргинин	Arg R	$\text{HN}=\text{C}(\text{NH}_2)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	Шульпе и др., проростки люпина (1886)	Миоглобин лошади Сывороточный альбумин быка β -Лактоглобулин	15,5 12,8 12,6
	Гистидин	His H		Коссель, стурин (1896)	Желатин Гистон (печени крысы)	86,4 8,3 15,9
	Аспарагиновая кислота	Asp D	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	Риттхаузен, бобовые (1868)	Сальмин Желатин Гемоглобин	7,0
Кислые аминокислоты и полуамиды	Аспарагиновая кислота	Asp D	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	Риттхаузен, бобовые (1868)	Элестин Глобулин ячменя	12,0 10,3

Тип аминокислоты	Тривиальные названия аминокислот	Сокращение согласно IUPAC-IUB ^a	Структурная формула	Открыватель и исходный материал, из которого выделен (год)	Материалы с наиболее высоким содержанием аминокислоты и содержание, %
Ароматические и гетероароматические аминокислоты	Аспарагин	Asn N или Asp(NH ₂)	$\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	Вокелли и Робике, спаржа (1806)	
	Глутаминовая кислота	Glu E	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	Риттхаузен, бобовые (1866)	Глиадин пшеницы 39,2 Глиадин ржи 37,7 Кукуруза 22,9
	Глутамин	Gln Q или Glu(NH ₂)	$\text{H}_2\text{N}-\text{OC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	Шульце, сахарная свекла (1877)	
	Фенилаланин	Phe F	 $\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	Шульце и Барбьери, ростки люпинна (1879)	Сывороточный альбумин 7,8 γ -Глобулин 4,6 Овальбумин 7,7
	Тирозин	Tyr Y	$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	Либих, сыр (1846)	Фиброин шелка 12,8 Папаин 14,7
	Триптофан	Trp W	 $\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	Гопкинс и Кол, казеин (1901)	Лизоцим (яйца) 10,6 α -Лактальбумин 7,0

^a Однобуквенные символы применяются только при написании аминокислотных последовательностей.

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

1.2.1. Протеиногенные аминокислоты

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

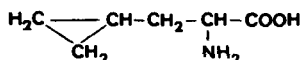
Таблица 1-3. Содержание НАК в белках различного происхождения [20]

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

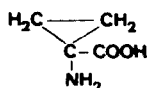
1.2.2. Непротеиногенные аминокислоты [21]

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

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

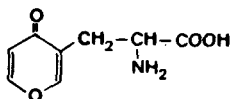


(1)

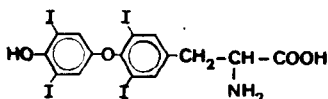


(2)

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

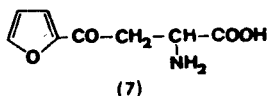
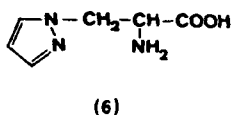
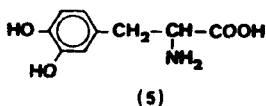


(3)

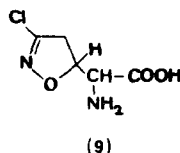
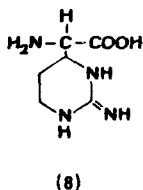


(4)

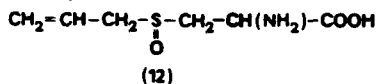
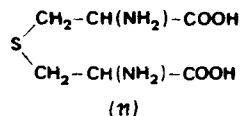
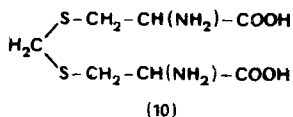
К производным аланина принадлежит изомерный β -аланин $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$ (основная составляющая кофермента А) и необходимый для образования меланина 3,4-дигидроксифенилаланин, или ДОФА (5). ДОФА существует в свободном состоянии в фасоли. Этой аминокислоте приписывают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



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

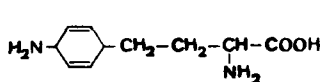


Представителями цистеинового ряда являются *дбенколовая кислота* (10) из восточноазиатских бобов, содержащийся в волосах и шерсти *лантинин* (11), *аллиин* (12) лука, гомолог метионина *этионин* $\text{H}_3\text{C}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$, а также часто встречающийся в грибах *гомоцистеин* $\text{HS-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$.

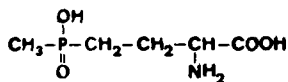


Из соединений, принадлежащих к ряду аминomásляной кислоты, интересны *гомосерин* $\text{HOCH}_2\text{-CH}_2\text{-C(NH}_2\text{)-COOH}$ из *Pisum sativum*, содержащаяся в полимиксинах γ -амино-масляная кислота $\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$, а также антибиотик γ -амино-4-(4'-амино-

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

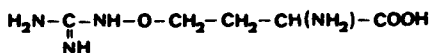


(13)

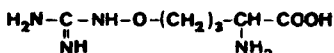


(14)

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



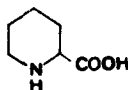
(15)



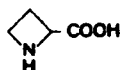
(16)

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

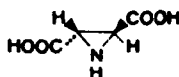
Представители ряда иминокислот — это распространенная в бобовых и микроорганизмах *пипеколиновая кислота* (17), а также встречающаяся в лилейных и агавах *азетидин-2-карбоновая кислота* (18).



(17)



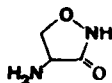
(18)



(19)

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

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



(20)

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

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

Аминотрикарбоновая α, γ-карбоксиглутаминовая кислота (Gla) была найдена в протромбине и в минерализованных белках тканей [22, 23].

1.3. *Стереохимия аминокислот* [24 — 26]

1.3.1. Оптическая активность аминокислот

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

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

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

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

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

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

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

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

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

^a В 1 н. HCl.

^b $c = 0,25$.

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

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

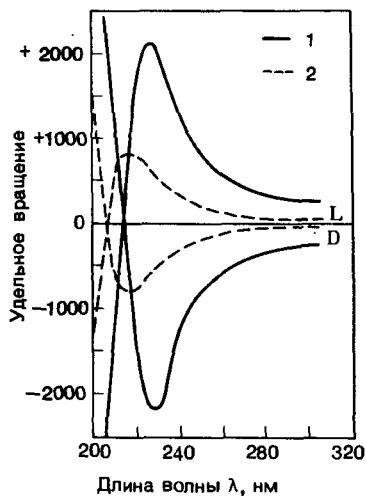


Рис. 1-3. Кривые ДОВ для D- и L-аланинов. 1 — гидрохлорид, 2 — нейтральный раствор аминокислоты.

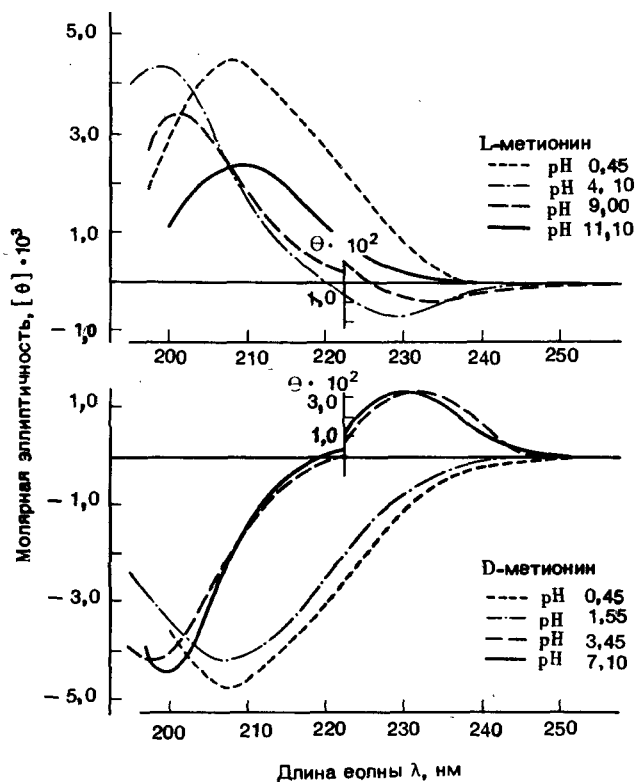


Рис. 1-4. Спектры КД D- и L-метионина.

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

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

1.3.2. Конфигурация и конформация аминокислот

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

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

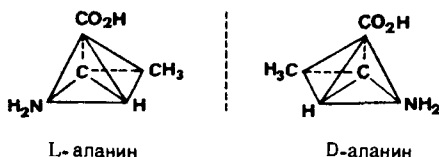
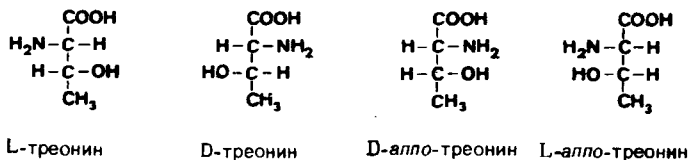


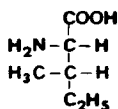
Рис. 1-5. Пространственные формулы D- и L-аланина.

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

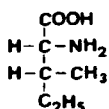
В случае абсолютной конфигурации по Кану, Ингольду и Прелогу заместители хирального C-атома располагаются в убывающем порядке и D-аминокислотам соответствует обозначение (R)-, а L-аминокислотам — (S)-. Хотя эта система универсальна, она до сих пор не получила признания в номенклатуре аминокислот.

Аминокислоты треонин, изолейцин и гидроксипролин имеют два центра хиральности.

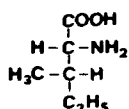




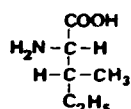
L-изолейцин



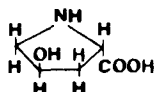
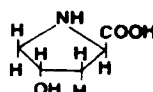
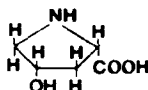
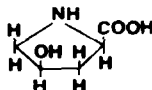
D-изолейцин



D-аппо-изолейцин

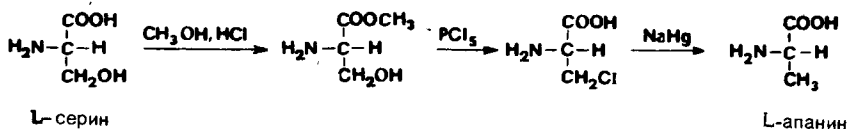


L-аппо-изолейцин

4-гидрокси-L-пролин
(транс-4-гидрокси-L-пролин)4-гидрокси-D-пролин
(транс-4-гидрокси-D-пролин)аппо-4-гидрокси-L-пролин
(цис-4-гидрокси-L-пролин)аппо-4-гидрокси-D-пролин
(цис-4-гидрокси-D-пролин)

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

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



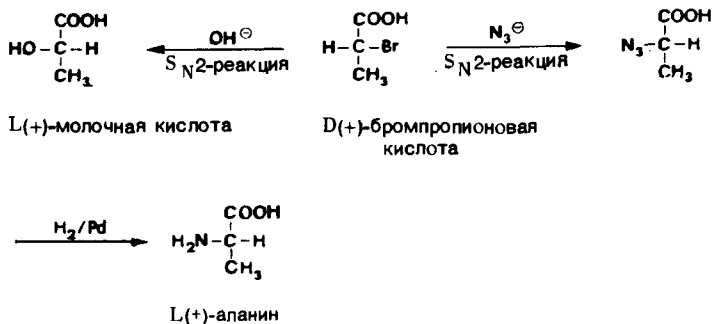
В 1933 г. Кун и Фрейденберг наблюдали однотипный сдвиг молекулярного вращения для производных аланина и молочной кислоты. Как видно из данных табл. 1-5, у производных L(+)-молочной кислоты и (+)-аланина происходит аналогичный переход $[M]_D$ из положительной области в отри-

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

Заместители		M_D		
		производное (+)-аланина	производное L-молочной кислоты	производное D-молочной кислоты
R^1	R^2	$\begin{array}{c} \text{COR}^2 \\ \\ \text{R}^1\text{-O}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{COR}^2 \\ \\ \text{R}^1\text{-NH}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{COR}^2 \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OR}^1 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
$\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}-$	$-\text{NH}_2$	+70	+120	-120
$\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}-$	$-\text{OC}_2\text{H}_5$	+12	+49	-49
$\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}-$	$-\text{OCH}_3$	0	+35	-35
$\text{CH}_3\text{CO}-$	$-\text{OC}_2\text{H}_5$	-74	-76	+76

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

После установления абсолютной конфигурации молочной кислоты на основании расчета дисперсии вращения (Кун, 1935 г.) и винной кислоты с помощью рентгеноструктурного анализа (Бийвё, 1951 г.) нужно было установить однозначные стерические связи природных аминокислот с этими гидроксикислотами. Это удалось Ингольду и др. в 1951 г.; они осуществили перевод D(+)-бромпропионовой кислоты в L(+)-молочную кислоту и в L(+)-аланин. Эти превращения протекают по S_N2 -механизму, и, как показано кинетическими исследованиями, обуславливают обращение конфигураций у асимметрического атома углерода. Таким образом была однозначно установлена абсолютная конфигурация аминокислот.



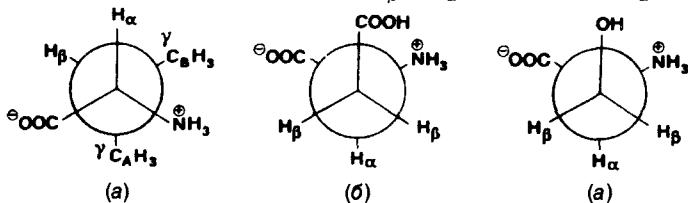
В настоящее время определение абсолютной конфигурации аминокислот проводят как с помощью рентгеноструктурного анализа и ферментативных методов, так и с помощью исследования спектров КД и ДОВ [28]. Оптически активный $h \rightarrow \pi^*$ -переход карбоксильной группы ($\lambda = 210$ нм) положителен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

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

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

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

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



С помощью ^{13}C -ЯМР-спектроскопии можно проводить конформационный анализ как в твердом состоянии, так и в растворе. Например, N-трет-бутилоксикарбоилфенилаланин (Boc-Phe) в кристаллическом состоянии существует в виде ротамера с E-конфигурацией уретановой связи. При растворении в CD_2Cl_2 E-конформер переходит в течение нескольких часов в Z-конформер, стабильный в растворе [39].

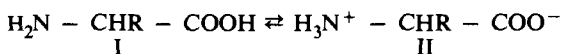
Конформационный анализ аминокислот дает важные сведения о конформационном поведении белков и пептидов.

1.4. Физико-химические свойства аминокислот

В твердом состоянии и в сильнополярных растворителях аминокислоты существуют в виде диполярных цвиттер-ионов. Это объясняет высокую температуру разложения аминокислот и их трудную растворимость в неполярных растворителях. Доказательства ионного дипольного строения аминокислот получены методами ЯМР-, ИК- и КД-спектроскопии: в спектрах отсутствуют полосы поглощения NH_2 - и COOH -групп. Сведения о кристаллической структуре обобщены в обзоре [40].

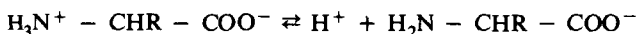
1.4.1. Растворимость

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

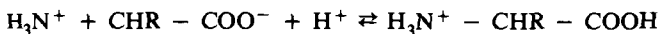


1.4.2. Кислотно-основные свойства

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



или как основания (акцепторы протонов)



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

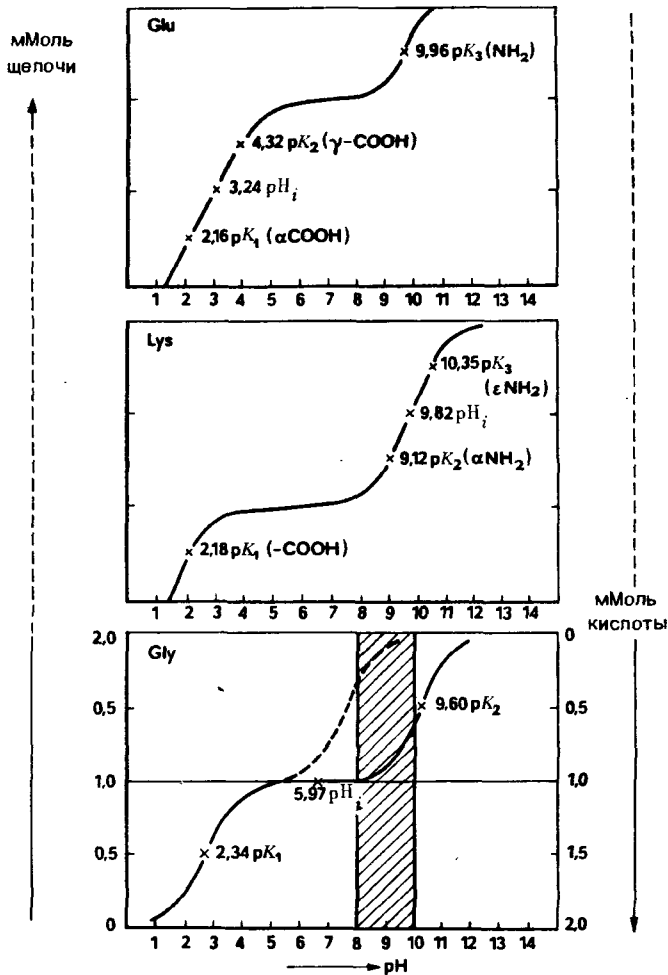


Рис. 1-6. Кривые титрования глицина, лизина и глутаминовой кислоты.

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



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

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

При равных концентрациях акцептора протонов и донора протонов измеренное значение pH численно равно значению pK соответствующей группы.

В кривых титрования глицина, например, при $pK = 2,34$ в эквимольных концентрациях сосуществуют $H_3N^+-CH_2-COOH$ и $H_3N^+-CH_2-COO^-$, а при $pK = 9,60$ наступает концентрационное равновесие между $H_3N^+-CH_2-COO^-$ и $H_2N-CH_2-COO^-$. Точки перегиба на кривой титрования дают значения pK_1 и pK_2 , т. е. pK карбоксн- и аминогрупп.

При pH 5,97 для глицина кривая титрования имеет точку перегиба, которая называется *изоэлектрической точкой* (pH_i). pH, соответствующее этой точке у моноаминокарбоновой кислоты, есть среднее арифметическое значений pK_1 и pK_2 и в сущности определяет условия (кислотность раствора), при которых почти все молекулы аминокислоты существуют в виде цвиттер-ионов. При формальном титровании глицина значение pK_2 сдвигается из основной в нейтральную область pH (заштрихованная область). Это объясняется тем, что аминокислоты сначала переводятся в гидроксиметиламинокислоты, которые затем титруются с фенолфталесином в качестве индикатора как истинные слабые кислоты.

У аминокислот, имеющих диссоциирующие группы в боковой цепи (Glu, Asp, Cys, Tyr, Lys, Arg, His), на кривых титрования появляется третий перегиб (pK_3). На рис. 1-6 приведены кривые титрования лизина и глутаминовой кислоты, значения pK — в табл. 1-6.

В отличие от нейтральных и кислых аминокислот значение pH_i основных аминокислот вычисляют как среднее арифметическое значений pK_2 и pK_3 , например для лизина $pH_i = 9,82 = (9,12 + 10,53):2$. Большое биологическое значение имеет поведение гистидина в качестве буфера. Это единственная протеиногенная аминокислота, которая действует в физиологической области pH 6 — 8.

Значения pK характеризуют кислотность аминокислот. Благодаря —I-эффекту аммонийной группы глицин ($pK_1 = 2,34$) обладает более высокой кислотностью, чем уксусная кислота ($pK = 4,76$). Этот эффект уменьшается с увеличением расстояния между амин- и карбоксильной группами: для β-аланина $pK_1 = 3,6$, для 6-аминогексановой кислоты $pK_1 = 4,43$.

У аминокдикарбоновых кислот α-карбоксильная группа проявляет более сильные кислотные свойства, и преимущественно она принимает участие в образовании цвиттер-ионной структуры.

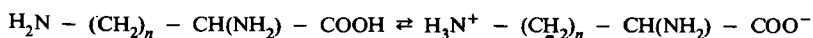
Основной характер аминокислот ослабляется из-за COO-группы, так что глицин с $pK_2 = 9,72$ менее основен, чем этиламин с $pK = 10,75$. Еще более низкая основность у эфиров аминокислот (например, для этилового эфира глицина $pK = 7,7$).

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

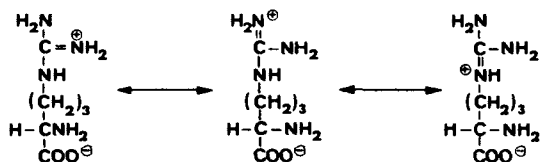
Аминокислота	Температура разложения, °C	Растворимость в воде, г/100 мл		pK ₁	pK ₂	pK ₃	pH _i
		25°C	100°C				
Gly	292	24,99	67,17	2,34	9,60		5,97
Ala	297	16,65	37,3	2,34	9,69		6,01
Val	315	8,85	18,8	2,32	9,62		5,96
Leu	337	2,43	5,64	2,36	9,60		5,98
Ile	284	4,12	8,26	2,36	9,68		6,02
Ser	228	5,0	32,2	2,21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

^a Для гидрохлорида.

У диаминокарбоновых кислот ω-аминогруппа проявляет более выраженные основные свойства, чем α-аминогруппа. Здесь цвиттер-ионная структура осуществляется преимущественно с участием ω-аминогруппы



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



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

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

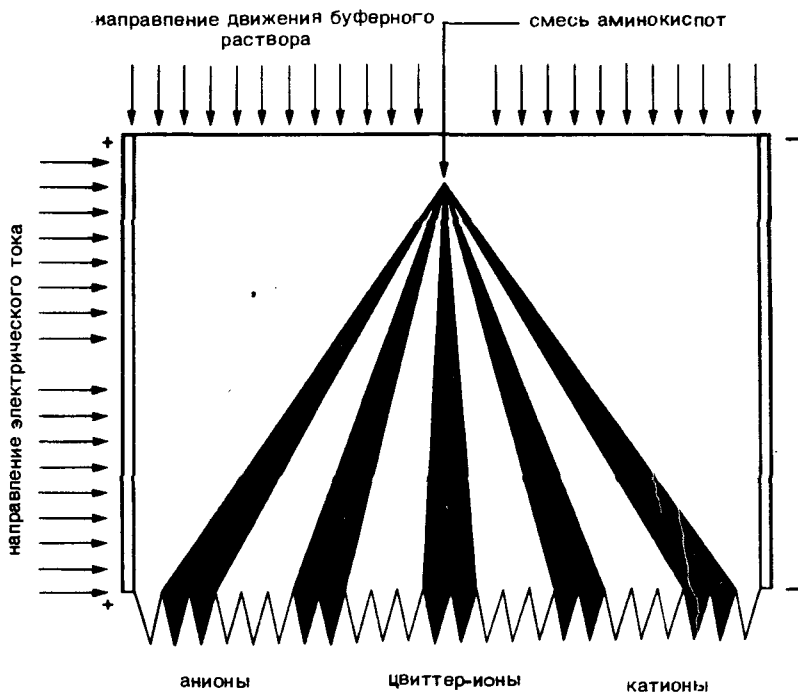


Рис. 1-7. Разделение аминокислот посредством непрерывного проточного электрофореза.

1.4.3. Спектры поглощения аминокислот

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

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

ИК-спектры [43, 44]. В спектрах аминокислот отсутствуют полосы нормальных валентных колебаний в области $3300 - 3500 \text{ см}^{-1}$, наблюдается поглощение при 3070 см^{-1} , которое можно отнести к H_3N^+ -группе. Эта полоса наблюдается также в спектрах гидрохлоридов аминокислот. Кроме того, две характеристические полосы H_3N^+ -группы находятся в области $1500 - 1600 \text{ см}^{-1}$.

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

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

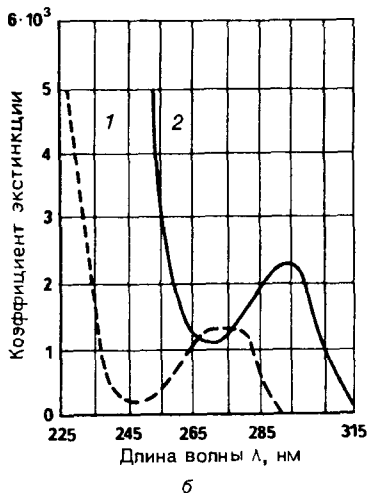
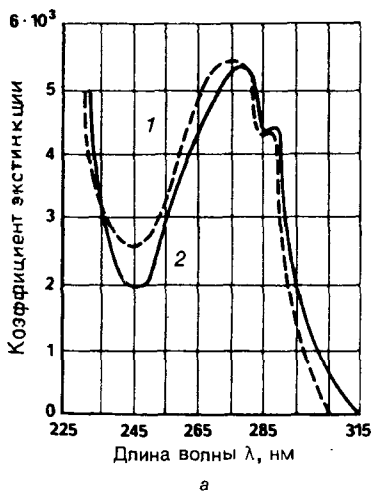


Рис. 1-8. УФ-Спектры триптофана (а) и тирозина (б) в 0,1 н. HCl (1) и 0,1 н. NaOH (2).

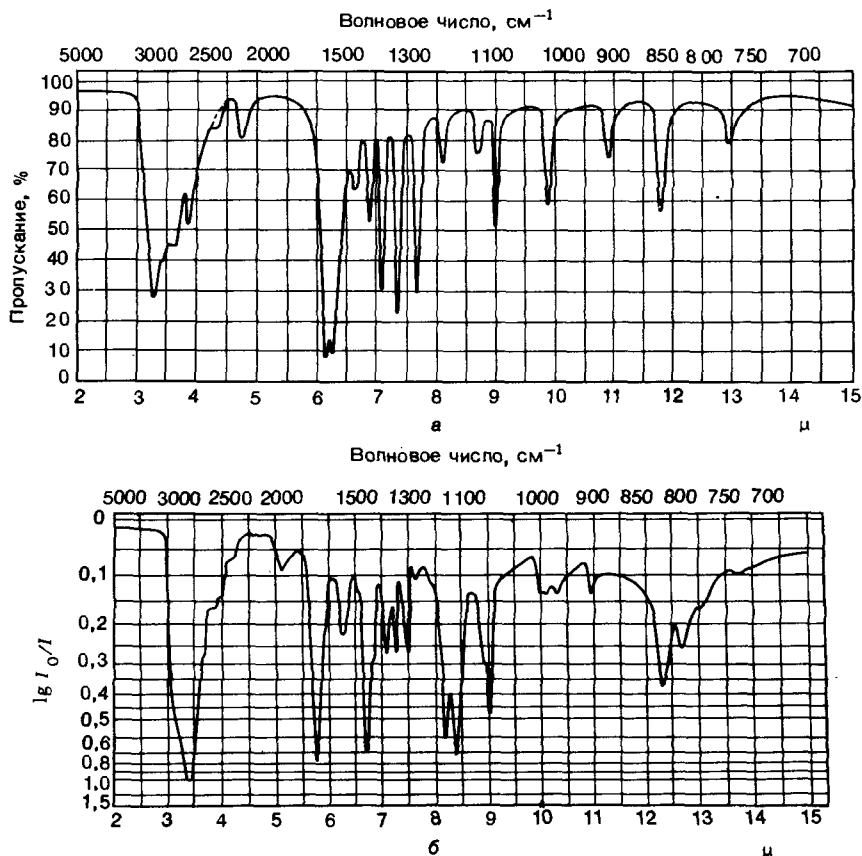


Рис. 1-9. ИК-спектры L-аланина (а) и L-аланингидрохлорида (б).

также константы протон-протонного взаимодействия зависят от заряженного состояния молекулы. В графическом изображении зависимость химического сдвига от рН имеет вид типичной кривой титрования. В качестве растворителей для ЯМР-спектроскопии аминокислот, пептидов и белков служит обычно вода или D₂O, а в качестве внутреннего стандарта применяют тетраметилсилан (ТМС), гексаметилдисулоксан (ГМДС) и 2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфонат (ДСС).

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

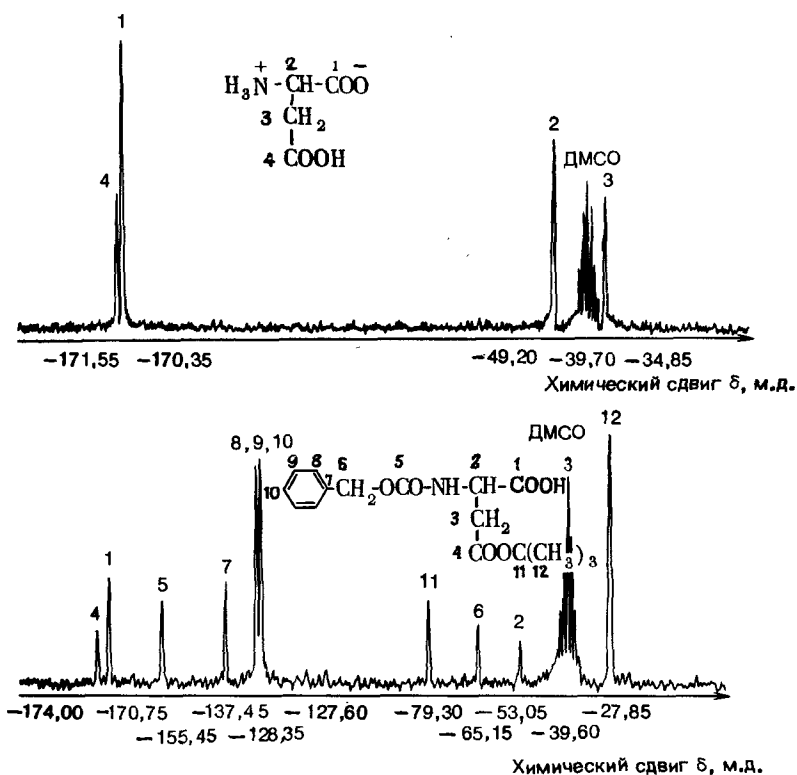


Рис. 1-10. ^{13}C -ЯМР-Спектры аспарагиновой кислоты и β -трет-бутилового эфира бензилоксикарбониласпарагиновой кислоты.

— 65 м. д., для β -углеродного атома между — 17 и — 70 м. д. и для γ - и δ -углеродных атомов между — 17 и — 50 м. д. Сигналы атомов углерода ароматических и гетероароматических колец находятся между — 110 и — 140 м. д. На рис. 1-10 приведены ^{13}C -ЯМР-спектры аспарагиновой кислоты и β -трет-бутилового эфира бензилоксикарбонил-L-аспарагиновой кислоты.

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

связанных СН-протонов, а также у протона пептидной группы CO-NH между 6,7 и 9,0 м.д. Резонансная область C₂-протона имидазола гистидина лежит между 8,0 и 9,2 м.д., а NH-индольного протона триптофана между 9,0 и 11,0 м.д.

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

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

1.5.1. *Выделение из белковых гидролизатов*

При получении аминокислот белки прежде всего расщепляют с помощью основного, кислотного или ферментативного гидролиза [54]. В классическом методе кислотного гидролиза [55, 56] используют 6 н. HCl ($t_{\text{кип}}$ 110 °C) или 8 н. H₂SO₄. Время реакции от 12 до 72 ч в зависимости от строения белка. Очень устойчивы к гидролизу пептидные связи, образованные лейцином, изолейцином и валином. При этом триптофан разрушается полностью, серин и треонин до 10%.

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

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

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

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

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

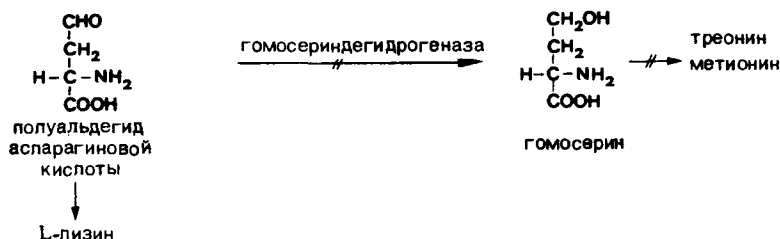
Глутаминовая кислота, например, кристаллизуется прямо из концентрированного гидролизата, насыщенного хлористым водородом, цистин и тирозин отделяют благодаря их плохой растворимости в воде. Селективное отделение ароматических аминокислот удается выполнить с помощью адсорбции на активированном угле. Полученную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

1.5.2. Микробиологические методы [53, 61]

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

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

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



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

Таблица 1-7. Аминокислоты, полученные ферментацией

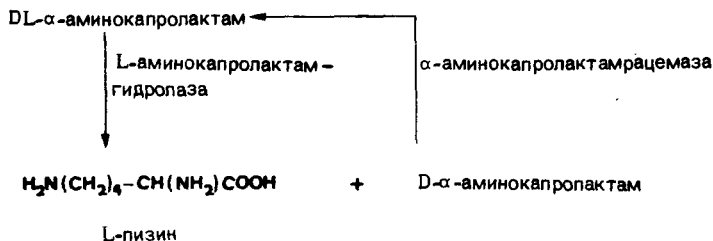
Микроорганизмы	Источники С, N	Полученные аминокислоты
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Глюкоза или гидролизат крахмала, патока тростникового и свекловичного сахара, аммиак, мочевины	Glu
Мутанты <i>Brevibacterium flavum</i>	Патока тростникового и свекловичного сахара, гидролизат крахмала, n-алканы, уксусная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

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

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

1.5.3. Ферментативные методы

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



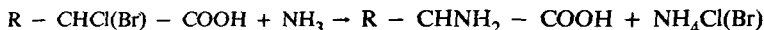
тама рацемазой и таким образом в конце концов полностью переводится в L-лизин.

1.5.4. Методы химического синтеза

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

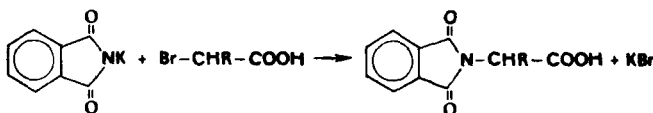
1.5.4.1. Аминолиз галогенкарбоновых кислот

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



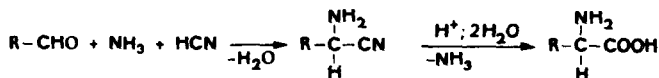
Впервые таким путем в 1858 г. был получен глицин из монохлоруксусной кислоты. Выходы составляют 60 — 70%, если применять 10-кратный избыток аммиака и работать в присутствии карбоната аммония. При этом аминогруппа образующейся кислоты дает карбамат аммония $R = \text{CH}(\text{NH} - \text{COONH}_4)$, и это предохраняет ее от дальнейшего превращения во вторичные и третичные аминокислоты.

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



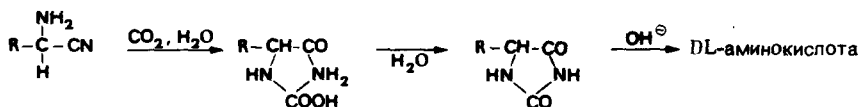
1.5.4.2. Синтез Штрекера

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

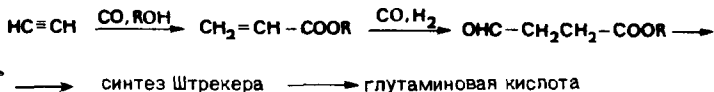


В качестве побочных продуктов могут получаться иминодинитрилы $\text{NH}(\text{CHR} - \text{CN})_2$, тринитрилы и карбоновые кислоты; общий выход при этом синтезе ~ 75%.

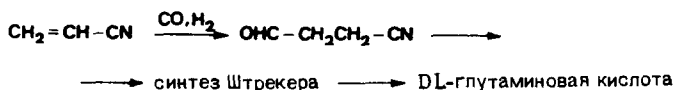
Бухерер внес изменения в синтез Штрекера: альдегид реагирует со смесью цианида натрия и карбоната аммония (или мочевины) и дает легко изолируемый гидантоин, который затем расщепляется щелочным гидролизом:



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

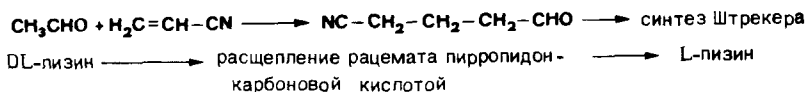


По методу Аджиномото получают DL-глютаминовую кислоту, исходя из акрилонитрила:

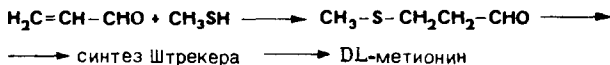


Расщепление рацемата по этому методу происходит самопроизвольной кристаллизацией при затравливании оптически чистыми кристаллами, причем выпавшая в осадок D-глютаминовая кислота после рацемизации снова вводится в процесс. В настоящее время в мире ежегодно производится ~250 000 т глютамата натрия, причем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

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



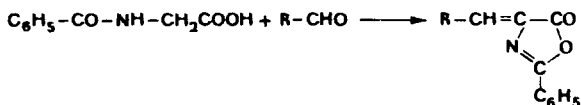
Промышленное производство DL-метионина (в 1977 г. произведено 100 000 т), который применяется главным образом как добавка в корм скоту, ведется по методу Штрекера из β-метилмеркаптопропионового альдегида, который получают из акролеина и метилмеркаптана. В этом случае не требуется разделения энантиомеров,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



1.5.4.3. Азлактонный синтез по Эрлейнмейеру — Плехлю

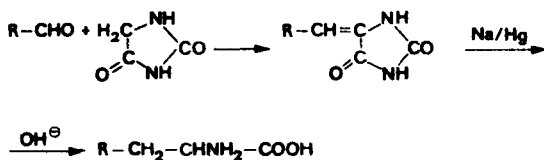
Синтез основан на том, что ароматический или α, β-ненасыщенный алифатический альдегид обрабатывается бензоилглицином (гиппуровая кислота) или ацетилглицином (ацетуровая кислота) в присутствии уксусного ангидрида и ацетата натрия. При этом образуется замещенный азлактон, кото-

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



1.5.4.4. Гидантоиновый синтез

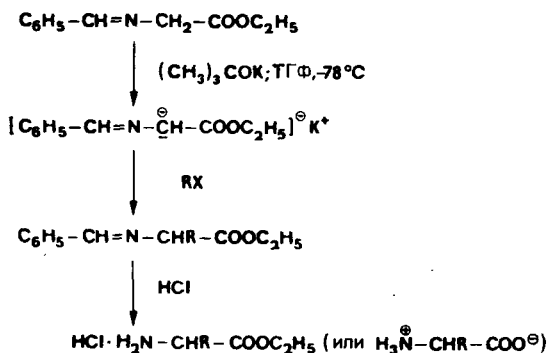
Альдегиды реагируют с гидантоином (метиленовый компонент) и смесью ацетангидрид — ацетат натрия (конденсирующее средство), давая продукты конденсации, которые после восстановления амальгамой натрия или смесью иодоводорода и фосфора последующим щелочным гидролизом переводятся в аминокислоты.



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

1.5.4.5. Алкилирование шиффовых оснований [63]

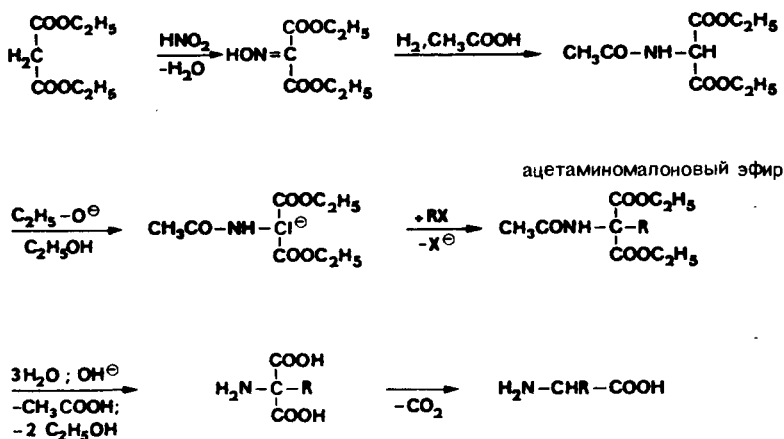
Легкодоступные бензилиденовые производные этилового эфира глицина можно превращать в α -аминокарбанионы действием сильных оснований, таких, как литийдиизопропиламид (ЛДА) или *трет*-бутилат калия, и затем алкилировать:



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

1.5.4.6. Синтезы с малоновым эфиром

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



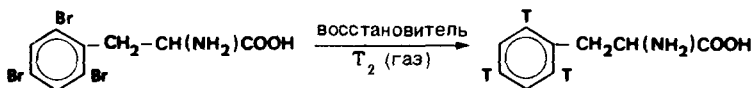
В качестве ацильного остатка кроме ацетильной и формильной групп применяется фталимидогруппа (Сёренсен, 1903 г.), алкилирующими реагентами служат алкилгалогениды и основания Манниха.

1.5.4.7. Синтез меченых аминокислот [64]

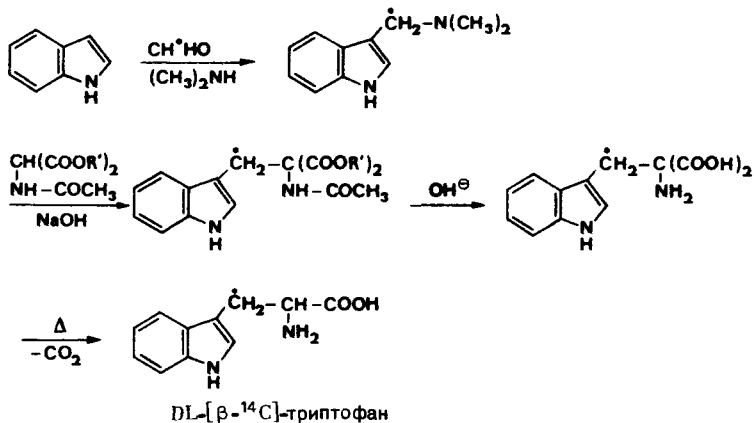
Применение меченых аминокислот значительно расширило наши знания о биохимических функциях аминокислот, пептидов и белков. В зависимости от конкретной задачи синтезируются аминокислоты с одной или несколькими метками, меченные азотом-15, тритием, углеродом-14 и серой-35. Введение тритиевых меток осуществляют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

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

ных или галогенированных полупродуктов в присутствии газообразного трития. При этом, например, из 2,4,6-трибром-1-фенилаланина получается 1-2,4,6- ^3H -фенилаланин с высокой удельной активностью (60 — 80 Ки/ммоль):



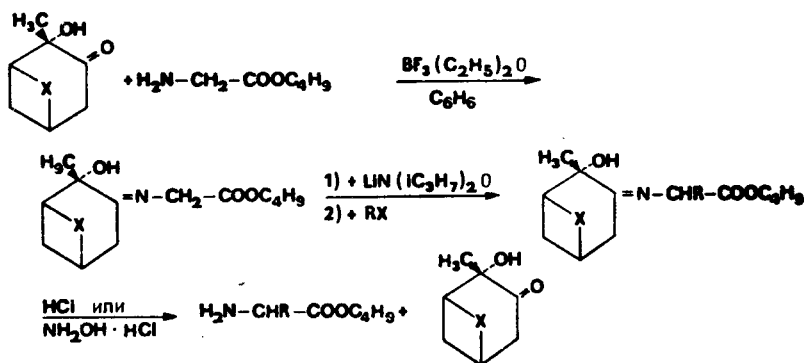
Аминокислоты могут быть получены микробиологическими методами, если в питательном растворе содержится $^{14}\text{CO}_2$ или другие источники ^{14}C [65]. После разрушения клеточной структуры фракции белка изолируют и полученную при гидролизе смесь аминокислот разделяют хроматографически. О биосинтезе ^{35}S -L-метионина с очень высокой удельной активностью сообщили Бретчер и Смит [66]. Для введения ^{14}C -метки можно использовать прямой химический синтез. Большое применение находит малоновый эфир (синтезы с циануксусным эфиром, содержащим 2- ^{14}C в остатке уксусной кислоты, для C_2 -метки и с ^{14}C -синильной кислотой для C_1 -метки). Если исходят из $^{14}\text{CO}_2$, то сначала из алкилгалогенида, магния и CO_2 получают карбоновую кислоту $\text{R}-^{14}\text{COOH}$ (реакция Гриньяра), затем с помощью галогенирования и аминолиза ее переводят в аминокислоту. Синтез Штрекера, с K^{14}CN приводит к метке карбоксильного углерода, с $^{15}\text{NH}_3$ — к ^{15}N -аминокислотам (имеющим важное значение в исследовательской практике). Классический синтез триптофана с малоновым эфиром — пример введения метки в положение C_3 (Гейдельберг, 1949 г.):



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

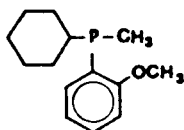
1.5.4.8. Асимметрические синтезы [69, 70]

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



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

Практический интерес получил асимметрический синтез L-ДОФА, при котором удалось осуществить стереоспецифическое гидрирование дигидроксикоричной кислоты с помощью катализатора Вилькинсона RhL_3Cl [77].



Структура оптически активного лиганда L

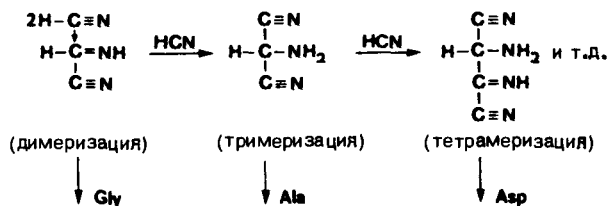
1.5.4.9. *Пребиотические синтезы [78 – 85]*

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

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

Аминокислотные анализы водных экстрактов образцов лунного грунта, проведенные в рамках американской программы «Аполлон», показали присутствие глицина и аланина. Еще четыре аминокислоты были обнаружены с помощью газовой хроматографии в кислотном гидролизате экстракта. Это Glu, Ser, Asp, Tug. Спектроскопические данные односторонне показывают присутствие NH_3 , HCHO и HCN в космическом пространстве. В лунных пробах также обнаружены исходные продукты для абиогенного образования «внеземных» аминокислот: CH_4 , N_2 , CO , CO_2 , HCN (20 — 70 нг/г). Возможно, правда, что часть предшественников аминокислот происходит от газов земных ракет.

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



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

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

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

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

Таблица 1-8. Аминокислоты, полученные абиогенно

Исходные компоненты	Источник энергии	Аминокислоты
$\text{CH}_4, \text{NH}_3, \text{H}_2, \text{H}_2\text{O}$	Электрический разряд	Gly, Ala, β -Ala, Abu
$\text{CH}_4, \text{NH}_3, \text{H}_2, \text{H}_2\text{S}$	То же	Cys, цистин, Met и др.
$\text{CH}_4, \text{CO}_2, \text{N}_2$	" "	Gly, Ala, Nva, Abu, Ser, Asp и др.
$\text{HCNO}, \text{NO}_3^-, \text{H}_2\text{O}, \text{FeCl}_3$	УФ-облучение	Ser, Asp, Asn, Gly, Ala, Thr, Val, Orn, Arg, Pro, Glu, Lys, Leu, Ile, His
Глюкоза, NH_3 , $\text{V}_2\text{O}_5(\text{H}_2\text{O}_2)$	" "	Gly, Ala, Asp, Val, Lys
$\text{CH}_4, \text{C}_2\text{H}_6, \text{NH}_3, \text{H}_2\text{S}, \text{HCN}$	УФ-облучение и электрический разряд	Phe, Tyr и др.
$\text{HCHO}, \text{KNO}_3, \text{H}_2\text{O}$	Солнечный свет (25—300 ч)	Asp, Lys, Ala, Gly, Orn, Arg, Glu, His, Ser, Thr
Винная кислота, $\text{KNO}_3, \text{H}_2\text{O}$	Солнечный свет (500 ч)	Asp, Ala
$\text{CH}_3\text{COONH}_4, \text{H}_2\text{O}$	β -Излучение	Asp, Glu
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	γ -Излучение	Gly, Ala
$(\text{NH}_3\text{CH}_2)_2\text{CO}_3$	α, γ -Излучение	Gly, Ala, Lys
Пропионовая кислота, $\text{NH}_3, \text{H}_2\text{O}$	Электрофорез в тлеющем разряде, 3 ч	Ala, β -Ala, Gly
$\text{CH}_4, \text{NH}_3, \text{H}_2\text{O} (\text{SiO}_2)$	Тепловая энергия (950°C)	Gly, Ala, Ser, Asp, Thr, Glu, Val, Leu, Pro, Ile, alle Tyr, Abu
$\text{HCN}, \text{NH}_3, \text{H}_2\text{O}$, глицин, оксид алюминия	90°C, 18 ч	Arg, Ala, Gly, Ser, Asp, Glu, Leu, Ile, Abu, Thr
$((\text{CH}_3)_3\text{NH})_2\text{CO}_3$	α, γ -Излучение	Gly, Ala, Lys, Val, Abu

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

1.5.4.10. Биосинтез аминокислот [93]

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

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

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

Таблица 1-9. Исходные вещества для биосинтеза незаменимых аминокислот

Аминокислота	Исходные вещества
Лейцин, валин	Пировиноградная кислота
Изолейцин	α -Кетомасляная кислота
Лизин	Кетоглутаровая кислота или полуальдегид аспарагиновой кислоты
Метионин, треонин	Гомосерин
Фенилаланин (тирозин)	Фосфоенолпировиноградная кислота
Триптофан	Эритроза-4-фосфат
Гистидин	5-Фосфорибозил-1-пирофосфат, глутамин, АТР

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

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

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

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

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

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

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

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

1.6.1. Методы кристаллизации [105]

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

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

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

1.6.2. Химические методы

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

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

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

1.6.3. Ферментативные методы

Среди ферментативных методов получения оптически активных аминокислот различают три направления:

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

3) ферментативный гидролиз α -амино- или α -карбоксизамещенных производных аминокислот.

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

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

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

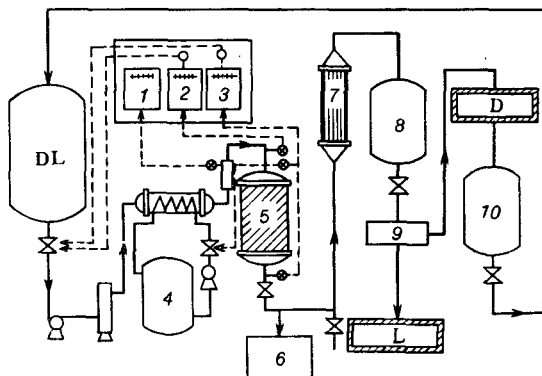


Рис. 1-12. Непрерывное производство кристаллических L-аминокислот на иммобилизованной аминокислотаце. DL — ацетил-DL-аминокислота, L — L-аминокислота, D — ацетил-D-аминокислота, 1 — 3 — приборы для измерения скорости потока, pH и температуры, 4 — камера с горячей водой, 5 — колонка с иммобилизованной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

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

1.7. *Анализ аминокислот* [109, 110]

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

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

1.7.1. *Хроматографические методы* [109 — 117]

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

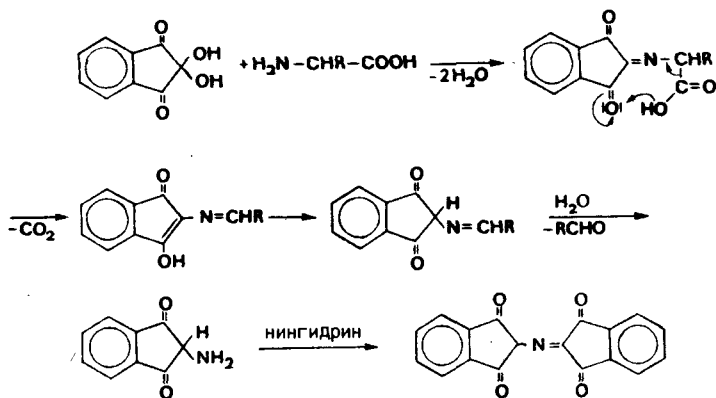
В соответствии с агрегатным состоянием подвижной фазы различают жидкостную хроматографию (ЖХ) и газовую хроматографию (ГХ). Кроме того, по совокупности возможных комбинаций разделения различают следующие виды хроматографии: жидкость — твердая фаза (ЖТХ), жидкость — жидкость (ЖЖХ), газ — твердое тело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

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

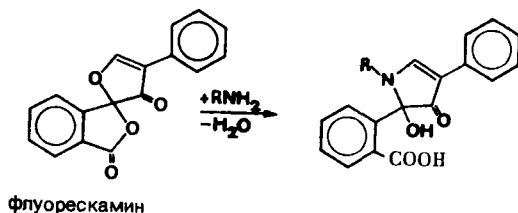
пользовании стационарных фаз с частицами малых диаметров с применением давления до 700 бар. В газовой хроматографии высокий эффект разделения достигается применением капиллярной техники, в особенности введением стеклянных капилляров. Современные аминокислотные анализаторы автоматизированы таким образом,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

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

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



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



Из других показательных реакций высокую чувствительность имеют реакции с 2,4,6-тринитробензолсульфокислотой, 1,2-нафтохинон-4-сульфокислотой (аминокислотный реагент Фолина), 4,4'-тетраметилдиднаминодифенилметаном (ТДМ, голубое окрашивание) [123], а также образование интенсивно флуоресцирующих производных с 2-фталевым альдегидом в присутствии восстановителей [124 — 126], пиридоксалем и $Zn(II)$ [127, 128], дансилхлоридом (5-диметиламинонафталинсульфонилхлоридом) [129, 130] и $[^3H]$ -бансилхлоридом (5-ди-*n*-бутиламинонафталинсульфонилхлоридом) [131, 132] и мансилхлоридом (N-метил-2-анилин-6-нафталинсульфонилхлоридом) [132]. Интенсивность флуоресценции можно значительно усилить применением смешанных систем растворителей, например $DMCO - H_2O$ [133].

1.7.1.1. Бумажная хроматография

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

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

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

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

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

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

Таблица 1-10. Значения R_f и R_{Leu} протеиногенных аминокислот [138]

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

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

1.7.1.2. Тонкослойная хроматография [139 — 143]

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

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

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

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

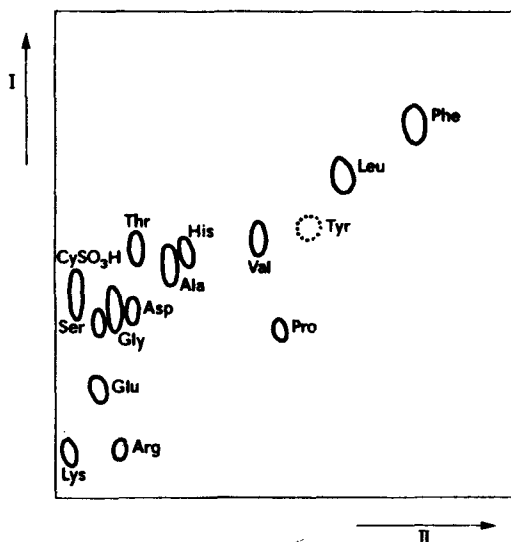


Рис. 1-13. Разделение гидролизата В-цепи инсулина с помощью тонкослойной хроматографии [144]. Состав элюента и время: направление I — хлороформ/метанол/17%-ный раствор NH_4OH (2:1:1), 75 мин; направление II — фенол/вода (75:25), 180 мин.

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

1.7.1.3. Ионообменная хроматография [146, 147]

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

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

В качестве ионообменников применялись смолы дауэкс и амберлит. Разделение аминокислот проходило в колонке $9,9 \times 150$ см с помощью непрерывно прокачивае-

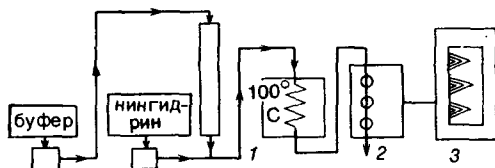


Рис. 1-14. Автоматический аминокислотный анализатор по Шпакману, Муру и Штейну.

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

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

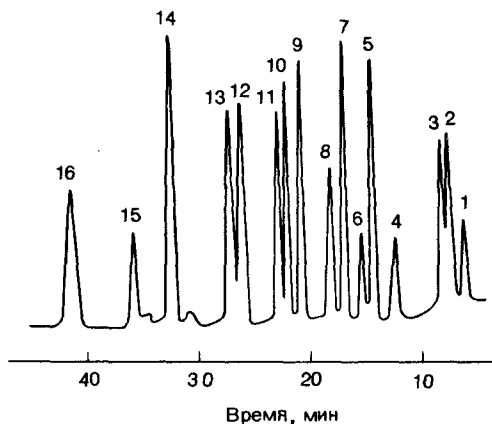


Рис. 1-15. Жидкостная хроматограмма высокого давления гидролизатов аминокислот. Разделение на колонке Хевлетта — Паккарда HP 1010 В (3 × 250 мм), наполненной сильнокислой полистиролдивинилбензольной ионообменной смолой (размер зерен 8 — 2 мкм): концентрация аминокислоты: 500 нмоль/л, реагент для детектирования — флуорескамин; детектор флуориметрический типа Хевлетта — Паккарда (тип 1033 А).

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

1.7.1.4. Газовая хроматография [151 — 156]

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

Таблица 1-11. Производные аминокислот для газохроматографического разделения

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

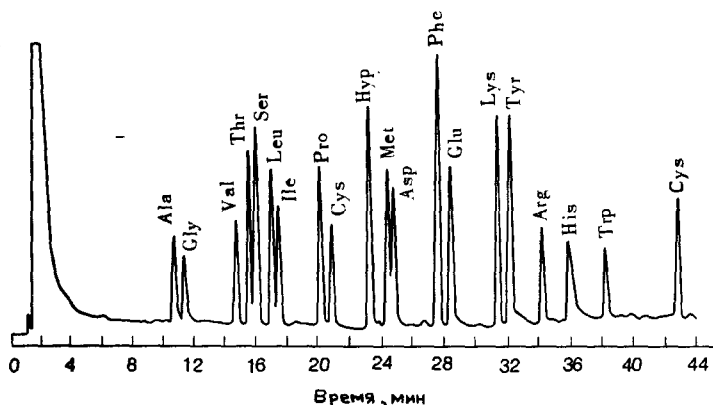


Рис. 1-16. ГХ-анализ N-ГФБ-пропиловых эфиров 20 протеиногенных аминокислот.

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

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

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

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

1.7.1.5. Хроматографическое разделение энантиомеров

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

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

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

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

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

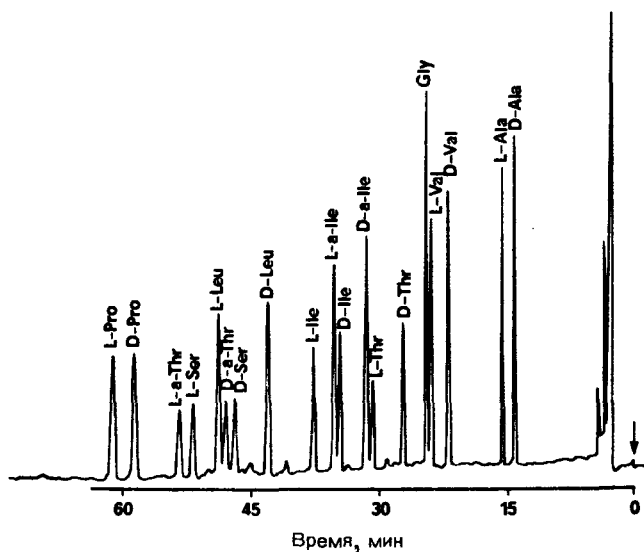


Рис. 1-17. Разделение энантиомеров изопропиловых эфиров пентафторпропиониламинокислот в стеклянной капиллярной колонке (20 м) с N-ТФА-L-Phe-L-Asp-бисциклогексильным эфиром в качестве неподвижной фазы. Температура 130°C ; температурная программа: $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до 165°C .

1) получение производных энантиомеров с оптически активными реагентами с последующим разделением на оптически неактивной фазе;

2) непосредственное разделение энантиомеров на хиральной неподвижной фазе [176, 177].

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

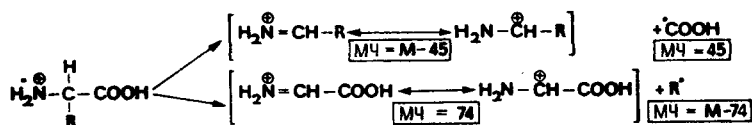
Использование второго принципа позволило разделить эфиры N-трифторацетиламиноаислот в стеклянных капиллярах (диаметр 15 мм, длина 150 м), которые содержат в качестве оптически активной неподвижной фазы эфир N-трифторацетил-L, L-дипептида. Циклогексиловый эфир N-ТФА-Val-Val [180] был применен для энантиомерного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

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

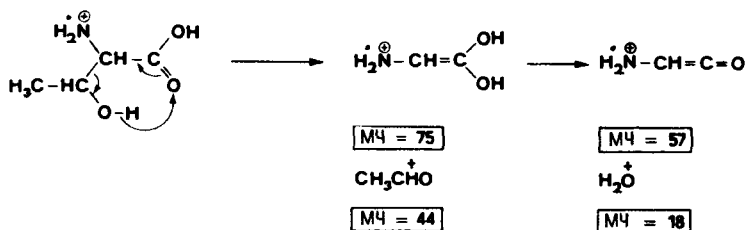
1.7.2. Масс-спектрометрический анализ аминокислот [187 — 189]

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

Характерное для α -аминокислот разложение на стабилизированные мезомерией иминные ноны и относительно устойчивый радикал $\cdot\text{COOH}$ и радикал боковой цепи $\text{R}\cdot$ идет по следующей схеме:



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



В связи с трудной летучестью аминокислот проба вносится в ионный источник масс-спектрометра при $10^{-4} - 10^{-5}$ Па и $100 - 150^\circ\text{C}$. Благоприятно введение летучих производных аминокислот, которые применяются и для газовой хроматографии.

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

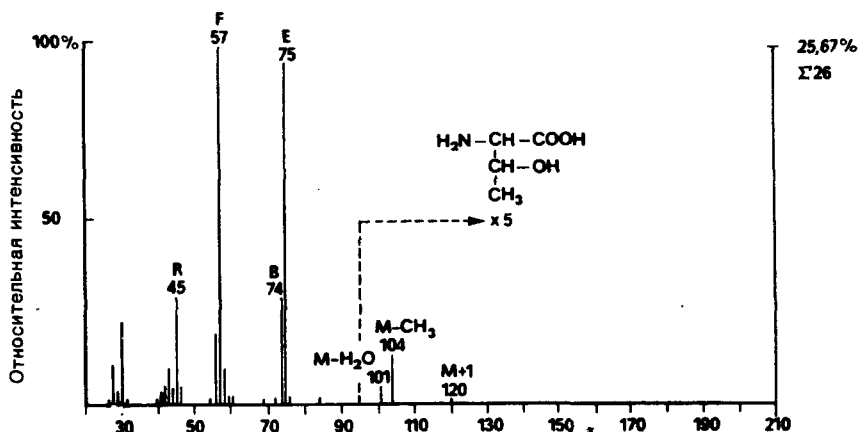


Рис. 1-18. Масс-спектр треонина (70 эВ).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

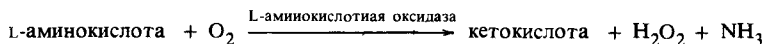
где W — количество добавленного неактивного производного, C_r — молярная концентрация изотопа в производном, полученном из реакции между очищенной аминокислотой и реагентом.

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

1.7.4. Ферментативные методы

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

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



Для определения можно использовать образующиеся H_2O_2 или NH_3 . Аммиак можно определять титрованием, пероксид водорода — либо амперометрически, либо по вторичной реакции с ионами I^- . Изменение концентрации I^- можно регистрировать иодселективным электродом.

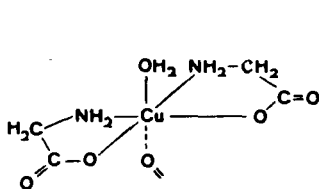
1.8. Специфические реакции аминокислот

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

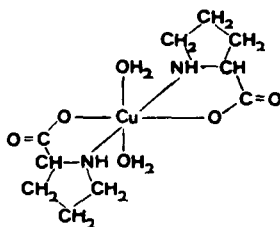
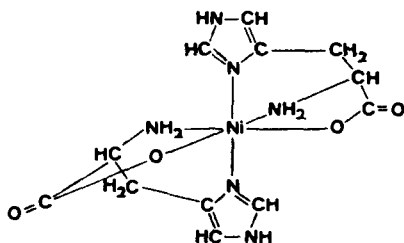
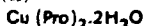
1.8.1. Образование комплексов с металлами [201]

Аминокислоты образуют с ионами тяжелых металлов хелатные комплексы, из которых наиболее известны темно-синие, хорошо кристаллизующиеся соединения с Cu(II) . Образование хелата типа CuA_2 используется при комплексометрическом титровании ряда аминокислот. Титрование производят раствором сульфата меди (II) при pH 9 в присутствии мурексиды как индикатора [202].

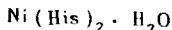
Анализ кристаллических структур комплексов белков с металлами показал, что аминокислотные комплексы металлов имеют октаэдрическое строение, причем два остатка аминокислоты связаны с центральным атомом металла амино- и карбоксильными группами, а свободные координационные места заняты водой. Особой устойчивостью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



гидрат бис-глицината меди (II)

дигидрат бис-DL-пропината
меди(II)

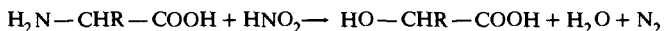
гидрат бис-L-гистидината никеля(II)



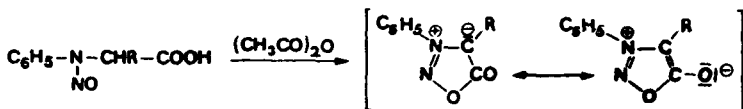
Бек и др. [203] провели систематические исследования комплексов аминокислот и простых пептидов с платиной (II). При этом оказалось, что построенные из аминокислотных комплексов платины(II) олигопептидные комплексы типа $\text{cis-PtAS}_2\text{X}_2$ (AS_2 — эфир дипептида, X — анионный лиганд, например Cl^-) обладают противоопухолевым действием.

1.8.2. Реакции с азотистой кислотой

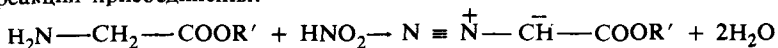
Свободные аминокислоты как первичные амины реагируют с HNO_2 с отщеплением азота. При этом аминогруппа замещается гидроксилем и изменения конфигурации у хирального атома углерода не происходит. Измерение количества выделяющегося азота служит для количественного определения аминокислот по ван Слайку (1910 г.):



Из N-алкил(или арил)-аминокислот и HNO_2 получаются *сидноны*. Сначала получается нитрозамин, при дегидратации которого с помощью ацетангидрида происходит замыкание кольца.

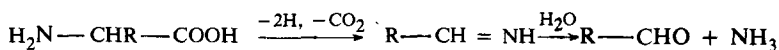


Фенилзамещенные сидноны и сидионимины представляют фармакологический интерес благодаря их противоопухолевому, бактериостатическому и жаропонижающему действию [204]. Эфиры аминокислот при реакции с HNO_2 переходят в относительно устойчивые диазоэфиры. Известным примером является диазоуксусный эфир, получающийся из эфира глицина, который находит применение в органическом синтезе для расширения циклов и реакций присоединения:



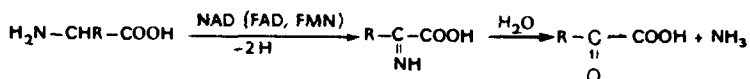
1.8.3. Окислительное дезаминирование

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



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

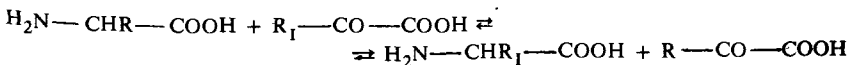
При биохимическом дезаминировании аминокислот аминогруппа на первой стадии реакции под влиянием D- и L-аминокислотных оксидаз дегидрируется в иминогруппу, затем полученная иминокислота гидролизруется в кетокислоту:



При этом в роли акцепторов водорода выступают никотинамидадениндинуклеотид, флавинадениндинуклеотид или флавиномононуклеотид. Образующийся аммиак токсичен для организмов и выделяется у человека и других млекопитающих в виде мочевины, у птиц и рептилий в виде мочевой кислоты.

1.8.4. Переаминирование

Аминогруппа аминокислоты может переноситься в обратимой реакции на кетокислоту, и при этом получают новую аминокислоту и новую кетокислоту:



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

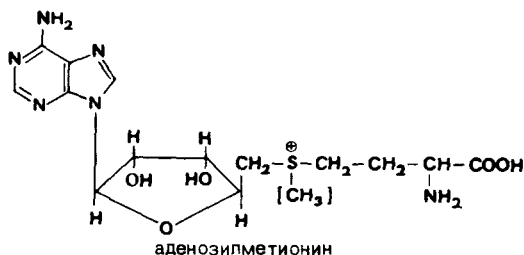
Путем переаминирования большинство аминокислот может превращаться одна в другую или заменяться соответствующей кетокислотой. Поэтому реакции переаминирования — одни из важнейших при биосинтезе заменимых аминокислот. Особенно легко переаминируются глутаминовая и аспарагиновая кислоты. Соответствующие им трансаминазы (глутаматоксалацетаттрансаминаза и глутаматпируваттрансаминаза) имеют очень высокую активность. Кетокислоты, получающиеся из этих аминокислот (α-кетоглутаровая и щавелевоуксусная кислоты), осуществляют связь углеводного и белкового обмена.

1.8.5. N-Алкилирование

По числу соединенных с азотом алкильных групп различают моно-, ди- и триалкиламино кислоты. Проще всего полное алкилирование аминокислоты (пералкилирование) проходит с диазоалканами или диалкилсульфатами, причем оно идет ступенчато через моно- и диалкилированные продукты. Моно- и диметиламино кислоты принимают участие в образовании пептидов микробного происхождения.

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

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

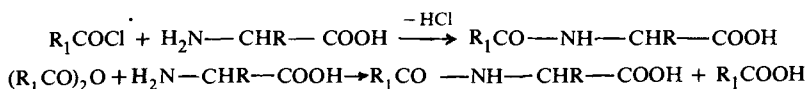


В качестве активного сульфониевого соединения S-аденозилметионин переносит связанную с ним метильную группу в виде CH_3^+ к свободной элек-

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

1.8.6. N-Ацилирование

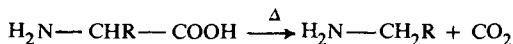
При взаимодействии ацилирующих реагентов (хлорангидриды, ангидриды и др.) с аминокислотами получаются по реакции Шоттена — Баумана N-ациламинокислоты:



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

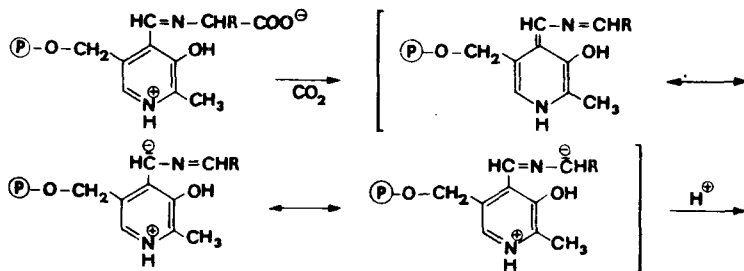
1.8.7. Декарбоксилирование

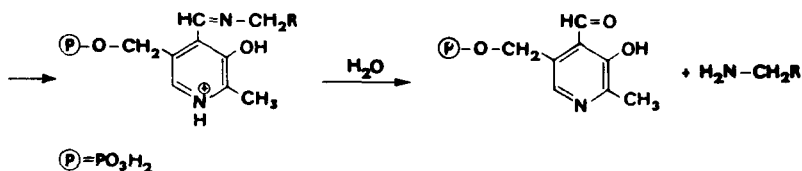
Из реакций карбоксильной группы аминокислот особое значение имеет декарбоксилирование. При постепенном нагревании до температур $> 200^\circ\text{C}$ аминокислоты начинают отщеплять CO_2 и переходить в первичные амины:



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

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





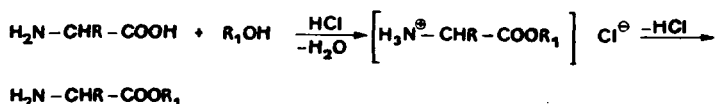
Продукты декарбоксилирования аминокислот, за исключением простых алифатических аминокислот, таких, как Gly, Ala, Val, Leu и Ile, обладают выраженным биологическим действием (биогенные амины). Некоторые из них имеют сильное фармакологическое действие, другие являются составными частями коферментов, гормонов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

Таблица 1-12. Важнейшие биоенные амины

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

1.8.8. Этерификация

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



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

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

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

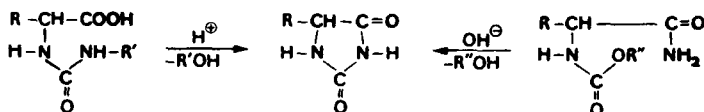
Эфиры аминокислот при действии восстановителей переходят в аминокислотные альдегиды или аминспирты. Особенно гладко проходит восстановление с литийалюминийгидридом; при этом с высокими выходами образуются оптически активные аминспирты.

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

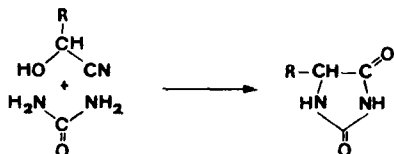
1.9. Циклические производные аминокислот

Из множества циклических производных аминокислот в этом разделе рассмотрены наиболее важные: пятичленные гидантоины, оксазолиноны и оксазолидиндионы и шестичленные диоксопиперазины.

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



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

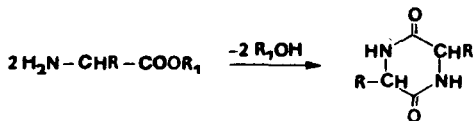


Креатинин, образующийся в мышечной ткани, представляет собой 2-имино-3-метилгидантоин. Стоит упомянуть и *тиогидантоин*, который образуется при определении аминокислотных последовательностей реакцией с изотиоцианатами (ср. разд. 3.6.1.2.2).

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

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

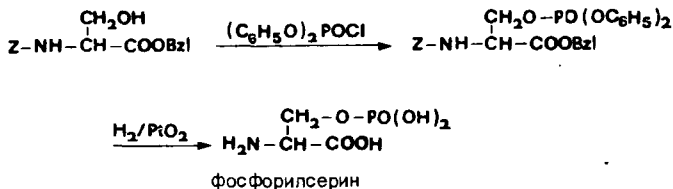
2,5-Диоксопиперазин, образующийся при межмолекулярной эфирной конденсации эфиров, аминокислот, известен как продукт обмена веществ различных микроорганизмов. Для синтетической химии аминокислот и пептидов он имеет лишь второстепенное значение.



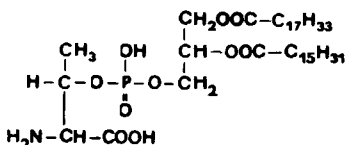
1.10. Фосфорил- и фосфатидиламинокислоты

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

взаимодействии фенолфосфорилхлорида с замещенными производными аминокислот:



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



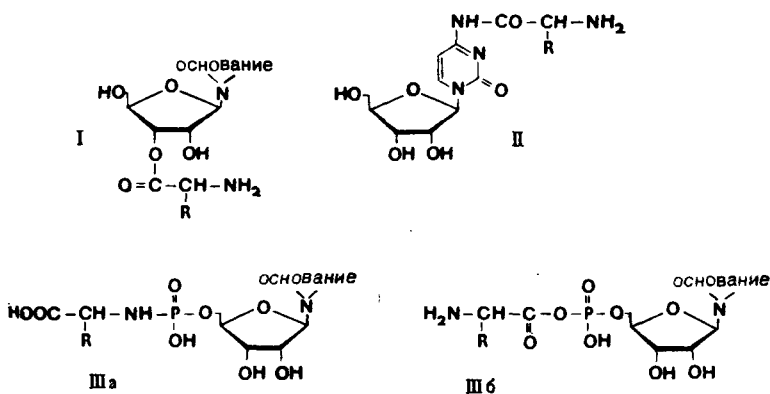
1.11. Гликоаминокислоты

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

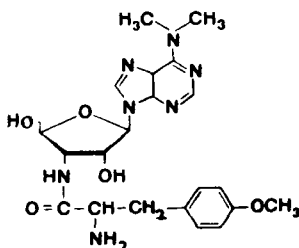
Углеводная часть состоит из 2—15 моносакхаридных звеньев, причем в качестве сахаров преобладают N-ацетилгексозамин, галактоза и манноза. Синтез гликоаминокислот происходит по принципам гликозидного связывания или этерификации при использовании производных соответствующих аминокислот.

1.12. Нуклеоаминокислоты

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



связывания с помощью остатка фосфорной кислоты (IIIa и IIIб). Эфирная группировка типа I встречается в тРНК (разд. 3.7.1), которая имеет важное значение в биосинтезе белка. Удивительная структурная аналогия имеется у антибиотика *пурамицина*, ингибирующего биосинтез белка.



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

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

Литература

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

4. *Гринштейн Дж., Виниц М.* Химия аминокислот и пептидов. — М.: Мир, 1965.
5. *Meister A.*, Biochemistry of the Amino Acids, Bd. 1 a. 2, Academic Press, New York — London, 1965.
6. *Corrigan J. J.*, Science, **164**, 142 (1969).
7. IUPAC-IUB-Nomenklaturregeln, J. Biol. Chem., **245**, 5171 (1970); J. Biol. Chem., **247**, 977 (1972); Pure Appl. Chem., **31**, 641 (1972); Pure Appl. Chem., **40**, 315 (1974); Eur. J. Biochem., **53**, 1 (1975).
8. *Brand E., Edsal J. T.*, Ann. Rev. Biochem. **16**, 224 (1947).
9. *Wellner D., Meister A.*, Science, **151**, 77 (1966).
10. *Barret G. C.* Amino Acids, Peptides, Proteins, **8**, 1 (1976).
11. *Fowden L.*, Endeavour **21**, 35 (1962).
12. *Tschiersch B.*, Pharmazie **17**, 721 (1962).
13. *Kühnau J.*, Angew. Chem. **61**, 357 (1949).
14. *Schuphan W., Schwerdtfeger E.*, Die Nahrung **9**, 755 (1965).
15. *Сафонова Е. Н., Беликов В. М.* — Успехи химии 1967, **36**, с.913.
16. The Therapeutic Use if EAS and their Analogues. IIIrd Int. Symp. (1976) Erlangen, Z. Ernährungswiss **16**, 1 (1977).
17. *Rose W. C. et al.*, J. Biol. Chem. **176**, 753, (1948); **188**, 49 (1951); **206**, 421 (1954); **216**, 763 (1955); **217**, 987 (1955).
18. Joint FAO/WHO Ad Hoc Expert Comitee, WHO, Techn. Report Ser. No. **522**, 55 (1973).
19. *Schneider F.*, Naturwiss. **65**, 376 (1978).
20. *Champagnat A. et al.*, Nature **197**, 13 (1963).
21. *Bell E. A., John D. I.*, Int. Rev. Sci.: Org. Chem. Ser. Two, **6**, 1(Hsg.: H. N. Rydon), Butterworth/London, (1976).
22. *Märki W.*, Helv. Chim. Acta **59**, 1591 (1976).
23. *Shah D. V., Tews J. K., Harper A. E., Suttie J. W.*, Biochim Biophys. Acta **539**, 209 (1978).
24. *Neuberger A.*, Adv. Protein Chem. **4**, 297 (1948).
25. *Гринштейн Дж., Виниц М.* Химия аминокислот и пептидов. — М.: Мир, 1965, с. 105.
26. *Eliel E. L.*, Chemie u. Zeit **8**, 148 (1974).
27. *Lutz O., Jirgenson B.*, Ber. dtsh. chem. Ges. **63**, 448 (1930); **64**, 1221 (1931).
28. *Toniolo C., Signor A.*, Experientia **28**, 753 (1972).
29. *Jennings J. P., Klyne W., Scopes P. M.*, J. Chem. Soc. **1965**, 294.
30. *Fowden L., Scopes P. M., Thomas R. N. J.* Chem. Soc. **1971**, 833.
31. *Toome V., Weigle S. M.* Tetrahedron **31**, 2625 (1975).
32. *Wieser H., Jügel H., Belitz H.-D.*, Z. Lebensmittel-Unters. u. Forsch. **164**, 277 (1977).
33. *Ariyoshi Yasuo*, Agr. and Biol. Chem. **40**, 983 (1976).
34. *Taddel F., Pratt L.*, J. Chem. Soc. **1964**, 1653.
35. *Abraham R. J., Thomas U. A. J.* Chem. Soc. **1964**, 3739.
36. *Martin R. B., Mathur R.*, J. Amer. Chem. Soc. **87**, 1065 (1965).
37. *Cavanaugh J. R.*, J. Amer. Chem. Soc. **89**, 1558 (1967).
38. *Roberts G. C. K., Jardeztzy O.*, Adv. Protein Chem. **24**, 460 (1970).
39. *Zimmerman S. S., Pottle M. S., Nemethy G., Scheraga H. A.* Macromolecules **10**, 1 (1977).
40. *Marsh R. E. Donoheu J.*, Adv. Protein Chem. **22**, 235 (1967).
41. *Beaven G. H., Holiday E. R.*, Adv. Protein Chem. **7**, 319 (1952).
42. *Wellauer D. B.*, Adv. Protein Chem. **17**, 303 (1962).
43. *Sutherland G. B. B. M.*, Adv. Protein Chem. **7**, 291 (1952).

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

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

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

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

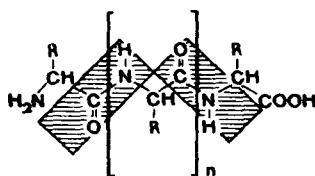
203. *Beck W., Purucker B., Girnth M., Schönenberger H., Seidenberger H., Ruckdeschel G.*, Z. Naturforsch. **31b**, 832 (1976).
204. *Ackermann E.*, Pharmazie **22**, 537 (1967).
205. *Jain J. C., Sharma I. K., Sahni M. K., Grupta K. C., Mathur N. K.*, Indian J. Chem. **B15**, 766 (1977).
206. *Brenner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

2. Пептиды

2.1. Общие свойства пептидов

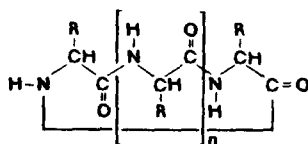
2.1.1. Что такое пептиды? Их строение

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



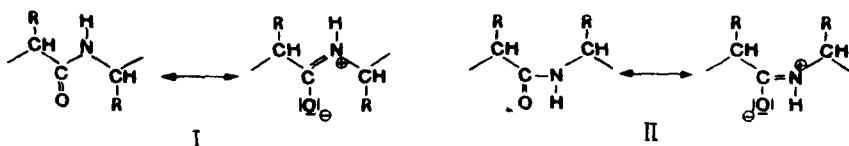
Термин «пептиды» был предложен известным химиком Эмилем Фишером (1852—1919 гг.). Слово образовано из первых четырех букв названия *пептоны* (продукты расщепления белков пепсином) и конечных букв названия углеводов *полисахариды*.

По размеру молекулы и своим свойствам пептиды стоят между высокомолекулярными белками и аминокислотами. Наиболее распространены линейные пептиды, однако известны также циклические пептиды, молекулы которых могут иметь различные размеры. Циклические пептиды образуются из линейных, когда пептидная связь связывает амино- и карбоксильную функцию N- и C-концевых аминокислот.



Полинг и Кори в 1951 г. показали с помощью рентгеноструктурного анализа аминокислот, амидов аминокислот и простых линейных пептидов, что пептидная связь C—N укорочена по сравнению с нормальной простой связью (рис. 2-1).

Вследствие мезомерии получаются две устойчивые плоские конформации, *транс* (I) и *цис* (II), при затрудненном свободном вращении около связи C—N:



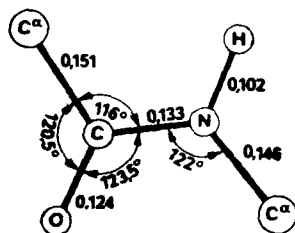


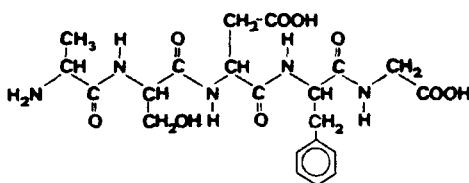
Рис. 2-1. Средние расстояния между атомами (нм), образующими пептидную связь и углы между связями.

В 2,5-дикетопиперазинах, простейших циклических пептидах, построенных из двух аминокислот, имеются *цис*-пептидные связи. Циклические трипептиды могут существовать без напряжения также только с тремя *цис*-пептидными связями. Поскольку пролин и саркозин не обладают возможностью стабилизации *транс*-пептидной связи, то можно легко синтезировать циклический трипептид — циклотрипролил (рис. 2-26). В нативных пептидах и белках преобладает *транс*-пептидная связь. В некоторых белках были найдены также и *цис*-пептидные связи, при этом в образовании пептидной связи всегда участвовал пролин.

2.1.2. Классификация и номенклатура

По числу аминокислот, содержащихся в пептиде, различают ди-, три-, тетра-, пента-, ..., окта-, нона-, декапептиды и т. д. Чтобы избежать проблемы, связанной с греческой нумерацией длинноцепочечных пептидов, Бодански предложил количество аминокислотных остатков пептида обозначать арабской цифрой и помещать перед словом «пептид». Например, 7-пептид вместо гептапептид, 10-пептид вместо декапептид. Пептиды, в молекулах которых меньше десяти аминокислотных остатков, формально относятся к *олигопептидам*, пептиды, построенные из большего числа аминокислотных остатков (до ~100), — к *полипептидам*. Различие между полипептидами и белками (макропептидами) чрезвычайно проблематично. Исторически сложилось так, что границей между полипептидами и белками считают соединения с молекулярной массой ~10 000, т. е. состоящие примерно из 100 остатков аминокислот. Такой принцип классификации основан на способности к диализу через природные мембраны.

Согласно принципам рациональной номенклатуры, пептиды рассматривают формально как ациламинокислоты, причем аминокислоте, карбоксил которой участвует в пептидной связи, придается окончание-ил. Поэтому только С-конечная аминокислота сохраняет свое первоначальное тривиальное название:

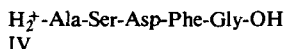
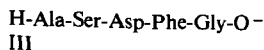
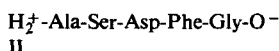
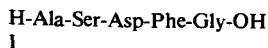


аланил-серил-аспарагил-фенилаланил-глицин

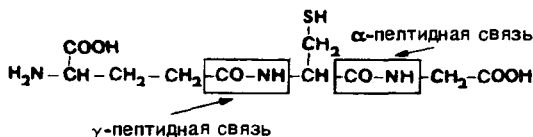


По предложению Бейли, в формулах линейных пептидов аминокислота со свободной аминогруппой называется *N-концевой аминокислотой*, в горизонтально изображенной пептидной цепи она стоит слева. Аминокислота со свободной карбоксильной группой обозначается как *C-концевая аминокислота*. В соответствии с этим в приведенном выше примере аланин — N-концевая, а глицин — C-концевая аминокислота. Фромажо предложил остаток, несущий свободную α -аминогруппу, называть начальной аминокислотой, а соответствующий остаток со свободной карбоксильной группой — конечной аминокислотой. Хотя это предложение кажется более простым, широкое признание получила рекомендация Бейли.

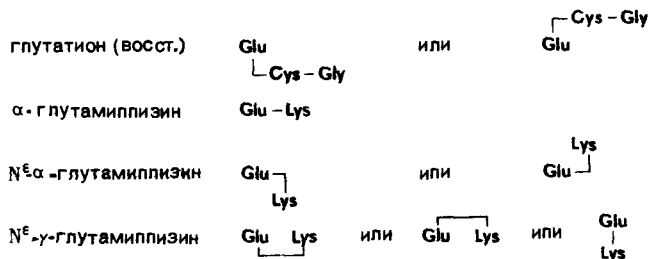
Краткая формула Ala-Ser-Asp-Phe-Gly соответствует пентапептиду независимо от состояния ионизации. При желании особо подчеркнуть, что данный пептид находится в незамещенной форме, можно, по предложению Гринштейна и Винаца, в упрощенной формуле при amino- и карбоксильной группах указывать наличие протона и гидроксильной группы с помощью соответствующих символов, например для цвиттер-иона (II), аниона (III) и катиона (IV) рассматриваемого здесь пентапептида:



При общепринятом способе написания формул исходят из того, что аминокислоты с тремя функциями, имеющие дополнительные amino- или карбоксильные функции (Lys, Orn, Glu, Asp), связаны α -пептидными связями. Для ω -пептидного связывания при такой записи требуются особые обозначения. Например, в биохимически важном трипептиде глутатионе наряду с α -пептидной связью имеется также γ -пептидная связь:

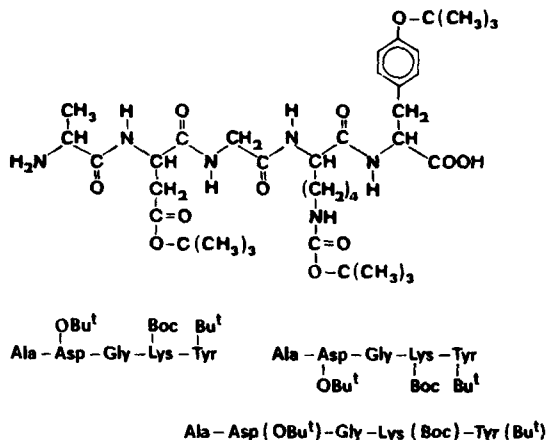


Способ обозначения γ -пептидного связывания в глутатионе и других ω -пептидах ясен из следующих примеров:



Пептидная связь между ε -аминогруппой лизина и γ -карбоксом глутаминовой кислоты (β -карбоксом аспарагиновой кислоты) называется *изо-пептидной связью* (такая связь имеется, например, в N^ε- γ -глутамиллизине).

При сокращенной записи замещение боковой цепи обозначают, помещая аббревиатуру этого заместителя выше или ниже символа соответствующей аминокислоты или же в скобках непосредственно после него, например для пентапептида L-аланил-L-аспарагил-(β -*mpem*-бутиловый эфир)глицил-N^ε-*mpem*-бутилоксикарбоил-L-лизил-O-*mpem*-бутил-L-тирозин:

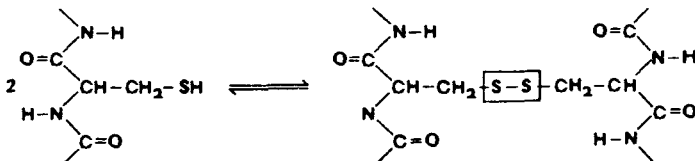


Число и последовательность связанных в пептид аминокислот называют *первичной структурой*. Для пептида с известной последовательностью формулу записывают, соединяя символы аминокислотных остатков черточками. Наконец, различают собственно пептид, например Ala-Ser-Asp-Phe-Gly- и фрагмент -Ala-Ser-Asp-Phe-Gly-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

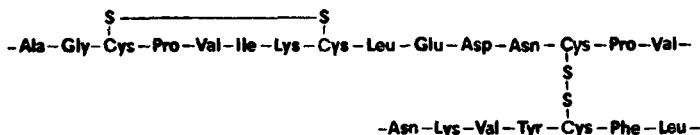


Итак, в соответствии с приведенным выше определением природные пептиды построены из аминокислотных остатков, которые связаны, как правило, α -пептидными связями.

Протеиногенная аминокислота цистеин имеет дополнительные возможности соединения аминокислотных остатков, так как при окислении тиольной функции могут образовываться **дисульфидные связи**:



Различают **внутримолекулярное дисульфидное связывание** в пределах одной пептидной цепи и **межмолекулярное дисульфидное связывание** между различными пептидными цепями:



Внутримолекулярные дисульфидные связи имеются, например, в окситоцине, вазопрессине, в А-цепи инсулина и в рибонуклеазе. Межмолекулярные дисульфидные связи соединяют между собой цепи пептидов, причем ковалентно связанными могут быть как идентичные цепи, как в окисленной форме глутатиона, так и различные цепи, как в инсулине. Дисульфидные связи имеют большое значение для образования и стабилизации определенных пептидных и белковых структур.

В природе встречаются пептидные вещества, построенные не только из аминокислот, но содержащие также оксикислоты, длинные остатки жирных кислот и др. компоненты; кроме того, в образовании связей между боковыми цепями могут принимать участие не только тиольные функции, но также и гидроксильные группы боковых цепей протеиногенных кислот. С учетом всех этих фактов данное в разд. 2.1.1 определение пептидов представляется не совсем корректным. Следует различать **гомомерные пептиды**, состоящие исключительно из аминокислот, и **гетеромерные пептиды**, которые кроме аминокислот содержат также небелковые компоненты.

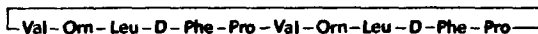
Известны также **гомодетные** и **гетеродетные пептиды**; первые содержат только пептидные связи, во вторых наряду с пептидным связыванием могут встречаться эфирные, дисульфидные или тиоэфирные связи.

Последовательность циклического гомодетного гомомерного пептида можно изобразить с помощью символических формул (в качестве примера выбран грамицидин S):

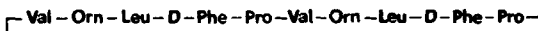
1. Заключают последовательность в скобки, а перед ними пишут цикло.



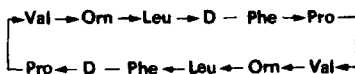
2. Можно написать аминокислотную последовательность пептида и затем соединить первую и последнюю аминокислоты длинной линией выше или ниже последовательности:



или



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



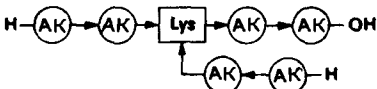
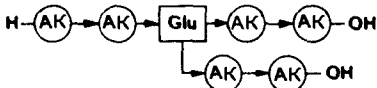
Циклические гетеродететригомомерные пептиды при сокращенной записи изображаются аналогично замещенным аминокислотам.

Гомодететные — гомомерные пептиды

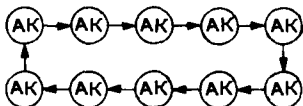
1. Линейный пептид



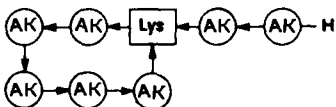
2. Разветвленный пептид



3. Циклический пептид

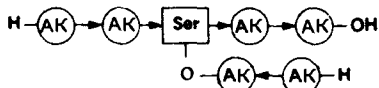


4. Циклический разветвленный пептид

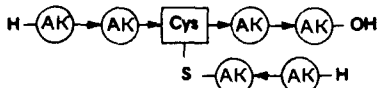


Гетеродететные — гомомерные пептиды

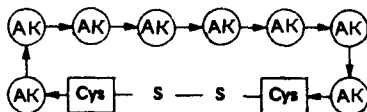
1. Линейный O-пептид



2. Линейный S-пептид



3. Циклический пептид (дисульфид)



4. Циклический разветвленный пептид (пептидактон)

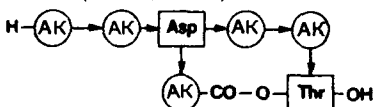


Рис. 2-2. Схема построения гомомерных пептидов. АК — аминокислотный остаток.

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

К *гетеродетным пептидам* относятся депсипептиды и пептоиды. Под депсипептидами понимают, согласно Шемякину, все пептиды, которые наряду с пептидными связями содержат также и эфирные, т. е. депсипептидами следует считать гомомерные О-пептиды и пептидлактоны оксиаминокислот серина и треонина. Для пептидов с встроенными в цепь оксиаминокислотами введено понятие *пептолиды*. Большинство пептолидов — это циклические соединения (известные как пептидные антибиотики). Любке и Шрёдер предложили название *пептоиды* для сложных белков, построенных из гетеромерных пептидов. Важными представителями этого ряда являются липо-, глико-, фосфо- и хромопептиды, в которых гетеросоставляющие ковалентно связаны с пептидом посредством amino- и или карбоксильных групп или же за счет функциональных групп боковых цепей.

2.1.3. Нахождение пептидов в природе и их значение

Пептиды широко распространены в природе. Они присутствуют во всех клеточных организмах (пептидный пул). В настоящее время трудно систематически классифицировать пептиды по химическим и физическим критериям, поэтому обычно за основу берут их физиологическое действие.

Из природных пептидных веществ наиболее изучены по своему действию пептидные гормоны, они имеют и наиболее известную структуру. Важные пептидные гормоны образуются в гипоталамусе (окситоцин и вазопрессин, гормоны гипоталамуса, стимулирующие освобождение и биосинтез других гормонов), в поджелудочной железе (инсулин, глюкагон), в гипофизе (адренотропный гормон, меланотропный гормон), в щитовидной железе (тироксальцитонин), в паращитовидной железе (паратгормон), в желудочно-кишечном тракте (гастрин, секретин, холецистокининпанкреозимин). Пептидные гормоны желудочно-кишечного тракта не вырабатываются специальной железой, так что их, так же как ангиотензин и плазмин, относят к тканевым пептидным гормонам (тканевым гормонам). В некоторых случаях бывает трудно отнести гормоны к какому-то определенному виду в связи с их неоднозначными физиологическими функциями, например пептиды амфибий и головоногих (элеодозин, физалемин, церулин, ранагензин, алантинин, бомбезин).

Большое значение приобретают пептиды из животных и растительных ядов, а также пептидные антибиотики из микроорганизмов.

В последнее время все больший интерес вызывают биологически активные пептиды, действующие на центральную нервную систему. В центре внимания находятся нейропептиды (разд. 2.3.3), в особенности нейромедиа-

торы, модуляторы нервной активности, эндогенные пептиды наркотического действия и многие другие. Влияние нейропептидов на центральную нервную систему очень многообразно. Так, известны пептиды, которые контролируют физиологический сон, другие действуют как обезболивающие препараты; есть даже такие, которые вызывают сексуальное возбуждение у кроликов, крыс и кошек [определенные фрагменты аленозинкортicotропного гормона (АКТГ), β -меланоцитстимулирующего гормона (β -МСГ)]. Нейрогипофизарные гормоны играют роль в процессах переработки информации. Многие пептиды следует отнести к особой группе лекарственных веществ (новая интересная область пептидной химии).

Определенные циклические пептиды, такие, как фитотоксичный *тентоксин*, цикло-(L-MeAla-L-Leu-MePhe[(Z) Δ]-Gly-) или продуцируемый *Diheterospora chlamydosporia* *хламидоцин* (циклический тетрапептид цитостатического действия), расширяют область применения пептидов.

Сладкие пептиды, такие, как дипептидный эфир *аспартам* (разд. 2.3.1.12.1), горькие пептиды из продуктов ферментации (соевый соус, сыр и т. д.), а также пептиды из белков рыбы или говядины, улучшают вкус пищи, как изолированный в 1978 г. Ямасаки и Маекава из мясного сока октапептид Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala, широко используются в пищевой промышленности.

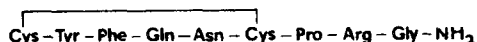
Методы выделения, очистки и аналитические характеристики пептидов описаны подробно в разд. 3.3. Изучение связи между строением и биологической функцией пептидов ведет к познанию молекулярного механизма их действия. При этом главное внимание обращается на выяснение активного центра и определение аминокислотной последовательности, которая ответственна за рецепторное связывание, транспорт и иммунологическое поведение. Большой практический интерес имеет также модификация природных пептидов для пролонгирования их действия и расширения практического применения. Такого рода исследования можно проводить только тогда, когда соответствующий природный пептид имеется в достаточном количестве. Необходимые для изучения пептиды можно получать путем частичного ферментативного расщепления экзопептидазами или эндопептидазами или же с помощью специфических химических методов расщепления (бромцианом или N-бромсукцинимидом); можно также использовать замещение, элиминирование или превращение функциональных групп соответствующих пептидов. Возможности модификации природных пептидов ограничены тем, что часто исследователь располагает лишь нанограммовыми количествами этих веществ.

Большой выбор возможностей для модификации предоставляет химический синтез пептидных аналогов. Для их получения производят систематические замены аминокислот в пептидах. Математический подход дает огромное число возможных вариантов последовательности:

$$P = \frac{n!}{x!y!z!}$$

где P — число возможных аналогов пептида, n — общее число аминокислотных остатков, x, y, z — число повторяющихся аминокислотных остатков.

Пептидный гормон [8-аргинин]вазопрессин, например, включает 9 аминокислот, две из которых одинаковые (Cys):



При систематических заменах аминокислот

$$P = \frac{9!}{2!} = \frac{362880}{2} = 181440$$

т. е. данному пептиду соответствует 181 440 аналогов. Нет необходимости доказывать, что такой путь не реален при выяснении связи между строением и активностью вазопрессина. Большое число аналогов биологически активных пептидов было синтезировано, исходя из каких-то определенных предположений. В связи с большим числом биологически активных аналогов оказалось необходимым ввести правила для наименования синтетических аналогов природных пептидов, которые и были предложены Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB [Hoppe-Syler's Z. Physiol. Chem. 348, 262—265 (1967)]. Некоторые правила можно проиллюстрировать на примере гипотетического пентапептида "Iupaciubin" Ala-Lys-Gly-Tyr-Leu, название которого должно символизировать объединение символов IUPAC и IUB.

1. При замене *аминокислотного остатка* в пептиде название аминокислоты, которая замещает другую, а также положение замены указывают в квадратных скобках перед тривиальным названием соответствующего пептида. В краткой форме, которую применяют только в таблицах, место замены указывается цифрой, стоящей сверху у символа заменяющей аминокислоты. Аналогично поступают при многократных заменах

[4-фенилаланин]Iupaciubin Ala-Lys-Glu-Phe-Leu

[Phe⁴]Iupaciubin 1 2 3 4 5

2. *Наращивание* пептида может происходить как с N-конца (а), так и с C-конца (б). При этом придерживаются принятой номенклатуры (разд. 2.1.2).

а) Аргинил-Iupaciubin Arg-Ala-Lys-Glu-Tyr-Leu

Arg-Iupaciubin 1 2 3 4 5

б) Iupaciubyl-метионин Ala-Lys-Glu-Tyr-Leu-Met

Iupaciubyl-Met 1 2 3 4 5

3. *Введение добавочного аминокислотного остатка* обозначают префиксом *эндо* с указанием положения:

Эндо-2а-треонин-Iupaciubin Ala-Lys-Thr-Glu-Tyr-Leu

Эндо-Thr^{2a}-Iupaciubin 1 2 2a 3 4 5

природой кажется бессмысленной, имеются весьма веские основания для оправдания работы по синтезу и химической модификации таких веществ.

Во-первых, это *подтверждение предполагаемой первичной структуры с помощью химического синтеза*. Общепринято, что полный синтез — надежное доказательство строения. Несмотря на применение новейших методов исследования, при выяснении первичной структуры могут быть допущены ошибки, что ведет к неправильным выводам. Так случилось при изучении АКТГ, соматотропина человека, мотилина. При сравнении синтетического и природного материалов можно выявить ошибочные последовательности.

Более того, в некоторых случаях окончательные доказательства структуры сумели получить только с помощью химического синтеза. В этой связи стоит напомнить о выяснении последовательностей гормонов скотофабина и тиреолиберина.

Во-вторых, *с помощью синтетических аналогов изучается связь между структурой и активностью*.

Для того чтобы выяснить структурные параметры, ответственные за биологическое действие пептидов, были синтезированы многие тысячи аналогов. Например, в случае окситоцина заменой глутамина в положении 4 на треонин удалось синтезировать аналог, который обладает более высокой биологической активностью, чем нативный гормон. Считают, что [4-треонин]окситоцин связывается с рецептором лучше природного гормона. Преимущество синтетического аналога доказано, и возможно, что в далеком будущем подобная мутация осуществится. Изменением длины цепи и другими манипуляциями можно выяснить расположение активных центров, области рецепторного связывания и т. д.

В этой связи представляет интерес также изучение конформаций природных веществ путем сравнения с аналогами различной структуры. Наконец, следует напомнить о возможности получать синтетическим путем радиоактивно меченные аналоги для изучения их связывания и радиоиммунологических исследований.

В-третьих, *химический синтез преследует цель изменить пептиды для модификации фармакологического действия*. Эта задача тесно связана с предыдущей, так как при исследовании связи между строением и активностью неизбежно выявляются новые аспекты для фармацевтического использования. Можно осуществлять различные модификации природной аминокислотной последовательности для получения веществ с улучшенными свойствами. Особый интерес обращается на пролонгирование или усиление биологического действия. В случае пептидов, проявляющих несколько эффектов, важно бывает выделить определенные из них. Путем модификации конечных amino- или карбоксильных групп можно повысить устойчивость пептида к ферментативному расщеплению. При этом следует учитывать, что не все пептиды можно одинаково подвергать химическим изменениям в связи с опасностью частичного или полного инактивирования. В то время как в случае, например, вазопрессина и окситоцина замещение в N-концевой аминокислоте ведет к снижению биологического дей-

ствия, полное удаление этой аминокруппы вызывает резкий подъем активности. Другие варианты модификации заключаются в изменении длины цепи пептида (при этом из экономических соображений обычно стремятся к уменьшению цепи, если это не сопровождается потерей активности). Окситоцин, вазопрессин, кальцитонин и брадикинин являются такими пептидами, которые для проявления своего биологического действия требуют полной аминокислотной последовательности. В случае многих других пептидов биологической активностью обладают частичные последовательности N-концевой области цепи (АКТГ, паратгормон) или С-концевые фрагменты (ангиотензин, секретин, гастрин, элехозин, вещество Р, физалемин, холецистокининпанкреозимин и др.). В случае состоящего из 17 аминокислот желудочно-кишечного гормона гастрин уже С-концевой тетрапептид обладает полным спектром биологического действия, причем в количественном отношении оно соответствует примерно десятой части биологической активности целого гормона. С-Концевой додекапептид холецистокининпанкреозимин, состоящий из 33 аминокислот, показывает в 2,5 раза большую активность (вызывает сокращение желчного пузыря) по сравнению с нативным гормоном.

Наращивание цепи — это легкий, а часто и единственный путь к получению меченых пептидов. Большой практический интерес имеют также конкурентные ингибиторы биологически активных пептидов, которые, не обладая активностью пептида, имеют похожую структуру и, присоединяясь к соответствующему рецептору, вытесняют природный активный пептид.

В-четвертых, химический синтез иногда проводят из экономических соображений. Например, применяемый для терапевтических целей окситоцин в настоящее время по этой причине получается исключительно химическим синтезом. Это же относится и к некоторым другим пептидам, как, например, к АКТГ и секретину. Синтетический секретин в десять раз дешевле природного продукта, изолированного из свиных кишок. Также обстоит дело и со многими другими активными пептидами. Наряду с вопросами стоимости важную роль играет здесь также доступность пептидов, получаемых химическим синтезом, так как некоторые активные пептиды, как уже упоминалось, встречаются в природе только в нанограммовых количествах. В случае же специфических пептидов человека их получение возможно только синтетическим путем. На примере синтезов АКТГ, глюкагона и секретина можно показать, что синтетические продукты имеют более высокую степень чистоты, чем пептиды, изолированные из природных источников. Полное разделение родственных по аминокислотной последовательности пептидов с противоположным или другого рода действием часто не всегда возможно с помощью применяемых в настоящее время методов изолирования и очистки.

И наконец, в-пятых, химический синтез дает модельные пептиды для изучения конформационных закономерностей с помощью физико-химических методов. Синтетические модели применяют также для исследования антигенного действия полипептидов и белков. Большой интерес представляют также синтетические субстраты для энзимологических исследований.

2.2.2. Основной принцип пептидного синтеза

Образование пептидной связи в случае дипептида является простым химическим процессом. Дипептид формально получается при отщеплении молекулы воды от amino- и карбоксильной групп двух аминокислот (рис. 2-3). Последовательное повторение этого процесса, казалось бы, должно привести к длинным пептидам и даже к белкам. Однако реализация этого принципа возможна только в жестких условиях неконтролируемой реакции. Основатель пептидной и белковой химии Э. Фишер в 1906 г. писал:

«Если бы сегодня по счастливой случайности с помощью какой-то жесткой реакции, например при сплавлении аминокислот в присутствии водоотнимающих средств, удалось получить настоящий белок и если бы, что еще менее вероятно, можно было искусственно созданный продукт идентифицировать с естественным, то это ничего не дало бы ни для химии белков, ни для биологии».

Образование пептидной связи в мягких условиях удается лишь при активировании карбоксильного компонента одной из аминокислот, вступающей в реакцию (рис. 2-4).

Вторая аминокислота Б (аминокомпонент) атакует активированный карбоксильный компонент аминогруппой с образованием пептидной связи. Незащищенная аминофункция карбоксильного компонента А тоже может реагировать, что приводит (рис. 2-4) к нежелательным побочным продуктам — линейным и циклическим пептидам. Из этого следует вывод, что для однозначного течения пептидного синтеза следует временно блокировать все функциональные группы, не участвующие в образовании пептидной связи.

Пептидный синтез, т. е. образование каждой пептидной связи, является поэтому многоступенчатым процессом (рис. 2-5).

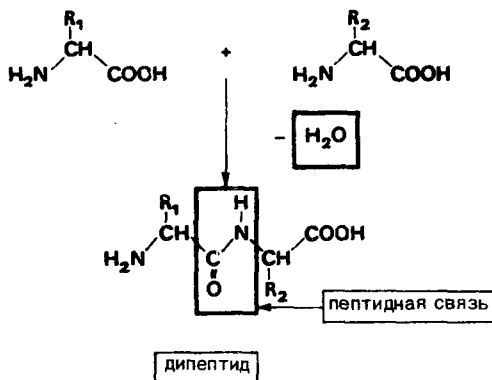


Рис. 2-3. Основной принцип пептидного синтеза.

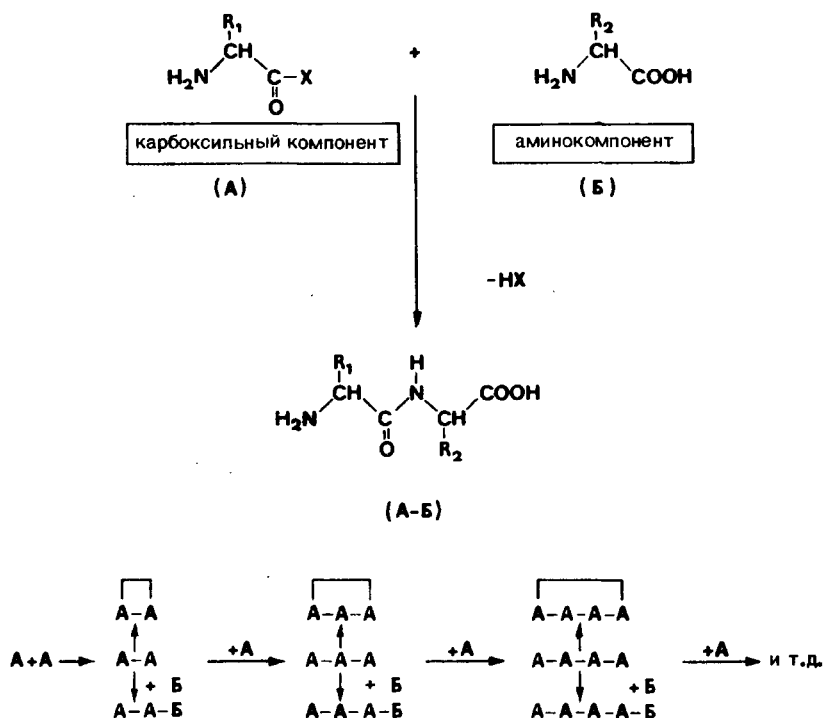


Рис. 2-4. Схема образования пептидной связи без защиты не участвующих в реакции функциональных групп. X — активирующая группа,

В первую очередь получают частично замещенные аминокислоты, при этом они одновременно теряют цвиттер-ионную структуру. Вторая ступень, собственно образование пептидной связи, протекает в две стадии. Сначала нужно активировать N-защищенный карбоксильный компонент. Затем происходит собственно образование пептидной связи, которое протекает либо одноступенчато (вместе с активированием), либо последовательно в следующую стадию. На третьей ступени защитные группы селективно отщепляются, причем полученные частично защищенные производные дипептидов могут использоваться для дальнейших синтезов как карбоксильные или аминокислоты. Само собой разумеется, что в случае синтеза дипептида обе защитные группы удаляются одновременно.

Пептидный синтез, далее, усложняется еще и тем, что из 20 протеино-гених аминокислот 9 обладают еще третьей функциональной группой, которая также требует селективной защиты. Это Ser, Thr, Tyr, Asp, Glu, Lys, Arg, His и Cys. Следует различать *временные* и *постоянные* защитные группы. Временные защитные группы служат для защиты концевых

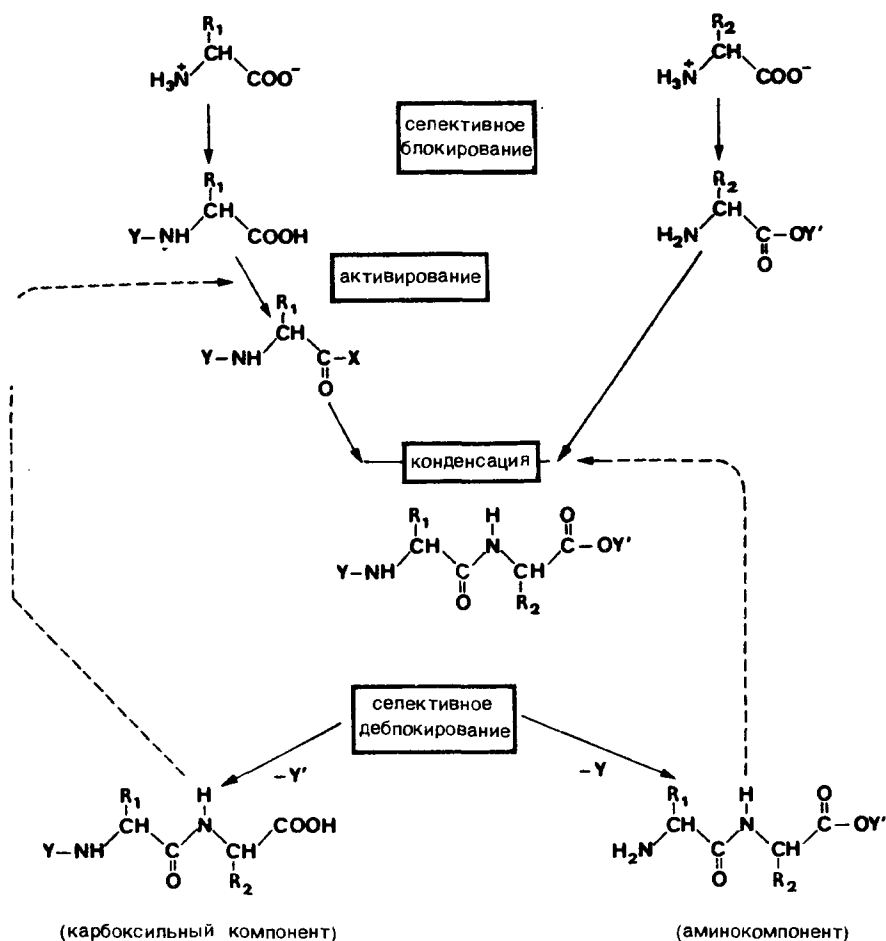


Рис. 2-5. Трехступенчатый процесс пептидного синтеза. Y — защита амминогруппы, X — активирующая группа, Y' — защита карбоксильной группы, R — остаток боковой цепи.

амино- и карбоксильных групп и должны поэтому селективно отщепляться в присутствии постоянных защитных групп. Постоянные защитные группы удаляются обычно только после окончания синтеза пептида или же иногда на стадии промежуточного продукта. Проблема защиты функциональных групп во время пептидного синтеза подробно рассматривается в разд. 2.2.4 и 2.2.10.2.

Активирование карбоксильного компонента и следующее за ним образование пептидной связи, т. е. так называемая *реакция конденсации*, в идеальных условиях должны протекать с высокой скоростью без рацемизации, без побочных реакций и с высоким выходом при соединении эквимоллярных количеств карбокси- и аминокомпонентов. К сожалению, в настоящее время еще неизвестно такого метода конденсации, который удовлетворял бы всем этим требованиям. Приходится выбирать из относительно большого набора методов подходящие варианты в соответствии со специфическими целями синтеза. Решение зависит в каждом случае от выбранной тактики синтеза, в соответствии с которой для каждого отрезка синтезируемой последовательности подбираются оптимальные методы конденсации. Набор методов, которые применяются для практического проведения синтеза пептидов, относительно мал по сравнению с примерно 130 описанными методами синтеза.

Поскольку при пептидном синтезе реакции протекают по группировке, связанной с асимметрическим центром, то существует опасность рацемизации. В связи с важностью этого вопроса для получения стереически однородных продуктов с полной биологической активностью изложение этой проблемы необходимо выделить в особый раздел.

На последней ступени пептидного синтеза происходит *отщепление защитных групп*. Поскольку синтез дипептида с полным удалением защитных групп проводится довольно редко, гораздо большее значение имеет селективное деблокирование, т. е. выборочное отщепление защитных групп N-концевой аминофункции или же C-концевой карбоксильной группы. Этот вопрос находится в тесной связи с общим планом синтеза (разд. 2.2.10).

Под *стратегией* понимают последовательность связывания аминокислотных компонентов в пептид, причем следует различать постепенное наращивание и фрагментную конденсацию. Получение полипептидов путем постепенного наращивания цепи трудноосуществимо при больших размерах целевой молекулы. В этих случаях большое значение приобретает разделение объекта синтеза на отдельные фрагменты с последующим соединением их в полипептид. Оптимальный выбор комбинации защитных групп и применение подходящего метода конденсации для каждого отрезка составляет предмет *тактики* пептидного синтеза.

Стратегическую модификацию постепенного наращивания пептидов или белков представляет разработанный в 1963 г. Меррифилдом пептидный синтез на полимерных носителях. Несмотря на сенсационный успех этого метода (синтез протекает в двухфазной системе и есть возможность его автоматизации), возлагаемые на него большие ожидания до сих пор полностью не исполнились.

2.2.3. История развития пептидного синтеза

Первый пептидный синтез был проведен в Лейпциге в 1881 г. Теодором Курциусом (1857—1928 гг.). При попытке получить гиппуровую кислоту бензоилированием глицина наряду с желаемым продуктом были получены Bz-Gly-Gly и так называемая γ-

кислота, состав которой был установлен только 21 год спустя Курциусом и Бенратом. Это был бензоилгексаглицин. Выяснить его строение удалось постепенным наращиванием бензоилированного пептида глицина до гексапептида с применением азидного метода. В 1883 г. при сплавлении эфира глутимовой кислоты и глицина Курциус также получил γ -кислоту. Хотя Курциусу и не удалось синтезировать свободные пептиды, его вклад в пептидный синтез очень существен; именно ему принадлежит

введение азидного метода, который до сих пор считается одним из самых полезных методов соединения фрагментов, так как практически не сопровождается рацемизацией;

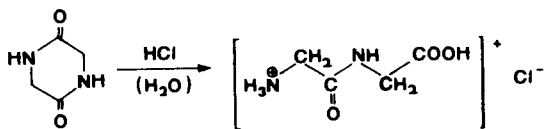
доказательство пригодности эфиров аминокислот для использования в пептидном синтезе;

понимание необходимости введения защитных групп, хотя в то время еще отсутствовала возможность селективного отщепления бензоильного остатка (разд. 2.2.4.1.1.2).

Пионер пептидной и белковой химии Эмиль Фишер в 1892 г. принял после Гофмана кафедру в Берлинском университете. Его выдающиеся работы в области углеводов и пуринов отмечены в 1902 г. Нобелевской премией по химии. В 1900 г. этот замечательный ученый обратился к химии белка. Результаты, полученные им всего за 5 лет в этой новой области, до сих пор считаются пионерскими. В докладе Химическому обществу 6 января 1906 г. Фишер обобщил результаты своей работы в области химии аминокислот, пептидов и белков [1]. Доклад Фишера привлек пристальное внимание исследователей, поскольку в нем были развиты основные принципы синтеза пептидов и белков, которые продолжают работать и сегодня.

«Чтобы получить надежные результаты в этой трудной области, необходимо сначала найти метод, который позволяет последовательно, ступенчато присоединять молекулы аминокислот одну за другой». И далее: «Я вижу счастье в том, что синтез заставляет создавать новые и новые методы конденсации, идентификации и выделения и подробно изучать сотни промежуточных продуктов, прежде чем удастся подойти к белкам».

Это предсказание подтвердилось, хотя сам Фишер успел получить по разработанным им методам только олигопептиды. Тогдашнее состояние препаративной и аналитической химии не позволяло достигнуть больших успехов в области синтеза. Первый свободный пептид глицилглицин Фишер и Фурне получили в 1901 г. омылением диоксопиперазина крепкой соляной кислотой:



Немного позже Фишер нашел, что подходящими исходными продуктами для целенаправленного синтеза пептидов могут служить хлорангидриды α -галогенкарбоновых кислот.

Эти соединения без труда реагируют с эфирами аминокислот, давая после омыления и аминирования дипептиды. Пропустив стадию аминирования, можно перевести галогенацетиламинокислоту в хлорангидрид и затем ввести в реакцию с эфиром аминокислоты (или также с аминокислотой или пептидом) в водно-щелочном растворе. Достигнув желаемой длины цепи, можно заместить галоген на аминогруппу обработкой аммиаком.

В 1905 г. был разработан хлорангидридный метод: солянокислые соли хлорангидридов аминокислот или пептидов взаимодействовали с эфирами аминокислот, давая соответствующие производные пептидов.

С помощью этих методов Фишер и сотр. синтезировали почти 70 небольших пептидов. Фишер понимал необходимость введения обратимо снимаемой защитной группы и работал в этом направлении, но ему так и не удалось селективно отщепить ни хлорацетильную, ни предложенную позднее карбэтоксигруппы.

Лишь в 1971 г. Штеглих и др. нашли, что хлорацетильный остаток можно селективно удалять с помощью амида 1-пиперидинтиокарбоновой кислоты.

Хотя надежды Фишера отщепить карбэтоксильный остаток в мягких условиях и не осуществились, он интуитивно стремился работать с ацильными группами уретанового типа. В настоящее время защиты уретанового типа являются самыми распространенными.

После этих основополагающих работ начала века в области пептидного синтеза больше 20 лет не было существенных успехов. В 1926 г. Шенкгеймер [2] применил при синтезе простых пептидов 4-толуолсульфонильный остаток для защиты аминокислотной группы. Эту защиту можно селективно удалить обработкой в течение нескольких часов иодоводородной кислотой в присутствии иодида фосфония при 50—65 °С. Ученики Фишера Макс Бергман, Эмиль Абдергальден и Герман Лейкс продолжали работать в области химии пептидов и белков. Особенно заметный вклад внесли в науку работы Бергмана.

В 1932 г. Бергман вместе с Л. Зервасом ввели в пептидную химию бензилоксикарбонильную группу. С этого времени начался новый этап развития современной пептидной химии. Во время фашистской диктатуры многие ученые, в том числе Бергман и Зервас, были вынуждены эмигрировать в США.

Бергман и сотр. использовали новую аминокислотную группу для получения различных пептидов [4]. Были синтезированы первые пептиды, встречающиеся в природе, — глутатион, карнозин и др.

В период между 1944 и 1954 гг. развивались аналитические исследования по выделению, очистке и определению строения пептидов с высокой биологической активностью, а также методические разработки в области синтеза, например в 1950 г. был разработан метод смешанных ангидридов (Виланд, Буассона, Воган). Эти успехи сделали возможным химический синтез природных пептидов, обладающих биологической активностью. В 1953 г. дю Виньо удалось синтезировать первый пептидный гормон — окситоцин. Эта работа была удостоена Нобелевской премии за 1955 г. В следующие годы наступило бурное развитие синтетической пептидной химии, было предложено несколько новых защитных групп, эффективные методы конденсации и новые методические варианты, такие, как разработанный Меррифилдом в 1962 г. пептидный синтез на полимерных носителях. Химический синтез нуклеиновых кислот и рибонуклеазы ознаменовал переход к белковому синтезу.

Более подробные сведения о синтезе важнейших пептидов приведены в обзорах [5—22], монографиях [23—31] и трудах европейских [32—46], американских [47—52] и японских пептидных симпозиумов [53—58].

2.2.4. Защитные группы

Разработанные еще Фишером и Курциусом методы образования пептидной связи не нашли широкого применения из-за отсутствия селективно-отщепляемых защитных групп. Необходимость обратимого блокирования

всех функциональных групп, не участвующих в образовании пептидной связи, уже была разъяснена в разд. 2.2.2.

Исходя из требований селективности, следует различать *временные и постоянные защитные группы*. При введении временных защитных групп должны выполняться следующие условия:

- 1) аминокислоты не должны иметь цвяттер-ионную структуру;
- 2) отщепление временных защитных групп не должно затрагивать постоянных защитных групп я пептидных связей;
- 3) исключение рацемизация как при введения я отщепления защиты, а также при образования пептидной связи;
- 4) защищенные промежуточные продукты должны быть достаточно устойчивы я легко идентифицироваться;
- 5) карбоксильная группа должна легко активироваться в случае защиты аминокислотной группы, а при защите С-концевой карбоксильной группы я нуклеофильность соответствующей аминокислотной группы должна быть достаточно высокой;
- 6) растворимость защищенных продуктов должна быть хорошей.

Для известных в настоящее время временных защитных групп эти критерии не всегда выполняются.

В соответствии с названием постоянные защитные группы отщепляются после заключительной стадии синтеза, при этом следует исключать воздействия на пептидные связи я функциональные группы. На постоянные защитные группы я также распространяются некоторые вышеизложенные условия (четвертое я шестое).

Выбор защитных групп определяется стратегией синтеза. Подчиненная стратегия тактика защитных групп подробнее обсуждается в разд. 2.2.10.2.

Классификация защитных групп зависит от природы блокируемой функции. В то время как защитные группы для тиольной, гидроксильной, гуанидиновой я имидазольной групп естественно относятся к постоянным блокирующим группам, защиты для аминокислотной я карбоксильной функций могут быть как временными, так я постоянными.

2.2.4.1. *Защитные группы для аминной функции*

Защитные группы для аминной функции используются для N-концевых аминокислот я для ω -аминокислот лизина я орнитина. Защитные группы этого типа применяются также я для временного блокирования гидразидов ациламинокислот, которые представляют собой промежуточные вещества при получении азидов (разд. 2.2.5.1). Солеобразование у аминной функции не является действенной защитой в синтезе пептидов.

В принципе аминная функция может обратимо блокироваться путем ацилирования я алкилирования. Наибольшее значение на практике имеют ацильные защитные группы, хотя для временной защиты аминокислотной функции применяются я некоторые алкильные производные.

2.2.4.1.1. Защитные группы ацильного типа

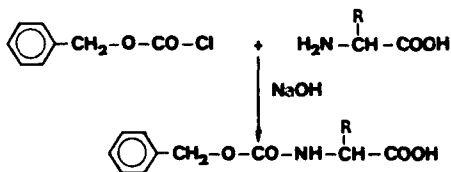
Уже Бергман и др. интенсивно применяли N-ацетиламинокислоты для целенаправленного синтеза пептидов. Оптически активные исходные продукты для образования пептидной связи они получали ацелированием эфиров аминокислот уксусным ангидридом и последующим омылением. Амидная группировка, выступающая в этом случае как защитная группа, структурно аналогична пептидной связи. Поэтому не было неожиданным, что селективное отщепление этого ацильного остатка не удавалось. Подобные эксперименты проводили еще Курциус с бензоильной группой и Фишер с хлорацетильной группой.

В дальнейшем удалось достигнуть надежного различия в реакционной способности между N-концевой ацильной группой и пептидной связью благодаря модификации ацильного остатка. Это сделало возможным селективное отщепление ацильной защиты. Большой практический интерес представляют защиты амидного типа, получаемые на основе карбоновых и неорганических кислот, а также защитные группы на основе эфиров карбамидной кислоты, названные позднее защитными группами уретанового типа.

2.2.4.1.1.1. Защитные группы уретанового типа

Решающий перелом в развитии современной пептидной химии наступил с введением Бергманом и Зервасом [3] бензилоксикарбонильной группы (Z)*. Исходя из того факта, что N-бензильная группа сравнительно легко отщепляется при каталитическом гидрировании, они заменили этильную группу на бензильную в остатке карбамидной кислоты и получили защитную группу, которую можно удалить при гидрогениолизе. Бензилоксикарбонильная группа Z относится к наиболее часто используемым защитным группам для аминной функции. (В литературе часто та же самая группа называется карбобензизоксигруппой Cbo- или Cbz-.)

Введение бензилоксикарбонильной группы в аминокислоты проводится по Шоттен-Бауману реакцией с бензиловым эфиром хлоругольной кислоты в присутствии едкого натра, гидрокарбоната натрия или оксида магния.



Для введения бензилоксикарбонильной группы можно применять также бензил-4-нитрофенилкарбонат и подобные активированные эфиры, особен-

* Принятое для этой группы сокращение происходит от фамилии Зервас (Zervas).

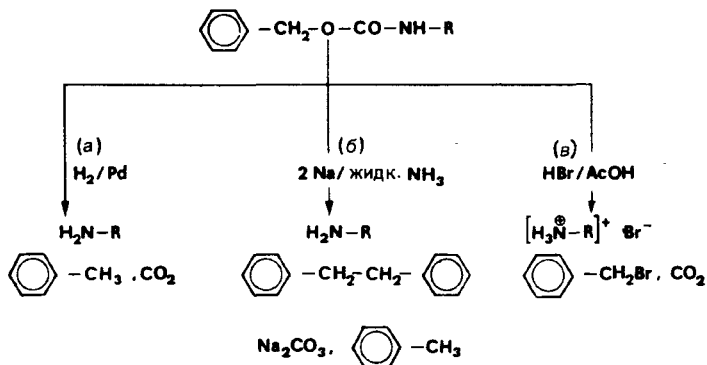


Рис. 2-6. Важнейшие реакции отщепления бензилоксикарбонильной группы. R — остаток аминокислоты или пептида.

но при бензилоксикарбонильном блокировании N^ω-лизина или ориитина после защиты α-аминной функции.

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

При каталитическом гидрировании в органических растворителях (уксусная кислота, спирты, ДМФ и др.) или в водно-органической фазе с катализаторами (палладиевая чернь, палладий на угле или палладий на сульфате бария) наряду со свободным пептидом получают не мешающие выделению толуол и диоксид углерода. Окончание выделения CO₂ означает одновременно завершение процесса отщепления. В том случае, если в пептиде присутствуют остатки цистеина или цистина, гидрогенолитического отщепления не происходит, но его можно проводить в присутствии эфирата трифторида бора [59] или 4 г-экв. циклогексиламина [60]. Такие же условия нужно соблюдать и при деблокировании в присутствии метионина. При восстановительном расщеплении натрием в жидком аммиаке [61] наряду с желаемым пептидом образуются 1,2-дифенилэтан и небольшие количества толуола; углекислота же связывается в карбонат натрия. При работе по этому методу одновременно с бензилоксикарбонильным остатком отщепляются N-тозилная, N-триметилная, N^{lm}-, S- и O-бензильные группы, а метиловые и этиловые эфиры частично переводятся в амиды. В качестве побочных реакций наблюдается частичное разрушение треонина, частичное деметилирование метионина, а также расщепление некоторых пептидных связей, например -Lis-Pro- и -Cys-Pro-.

Ацидолитическое расщепление проводят предпочтительно действием бромоводорода в ледяной уксусной кислоте (2 н. раствор); предлагались

также хлороводород, иодоводород в различных растворителях (в диоксиде, нитрометане, трифторуксусной кислоте). При ацидолитическом расщеплении наблюдаются, однако, побочные реакции. Например, в случае треонина и серина идет О-ацетилирование, в случае метионина — S-перезэтерификация, разрушаются триптофан и нитроаргинин, расщепляются бензиловые эфиры и амидные группы, а также происходит перезэтерификация метиловых и этиловых эфиров. Можно значительно снизить степень протекания этих нежелательных реакций, меняя условия реакции [62]. Бензилоксикарбонильная группа может отщепляться также под действием безводного жидкого фтороводорода [63]. С помощью жидкого HF можно удалить почти все известные защитные группы, за исключением N-тозилных, N-формильных, N-фталильных, N-бензильных и N-4-метоксибензильных остатков, а также метиловых и этиловых эфиров. Введением различных заместителей в бензилоксикарбонильную группу удается улучшить способность производных к кристаллизации, а также ступенчато изменять их чувствительность к действию отщепляющих агентов. Такими преимуществами обладает 4-метоксибензилоксикарбонильный остаток [64], который легко вводится при использовании кристаллического азида $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{OCON}_3$ и селективно удаляется безводной трифторуксусной кислотой при температуре $< 0^\circ\text{C}$; бензилоксикарбонильная группа при этом не затрагивается [65]. Для исключения побочных реакций 4-метоксибензильного катиона, получающегося при ацидолитическом отщеплении, требуются добавки анизол или резорцина.

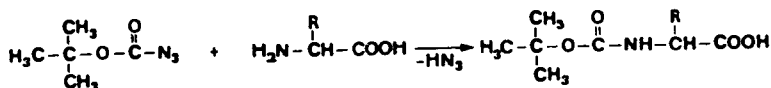
Швицер [66] предложил окрашенные 4-замещенные бензилоксикарбонильные защиты (как, например, 4-фенилазобензилоксикарбонил), которые облегчают аналитический контроль при операциях очистки. 4-Нитробензилоксикарбонильная группа [67] отщепляется гидрогенолизом легче незамещенной бензилоксикарбонильной группы, однако в качестве побочного продукта получается *p*-толуидин, который трудно отделить от продукта.

Представляют определенный интерес 3- и 4-галогензамещенные бензилоксикарбонильные защиты, а также 3-нитро- и 4-цианбензилоксикарбонильные группировки. Эти соединения отличаются повышенной стабильностью при селективном отщеплении ацидолизом *трет*-бутилоксикарбонильных групп от производных диаминокислоты. Наряду с уже известной фоточувствительной 3,5-диметоксибензилоксикарбонильной группой [68] были предложены другие защитные группы, отщепляемые фотохимически: 6-нитровератрилоксикарбонильная, 2-нитробензилоксикарбонильная [69], а также α,α -диметил-3,5-диметоксибензилоксикарбонильная [70]; последняя может сниматься при обработке 5%-ным раствором трифторуксусной кислоты в дихлорметане.

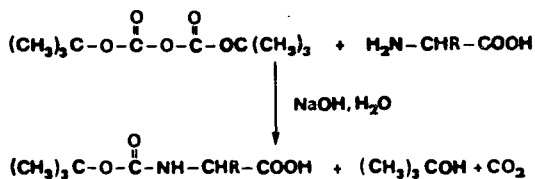
трет-Бутилоксикарбонильная группа [71] наряду с бензилоксикарбонильной является наиболее важной аминокзащитной группой. Особенное значение имеет тот факт, что ацильные защитные группы уретанового типа при постепенном наращивании пептидной цепи с С-конца предохраняют соответствующую аминокислоту от рацемизации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

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

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



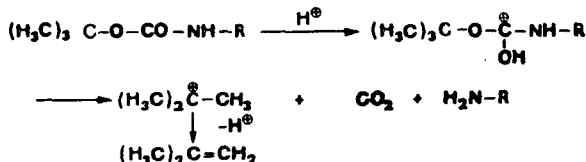
Он реагирует с солью аминокислоты в водно-диоксановой смеси в присутствии триэтиламина или оксида магния; pH можно также поддерживать с помощью 2—4 н. NaOH. Можно вести реакцию и с эфиром аминокислоты в пиридине. Шнабель предложил для введения Вос-группы методику с использованием pH-стата [73, 74]. Естественно, что для введения этой важной защиты было предложено много вариантов, из которых не все здесь могут быть рассмотрены. Несмотря на большие преимущества описанного метода ацилирования с помощью *трет*-бутилоксикарбонилазид, интересны и другие варианты введения этой группы, так как при перегонке *трет*-бутилоксикарбонилазид может произойти разложение со взрывом, а выделяющаяся во время реакции ацилирования азотистоводородная кислота очень токсична. Особое значение приобрел *трет*-бутилоксикарбонилфторид, который образуется из хлорфторфосгена и *трет*-бутанола при температурах около —25 °C и дает при строгом контроле pH *трет*-бутилоксикарбониламинокислоты с выходом > 90% [75]. *трет*-Бутил-S-[4,6-диметилпиридил-2-тио]карбонат [76] тоже является хорошим реагентом для введения *трет*-бутилоксикарбонильной группы. Превосходным агентом для этой цели оказался ди-*трет*-бутилпирокарбонат (Вос)₂O [77—79]:



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

Аминокислоты и пептиды, защищенные по аминогруппе *трет*-бутилоксикарбонилом, можно активировать всеми обычными методами кроме хлорангидридного, если получение хлорангидрида сопровождается выделением хлороводорода (синтез с помощью PCl₅, SOCl₂ и др.). В других случаях синтеза хлорангидридов, не сопровождающихся выделением HCl, можно использовать Вос-аминокислоты [79a].

Важнейшим отщепляющим реагентом для этой группы является хлороводород в ледяной уксусной кислоте, диоксане, эфире, нитрометане, этилацетате и др. Ацидолитическое деблокирование протекает по следующему механизму:



трет-Бутилоксикарбонильная группа гладко отщепляется также трифторуксусной кислотой в дихлорметане или безводной трифторуксусной кислотой при температурах $< 0^\circ\text{C}$ (последнему методу часто отдается предпочтение). Во время реакции отщепления может протекать *трет*-бутилирование индольного кольца триптофана или тиоэфирной группировки метионина.

Уже упомянутые различия в селективности между *трет*-бутилоксикарбонильной и бензилоксикарбонильной группами позволяют комбинировать защиты на α - и ω -аминных функциях.

Правда, в некоторых работах сообщалось о частичном деблокировании ω -аминогрупп, защищенных бензилоксикарбонилем, при ацидолитическом отщеплении *трет*-бутилоксикарбонила. Поэтому были предложены другие деблокирующие реагенты, такие, как эфират трехфторида бора, 2-меркаптоэтансульфокислота, водная трифторуксусная кислота и 98%-ная муравьиная кислота, которые, однако, не всегда гарантируют успешное проведение процесса. Предпринимались попытки использовать различные замещенные бензилоксикарбонильные остатки с целью повышения устойчивости к применяемым отщепляющим реагентам. Все это, однако, никоим образом не снижает большого значения *трет*-бутилоксикарбонильной группы в пептидном синтезе.

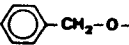
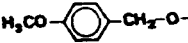
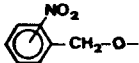
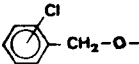
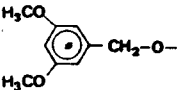
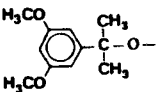
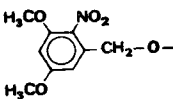
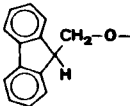
Наряду с упомянутыми предлагались и другие защитные группы уретанового типа (табл. 2-1).

Интересными свойствами обладает 2-[бифенилил-(4)]пропил-2-оксикарбонильная группа как защитная. Благодаря высокой селективности отщепления присоединение этой группы можно комбинировать с защитами ω -аминной, гидроксильной и карбоксильной функций на основе *трет*-бутильного остатка. К сожалению, здесь не рассматриваются в подробностях отщепления всех защит, представленных в табл. 2-1. (Желающие могут ознакомиться с этой проблемой по оригинальной литературе.)

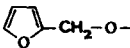
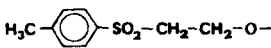

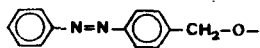
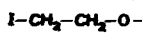
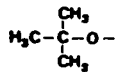
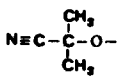
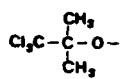
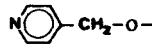
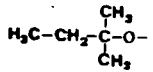
2.2.4.1.1.2. Защитные группы амидного типа

Аминозащитные группы этого типа (табл. 2-2) являются производными карбоновых кислот или замещенных неорганических кислот, они играют второстепенную роль по сравнению с защитными группами уретанового типа.

Таблица 2-1. N-Защитные группы уретанового типа $Y-\overset{\text{O}}{\parallel}{C}-NH-R$
(R —остаток аминокислоты или же пептида)

Защитная группа R	Сокращенное обозначение защитной группы R	Y	Снятие защиты
Бензилокси-карбонил- [3]	Z		H_2/Pd ; HBr/CH_3COOH ; $Na/жидк. NH_3$
4-Метокси-бензилоксикарбонил- [64, 65]	Z(OMe)		CF_3COOH ; H_2/Pd ; $Na/жидк. NH_3$
Нитробензилоксикарбонил-	Z(2-NO ₂) [67] Z(3-NO ₂) [80] Z(2-NO ₂) [69]		H_2/Pd (легко); $HBr/AcOH$ (затруднено по ср. с Z) Дополнительно фотолиз
Хлорбензилоксикарбонил-	Z(4-Cl) [81, 82] Z(3-Cl) [83, 84] Z(2-Cl) [80] Z(2, 4-Cl) [85]		Аналогично Z, но под действием H_2/Pd или $HBr/AcOH$ (труднее) CF_3COOH/CH_2Cl_2 (1:1)
3,5-Диметоксибензилоксикарбонил- [68]	Z(OMe) ₂		Фотолиз
α, α -Диметил-3,5-диметоксибензилоксикарбонил- [86]	Ddz		Фотолиз, 5%-ная CF_3COOH в CH_2Cl_2
2-Нитро-4,5-диметоксибензилоксикарбонил-(6-нитровератрилоксикарбонил-)	Ndz (Nvoc)		Аналогично Z; фотолиз
Флуоренил-9-метоксикарбонил- [87]	Fmoc		Жидк. NH_3 ; 2-аминоэтанол; морфолин

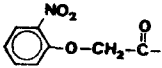

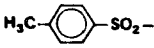
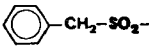
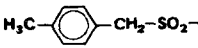
Продолжение табл. 2.1

Защитная группа R	Сокращенное обозначение защитной группы R	Y	Снятие защиты
Фурил-2-метоксикарбонил- (фурфурилоксикарбонил-) [88]	Foc		CF ₃ COOH; HCl/AcOH; H ₂ /Pd
2-(4-Толилсульфонил)-этоксикарбонил- [89]	Tsoc		C ₂ H ₅ ONa в этаноле
Метилсульфонилэтоксикарбонил- [383]	Msc		Катализируемое основаниями β-элиминирование
4-Фенилазобензилоксикарбонил- [90]	Paz		Аналогично Z
2-Иодэтоксикарбонил- [92]	Iec		Zn/метанол; электролиз
<i>трет</i> -Бутилоксикарбонил- [71]	Boc		CF ₃ COOH; CF ₃ COOH/CH ₂ Cl ₂ ; HCl в органических растворителях
2-Циан- <i>трет</i> -бутилоксикарбонил- [93]	Cuoc		Слабоосновные реагенты (водный K ₂ CO ₃ ; триэтиламин)
2,2,2-Трихлор- <i>трет</i> -бутилоксикарбонил- [94]	Tcboc		Кобальт(II)-фталацианиновый аннон в метаноле; Zn/AcOH
Изоникотинолсикарбонил- [95]	iNoc		Zn/AcOH; H ₂ /Pd; устойчив к кислотам
<i>трет</i> -Амилоксикарбонил- [96]	Aoc		CF ₃ COOH(анизол); CF ₃ COOH/CH ₂ Cl ₂ (1:1)

Продолжение табл. 2.1

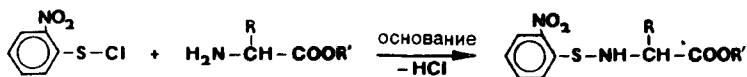
Защитная группа R	Сокращенное обозначение защитной группы R	Y	Снятие защиты
Адамантил-1-оксикарбонил- [97]	Adoc		CF ₃ COOH
1-[1-Адамантил]-1-метил-этоксикарбонил- [91]	Adroc		3%-ная CF ₃ COOH в CH ₂ Cl ₂ ; устойчив к гидрогенализу
Изоборнилоксикарбонил- [98]	Iboc		CF ₃ COOH; устойчив к H ₂ /Pd и основным реагентам
2-[Бифенилил-(4)]пропил-2-оксикарбонил- [99]	Broc		80%-ная AcOH
Пиперидин-оксикарбонил- [100]	Pipoc		Электролитическое восстановление; H ₂ /Pd
Циклопентилоксикарбонил- [101]	cPoc		HBt/AcOH; Na/жидк. NH ₃ ; устойчив к гидрогенализу (H ₂ /Pd)
α-Метил-2,4,5-триметилбензилоксикарбонил- [102]	Tmz		3%-ная (по объему) CF ₃ COOH в CHCl ₃ ; отщепляется легче, чем Broc, медленнее, чем Broc
Бензилоксазол-5-метил-оксикарбонил- [103]	Bic		Изомеризация в присутствии 3 экв. триэтиламина в ДМФ и сольволиз в водном буфере (pH 7)
(4-Фенназо-фенил)изопрпилоксикарбонил- [104]	Azoc		Аналогично Broc

Таблица 2-2. Аминозащитные группы ацильного типа Y—NH—R (R — остаток аминокислоты или пептида)^a

Защитная группа	Сокращенное обозначение защитной группы	Y	Снятие защиты
Формил- [112, 113]	For	$\text{H}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-$	Сольволиз; окисление, гидразинолиз
Трифторацетил- [111]	Tfa	$\text{CF}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-$	Разб. NaOH; Ba(OH) ₂ ; раствор аммиака
Ацетоацетил- [114]	Aca	$\text{H}_3\text{C}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-$	C ₆ H ₅ —NH—NH ₂ или же H ₂ N—OH в растворе уксусной кислоты
2-Нитрофеноксиацетил- [115]	Npa		Восстановление и последующее нагревание в H ₂ O до 100°C
Монохлорацетил- [116]	Mca	$\text{Cl}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-$	Амид пиперидин-1-тиокарбоновой кислоты
2-Нитрофенилтио- [105, 106]	Nps		Хлороводород в инертных растворителях, никель Ренея, тиольные реагенты; дибензолсульфимид
4-Толуолсульфонил- [107]	Tos		Na/жидк. NH ₃ ; HBr/AcOH (феиол); иодоводородная кислота/иодид фосфония
Бензилсульфонил- [108]	Bes		Na/жидк. NH ₃ ; гидрогенолиз
4-Толилметилсульфонил- [117]	Tms		HF/анизол (0°C, 60 мин)

^a Фталильная группа не включена в таблицу по структурным соображениям.

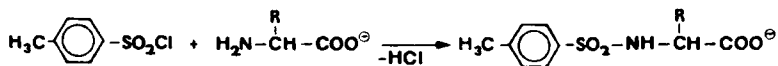
2-Нитрофенилтиогруппа, впервые описанная в работе [105], была более подробно изучена применительно к пептидной химии Зервасом и др. [106]. Эта группа, часто называемая по рекомендации IUPAC — IUB **2-нитрофенилсульфенильной группой**, представляет большой практический интерес. Она вводится сравнительно просто при действии на натриевые соли аминокислот ($R' = Na$) или на эфиры аминокислот ($R' = \text{алкил}$) 2-нитрофенилсульфенилхлорида в присутствии эквивалентного количества NaOH или триэтиламина:



Отщепление этой группы можно проводить мягким ацидолизом под действием 2 экв. хлороводорода в эфире, этилацетате и т. п. или же 1+1,1 экв. хлороводорода в метаноле или других спиртах (в последнем случае получается легко удаляемый 2-нитрофенилсульфениловый эфир). Кроме того, нитрофенилсульфенильную группу можно удалить с помощью никеля Ренея (Майенхофер, 1965 г.), меркаптанами (Фонтана и др., 1966 г.), нуклеофильными тиольными реагентами (Кеслер и Изелин, 1966 г.), дибензолсульфимидом (Подушка, 1968 г.) и т. д. Отмечалось, что при десульфенилировании пептидов с С-концевым (или расположенным в середине цепи) триптофаном почти количественно образуется 2-(2-нитрофенилтио)индолное производное. Этой побочной реакции можно в значительной степени избежать, если, согласно рекомендации Вюнша и сотр., добавлять производные индола (10—20 экв.).

4-Толуолсульфонильная группа, называемая также **тозилъной**, впервые была применена для пептидных синтезов в 1926 г. [107]. Фишер уже в 1915 г. сообщал о возможности отщепления этой группы от N-тозиламинокислот обработкой смесью иодоводородной кислоты с иодидом фосфония.

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



Отщепление тозилъной группы [108] производится восстановлением натрием в жидком аммиаке. Более удобным является экстракционный метод, разработанный позднее [109]. Механизм реакции деблокирования не совсем ясен, несмотря на многочисленные исследования (в особенности Рудингера и сотр.). При деблокировании наблюдались различные побочные реакции: расщепление связи Lys — Pro, деметилирование метионина, частичное разрушение треонина и триптофана и др.

Хорнер в 1965 г. описал метод восстановительного расщепления с помощью тетраметиламинильного радикала, образующегося при разрядке тетраметиламмония на ртутном катоде. Этим методом можно удалять также и N-бензоильный остаток [110], так что предложенная еще в начале века Курциусом амнозащитная группа теперь тоже может относиться к селективно удаляемым.

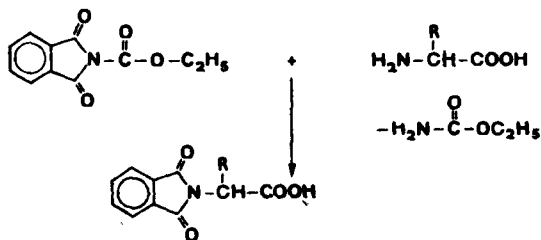
На возможность детоцилирования по Фишеру (иодоводород + иодид фосфония в уксусной кислоте) при 60 °С уже указывалось. Деблокирование проходит также с HBr/AcOH в присутствии фенола в течение 16 ч при комнатной температуре (Рудингер и сотр., 1959 г.).

Благодаря высокой стабильности тозилъного остатка в условиях отщепления защитных групп уретанового типа эта защитная группа часто применяется для блокирования N^ω-аминофункций, как, например, гуанидиновой группы аргинина. Проблема детоцилирования еще ждет своего окончательного решения.

Трифторацетильная группа впервые применена в пептидной химии в 1952 г. [111]. Она вводится без рацемизации при реакциях с ангидридом трифторуксусной кислоты в безводной трифторуксусной кислоте, с тиоэтиловым эфиром трифторуксусной кислоты или же с фениловым эфиром трифторуксусной кислоты. Деблокирование проходит при комнатной температуре под действием 0,01—0,02 н. NaOH, разбавленных растворов аммиака или гидроксида бария. Для присоединения N-трифторацетил-аминокислот неприемлем метод смешанных ангидридов.

При щелочном отщеплении этой защитной группы наблюдались различные побочные реакции. Как альтернатива в качестве отщепляющего реагента был предложен боргидрид натрия в этаноле, причем в качестве защиты карбоксила в этом случае должен быть использован *трет*-бутиловый эфир. При этих условиях бензилоксикарбонил-, *трет*-бутилоксикарбонил- и *трет*-бутилэфирные группы устойчивы. При активировании трифторацетиламинокислот существует опасность рацемизации, благодаря чему значение этой защитной группы для целей синтеза не столь велико. Широкое распространение получили эфиры N-трифторацетиламинокислот и эфиры пептидов; благодаря высокой летучести эти производные используются в газовой хроматографии.

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



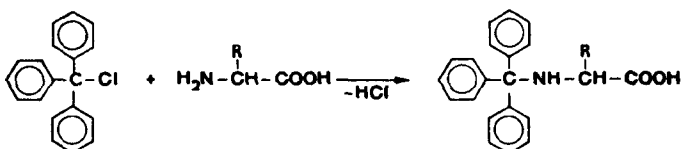
Отщепление фталильной группы [120] производится ацетатом гидразина в метаноле. Этот мягкий метод деблокирования, протекающий при кажущемся pH 6,5 в случае щелочелабильных пептидных производных следует предпочесть обычным методам гидразинолитического расщепления.

Устойчивость фталильной группы в условиях деблокирования многих других защитных групп должна была бы способствовать ее широкому применению. Однако фталильная защита лишь иногда используется в определенных синтезах; ее применение ограничено трудностями отделения получаемого во время гидразинолитического расщепления фталилгидразида от производного пептида, а также уже упоминавшейся неустойчивостью защитной группы в щелочных условиях.

2.2.4.1.1.3. Защитные группы алкильного типа

N-Бензильная и N,N-дибензильная защитные группы не представляют большого интереса для пептидного синтеза. Деблокирование таких защит возможно лишь при каталитическом гидрировании в присутствии палладиевой черни при 70—80 °C.

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

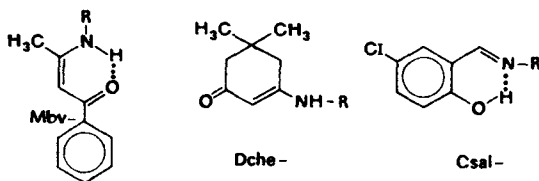


Можно исходить также из эфиров аминокислот и удалять эфирную группу после тритилирования. Однако омыление часто бывает затруднительным. Встречаются сложности и при селективном гидрогенолитическом отщеплении бензильной группы от соответствующих тритилированных бензиловых эфиров аминокислот. При применении в качестве растворителя диоксана удаляется только бензильная эфирная группировка. Активированию карбоксильной группы тритилированных аминокислот мешают стерические препятствия, создаваемые тремя объемными фенильными остатками. Наилучшие результаты дает применение карбодиимидного метода (разд. 2.2.5.4). Кроме того, хорошие результаты получаются с N-гидроксисукцинимидными эфирами [124]. Отрицательное стерическое влияние тритильной группы меньше сказывается на поведении карбоксильной функции пептидов, поэтому в случае пептидов омыление и активирование протекают без особых трудностей. Можно использовать преимущество тритильной защиты, заменив ею другую защитную группу на какой-то стадии синтеза пептида. Тритильная группа может отщепляться в мягких ус-

ловиях при ацидолизе хлороводородом (соляной кислотой) в различных органических растворителях, трифторуксусной кислотой (можно использовать также водную трифторуксусную кислоту или трифторуксусную кислоту в водной уксусной кислоте) при $0 \div -10^\circ\text{C}$, кратковременным нагреванием с ледяной уксусной кислотой или многочасовой обработкой 70—80%-ной уксусной кислотой. Удаляется тритильный остаток и при каталитическом гидрировании, причем отщепление идет медленнее, чем удаление в тех же условиях бензилоксикарбонильной группы. Все эти методы отщепления позволяют селективно удалять тритильные остатки в присутствии бензилоксикарбонильной, *трет*-бутилоксикарбонильной, *O*-бензильной, *O*-*трет*-бутильной и *S*-бензильной групп. Были предложены и такие методики детритилирования, когда N^α -тритильный остаток селективно удаляется в присутствии N^ω -, N^{im} -, *O*- и *S*-тритильных групп. Несмотря на столь многочисленные возможности комбинаций, значение тритильной защиты ограничено ее высокой лабильностью к кислотам и уже упомянутыми проявлениями стерического эффекта.

Далее следует упомянуть защитные группы, которые представляют только теоретический интерес и были до сих пор использованы в особых случаях.

1-Метил-2-бензоилвинильная группа (Mbv) получается при взаимодействии бензоиллацетона с калиевыми солями аминокислот и отщепляется при кратковременной обработке разбавленной соляной кислотой или уксусной кислотой (Дане и сотр., 1962 г.):



R — остаток аминокислоты или пептида

5,5-Диметил-3-оксоциклогексен-1-ильная группа (Dche) вводится при реакции эфиров аминокислот с димедоном (Гальперн и сотр., 1964 г.). Она устойчива к кислотам и каталитическому гидрированию. Для активирования *N*-[5,5-диметил-3-оксоциклогексен-1-ил]аминокислот подходят карбодимидный и азидный методы, а также метод Вудварда. Можно применять также тио- и 4-нитрофениловые эфиры. Отщепление этой защитной группы производится бромной водой или нитритом натрия в уксуснокислом растворе.

Макинтайр (1947 г.) описал блокирование аминофункции аминокислоты 2-гидроксизамещенными ароматическими альдегидами. Получающиеся шиффовы основания хорошо кристаллизуются и являются очень устойчивыми соединениями благодаря внутримолекулярным водородным связям.

N-(5-хлорсалицил)-группа (*Csal*) была предложена в 1962 г. Шиханом и др. для защиты *N*-концевых аминокислот и последующего связывания их в дипептиды карбодимидным методом. Деблокируют их при комнатной температуре с помощью 1 н. HCl.

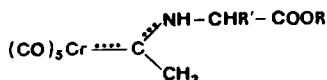
Растущий интерес вызывают защитные группы, такие, как введенная Тессером Msc-группа (табл. 2-1), которые могут быть отщеплены основаниями.

В 1976 г. Кунц предложил 2-(метилтио)этоксикарбонил $\text{CH}_3\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CO-NH-R}$ (Mtc) как защитную группу. Такие соединения можно сделать более лабильными посредством метилирования или окисления в сульфон и отщеплять β -элиминированием по аналогии с методом Тессера. Такие же свойства должны иметь и фосфониевые соединения, такие, как *фосфонийэтоксикарбонильные производные* $(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{P}^+\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CO-NH-R}$.

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

Тозиламинокарбонил-группа (4-тозилсульфонилкарбамоильная группа) $\text{H}_3\text{C-C}_6\text{H}_4\text{-SO}_2\text{-NH-CO-NH-R}$ (Tас) вводится с помощью 4-тозилизоцианата. Отщепление Tас происходит при нагревании с различными 95%-ными спиртами (85—105 °C).

Теоретический интерес имеет предложенный Вайсом и Фишером комплекс хрома следующего состава:



2.2.4.2. Защитные группы для карбоксильных и амидных функций

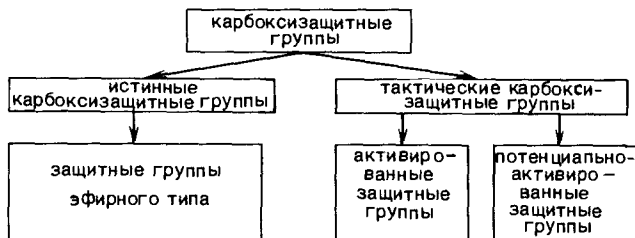
При пептидном синтезе, как уже указывалось в разд. 2.2.2, карбоксильная функция аминокомпонента тоже должна быть защищена.

Проще всего защита карбоксильной группы достигается *солеобразованием*. Соли аминокислот со щелочными и щелочноземельными металлами обычно реагируют в воде или в водном диоксане с соответствующим образом активированным карбоксикомпонентом. Большое значение имеют также соли пептидов с третичными основаниями (триэтиламин, трибутиламин, N-метилморфолин, N-этилпиперидин, 1,1,3,3-тетраметилгуанидин и др.). Эти соли позволяют вести пептидный синтез в органических растворителях, главным образом в диметилформамиде. Для конденсации подходят методы активированных эфиров, галогенангидридов, смешанных ангидридов и азидный. Преимущество такого пути в том, что по окончании реакции карбоксильная функция освобождается подкислением. При синтезе дипептидных производных из солей аминокислот встречаются и с затруднениями. Например, при частичном омылении активированного эфира получают смесь N-защищенного дипептида и N-защищенного карбоксильного компонента. Разделение этих продуктов крайне затруднительно. Поэтому более выгодно вводить в реакцию соли ди- или трипептидов, так как здесь возможно разделение на основе различий в растворимости исходного и конечного продуктов.

Кроме того, в случае использования активированных эфиров возможна перэтерификация с образованием активированного эфира конечного продук-

та. Этот активированный эфир может вступать в реакцию с еще не прореагировавшим аминокомпонентом, что приводит к появлению пептидов с большой молекулярной массой.

Описанный способ не является универсально применимым, поэтому для защиты карбоксильной функции аминокислоты (или пептида), подлежащей ацилированию, необходимо применять обратимо отщепляемые группировки. Для этой цели в первую очередь подходят различного типа эфиры. Амидные группы служат, как правило, достаточной защитой, если входят в состав растущего пептида. Для улучшения растворимости амидов пептидов в органических растворителях нужно блокировать амидную группу. Следует различать карбоксизащитные группы, которые по окончании синтеза пептида или пептидного фрагмента снимаются с регенерацией свободной карбоксильной группы и такие, которые после получения фрагмента либо прямо, либо после соответствующей обработки превращаются в группы, способные к дальнейшему аминолнзу. Эти защиты названы Вюншем [125] как *истинные*, или *потенциально активные, карбоксизащитные группы*. Принята следующая классификация защитных групп:



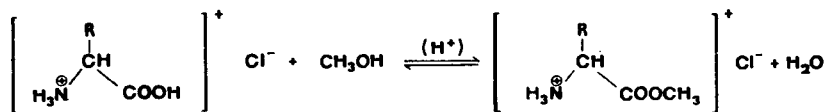
2.2.4.2.1. Истинные карбоксизащитные группы

Под истинными защитными группами понимают соответственно определению такие, которые после синтеза пептида или пептидного фрагмента отщепляются с регенерацией исходной карбоксильной группы.

2.2.4.2.1.1. Защитные группы эфирного типа

Преобладающее число карбоксизащитных групп производится на основе первичных, вторичных и третичных спиртов. Для приготовления эфиров аминокислот служат методы, известные из органической химии, причем исходят либо из свободной аминокислоты, либо из N-замещенного производного аминокислоты.

По классическому методу этерификации (метод Фишера) проводят реакцию гидрохлорида аминокислоты с соответствующим спиртом в присутствии хлороводорода как катализатора [126]:



Согласно закону действующих масс, количественный перевод аминокислоты в соответствующий эфир достигается тем, что спирт берут в большом избытке, а образующуюся воду удаляют из сферы реакции, например, азеотропной отгонкой. Наряду с хлороводородом в качестве катализаторов были предложены эфират трифторида бора, уксусный ангидрид, ацетилхлорид, тионилхлорид и др. (в последнем случае образование эфира протекает по другому механизму). Этерификация с тионилхлоридом предложена Бреннером и др. [127]. При этом в качестве промежуточного продукта реакции из $SOCl_2$ и CH_3OH образуется, вероятно, метиловый эфир хлорсульфиновой кислоты $H_3CO-SO-Cl$, который реагирует с аминокислотой с выделением SO_2 и образованием метилового эфира. По этому методу можно получать также этиловые и бензиловые эфиры. Эфиры из свободных аминокислот можно получать и другими способами, например переэтерификацией или реакцией с олефинами (последнюю используют для синтеза *трет*-бутиловых эфиров).

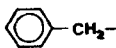
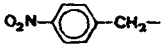


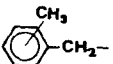
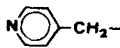
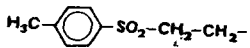
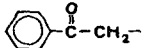
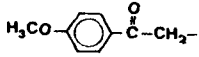
N-Защищенные аминокислоты этерифицируют реакцией с алкилгалогенидами в присутствии третичных аминов или с диазометаном или производными диазометана и т. д. N-Защищенные аминокислоты и пептиды можно превращать в соответствующие эфиры в очень мягких условиях при реакции их цезиевых солей с алкилгалогенидами [128]. В табл. 2-3 приведены некоторые важные карбоксизащитные группы; наибольшее практическое значение имеют метиловые, этиловые, бензиловые, 4-нитробензиловые и *трет*-бутиловые эфиры.

Метиловые эфиры (-OMe) и этиловые эфиры (-OEt) применялись в пептидном синтезе уже Фишером и Курциусом. Снятие этих защит по окончании пептидного синтеза проводят мягким щелочным гидролизом в диоксане, метаноле (этаноле), ацетоне, ДМФ с добавлением различных количеств воды. Названные алкиловые эфиры следует применять для синтеза коротких пептидов, так как с ростом цепи гидролитическое расщепление затрудняется, а применение жестких условий гидролиза повышает опасность побочных реакций. Следует избегать избытка щелочи, в противном случае может произойти рацемизация и другие побочные реакции. Оба алкильных эфира устойчивы к гидрогенолизу и мягкому ацидолизу. При гидразинолизе они переходят в гидразиды, что можно использовать для дальнейшей конденсации фрагментов с помощью азидного метода. При аммонолизе метиловые и этиловые эфиры дают амиды. Это применяют в тех случаях, когда C-концевая аминокислота должна нести амидную группу.


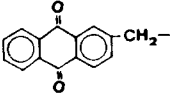
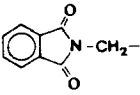

Бензиловые эфиры (-OBzl) [129] свободных аминокислот получают при прямой этерификации бензиловым спиртом в присутствии кислых катализаторов (4-толуолсульфокислота, хлороводород, бензосульфокислота, полифосфорная кислота и др.). Образующаяся при этерификации вода уда-

Таблица 2-3. Карбоксизащитные группы эфирного типа

$$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{Y}-\text{O}-\text{C}-\text{R} \end{array}$$

Эфир аминокислоты	Y	Снятие защиты
Метиловый Этиловый	CH_3- $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-$	Щелочной гидролиз; ферментативные методы (трипсин или химотрипсин); с 0,1 н. NaOH, pH 7,0
Бензиловый [129]		H_2/Pd ; насыщ. HBr/AcOH; Na/жидк. NH_3 ; жидк. HF; щелочной гидролиз
4-Нитробензиловый		H_2/Pd ; щелочной гидролиз; Na/жидк. NH_3 ; устойчив против HBr/AcOH
<i>трет</i> -Бутиловый [130, 131]		CF_3COOH ; насыщ. HCl/AcOH; 2 н. HBr/AcOH; эфират трифторида бора/AcOH
4-Метоксибензиловый [132, 133]		CF_3COOH (анизол) при 0°C; HCl/нитрометан; H_2/Pd ; жидк. HF; щелочной гидролиз
Метилзамещенный бензиловый [134]	 (2,4,6-триметил- и пентаметилбен- зиловый)	CF_3COOH при 20°C; 2 н. HBr/AcOH
Пиридил-4-метиловый (4-пиколиловый) [135]		H_2/Pd ; Na/жидк. NH_3 ; щелочной гидролиз; электролитическое восстановление
2-(Толуол-4-сульфо- нил)-этиловый [136]		β -Элиминирование в смеси вода/диоксан с раствором Na_2CO_3 при 20°C
Фениациловый [137]		Тиофеиолят иатрия; H_2/Pd ; Zn/AcOH; фотолиз
4-Метоксифениациловый [138]		Фотолиз при УФ-облучении при 20°C

Продолжение таблицы 2-3.

Эфир аминокислоты	Y	Снятие защиты
Дифенилметилловый (бизгидриловый) [139]		H_2/Pd ; CF_3COOH при 0°C ; разб. HCl/AcOH ; эфират три- фторида бора/ AcOH (1:6) при 25°C
Аитрахинон-2-метило- вый [140]		H_2/Pd ; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ в водно-ди- оксановом растворе, pH 7—8; фотолиз
Фтальимидометилловый [141]		Тиофенолят натрия; Zn/AcOH ; N_2H_4 ; $\text{HCl}/\text{орг.}$ рас- творитель; $(\text{CH}_3)_2\text{NH}/\text{этанол}$
Фениловый [142]		Омыление, pH 10,5 (0,8 экв. H_2O_2)
Триметисилиловый [143, 144]	$(\text{CH}_3)_3\text{Si}-$	Сольволиз водой или спиртом
2-Триметилсилилэти- ловый [145]	$(\text{CH}_3)_3\text{Si}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	F^-

ляется азеотропной отгонкой с подходящим растворителем (бензол, толуол, тетрагидрид углерода). Для получения бензиловых эфиров пригоден также и тионилхлоридный метод [127]. Синтезы бензиловых эфиров N-замещенных аминокислот проводят с использованием дициклогексилкарбодиимида, тионилхлорида и сульфурилхлорида, а также методами перегруппировки. Для расщепления бензиловых эфиров применяют каталитическое гидрирование и ацидолиз насыщенным раствором бромоводорода в уксусной кислоте (12 ч при комнатной температуре или 1-2 ч при $50-60^\circ\text{C}$). Используют также натрий в жидком аммиаке, жидкий фтороводород и щелочной гидролиз. Ацидолитическое расщепление в названных условиях может иногда задевать и пептидные связи.

4-Нитробензиловые эфиры ($-\text{ONb}$) получают, используя те же методы, что и для незамещенных бензиловых эфиров. N-Замещенные аминокислоты и пептиды легко реагируют с 4-нитробензилгалогенидами в присутствии третичных оснований, превращаясь в соответствующие эфиры. 4-Нит-

робензиловые эфиры устойчивы к бромоводороду в уксусной кислоте и даже жидким фтороводородом отщепляются не полностью. Снятие этой защиты легко проходит при гидрогенолизе, щелочном гидролизе и восстановлении натрием в жидком аммиаке.

трет-Бутиловые эфиры ($-\text{OBu}^t$) [130, 131] имеют чрезвычайно большое значение для синтеза пептидов. *трет*-Бутилэфирная группа очень легко отщепляется при ацидолизе, но она устойчива к гидрогенолизу и заметно устойчива в условиях щелочного гидролиза, гидразинолиза и аммонолиза. Далее следует отметить ее устойчивость в условиях кислотного отщепления 2-нитрофенилтио-, тритильной и 2-[бифенил-(4)]пропил-2-оксикарбонильной групп. Эфират трифторида бора в уксусной кислоте селективно отщепляет *трет*-бутилэфирную группу в присутствии бензилоксикарбонильной группы. Дифференцированный ацидолиз *трет*-бутилоксикарбонильной группы удается лишь в очень редких случаях. *трет*-Бутиловые эфиры аминокислот можно получать присоединением изобутилена к аминокислоте при катализе кислотами или перэтерификацией с *трет*-бутиловым эфиром уксусной кислоты. В этих условиях гидроксильные группы серина и треонина также переводятся в *трет*-бутилэфирные. Разумеется, что N-защищенные аминокислоты (бензилоксикарбониламинокислоты) тоже можно превращать в эфиры при реакции с изобутиленом в присутствии серной кислоты или перэтерификацией с *трет*-бутиловым эфиром уксусной кислоты в присутствии хлорной кислоты. Этот путь можно рекомендовать и в том случае, если по причине плохой растворимости некоторые аминокислоты не удастся этерифицировать другим способом.

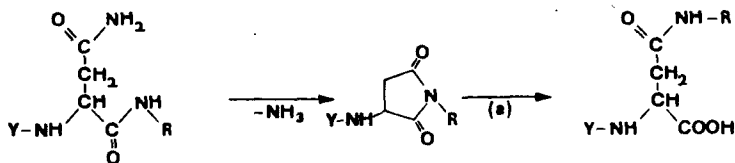
Пиридил-4-метилловый эфир [135] благодаря основным свойствам позволяет обратимо фиксировать пептиды на катионообменниках после каждой ступени синтеза. Таким путем можно отделять пептиды от побочных продуктов. Преимущество этого метода состоит в том, что в противоположность твердофазному синтезу здесь все реакции протекают в гомогенной фазе. Похожий метод с применением 4-диметиламинобензилового эфира описан в работе [146].

Нерастворимые полимерные эфиры являются чрезвычайно интересным классом карбоксизащитных групп, из которых полимерный бензиловый эфир является прототипом разработанного Меррифилдом твердофазного синтеза пептидов. Проблема синтеза на полимерных носителях излагается (разд. 2.2.7).

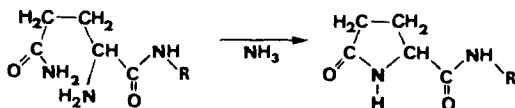
Карбоксизащитные группы в случае аминокислот могут применяться как для α -, так и для ω -карбоксильной функции. Относительно просто можно получать пептиды с С-концевыми аминокислотами. Пептиды с аминокислотами в середине цепи или с N-концевыми аминокислотами нельзя получить без специального блокирования. Поэтому для наращивания пептидов с α - или ω -аминокислотами требуется селективное блокирование одной карбоксильной группы.

2.2.4.2.1.2. Защитные группы для амидной функции

Амид карбоновой кислоты представляет собой нейтральную функциональную группу, которая блокирует карбоксильную функцию и поэтому не нуждается в дополнительной защите. Это верно также и для концевой α -амидной функции в условиях обычных реакций конденсации и деблокирования, если не считать иногда наблюдающейся дегидратации с образованием нитрила. Гораздо чаще побочные реакции происходят у ω -амидных групп аспарагина и глутамина. Дегидратация амидной группы до нитрила может происходить при применении дициклогексилкарбодиимида и, кроме того, при гидразиолизе, если он необходим в ходе пептидного синтеза; ω -амидные группы могут переводиться в гидразидные. Отщепление защитных групп в спиртовых растворах может приводить к алкоголизу амидных группировок. Образование сукцинимидных производных в случае пептидов, содержащих аспарагин с незамещенной амидной функцией, влечет за собой нежелательную транспептидацию (а):



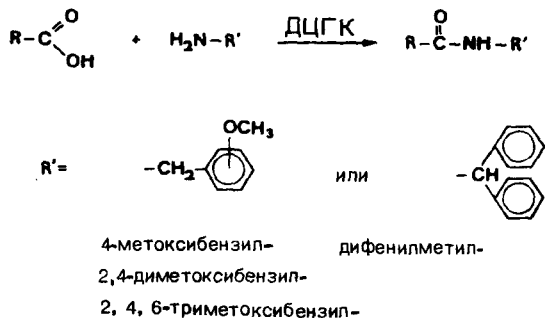
Пептиды, имеющие N-концевой глутамин с незащищенной аминной функцией, легко превращаются в пироглутамилпептиды:



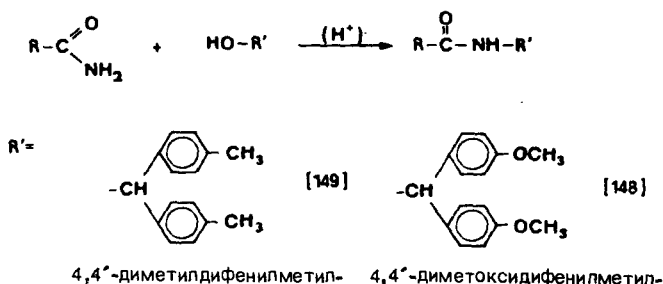
Для исключения описанных побочных реакций и особенно для улучшения растворимости в органических растворителях пептидов, имеющих амидные группы, большое значение имеет обратимое блокирование амидных функций. Как известно, незамещенные амидные функции склонны к образованию внутри- или же межмолекулярных водородных связей. При этом растворимость в органических растворителях ухудшается и одновременно повышается растворимость таких производных в воде, что нежелательно при синтезе пептидов.

Из множества теоретически возможных вариантов блокирования в практических условиях пептидного синтеза особенно пригодными оказались замещенные бензильные группы. Они могут легко отщепляться ацидлизом. Для введения метоксизамещенного бензильного остатка или же незамещенного дифенилметильного остатка N-защищенное производное аминокислоты (R) со свободной карбоксильной функцией конденсируют с соот-

ветствующим амином (R') с помощью днциклогексилкарбодиимида [147]:



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



Все амидозащитные группы могут отщепляться жидким фтороводородом [149]. За исключением 4-метоксibenзильной и дифенилметильной групп, удаление защитных групп удастся уже при обработке трифторуксусной кислотой при 20 °C. Добавка анизола благоприятствует реакции отщепления.

2.2.4.2.2. Тактические карбоксизащитные группы

Для специальных синтетических целей вводятся карбоксизащитные группы, которые после получения пептидного фрагмента не отщепляются с освобождением карбоксильной функции как истинные защитные группы, а непосредственно или после химического превращения выступают в роли активированных производных, пригодных для соединения фрагментов.

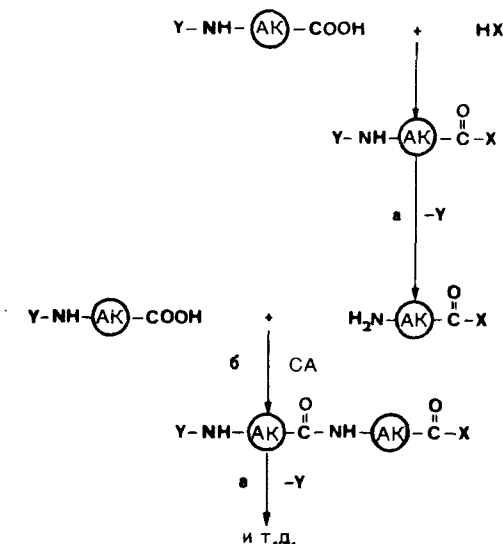
2.2.4.2.2.1. Активированные карбоксизащитные группы

Карбоксизащитные группы этого типа могут применяться для пептидных синтезов только в определенных условиях, так как аминокомпоненты с активированными карбоксильными группами могут вступать в реакцию не только с карбоксильными компонентами, но и давать нежелательные побочные продукты в результате внутри- и межмолекулярной самоконденсации. Для того чтобы обеспечить одно-значное течение реакции, в пептидном синтезе применяют карбоксильные компоненты, имеющие более высокий потенциал ацилирования, чем активированная карбоксизащитная группа аминокомпонента.

Такой подход был введен в пептидную химию в 1959 г. Гудманом и Стьюбеном [150] (в мировой литературе известен как *backing-off-метод*).

В качестве активированных карбоксизащитных групп применяют, как правило, различные активированные эфиры (разд. 2.2.5.3). В принципе к ним следовало бы отнести также метиловые и этиловые эфиры, так как они обладают неким потенциалом ацилирования (образование диоксопиперазинов) и могут аммонолизом превращаться в амиды. Однако из-за слишком низкой (для пептидного синтеза) активности названные эфиры здесь не рассматриваются.

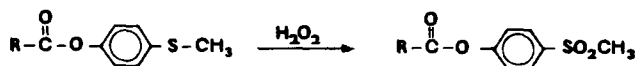
В случае *backing-off-метода* N-защищенная аминокислота (для предотвращения рацемизации предпочтительны защитные группы уретанового типа) переводится в активированный эфир (X — активирующий компонент) и после этого деблокируется. Полученный аминокомпонент связывается с другой N-защищенной аминокислотой (карбоксильный компонент) преимущественно методом смешанных ангидридов (CA), давая защищенное производное дипептида. Последовательным повторением стадий *a* и *б* можно получить желаемый фрагмент:



Разумеется, не все известные активированные эфиры подходят для этих целей. Подходящие активированные эфиры подбираются опытным путем.

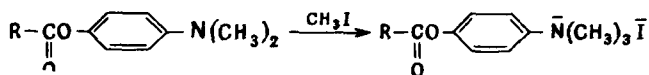
2.2.4.2.2.2. Потенциально активируемые карбоксизащитные группы

В отличие от уже рассмотренных тактических защитных групп потенциально активируемые карбоксизащитные группы ведут себя во время пептидного синтеза как настоящие защитные группы. Другими словами, в этом случае можно пренебречь опасностью побочных реакций самоконденсации. В качестве прототипа таких защитных групп можно назвать 4-метилтиофениловый эфир [151]. Получение его проводится по *backing-off*-методу. Перед конденсацией фрагментов проводят активирование окислением пероксидом водорода или 3-хлорпербензойной кислотой:



Полученный 4-метилсульфонилфениловый эфир обладает свойствами активированного эфира и может использоваться для дальнейших синтезов в качестве карбоксильного компонента (R—N-замещенный остаток пептида).

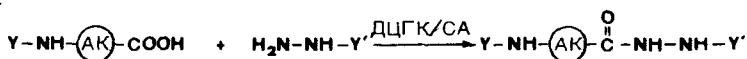
Другим примером эфиров с переменной активностью служат N,N-диметиламинофениловые эфиры. Такие эфиры неактивны, они не взаимодействуют с аминами. Однако после метилирования с помощью метилиодида образующаяся четвертичная аммониевая группа вызывает значительную активацию эфира [151a]:



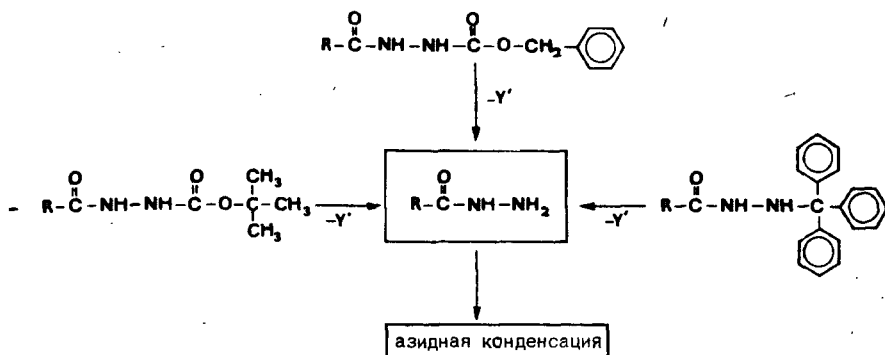
По своей активности они близки к *n*-нитрофениловым эфирам и могут быть использованы для образования новых пептидных связей.

Еще большее значение имеют N'-замещенные гидразиды, которые после получения фрагментов селективно деблокируются и далее могут вводиться в азидную конденсацию. Для N'-замещения в гидразиде подходят с небольшими исключениями практически все амнозащитные группы, из которых важнейшими являются бензильноксикарбонил [152], *трет*-бутилоксикарбонил [153] и тритил [154].

N'-Замещенные гидразиды получают при реакции N-защищенных аминокислот с частично защищенными гидразинами с помощью дициклогексилкарбодимида (ДЦГК) или по методу смешанных ангидридов (СА):



После отщепления Y соответствующее производное используется для синтеза фрагмента, а по окончании синтеза проводят селективное деблокирование Y' (Y' = Z-, Вос- или Tgt-). N-Защищенный гидразид пептида можно после перевода в азид использовать далее в качестве карбоксильного компонента (R—N-защищенный остаток пептида):

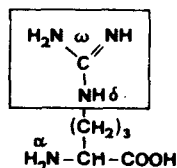


4-Метилтиофениловый эфир нельзя использовать для синтеза фрагментов, содержащих серосодержащие остатки аминокислот, из-за необходимости окислительного активирования. Применение N'-замещенных гидразидов N-аминаминокислот не лимитировано и позволяет планировать самые разнообразные синтезы, разумно комбинируя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

2.2.4.3. ω -Защитные группы трифункциональных аминокислот

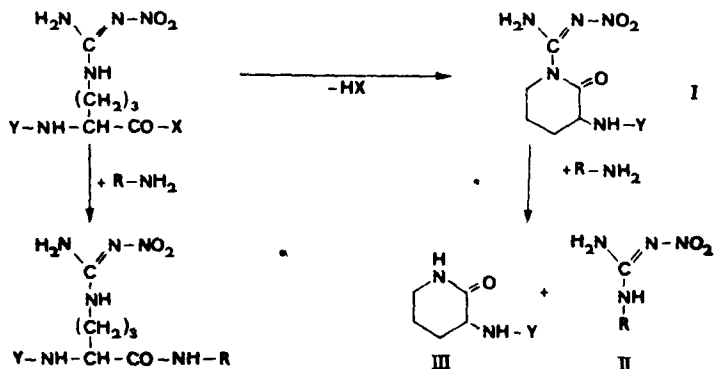
Если в пептидном синтезе используют полифункциональные аминокислоты, такие, как глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, лизин, аргинин, серин, тирозин и т. д., то функциональная группа их боковой цепи должна быть селективно блокирована. Нужные для этого защитные группы не отличаются от тех, которые применяются для блокирования α -амино- или α -карбоксильных групп. Собственно, проблему представляет собой селективное блокирование, в то время как выбор комбинаций защитных групп является вопросом тактики. Точно так же требуется блокировать тиольные и гуанидиновые группы. В других случаях можно предотвратить или свести к минимуму побочные реакции, обусловленные третьей функцией, поддерживая специфические условия при конденсации. Несмотря на эти возможности, на практике предпочитают варианты с максимальной защитой.

2.2.4.3.1. Защита гуанидиновой функции аргинина



Несмотря на большое число описанных возможностей блокирования сильносоосновной гуанидиновой функции, идеальной защитной группы для нее до сих пор не найдено. Применяют в основном нитрование, N^ω -моно- или же N^ω, N^δ -диацилирование или протонирование. Можно избежать защиты гуанидиновой группы, если вводить ее реакцией амидинирования в пептиды, содержащие орнитин.

Применение нитрогруппы для защиты гуанидиновой функции предложено в работе [155]. В случае применения нитрогруппы как защиты гуанидиновой функции встречаются трудности при активировании таких производных. В качестве побочной реакции происходит образование лактама:



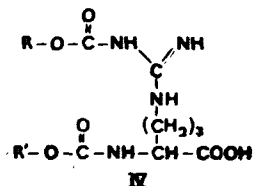
Полученный как побочный продукт лактам (I) дает при аминолизе производное замещенного нитрогуанидина (II) и лактам орнитина (III) [156]. Нитрогруппа отщепляется удобнее всего гидрированием в присутствии палладия или никеля Ренея или же в случае серусодержащих остатков аминокислот гидрированием с палладиевым катализатором при добавке эфира трифторида бора, хотя этот метод деблокирования не свободен от побочных реакций. Успешно применялся также метод расщепления с помощью HF [63].

Для N^ω -моноацилирования была предложена *тозильная группа*, которая, однако, тоже не полностью исключает образование лактама. Для детозилирования подходит обработка натрием в жидком аммиаке, также сопровождающаяся побочными реакциями или же жидким фтороводородом.

Мезитилен-2-сульфонильная группа (Mts), которую можно вводить при аналогичных условиях, снимается HF и, кроме того, метансульфонокислотой или трифторметаилсульфонокислотой (Йаджима и др., 1978 г.).

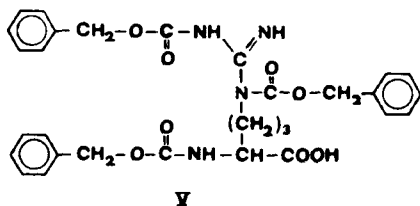
4-Метоксифенолсульфонильная группа [165] $\text{H}_3\text{C}-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2-$ в противоположность тозильной группе может отщепляться легко и полностью метансульфонокислотой или бортрис(трифторацетатом). Однако она устойчива к трифторуксусной кислоте и гидрогенолизу.

Для N^ω -моноацилирования можно успешно применять защитные группы уретанового типа, причем проще всего удастся готовить $\text{N}^\alpha, \text{N}^\omega$ -диацильные производные ($\text{R} = \text{R}'$) (IV):



Z-Arg-(Z)-OH ($R = R' = -CH_2C_6H_5$) может образовывать дипептиды только с гидрохлоридами аминок компонента, что обеспечивает дополнительное протонирование гуанидиновой функции. В противном случае образуется лактам. В случае N^ω , N^δ -диацилпроизводных с разными заместителями, таких, как Z-Arg-[Z(-4NO₂)]-OH ($R' = -CH_2C_6H_5$; $R = -CH_2-C_6H_4-NO_2$) [158] или Z-Arg-(Boc)-OH ($R' = -CH_2C_6H_5$; $R = -C(CH_3)_3$) [159], наблюдалось лишь незначительное образование лактама. Различия селективности деблокирования (4-нитробензилоксикарбонильная группа устойчива против смеси HBr/уксусная кислота) позволяют применять такие производные в многочисленных синтезах пептидов.

Зервас и др. [160], которые провели детальные исследования ацилирования гуанидиновой функции аргинина, смогли в конце концов приготовить δ, ω -диацилированное производное аргинина; реакция проходила в сильнощелочных условиях с большим избытком бензилового эфира хлормуравьиной кислоты. В работе [160] приведены доказательства предполагаемой структуры (V). Z-Arg-(ω, δ -Z₂)-OH и особенно соответствующие 4-нитрофениловый или N-гидроксиsuccинимидный эфиры — превосходные исходные соединения для получения аргининовых пептидов [161]. Исходя из Z-Arg-OH, можно с помощью 1-адамантилового эфира хлормуравьиной



кислоты получить соответствующее N^ω, N^δ -диадамантильное производное [162]. После отщепления бензилоксикарбонильной группы гидрогенолизом от α -аминной функции можно получать различные замещенные.

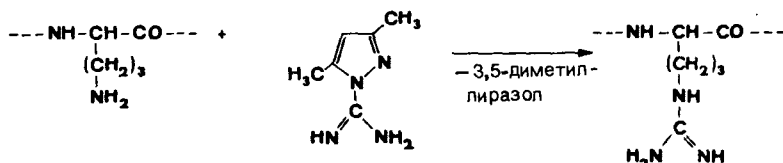
В работе [166] показано, что защищенное по N^α -и карбоксилу производное аргинина со свободной (непротонированной) гуанидиновой группой дает с активированным эфиром бензилоксикарбонилглицина N^ω, N^δ -диацильное производное, которое может дальше перацилироваться с Z-Phe-OH/ДЦГК.

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

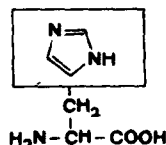
Бензилоксикарбониларгинингидробромид получают очень просто из Z-Arg-OH обработкой 1,4 н. HBr в метаноле и высаживанием продукта абсолютным эфиром. Производное гидробромид аргинина со свободной α -аминогруппой можно использовать в синтезах в качестве аминок компонента.

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

жащие пептиды путем амидинирования (гуанилирования). Подходящим реагентом для этого оказался 1-амидино-3,5-диметилпиразол [164]:



2.2.4.3.2. Защита имидазольной функции гистидина

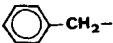
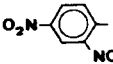
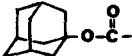

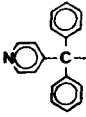


При пептидных синтезах с незащищенной имидазольной функцией могут встречаться трудности, связанные с возможностью ацилирования имидазольного остатка, его слабой основностью, а также часто с низкой растворимостью таких пептидов. Эти трудности можно уменьшить блокированием имидазольной функции. Некоторые синтезы с незамещенной имидазольной функцией тем не менее были описаны, причем остаток гистидина был аминокислотным компонентом. Только после того, как в 1954 г. получили *трет*-бутилоксикарбонилгистидиназид (Z-His-OH практически нерастворим в применяемых для пептидного синтеза растворителях), были проведены синтезы с незамещенными по имидазолу азидами гистидина [167]. Вообще же более разумнее применять для пептидных синтезов гистидин с блокированной имидазольной функцией. Долгое время существовала только одна возможность блокирования азота имидазола бензильным остатком [168]. Приведенные в табл. 2-4 N^{Im} -защитные группы довольно часто применяются в настоящее время в синтезе пептидов; тем не менее трудная проблема защиты имидазольной функции все еще не решена.

Основываясь на новых возможностях получения Z-His-OH [169] и Boc-His-OH [170], можно синтезировать важные исходные продукты с Z-His(Tos)-OH, Z-His(Adoc)-OH и Z-His(Boc)-OH. Разумеется, можно исследовать возможность получения еще и других защитных групп уретанового типа, например N^{Im} -бензилоксикарбонильной и др. Блокированные ацильной группой производные гистидина могут как ацилимидазолиды вызывать нежелательные ацилирования. Кроме того, будучи лабильными к аминолизу и гидролизу, они потенциально опасны при последующих стадиях омыления эфиров или их гидролиза.

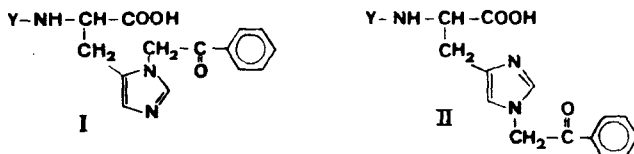
Хотя производные N^{Im} -тозилгистидина до сих пор применялись главным образом в твердофазном синтезе пептидов, интерес к этой защитной группе растет и при осуществлении синтезов в растворе. Нуклеофильные соединения (1-гидроксibenзотриазол, аммиак и др.) способны вызывать от-

Таблица 2-4. Защитные группы для имидазольной функции гистидина

N ^{Im} -Защитная группа	Формула	Деблокирование
Бензил [168]		Na/жидк. NH ₃
2,4-Динитрофенил [171]		2-Меркаптоэтанол (pH 8; 1 ч); устойчив при ацидолизе
1-Бензилоксикарбоил-амино-2,2,2-трифторэтил [172]	$\text{F}_3\text{C}-\underset{\text{Z}-\text{NH}}{\text{CH}}$	H ₂ /Pd; устойчив в условиях отщепления Вос-остатков и алкиловых эфиров
<i>трет</i> -Бутилоксикарбо-нил [173]	$(\text{CH}_3)_3\text{C}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-$	HBr/AcOH; HBr/CF ₃ COOH; HF; устойчив к HCl в диоксане
Адамантил-1-оксикарбоил [174, 175]		CF ₃ COOH
Пиперидинокарбо нил [176]		N ₂ H ₄ ·H ₂ O; 2 и. NaOH в ди-оксане
Дифенилметил [177]	$(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{CH}-$	6 и. HBr/AcOH (3 ч); HCOOH (10 мин); CF ₃ COOH (1 ч)
Пиридилдифенилметил [178]		Каталитическое или электроли- тическое восстановление; Zn/AcOH
4-Толуолсульфоилл [179]	$\text{H}_3\text{C}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2-$	Гидроксibenзотриазол (HOBT) [180]; HF; щелочное омыление

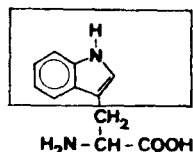
щепление этой группы [180], поэтому следует проявлять осторожность при получении некоторых активированных эфиров. К тому же существует опасность, что частичное детоцилирование при нуклеофильном воздействии аминок компонента приведет к образованию N^α-тозилпроизводного пептида. Пиридилдифенилметильная группа [178] аналогично давно известной N^{Im}-третилной группе [181] может отщепляться гидрогенолизом или ацидолизом. Комбинация N^{Im}-тозилной защиты с N^α-Вос-группой из-за недоста-

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

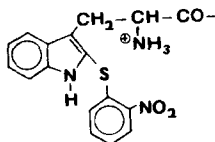


N^{Im} -фенилгруппа приобрела практическое значение также для твердофазного синтеза, после того как было описано приготовление I ($Y = Boc$) [183]. Деблокирование с цинковой пылью в водной уксусной кислоте проходит быстро и количественно.

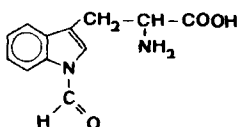
2.2.4.3.3. Защита индольной функции триптофана



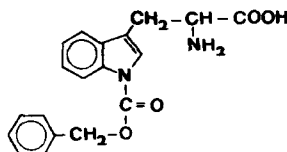
До сих пор в подавляющем большинстве случаев индольная функция триптофана не защищалась. Обычные методы образования пептидной связи позволяют вводить триптофан без особых проблем как в качестве аминокомпонента, так и в качестве карбоксильного компонента. Однако при неточном соблюдении стехиометрических соотношений в случае получения азиды из гидразиды возможно N-нитрозирование индольного кольца. Производные триптофана, защищенные по N- и C-концам, получают вообще легко. Исключение составляет введение фталильного остатка [184]. Различные побочные реакции наблюдались при отщеплении защитных групп. Индольное кольцо очень чувствительно к окислителям. Поэтому при некоторых операциях целесообразны применение абсолютных (не содержащих воды) и свободных от пероксидов растворителей и работа без доступа кислорода воздуха. При ацидолитическом отщеплении защитных групп *трет*-бутильного типа случается N^{Im} -*трет*-бутилирование [185]. Наряду с N-алкилированием может происходить также и C-алкилирование индольной группы [186]. При удалении Nps-группы с помощью хлороводорода в спирте получается S-(2-нитрофенил)тиоиндольное производное (I). Эту побочную реакцию можно в значительной степени подавить добавлением избытка метилиндола (10—20 экв.) [187].



I



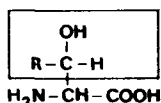
II



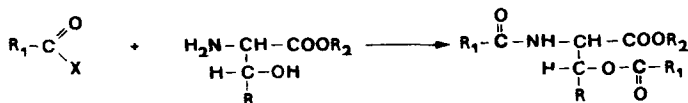
III

Возможности блокирования индольной функции сравнительно невелики. Первой защитной группой, использованной в пептидном синтезе, был предложенный Изумия и др. [188] N^{In}-формильный остаток (II). Отщепление происходит при 2-часовом воздействии пиперидина. Возможна комбинация N^{In}-For-защиты с N^α-Вос-группой, которую можно селективно отщепить действием 1 н. хлороводорода в уксусной кислоте или 0,1 н. хлороводорода в муравьиной кислоте. Была показана также возможность защиты с помощью N-бензилоксикарбонильной группы (III) [189]. Исходя из Вос-Гтр-ОEt, удалось ацилировать индольный азот с помощью бензил-(4-нитрофенил)карбоната в ацетонитриле в присутствии диизопропилэтиламина и фторида калия. N^{In}-Z-Группа устойчива в условиях отщепления Вос-группы и может деблокироваться при гидрогенолизе, гидразинолизе или под действием жидкого фтороводорода.

2.2.4.3.4. Защита алифатической гидроксильной функции



Вообще говоря, спиртовой гидроксил можно не защищать, если серин (R = H), треонин (R = CH₃) или гидроксипролин является составной частью аминок компонента. Нужно только не применять избыток ацилирующего средства, так как иначе может пройти частичное O-ацилирование:

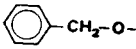

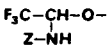


Эта опасность существует в основном в случае синтезов на твердых носителях по Меррифилду (разд. 2.2.7.1), где, как правило, вводятся большие избытки активированных карбокси компонентов.

Для присоединения С-концевых карбоксикомпонентов, содержащих гидроксиаминокислоты, вначале использовали только азидный метод. Позднее появились работы, в которых указывалось, что для активирования не защищенных по гидроксилу производных можно применять также ангидридные и карбодиимидный методы. Применение активированных эфиров вначале терпело неудачу, потому что не удавалось получить чистый N-защищенный эфир гидроксиаминокислоты с неблокированной оксигруппой. Исключение составлял только 2,4-динитрофениловый эфир [190]. Позднее и другие активированные эфиры были получены в чистом виде, как, например, Z-Ser-OPср [191] или Boc-Thr-ONSu [192].

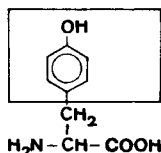
При синтезе пептидов с О-незащищенными гидроксиаминокислотами все-таки часто наблюдаются нежелательные побочные реакции. Так, в кислых условиях может происходить N → О-аминоацильная миграция [193] с последующими нежелательными реакциями. При деблокировании N^α-аминозащитной группы посредством HCl в уксусной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

Таблица 2-5. Защитные группы для гидроксильной функции

О-защитная группа	Формула	Снятие защиты
Бензил [194]		Гидрогенолиз; HF; Na/жидк. NH ₃ ; HBr/диоксан
<i>трет</i> -Бутил [195]	(CH ₃) ₃ C-O-	CF ₃ COOH; HCl/CF ₃ COOH; конц. HCl (0°C, 10 мин)
Тетрагидропиранил [196]		Ацидолиз
1-Бензилоксикарбонил-амино-2,2,2-трифторэтил [197]		Гидрогенолиз; ацидолиз
Дифенилметил [198]	(C ₆ H ₅) ₂ CH-O-	Гидрогенолиз; нагревание с безводной CF ₃ COOH при температуре кипения
Триметилсилл [199]	(CH ₃) ₃ Si-O-	Гидролиз
Метилтиометил [200]	H ₃ C-S-CH ₂ -O-	CH ₃ I во влажном ацетоне (NaHCO ₃)

На практике используют прежде всего О-бензильный и О-*трет*-бутильный остатки. О-Бензил-L-треонин получают одновременной этерификацией карбоксильной и гидроксильной групп L-треонина бензиловым спиртом в присутствии 4-толуолсульфокислоты и последующим щелочным омылением Н-Thr(Bzl)-OBzl [201]. В свою очередь О-эфирную группу можно удалить обработкой иодтриметилсианом [202].

2.2.4.3.5. Защита ароматической гидроксильной функции



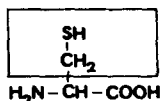
Фенольный гидроксил имеет более кислый характер по сравнению со спиртовыми функциями серина, треонина и гидроксипролина. Поэтому требования к защите этой группы повышаются. Можно, конечно, проводить пептидные синтезы и с незащищенным гидроксилом тирозина. Однако при этом получаются более низкие выходы, и, кроме того, для образования пептидной связи можно применять уже не все методы активирования (нельзя применять например, хлорангидридный, фосфоразометод и др.). При азидном методе наблюдалось нитрозирование ядра, а также другие побочные реакции, которые можно объяснить перегруппировкой Курциуса. При введении карбоксикомпонентов с С-концевым тирозином существует повышенная опасность рацемизации. Довольно много исследований проводилось с О-ацилированными производными тирозина, при этом оказалось, что устойчивость О-ацильной группы к нуклеофильным воздействиям недостаточна и нельзя полностью исключить ацильную миграцию О→N. В старых синтезах вазопрессина применяли тозилную группу [203]. Введение О-алкоксикарбонильных групп (Z, Boc и др.) не привело к желаемому успеху, тем более что алкилфенилкарбонатная группировка могла реагировать с аминогруппой аминоконпонента, тем самым блокируя ее.

Для защиты ароматических гидроксифункций предлагались в основном те же О-алкилпроизводные, которые уже обсуждались для алифатических гидроксикаминокислот (табл. 2-5). О-Тирозинбензиловые эфиры [204] можно получать прямым алкилированием медного комплекса тирозина бензилом [204]. Отщепление этой защитной группы можно проводить при гидрогенолизе, под действием жидкого фтороводорода, а также при ацидолизе действием бромоводорода в уксусной кислоте или бромоводорода в трифторуксусной кислоте. В последних случаях, однако, возможны как неполное расщепление, так и побочные реакции. При ацидолизе существует опасность С-бензилирования, поэтому рекомендуется добавлять «ловушки» катионов (анизол, резорцин и др.).

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

(1—2 ч, комнатная температура) или концентрированной соляной кислотой при 0 °С без доступа кислорода воздуха (8—10 мин). Для защиты ароматических гидроксифункций была предложена также метилтиометильная группа [207]. Интерес представляют методы расщепления простых и сложных эфиров под действием иодтриметилсилана [202].

2.2.4.3.6. Защита тиольной функции цистеина



Сильная нуклеофильность, легкая окисляемость и кислый характер тиольной группы цистеина требуют селективного блокирования на всех стадиях синтеза. Еще в 1930 г. дю Виньо [208] впервые применил S-бензильный остаток для защиты тиольной функции. Получение окситоцина в лаборатории открыло путь для всех дальнейших синтезов с использованием цистеина и цистина. S-Бензильная группа снимается только натрием в жидком аммиаке; в некоторых случаях, в особенности при синтезах инсулина, применение этого метода сопровождалось повреждением пептидных цепей. Поэтому были разработаны другие методы эффективного блокирования тиольной функции (некоторые примеры приведены в табл. 2-6).

S-Ацилзащитные группы в последнее время применяются очень мало из-за опасности S—N-миграции ацила. Поэтому этот тип защит не обсуждается. Между тем все большее значение приобретают такие группы, которые могут приводить прямо к дисульфидному связыванию с образованием цистина без предшествующего деблокирования (разд. 2.2.8.2). Для образования дисульфидных мостиков служат методы иодолиза [209], роданолиза (диородановый метод или метод Хиски) [210] или метод Камбера (посредством метоксикарбонилсульфенилхлорида Cl-S-CO-OCH₃) [211].

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

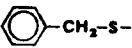
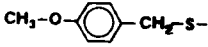
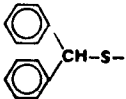
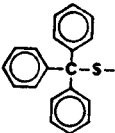
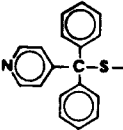
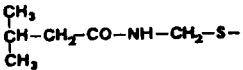

В случае S-этилтио- и S-*mpem*-бутилтиотиолзащитных групп речь идет о несимметричных дисульфидах цистеина. Они могут быть селективно восстановлены тиолизом под действием избытка различных тиолов [224]:



Здесь речь идет о тиолдисульфидном обмене. Сдвиг равновесия в желаемую сторону достигается применением избытка тиольного соединения R'SH. Этот вариант подходит для селективного образования цистиндисульфидных мостиков в пептиде. Таким образом можно селективно деблокировать S-алкилтиоацетальные группы, тогда как другие защитные группы, в том числе и тиолзащитные группы другого типа, устойчивы к тиолизу.

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

Таблица 2-6. Защитные группы тиольной функции

S-Защитная группа	Формула	Снятие защиты (превращение в пептиды чистина по методам А, Б, В ^а)
Бензил [208]		Na/жидк. NH ₃
4-Метоксибензил [212]		HF; кипящая CF ₃ COOH; Na/жидк. NH ₃ ; соли Hg(II) [213]
Дифенилметил [214]		HBr/AcOH; CF ₃ COOH; Na/жидк. NH ₃ ; Nps-Cl и последующее восстановление (Б/В)
Тритил [215]		HF/CF ₃ COOH; HF; CF ₃ COOH; HBr/AcOH; водн. HCl/AcOH; соли Hg(II), Nps-Cl и последующее восстановление (А/Б/В)
Пиридилдифенилметил [216]		Соли Hg(II) (pH 4); Zn/AcOH; электролитическое восстановление (А)
Ацетамидометил [217]	$\text{CH}_2\text{-CO-NH-CH}_2\text{-S-}$	Соли Hg(II) (pH 4); Nps-Cl с последующим восстановлением (А/Б/В)
Хлорацетамидометил [218]	$\text{Cl-CH}_2\text{-CO-NH-CH}_2\text{-S-}$	1-Пиперидинтиокарбоксамид
Изобутириламидометил [219]		Соли Hg(II) (pH 4) (Б)
Тетрагидропиранил [220]		HBr или CF ₃ COOH; разб. кислоты; AgNO ₃ ; Na/жидк. NH ₃ (Б)
Этилкарбамоил [221]	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-NH-C(=O)-S-}$	Щелочная среда (NH ₃ , NaOCH ₃ , NaOH); соли Ag и Hg(II) (pH 7)

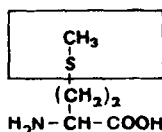
S-Защитная группа	Формула	Снятие защиты (превращение в пептиды цистина по методам А, Б, В ^а)
Этилтио [222]	$\text{CH}_3\text{--CH}_2\text{--S--}$	Тиолиз (тиофенол, тиогликолевая кислота и др.)
<i>трет</i> -Бутилтио [223]	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C--C--S--} \\ \\ \text{CH}_3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

^а А — иодолиз, Б — роданолиз, В — метод Камбера.

Производное S-сульфоцистеина R-S-SO_3^- , полученное окислительным сульфитололизом из цистеина или S-алкил(арил)-тиоцистеиновых соединений, обладает достаточной для некоторых пептидносинтетических операций устойчивостью. Снятие этой защиты возможно при восстановлении тиогликолевой кислотой при pH 5.

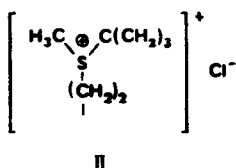
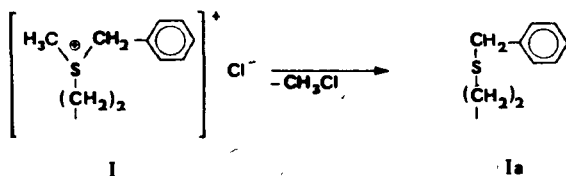
В заключение следует еще раз указать, что защита тиольной функции вызывает большие затруднения и из описанных (более 50) возможных защит тиольной группы трудно остановиться на удовлетворяющем различным требованиям варианте.

2.2.4.3.7. Защита тиоэфирной функции метионина



Тиоэфирная группа метионина, собственно говоря, не должна вызывать чрезвычайных затруднений при синтезе пептидов. Введение амино- и карбоксизащитных групп в производные метионина также протекает гладко. Гораздо больше проблем связано с удалением защитных групп в случае метионинсодержащих пептидов. Так, при обработке натрием в жидком аммиаке наблюдалось частичное S-деметилование с образованием производных гомоцистеина. Отщепление бензилоксикарбонильных групп каталитическим гидрированием из-за присутствия серы метионина возможно только при добавлении оснований [226] или эфирата трифторида бора [227]. При ацидолитическом отщеплении защитных групп на основе бензила и *трет*-бутила тоже идут побочные реакции, так как в результате взаимодействия сульфидной группы с бензил-(I) или же *трет*-бутил-катионами (II) образу-

ются сульфониевые соли. В случае сульфониевых солей I происходит S-деметилование с образованием производных S-бензилгомоцистеина (Ia).



Сульфониевая соль II идентифицирована Зибером и сотр. [228]. Специальными приемами [229] она может быть превращена вновь в производное метионина. Полностью предотвратить образование сульфониевых солей добавками «ловушек» катионов (метилэтилсульфид, анизол и др.) не всегда возможно.

Другая причина нежелательных побочных реакций — чувствительность тиоэфирной группы к окислению. Пероксиды и другие окислители (например, при определенных условиях кислород воздуха и даже диметилсульфоксид, часто применяемый в пептидных синтезах) ведут к образованию метионин-S-оксида. В подавляющем большинстве случаев пептиды лишаются из-за этого своей биологической активности. Добавлением метилэтилсульфида или метионина можно воспрепятствовать или в значительной степени снизить образование сульфоксидов, так как эти добавки исключают окисление при различных операциях.

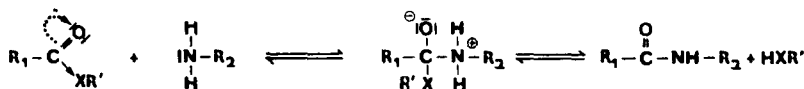
В то же время сульфоксидные группы были предложены для защиты тиоэфирной функции [230]. При образовании S-оксидов возникает второй центр хиральности. Полученную смесь диастереомеров можно разделить, переводя в соли пикриновой кислоты. Сульфоксидная группа удаляется восстановлением тиогликолевой кислотой или тиогликолем.

Простой метод получения производных метионинсульфоксида описан в работе [231].

2.2.5. Методы образования пептидной связи

Образование пептидной связи можно рассматривать как нуклеофильную реакцию полярной двойной связи. Из органической химии известно, что карбоновые кислоты не вступают в реакцию с аммиаком или аминами на хо-

лоду. Образование пептидной связи, как уже указывалось (разд. 2.2.2), должно протекать в мягких реакционных условиях, поэтому необходимо активировать карбоксильную группу (R_1 — остаток карбоксильного компонента). Повышение электрофильных потенциалов достигается введением электроаффинных $-I$ или $-M$ (индуктивных или мезомерных) заместителей (XR'), которые снижают электронную плотность как на карбонильном углероде, так и на карбонильном кислороде. Благодаря этому повышается чувствительность к нуклеофильному воздействию аминок компонента (R_2 — остаток аминок компонента).



Нуклеофильный аминок компонент воздействует на углеродный атом карбоксила свободной парой электронов; при этом происходит перераспределение электронов с образованием промежуточного продукта, который, обладая повышенной реакционной способностью, расщепляется с выделением $R'X^-$.

Изменение активирующей группы неограниченно расширяет возможности синтеза пептидной связи. (Однако в рамках данной книги подробно останавливаться на них не представляется возможным.) Различные способы активирования карбоксильной группы, описанные к началу 70-х годов, собраны в прекрасной монографии Вюнша [29]. Методы, которые появились позже, можно отнести к уже известным типам активирования.

Обсуждение всех теоретически возможных вариантов следует ограничить еще и потому, что лишь немногие методы синтеза пептидов имеют практическое значение [28].

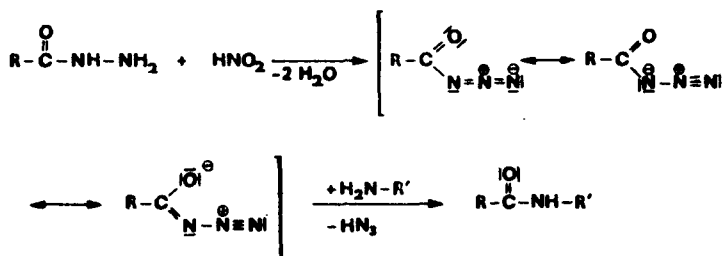
Из наиболее употребительных методов надо назвать азидный метод, метод смешанных ангидридов карбоновых и алкилугольных кислот, метод активированных эфиров и, наконец, карбодиимидный метод, который в своей модифицированной форме (карбодиимид с добавками) наиболее широко используется в синтезах. Именно эти методы подробно обсуждаются ниже. Будут упомянуты еще некоторые методы, имеющие теоретический интерес, а также методы, которые употребляются только в особых случаях.

2.2.5.1. Азидный метод

Азидный метод [232], введенный в пептидную химию Курциусом в 1902 г., до сих пор является одним из наиболее широко применяемых способов образования пептидной связи. С помощью этого метода Курциус синтезировал ряд N-бензоилированных пептидов, содержащих от двух до шести аминокислот. В качестве аминок компонентов он использовал как аминокислоты и пептиды в водно-щелочной среде, так и эфиры аминокислот в органической фазе. С введением селективно отщепляемых N-защитных групп азид-

ный метод, который долгое время являлся единственным методом, свободным от рацемизации, пережил настоящий расцвет.

Исходными веществами для азидной конденсации служат хорошо кристаллизующиеся гидразиды N-защищенных аминокислот или пептидов, которые получают из соответствующих эфиров гидразиолиза. Для превращения в азид соответствующий гидразид в солянокислом растворе смешивают при -10°C с рассчитанным количеством нитрита натрия. В качестве растворителя годятся также смеси уксусной кислоты, тетрагидрофурана или диметилформамида с соляной кислотой. Полученный азид экстрагируют на холоду этилацетатом, промывают, высушивают и вводят в реакцию с аминокомпонентом:

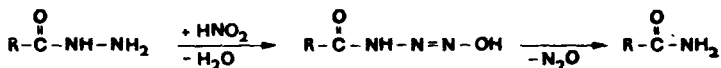


Некоторые азиды могут быть выделены путем осаждения при добавлении ледяной воды и затем, после растворения в подходящем растворителе, введены в реакцию с аминокомпонентом. Эти операции следует проводить при низких температурах ввиду нестабильности азидов и связанной с этим опасности взрыва.

По методу Хонцля и Рудингера [233] можно проводить азидную конденсацию прямо в органическом растворителе, используя для этого *трет*-бутилнитрит. Гидразиолиз эфирных групп более длинных N-защищенных пептидов часто бывает трудным. Можно использовать N-замещенные гидразиды (разд. 2.2.4.2.2.). Соответствующий пептидный фрагмент, полученный по одному из известных методов синтеза, вводят в азидную конденсацию после селективного удаления защитной группы гидразида. Хотя азидный метод относят к методам, свободным от рацемизации, в некоторых случаях все-таки наблюдалась заметная рацемизация [234]. Поскольку азиды ациламинокислот легко рацемизируются при катализе основаниями [235], при азидных конденсациях следует избегать контакта с основаниями. Для нейтрализации солей аминокомпонентов вместо триэтиламина целесообразно применять N,N-диизопропилэтиламин и N-алкилморфолин.

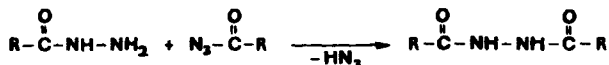
При количественном протекании азидной конденсации единственным побочным продуктом является азотистоводородная кислота, обработка реакционной смеси не вызывает затруднений. К сожалению, однако, синтез усложняется нежелательными побочными реакциями, хотя при тщательном соблюдении условий многие конкурентные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

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

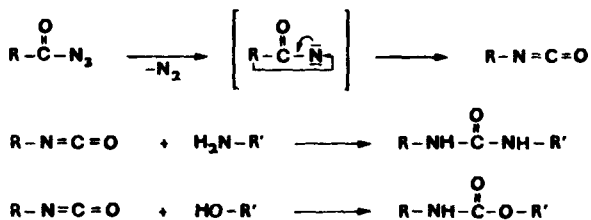


Согласно Рудингеру, можно в значительной степени избежать этой побочной реакции, проводя процесс в безводной среде с алкилнитритами (например, *трет*-бутилнитритом) в присутствии хлороводорода [233].

При взаимодействии еще не вступившего в реакцию гидразида с уже образованным азидом может легко получаться 1,2-бисацилгидразин:



Другие побочные реакции можно интерпретировать как перегруппировку Курциуса, причем промежуточно образующийся изоцианат, реагируя с аминогруппой, дает производное мочевины, а с гидроксильной — соответствующие уретаны:



Защищенный по азоту изоцианат серина с незащищенным гидроксильным дает производное оксазолинона-2:



Кроме того, при азидной конденсации наблюдались и другие побочные реакции: нитрование фенольного ядра тирозина, окисление производных S-бензилцистеина до сульфоксидов, образование N-нитрозосоединений триптофана, а также разложение азидов α -тозиламинокислот. Побочные реакции, возможные при азидном синтезе, обстоятельно рассмотрены в обзоре Шнабеля [236].

Хотя при точном соблюдении условий реакции можно в значительной степени избежать образования побочных продуктов, все же, как уже указывалось, это значительно затрудняет обработку и очистку полученных пептидов. В зависимости от синтезируемого объекта проведение азидной конденсации (включая приготовление гидразида) требует 2—6 рабочих дней. Выходы составляют 30—70%.

Азидный метод и в настоящее время имеет большое практическое значение благодаря ряду преимуществ: это малая степень рацемизации, возможность введения в реакцию серина и треонина без защиты гидроксильной функции, а также разнообразные возможности, открываемые применением N-защищенных гидразидов.

2.2.5.2. Ангидридный метод

Большое значение для развития метода ангидридов и применения его в пептидном синтезе имела работа Курциуса и результаты, полученные в 1881 г. Получая бензоилглицин (гиппуровую кислоту) из серебряной соли глицина и бензоилхлорида в кипящем бензоле, Курциус выделил также бензоилдиглицин и бензоилгексаглицин. Уже тогда предполагали, что ангидрид N-бензоилированной аминокислоты или пептида образует с бензойной кислотой реакционноспособный промежуточный продукт. Основываясь на этих данных, Виланд и соотр. спустя 70 лет применили метод смешанных ангидридов для целенаправленного синтеза пептидов. Для синтеза пептидов наряду с асимметричными ангидридами можно применять симметричные ангидриды и внутримолекулярные ангидриды карбаминовой кислоты (N-карбоксиянгидриды).

2.2.5.2.1. Метод смешанных ангидридов

Для получения смешанных ангидридов (СА) пригодны как карбоновые, так и неорганические кислоты. Многочисленные методические разработки и применяемые кислоты можно найти в обзоре [237]. Большая часть теоретически и методически очень интересных разработок (в силу различных причин) не нашла практического применения. Наиболее часто используют алкиловые эфиры хлормуравьиной (хлоругольной) кислоты, особенно предложенный Виландом и Бернардом [238] и независимо от них Буассона [239] этиловый эфир хлормуравьиной кислоты, а также изобутиловый эфир хлормуравьиной кислоты [240]. Взаимодействие несимметричного смешанного ангидрида, полученного из карбоксикомпонента и алкилового эфира хлормуравьиной кислоты (рис. 2-7), с аминокислотой зависит от электронной плотности на обоих конкурирующих С-атомах карбонильных групп, а также от стерических эффектов и, как правило, проходит по карбонилу ациламинокислоты с образованием желаемого пептидного производного и освобождением второй кислоты (алкилугольной) (путь *а*). Последняя при использовании алкилхлорформатов (R — этил или изобутил) очень неустойчива и сразу разлагается на CO_2 и соответствующий спирт. Правда, известны также примеры воздействия аминокислоты на карбонил угольной кислоты [241, 242], причем освобождается ациламинокислота и в качестве побочного продукта получается уретан (путь *б*). Как показал Виланд, эту побочную реакцию нельзя полностью исключить даже при температуре реакции $-15^\circ C$. Указанная побочная реакция протекает обычно при использовании N-тозил-, N-тритил- и N-трифтораце-

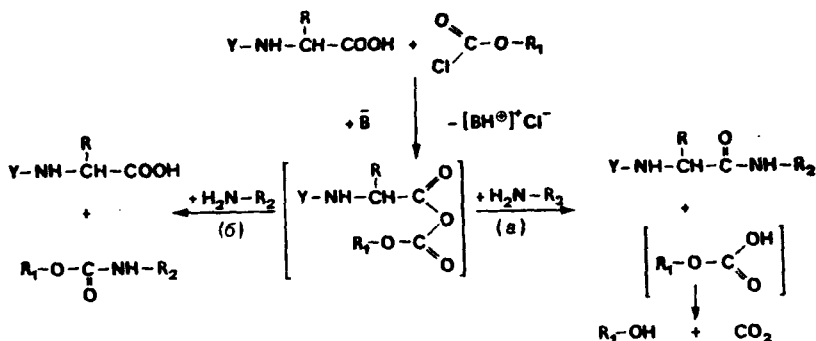


Рис. 2-7. Синтез по методу смешанных ангидридов. Y — N-защитная группа, R — остаток боковой цепи, B — третичное основание, R₁ — радикал алкилугольной кислоты, R₂ — остаток аминокомпонента.

тиламинокислот. В случае N-ациласпарагина для получения смешанного ангидрида целесообразно использовать хлорангидрид триметилуксусной (пивалиновой) кислоты.

Для приготовления смешанных ангидридов N-замещенные аминокислоты или пептиды растворяют в тетрагидрофуране, диоксане, ацетонитриле, этилацетате или диметилформамиде, смешивают с эквивалентным количеством третичного основания (N-метилморфолин, трибутиламин, N-этилпиперидин) и при охлаждении до $-5 \div -15^\circ\text{C}$ добавляют соответствующий алкилхлорформиат.

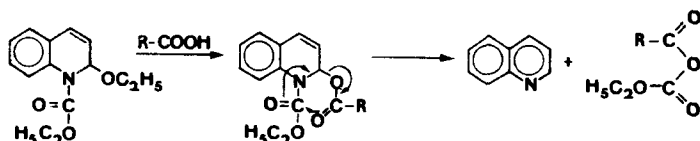
Андерсон и сотр. [243] предложили условия, при которых можно полностью избежать рацемизации при использовании изобутилхлорформиата: в качестве основания применяют N-метилморфолин, время образования ангидрида—30 с и низкая температура (от -5 до -15°C). Эти данные были подтверждены Кемпом с помощью чувствительного метода изотопного разбавления. Тест на рацемизацию по Изумия неожиданно показал 2,4% рацемата. Добавлением N-гидроксисукцинимиды можно снизить ее до 0,2% [244]. При соблюдении предложенных Андерсоном условий и отсутствии избытка основания метод смешанных ангидридов практически не дает рацемического продукта. В то время как приготовление несимметричных ангидридов требует исключения следов воды, собственно реакцию ацилирования можно проводить в водно-органической среде. Несмотря на то что иногда наблюдалось в небольшой степени O-ацилирование, гидроксикаминокислоты, как правило, не требуют защиты гидроксила.

Аналогичным путем можно приготовить асимметричный ангидрид из ациламинокислоты и триметилуксусной (пивалиновой) кислоты и получать хорошие результаты при конденсации его с аминокомпонентами [245]. Благодаря сильному положительному индуктивному эффекту *трет*-бутильной

группы электрофильный потенциал углеродного атома карбоксила вспомогательной кислоты снижается и это наряду со стерическими препятствиями подавляет реакцию «неправильного» аминоллиза.

Тилак [246] описал ускоренный вариант синтеза без очистки промежуточных продуктов, так называемый метод последовательных избытков (ПСА-метод)*. Если для приготовления ангидрида используют реакцию с изобутилхлорформиаом в присутствии N-метилморфолина в диметилформамиде при -15°C , то необходим 6%-ный избыток бензилоксикарбонил-аминокислоты, а полученный ангидрид вводится в реакцию с аминокомпонентом в 50%-ном избытке. Непрореагировавший смешанный ангидрид можно гидролизовать насыщенным раствором KHCO_3 при 0°C (30 мин, pH 8).

В одном из вариантов метода смешанных ангидридов предложено применять конденсирующий агент 1-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохиолин (ЭЭДХ) [247]. Это соединение образует промежуточный смешанный ангидрид, который быстро вступает в реакцию конденсации, причем полностью исключается нежелательная побочная реакция:



Рекомендоваи также аналогичный реагент — 1-изобутилоксикарбонил-2-изобутилокси-1,2-дигидрохиолин (ИИДХ) [248]. С обоими этими реагентами получены хорошие результаты, причем гидроксиаминокислоты можно вводить в реакцию без специальной защиты гидроксила. Отметим, что ациласпарагин при этом реагирует без побочных реакций.

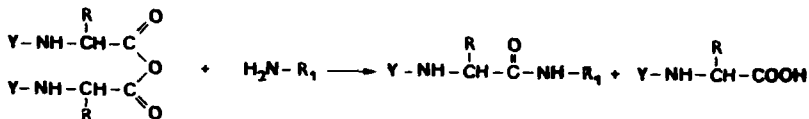
Возвращаясь к механизму реакции, следует допустить, что предполагаемый промежуточный продукт — 1-этоксикарбонил-2-ацилоксн-1,2-дигидрохиолин, будучи активированным эфиром, может также реагировать с аминокомпонентами по аналогии с эфирами 8-оксихиолина (разд. 2.2.6.1.1) [249].

2.2.5.2.2. Метод симметричных ангидридов

В случае смешанных ангидридов опасность диспропорционирования можно почти полностью подавить, подбирая подходящие условия реакции. В случае же симметричных ангидридов такой опасности, равно как и опасности неправильного аминоллиза, вообще не существует. Правда, выход пептида не может превышать 50%. Большую часть ациламинокислоты, образу-

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

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



Симметричные ангидриды ациламинокислот можно легко синтезировать, используя дициклогексилкарбодиимид (ДЦГК), этоксиацетилен, инамины, а также получить в результате диспропорционирования несимметричных ангидридов. Поскольку при синтезе симметричных ангидридов из Вос-аминокислот и ДЦГК возможны побочные реакции, то в качестве альтернативы было предложено вводить в реакцию 2 г-экв. натриевой соли Вос-аминокислоты и 1 г-экв. фосгена; реакцию проводят в тетрагидрофуране при -40°C [250].

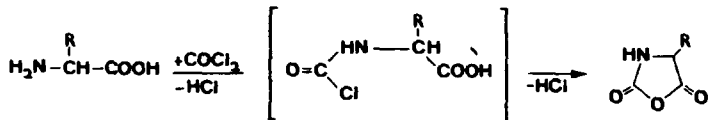
2.2.5.2.3. N-Карбоксиангидриды (НКА)

В N-карбоксиангидридах карбоксильная группа находится в активированном состоянии, в то время как аминогруппа блокирована. Такие производные аминокислот могут служить прекрасными исходными соединениями для синтеза пептидов.

Этот класс соединений был открыт в 1906 г. Лейксом [251], одним из учеников Эмиля Фишера. Первые N-карбоксиангидриды (1,3-оксазолидиндионы-2,5) были получены термическим отщеплением этилхлорида от хлорангидридов N-этоксикарбониламинокислот:

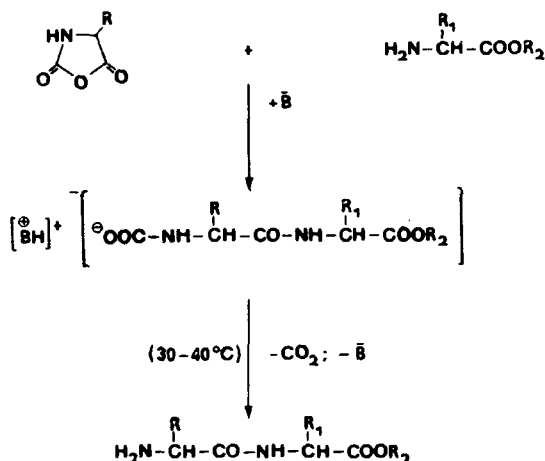


При получении N-карбоксиангидридов в качестве исходных соединений наиболее подходят хлорангидриды N-бензилоксикарбониламинокислот. Очень удобный способ синтеза N-карбоксиангидридов состоит во взаимодействии свободных аминокислот с фосгеном, при этом в качестве промежуточных продуктов образуются соответствующие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

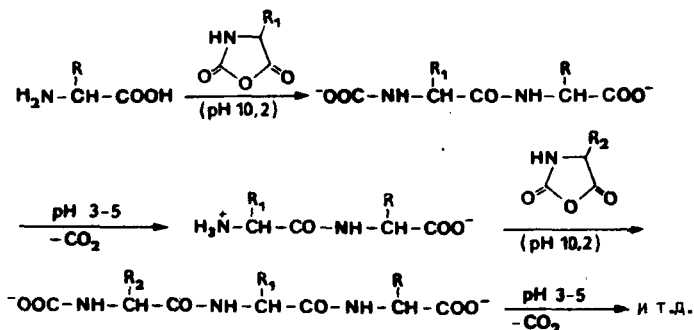


Поскольку даже следы воды вызывают полимеризацию N-карбоксиангидридов в полипептиды, то применение N-карбоксиангидридов для контролируемого синтеза пептидов сопряжено с большими трудностями.

ми. В 1949 г. Бейли удалось осуществить направленный синтез пептидов, введя одновременно эфир амнинокислот и триэтиламин в реакцию с N-карбоксиангидридом. Реакция идет через образование соли соответствующей карбаминовой кислоты, которая при осторожном нагревании разлагается на эфир пептида, CO_2 и основание:



В качестве основания Лангбек предложил использовать трибензиламин, так как соответствующая соль карбаминовой кислоты хуже растворима. Однако, несмотря на кажущиеся преимущества, N-карбоксиангидриды не получили широкого применения для направленного синтеза пептидов. Только в 1966 г. Хиршман и сотр. [252] разработали основы контролируемого синтеза пептидов этим методом в водной среде: аминокислоты или пептиды быстро ацилируются на холоду кристаллическими N-карбоксиангидридами при pH 10,2. При понижении pH до 3—5 полученные карбаматы пептидов декарбоксилируются. После повышения pH до 10 и добавления следующего N-карбоксиангидрида начинается новый цикл. Выход после трех циклов > 50%.



Чтобы избежать опасности нежелательного обмена карбоксильными группами между промежуточными карбамиатами пептидов и аминокомпонентом, необходима высокая скорость перемешивания. Столь же существенно для гладкого протекания реакции ацилирования точное контролирование pH (pH 10,2—10,5 для аминокислот или pH 10,2 для пептидов; при pH > 10,5 в качестве побочных продуктов в результате частичного гидролиза образуются гидантоиновые кислоты). Для пептидного синтеза были применены также тиоаналоги N-карбоксиангидридов — ангидриды N-тиокарбоновых кислот (НТА; 1,3-тиазолидиндионы-2,5); интересно, что соответствующие тиокарбаматные соли отличаются высокой стабильностью. Ацилирование этими соединениями может происходить уже при pH 9—9,5, а опасность гидролитического превращения в гидантоиновые кислоты снижается [253, 254].

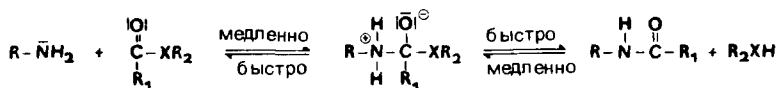
Применение НКА и НТА особенно удобно для осуществления свободно от рацемизации синтеза пептидных фрагментов без выделения промежуточных продуктов, причем трифункциональные аминокислоты, за исключением лизина и цистеина, не требуют специальной защиты. Хиршману и Денкевальтеру [255] удалось синтезировать большое число фрагментов S-белка рибонуклеазы, которые затем были соединены в S-белок азидным методом (разд. 3.8.1.1). Согласно исследованиям Ивакура с сотр. [256], применение N-карбоксиангидридов позволяет проводить синтез без точного контроля pH в некоторых гетерогенных системах растворителей. В системе ацетонитрил — водный раствор Na_2CO_3 (60:50) реакция идет на границе раздела фаз, причем НКА не дает побочных реакций в органической фазе, а полученный карбамат стабилизируется в щелочной водной фазе. Эта методика также свободна от рацемизации.

2.2.5.3. Метод активированных эфиров

Уже при зарождении синтетической пептидной химии для образования пептидной связи использовалась ацилирующая способность метиловых и этиловых эфиров аминокислот. Первые работы, проведенные Курциусом и Фишером, хотя и не получили практического применения, однако способствовали пониманию того, что эфиры ацилированных аминокислот и пептидов являются активированными соединениями. Спустя примерно 80 лет Виланд и сотр. [257], применив для образования пептидной связи тиоэфиры N-замещенных аминокислот, сделали метод активированных эфиров достоянием современной пептидной химии. Немного позже Швицеру и сотр. [258] удалось путем введения в эфирный остаток — I-заместителей превратить недостаточно реакционноспособные метиловые эфиры ациламинокислот в достаточно активные для образования пептидной связи промежуточные продукты. В настоящее время очень многие активированные эфиры успешно применяются в пептидной химии.

Образование пептидной связи при аминолизе эфира классифицируется по аналогии с омылением эфира как катализируемое основанием бимолеку-

лярное расщепление эфирной группы между ацильным остатком и кислородом ($B_{Ac} 2$):



где $X = O, S$ или Se ; R — остаток аминокомпонента; R_1 — остаток карбоксильного компонента; R_2 — замещенный или незамещенный алкиловый или ариловый эфир.

Нуклеофильная атака аминокомпонента на углеродный атом карбоксилата является стадией, определяющей скорость реакции; она приводит к тетраэдрическому комплексу — реально существующему промежуточному продукту, образованию которого способствует присутствие электроноакцепторной группы — XR_2 . Образование пептидной связи будет проходить быстрее, если R_2XH — слабое основание, т. е. если R_2XH — сопряженное основание относительно сильной кислоты. Причина высокой активности промежуточного соединения — сдвиг электронной плотности и анион, облегчающий расщепление связи $C-XR_2$.

По Менгеру и Смит (1972 г.), при аминолизе фениловых эфиров в органических растворителях определяющей скоростью стадией следует считать не образование тетраэдрических аддуктов, а скорее их разложение.

В противоположность замещенным алкиловым, незамещенным или замещенным ариловым эфирам ($X = O$), а также изолированным тио- ($X = S$) и селеновым эфирам ($X = Se$), аминолиз которых протекает по классическому механизму $B_{Ac} 2$, Юнг [259] и Якубке [260] в 1965 г. предложили новый тип активированных эфиров. Речь идет о гидроксипиридиновых [259] и 8-оксихинолиновых эфирах [260]. Во время аминолиза этих эфиров образуется циклическое переходное состояние, стабилизированное водородными связями, которые в свою очередь обусловлены наличием подходящих протоноакцепторных групп (рис. 2-8). В результате этого аминолиз протекает с высокой скоростью, и в то же время исключается образование оксазононов, ведущее к рацемизации (разд. 2.2.6.1.1).

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

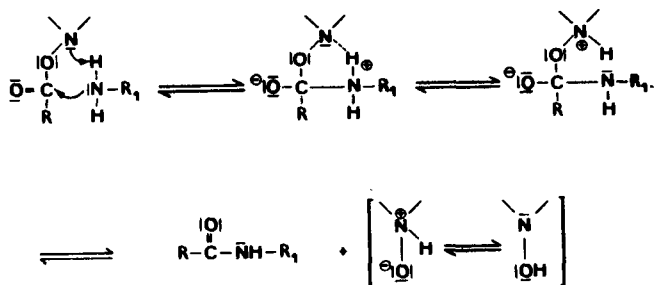


Рис. 2-8. Активирование карбоксила по механизму внутримолекулярного основного катализа при образовании циклического переходного состояния. R — остаток карбоксикомпонента, R₁ — остаток аминокомпонента.

активирования, который имеет большое практическое значение, особенно благодаря возможности избежать рацемизации. Возможно, этот механизм следует распространить на стадию связывания пептидов в белковом синтезе *in vivo*.

Некоторые активированные эфиры представлены в табл. 2-7. Другие сведения можно получить из литературы [63, 288—290].

Интересный новый реагент для пептидного синтеза — 4,6-дифенилтиено-[3,4-d] [1,3]-диоксол-2-он-5,5-диоксид (I) был предложен Штеглихом [291]. Этот циклический эфир угольной кислоты I реагирует с

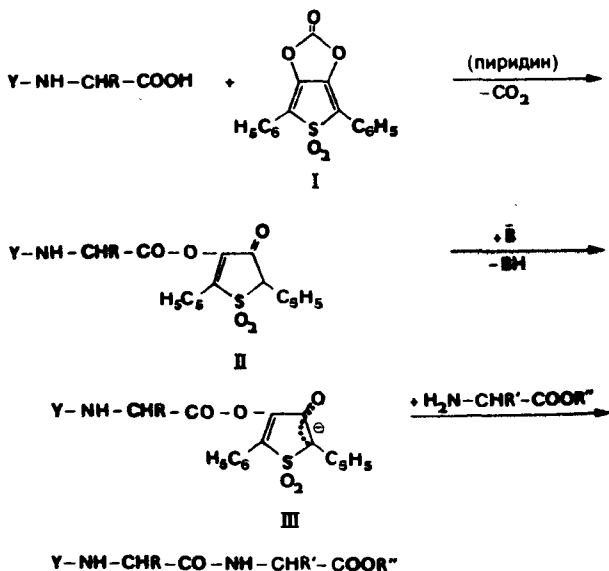

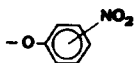
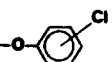
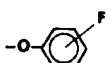
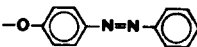
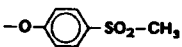
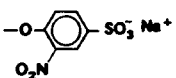
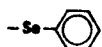
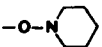
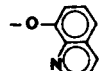
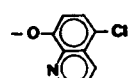
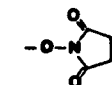
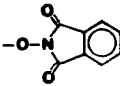

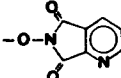
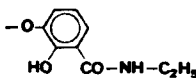
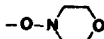
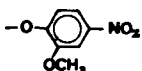

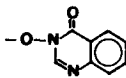


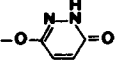
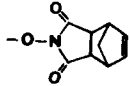


Таблица 2-7. Активированные эфиры

$$\text{R}-\overset{\text{O}}{\overset{\parallel}{\text{C}}}-\text{A}$$

(R — остаток аминокислоты, A — активирующий компонент)

№ п/п	Эфир	Сокращение	Формула A	Литература
1	Тиофениловый	SPh		257
2	Цианометиловый	OCm	$-\text{O}-\text{CH}_2\text{CN}$	258
3	Нитрофениловые: 4-нитро- 2-нитро- 2,4-динитро- 2,4,5-тринитро-	ONp O2 Np 2,4Np OTcp		263 263, 265 263, 265 266
4	Хлорфениловые: пента- три-	OPcp OTcp		267 267
5	Пентафторфениловый	OPfp		268
6	Фенилазофениловый	OPap		269, 270
7	4-Метилсульфонилфениловый			271
8	2-Нитро-4-сульфофениловый	ONs		272
9	Селенофениловый	SePh		273
10	Виниловый	OVi	$-\text{O}-\text{CH}=\text{CH}_2$	274
11	N-Гидроксипиперидиновый	OPip		259
12	8-Хинолиловый	OQ		260, 262
13	5-Хлор-8-хинолиловый	OQCl		261
14	N-Гидроксисукцинимидный	ONSu		275

№ п/п	Эфир	Сокращение	Формула А	Литература
15	N-Гидроксифтальимидный	ONPh		276
16	N-Гидроксиглутаримидный	ONGl		277
17	N-Гидроксиуретановый	ONUr	$-O-NH-COOC_2H_5$	278
18	N-Гидроксипиридин-2,3-дикарбоксиимидный			279
19	2-Гидрокси-3-этиламинокарбонилфениловый			280
20	N-Гидроксиморфоллиновый	ONMor		281
21	2-Метокси-4-нитрофениловый			282
22	2-Гидроксифениловый			283
23	3-Гидрокси-4-оксо-3,4-дигидрохиназолиновый	OOCh		284
24	1-Гидроксibenзотриазоловый	OBt		285
25	2-Тиопиридиловый	SPyr		286
26	3-Гидроксипиридазон-6-овый	OPn		287
27	N-Гидрокси-5-норборнен-2,3-дикарбоксиимидный	ONB		316, 317

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

N-защищенными аминокислотами в протонных растворителях с образованием соответствующих активированных эфиров (II). Как видно из приведенной схемы, активированный эфир реагирует с аминокомпонентом, давая защищенный дипептид. Реакцию можно вести как с выделением активированного эфира, так и не делая этого. Высокая активность III по отношению к аминам объясняется внутримолекулярным основным катализом, вызываемым енольной группировкой в окрашенном анионе III. Ацилирующая способность таких соединений выше, чем у 4- или 2-нитрофениловых эфиров.

Для синтеза пептидных и белковоподобных веществ до сих пор применяли преимущественно 4-нитрофениловые, N-гидроксисукцинимидные и галогензамещенные фениловые эфиры. Для приготовления *4-нитрофениловых эфиров* (впервые описаны Бодански) пригодны метод смешанных ангидридов, дициклогексилкарбодиимидный (см. ниже) и карбонатный методы [292].

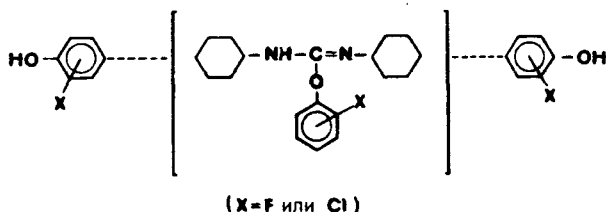
Большой экономический интерес представляет разработанный Вольманом [293] вариант их приготовления. При реакции бензил-(4-нитрофенил)-карбоната с солью аминокислоты получают соответствующую соль бензильноксикарбониламинокислоты, которая после подкисления и добавления ДЦГК образует с освободившимся 4-нитрофенолом замещенный активированный эфир с выходами 65—80%. Если исходить из *трет*-бутил-(4-нитрофенил)-карбоната, то можно получить 4-нитрофениловые эфиры Восаминокислот. Подбирая соответствующие карбонаты, можно по такому «одностадийному» методу получить и другие активированные эфиры.

Хорошо кристаллизующиеся и устойчивые при комнатной температуре (в темноте) 4-нитрофениловые эфиры отличаются высокой активностью в реакциях аминолита в диметилформамиде, N,N-диметилацетамиде и диметилсульфоксиде. Каталитические добавки уксусной кислоты, пивалиновой кислоты, азолов и N-гидроксисоединений ускоряют реакцию аминолита. Отделение освобождающегося во время аминолита 4-нитрофенола часто бывает трудным. Удаление побочных продуктов, особенно нежелательных при последующем гидрогенолизе, осуществляется обычно переосаждением в системах диметилформамид — вода или диметилформамид — эфир, адсорбцией на нейтральном оксиде алюминия или образованием комплексов с пиридином (рН 6,5).

N-Гидроксисукцинимидные эфиры, предложенные впервые Андерсоном и сотр., отличаются хорошей способностью к кристаллизации и высокой активностью при аминолите. При этом следует особенно подчеркнуть низкую чувствительность этих эфиров к гидролизу и алкоголизу, так что пептидный синтез можно проводить даже в воде. Соли аминокислот или пептидов, растворимые в системах этанол—вода, диоксан—вода или тетрагидрофуран—вода, можно сочетать с гидроксисукцинимидными эфирами N-замещенных аминокислот, получая пептиды с хорошими выходами. Преимуществом является также то, что освобождающийся при аминолите N-гидроксисукцинимид растворим в воде.

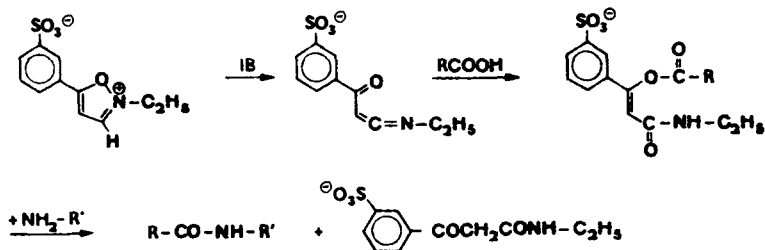
Большое практическое значение имеют также *галогензамещенные феноловые эфиры* N-замещенных аминокислот, которые были введены в синтетическую пептидную химию Купришевски и сотр. По скорости аминолиза они сравнимы с 4-нитрофеноловыми эфирами, но имеют преимущество, так как удаление освобождающегося при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

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



Перечисленные методы получения пригодны и для *пентафторфеноловых эфиров*, которые оказались превосходными ацилирующими агентами для синтеза различных пептидов. *Комплекс пентафторфенола с производными изомочевины* (F-комплекс), который имеет строение, аналогичное комплексу пентахлорфенола с карбодимидом ($X = F$), можно использовать для конденсации фрагментов.

Метод *изоксазолиевых солей*, предложенный для образования пептидной связи Вудвардом и Олофсоном [295], формально можно рассматривать в этой главе, поскольку 3'-сульфонат N-этил-5-фенилизоксазолия (К-реакгент Вудварда) образует с N-защищенными аминокислотами и пептидами в присутствии мягких оснований реакционноспособный эфир енола, который далее без выделения можно вводить в реакцию с аминокислотным компонентом:



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

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

2.2.5.4. Карбодиимидный метод

Пригодность карбодиимидов для образования пептидной связи впервые продемонстрирована Шиханом и Гессом [298]. В результате обширных исследований, проведенных различными лабораториями, предложен механизм реакции (рис. 2-9).

К протонированному карбодиимиду присоединяется анион карбоксильного компонента с образованием ацилуреида I (О-ациллактим, производное изомочевины),

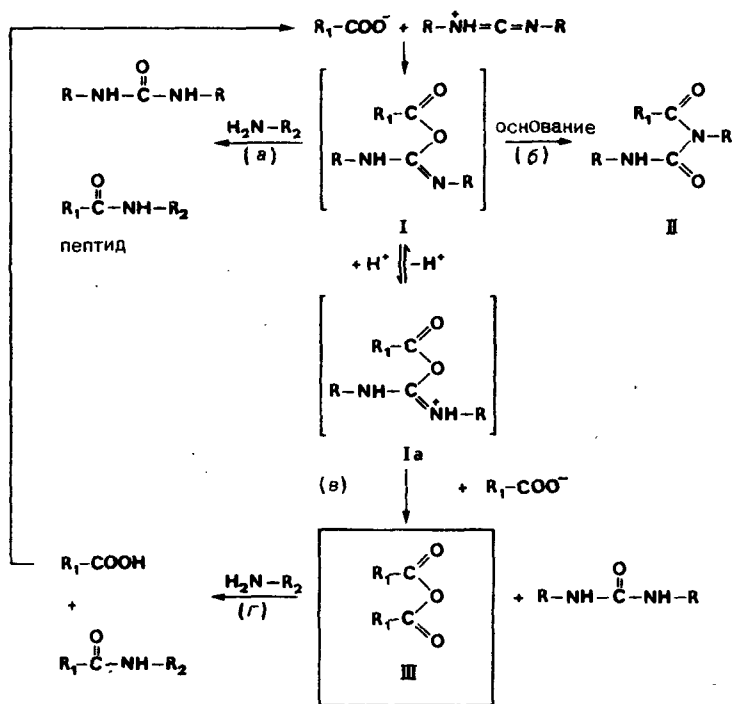


Рис. 2-9. Механизм образования пептидной связи с помощью ДЦК. R — циклогексил, R_1 — остаток N-защитной аминокислоты или пептида, R_2 — остаток C-защитной аминокислоты или пептида.

который с аминокомпонентом образует пептид с отщеплением замещенной мочевины (путь *a*). Протонированная форма ацилизоомочевины Ia может реагировать со следующей молекулой ациламиноокислоты с образованием симметричного ангидрида III и N,N'-дизамещенной мочевины (путь *b*). Симметричный ангидрид может реагировать с аминокомпонентом, образуя пептид и одну молекулу ациламиноокислоты (путь *z*).

Катализируемая основаниями перегруппировка О-ациллактама I в производное ацилмочевины (путь *b*) является нежелательной реакцией, так как приводит к неактивному соединению II. Эта реакция (O → N-миграция ацильной группы) катализируется не только избытком третичных оснований, катализ вызывается также аминокомпонентом и самим карбодиимидом, которые обладают достаточной основностью для этого.

2.2.5.4.1. Применение дициклогексилкарбодиимида

N,N'-Дициклогексилкарбодиимид (R — циклогексил) особенно пригоден в качестве конденсирующего реагента в тех случаях, когда продукт относительно дешев и хорошо растворим в растворителях, обычно применяемых для пептидных синтезов. Образующаяся при проведении синтезов дициклогексилкарбодиимидным методом N,N'-дициклогексилмочевина выпадает из реакционной смеси. Дициклогексилкарбодиимидные сочетания можно проводить в присутствии воды, так как скорости гидролитического и аминолитического расщепления О-ациллактама заметно различаются.

ДЦГК-метод особенно пригоден при ступенчатом синтезе пептидных фрагментов. Этим методом можно соединять без рацемизации пептидные фрагменты, имеющие на С-конце пролин или глицин. Во всех других случаях существует опасность рацемизации. Другим недостатком является уже упоминавшееся образование ацилмочевины. Этой побочной реакции можно в какой-то степени избежать, поддерживая низкую температуру и применяя неполярные растворители. Применение в качестве растворителей диметилформамида и N,N-диметилацетамида приводит к образованию производных ацилмочевины. Эти растворители даже при высокой степени чистоты содержат небольшие количества диметиламина, способствующего O → N-миграции ацильной группы. Далее, ДЦГК-активирование незащищенных остатков аспарагина и глутамина приводит к соответствующим нитрилам вследствие дегидратации амидных групп. Поэтому целесообразно при конденсациях с карбодиимидом использовать производные аминокислот, полностью защищенные по боковым функциям.

2.2.5.4.2. Применение модифицированных карбодиимидов

В то время как при синтезе коротких пептидов отделение N,N'-дициклогексилмочевины не составляет больших трудностей, при получении более крупных фрагментов это становится такой же проблемой, как и очистка от N-ацилмочевины. Чтобы избежать этих трудностей, были разработаны различные замещенные карбодиимиды с третичноаминными или четвертичноаммонийными группами. Побочные соединения, которые полу-

чаются с такими карбодиимидами, легче удалить благодаря их растворимости в воде или в кислотах. Такие соединения, как 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимидгидрохлорид [299] или 1-циклогексил-3(3-диметиламинопропил)-карбодиимидметилюид [300], делают возможным проведение реакций в водных растворах; их используют также для циклизации пептидов и в реакциях с белками.

Дальнейшее развитие этого класса соединений связано с полимерными карбодиимидами. Вольман и сотр. [301] синтезировали полигексаметиленкарбодиимид $-(\text{CH}_2)_6-\text{N}=\text{C}=\text{N}-(\text{CH}_2)_6-\text{N}=\text{C}=\text{N}-\text{N}_n-(\text{CH}_2)_6-$. Полимерная мочевины, получающаяся в результате реакции, легко удаляется. Ито и др. [302] предложили *несимметричные карбодиимиды*, N-атомы которых имеют различную электронную плотность, и поэтому при пептидном синтезе снижается нежелательная O — N-миграция ацильной группы, ведущая к N-ацилмочевине. При применении 1-бензил-3-этилкарбодиимида заметно снижается образование N-ацилмочевины. Кроме того, следует указать на гораздо меньшую по сравнению с ДЦГК степень рацемизации, определенную по тесту Янга (разд. 2.2.6.2).

2.2.5.4.3. Применение карбодиимидов с добавками

Несмотря на указанные ограничения, ДЦГК-метод оказался наиболее продуктивным для образования пептидной связи. Поэтому внимание исследователей было направлено на исключение или хотя бы снижение образования N-ацилмочевины и опасности рацемизации при конденсации фрагментов.

В 1966 г. Вюнш и Дресс [303], а также Вейганд и др. [304] нашли, что при одновременном введении 1 г-экв. ДЦГК и 2 г-экв. N-гидроксисукцинимидом образование пептидной связи протекает практически без рацемизации и без образования ацилмочевины. Метод Вюнша — Вейганда стал теперь конкурентно способным азидному методу для случаев конденсации фрагментов.

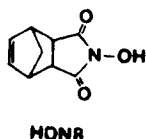
С помощью этого комбинированного ДЦГК-метода были успешно проведены фрагментные конденсации и циклизация фрагментов. Метод имеет, однако, недостаток: может протекать конкурентная реакция между ДЦГК и N-гидроксисукцинимидом, особенно заметная в случае стерически затрудненных пептидов. Согласно исследованиям Гросса и Билка [305], эта побочная реакция ведет к размыканию кольца O-ациллактама, образованного из эквимольных количеств ДЦГК и N-гидроксисукцинимидом, под действием второго моля N-гидроксисукцинимидом. При этом отщепляется дициклогексилмочевина. Промежуточный продукт — ацилнитрен перегруппировывается в изоцианат, который в свою очередь присоединяет третий моль N-гидроксисукцинимидом с образованием N-гидроксисукцинимидного эфира сукцинимидоксикарбонил-β-аланина. Этот активированный эфир может выступать в качестве конкурирующего ацилирующего реагента, вследствие чего происходит неконтролируемое встраивание β-аланина в пептидную цепь. (Механизм был установлен Ешкайтом [306], который исследовал вза-

имодействие ДЦГК с N-гидроксиглутаримидом.) Аналогичным путем образуется производное γ -аминомасляной кислоты.

Далее, естественно, начались поиски 1,2-динуклеофилов, которые благодаря своим структурным особенностям должны были предотвращать побочные реакции такого рода. В качестве добавок для карбодиимидного метода были предложены гидроксикарбонаты [278], 1-гидроксibenзотриазолы [308], 3-гидрокси-4-оксо-3,4-дигидрохиназолин [309], этиловый эфир 2-гидрооксимино-2-циануксусной кислоты (изонитрозоциануксусный эфир) [310], 4-нитро- или 4-хлор-бензолсульфгидроксамовая кислота [311], динитрил изонитрозомалоновой кислоты $\text{HO}-\text{N}=\text{C}(\text{CN})_2$ [312]. Предлагались также другие изонитрозопроизводные [313], 5,7-дихлор-8-гидроксихинолин [307], а также N-гидрокси-5-нонборней-2,3-дикарбоксиимид [314, 315].

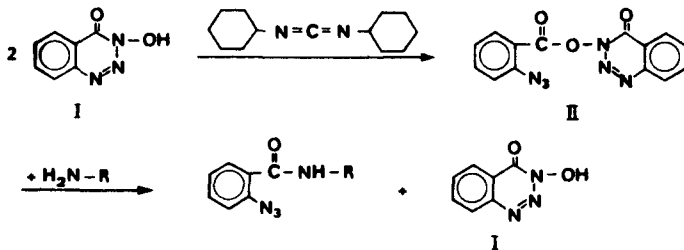
Долгое время методы Вюнша — Вейганда и Гейгера — Кёнига считались наиболее пригодными для синтеза пептидов. Что касается безопасности в отношении рацемизации, то, как показано новыми исследованиями [310, 312, 316, 317], имеются ограничения и при работе с ДЦГК-гидроксibenзотриазолом.

Большое практическое значение приобретает N-гидрокси-5-нонборней-2,3-дикарбоксиимид (HONB).



Эта добавка, предложенная Фуджино и сотр. [314, 315], вызывала лишь незначительную рацемизацию. Она была испытана на примерах синтеза некоторых важных пептидов (АКТГ, люлиберина и др.). Можно вести реакцию также с выделением соответствующего эфира.

3-Гидроокси-4-оксо-3,4-дигидро-1,2,3-бензотриазин (I) — прекрасная добавка в ДЦГК-методе [309], однако применение его сильно ограничено из-за нежелательной побочной реакции между триазином и ДЦГК. При этом образуется 3-(2-азидобензоилокси)-4-оксо-3,4-дигидро-1,2,3-бензотриазин (II), который в конце концов ацилирует аминокомпонент (R — остаток аминокомпонента):



На различных примерах было показано, что 3-гидрокси-4-оксо-3,4-дигидрохиназолин можно применять в качестве добавки как для ступенчатого синтеза, так и для фрагментной конденсации [284].

Кислые добавки (N-гидроксисбензотриазол) могут катализировать димеризацию ДЦГК в 1,3-дициклогексил-2,4-бис-(циклогексимилино)-1,3-дiazетидин [318].

Для интерпретации влияния 1,2-динуклеофильных добавок на течение реакции по модифицированному ДЦГК-методу исходят из допущения [319], что вначале из карбоксикомпонента и ДЦГК получается очень реакционноспособное O-ацилпроизводное изомочевины (III) (рис. 2-10). Оно

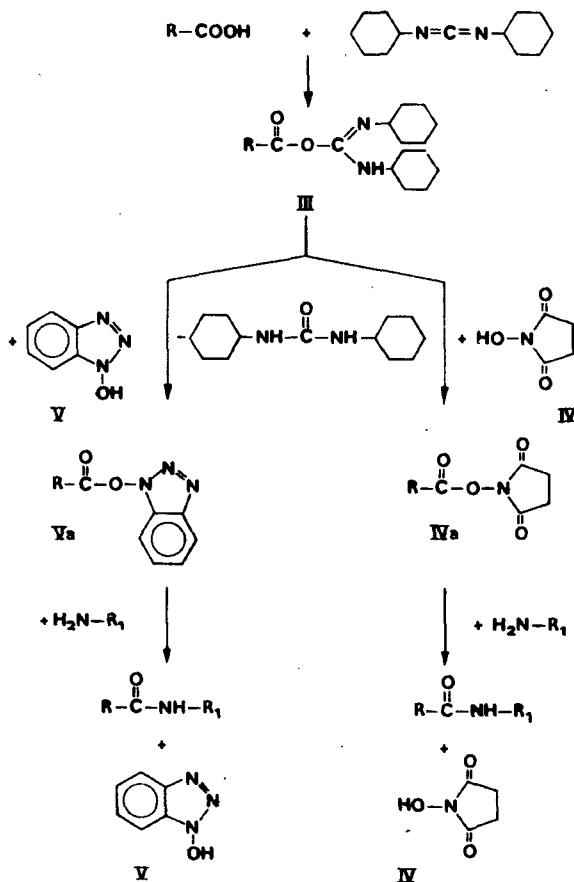


Рис. 2-10. Реакции, протекающие при синтезе по ДЦГК-методу с добавками N-гидроксисоединений. R — остаток карбоксикомпонента, R_1 — остаток амнокомпонента.

очень быстро реагирует с добавленным N-гидроксисоединением, как, например, N-гидроксисукцинимидом (IV) или N-гидроксibenзотриазолом (V), и превращается в соответствующие активированные эфиры IVa или Va. В противоположность склонным к рацемизации производным O-ацилмочевины аминолиз промежуточных активированных эфиров протекает без рацемизации.

Исключение образования N-ацилмочевины объясняется относительно высокой кислотностью N-гидроксисоединений IV и V.

По Пшибыльски и сотр. [313] димерный азлактонный комплекс, способствующий рацемизации в полярных растворителях, в присутствии добавки переходит в комплекс азлактон — добавка, благодаря чему снижается опасность рацемизации. Вероятно, ход реакции в ДЦГК-методе с добавками гораздо сложнее, чем это представлено на схеме.

При использовании в качестве добавок к ДЦГК кислот Льюиса [320] было продемонстрировано, что для снижения рацемизации образование активированного промежуточного продукта с участием добавки не является обязательным. Синтез Tfa-Pro-Val-Pro-OMe с ДЦГК и SbCl_3 или AlCl_3 в качестве добавок прошел практически без рацемизации. Значение кислот Льюиса в практике пептидного синтеза сравнительно невелико, так как при этом получают низкие выходы пептидов. Между тем ZnCl_2 хорошо подходит в качестве добавки: рацемизация снижается так же, как в случае N-гидроксibenзотриазола; эту добавку можно применять в препаративных синтезах. На примере оптически активного 1,3-оксазолин-5-она, а именно 2-(1'-бензилоксикарбонилпирролидин-2-ил)-L-4-изопропил-5-оксо-4,5-дигидрооксазола, который соответствует карбоксильному компоненту модельного пептида Вейганда, впервые удалось доказать, что раскрытие кольца оксазола метиловым эфиром пролина катализируется кислотами Льюиса [321]. При этом одновременно снижается рацемизация и увеличивается скорость реакции размыкания кольца. Сообразно с этим размыкание оксазолонового кольца с сохранением оптической активности достигается не только с помощью N-гидроксисоединений, но и с электрофильными добавками, которые ускоряют размыкание оксазолонового кольца и снижают основность среды.

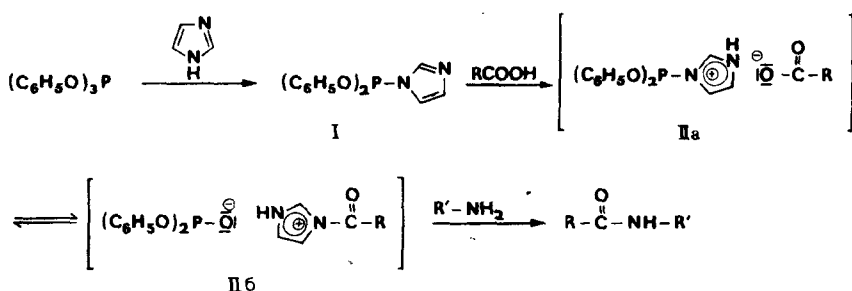
2.2.5.5. *Пептидные синтезы с применением соединений фосфора*

Применение соединений фосфора для образования пептидной связи кажется обоснованным уже потому, что при биосинтезе белка активирование аминокислот происходит при реакции с аденозинтрифосфатом. При этом в качестве промежуточного соединения образуется ангидрид аминокислоты и адениловой кислоты с элиминированием пирофосфата.

Наряду с классическим *фосфоразо-методом* [322] было описано большое число методов конденсации с участием соединений фосфора. В подавляющем большинстве случаев речь идет об ангидридах с кислотами фосфора. Ниже рассматриваются только некоторые интересные методы.

2.2.5.5.1. Метод Митина

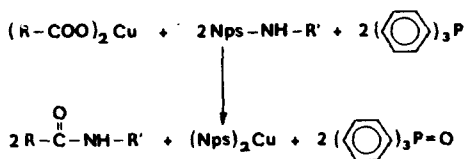
Митии и сотр. [323, 324] предложили проводить конденсацию N-ациламинокислоты с эфирами аминокислот в присутствии трифенилфосфита и 2 г-экв. имидазола при 40 °С. В качестве растворителей используют ацетонитрил, диоксан или диметилформамид. Соответствующие эфиры N-ацилпептидов получаются с хорошими выходами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



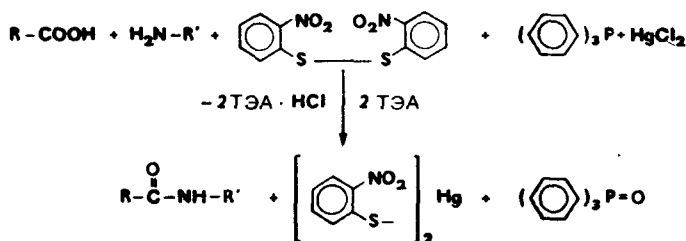
Хотя допустимы и другие промежуточные ступени, реакция, вероятно, идет прямо через N-ацилимидазолиум-(дифенил)-фосфит (II_б), который образуется из имидазолил-(дифенил)-фосфита (I) и карбоксильного компонента. В качестве N-защитных групп используют бензилоксикарбонильный или *трет*-бутилоксикарбонильный остаток, тогда как, например, арилсульфенильные группы приводят к побочным реакциям.

2.2.5.5.2. Метод Мукайма

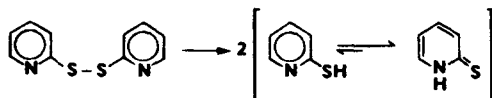
Мукайма и сотр. [325] предложили методику синтеза, названного окислительно-восстановительной конденсацией. Медная соль ациламинокислоты и эфир 2-нитрофенилсульфениламинокислоты реагируют с трифенилфосфином, причем Cu²⁺ выступает как тиольная «ловушка»:



Точно так же могут реагировать с трифенилфосфином свободная N-ациламинокислота и эфир аминокислоты, если в реакцию добавить ди-(2-нитрофенил)-дисульфид, хлорид ртути(II) (как тиольную «ловушку») и триэтиламин для связывания хлороводорода:

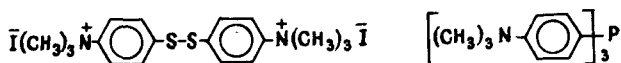


Еще лучше в качестве дисульфидного компонента вводить дипиридил-2-дисульфид [326]. Добавка тиольной «ловушки» не нужна, так как образующийся во время реакции пиридин-2-тиол перегруппировывается в более устойчивый тион:



Метод Мукаяма пригоден и для реакций конденсации на полимерных носителях.

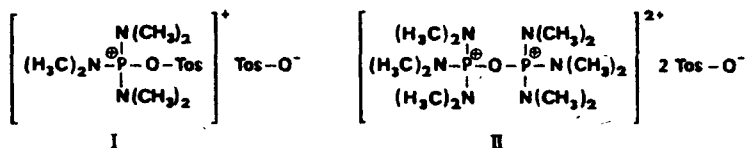
Интерес представляет использование для окислительно-восстановительной конденсации водорастворимых производных диарилдисульфида и триарилфосфина [326a]:



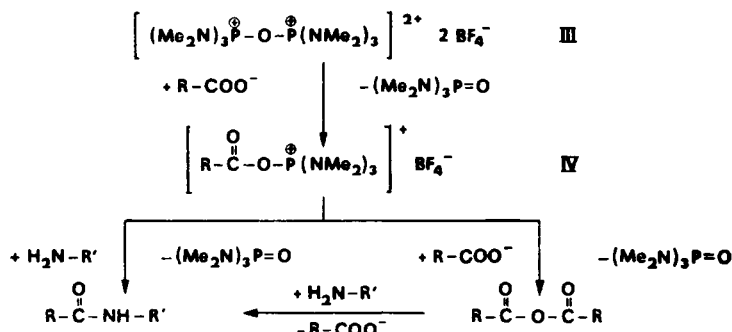
Применение этих реагентов значительно облегчает выделение синтезированного пептида, так как все побочные продукты реакции легко удаляются водой.

2.2.5.5.3. Применение других производных фосфора

Кеннер, Шепард и др. [421] разработали метод конденсации с применением гексаметилтриамида фосфорной кислоты (ГМТАФ) и ангидрида 4-толуолсульфокислоты. Промежуточные продукты, образование которых вначале было постулировано, в конце концов удалось выделить [328]. При добавлении ангидрида 4-толуолсульфокислоты к ГМТАФ сначала при 20 °C за 5—20 мин образуется тозилат монокациона (I), который при нагревании до 55 °C переходит в дитозилат (II).

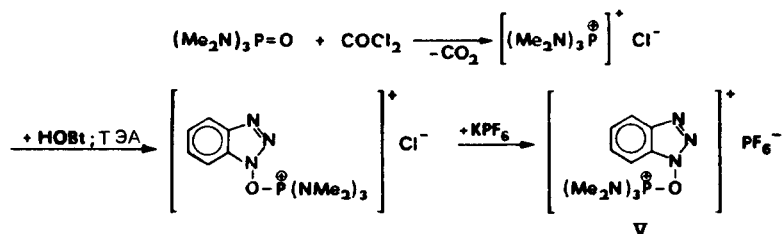


Очень гигроскопичный дитозилат II может быть переведен в сухом ацетонитриле с тетрафтороборатом натрия в кристаллический негигроскопичный бис-(тетрафтороборат) III, который известен как *реактив Бейтса*. При его использовании дипептиды получаются с высоким выходом. Правда, этот метод не вполне надежен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



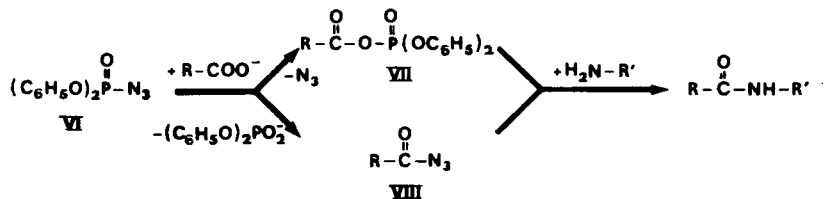
фониевая соль (IV), с которой реагирует аминокислота. Наряду с этим возможен также путь через симметричный ангидрид.

Структурно аналогичный реагент *гексафторфосфат бензотриазолил-окситрис-(диметиламино)-фосфония* (V) может быть приготовлен сравнительно просто [329]:



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

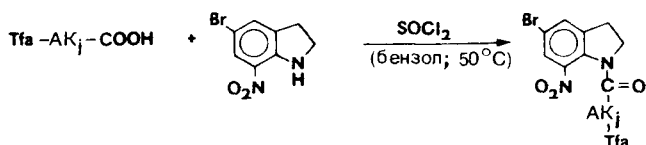
Практический интерес в качестве реагента конденсации представляет *фосфорилиазид* (VI) [331]. В этом случае наряду с несимметричным ангидридом VII в качестве промежуточного продукта может получаться также ацилазид (VIII).



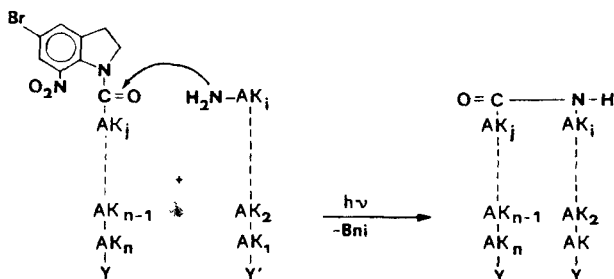
Метод Уги можно рассматривать как комбинацию реакции Пассерини с конденсацией Манниха. Для получения пептидных фрагментов проводят в одну стадию, без выделения промежуточных продуктов, взаимодействие *N*-ацетиламиноокислоты (I), замещенного амина (II), альдегида (III) и изонитрила (IV) (производного аминокислоты или пептида). Сначала из четырех компонентов образуется неустойчивый продукт присоединения V, который спонтанно и очень быстро перегруппировывается внутримолекулярно по реакции 1-го порядка через пятичленный промежуточный цикл в *N*-замещенное производное пептида VI. После отщепления R_1 получают желаемый пептид VII.

Принципиальная пригодность четырехкомпонентной конденсации для синтеза пептидных фрагментов с 3—5 остатками аминокислот была показана Уги и сотр. [340] на примере синтеза производного тетравалина.

Фотохимический метод конденсации для связывания пептидных фрагментов был разработан Пачорником и сотр. [343] на основе 5-бром-7-нитроиндолинил-группы (БНИ-группа), которая прежде была описана как карбоксизащитная группа. БНИ-группа сравнительно устойчива и может отщепляться в присутствии воды при облучении ($\lambda < 400$ нм). В неводных растворах 1-ацил-5-бром-7-нитроиндолин фотохимически ацилирует также и другие нуклеофильные соединения (амины, спирты, фенолы, тиолы и т. д.). Это и наводило на мысль применить БНИ-группу для фотохимической конденсации фрагментов. При построении пептидного фрагмента *C*-конец защищают БНИ-остатком:



Затем обычным путем синтезируют нужный фрагмент. Фотохимическая реакция конденсации происходит со вторым фрагментом, имеющим свободную аминофункционацию:



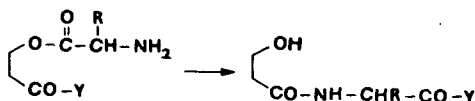
Таким путем можно получить пентапептид по схемам 2 + 3 или же 4 + 1.

Главная трудность при обычном пептидном синтезе в растворе заключается в соединении больших фрагментов, состоящих из 50 и более остатков аминокислот. Так как реакция конденсации протекает как реакция 2-го порядка, для быстрого соединения фрагментов нужны высокие концентрации реагирующих партнеров. Защищенные длинноцепочечные пептиды часто плохо растворяются в используемых для

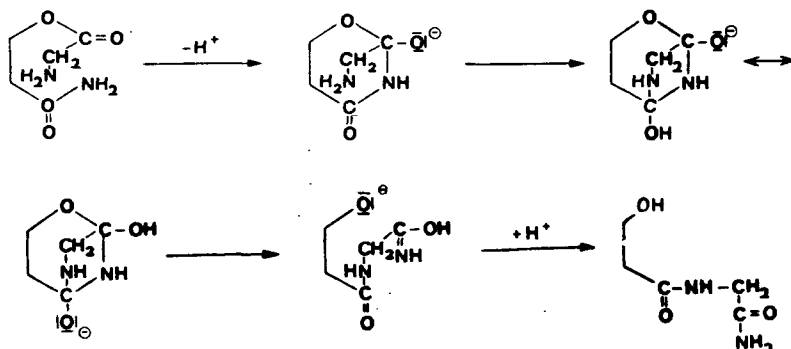
конденсации растворителей. При низкой концентрации реагентов реакции конденсации идут очень медленно. В этих условиях могут идти необратимые внутримолекулярные побочные реакции или обменные взаимодействия с растворителем. Не спасает положения и более энергичное активирование карбоксила, так как при этом повышается опасность рацемизации. Здесь могли бы помочь некие «молекулярные шипцы», с помощью которых активные группы связывающихся фрагментов приводятся в тесное соседство, и образование пептидной связи идет независимо от концентрации. Принципиальную возможность этого дает метод Уги, который, однако, еще не получил широкого практического применения.

В этой связи следует сказать о классических исследованиях групп Т. Виланда и М. Бреннера, которые теоретически и экспериментально занимались этой сложной проблемой.

По реакции Бреннера, пептиды получают с помощью внутримолекулярной перегруппировки, известной как *аминоацильная перегруппировка*. Предварительным условием такого превращения является наличие гидроксильной группы в β -положении к карбоксилу.

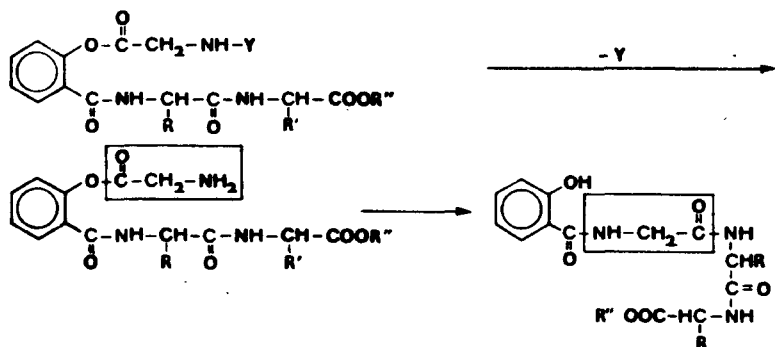


Для таких реакций подходят свободные карбоновые кислоты ($\text{Y} = \text{OH}$), эфиры ($\text{Y} = \text{OR}$), амиды ($\text{Y} = \text{NH}_2$), а также замещенные амиды ($\text{Y} = \text{NH-R}$). Так как N-ациламинокислоты представляют собой замещенные амиды ($\text{Y} = \text{NH}-\text{CHR}-\text{COY}'$),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



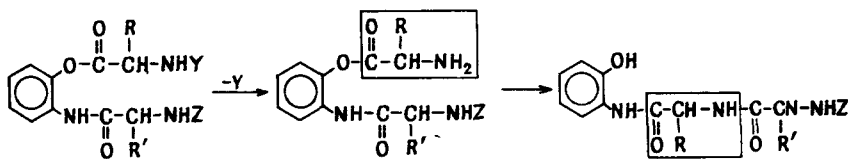
Превращение очень легко протекает с салициловой кислотой в качестве гидроксисодержащего компонента:





После введения О-аминоацильного остатка и последующего отщепления аминозащитной группы Y происходит спонтанная перегруппировка с образованием эфира салицилоилтрипептида. Широкое применение этого метода ограничено тем, что очень трудно осуществить отщепление остатка салициловой кислоты после завершения синтеза. Один из диациламидов, полученный при такого рода перегруппировке, описан Виландом и сотр. в 1956 г.

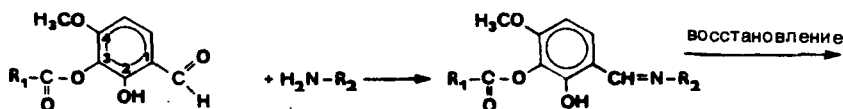
Интерес представляет внутримолекулярная перегруппировка производных о-аминофенола, также приводящая к образованию пептидной связи [344a]:

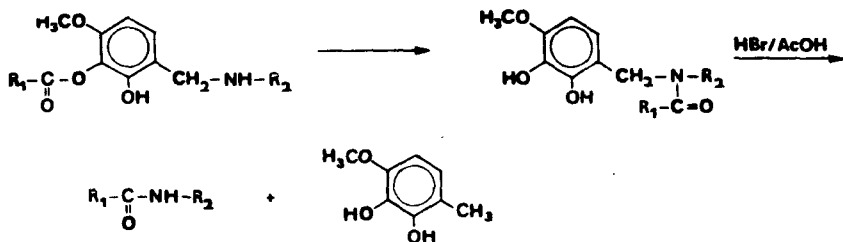


В отличие от перегруппировки Бреннера наращивание пептидной цепи здесь идет от С- к N-концу.

Кемп и сотр. [345] описали метод аминной «ловушки». При этом используют соединения, в которых аминокомпонент ковалентно привязан к некоему электрофильному центру в непосредственной близости от эфирной функции активированного ацильного производного. Образование пептидной связи происходит в результате внутримолекулярной перегруппировки.

В качестве системы, фиксирующей аминокомпонент, оказался пригодным 4-метокси-3-ацилокси-2-гидроксibenзальдегид. В ацетонитриле этот альдегид с эфирами аминокислот очень быстро образует шиффовы основания, которые легко восстанавливаются в соответствующие производные бензламина. Далее внутримолекулярная О → N-перегруппировка дает N-бензламид, из которого пептидное производное освобождается при обработке HBr/AcOH :





Исходя из 4-метокси-3-бензилоксикарбонилглицил-2-гидроксибензальдегида, после его взаимодействия с тетраметилгуанидиновой солью дипептида H-Leu-Gly-OH, восстановления и перегруппировки, получили с 92%-ным выходом Z-Gly-Leu-Gly-OH с 4-метокси-2,3-дигидроксибензильным остатком у азота лейцина.

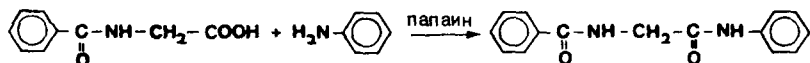
Все эти методы, так же как и метод Уги, могут иметь определенные перспективы в трудной проблеме соединений больших пептидных фрагментов.

2.2.5.7. Ферментативный синтез пептидов

Еще до первого химического образования пептидной связи делалась попытка получить белок с помощью ферментов. В 1886 г. Данилевски показал, что при инкубации продуктов расщепления белка с неочищенной смесью ферментов желудочного сока выпадает белковоподобный осадок. Завьялов и сотр. в 1901 г. назвали продукт такого синтеза пластеином. Впоследствии многие исследователи занимались синтетами высокомолекулярных пластеинов при воздействии протеолитических ферментов на концентрированные растворы подходящих олигопептидов (ср. разд. 2.2.9.2.)

Использованию ферментов в качестве катализаторов для реакции соединения пептидов и в настоящее время уделяется большое внимание. Катализ образования пептидов при биосинтезе белка осуществляет фермент пептидилтрансфераза. Так как этот фермент взаимодействует с протеиногенными аминокислотами независимо от природы боковой цепи, теоретически он представляет собой идеальный катализатор для реакций целенаправленного синтеза пептидов. Пептидилтрансфераза в сложной рибосомной системе структурно тесно связана со всеми другими составляющими, кроме того, на стадии элонгации во время биосинтеза белка одновременно действуют также другие факторы. Поэтому вероятность того, что выделенный из естественной среды фермент вообще будет способен к катализу реакции синтеза пептидов, очень мала. Никакого выхода в практику пептидного синтеза не получил также изученный Липманном механизм биосинтеза пептидных антибиотиков, который проходит с участием определенных ферментов.

Первое использование гидролазы для реакции синтеза осуществлено Хиллом в 1898 г. на примере мальтазы. Только 40 лет спустя Бергман и Френкель-Конрат [346] осуществили первое ферментативное образование амидной связи. Действуя папаином на гиппуровую кислоту и анилин, они получили анилид гиппуровой кислоты:



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

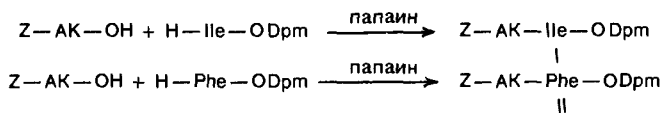
используют производные аминокислот или пептидов и продукт выпадает в осадок, благодаря чему равновесие сдвигается в сторону образования пептида.

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

После работ исследовательских групп Исова (Исследовательский центр по химии в Сагами) и Морихара (Исследовательская лаборатория в Синоги) в Японии и Луизи и сотр. в Швейцарии на ферментативном пептидном синтезе сосредоточились интересы исследователей, работающих в области пептидной химии. В результате дальнейшей интенсивной разработки методик ферментативного синтеза намечается многообещающая фаза развития этого метода в качестве дополнения к классическим химическим методам конденсации, а также для решения полусинтетических задач.

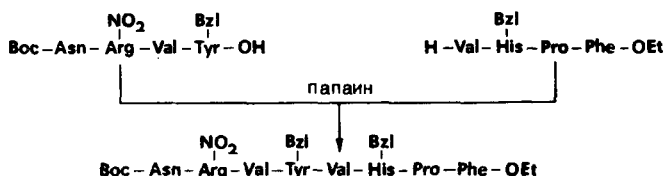
В качестве ферментов использовались протеазы животного, растительного и микробного происхождения. Исова и сотр. [347] применяли в качестве катализаторов для образования пептидной связи папаин, пепсин, субтилизин BPN' (нагароза), а также бактериальные металлопротеазы пролизин (*Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens*), тациназу N (*Streptomyces caespitosus*), термолизин и термоазу (*Bacillus thermoproteoliticus*).

Особенно хорошими свойствами как катализатор для синтеза пептидов обладает растительная тиюльная протеаза папаин (*Carica papaya*) благодаря малой субстратной специфичности при расщеплении. Это показано на примерах двух модельных реакций [347]:



Выход, %			Выход, %		
AK	I	II	AK	I	II
Gly	53	77	Gln	55	98
Ala	92	89	Arg(NO ₂)	73	96
Leu	59	92	Lys(Z)	100	80
Phe	37	95	Glu	71	—
Ser	21	72	Met	—	96
Thr	73	78	His(Bzl)	—	97

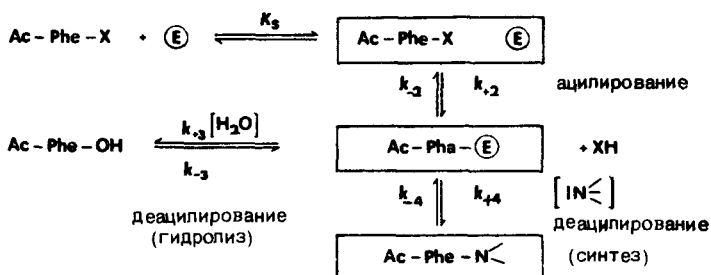
С другими названными выше протеазами также получены многообещающие результаты при реакциях конденсации. Исова и сотр. показали применимость ферментативного синтеза для получения небольших биологически активных пептидов, таких, как, например, [1-аспарагин, 5-валин]-ангиотензин (II):



Выход аналога ангиотензина в смеси буфера (pH 5,5) и метанола (1:1 по объему) составил 78%.

Большого внимания заслуживает описанный Кульманом [348] ферментативный синтез Leu- и Met-энкефалинов (ср. разд. 2.3.3.2) с использованием только катализируемой протеазами конденсации, причем из семи ферментативных реакций пять было проведено с папаином. Скорость катализируемого папаином пептидного синтеза существенно повышается при применении в качестве карбоксильного компонента алкиловых эфиров вместо N-замещенных аминокислот или пептидов (Якубке и др., 1981 г.).

Обширные экспериментальные данные по применению α -химотрипсина и трипсина как катализаторов образования пептидной связи получены в работах Морихара и Ока [350]. Карбоксикомпонент Ac-Phe-OEt ($X = \text{OEt}$) реагирует с химотрипсином и после образования фермент-субстратного комплекса дает ацилфермент, который может реагировать либо с аминокислотным компонентом ($IN \equiv$) с образованием пептида, либо с водой, давая продукт гидролиза:



Поскольку в случае пептидного синтеза из эфирного субстрата и производного аминокислоты или пептида $k_4 > k_3$, идет преимущественно кинетически контролируемый синтез пептида до тех пор, пока в реакционной смеси есть эфирный субстрат. Луизи и сотр. [353, 354] применяли субстраты со свободной карбоксильной функцией, а в качестве аминокислотных компонентов вводили амиды или алкиловые эфиры аминокислот, причем последние всегда давали худшие выходы.

На основании того, что добавки органических растворителей сдвигают равновесие катализируемых протеазами реакций в сторону синтеза (Ласковский и др., 1978 г.), а также для улучшения растворимости реагентов в реакционную смесь часто добавляются смешивающиеся с водой органические растворители.

Куль и сотр. [356] и Мартинек и сотр. [356a] исследовали катализируемое ферментами образование пептидной связи в двухфазных водно-органических системах. Преимущество такой методики состоит в том, что функционирующая как катализатор протеаза не повреждается органическим растворителем, что гарантирует более высокие выходы, кроме того, можно вернуть обратно биокатализатор после разделения фаз. Далее Кёнек и сотр. [386] впервые провели успешные пептидные синтезы с иммобилизованным химотрипсином. Наряду с иммобилизованными ферментами можно также использовать ферменты, адсорбционно фиксированные на силикагеле, что было продемонстрировано на примере синтеза пептидов с помощью химотрипсина, фиксированного на силикагеле [443].

Ока и Морихара [352], а также Семенов и Мартинек [466] описали синтезы с применением растворимых протеаз, при этом продукты синтеза не выпадали в осадок. В качестве катализатора для синтезов пептидов применялась также термитаза (Кёнек, Якубе [443]), хотя из-за высокой эстеразной активности фермента выходы бывали не всегда удовлетворительными.

Очень хороша для ферментативного пептидного синтеза карбоксипептидаза Y (CPD-Y) из пекарских дрожжей, синтетические возможности которой тщательно изучены группой Йохансена [349]. Авторы применяли CPD-Y для получения различных синтетических объектов, в том числе энкефалина. Большие ожидания возлагаются на CPD-Y в области семисинтеза, в особенности для превращения инсулина свиньи в человеческий (такое превращение было описано также с применением других протеаз [351]). О значении протеаз для семисинтеза [540] см. разд. 2.2.10.1.3.

Из аспартатпротеаз наибольший интерес для катализа синтеза пептидов представляет пепсин [355].

Реакции конденсации, катализируемые протеазами, обладают по сравнению с химическими методами следующими преимуществами; полное исключение рацемизации, простота проведения процесса, минимальные требования к защите функций боковых цепей и др. Недостатком является, однако, невозможность универсального применения протеаз из-за их высокой специфичности. Кроме того, иногда бывает трудно предсказать ход реакции. После дальнейших методических усовершенствований ферментативная каталитическая конденсация может стать еще одним полезным методом в пептидной синтетической химии.

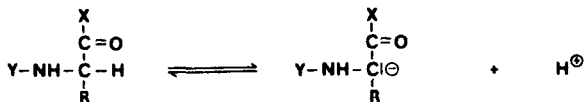
2.2.6. Проблемы рацемизации при пептидных синтезах

Все операции при синтезе пептидов, которые проводятся по функциональным группам, связанным с асимметрическим центром, тают в себе опасность рацемизации.

При синтезе длинноцепочечных оптически активных пептидов отсутствие рацемизации в ходе конденсации имеет решающее значение, так как стереоизомеры крупных фрагментов почти невозможно разделить с помощью таких операций очистки, как кристаллизация, ионообменная хроматография и др. Оптическая чистота синтетических пептидов зависит от степени рацемизации на каждой стадии конденсации. Если представить себе, что на каждой стадии синтеза рацемизация составляет только 1%, то после 100 конденсаций продукт будет содержать всего 61% желаемого стереоизомера. Этот пример показывает, какое огромное значение имеет проблема рацемизации при пептидных синтезах. Поскольку целью пептидных синтезов является получение биологически активных пептидных и белковоподобных веществ, биологическая активность которых зависит от оптической чистоты, то следует уделять особое внимание вопросам снижения рацемизации при пептидных синтезах.

2.2.6.1 Механизмы рацемизации

Свободные аминокислоты имеют сравнительно стабильную стереическую конфигурацию. У активированных по карбоксилу N-ациламинокислот, применяемых для пептидного синтеза, опасность рацемизации гораздо больше. Рацемизация может происходить при обратимом отщеплении протона от α -углеродного атома:



У образующегося при отщеплении протона карбаниона все заместители расположены в одной плоскости. Присоединяющийся обратно протон с равной вероятностью может подходить с одной и с другой стороны этой плоскости, при этом образуется рацемат. Устойчивость связи C—H сильно зависит от природы заместителей. Рацемизация может катализироваться и основаниями, и кислотами, причем этому благоприятствуют высокие температуры и полярные растворители. В условиях конденсации решающую роль играет рацемизация, катализируемая основаниями. Ниже обсуждаются два основных механизма рацемизации.

2.2.6.1.1. Азлактонный механизм

Рацемизация, происходящая в условиях конденсации, вызывается главным образом промежуточным образованием «оптически лабильного» азлактона (1,3-оксазолин-5-она). При активировании N-ациламинокислоты I (рис. 2-11) может с отщеплением HX образоваться азлактон, который, как известно, очень легко рацемизуется [357]. Скорость образования азлактона II зависит от различных факторов. Благодаря электрофильному заместителю X

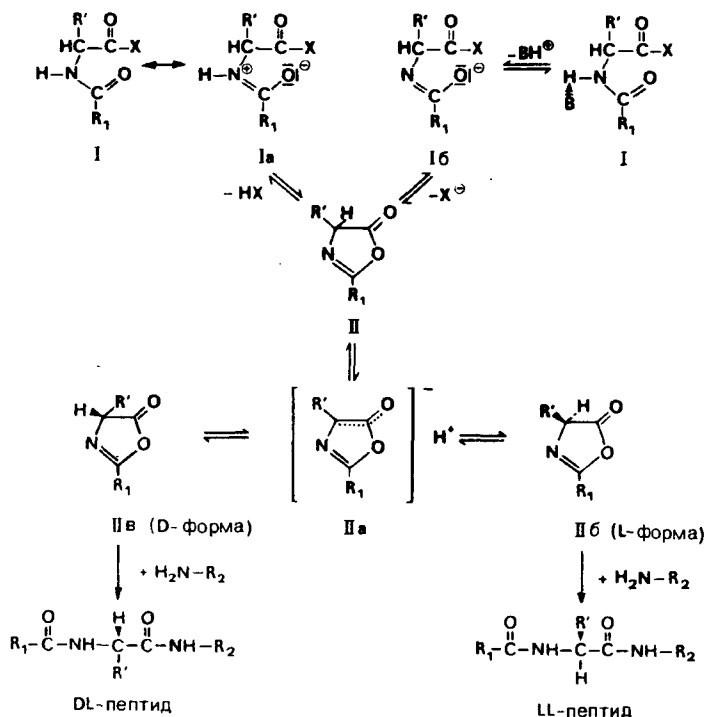


Рис. 2-11. Азлактонный механизм рацемизации. R' — остаток С-концевой аминокислоты, R_1 — остаток пептида, X — активирующая группа, R_2 — остаток аминок компонента, B — основание.

углеродный атом карбоксила получает положительный заряд, что способствует внутримолекулярной нуклеофильной атаке на кислород карбонила ацильной группы RCO ; такие N-ацильные группы, как ацетил, бензоил, трифторацетил, аминоацил и др., облегчают образование азлактона, потому что они усиливают нуклеофильность кислорода карбонила амидной группы (**Ia**). На образование азлактона влияют, далее, основность среды, вид растворителя и температура. Так, при действии основания может отщепляться амидный протон (быстрая реакция). В полученном амид-анионе **Ib** благодаря нуклеофильному кислороду идет замыкание кольца и получается азлактон **II**. Циклизация является стадией, определяющей скорость процесса. Полярный растворитель способствует образованию амид-аниона [358, 359].

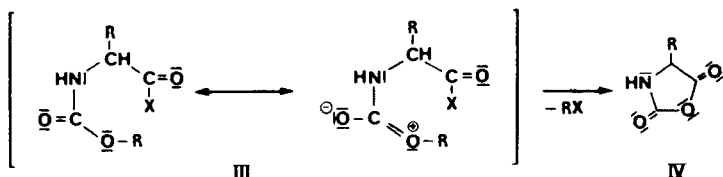
Полученный азлактон **II** может легко рацемизоваться в условиях конденсации (аминокомпонент, основные активирующие средства и др.). При

этом благодаря псевдоароматическому промежуточному IIа устанавливается катализируемое основанием равновесие между обоими энантиомерами IIб и IIв. Наряду с аминолизом активированного карбоксикомпонента I (аминолиз на рис. 2-11 не показан) оптически активный аминокомпонент реагирует с энантиомерами азлактона с образованием LL- и DL-пептидных производных.

Раскрытие кольца происходит с различной скоростью [360]. Соотношение полученных диастереомеров определяется принципом Куртина — Гаммета. При размыкании азлактонного кольца эфирами L-аминокислот доминирует образование DL-пептида. При образовании пептидной связи по азлактонному механизму степень рацемизации зависит как от тенденции образования азлактона, так и от скорости размыкания азлактонного кольца аминокомпонентом. Важную роль играет при этом нуклеофильность аминокомпонента.

Для исключения или снижения рацемизации, протекающей по азлактонному механизму, существуют различные возможности. Лучше всего выбирать такие условия для образования пептидной связи, при которых азлактоны не могут образоваться.

1. *Постепенное наращивание пептидной цепи с применением N-защитных групп уретанового типа.* Аминокислоты и пептиды с такими защитами (см. разд. 2.2.4.1.1.1.) не образуют азлактонов в активированном состоянии. Алкоксикарбониламинокислоты III могут, правда в активированной форме ($X = Cl$), давать N-карбоксиянгидриды [1,3-оксазолидин-2,5-дионы] IV, однако алкоксигруппы препятствуют образованию азлактонного кольца.



Бенуатон и Чен сообщили [361], что при определенных условиях из Вос-аминокислот и карбодиимида вопреки существовавшему мнению образуются 2-алкоксиксазолонны. Последние, однако, в противоположность оптически лабильным 2-алкилоксазолонам гораздо более устойчивы и конденсируются с аминокомпонентами без рацемизации.

2. *Активирование N-защищенных фрагментов пептидов с C-концевым пролином.* При введении карбоксикомпонента с C-концевым пролином образование азлактона невозможно, так что такие пептиды можно активировать, не опасаясь рацемизации. Нет опасности рацемизации также при активировании фрагментов с C-концевым глицином из-за отсутствия хиральности у этой аминокислоты.

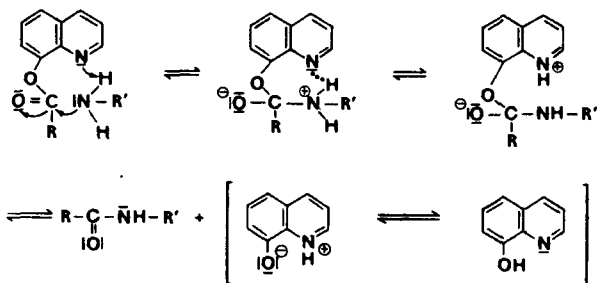
3. *Использование азидного метода.* Азидная конденсация безопасна в отношении рацемизации при условии отсутствия избытков *трет*-основания

и поддержания низких температур реакции (разд. 2.2.5.1). Отсутствие рацемизации объясняется электростатической стабилизацией азидной группировки N-ациламинокислоты.

4. *Применение метода Уги.* Преимущество метода четырехкомпонентной конденсации (разд. 2.2.5.6) состоит в том, что в отличие от обычных методов конденсации активированные производные пептидов не рацемизируются.

5. *Применение активированных эфиров, аминолиз которых протекает через переходное состояние, стабилизированное водородными мостиками.* Хотя в этом случае при реакциях конденсации нет полной гарантии отсутствия азлактонов, рацемизация либо не идет, либо идет в ничтожной степени.

В 1965 г. были предложены для пептидного синтеза N-гидроксипиридиновые и 8-хинолиловые эфиры (разд. 2.2.5.3). Это активированные эфиры с новым механизмом действия, который показан на примере 8-хинолилового эфира [262]:



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

6. *Карбодимидный метод с добавками* (разд. 2.2.5.4.3) принадлежит к наиболее часто применяемым методам конденсации. Гудман и сотр. [363, 364] провели исследование N-гидроксисоединений на снижение степени рацемизации в случае оптически активных пептидазлактонов, полученных при действии ДЦГК. Согласно этим исследованиям, азлактонное кольцо может размыкаться без рацемизации при действии вицинальных бифункциональных нуклеофилов (так называемых α -нуклеофилов или 1,2-динуклеофилов), в особенности производных гидроксиламина или гидразина, при условии, если:

- 1) их нуклеофильность больше, чем их основность;

- 2) при присоединении к азлактону может образоваться дополнительная циклическая система с водородным мостиком у О-атома карбонила;
- 3) нуклеофильный центр располагает отщепляемым протоном.

Стабилизация азлактона и последующее размыкание кольца без рацемизации с образованием N-гидроксисукцинимидного эфира ациламино кислоты демонстрируется на примере гидроксисукцинимиды:



Относительно кислые гидроксисоединения оказывают влияние на основность реакционной среды, препятствуя образованию N-ацилмочевины, а также снижают тенденцию к рацемизации образующегося азлактонного кольца. Хорошо действуют в качестве добавок кислоты Льюиса, в особенности хлорид цинка [320], хотя они не могут образовывать способный к аминолизу промежуточный продукт, как в случае производных N-гидроксилamina. Все эти добавки существенно снижают рацемизацию при размыкании азлактонного кольца эфиром аминокислоты. Это было показано на примере синтеза Z-Pro-Val-Pro-OMe из соответствующего оптически активного азлактона и Pro-OMe. Наблюдаемый эффект объясняется как каталитическим влиянием на скорость размыкания кольца, так и понижением рацемизации азлактона вследствие снижения основности реакционной среды.

Наряду с приведенными возможностями снижения рацемизации, вызванной образованием кольца азлактона, известны также методы конденсации, такие, как метод смешанных ангидридов (разд. 2.2.5.2.1), которые при соблюдении определенных условий реакции проходят практически без рацемизации.

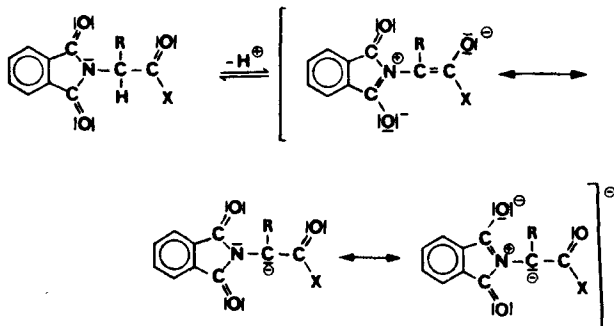
Подробно ознакомиться с проблемой рацемизации можно по прекрасным обзорам Янга [365] и Гудмана [357].

2.2.6.1.2. Рацемизация при прямом α -депротонировании

На устойчивость α -C—H-связи аминокислот сильно влияет характер заместителей. Особенно легко при катализе основаниями рацемизируются активированные эфиры N^α -бензилоксикарбониламинокислот, имеющие β -заместители, оттягивающие электроны. Рацемизация через азлактоны в этом случае исключена. Предполагается [366], что в таких случаях рацемизация протекает путем прямого α -депротонирования, причем возникающий карбанион мезомерно стабилизируется. Механизм β -элиминирования и обратного присоединения, который первоначально постулирован для рацемизации 4-нитрофенилового эфира N-бензилоксикарбонил-S-бензил-L-цистеина, был опровергнут исследованиями Ковача и др. [367]. Изучение

других активированных эфиров этой замещенной аминокислоты привело к гипотезе [369], что в данном случае следует говорить об изорацемизации [368].

Рацемизация активированных эфиров N-фталиламиноокислот также объясняется прямым отрывом протона [370]:



Вызываемая основаниями рацемизация азидов N-ацилпептидов протекает по аналогичному механизму [357].

2.2.6.2. Определение степени рацемизации

Степень рацемизации при конденсации и стереическую однородность полученного пептида нельзя ставить в непосредственную связь друг с другом. Так, к примеру, считают, что процесс протекает без рацемизации, если в результате операций очистки происходит более или менее полное разделение стереоизомеров. Из большого числа описанных тестов рацемизации ясно, что идеального метода определения рацемизации нет. Все химические тесты испытываются на модельных пептидах. Поэтому распространение полученных результатов на огромное множество пептидных последовательностей, полученных из 20 протениогенных аминокислот, по меньшей мере спорно. За неимением лучших методов новые методы сочетания следует испытывать на нескольких различных модельных системах.

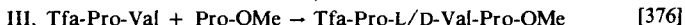
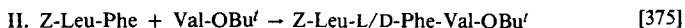
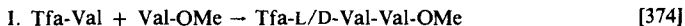
1. *Тест Андерсона — Каллагана* [371]. В случае модельного пептида Z-Gly-Phe-Gly-OEt (пептид Андерсона), полученного из Z-Gly-Phe-OH и Gly-OEt, можно разделить стереоизомеры образовавшегося рацемата фракционной кристаллизацией. Чувствительность определения степени рацемизации 1—2%.

2. *Тест Янга* [372]. Для этого поляриметрического метода в качестве модельного пептида вначале использовался Ac-Leu-Gly-OEt. Лучшими свойствами обладает эфир дипептида Bz-Leu-Gly-OEt, полученный из Bz-Leu-OH с Gly-OEt. Долю оптически чистого соединения можно рассчитать из значений удельного вращения неочищенного продукта реакции. После омыления эфира можно дополнительно определить количество DL-пептида фракционной кристаллизацией. Чувствительность также 1—2%,

причем, однако, по сравнению с тестовым пептидом Андерсона—Каллагана склонность к рацемизации у этого пептида в десять раз выше.

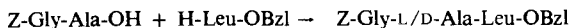
3. *Тест Кемпа* [373] разработан на основе тестовых систем Андерсона или Янга Кемпом и сотр. Благодаря применению техники изотопного разбавления чувствительность определения степени рацемизации намного повышена и составляет $\sim 0,001$ —1%.

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



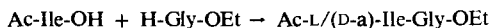
Согласно второму варианту, после отщепления защитных групп трифторуксусной кислотой в анизоле при частичном гидролизе трипептида получают Phe-Val. Его этерифицируют (HCl/метанол), затем получают трифторацетильное производное с помощью метилового эфира трифторуксусной кислоты. Соотношение диастереоизомеров Tfa-L/D-Phe-Val-OMe, определенное газохроматографическим анализом, дает степень рацемизации. Вариант III подкупает простотой исполнения. Чувствительность $\sim 0,1$ —1%.

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



Диастереоизомеры, полученные при отщеплении защитной группы гидролизом, разделяются ионообменной хроматографией и после окрашивания нингидрином определяются количественно. Чувствительность $\sim 0,1$ —1%.

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



После полного гидролиза полученного дипептида количественно определяют D-алло-изолейцин и изолейцин на автоматическом анализаторе. Чувствительность $\sim 0,1$ —2%.

7. *Тест Гальперна — Вайнштейна* [379]. С помощью сигналов метильной группы аланина в спектре ЯМР можно провести определение степени рацемизации без разделения стереоизомеров:



Различный химический сдвиг метильной группы аланина у LL-пептида по сравнению с LD-изомером делает возможным определение DL-пептида. Чувствительность $\sim 3\%$.

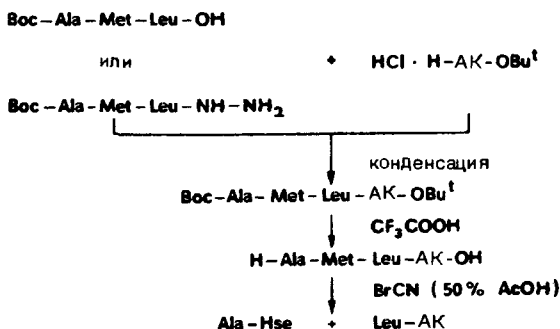
Используя сателлитный сигнал ^{13}C -H LL-пептида в качестве внутреннего стандарта, можно при низком содержании DL-изомера повысить чувствительность в 10 раз [380].

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



и отщепления защитных групп гидрогенолизом получается изомерная смесь LDLL/LLLL. При инкубации с лейцинаминопептидазой энзиматически расщепляются полностью только L-изомеры. L-Аланин определяется количественным аминокислотным анализом и соответствует учетверенному значению степени рацемизации, происшедшей у C-концевого D-аланина карбоксикомпонента. Этот тест относится к наиболее чувствительным методам определения рацемизации.

9. Тест Фуджино [387]. Тестовая система основана на взаимодействии Boc-Ala-Met-Leu-OH с *трет*-бутиловыми эфирами лейцина, изолейцина или же с β -*трет*-бутиловым эфиром аспарагиновой кислоты с последующим расщеплением бромцианом и определением соотношения диастереомеров при помощи аминокислотного анализатора:



Таким образом, можно разделить L- и D-изомеры H-Leu-AK-OH (AK = Leu, Ile, Asp). С помощью этой тестовой системы можно изучать влияние аминокислотного компонента на степень рацемизации. Оказалось, что Asp(OBu^t) способствует рацемизации сильнее, чем Leu или Ile, даже в отсутствие гидрохлорида триэтиламина. Результаты представлены в табл. 2-8.

На примере карбодиимидного метода с добавкой N-гидрокси-5-нонборнен-2,3-дикарбоксимидна, было изучено влияние различных растворителей при конденсациях фрагментов. Результаты этого исследования показали, что системы ДМФ — ДМСО (1:1), N-метилпирролидон (НМП) — пиридин и ДМФ — H₂O (7:3) не подходят для фрагментной конденсации. Предпочтительной по сравнению с другими растворителями оказалась система ДМФ — НМП (1:1).

Наряду с приведенными методами определения рацемизации в литературе описаны другие тестовые системы, на которых, однако, нет возможности останавливаться. В заключение можно только добавить, что недопу-

Таблица 2-8. Степень рацемизации, определенная с помощью различных тестов [387]

Метод (в ДМФ)	Температура, °C	Степень рацемизации (%) на различных модельных системах ^a		
		Leu-Ile	Leu-Leu	Leu-Asp
ДЦГК/HONB	0	0,7	1,5	3,42(6,0)
ДЦГК/HONSu	0	1,6	2,9	9,24
ДЦГК/HOBt	0	0,7	1,9	9,1
ДЦГК	0	8,7(8,0)	9,3(4,6)	14,8(20,1)
ЭЭДХ	0	0,7	1,2	9,1
Мукайма	0	19,8(9,6)	26,5(13,5)	11,7
Азидный (Рудингер)	-30	1,3	2,3	8,03
Азидный (без выделения)	-15	4,2	4,5	7,02
Азидный (с выделением)	-15	1,6	2,7	5,5
СА	-20	3,9	—	—
С пепсином (в 30%-ном MeOH)		1,6	—	—
Ступенчатое наращивание		0,8	—	—

^a В присутствии 1 г-экв. гидрохлорида триэтиламина; в скобках приведены данные, когда аминокомпонент вводился в виде свободного основания.

стимо обобщать результаты, полученные с помощью только одной тестовой системы. Это подтверждают исследования Фуджино и сотр. с различными аминокомпонентами. Бенойтон и сотр. [388] исследовали зависимость рацемизации от последовательности фрагмента с помощью серии модельных пептидов. Им удалось показать, что степень рацемизации определяется не только характером активированной С-концевой аминокислоты. Аминокислотный остаток, стоящий перед ней, а также, как было установлено еще Фуджино, N-концевая аминокислота аминокомпонента оказывают решающее влияние на рацемизацию.

2.2.7. Пептидные синтезы на полимерных носителях

В 1962 г. Меррифилд [389] разработал новую стратегию химического синтеза пептидов и белков, которая, как и биосинтез белка, протекает на второй фазе. Правда, еще в 1955 г. Николс [390] сообщил о методе, согласно которому аминокислота, фиксированная на ионообменнике посредством четвертичных аммониевых групп, соединяется после смены растворителя со второй аминокислотой, находящейся в растворе, образуя производное дипептида. Все же следует признать огромную важность открытия Мерри-

филдом пептидного синтеза на полимерных носителях с ковалентным присоединением.

Удивительно простая идея этого нового метода синтеза состоит в том, что аминокислота закрепляется через свою карбоксильную группу на нерастворимом легко фильтруемом полимере, и затем пептидная цепь постепенно наращивается с С-конца. Для этой цели N-замещенные аминокислоты вводят в реакцию с реакционноспособными группами полимерной смолы. С аминокислоты, ковалентно соединенной с полимерной частицей, удаляется N-защитная группа, и полученный аминоацильный полимер реагирует со следующей N-защищенной аминокислотой. Пептидная цепь ступенчато наращивается на полимерной матрице. На последней стадии синтеза Меррифилда расщепляется ковалентная связь между С-концевой аминокислотой построенной полипептидной цепи и якорной группировкой полимерного носителя. Нерастворимый носитель может быть отделен от находящегося в растворе полипептида простым фильтрованием. Решающее преимущество метода Меррифилда состоит в том, что избегают трудоемких и требующих много времени операций по очистке промежуточных продуктов. Ценный продукт реакции все время остается прикрепленным к полимерному носителю, в то время как избытки реагентов и побочные продукты удаляются фильтрованием. Простота эксперимента и возможность автоматизации привели сначала даже к мнению, что благодаря этой новой синтетической концепции будет, наконец, решена проблема химического синтеза ферментов и других белков. Однако после подробного изучения и интенсивной разработки этой новой техники синтеза были выявлены серьезные лимитирующие факторы, которые впоследствии привели к реалистической оценке этого метода. Конечно, сведение трудных стадий высаживания и очистки при обычных методах в растворе к простому процессу фильтрования в твердофазном синтезе уже означает неоспоримое преимущество.

Однородные продукты реакции получаются только в том случае, если как конденсация, так и деблокирование протекают практически количественно. Так как эти требования не всегда выполнимы, то на носителе накапливаются примеси. Поэтому после снятия пептида с носителя требуется тщательная очистка конечного продукта. Отмена очистки промежуточных продуктов в случае синтеза Меррифилда, декларированная вначале как удобство, оказалась впоследствии сомнительным преимуществом.

Дальше наряду с методом Меррифилда будут обсуждаться некоторые методы на основе этой же концепции.

2.2.7.1. *Синтез пептидов на твердой фазе (синтез Меррифилда)*

Хотя все описанные методы пептидного синтеза с применением нерастворимых или растворимых полимерных носителей основаны на главном принципе, введенном Меррифилдом, понятие «синтез Меррифилда» следует употреблять специально для пептидного синтеза с твердыми носителями. По причине громадного количества работ, появившихся с 1963 г., полный

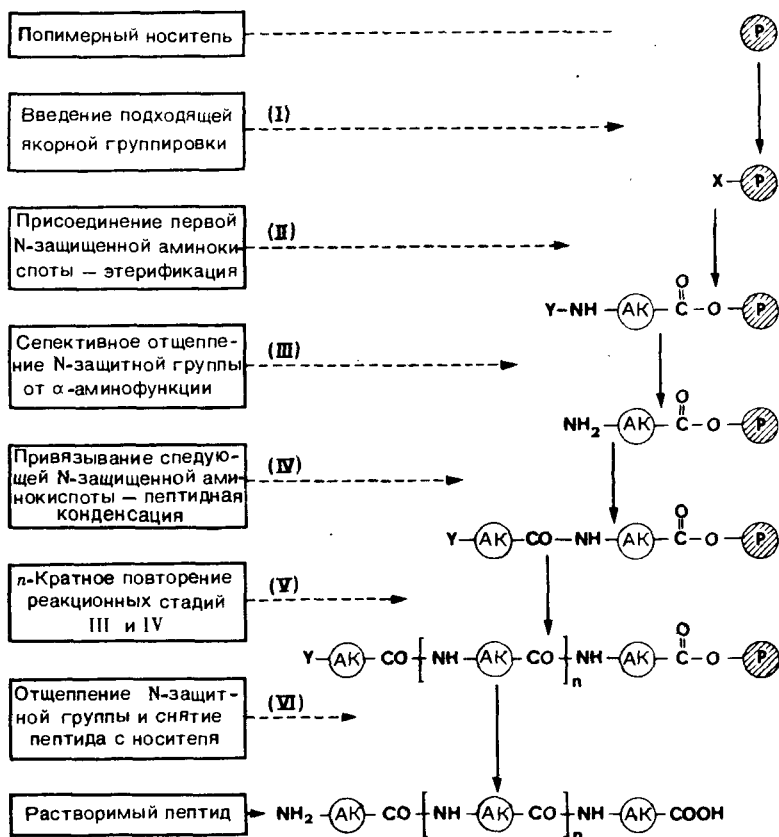


Рис. 2-12. Схема синтеза Меррифилда.

обзор литературы в рамках этой книги невозможен. Поэтому следует указать на обзоры [391—395] и специальную монографию [396], в которых подробно описана техника работы. Правда, в этой литературе отсутствует критическая оценка метода [397, 398]. Принцип метода Меррифилда схематически приведен на рис. 2-12.

В качестве полимерного носителя наиболее подходит сополимер полистирола с 2% дивинилбензола (ДВБ), хотя предлагались и другие. Сшивка с 1% ДВБ благодаря более высокой набухаемости особенно подходит для синтеза длинноцепочечных полипептидов.

Шарики смолы, полученные бисерной полимеризацией, имеют диаметр 20—100 мкм. После набухания в органических растворителях, применяемых для пептидного синтеза, они становятся проницаемы для реагентов.

Авторадиографические исследования показали, что образующиеся полипептидные цепи равномерно распределяются внутри полимерных зерен (рис. 2-14). Эти данные противоречат мнению, по которому реакции должны протекать только на поверхности носителя. Вычислено, например, что в зернышке полистирол/1% ДВБ диаметром 50 мкм при степени замещения 0,3 ммоль/г могут разместиться $\sim 10^{12}$ пептидных цепей небольшого белка.

Полимерный носитель должен быть химически инертен, совершенно нерастворим в применяемых растворителях и легко фильтруем. Этим требованиям удовлетворяет классический носитель Меррифилда. Несмотря на это, были испробованы многие другие типы носителей. Недостатки большинства носителей — недостаточная механическая прочность, низкая емкость, значительная сольватация самого носителя и растущей цепи пептида и др. Появились модифицированные полистирол/ДВБ-носители, кроме того, изучались также и другие полимеры.

Для того чтобы в значительной мере исключить влияние диффузии при гетерогенных реакциях на полимерном носителе, предлагались разные типы носителей, которые допускают только реакции на поверхности, например ненабухающий сополимер стирола и дивинилбензола с высокой степенью сшивок и макропористый носитель с твердой матрицей, но большой внутренней поверхностью — так называемые «пленочные» или «щеточные» смолы.

Пленочный, или пелликулярный, носитель [399] был получен полимеризацией тонкого слоя смолы на поверхности инертных стеклянных шариков. Такой носитель имеет низкую механическую прочность и поэтому применим только для колоночных

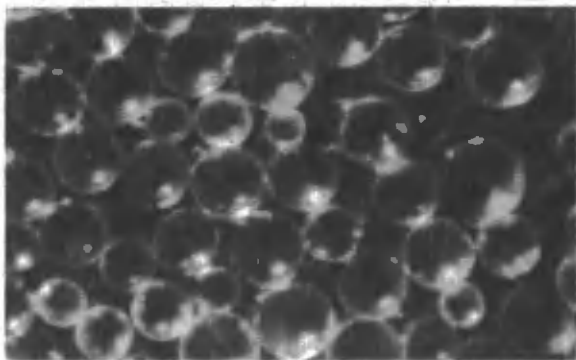


Рис. 2-13. Фотография зерен полистирола с 1% ДВБ [467].

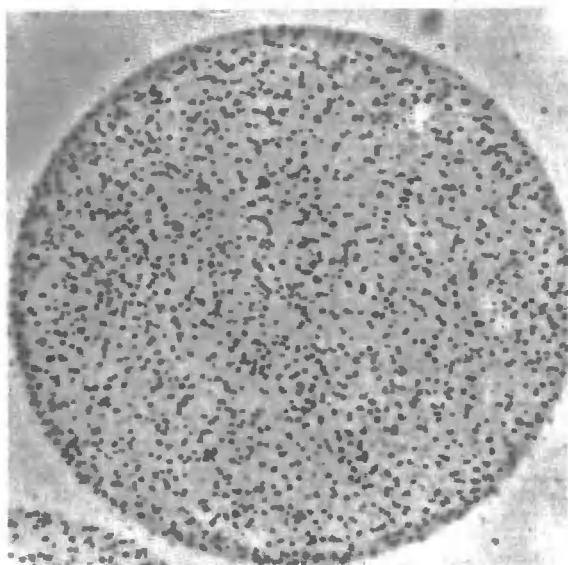
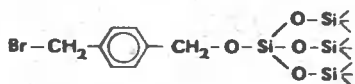


Рис. 2-14. Автодиаграмма пептидов, меченых H^3 , в зернах полистирола с 1% ДВБ [467].

методов. Для последних предложены также щеточные смолы, у которых функциональные группы «торчат» наружу, как щетина у щетки [400].



Пробовали применять также полимеры в форме лент, пленки, волокна (особенно для автоматических методов). Недостатком носителей такого типа является их низкая емкость.

Согласно Шеппарду [401], различные лимитирующие факторы синтеза Меррифилда можно объяснить различием полярностей углеводородной основы полимерной матрицы и растущей на носителе пептидной цепи (рис. 2-15).

На рис. 2-15, а схематически изображается идеальное расположение. Обычно применяемая полистирольная матрица неполярна и набухает в неполярных растворителях (CH_2Cl_2 и др.), в то время как полярная пептидная цепь в этих условиях сжимается (б). В полярных растворителях (в ледяной уксусной кислоте, ДМФ, спир-

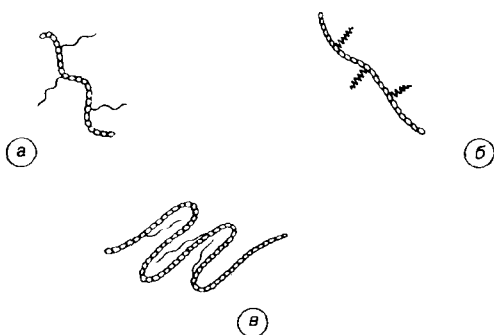


Рис. 2-15. Поведение привязанной к носителю полипептидной цепи в растворителях различной полярности [401].

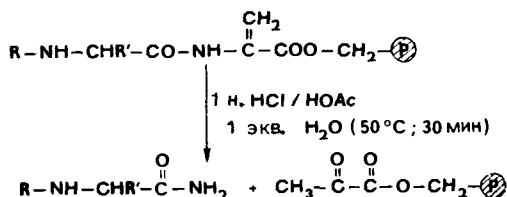
тах и др.) матрица носителя сжимается, причем сольватированные короткие пептидные цепи могут оказаться зажатыми (а).

Для разрешения этой проблемы был предложен сетчатый полиакриламидный носитель [402], и для синтезов применяли полярный растворитель.

Вообще свойства обычного полимера Меррифилда меняются с ростом пептидной цепи. При нормальной емкости 0,1—0,5 ммоль/г уже после присоединения 13 остатков аминокислот масса носителя повышается примерно в 2 раза. Более 50% пептидсмолы состоит теперь из пептида, что заметно влияет на набухаемость в неполярных растворителях. Добавкой ДМФ или мочевины можно в некоторых случаях улучшить свойства системы.

Введение подходящих «якорных» группировок (I, рис. 2-12) в полимерный носитель нужно для ковалентного связывания первой аминокислоты. Классической якорной группой является хлорметильная, которая может сравнительно легко вводиться хлорметилированием полистирол/ДВБ-смолы по Фриделю — Крафтсу в присутствии хлорида олова(IV) [403]. Некоторые якорные группы приведены на рис. 2-16 [404]. (Выбраны группы, для которых достаточно исследовано отщепление защищенного фрагмента пептида от полимерного носителя.)

Наряду с этим развивались другие направления синтеза на полимерных носителях; приведем несколько примеров. Согласно Гроссу и сотр. [414], в качестве якорной группировки для синтеза пептидов с С-концевыми амидными группами годится дегидроаланин:



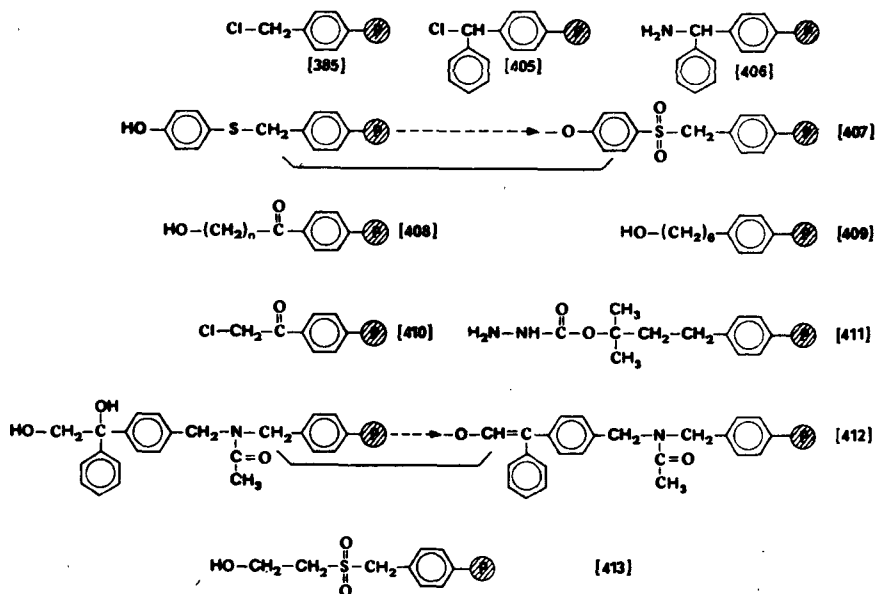
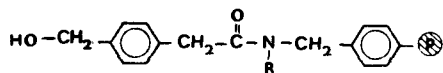
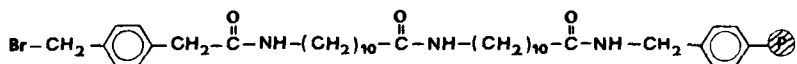


Рис. 2-16. Якорные группировки для синтеза Меррифилда [404].

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



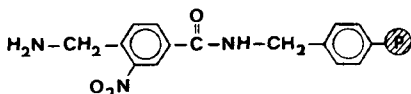
Однако отщепление пептида от носителя в этом случае возможно только с помощью HF . Что касается повышения выхода при твердофазном синтезе пептидов, то оказалось, что более длинные группировки между С-концевой аминокислотой и полимерным носителем оказывают положительное влияние, например [417]:



Многообразие якорных группировок объясняется постоянными усилиями исследователей разрешить проблемы твердофазного синтеза. Всеобъемлющий обзор даже только наиболее важных работ здесь едва ли изможен.

В заключение рассмотрим *фотолитическое отщепление* пептидов после синтеза; метод основан на использовании особых якорных группировок, а также так называемого принципа безопасной «ловушки».

Так, люлиберин был синтезирован аналитически чистым (выход 65%) на носителе с 3-нитро-4-аминометилбензоиламидной группой, которая делает возможным фотолитическое снятие пептида при 350 нм [418]:



Этот мягкий метод отщепления, который дает пептиды с С-концевыми амидными группами, приводит к высоким выходам также в случае пептидов со стерически затрудненными концевыми аминокислотными остатками. Фотолиз α -метилфенацильных эфиров был перенесен и на твердофазный синтез [419]. Фотолитические методы отщепления позволяют проводить синтез защищенных пептидных фрагментов.

Основываясь на фотолабильных якорных группировках, Меррифилд разработал так называемую «ортогональную» коцепцию защит для твердофазного пептидного синтеза [420]. С этой целью вводятся защитные группы различных типов, которые могут селективно отщепляться при действии разных реагентов.

В условиях отщепления защитных групп одного класса остальные защитные группы совершенно устойчивы, так как их механизмы отщепления различны (рис. 2-17). В то время как защитные группы боковых цепей могут отщепляться ацидолизом, а якорная группа — фотолизом, устойчивая в этих условиях *дитиосулфонильная* группа (Dts) может отщепляться тиольным реагентом (мягкое восстановление).

Требование полиой устойчивости во время пептидного синтеза и мягкого отщепления после его окончания практически трудновыполнимы для связи пептид-носитель. Теоретически кажется, что этим требованиям, скорее всего, может удовлетворить носитель с так называемой группой «безопасного захвата». При этом используют якорную связь, которая совершенно устойчива в условиях синтеза, а после него может легко отщепляться в

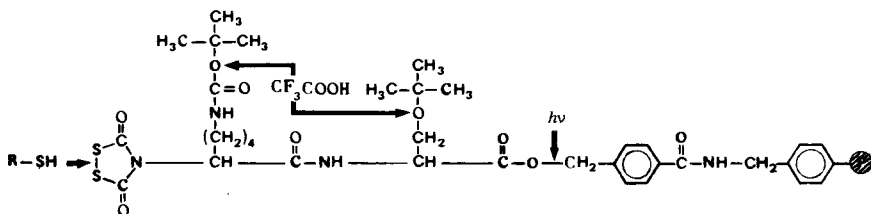
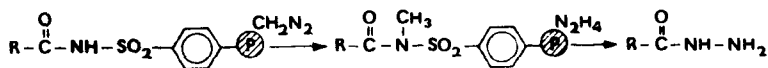
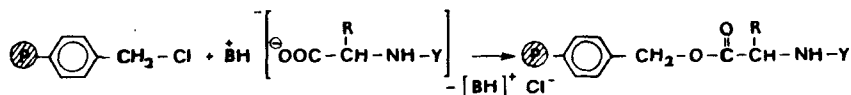


Рис. 2-17. Принцип ортогональных защит по Меррифилду [420].

мягких условиях. Так, например, ацилсульфонамидная связь совершенно устойчива к трифторуксусной кислоте или к НВг в уксусной кислоте, а после N-метилирования может отщепляться в мягких щелочных условиях (N_2H_4 , NaOH , NH_3) [421]. Этот принцип лежит в основе многих работ.

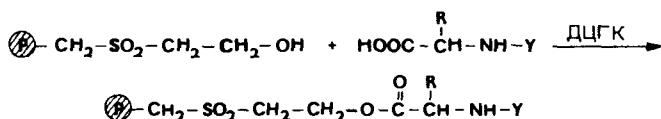


Присоединение первой аминокислоты (II, рис. 2-12) может происходить с образованием эфирной, гидразидной или амидной связи. В большинстве случаев используется образование эфирной связи:



Этерификация хлорметилированных смол происходит в этаноле, ТГФ, бензоле и др. при нагревании до кипения (24—50 ч), причем выходы невелики — 14—50%. Применение гидроксида тетраметиламмония вместо триэтиламина приводит к более высокой степени этерификации и, кроме того, препятствует образованию четвертичных аммониевых групп на носителе [422].

Гидроксиметилированный носитель дает возможность присоединять исходную N-замещенную аминокислоту с помощью N,N-карбонилдиимидозола [423]. 2-Гидроксиэтилсульфонилметилированный полимер («β-сульфовая смола»), предложенный Тессером и Элленброеком [424], позволяет присоединять первую аминокислоту с помощью мягких методов образования пептидной связи, как, например, посредством дициклогексилкарбодиимида.



По окончании синтеза пептид снимается с носителя β-элиминированием в мягких щелочных условиях.

Наряду с приведенными примерами описаны многие другие варианты присоединения исходных аминокислот [391—396].

После присоединения к носителю первой N-защитной аминокислоты все остальные операции проводятся в специальном стеклянном реакторе, снабженном пористой пластинкой, приспособлением для отсасывания и тубусом (рис. 2-18).

Для перемешивания предлагались различные способы встряхивания реакционного сосуда. Процесс можно вести и вручную, и автоматизировать, применяя доступный продажный «синтезатор» (см. ниже). Перед началом синтеза необходимо аналитически определить количество присоединенной аминокислоты. Практически достаточно содержания 0,1—0,5 ммоль ами-

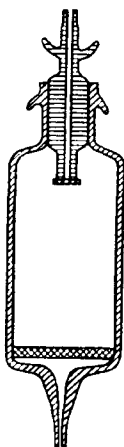


Рис. 2-18. Реакционный сосуд для синтеза Меррифилда.

нокислоты на грамм смолы. Данные по содержанию аминокислоты в смоле необходимы для дозирования реагентов, а также используются при определении выходов.

Селективное отщепление N^{α} -замещенной группы (III, рис. 2-12) — следующая ступень синтеза Меррифилда. Выбор N^{α} -аминозащитной группы зависит как от прочности связи между исходной аминокислотой и полимерным носителем, так и от защитных групп на функциях боковых цепей. Требования к защитным группам, применяемым в твердофазном синтезе, особенно велики в отношении селективности отщепления.

Приемлемой оказалась комбинация N^{α} -*трет*-бутилоксикарбонильной группы с блокированием функций боковых цепей на основе бензильной группы. Для отщепления *Вос*-группы применяются 1 н. HCl в уксусной или в муравьиной кислоте, 4 н. HCl в диоксане и трифторуксусной кислоте, а также раствор трифторуксусной кислоты в дихлорметане, 98%-ная муравьиная кислота и т. д.

Ввиду опасности частичного деблокирования N^{α} -бензилоксикарбонильных групп лизина и орнитина или бензильного остатка тирозина комбинация их с N^{α} -*Вос*-группой не рекомендуется.

Гораздо более устойчивы различные замещенные бензилоксикарбонильные остатки (разд. 2.2.4.1.1.1). В условиях деблокирования N^{α} -*Вос*-группы с помощью трифторуксусной кислоты в дихлорметане (1:1) достаточно устойчивыми оказались ω -бензиловые эфиры аспарагиновой и глутаминовой кислот, а также *O*-бензиловые эфиры треонина и серина. Еще более кислотолабильную N^{α} -*Врос*-группу (табл. 2-1) можно применять для твердофазного синтеза в комбинации с защитными группами боковых функций на основе *трет*-бутиловых эфиров.

Само собой разумеется, можно использовать N^α -аминозащитные группы, отщепляемые при фотолизе. Хорошей комбинацией защитных групп является Fmoc-группа для α -аминой функции и защиты третичнобутильного типа для боковых цепей [425, 426]. Fmoc-группа отщепляется в мягких основных условиях, например, с помощью 50%-ного пиперидина в CH_2Cl_2 .

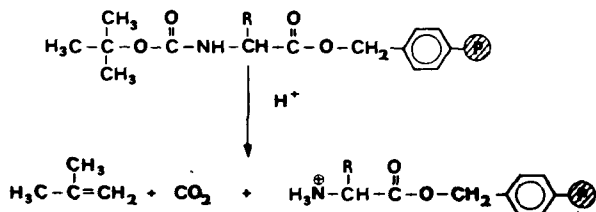
Защита имидазольного азота гистидина — так же как и при синтезе в растворе — представляет серьезную проблему. Применение N^{Im} -бензильной группы вызывает трудности при отщеплении, так как действие натрия в жидком аммиаке далеко не щадящий метод и может затрагивать также имидазольное кольцо. Другая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

Гуанидиновая группа аргинина может блокироваться нитрованием или тозилрованием. Последний метод, очевидно, предпочтительнее, так как тозилный остаток может быть удален как посредством HF, так и с помощью расщепления бортрис-(трифторацетата) [427]. В случае нитроаргинина существует опасность расщепления с образованием орнитина. Все еще недостаточно решена проблема защиты цистеина при твердофазном синтезе, хотя перепробовано множество вариантов. Амидные группы глутамина и аспарагина целесообразно защищать. Общеизвестные побочные реакции при применении многофункциональных аминокислот, такие, как, например, транспептидация в случае аспарагиновой кислоты или образование пирролидон-5-карбоновой-2 кислоты с глутамином, представляют опасность также и в случае синтезов Меррифилда.

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

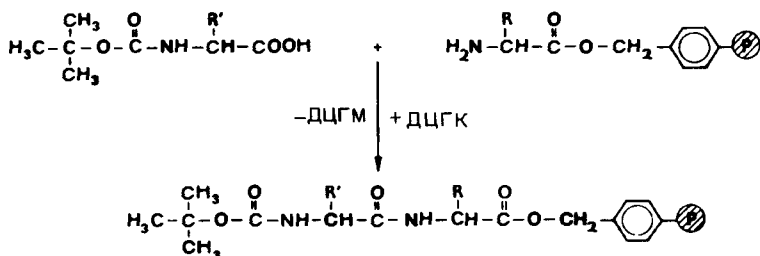
Описанная проблематика защитных групп при твердофазном пептидном синтезе показывает, что различные лимитирующие факторы метода Меррифилда тесно связаны с указанными неразрешенными (или же недостаточно разрешенными) вопросами. Совокупность этих проблем не может здесь подробно обсуждаться, поэтому желающие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

После удаления ацидолизом наиболее часто используемой N^α -Вос-группы получается протонированная аминная функция.



Аминогруппа освобождается с помощью триэтиламина в хлороформе, ДМФ или CH_2Cl_2 , и ее содержание определяется количественно титрованием элюированного с триэтиламином иона хлора.

Для присоединения следующей *N*-защищенной аминокислоты (IV, рис. 2-12) были испробованы почти все известные методы образования пептидной связи, исключая азидный. Наиболее применимым до сих пор оказался ДЦГК-метод (разд. 2.2.5.4).



Согласно Ребеку [428], ДЦГК-конденсация в условиях твердофазного синтеза протекает через стадию симметричного ангидрида, в то время как в гомогенной фазе в качестве промежуточного соединения доминирует *O*-ациллактим. Образующаяся дициклогексилмочевина препятствует диффузии внутрь набухшей смолы. Из этих соображений предложен метод Хагемейера [429], по которому сначала из Вос-аминокислоты и ДЦГК (в соотношении 2:1) получают активированное производное в растворе и после отделения дициклогексилмочевины вводят его в реактор.

Главная проблема синтеза Меррифилда состоит в том, чтобы все реакции ацилирования и деблокирования проводить количественно. Так как это требование при гетерогенных реакциях не всегда выполнимо, происходит образование *ошибочных последовательностей* или *неполных последовательностей* [430, 431] (рис. 2-19).

При синтезе пентапептида A—B—C—D—E в случае неполной конденсации можно получить четыре неполные и три ошибочные последовательности. Последние получаются, если неполные последовательности ацилируются с пропуском одного или нескольких остатков аминокислот. Наряду с этим об *ошибочных пептидах* говорят и в случае, когда при правильной последовательности аминокислот происходит ацилирование по функциям боковых цепей (при частичном доблокировании третьей функции) или при других изменениях у третьих функций. Отделение этих загрязняющих пептидов после окончания твердофазного синтеза крайне затруднительно. Поэтому нужно использовать все возможности, чтобы реакции в гетерогенной фазе проходили количественно. Для этого вводят большие избытки ацилирующего средства, которые в случае стерически затрудненных аминокислот часто составляют 6 г-экв. В других случаях работают с 3—4 г-экв. и повторяют реакцию конденсации один-два раза. В таких условиях аминокислотное ацилирование проходит с высоким выходом [432].

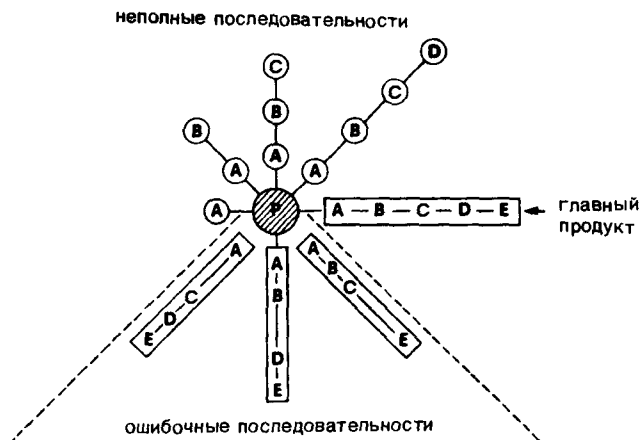


Рис. 2-19. Неполные и ошибочные последовательности.

При синтезе аналога цитохрома с (104 аминокислотных остатка) для присоединения последних 45 аминокислот избытки ацилирующих реагентов доходили до 30- и 70-кратных, а время конденсации увеличивали до 24 ч. В то же время Анфиисен и сотр. [433] описали синтез брадикинина с 10-кратным избытком ацилирующего агента, причем время реакции ограничивалось 3 мин, и для синтеза ноиапептида понадобилось меньше 5 ч. Экономически такой избыток защищенной аминокислоты едва ли может быть оправдан, тем более что обратное получение ее в случае применения ДЦГК-метода затруднительно из-за образования N-ацилмочевии.

Чтобы обойти эти трудности, метод был модифицирован [434, 435]: N-защищенные аминокислоты ионогенно фиксируются на свободных аминогруппах носителя перед добавкой ДЦГК; избыток нефиксированных N-защищенных аминокислот можно вернуть промыванием дихлорметаном. Легко вымываются активированные эфиры. Для синтезов Меррифилда применялись различные типы эфиров. Правда, они требуют значительно большего времени реакции, чем конденсация по ДЦГК-методу [436]. Другие методы активирования, включая их различные варианты, тоже не столь эффективны, как ДЦГК-метод.

Определение степени превращения в случае твердофазного пептидного синтеза имеет большое значение для ведения процесса. Сравнительно просты различные титриметрические методы, как, например, метод Дормана [437], согласно которому после предварительного протонирования непрореагировавших аминогрупп пиридингидрохлоридом или пиридингидробромидом [438] галогенид элюируется триэтил-амином и определяется в элюате. Другой метод — прямое титрование непрореагировавших аминогрупп 0,1 н. HClO_4 [439]. Наряду с этим разрабатывались различные цветные реакции (с нингидрином, флуорескамином и др.) для контроля полноты

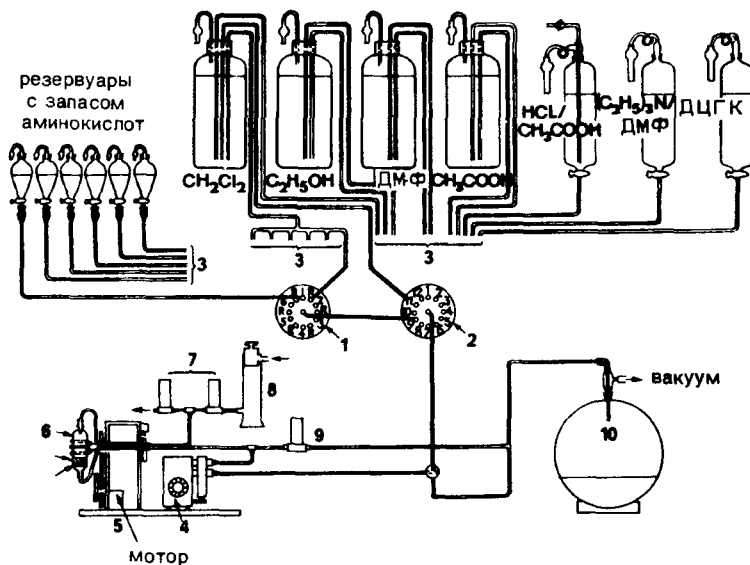


Рис. 2-20. Схема первого «синтезатора» Меррифилда [440].

протекания реакции конденсации. Было предложено относительно много аналитических методов [391—396], однако трудно указать среди них идеальный.

Если посредством названных аналитических методов установлено, что, несмотря на многократные повторения реакции конденсации, ацилирование протекает не полностью, то на следующих стадиях будут неизбежно получаться неполные и ошибочные последовательности. Чтобы сделать возможным более легкое отделение этих нежелательных пептидов, после реакции конденсации проводится ацилирование такими реагентами, как *N*-ацетилимидазол, ангидрид 3-нитрофталевой кислоты и др. При этом, однако, количественное блокирование представляется едва ли возможным вследствие низкой диффузии реагентов.

После *n*-кратного повторения реакционных стадий III и IV (рис. 2-12) желаемая пептидная последовательность строится на полимерном носителе на стадии V. Несмотря на указанные недостатки, твердофазный пептидный синтез открыл новые возможности для автоматизации. Первый аппарат был сконструирован Меррифилдом и сотр. [440] (рис. 2-20).

Этот «синтезатор» состоит из двух главных частей: системы контроля и системы реактора. Система реактора включает реакционный сосуд, набор вентилей для подачи растворителей и реагентов, а также резервуары для этих жидкостей. Встряхивающее устройство для реакционного сосуда, а также различные вентили и насосы управляются программирующим устройством.

Этот классический аппарат положен в основу улучшенных моделей с дальнейшей автоматизацией. Брунфельдт и сотр. [441] разработали прототип первой коммерческой модели компании Schwarz/Mann (Оранджберг, шт. Нью-Йорк). Теперь в продаже имеется много приборов различных компаний (Beckman-Spinco Instruments, Inc., Palo Alto, Калифорния; Vega Engineering Corp., Аризона; Chemtrox Corporation, Rochester, шт. Нью-Йорк и т.д.). Первая коммерческая модель «синтезатора» изображена на рис. 2-21. Следует отметить дальнейшее усовершенствование реакционного сосуда. Наряду с испытанной моделью с встряхиваемым сосудом описаны системы, в которых смола перемешивалась путем перекачивания реакционного раствора в неподвижном сосуде, путем пропускания инертного газа или с помощью механической мешалки. Интересен сконструированный Виландом и сотр. [442] центрифужный реактор.

Отщепление синтезированного пептида от полимерного носителя (VI, рис. 2-12) составляет последнюю стадию синтеза Меррифилда, а последующая очистка полученной смеси продуктов — самая трудная операция. Снятие полимера осуществляется с помощью реагентов, которые либо селективно расщепляют якорную связь между С-концевой аминокислотой и носителем, либо одновременно с этим позволяют частично или полностью деблокировать полипептид. Связь типа алкилзамещенного бензильного эфира лучше всего расщепляется ацидолизом. Для этого часто применяются растворы бромоводорода в трифторуксусной кислоте, уксусная кислота меньше подходит в качестве растворителя из-за опасности ацетилирования гидроксиминокислот. Описаны также многие отщепления при помощи безво-

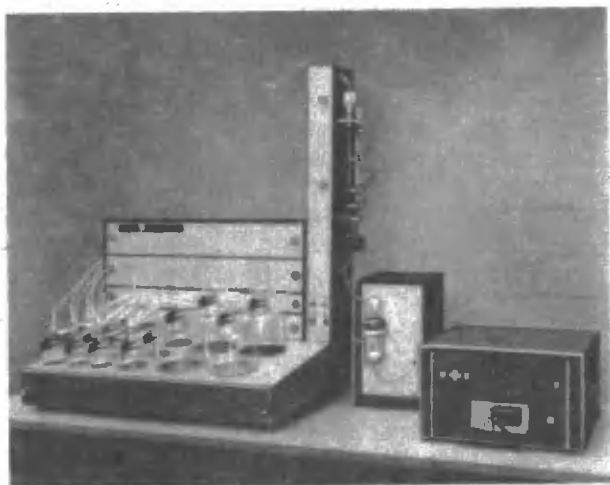


Рис. 2-21. Первая коммерческая модель «пептидного синтезатора» по Брунфельдту.

дного жидкого фтороводорода [63] при 0 °С в присутствии анизола в качестве «ловушки» катионов. При этом отщепляются также все N- и O-защитные группы на основе *трет*-бутильного и бензильного остатков, нитрогруппа аргинина и S-метоксибензильная группа. К таким же результатам приводит метод Плесса и Бауэра [427] (отщепление с помощью бор-трифторацетата). С помощью HF не отщепляются N^{lm}-бензильный, S-алкилтио- и N^{lm}-2,4-динитрофенильный остатки, а также 4-нитробензиловые эфиры.

При отщеплении с помощью щелочного гидролиза или катализируемых основаниями превращений в присутствии сильных ионообменников существует опасность рацемизации и возможность перэтерификации бензиловых эфиров боковых цепей. В принципе возможно также и аминокислотное и гидролизное отщепление пептида. Для получения амидов и гидразидов следует использовать уже обсуждавшиеся модифицированные якорные группировки.

В заключение следует еще раз указать на то, что ацидолитическое расщепление, в особенности с помощью жидкого фтороводорода, может во многих случаях приводить к повреждению конечного продукта.

Метод Меррифилда позволил начиная с 1963 г. получить многие пептиды, важнейшие из которых приведены в табл. 2-9. Некоторые из них были, правда, получены не в очень чистом состоянии из-за уже упомянутых недостатков методики.

Если проанализировать все проведенные синтезы Меррифилда (табл. 2-9), то станет ясно, что это в основном работы в период между 1968 и 1972 гг. В это время во многих новых лабораториях — а их количество в США со времени опубликования концепции Меррифилда увеличилось в десять раз — начали проводить синтезы пептидов на носителях, чему в значительной степени способствовала коммерческая доступность синтезаторов. Очевидно, разочаровывающие результаты при попытках синтеза белков привели к реалистической оценке возможностей метода. Попытка синтеза лизоцима привела, например, к смеси полипептидов, которая обладала 0,5—1% специфической активности [455]. Гораздо успешнее был синтез рибонуклеазы А [449], хотя и в этом случае выход составлял всего 16%. На этом ферменте с помощью твердофазной техники проведено интересное изучение взаимосвязи строения и активности [467]. Несомненно, что биологическая активность не является критерием гладкого течения твердофазного синтеза. Синтез белка, состоящего из 188 аминокислот, который сначала считали гормоном роста человека, дал смесь белков с заметной биологической активностью. Несколько позднее было, однако, показано, что положенная в основу синтеза первичная структура не подтвердилась [453, 468]. Синтез длинноцепочечных пептидов и белков по методу Меррифилда в настоящее время и в обозримом будущем уже не может отвечать тем высоким требованиям, которые предъявляются к синтезу биологически активных соединений.

Несмотря на это, работы Меррифилда положили начало новому направлению пептидного синтеза, которое следует рассматривать не просто

Таблица 2-9. Некоторые пептиды, синтезированные по методу Меррифилда

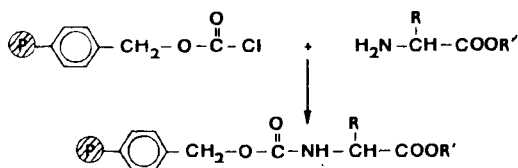
Пептид	Число аминокислот	Год	Литература
Брадикинин	9	1964	444
Ангиотензин II	8	1965	445
Цепи инсулина	21/30	1966	446
Ферредоксин	55	1968	447
Окситоцин	9	1968	448
Рибоуклеаза А	124	1969	449
Цитохром с	104	1969	450
Стафилококковая нуклеаза (6—47)	42	1969	451
Антаминд	10	1969	452
Гормон роста человека	188	1970	453
Паратгормон (1—34)	34	1971	454
Лизоцим	129	1971	455
Ацилпептидомиин белок	74	1971	456
Трипсиновый ингибитор (быка)	58	1971	457, 458
Вещество Р	11	1971	459
Грамицидин S	10	1971	460
Люлиберин/фоллиберин	10	1971	461
Кобротоксин	62	1972	462
Рибоуклеаза T ₁	104	1972	463
Соматостатин	14	1973	464
АКТГ человека	39	1975	465
Глукагон	29	1978	420

как альтернативу обычным методам синтеза, а как попытку использовать преимущества обеих концепций для синтеза белков в лаборатории, что было предсказано Э. Фишером еще в первом десятилетии нашего века.

Используя несомненные преимущества метода Меррифилда, уже сегодня можно сравнительно быстро синтезировать пептидные фрагменты, которые могут быть получены с высокой степенью чистоты при помощи имеющейся теперь техники фракционирования. Конденсация таких фрагментов с помощью обычных методов, позволяющих проводить тщательную очистку и анализ после каждой стадии, указывает путь на ближайшее будущее. Наряду с этим с помощью твердофазного синтеза следует получать короткие биологически активные пептиды и прежде всего многочисленные аналоги. Хотя трудно установить предел длины цепи, позволяющий использовать этот метод для успешного получения пептидов, но пептиды, включающие 10—15 аминокислот, — вот, по-видимому, предпочтительные объекты синтеза. Главные проблемы, решение которых позволит преодо-

леть существующие сегодня ограничения, — это разработка приемлемых полимерных носителей, эффективных методов конденсации (со средней степенью превращения выше 99%!), защитных групп высокой селективности, тщательные кинетические исследования всех реакций. Необходимо также повысить возможности аналитического контроля реакций в гетерогенной фазе и, кроме того, увеличить эффективность методов разделения и очистки пептидов.

В отличие от описанного стратегического варианта Меррифилда Летзингер и сотр. [469] предложили ступенчато наращивать пептидную цепь на полимерном носителе с N-конца. Для этой цели N-концевая исходная аминокислота привязывается к полимерному бензиловому эфиру хлоругольной кислоты:



После омыления можно присоединять следующий остаток аминокислоты ангидридным методом. Недостаток этого подхода состоит в том, что, начиная со стадии дипептида, для всех последующих конденсаций можно применять только такие методы конденсации, которые обеспечивают отсутствие рацемизации. Кроме того, ощущается недостаток подходящих карбоксизащитных групп. Используя *трет*-бутилоксикарбоилгидразиды аминокислот, можно проводить наращивание цепи азидным методом [470].

Несмотря на разработку других модификаций, ступенчатое наращивание цепи с N-конца на полимерных носителях до сих пор не получило практического применения.

2.2.7.2. Жидкофазные методы

Уже в 1965 г. Шемякин и сотр. [471] предложили применять для пептидного синтеза жидкие полимерные носители, чтобы таким путем преодолеть некоторые недостатки твердофазного метода. В случае применения жидкого полимерного носителя реакция конденсации может проводиться в растворе. Правда, при этом отделение избыточных реагентов после каждой стадии конденсации возможно только с помощью сложной операции высаживания. Введением полиэтиленгликоля (ПЭГ) как C-концевой защитной группы растущей пептидной цепи и применением ультрафильтрации для отдельных низкомолекулярных реагентов Муттер и сотр. [472] решающим образом улучшили «жидкофазный» метод.

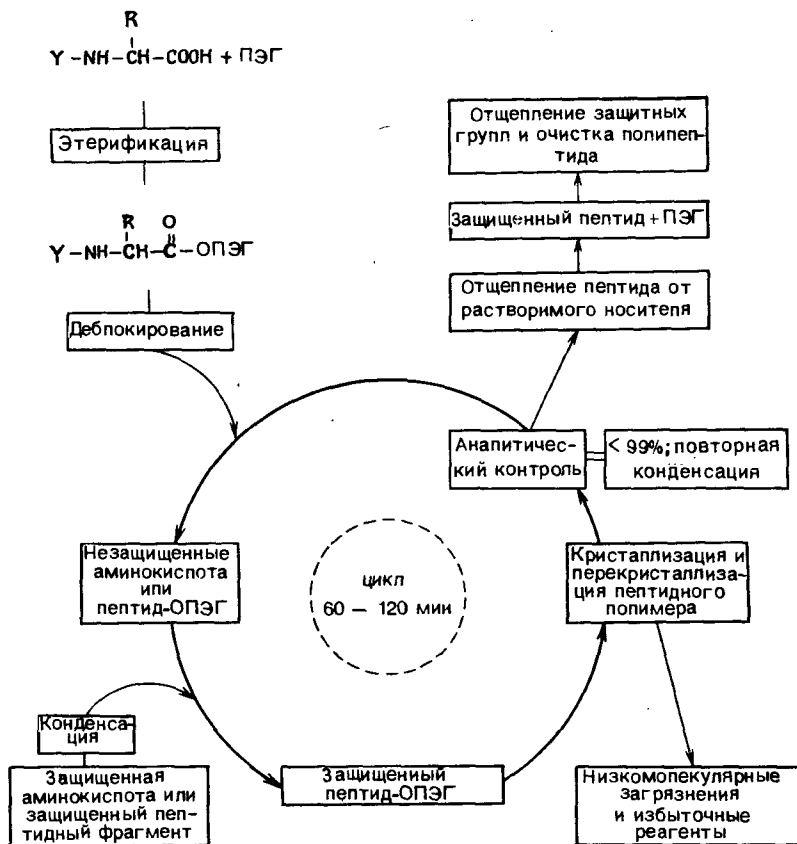


Рис. 2-22. Схема жидкофазного пептидного синтеза по Муттеру и Байеру [473].

Был предложен также «метод кристаллизации» [473]. Путем добавки подходящего органического растворителя (диэтиловый эфир) пептидил-ПЭГ быстро и количественно переводится в кристаллическую форму с образованием спиральной структуры, чем достигается простое отделение от низкомолекулярных компонентов и реагентов (рис. 2-22). Продолжительность реакции в этом методе такая же, как при обычном синтезе в растворе, но для получения оптимального превращения необходим избыток аци-

лирующего средства, а также повторная конденсация. С ростом пептидной цепи меняется растворимость, так что даже при применении ДМФ могут получиться вязкие растворы [474, 475].

Жидкофазный пептидный синтез, так же как и твердофазный, может быть автоматизирован.

Пфеидер и др. [476] описали вариант пептидного синтеза в водной среде, применяя НКА-метод (разд. 2.2.5.2.3) и полиэтилениминный носитель. Для этой цели был разработан автоматический пептидный синтезатор.

2.2.7.3. Чередующийся твердофазно-жидкофазный пептидный синтез

Чтобы избежать образования неполных и ошибочных последовательностей при пептидном синтезе на полимерных носителях, требуется по возможности полное превращение на каждой стадии. Несмотря на большие усилия, эта цель недостижима.

Франк и Хагенмейер [477] предложили вариант стратегии смешанного твердофазно-жидкофазного синтеза с применением полимерных носителей. При этом на каждой стадии возможно простое отделение как избытка аминокислоты, присоединяемой к растущей цепи, так и непрореагировавшей

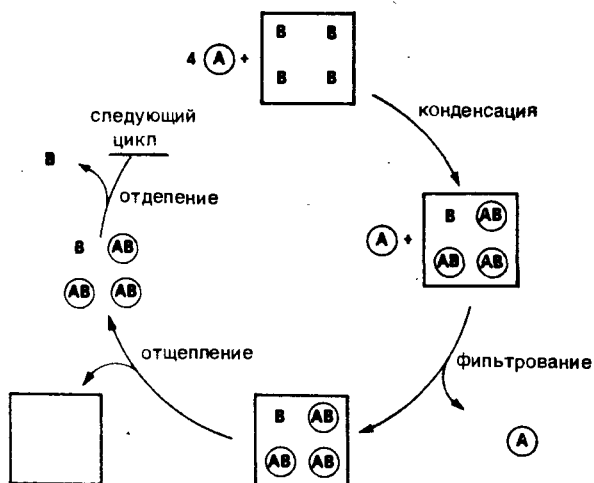
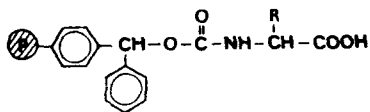


Рис. 2-23. Схема синтетического цикла чередующегося твердофазно-жидкофазного пептидного синтеза.

пептидной цепи от конечного пептида. Основная идея этого метода состоит в том, что наращиваемая пептидная цепь после одной конденсации так изменяется по физическим свойствам, что исходный продукт легко отделяется от конечного. Для этой цели наращиваемая аминокислота прикрепляется аминной функцией к селективно отщепляемой якорной группе нерастворимого полимерного носителя. Находящийся в растворе защищенный по карбоксилу аминокомпонент в результате реакции конденсации переходит на твердую фазу. Не вступивший в реакцию аминокомпонент отделяется с помощью простых операций фильтрования и промывания. Затем путем отщепления полимерной аминозащитной группы пептид вместе с избытком аминокислоты (карбоксильный компонент) снова переводится в растворимую фазу. В зависимости от защитной группы карбоксила и от длины цепи пептида отделение аминокислоты от пептида производят с помощью ультрафильтрации, гель-хроматографии или высаживания. Далее проводят новый цикл синтеза, присоединяя следующую N-полимер-блокированную аминокислоту.

Благодаря такой последовательности реакций, когда растущая полипептидная цепь находится попеременно то в твердой, то в жидкой фазе, можно на определенных этапах полностью удалить как непрореагировавший аминокомпонент, так и недеблокированный пептид. Метод можно комбинировать с другими стратегиями синтеза (кроме метода Меррифилда). В качестве карбоксизащитных групп предлагались такие монофункциональные полимеры, улучшающие растворимость, как моноалкиловый эфир полиэтиленгликоля. Ход реакции конденсации и деблокирования можно контролировать аналитически с помощью нингидрида или флуорескамина. Первой полимерной аминозащитной группой был связанный носителем бензигидроксикарбонильный остаток, который позволяет освобождать пептид с помощью 10%-ной трифторуксусной кислоты в дихлорметане.



Что касается полимерного носителя и якорной группы, то здесь имеется много возможных вариантов. После широкого опробования на практике можно будет указать место этой синтетической концепции в ряду уже обсуждавшихся синтетических методов, основанных на применении полимерных носителей.

2.2.7.4. Пептидный синтез с применением полимерных реагентов

Речь идет, собственно, не о синтезе на полимерном носителе, так как растущая пептидная цепь постоянно находится в растворе. В реакцию с аминокислотным компонентом вводится нерастворимое активированное полимером карбоксильное производное, причем образуется растворимый защищенный пептид и освобождается полимер. Преимущество этого метода состоит в том, что полимерные реагенты могут вводиться в избытке, а отделение синтезированного пептида от нерастворимого полимера не представляет трудностей. Для этой цели подходят разные типы полимерных активированных эфиров. Метод был разработан одновременно группами Пачорника [478] и Виланда [479]. Такие полимерные реагенты должны быть механически устойчивы, обладать хорошей набухаемостью и иметь высокую химическую активность и малую стерическую затрудненность. Виланд и сотр. предложили вести процесс непрерывно (рис. 2-24).

Для практической реализации этого процесса удачными оказались аминозащитные группы, отщепляемые фотолизом, так как при ацидолитическом деблокировании с последующей нейтрализацией в реакционном растворе постоянно растет концентрация солей.

Из большого числа уже описанных полимерных реагентов некоторые следует рассмотреть подробно.

С помощью активированного полимерного эфира, изготовленного на основе поли-[(4-гидрокси-3-нитробензил]-стирола) (I), синтезировали за-

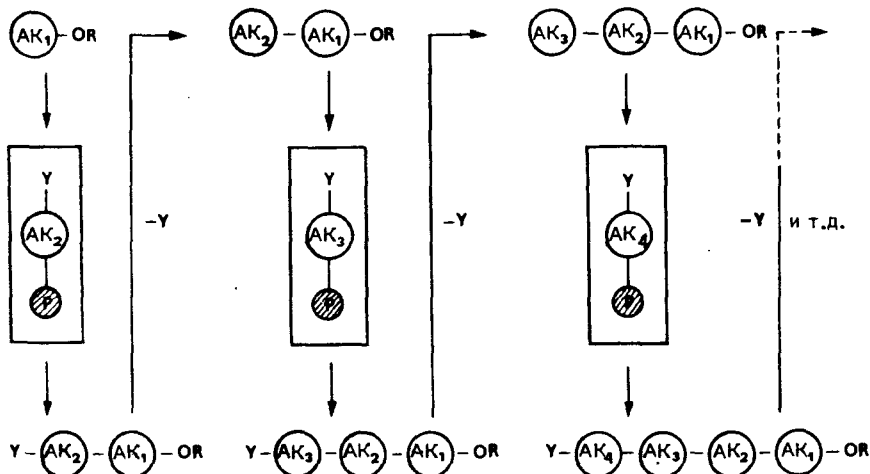


Рис. 2-24. Принцип непрерывного синтеза с полимерными реагентами [479].

шиту после окончания пептидного синтеза. При использовании для соединения с полиэтиленгликолем якорных групп на основе бензила получают связи, которые можно расщеплять гидрогенолизом. Таким образом, можно добиться значительного улучшения жидкофазного метода, а также комбинированного метода, основанного на использовании полимерных реагентов [487].

2.2.8. Синтез циклических пептидов

Некоторые биологические активные пептиды, встречающиеся в природе, имеют циклическое строение, для их химического синтеза должны быть разработаны соответствующие методы. Сравнительно легко можно получить гомодетный циклический пептид. В этом случае одна пептидная связь образуется между карбоксильной и аминогруппами одной и той же пептидной единицы. В случае синтеза циклических гетеродетных гомомерных пептидов ситуация гораздо сложнее. У таких пептидов замыкание кольца происходит посредством образования связи дисульфидного или эфирного типа.

Циклическим пептидам с дисульфидными мостиками посвящены обширные систематические исследования. В настоящее время растущий интерес вызывают работы по образованию пептидлактонов (например, актиномицина). Эфирная связь имеет большое значение в случае гетеромерных пептидов, содержащих наряду с аминокислотами также гидроксикислоты. Большинство таких пептидов встречается в природе в виде циклических структур (циклические пептолиды).

2.2.8.1. Синтез гомодетных циклических пептидов

Реакция замыкания кольца происходит в подавляющем большинстве случаев посредством образования α -пептидной связи. Бывают случаи построения циклических структур с включением ω -пептидных связей. Последний вариант обычно используется для синтеза разветвленных циклических пептидов.

Для реакций циклизации в принципе подходят те же методы конденсации, которые используются и для синтеза линейных пептидов. Из линейного пептида с незащищенной аминофункцией при активировании карбоксила наряду с циклическим пептидом I могут получаться также линейные полимеры II (рис. 2-25).

Для того чтобы подавить легко идущую линейную конденсацию, реакцию проводят при большом разбавлении, в соответствии с принципом Руггли — Циглера. В этих условиях вероятность мономолекулярной реакции замыкания кольца не снижается, в то время как бимолекулярная поликонденсация заметно уменьшается. На практике циклизующиеся компоненты очень медленно вводят в реакционную среду. Активирование карбоксильной функции линейных пептидов можно проводить различными методами.

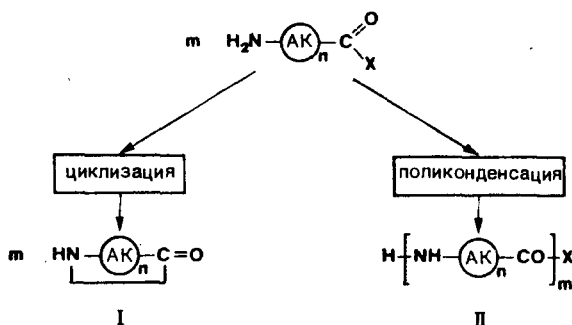


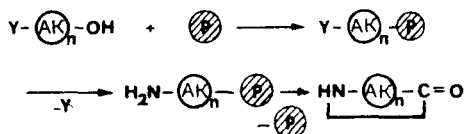
Рис. 2-25. Схематическое представление конкуренции между реакцией замыкания кольца и поликонденсацией.

1. **Активирование при блокированной аминофункции.** Этот метод основан на применении активированных эфиров N-защищенных пептидов. После отщепления N^α-защитной группы происходит промежуточное блокирование солеобразованием, которое в нужное время снимается добавлением основания.

2. **Активирование незащищенных пептидов.** Применяется для циклизации пептидных фрагментов путем введения в реакционную среду дициклогексилкарбодимида (также с добавками), водорастворимых карбодимидов или других активирующих средств.

3. **Активирование при протонированной аминофункции.** Аминофункция промежуточно блокируется солеобразованием. Активирование может производиться при образовании азида, смешанного ангидрида и т. д. Затем аминофункцию освобождают добавлением основания.

4. **Активирование в виде полимерных активированных эфиров.** Принцип активирования карбоксильной группы полимерным носителем для синтеза циклических пептидов был использован Фридкиным и сотр. [488]. N-Защищенная пептидная последовательность, подлежащая циклизации, присоединяется к подходящему полимерному активирующему реагенту. После деблокирования циклический пептид получается путем внутримолекулярного аминолиза:



В случае применения принципа «безопасного захвата» вначале синтезируют линейные фрагменты на соответствующем носителе, затем якорная группировка активируется, и после отщепления N^α-защитной группы активированная полимерная карбоксильная функция взаимодействует со свободной аминогруппой с образованием циклического пептида [489].

По стерическим и энергетическим соображениям не каждую произвольно взятую пептидную последовательность можно перевести в соответствующий циклопептид. Циклодипептид 2,5-диоксопиперазин образуется легко. Он содержит две *цис*-пептидные связи, причем затрата энергии на их образование компенсируется при получении энергетически выгодного 6-членного кольца. Диоксопиперазины легко образуются из алкиловых эфиров дипептидов, а также из эфиров аминокислот циклодимеризацией. По исследованиям Швицера и сотр. [490, 491], линейные пептиды с нечетным числом аминокислотных остатков ($n = 1, 3$ и 5) циклизуются с димеризацией в циклические ди-, гекса- и декапептиды. Однако при циклизации линейных пентапептидов образуются не только декапептиды (циклодимеризацией), но и циклопентапептид.

Изумия и сотр. при синтезе грамицидина S (рис. 2-50), исходя из линейного активированного производного пентапептида, получили наряду с желаемым циклическим декапептидом еще и циклопентапептид с выходом 34%.

Для циклотрипептида требуется, чтобы все три пептидные связи были в энергетически богатой *цис*-форме. Исходя из энергетических соображений, можно понять низкую тенденцию к образованию 9-членных циклотрипептидов, ибо в их модели имеется сильное напряжение кольца, которое может быть объяснено стерическим взаимодействием направленных внутрь трех α -H-атомов (напряжение Прелога). Циклодимеризации, без сомнения, способствует антипараллельное взаимное расположение двух молекул трипептида с образованием водородных мостиков. Димеризация с образованием водородных связей невозможна, если в трипептид встроен пролин; кроме того, в этом случае *цис*- и *транс*-конфигурации пептидных связей практически равноценны энергетически. Роте и сотр. [492] описали в 1965 г. синтез циклотрипролила, единственного возможного циклотрипептида (рис. 2-26).

Небольшие циклические пептиды особенно годятся для изучения конформаций, поскольку ограниченная молекулярная подвижность позволяет существовать только некоторым конформациям. Циклотрипептиды в кристаллах обладают только конформацией короны. В растворе же дополнительно появляется асимметричная конформация ванны в том случае, если в трипептиде присутствует хотя бы одна нехиральная аминокислота (саркозин, N-бензилглицин) [492a].

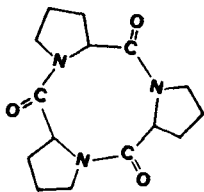


Рис. 2-26. Структура циклотрипролила.

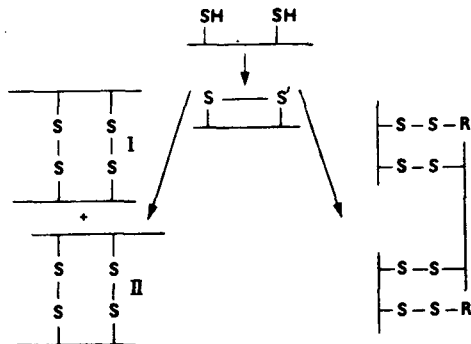
Для циклических тетрапептидов с 4-*транс*-пептидными связями нельзя построить модели, полностью свободные от напряжения. Однако это можно сделать при чередовании *цис*- и *транс*-конфигураций. Циклопентапептиды содержат только *транс*-пептидные связи, как и наиболее изученные циклогексапептиды.

2.2.8.2. Синтез гетеродетных циклических пептидов

Из имеющихся в циклических пептидах гетеросвязей дисульфидная связь чаще встречается в пептидах и белках, чем эфирная связь депсипептидов.

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

Синтез простых моноциклических цистеиновых пептидов не представляет трудностей. При получении исходной линейной пептидной последовательности блокируют обе тиольные функции одинаковыми защитными группами. После отщепления защитных групп внутримолекулярное дисульфидное кольцо может селективно замыкаться по принципу разбавления Руггли — Циглера посредством окисления кислородом воздуха. При этом в качестве нежелательных побочных продуктов образуются циклические димеры с параллельной (I) или же антипараллельной (II) структурой, а также полимерные продукты.



Эта концепция синтеза была разработана дю Виньо и др. [493] для первого химического синтеза пептидного гормона окситоцина.

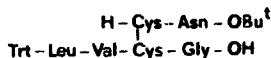
Значительно сложнее синтез пептидов, содержащих многие дисульфидные мостики, в особенности многоцепочечных молекул с добавочными междоцепочечными дисульфидными связями. Цистеиновые пептиды можно получать двумя путями:

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

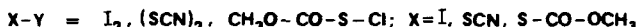
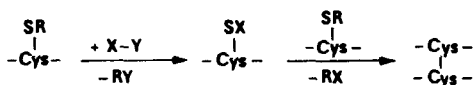
2) через S-защищенный цистеиновый пептид с последующим переводом в цистиновый.

Синтез симметричного цистинового пептида по первому пути не представляет трудностей, так как для этого не нужны отдельные тиольные защитные группы. Значительно сложнее получить таким путем несимметричный цистиновый пептид, так как здесь предъявляются высокие требования к селективности применяемых защит для amino- и карбоксильной групп.

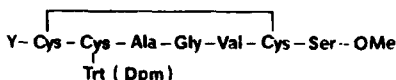
На основе полученного в 1973 г. Камбером [494] несимметричного цистинового пептида A(20-21)-B(17-20) Зибер [495] осуществил при последовательном образовании дисульфидных мостиков полный синтез инсулина человека.



Второй стратегический путь служит для селективного образования дисульфидных связей, причем соответствующие реагенты взаимодействуют с S-защищенным пептидом без предварительного деблокирования. При этом цистеин или блокированное производное цистеина с электрофильно-отщепляемой S-защитной группой сначала переводится иодом, диороданом [496] или метоксикарбонилсульфенилхлоридом [494, 495] в активированное промежуточное соединение. Последнее реагирует со второй молекулой цистеина или S-блокированного цистеина ($R = \text{H}$ или электрофильно-отщепляемая защитная группа, такая как Trt, Dpm, Ascm, Thr и др.) и дает производное цистеина:



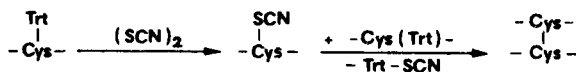
Применение селективно-отщепляемых S-защитных групп было впервые предложено Зервасом и сотр. [497]. Этим путем был получен гептапептидный фрагмент инсулина овцы с внутрицепочечным дисульфидным мостиком, а также с блокированной Trt- или Dmp-остатком третьей тиольной функцией:



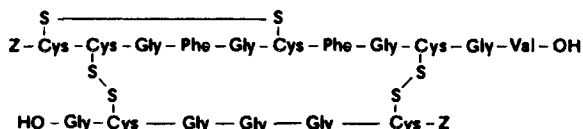
В качестве аминоксигнатурной группы Y в случае Dpm-тиольной защиты применялись Z- или Boc-остатки, а также S-Trt-группа и Nps-остаток.

Хиски и сотр. [498] подробно исследовали целенаправленный синтез несимметричной дисульфидной связи. Как уже упоминалось, им удалось отщепить подходящие S-защитные группы путем ступенчатого изменения кислотности, причем промежуточный сульфенилтиоцианат, получающийся

с помощью диородана, выступает в качестве активированной тиольной группировки:

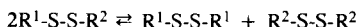


При применении такого сульфенилтиоцианатного метода был получен инсулиноподобный модельный пептид:



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

Нежелательной побочной реакцией при синтезе несимметричного дисульфида является дисульфидный обмен:



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

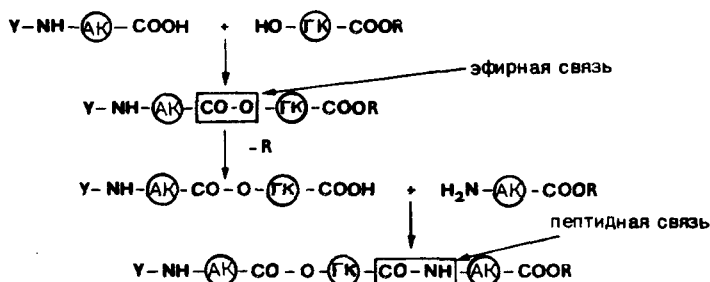
Нельзя не упомянуть, что при статистическом окислении двух различных цистеиновых пептидов также может получиться несимметричный цистеиновый пептид. Этот путь был описан, например, при первом полном синтезе инсулина (разд. 2.3.1.8).

Во многих биологически активных пептидах циклического строения наряду с дисульфидными мостиками обнаруживают также эфирные связи. Этот тип связей преобладает в различных пептидных антибиотиках (разд. 2.3.5).

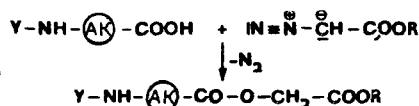
На специальной проблематике синтеза гомомерных пептидных лактонов не стоит останавливаться. Пептолиды являются гетеромерными пептидами, в которых аминокислоты заменены на α -или β -гидроксикислоты (ГК); в большинстве случаев пептолиды обладают циклической структурой. Для реакции замыкания кольца пептолидов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

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

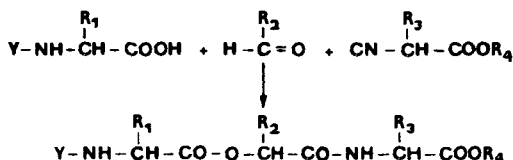
Стратегические и тактические вопросы синтеза пептолидов мало отличаются от тех же проблем пептидного синтеза. Пептолиды с периодической структурой, т. е. с повторяющимися единицами дипептолида, названы, по Лоссе и Бахману [500], регулярными пептолидами. Их синтез можно вести как ступенчато попеременным образованием эфирных и амидных связей, так и фрагментной конденсацией, причем в последнем случае в зависимости от выбора места соединения можно получать только амидные или только эфирные связи:



Третий путь исходит из соединений, которые приводят к получению гидроксикислотных или аминокислотных остатков в процессе реакции конденсации. Основываясь на исследованиях Курциуса, таким путем были получены пептолиды при взаимодействии бензильного [501] и 4-нитробензильного [502] эфиров диазоуксусной кислоты с N-замещенными аминокислотами:



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



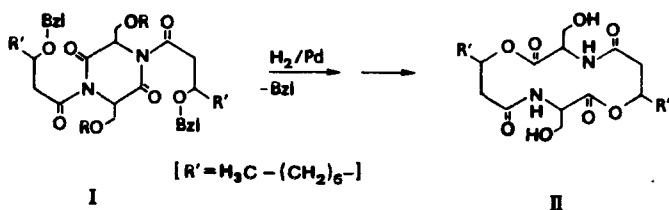
Фрагментную конденсацию, так же как и реакцию замыкания кольца, в предварительно полученном линейном пептолиде лучше проводить путем образования пептидной связи.

При циклизации методом активированных эфиров имеется опасность аминолитического расщепления пептолид-эфирной связи. Как правило, применяют хлорангидридный метод, причем сначала незащищенный пептолид переводится обработкой пентахлоридом фосфора [504] или тионилхлоридом [505] в хлорангидрид солянокислого пептолида, а затем, при освобождении аминофункции с помощью третичного основания, проводится реакция замыкания кольца. Выходы циклических пептолидов невелики. Это объясняется конкурирующей реакцией поликонденсации, что, как и при нормальной пептидной циклизации, требует работы в разбавленных растворах. Причиной низких выходов являются также стерические препятствия в виде участвующих в реакции циклизации гидроксисили или аминокислот, а также циклоолигомеризация. Несмотря на трудности, связанные с циклоолигомеризацией [490, 506, 507], этот синтетический принцип используют для получения циклических пептолидов с

периодической структурой, так как при этом не нужны сложные синтезы исходных линейных соединений [508, 509].

Роте и Крейс [510] исследовали зависимость от растворителя в случае образования циклических гомологов валиномицина фосфитным методом. Исходя из линейной последовательности, они сумели получить додекадепептид в толуоле ($c = 0,001$ моль/л) с выходом 56%.

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



2.2.9. Синтез полиаминокислот и регулярных полипептидов

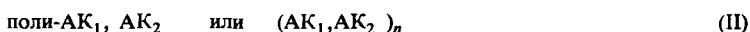
Полиаминокислоты и регулярные полипептиды — это синтетические полипептиды, которые получаются при поликонденсации аминокислот или коротких пептидных последовательностей. В противоположность систематически построенным пептидам они представляют собой не отдельные соединения, а смесь гомологов макромолекул. Использование различных номенклатур вызывает затруднения при названии этих веществ. Комиссия IUPAC—IUB по биохимической номенклатуре предложила правила [512], которые и применяются при последующем изложении. Приравнивание таких синтетических полипептидов к полимеризованным аминокислотам или фрагментам находится в противоречии с обозначением, используемым в макромолекулярной химии. Для процесса многократного присоединения аминокислот или пептидных фрагментов вместо термина «полимеризация» следует применять термин «поликонденсация».

Полиаминокислоты и регулярные полипептиды имеют большое значение в качестве моделей белков для физических, химических и биологических исследований. Хотя такие соединения не встречаются в природе, они тем не менее очень интересны для исследования влияния различных воздействий на строение и свойства пептидных цепей. Столь же высок биохимиче-

ский интерес к соединениям такого рода, так как с их помощью получают новые важные результаты в энзимологии и иммунологии. В различных монографиях и обзорах [513—518] детально рассматриваются значение, получение и характеристики этих синтетических полипептидов.

2.2.9.1. Синтезы гомо- и гетерополиаминокислот

Гомополиаминокислоты (I), по определению Вюнша, построены из идентичных остатков аминокислот, в то время как гетерополиаминокислоты (II) содержат аминокислотные остатки нескольких видов, которые распределены в пептидной цепи статистически:

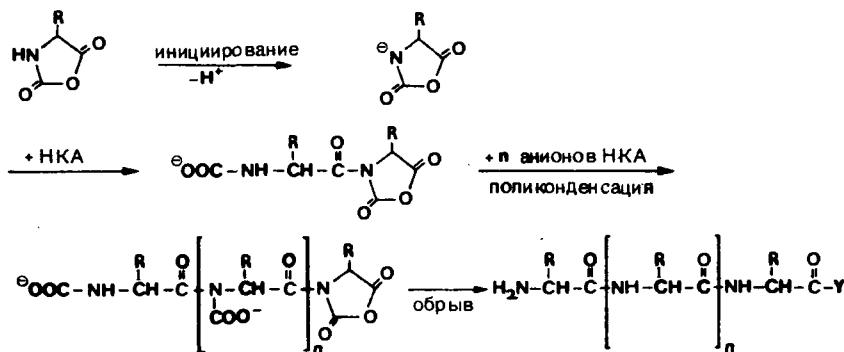


При всех методах поликонденсации предпочитают максимально защищать все третьи функции, причем применяемые защитные группы должны быть устойчивыми в условиях синтеза, а после поликонденсации полностью отщепляться от высокомолекулярных полипептидов.

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

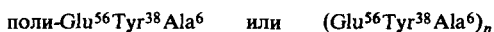
Для поликонденсации N-карбоксиангидридов в растворе нужны инициаторы. Тип инициатора определяет механизм поликонденсации и молекулярную массу продукта. При помощи сильных оснований (третичные амины, алкоголяты щелочных металлов, алкилметаллические соединения) получают гомополиаминокислоты с узким молекулярномассовым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

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



Обрыв цепи вызывается гидроксилом ($Y = OH$) или вторичным амином ($Y = NR_2$). В случае применения спиртов, первичных или вторичных аминов и т. д. сначала образуется производное аминокислоты, свободная аминогруппа которого начинает следующую стадию конденсации. В результате получают гомополиаминокислоты с С-концевыми эфирными или амидными группировками ($\bar{n} = 20 \div 100$).

Сополиконденсацией можно готовить гетерополиаминокислоты, причем, как правило, получается полипептид со статистическим распределением аминокислотных остатков по всей цепи. Для этой цели подходит и метод термической полимеризации. Само собой разумеется, можно применять и активированные аминокислоты. Наилучшие результаты получаются при применении метода N-карбоксиянгидридов. Сокращенно можно записать состав поликонденсата с помощью формул:



что соответствует 56% Glu, 38% Tyr и 6% Ala.

Первоначальное соотношение мономеров в смеси не сохраняется в поликонденсате, потому что скорость реакции зависит от строения боковых цепей аминокислот и в процессе роста цепи активность концевых остатков аминокислот меняется.

Разветвленные гетерополиаминокислоты можно получать двумя принципиально различными путями, причем разветвления происходят за счет третьих функций, главным образом Lys, Glu и Asp. Чаше всего исходят из заранее построенных цепей, например полилизина или лизинсодержащего сополиконденсата, и разветвления получают при поликонденсации подходящих мономеров. В случае второго варианта сначала синтезируют полипептидную часть боковой цепи и потом привязывают ее к третьей функции основной цепи.

2.2.9.2. Синтез регулярных полипептидов

Первый регулярный полипептид был синтезирован уже в начале нашего века Фишером:



Лучшими свойствами для поликонденсации пептидных фрагментов обладают, без сомнения, активированные эфиры, из которых чаще всего применяются 4-нитрофениловые и пентахлорфениловые эфиры. Для конденсации — это касается и уже обсужденных синтезов полиаминокислот — должны применяться только очень чистые мономеры, лишь тогда могут достигаться высокие степени полимеризации. Высокие требования предъявляются также к стерической однородности исходных продуктов. Поликонденсация активированных эфиров обычно проводится в растворе; хорошие результаты были получены и в суспензии [519, 520], причем продукты поликонденсации были более высокомолекулярными. Эфиры дипептидов не очень удобны для поликонденсации из-за конкурирующей

реакции образования диоксопиперазинов. Поэтому применяют предпочтительно три-, тетра- и пентапептидные мономеры. По сравнению с полиаминокислотами при поликонденсации пептидов получают продукты с более короткими цепями (25-55 пептидных единиц).

Образование регулярных полипептидов имеет место также при *пластеиновой реакции* [521, 522], при которой под каталитическим воздействием различных протеаз (трипсин, химотрипсин, пепсин, катепсин и т. д.) из так называемых пластеиновых пептидных мономеров получают продукты конденсации — пластеины. В качестве субстратов годятся продукты частичного ферментативного гидролиза белков (пептоны, альбумозы и др.). Первый пластеиноактивный синтетический пептид имел последовательность $\text{Tyr-Ile-Gly-Glu-Phe}$.

В случае синтетических субстратов получались пластеины с более низкими молекулярными массами, чем при работе с продуктами, полученными при ферментативном распаде белков. Хотя механизм пластеиновой реакции выяснен еще не полностью, формально речь здесь идет об обращении катализируемого протеазами расщепления пептидной связи (разд. 2.2.5.8).

2.2.10. Стратегия и тактика пептидного синтеза

В то время как синтез ди- и трипептидов по большей части не вызывает затруднений в отношении выбора защитных групп и методов активирования, при получении более длинных пептидных цепей необходимо точное планирование синтеза. Естественно, имеет значение и последовательность связывания аминокислотных составляющих в желаемый пептид. При этом статистические возможности здесь гораздо больше, чем число радикальных методов синтеза, которые можно принимать в расчет. Перед началом каждого синтеза нужно выбрать наиболее оптимальный путь синтеза. Успех пептидного синтеза зависит от избранных стратегии и тактики и требует наряду со значениями теоретических возможностей большого опыта экспериментатора.

2.2.10.1. Стратегия пептидного синтеза

Под стратегией понимают последовательность соединения аминокислотных составляющих в пептид. С введением твердофазного синтеза в 1962 г. появился дополнительный выбор методов, т. е. кроме традиционного синтеза в растворе можно получать пептиды на второй фазе. При этом синтез на второй фазе может протекать либо как гетерогенная реакция (твердофазный синтез), либо как гомогенная реакция при применении растворимых полимерных носителей (жидкофазный синтез), либо как одновременно гетерогенная, так и гомогенная реакция (чередующийся твердофазно-жидкофазный синтез). В связи с этим понятие стратегии несколько изменилось. Теперь под стратегией понимается только тип соединения аминокислот, причем различают *ступенчатое наращивание цепей* и *фрагментную конденсацию*. Особенности этих путей синтеза обсуждаются ниже.

2.2.10.1.1. Ступенчатое наращивание пептидной цепи

Применяя ступенчатый метод, принципиально цепь можно наращивать и с N-конца, и с C-конца (рис. 2-27). Хотя *ступенчатое удлинение цепи с N-конца* соответствует биосинтетическому пути, этот стратегический вариант в практике пептидного синтеза имеет подчиненное значение. Главная причина такого положения дел состоит в том, что при активировании, начиная со стадии дипептида, существует постоянная опасность рацемизации. Летзингер и сотр. [469] осуществили такой синтез на полимерном носителе (с. 195). Несмотря на новые методы конденсации, практически свободные от рацемизации, интерес к этому пути синтеза невелик.

Ступенчатое наращивание цепи с C-конца с применением N^α -защитных групп уретанового типа (разд. 2.2.4.1.1.1) независимо от выбранного мето-

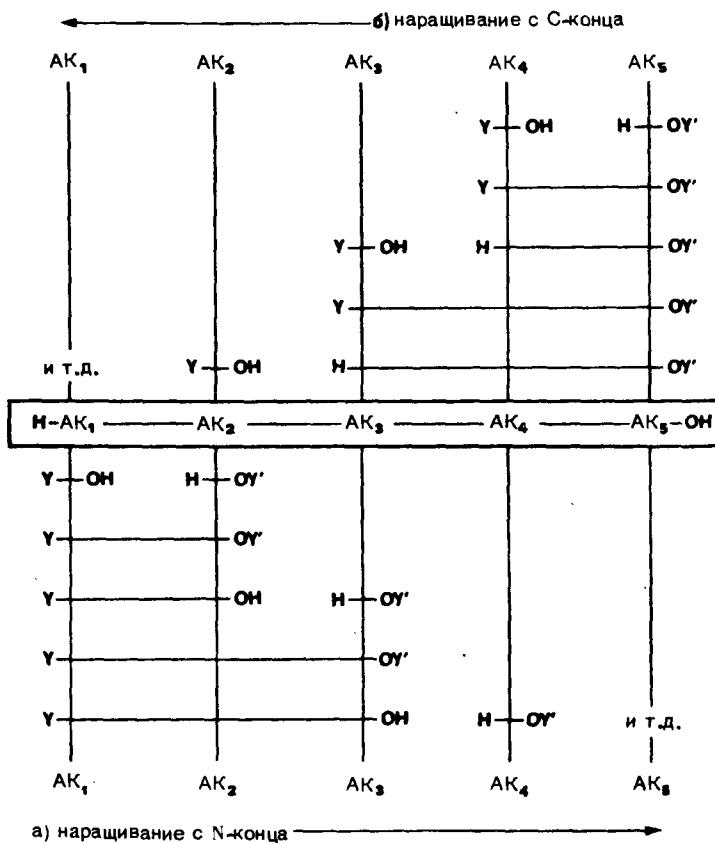


Рис. 2-27. Стратегия ступенчатого удлинения цепи.

да конденсации не сопровождается рацемизацией. Для получения по возможности количественного превращения активированный карбоксикомпонент вводится в избытке. Этот вариант стратегии был впервые применен Бодански в 1959 г. и теперь с успехом используется как при традиционных синтезах в растворе, так и в синтезах на носителях. Традиционный метод ступенчатого наращивания цепи с С-конца с тщательной очисткой и характеристикой промежуточных продуктов по-прежнему преобладает. Для конденсации используются преимущественно активированные эфиры. Очистка и характеристика промежуточных продуктов происходят обычно на стадии полностью защищенных соединений. После отщепления α -аминозащитной группы полученное производное применяется прямо для следующей реакции конденсации. Получение биологически активных пептидов или крупных фрагментов этим путем является довольно трудной задачей, требующей больших экспериментальных затрат. Лимитирующий фактор этой стратегии — быстро уменьшающаяся растворимость растущей пептидной цепи в обычно применяемых органических растворителях. Бодаиски на примере полного синтеза амида гептакозапептида секретина (разд. 2.3.1.12.2) показал, что затруднения, обусловленные растворимостью пептидов или фрагментов, начинаются при 10—15 аминокислотных остатках. Средний выход на одну стадию ~94%.

Такая стратегия синтеза — в данном случае в сочетании с фрагментной конденсацией в растворе — единственный метод, который гарантирует надежный полный синтез изолированного природного продукта.

Группы Кнорре [523], Шихана [524] и Подушки [525] уже с середины шестидесятых годов изучали на различных объектах *ступенчатый синтез пептидов в гомогенном растворе без выделения промежуточных продуктов*, синтез *in situ*. Отменой утомительных операций очистки на отдельных стадиях синтеза достигается значительная экономия времени. Разработанный Тилаком ПСА-метод (разд. 2.2.5.2.1) и особенно НКА/НТА-метод (метод Хиршмана) (разд. 2.2.5.2.3), который позволяет получать фрагменты пептидов в водном растворе, открыли новые возможности для широкого применения синтезов *in situ*. Методы синтеза пептидов без выделения разрабатывались и позже.

Отделение побочного продукта может происходить

- 1) промыванием не смешивающейся с водой органической фазы или
- 2) высаживанием промежуточного продукта реакции с удалением побочных продуктов и загрязнений соответствующими операциями промывания.

Первый вариант очистки нашел применение, например, в случае так называемого *двухфазного метода* [526] и так называемого *метода удерживания в растворе* [527], а также отчасти при «быстром» методе пентафторфениловых эфиров Кишфалуди [528]. Второй метод очистки используется в методе Кишфалуди, а также ПСА-методе и методе с 2-нитрофениловыми эфирами *in situ* [529]. Предпосылкой для успешного использования техники *in situ* является знание свойств промежуточных продуктов реакции, чтобы суметь сделать правильный выбор растворителей или высаживающих средств. По исследованиям Бейермана и ван Зоона [530] затрата времени на одну конденсацию в случае ПСА-метода составляет приблизительно один

день. Между тем октапептид по методу *in situ* с применением пентафторфениловых эфиров синтезирован за 10 ч [531]. Исследования Пенке и др. [532] привели к заключению, что метод быстрого синтеза с пентафторфениловыми эфирами наиболее удобен для синтеза коротких и средних пептидов.

Ступенчатое наращивание пептида с применением второй фазы впервые проведено Меррифилдом на примере твердофазного пептидного синтеза (разд. 2.2.7.1). При реакциях в гетерогенной фазе вероятность встречи реагирующих партнеров гораздо ниже, чем в гомогенном растворе. Для получения высокой степени превращения требуется значительный избыток ацилирующего средства. Преимуществом этой стратегии является простота технических операций и связанная с этим возможность автоматизации. Трудные операции очистки промежуточных веществ традиционного синтеза заменяются простыми процессами фильтрования и промывания. Однако на этом пути однородный продукт синтеза получается только в том случае, если каждая реакция в гетерогенной фазе протекает практически количественно. Несмотря на большие избытки карбоксикомпонента, использование которых чревато опасностью N-ацилирования пептидной связи, полное превращение на каждой стадии в настоящее время недостижимо. На практике средний выход на одну стадию 95—99%, что недостаточно для синтеза длинных пептидов или белков. Средние выходы на одну стадию и полные выходы (в зависимости от длины цепи) приведены в табл. 2-10. Как показывает практика, короткоцепочечные пептиды или их аналоги длиной до ~15 аминокислотных остатков могут быть получены твердофазным методом. Трудности при синтезе небольших белков наглядно демонстрируются данными табл. 2-10. Еще хуже сказывается накопление не-

Таблица 2-10. Выходы на одну конденсацию и общие выходы в зависимости от длины цепи при синтезах Меррифилда [533]

Объект синтеза	Число остатков	Общий выход (%) при выходе на одну конденсацию			
		95%	98%	99%	99,9%
Гормон роста	191	0,006	2,2	15,0	82,8
Рибонуклеаза А	124	0,2	8,3	29,1	88,4
Цитохром с	104	0,5	12,4	35,5	90,2
Трипсиновый ингибитор (быка)	58	5,4	31,6	56,4	94,5
Ферредоксин	55	6,3	33,6	58,1	94,7
В-Цепь (инсулин)	30	22,6	55,7	74,7	97,1
А-Цепь (инсулин)	21	35,8	66,8	81,8	98,0

^a Расчет производили относительно C-концевых исходных аминокислот.

полных и ошибочных последовательностей в ходе твердофазного синтеза, так как очистка возможна только на стадии конечного продукта. Так, например, при синтезе АКТГ (39 аминокислотных остатков) при 98%-ном выходе на каждой стадии, что составляет общий выход 45%, получается 55% различных последовательностей. Последние состоят большей частью из $n - 1$ (38) и $n - 2$ (37) аминокислотных остатков и по причине большого сходства с АКТГ очень трудно отделяются. Более короткие последовательности, конечно, удалить легче. В случае рибонуклеазы при выходе на каждой стадии 98% получили всего 8,3% нужного фермента (табл. 2-10). 91,7% других последовательностей содержали 123 разные молекулы. Ситуация еще больше усложняется, если не вступившие в реакцию на какой-то стадии пептидные цепи (2% на стадию) реагируют в последующих реакционных циклах. В различных продуктах, составляющих 91,7%, получается тогда свыше 4 миллиардов неполных и ошибочных последовательностей.

Эти примерные расчеты ясно показывают, что для приемлемого синтеза белка выход на одну стадию должен быть по меньшей мере 99,9%.

Несмотря на большие усилия, до сих пор не удалось решающим образом улучшить твердофазный пептидный синтез. Наоборот, в последние годы выявлен целый ряд дополнительных побочных реакций [534].

Пытались обойти некоторые недостатки твердофазной техники введением растворимых полимерных носителей.

Жидкофазный пептидный синтез, хотя и не дает возможности разделения промежуточных продуктов, имеет, однако, преимущество: условия реакции гораздо ближе к условиям традиционных методов. Полного превращения здесь можно добиться тоже только с помощью больших избытков ацилирующего средства и многократного повторения стадий конденсации. Кроме того, растущие цепи пептидов — в большинстве случаев уже начиная с гептапептидов — влияют на растворимость полимерных носителей. Получающиеся при этом (даже при применении диметилформамида) вязкие растворы затрудняют дальнейшее течение синтеза. Хотя жидкофазный метод также может быть автоматизирован, он не получил такого широкого применения, как метод Меррифилда.

Комбинацию обоих принципов синтеза представляет чередующийся твердофазно-жидкофазный пептидный синтез (разд. 2.2.7.3); большой интерес представляет принцип этого метода, однако еще многое предстоит сделать, чтобы его можно было использовать на практике.

Синтез на твердом материале (разд. 2.2.7.4) делает возможным ступенчатое наращивание на полимерном носителе с помощью полимерных активированных эфиров или других полимерных агентов. Растущие цепи пептида остаются постоянно в гомогенном растворе, так что возможна очистка промежуточных продуктов.

Исследованный Юнгом *метод обратимого фиксирования* использует карбокси-защитные группы с основным центром. После каждой стадии конденсации в гомогенном растворе растущая пептидная цепь может обратимо фиксироваться на ионообменной смоле с целью отделения избытка карбоксикомпонента, а также побочных продуктов и загрязнений. Этим путем можно синтезировать различные небольшие пептиды.

Применение в качестве твердого носителя силикагеля было предложено Запезаловой, Максимовым и Митиным [535]. С этой целью силикагель пропитывается полярным растворителем (ДМФ, ацетонитрил, гексаметилтриамид фосфорной кислоты (ГМТАФ) и др.) и адсорбционно нагружается аминокомпонентом. Фиксированный на силикагеле аминокомпонент взаимодействует далее с пентафторфениловыми эфирами Вос-аминокислот, суспейдированными в гексане или петролейном эфире. Пептидный синтез происходит в тонком слое полярного растворителя на поверхности силикагеля, в котором реакционные партнеры находятся в высокой концентрации. Избыток активированного эфира удаляют промыванием диэтиловым эфиром. После отщепления Вос-группы с помощью HCl в дибутиловом эфире проводят следующую стадию конденсации. Избытком полярного растворителя можно снять с силикагеля промежуточный продукт синтеза для очистки и идентификации. Этим методом синтезировали защищенный окситоцин, тетрапептид гастрин и другие короткие пептиды.

Названные ступенчатые методы построения пептидных цепей подчеркивают многообразие вариантов этой стратегии.

2.2.10.1.2. Стратегия фрагментной конденсации

Упомянутые выше лимитирующие факторы ступенчатого метода в гомогенном растворе, а также недостатки ступенчатого удлинения цепей на второй фазе не позволяют получать длинноцепочечные полипептиды или белки. В качестве альтернативы служит фрагментная конденсация.

Обычное до сих пор в пептидной химии понятие *фрагментная конденсация* предложено [26] заменить на более точное выражение *сегментная конденсация*. При этом более понятно, что подразумевается не обломок последовательности, а отрезок ее, сегмент. Между тем при семисинтезе (разд. 2.2.10.1.3) употребляются преимущественно именно фрагменты белков в качестве промежуточных ступеней синтеза, так что в этой связи понятие фрагментной конденсации должно бы сохраниться. Следует упомянуть, однако, что фрагменты перед конденсацией часто модифицируются и, таким образом, теряют характер истинных фрагментов (обломков).

Решающее значение для успеха синтеза длинноцепочечных объектов имеет правильное разделение всей последовательности на фрагменты. Всеобъемлющих правил для расчленения на фрагменты не существует. Можно разделить последовательность на два приблизительно равных по размеру фрагмента, чем облегчается последующая очистка благодаря различию свойств исходных и конечных продуктов. Можно, напротив, соединять крупный фрагмент с короткими карбокси- или аминокомпонентами.

Длинные карбоксильные компоненты трудно активируются, и, кроме того, необходимые для реакции избытки едва ли оправданы с экономической точки зрения. В то же время при неполном превращении длинноцепочечные аминокомпоненты труднее отделять из-за плохой растворимости.

При разделении последовательности на отрезки следует учитывать опасность рацемизации при последующем их соединении. Кроме того, пеп-

тидная конденсация должна протекать по возможности без подобных реакций.

Разделение по связям у пролина или глицина допускает, например, любое активирование без риска рацемизации. Конечно, в пептидах и белках пролиновые и глициновые остатки не всегда удобно распределены по цепи. Кроме того, чтобы гарантировать возможно более высокий выход при реакции конденсации, нужно учитывать еще ряд факторов: С-концевой остаток аминокислоты в карбоксильном компоненте должен легко активироваться, N-концевая аминокислота аминокомпонента должна быть стерически менее затрудненной и т. д. По-прежнему трудности связаны с проблемой рацемизации при конденсации фрагментов. Так, Риникер и сотр. [536] при конденсации фрагмента инсулина В(1—16), содержащего С-концевой тирозин, с фрагментом А(14—21)/В(17—30) по методу Гайгер — Кёнига наблюдали сильную рацемизацию остатка тирозина. Выход диастереомера D-Тур-В¹⁶ 30%. При перенесении места соединения на связь Leu¹⁵-Тур¹⁶ и применение ДЦГК-метода с добавкой гидроксibenзотриазола с 10%-ным выходом был получен нежелательный диастереомер D-Leu-В¹⁵. Оптическая чистота аминокислотных составляющих определялась газохроматографически (после проведения полного гидролиза и перевода в изопропиловые эфиры трифторацетиламинокислот) по методам Гил-Ав и Фейбуша [537] или же Кёнига и Николсона [538].

Из приведенных данных видно, что методы конденсации, практическая безопасность которых была установлена разными тестами на рацемизацию (разд. 2.2.6.2), дают неожиданные результаты при изменении условий. Может быть, при дальнейшем развитии ферментативного пептидного синтеза (разд. 2.2.5.8) удастся соединять особенно опасные в отношении рацемизации фрагменты с помощью фермента.

Следует, наконец, упомянуть и об обоюдной связи между стратегией и тактикой защитных групп, так как при определенных комбинациях защитных групп сужаются возможности стратегического варьирования.

Фрагментная конденсация проводится главным образом в гомогенных растворах, так что проблемы растворимости и способности к активированию могут быть лимитирующими факторами. Соединение двух фрагментов протекает по кинетике 2-го порядка, причем быстрая реакция возможна только при наличии достаточно высоких концентраций обоих реагирующих партнеров. Из-за снижающейся с ростом пептидной цепи растворимости достаточная концентрация партнеров реакции труднодостижима в случае фрагментов, имеющих более 50 аминокислотных остатков. Решением проблемы могло бы быть такое соединение фрагментов, которое основано на не зависящей от концентрации внутримолекулярной перегруппировке. Можно предположить, что эту проблему можно решить с помощью метода Уги и метода аминной «ловушки» (разд. 2.2.5.7).

Фрагментная конденсация на второй фазе тоже возможна. Этот принцип описан Вейгандом и Рагнарсоном [539] уже в 1966 г. На примере различных синтезов, однако, этот вариант не представляется решением проблемы, так как ему присущи все уже известные недостатки твердофазного метода.

2.2.10.1.3. Семисинтез [540, 541]

Из изложенного материала по стратегическим возможностям синтеза пептидов и белков можно сделать вывод, что в настоящее время химический синтез модифицированных пептидов ограничен примерно 100 аминокислотными остатками. В то же время значительно вырос интерес к модифицированным белкам для молекулярно-биологических и медицинских исследований. Хотя с помощью методов химического синтеза можно получать некоторые небольшие белки, необходимые для этого затраты не идут ни в какое сравнение с достигнутыми результатами. Кроме того, в настоящее время только очень немногие высокоспециализированные лаборатории в состоянии проводить такие синтезы.

В 60-е годы некоторые группы начали заниматься семисинтезом пептидов и белков. При семисинтезе фрагменты природных белков используются в качестве промежуточных продуктов для получения новых белков с измененной последовательностью. О теоретических и практических аспектах семисинтеза исчерпывающе сообщил пионер этой стратегии Оффорд [540].

Различают нековалентный и ковалентный семисинтез.

Нековалентные семисинтезы основаны на том факте, что различные белки после расщепления на фрагменты и их разделения при рекомбинации образуют биологически активные нековалентные комплексы. Классический пример — рнбоинуклеаза А из поджелудочной железы быка (рис. 3-24), которая расщепляется бактериальной протеазой субтилизинном на так называемые S-пептид (1—20) и S-белок (21—124), а после рекомбинации разделенных продуктов расщепления показывает полную ферментативную активность. Для рекомбинации с нативным S-белком использовались аналоги S-пептида, синтезированные химически, при этом были получены ценные данные по связи между структурой и функцией.

Другими подходящими для нековалентных семисинтетических операций белками являются стафилококковые нуклеазы, цитохром с, тиоредоксин и миоглобин. Цитохром с расщепляется бромцианом на фрагменты 1—65 и 66—104. Коррадин и Харбури в 1971 г. предположили образование при рекомбинации продуктов расщепления цитохрома с нековалентных комплексов. Однако позже они показали, что полученное при расщеплении бромцианом лактонное кольцо гомосерина-65 реагирует с α -аминогруппой фрагмента 66—104 с образованием пептидной связи и получается [Hse⁶⁵]-цитохром с. Семисинтетическое изучение цитохрома с описано Харбури, Валласом, Харрисом и Тессером [540].

Ковалентные семисинтезы осуществляются посредством образования дисульфидных мостиков или пептидных связей. Примеры соединения через дисульфидные мостики — многочисленные комбинации природных и синтезированных химически цепей инсулина в гибридные инсулины. Большая часть используемых на практике семисинтезов основана на образовании пептидной связи.

Семисинтез с образованием пептидной связи можно в свою очередь разделить на ступенчатый семисинтез и семисинтез посредством фрагментной конденсации.

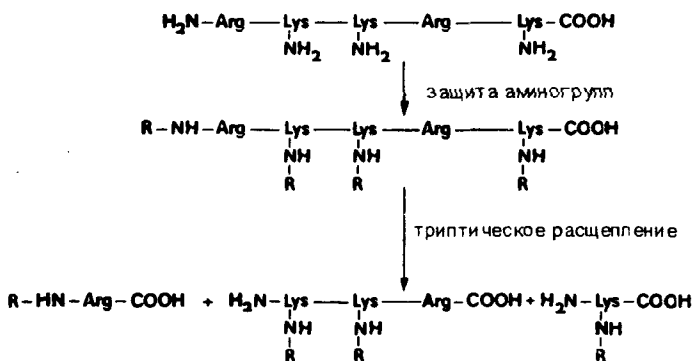
Для семисинтеза вообще необходимы следующие операции:

- обратимая защита перед расщеплением;
- расщепление и разделение фрагментов;
- обратимая защита после расщепления;
- модификация или замена одного фрагмента;
- конденсация фрагментов;
- деблокирование, очистка и идентификация аналога.

Ступенчатый семисинтез заключается в селективном отщеплении одного или нескольких аминокислотных остатков от одного конца цепи с по-

мощью метода Эдмана (разд. 3.6.1.2.2.1) с последующим замещением новыми остатками аминокислот. Инсулин особенно часто служил объектом таких семисинтезов. Ступенчатым семисинтезом от него произведено от 30 до 40 аналогов. Классический пример семисинтетической модификации N-конца В-цепи инсулина показан на рис. 2-28. Основные работы по инсулину проведены группами Бранденбурга, Крейля, Гейгер и Оффорда. Другие объекты семисинтеза — трипсин, ферредоксин, фосфолипаза A2', миоглобин, цитохром с.

Фрагментные семисинтезы. Семисинтезы с применением фрагментной конденсации гораздо сложнее ступенчатых семисинтезов. Трудную проблему представляет селективная защита концевых и находящихся в боковых цепях amino- и карбоксильных групп. Гольдбергер и Анфинсен в 1962 г. предложили следующий путь дифференцирования ϵ -аминогрупп и α -аминогрупп:



Для практического применения важно, чтобы при введении защитных групп растворимость не уменьшалась. К сожалению, большинство обратимых карбоксизащитных групп оказывает отрицательное влияние на растворимость. Для этерификации часто применяют 4-метоксифенилдиазометан.

Для фрагментирования наряду с трипсином часто применяется бромциановый метод (разд. 3.6.1.1). О бромциановом расщеплении цитохрома с уже сообщалось. Кроме того, фрагментно-синтетические работы проводились с лизоцимом (Рис и Оффорд, 1976 г.), карбоангидразой В (Фельш и сотр., 1974 г.), стафилококковой нуклеазой (Белло, 1975 г.), а также меланотропином (Буртон и Ланде, 1970 г.) и другими объектами.

Следует заметить, что стадия конденсации в случае фрагментных семисинтезов сопряжена с гораздо более значительными трудностями. Большое значение приобретает использование ферментов для соединения пептидов [540] (разд. 2.2.5.8).

Необходимы еще поиски лучших растворителей, активирующих реагентов и защитных групп. При этом учитывается интерес к таким защитным группам, которые не влияют на распределение заряда в защищенных фраг-

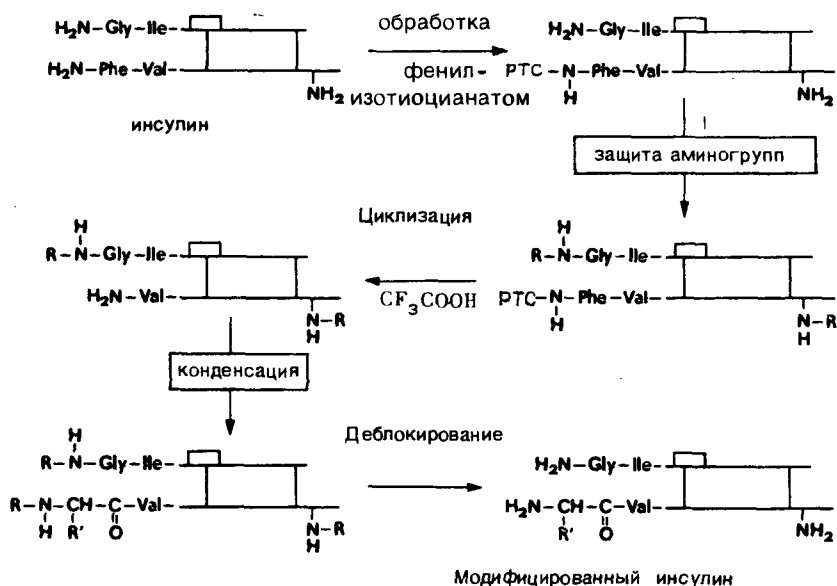


Рис. 2-28. Модификация N-конца В-цепи инсулина в семисинтезе [540].

ментах. В этой связи следует обратить внимание на изучение водных или водно-органических систем растворителей.

Итак, следует констатировать, что семисинтез не всегда легко осуществить. Здесь так же как и в случае химического синтеза, возможны методические улучшения, касающиеся универсальности метода. Оба этих метода должны способствовать разрешению насущных задач стратегии.

2.2.10.2. Тактика пептидного синтеза

В то время как последовательность соединения аминокислотных остатков в пептид определена стратегией пептидного синтеза, оптимальная комбинация защитных групп и метод конденсации для каждого случая образования пептидной связи выбираются тактикой.

2.2.10.2.1. Выбор комбинации защитных групп

Для обратимого блокирования концевых и боковых основных, кислых и спиртовых групп аминокислот существует большое число защитных групп (разд. 2.2.4), выбор которых определяется стратегией синтеза и селективностью их отщепления. Небольшие пептиды, а также участки последовательностей для фрагментной конденсации лучше всего могут быть синтезированы ступенчато с С-конца. При обсуждении отдельных защитных групп

уже было показано, что одни функциональные группы должны быть защищены обязательно, в то время как другие могут быть защищены, но их защита не всегда необходима. Обязательна защита аминогрупп, не принимающих участия в образовании пептидной связи, а также тиольных групп цистеинов. Защита дополнительных карбоксильных групп не всегда необходима. Аргинин можно вводить в синтез с протонированной гуанидиновой группой. Степень защиты боковых групп трифункциональных аминокислот зависит от цели синтеза и от выбранного метода конденсации. Например, при классическом синтезе боковые функциональные группы серина, треонина, тирозина или гистидина могут оставаться незащищенными, если для конденсации используют азидный метод или некоторые активированные эфиры. В то же время при синтезе пептидов в двухфазной системе обычно берут большой избыток ацилирующего компонента, что приводит к ацилированию окси- и имидазольных групп. В этом случае защита этих групп имеет существенное значение.

Если для синтеза выбрана классическая методика, то в зависимости от стратегии возможна тактика максимальной или минимальной защиты.

Тактика максимальной защиты использована на практике Вюншем при полном синтезе глюкагона. Преимущества тактики полной защиты заключаются в максимальном предотвращении нежелательных побочных реакций и в гибкости выбора метода конденсации. Неизбежно возникающая проблема растворимости ограничивает длину синтезируемого пептида до 30—50 аминокислотных остатков, что определяется конкретной последовательностью. Однако проведенный Ивановым и сотр. полный синтез α -бунгаротоксина, содержащего 74 аминокислотных остатков, убеждает, что предполагаемую предельную длину пептида можно превзойти. Но в целом тактика максимальной защиты страдает одним недостатком: в процессе деблокирования выход продукта может снизиться.

Тактика минимальной защиты эффективно продемонстрирована Хиршманом при полном синтезе S-белка рибонуклеазы А. Пептидная цепь из 103 аминокислот содержит все трифункциональные аминокислоты, исключая триптофан, в которых были защищены только ε -амино- и тиольные группы. Вследствие частичной защиты синтез фрагментов и последующая их конденсация (сборка) могли быть проведены лишь немногими методами (с применением НКА и НТА, N-гидроксисукцинимидных эфиров и азидным методом). Само собой разумеется, что опасность побочных реакций при минимальной защите велика, поэтому фрагменты после их синтеза должны быть очень тщательно очищены. Деблокирование защитных функций обычно протекает без осложнений.

Различие тактики максимальной и минимальной защиты продемонстрировано на трех ионапептидах (рис. 2-29).

На практике, однако, не всегда используют тактику защиты в экстремальных вариантах. Чаще синтез планируется в приближении к тому или иному варианту, что зависит от синтезируемой последовательности.

Классификация защитных групп на временные и постоянные и их роль подробно обсуждались в разд. 2.2.2 и 2.2.4. Важнейшая проблема тактики

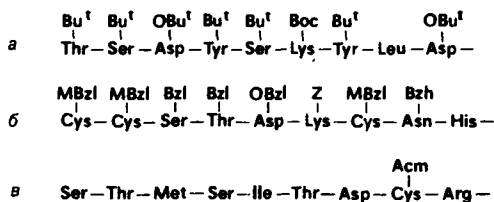


Рис. 2-29. Применение техники максимальной и минимальной защиты.

защитных групп состоит в селективности отщепления временных и постоянных групп. Деблокирование постоянных защитных групп должно протекать без побочных реакций и разрушений продукта. Реализация этих требований вызывает весьма большие затруднения. В настоящее время разработано еще очень мало универсальных методов деблокирования, поэтому для дифференцированного отщепления защитных групп должны быть использованы различные подходы. Селективность деблокирования должна быть обеспечена как при удалении временных защитных групп, так и постоянных.

В данной книге не представляется возможным изложить даже в общих чертах проблемы, связанные с деблокированием защитных групп. Остановимся лишь на некоторых из многих описанных в литературе методах селективного отщепления защитных групп.

Например, ставшие классическими синтезы окситоцина, вазопрессина и инсулина спланированы так, что временные защитные группы удалялись *ацидолизом*, постоянные — *восстановлением* после завершения синтеза. Защита α -аминогрупп осуществлялась бензилоксикарбонильной группой, которая деблокировалась при обработке бромоводородом в уксусной кислоте, в то время как ϵ -аминогруппы остатков лизина и гуанидиновые группы остатков аргинина были защищены тозилными группами, удаляемыми лишь восстановлением натрием в жидком аммиаке. Но, поскольку обработка натрием в жидком аммиаке ведет к различным повреждениям продукта, эту методику восстановительного отщепления применяют теперь редко.

При отсутствии в пептиде серусодержащих аминокислот бензилоксикарбонильные группы, используемые для промежуточного блокирования, могут быть отщеплены гидрогенолизом, тогда в качестве постоянных защитных групп можно применять группы *трет*-бутильного типа, устойчивые к восстановлению. В этом случае окончательное деблокирование осуществляется *ацидолизом*.

Большие усилия были предприняты с целью поиска лучших условий селективного отщепления кислотолабильных защитных групп. Основное внимание уделялось селективному отщеплению аминокислотных групп, особенно *Вос*-группы, в присутствии бензилоксикарбонильных остатков, так как при применении трифторуксусной кислоты и HCl в органических раствори-

телях селективность не всегда была удовлетворительной. Согласно Шнабелю [542], 70%-ная водная трифторуксусная кислота, а также смесь трифторуксусной кислоты (70%) и ледяной уксусной кислоты (30%) [543] обладают высокой селективностью действия при деблокировании. При наличии триптофана в объекте синтеза для ацидолитического отщепления более предпочтителен 0,1 н. HCl в муравьиной кислоте [544]. (Этот деблокирующий реагент предложен для твердофазного синтеза Оно с сотр.) В неполярных растворителях Вос-группу можно селективно удалить (в присутствии Z-группы) действием эквимолярного количества триметилсилилперхлората [545]. Следует отметить успехи, достигнутые Риникером и сотр. [546]. При проведении *селективного ацидолиза* тритильную группу в присутствии других групп можно селективно отщеплять обработкой HCl в трифторэтанол. Кинетическими исследованиями показано, что в системе HCl/трифторэтанол при pH 1 Вос-группа в ~2500 раз стабильнее, чем Врос-группа, а при pH 0 ее устойчивость в 1500 раз больше, чем 2-фенилизопропилоксикарбонильной группы.

В последние годы отмечается повышенный интерес к кислотоустойчивым временным защитным группам, отщепляемым в слабощелочных условиях (разд. 2.2.4.1 и табл. 2-1). Такие группы можно использовать в комбинации с постоянными защитными группами *трет*-бутильного типа. Комбинация этих защитных групп была с успехом применена при синтезе пептидов по Меррифилду (разд. 2.2.7). Эта так называемая *ортогональная концепция защиты* для твердофазного синтеза очень интересна с тактической точки зрения (с. 185). И наконец, следует обратить внимание на уже обсуждавшуюся возможность фотолитического отщепления защитных групп, а также упомянуть защитные группы, которые можно удалить лишь в особых условиях (например, с помощью протеаз). Значение *ферментативного деблокирования* [476, 552—555] в будущем может возрасти.

Интересным также кажется путь *полного деблокирования* на конечной стадии синтеза с помощью таких сильноокислых реагентов, как HF [63], VBg_3 в метиленхлориде [547], трифторацетат бора [427], трифторметансульфокислота $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$ [548], метансульфокислота $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$ [549], комплекс HF — пиридин [550] и др. И наконец, такие защитные группы, как тозилъная, тритильная, дифенилметильная, бензильная и карбобензоксигруппа, удаляются электрохимически [551].

Для синтеза α - и ϵ -пептидов из аминокислот необходимо блокирование карбоксильной группы. Эта сложная проблема подробно рассмотрена в превосходной монографии Вюнша [29].

На рис. 2-30 приведены данные, характеризующие устойчивость некоторых защитных групп в стандартных условиях. Как показывает опыт, к подобным сведениям следует относиться с известной осторожностью, и общие рекомендации не всегда применимы. Способность к деблокированию или устойчивость в данных условиях зависит прежде всего от определенной системы, что трудно отразить в таблице. Первое систематическое исследование различных N-защитных групп в этом направлении предпринято уже сравнительно давно (в 1953 г.) Буассона и Прайтиером [556]. Скорость от-

Временные защитные группы	Посто- янные защитные группы	для аминогруппы										для карбоксила					
		Z		Boc		Nps		Bpsc		Trt		OMe/OEt		OBzl		OtBu	
		s	g	s	g	s	g	s	g	s	g	s	g	s	g	s	g
для аминогруппы	Z	—	$\text{H}_2/\text{NH}_3/\text{HBr}$	TFA	HBr	HCl	HBr	AcOH	HBr	AcOH	$\text{H}_2/\text{NH}_3/\text{HBr}$	OH^\ominus	—	OH^\ominus	$\text{H}_2/\text{NH}_3/\text{HBr}$	TFA	HBr
	Boc	H_2	HBr	—	TFA	SH HCl	TFA	AcOH	TFA	AcOH	TFA	OH^\ominus	—	OH^\ominus H_2	HF	—	TFA
	Tos	H_2/HBr	Na/NH_3	TFA	—	HCl		AcOH		AcOH	Na/NH_3	OH^\ominus	—	OH^\ominus H_2	Na/NH_3	TFA	—
для карбоксила	OMe OEt	H_2/HBr	—	TFA	—	HCl	—	AcOH	—	AcOH	—	—	OH^\ominus	H_2	OH^\ominus	TFA	—
	OtBu	$\text{H}_2/\text{Na}/\text{NH}_3$	HBr	—	TFA	SH HCl	TFA	AcOH	TFA	AcOH	TFA	OH^\ominus	—	$\text{H}_2/\text{Na}/\text{NH}_3$	HF	—	TFA
	OBzl	(HBr)	$\text{H}_2/\text{Na}/\text{NH}_3/\text{HF}$	TFA	HF	HCl	HF	AcOH		AcOH	$\text{H}_2/\text{Na}/\text{NH}_3/\text{HF}$	—	OH^\ominus	—	$\text{H}_2/\text{Na}/\text{NH}_3/\text{HF}$	TFA	HF (HBr)
для гидроксигруппы	Bzl		$\text{H}_2/\text{Na}/\text{NH}_3/\text{HF}$	TFA	HF	HCl	HF	AcOH	HF	AcOH	$\text{H}_2/\text{Na}/\text{NH}_3/\text{HF}$	OH^\ominus		OH^\ominus	$\text{H}_2/\text{Na}/\text{NH}_3/\text{HF}$	TFA	HF
	tBu	$\text{H}_2/\text{Na}/\text{NH}_3$	HBr		TFA	SH HCl	TFA	AcOH	TFA	AcOH	TFA	OH^\ominus	—	OH^\ominus H_2	HF		TFA
для гидроксигруппы новой группы	NO ₂	HBr	H_2/HF	TFA	HF	HCl	HF	AcOH	HF	AcOH	H_2/HF	OH^\ominus	—	OH^\ominus	H_2/HF	TFA	HF
	Tos	H_2/HBr	$\text{Na}/\text{NH}_3/\text{HF}$	TFA	HF	HCl	HF	AcOH	HF	AcOH	$\text{Na}/\text{NH}_3/\text{HF}$	OH^\ominus	—	$\text{H}_2/\text{OH}^\ominus$	$\text{Na}/\text{NH}_3/\text{HF}$	TFA	HF
для имидо- группы	Bzl	HBr (H_2)	Na/NH_3	TFA	—	HCl	—	AcOH	—	AcOH	Na/NH_3	OH^\ominus	—	OH^\ominus	Na/NH_3	TFA	—
для тиола	Bzl	HBr	Na/NH_3	TFA	—	HCl		AcOH		AcOH	Na/NH_3	OH^\ominus	—	OH^\ominus	Na/NH_3	TFA	—
	BzlOMe	—	$\text{Na}/\text{NH}_3/\text{HF}$	TFA	HF	SH HCl	HF	AcOH	HF	AcOH	$\text{Na}/\text{NH}_3/\text{HF}$	OH^\ominus	—	OH^\ominus	$\text{Na}/\text{NH}_3/\text{HF}$	TFA	HF
	Trt	—	$\text{Na}/\text{NH}_3/\text{HF}$		HF	SH HCl	HF	AcOH	HF	AcOH	$\text{Na}/\text{NH}_3/\text{HF}$	OH^\ominus	—	OH^\ominus	$\text{Na}/\text{NH}_3/\text{HF}$		HF
	AcM	HBr		TFA	—	HCl	—	AcOH	—	AcOH	—	(OH^\ominus)	—	(OH^\ominus)		TFA	—
	S-tBu S-Et	HBr	Na/NH_3	TFA	—	HCl	—	AcOH	—	AcOH	Na/NH_3	—	—	—	Na/NH_3	TFA	—

Рис. 2-30. Возможные комбинации некоторых защитных групп [30].

Обозначения: s — селективное удаление временной защитной группы; g — удаление одновременно обеих групп.

щепления различных замещенных бензилоксикарбонильных остатков при действии НВг в уксусной кислоте изучали Блага и Рудингер [557], кроме того, Лоссе и др. [558] проводили кинетические исследования кислотности деблокирования N- и C-защитных групп. В последние годы появилось много новых возможностей для блокирования, поэтому подробное изучение селективности отщепления защитных групп в различных условиях — весьма трудоемкая задача.

К рис. 2-30 следует обращаться лишь для предварительного приблизительного выбора тактики защиты. Для того чтобы правильно остановиться на комбинации защитных групп, надо хорошо представлять процесс блокирования и обязательно учитывать экспериментаторский опыт.

2.2.10.2.2. Метод конденсации

Располагая очень многими методами конденсации, на первый взгляд кажется очень трудным выбрать необходимую методику для конкретного синтеза. Однако установившиеся стратегия и тактика использования защитных групп существенно ограничивают число возможных вариантов. Кроме того, из более чем 130 известных методов конденсации, упоминавшихся в разд. 2.2.5, лишь немногие применяются на практике.

Образование пептидной связи может протекать как одно- или двухстадийный процесс (разд. 2.2.2).

При *одностадийном процессе* активация свободной карбоксильной группы идет в присутствии аминокомпонента. Прототип этого варианта синтеза — конденсация с участием дициклогексилкарбодимида (все не участвующие в конденсации карбоксильные группы должны быть предварительно защищены). Только при эквимольном количестве amino- и карбоксикомпонентов можно отказаться от защиты гидроксигрупп.

При *двухстадийном процессе* собственно реакции конденсации предшествует активация карбоксильного компонента. В качестве примера можно привести метод смешанных ангидридов. Чаще всего в многочисленных вариантах метода активированных эфиров для активации карбоксильной группы, т. е. для образования активированного эфира, используют какой-либо метод конденсации, обычно это ДЦГК- или ангидридный метод. Для самой реакции образования пептидной связи справедливы такие же требования к защите, как и при одноступенчатом процессе, за исключением того, что дополнительные карбоксигруппы аминокомпонента могут оставаться незащищенными.

Особым случаем двухстадийного процесса, имеющим большое практическое значение, является азидаая конденсация. В отличие от метода активированных эфиров, здесь активация протекает через промежуточную ступень образования гидрозида. Другие чувствительные к гидразину группы в карбоксикомпоненте должны отсутствовать. Азидный метод позволяет осуществить тактику минимальной защиты. Синтезы с незащищенной гидроксигруппой наиболее важны с практической точки зрения; это же отно-

сится и к синтезам, в которых остаются незащищенными дополнительные карбоксильные группы, как в amino-, так и в карбоксикомпоненте.

Существенный момент при выборе метода конденсации — свобода от рацемизации. Возможности исключения или значительного снижения рацемизации подробно рассмотрены в разд. 2.2.6.1, а также совместно со стратегией фрагментной конденсации (разд. 2.2.10.1).

2.2.10.3. Возможности и ограничения пептидного синтеза

Кратко изложив стратегию и тактику пептидного синтеза, попробуем проанализировать его современное состояние. Методические возможности, которыми располагает исследователь, чтобы осуществить синтез небольшого белка. Приведенные в табл. 2-9 данные по твердофазному пептидному синтезу убедительно показывают, что относительно быстро можно построить длинные пептидные цепи. Но так как в результате получаются, как правило, только трудно или вообще неочищаемые продукты, этим методом целесообразно синтезировать только короткие пептиды, а также аналоги и фрагменты с максимальным числом аминокислотных остатков от 10 до 15.

Применение современной техники разделения, особенно высокоэффективной жидкостной хроматографии, позволяет относительно хорошо очистить пептиды, содержащие 3—10 аминокислотных остатков. Для построения длинных полипептидов и небольших белковых молекул подходит только классический метод конденсации фрагментов. Синтез фрагментов производят либо в растворе путем ступенчатого удлинения пептидной цепи, либо

Таблица 2-11. Биологически активные пептиды и белки, синтезированные классическим методом в гомогенном растворе

Объект синтеза	Число аминокислотных остатков	Год синтеза	Литература
Лизоцим (аналог)	129	1979 ^a	559
Рибонуклеаза А	124	1981	560
S-Белок рибонуклеазы	104	1969	255
Проинсулин (человека)	86	1977	561, 561
Инсулин	51	1974	495
АКТГ (свиньи)	39	1963	563
АКТГ (человека)	39	1967	564
Бунгаротоксин	74	1979	565
Глюкагон	29	1967	566
Секретин	27	1966	567
Окситоцин	9	1953	493

^a Синтез еще не завершен.

в определенных случаях методом Меррифила. В табл. 2-11 приведены отдельные примеры пептидов и белков, полученных с помощью классического метода.

Данные, приведенные в табл. 2-11, хотя и не полностью демонстрируют все достижения, однако они отражают тенденцию применения классического метода синтеза для получения белков. В общем объекты такой величины демонстрируют границы современного химического синтеза, правда в отдельных случаях этот предел может быть преодолен. На причины этого здесь уже многократно указывали. Наибольшие трудности встречаются при конденсации фрагментов из 50 или более аминокислотных остатков.

Можно думать, что химики-сингетики найдут в будущем пути и средства для решения сегодняшних проблем. Химический синтез белков с аминокислотными заместителями в последующие десятилетия будет важным средством для выяснения вопросов,

Лабораторный синтез		
Boc-Ser-Tyr-Ser-Met-NH-NH ₂	1 - 4	1 - 10
<div><div>OBu^t</div><div>Z-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH</div></div>	5 - 10	
<div><div>Boc</div><div>Pz-Lys-Pro-Val-Gly-NH-NH₂</div></div>	11 - 14	11 - 19
<div><div><div>Boc</div><div>Boc</div><div>NO₂</div><div>NO₂</div></div><div>Trt-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-OMe</div></div>	15 - 19	
<div><div>Boc</div><div>Z-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-OBu^t</div></div>	20 - 24	
Промышленный синтез		
Boc-Ser-Tyr-Ser-Met-NH-NH ₂	1 - 4	1 - 10
<div><div>OBu^t</div><div>Z-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH</div></div>	5 - 10	
<div><div>Boc</div><div>Z-Lys-Pro-Val-Gly-OH</div></div>	11 - 14	11 - 16
<div><div><div>Boc</div><div>Boc</div></div><div>Z-Lys-Lys-OMe</div></div>	15 - 16	
<div><div>Boc</div><div>Z-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-OBu^t</div></div>	20 - 24	
Z-Arg-Arg-Pro-OH	17 - 19	17 - 24

Рис. 2-31. Различные тактико-стратегические концепции синтеза АКГГ [1-24] [568].

возникающих в молекулярной биологии и эзимиологии. Целесообразным может быть комбинированное применение химического синтеза и методов генной инженерии. Остается только ожидать, когда уже осуществленное в нескольких случаях введение синтетических генов в бактериальные хромосомы может быть использовано в синтезе биологически активных пептидов и белков в более крупных масштабах.

В заключение следует остановиться на потенциальных возможностях использования пептидного синтеза для *промышленного производства пептидов* и возникающих в связи с этим проблемах. По сравнению с большим числом доступных для химического синтеза пептидных препаратов доля их промышленного производства для нужд фармакологии очень мала. Причины такого несоответствия весьма многообразны. Во-первых, учреждения здравоохранения обладают правом предъявлять высокие требования к чистоте производимых пептидных препаратов. Биологические, фарма-

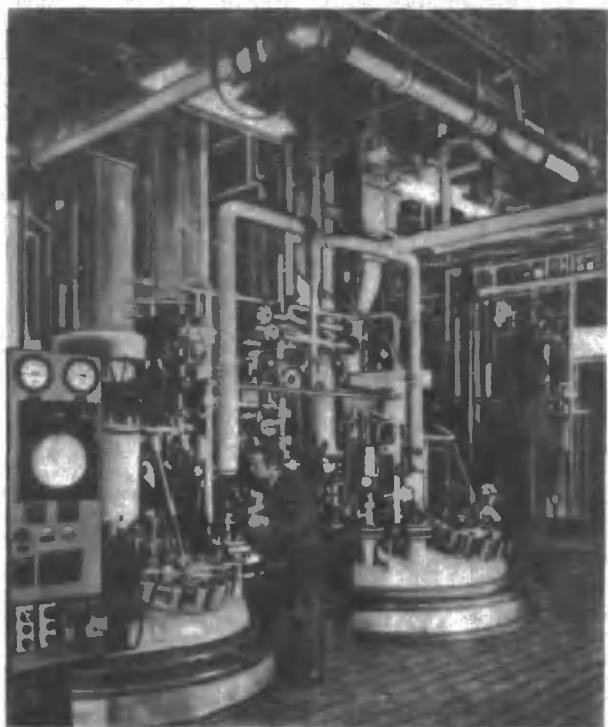


Рис. 2-32. Реактор для промышленного пептидного синтеза [568].

кологические и медицинские тесты, необходимые для допуска препарата в качестве лекарственного средства, составляют обширную, очень дорогостоящую программу исследований. До настоящего времени такие испытания проводились с относительно небольшим числом биологических активных пептидов. Во-вторых, высокая себестоимость промышленной пептидной продукции обусловлена помимо стоимости исходных веществ и вспомогательных материалов очень сложной и дорогостоящей методикой проведения процесса, где каждый промежуточный продукт многоступенчатого пептидного синтеза должен быть однозначно аналитически охарактеризован. Очень много внимания должно быть также посвящено очистке конечных продуктов промышленного производства.

Стратегия и тактика химического синтеза пептидных препаратов на стадии исследования, при препаративной наработке в лабораторных условиях и при промышленном производстве совершенно различны.

Лабораторный синтез служит для приготовления пептидов в небольших количествах, достаточных для получения их характеристики и первых фармакологических исследований. Для исключения фактора риска такой синтез в основном строится по принципу максимальной защиты. На следующих стадиях разработки технологии крупномасштабного синтеза уже необходи-

Таблица 2-12. Некоторые производимые в промышленности пептидные гормоны

Пептид	Число амино- кислот- ных ос- татков	Торговое название	Фирма и год предложения
Окситоцин	9	Syntocinon	Sandoz (1956)
Метилнокситоцин	9	Remestyp	SPOFA (1967)
[Asp ¹ , Val ⁵]ангиотензин II	8	Hypertensin	CIBA (1959)
[Lys ⁸]вазопрессин	9	Vasopressin	Sandoz (1961)
		Diapid (США)	Sandoz (1970)
АКТГ (1—24)	24	Synacthen	CIBA (1967)
АКТГ (1—28) и (1—32)	28(32)	Humacthid	Gedeon-Richter (1970)
Пентагастрин	5	Peptavlon	ICI (1969)
Дезаминокситоцин	9	Sandopart	Sandoz (1971)
Дезамино-D-Arg-вазопрессин	9	Minirin	Ferring (1973)
Тиреолиберин	3	TRF	Roche (1974)
		Tiregan	Hoechst
		Thypionone	Abbott
Кальцитонин (лососевых) -	32	Calcitonin	Sandoz (1974)
		Calcimar	Armour (1975)
Гонадолиберин	10	Relisorm L	Abbott (1975)
Кальцитонин (человека)	32	Cibacalcin	Ciba-Geigy (1977)
Триглицид[Lys ⁸]вазопрессин	12	Glypressin	Ferring (1977)
АКТГ (человека)	39		Armour (1977)

мо учитывать требования промышленного производства. Соединение разбивают на наиболее удачные фрагменты, используя принцип минимальных защит, и подбирают несложные методы конденсации и очистки.

Рис. 2-31 на примере АКТГ (1—24) [568] хорошо иллюстрирует различные подходы при осуществлении лабораторного и промышленного синтеза. Вообще говоря, крупнолабораторная пилотная и производственная установки по производительности различаются незначительно. Процесс протекает чаще всего в реакторах из нержавеющей стали или в эмалированных реакторах; реакторы снабжены обычными мешалками, паропроводами, холодильниками и сборниками. Типичный реактор на 200 галлонов ($\sim 0,76 \text{ м}^3$) для производства пептидов изображен на рис. 2-32 [568]. Нагревающая и охлаждающая системы делают возможным терморегулирование в реакторе в интервале $-20 \div +70^\circ \text{C}$.

При проведении гидрогенолиза для сокращения времени реакции применяют специальные высокоскоростные мешалки. Очистка конечного продукта составляет отдельную стадию производства. Противоточное распределение, по-видимому, хорошо подходит для очистки синтетических пептидов в промышленных масштабах [568]. В табл. 2-12 приведены некоторые гормоны, производимые в промышленности.

2.3. Биологически активные пептиды

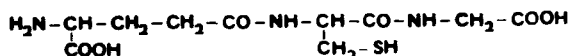
За последние годы число пептидов, найденных в живых системах, сильно возросло. В период 1944—1954 гг. были разработаны основные аналитические методы выделения, очистки и установления структуры пептидов. Однако исследования некоторых пептидов, особенно пептидов головного мозга, совершенно не развивались, так как были неизвестны соответствующие аналитические методы определения нанограммовых (10^{-9} г) или меньших количеств вещества. Лишь с развитием радиоиммунного анализа (RIA) (Р. С. Ялоу, лауреат Нобелевской премии 1977 г. по физиологии и медицине, и С. Берсон) стали возможны определения исключительно малых концентраций пептидов в соответствующих препаратах. Например, некоторые гормоны можно обнаружить при содержании 10^{-12} г в 1 мл крови. Развитие радиоиммунного метода позволило начать исследование нейрогормонов гипоталамуса. Гийемен и Шалли (получившие вместе с Ялоу Нобелевскую премию по физиологии и медицине) смогли привести экспериментальные доказательства того, что центральная нервная система модулирует активность гипоталамуса путем выделения ничтожных количеств либеринов (факторы высвобождения гормонов, рилизинг-факторы); тем самым контролируется эндокринная регуляция. Оба исследователя (совершенно независимо друг от друга) установили последовательность первых гормонов гипоталамуса и синтезировали их в лаборатории.

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

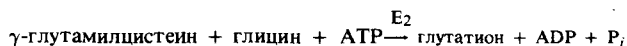
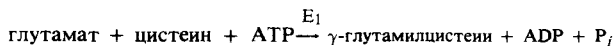
только на одну аминокислоту. Затем были найдены другие активные пептиды, такие, как β -эндорфин из гипофиза и α - и γ -эндорфины из системы гипоталамус-нейтрогипофиз. Этот класс соединений, названный в совокупности эндорфинами, имеет огромное значение для физиологии и фармакологии в связи с новыми данными, полученными при исследовании болевых ощущений и подавления боли, а также играет определенную роль в патогенезе психических расстройств. Исследования пептидов, влияющих на центральную нервную систему, находятся в начальной стадии.

Многие биологически активные пептиды природного происхождения отличаются структурно от пептидов, образующихся в результате процессинга белков. Зачастую в их составе находятся небелковые аминокислоты, такие, как β -аланин, γ -аминомасляная кислота, D-аминокислоты, N $^{\alpha}$ -алкилированные аминокислоты и др. Для многих низкомолекулярных пептидов также характерны ω -пептидные связи и кольцевые структуры. Такие структурные особенности, а также остатки пироглутаминовой кислоты образуют действенную защиту против атаки протеаз, обладающих обычно субстратной специфичностью к пептидам из α -аминокислот с нормальными пептидными связями.

Глутатион, присутствующий во всех клетках высших животных, представляет собой трипептид с N-коцевым остатком глутаминовой кислоты, присоединенным γ -пептидной связью:



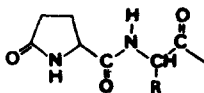
Биосинтез таких пептидов осуществляется не обычным путем при участии рибосом, а протекает в двухступенчатых катализируемых ферментами реакциях с использованием АТФ:



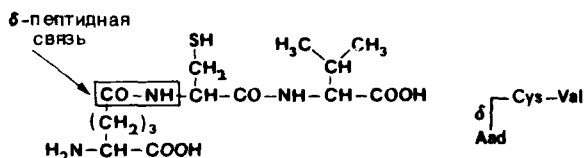
где E_1 — γ -глутамилцистеинсинтетаза, E_2 — глутатионсинтетаза.

Глутатион — биохимически важный активатор некоторых ферментов; он защищает липиды от аутоокисления и является составной частью системы транспорта аминокислот в отдельных тканях животных (цикл γ -глутаминовой кислоты). Другие γ -глутамилпептиды находят в растительных тканях, например в луке, чесноке и в семенах бобовых. Некоторые производные *птероилглутаминовой кислоты* (*фолиевая кислота*) также содержат дополнительные остатки глутаминовой кислоты, соединенные оди- с другим γ -пептидной связью.

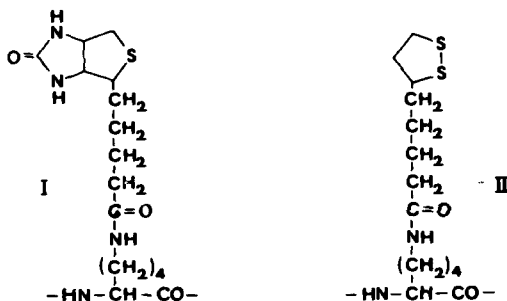
Действенной защитой против ферментативного расщепления аминопептидазами служит пироглутаминовая кислота (пирролидои карбоновая кислота) — N-концевой остаток в *пироглутамилпептидах*:



Представители таких пептидов, например *эйзенин* (Pyr-Gln-Ala) и *пельветин* (Pyr-Gln-Gln), были найдены в водорослях. Пироглутаминовая кислота присутствует также в различных либерилах. Кроме этой внутримолекулярной γ -связи между α -аминогруппой и карбоксигруппой в боковой цепи в природных пептидах существует также другие ω -пептидные связи аминокислот. Различные простые β -аспартилпептиды найдены в человеческой моче, в то время как в различных грибах рода *Penicillium* обнаружен δ -аминоадипилцистеинилвалин — пример очень редко встречающейся δ -пептидной связи:



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



В бацитраине (разд. 2.3.5.1) имеется разветвленно-циклическая структура, присоединенная через ϵ -аминогруппу лизина.

2.3.1. Пептидные и белковые гормоны

Гормоны — химические органические соединения, которые образуются в железах или специализированных клетках и переносятся по транспортной (кровеносной) системе к одному или нескольким местам воздействия, где проявляют специфическую к данным клеткам активность, связываясь с соответствующими рецепторами. Гормональное действие характеризуется передачей информации, причем в отличие от нервной системы в этом случае накопление информации невозможно.

Следует отметить, что физиологически обе системы развивались одновременно, причем с возникновением нейросекретин, появившейся уже у червей и членистоногих, была достигнута качественно более высокая ступень развития. У позвоночных наблюдается иерархическая организация эндокринной системы. Нервные раздражения с помощью преобразователей в нервносекреторных клетках трансформируются в гормональные сигналы (нейрогормоны), благодаря чему различные окружающие воздействия через нервную систему передаются на внутренние секреторные органы, которые затем соответствующим образом адаптируются. Гормональная и нервная системы, взаимодействуя, управляют и регулируют все жизненные процессы высокоорганизованных организмов.

Гормоны объединяют химически неоднородные регуляторы; к ним относятся стероиды, производные жирных кислот, аминокислоты, производные аминокислот, а также пептиды и белки (обстоятельно обсуждаются далее; рассмотрение белковых гормонов в главе «Белки» вряд ли уместно, так как разделение пептидов и белков имеет исторические корни и сегодня едва ли можно их четко разграничить).

По месту образования гормоны разделяют на нейрогормоны, гормоны, секретлируемые специальными железами, и тканевые гормоны. Классификация часто затруднена, так как не во всех случаях точно определены места образования и воздействия. Согласно общепринятому определению гормонов, вещества, которые, диффундируя, действуют вблизи места их образования, не должны называться гормонами, однако все же часто к гормонам относят нейротрансмиттеры (ацетилхолин, допамин, норадреналин, серотонин, гистамин, глутамат, глицин, γ -аминобутират, таурин, вещество Р и многие другие пептиды), а также модуляторы нейронной активности нейрогормонов [569]. Возможно, не будет ошибкой рассматривать классическую эндокринологию как одну из областей нейроэндокринологии. Мозг уже характеризуется как высокоспециализированная «эндокринная железа», ибо в общем нейротрансмиссия связана с секреторными процессами, в то время как электрическая передача нервных импульсов представляет собой исключительный случай. Несмотря на трудность четкого определения, все активные в отношении центральной нервной системы пептиды следует называть нейропептидами (разд. 2.3.3), при этом понятие «нейрогормоны» должно соответствовать действующей классификации гормонов.

Решающей предпосылкой для выполнения функции «первого курьера» является то, что гормон узнается в органе, на который он действует, дифференцированно от остальных соединений. Этот процесс узнавания характеризуется связыванием данного гормона со специфическим рецептором целевой клетки. Рецепторы гормонов — это белки, которые должны узнавать гормон, связывать его и отвечать следующим требованиям:

- иметь высокую рецепторную специфичность для того, чтобы обеспечить правильное соотношение между структурой гормона и его биологической активностью;

- проявлять сродство к гормону вследствие его очень низкой физиологической концентрации;

- иметь ограниченное число мест связывания гормона;

гарантировать обратимость связывания гормона (на рецепторе), так как окончание физиологического акта — предпосылка для новой стимуляции.

Принцип гормон-рецепторного комплекса был постулирован уже в начале столетия П. Эрлихом. Рецепторы гормона локализируются или на клеточной поверхности (клеточные мембраны), или в цитоплазме клетки. Интересующие нас пептидные или белковые гормоны вступают во взаимодействие с рецепторами, связанными с клеточными мембранами. Первое экспериментальное доказательство наличия связанного с мембраной рецептора удалось получить лишь в 1969—1970 гг. при использовании меченых пептидных гормонов (АКТГ, инсулин, ангиотензин) [571—573]. Затем были установлены специфические рецепторы всех гормонов, и гормон-рецепторная концепция стала быстро развиваться. Здесь нужно сослаться на прекрасный обзор Любке и сотр. [574], посвященный этому вопросу.

Если пептидный или белковый гормон вступает во взаимодействие с мембранными рецепторами, то циклический АМР, образующийся при активации аденилатциклазной системы, становится во многих случаях «вторым курьером», формирующим следующие стадии внутриклеточных реакций (рис. 2-33). сАМР был открыт Шутерландом в начале 50-х годов.

Инициированный таким образом внутриклеточный гормональный эффект определяется свойствами клетки. Адренокортикотропный гормон (АКТГ) и гормон, стимулирующий интерстициальные клетки, стимулируют, например, одинаковые реакции превращения холестерина в прегненолен. Это объясняется тем, что при различном наборе ферментов в клетке, в коре надпочечников из прегненолена образуются кортикоиды (альдостерон, кортизол), а в половых железах — предпочтительно андрогены, гестагены и эстрогены. Инсулин связывается с рецепторами на мембране жировой клетки. Взаимодействие со специфическим рецептором повышает концентрацию сGMP, концентрация же сАМР понижается. Образование

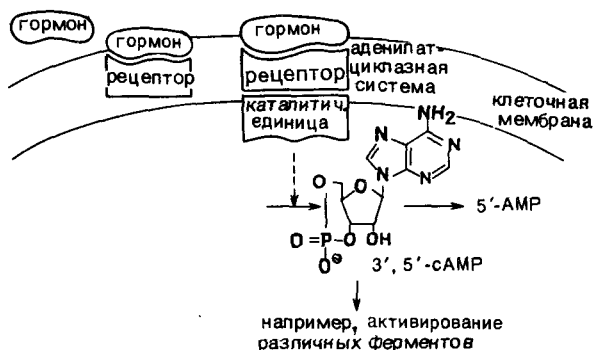


Рис. 2-33. Схематическое изображение действия гормона через рецептор, связанный с мембраной [574].

cGMP посредством активации гуанилатциклазы и стимулированные этим изменения мембраны в жировых клетках при связывании инсулина с рецептором ясно показывают, что cGMP также может служить в качестве «второго курьера». Андреналин и глюкагон, напротив, активируют аденилатциклазную систему. Отсюда следует, что cAMP и cGMP обладают взаимно противоположным действием (гипотеза "up-down"), т. е. антагонистическое действие гормонов инсулина и глюкагона проявляется в противоположных изменениях концентрации регуляторных циклических нуклеотидов. Для доказательства этой гипотезы необходимы дальнейшие исследования.

Предполагается, что пептидные гормоны (инсулин, пролактин, гормон роста, паратиреоидный гормон, гонадотропин, гормоноподобные факторы роста и др.) также могут проникать через клеточную мембрану внутрь клетки [575]. Это предположение уже выдвигалось в 50-х годах двумя группами исследователей, но эндокринологи настанвали на концепции взаимодействия пептидных гормонов исключительно лишь со связанными с мембраной рецепторами. Согласно современным воззрениям, такие трудноинтерпретируемые долговременные эффекты, как, например, влияние на рост клетки и белковый синтез в случае инсулина, можно объяснить, лишь принимая возможность проникновения гормона в клетку. Кратковременные эффекты могут быть вызваны, по существующему представлению, обычным путем, т. е. взаимодействием с рецептором, связанным с мембраной. Относительно процесса входа в клетку существуют различные точки зрения, как, например, совместное действие высокомолекулярного белка-носителя (α_2 -макроглобулин для инсулина или эпидермального фактора роста) или совместное с рецептором клеточной стенки проникновение гормона в клетку. Но в общем случае ясность в вопросе о функциях полипептидного гормона в клетке пока отсутствует. Дискусируются следующие предположения:

после входа пептидного гормона в клетку он вступает во взаимодействие с внутриклеточными рецепторами и вызывает долговременные эффекты;

биологический эффект в клетке предполагает совместный транспорт гормона и рецептора клеточной стенки;

совместный перенос приводит к исчезновению рецептора;

пептидный гормон затем расщепляется в клетке.

Секреция и снижение содержания гормона регулируются сложной системой контроля. Первые импульсы (электрические), вызванные внешним возбудителем, передаются нервной системой к ганглиозным клеткам гипоталамуса, где трансформируются в гормональные (химические) сигналы (либерины), которые в свою очередь по нервным волокнам идут в аденогипофиз и там индуцируют или, наоборот, останавливают выделение определенного гормона. Гормоны аденогипофиза затем по кровеносной системе транспортируются к другим эндокринным железам. Например, АКТГ идет к коре надпочечников, где вызывает выделение адренокортикоидов. Наряду с этим в гипоталамусе образуются как минимум еще два других нейрогормона — окситоцин и вазопрессин, связывающиеся затем с транс-

портными белками (нейрофизинами) и передаваемые в виде нейросекрета по паравентрикуло-гипофизарному или супраоптико-гипофизному тракту в нейрогипофиз. Из этого «аккумулятора» при необходимости они могут освобождаться в кровяное русло.

С помощью отрицательной обратной связи определенные продукты обмена веществ могут управлять секрецией или связыванием определенных гормонов (механизм обратной связи). После воздействия, вызванного определенным гормоном, идет очень быстрая инактивация или разрушение регулирующего вещества. Период полураспада для пептидных и белковых гормонов, как правило, составляет менее 30 мин. Быструю инактивацию обеспечивают различные эндо- и экзопептидазы. Многие известные к настоящему времени пептидные гормоны образуются в результате ферментативного расщепления неактивных белковых предшественников. Интересна также концепция, по которой определенные гормоны могут быть предшественниками совершенно других видов гормонов.

Обстоятельное изучение связей между структурой и активностью позволило выделить участок аминокислотной последовательности гормона, несущий информацию о биологическом эффекте, и назвать его *активным центром* или *информационным участком*, в то время как участок, ключевой для узнавания соответствующим рецептором, локализован в части аминокислотной последовательности, называемой *адресной* или *связывающей*.

Табл. 2-13 не исчерпывает все вещества пептидной природы из животного материала, имеющие гормоноподобное действие. Пептиды, действующие на центральную нервную систему (нейропептиды), активные вещества из амфибий и головоногих (эледонин, физаламин, филломедузин, уперолин, кассинин, церулин, филлоцерулин), а также интересная группа бомбезина (бомбезин, ранатензин, алитензин, литорин) рассмотрены особо.

В таблице приведены далеко не все секреторные и несекреторные пептидные и белковые гормоны. При их последующем рассмотрении также нельзя охватить всех их представителей и остановиться на всех аспектах их химии и эндокринологии. Почти невозможно включение в обсуждение многочисленных синтетических аналогов различных пептидных гормонов, а также проблематики, связанной с обширными исследованиями конформаций пептидных молекул. Многие монографии и обзоры могут дать обширную информацию об интересной области науки, относящейся к пептидным и белковым гормонам [581—590]. Уверенно идет установление структуры и изучение механизма действия новых природных соединений пептидной природы из головного мозга, внутренних органов, лимфоцитов, кожи амфибий и т. д., обладающих гормональным действием.

Существенную помощь при определении наличия пептидных гормонов оказывает *радиоиммунный метод*, отличающийся высокой чувствительностью и специфичностью. Для проведения радиоиммунного определения гормона необходимы следующие предпосылки:

Таблица 2-13. Пептидные и белковые гормоны

Название и синоним	Место образования	Действие	Химическая классификация
Тиреотропин (тиреостимулирующий гормон)	Гипофиз	Образование и выделение гормонов щитовидной железы	Гликопротеин, 2 субъединицы (α : 96 аминокислот, β : 113 аминокислот)
Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ, фоллитропин) [577]	"	Способствует росту и созреванию фолликул; стимулирует сперматогенез	Гликопротеин, 2 субъединицы [576] Гонадотропин
Лютеинизирующий гормон (ЛГ, лютропин, гормон, стимулирующий интерстициальные клетки)	"	Стимулирует образование эстрогена и тем самым окончательное созревание фолликул; вместе с ФСГ вызывает овуляцию	Гликопротеин, 2 субъединицы (α : 96 аминокислот, β : 120 аминокислот [578]) Гонадотропин
Пролактин (лютеотропный гормон, ЛТГ, люотропин)	"	Стимулирует рост молочных желез и секрецию молока (известен также ЛТГ человека [579])	Одицепочечный белок (овца: 198 аминокислот, 3 S—S-связи)
Соматотропный гормон (СТГ, соматотропин, гормон роста)	"	Необходим для нормального роста, стимулирует рост костей в длину	Одицепочечный белок (СТГ человека: 191 аминокислота)
Липотропный гормон (ЛТГ, липотропин)	"	Стимулирует образование свободных жирных кислот из триглицеридов	β -ЛТГ: 91 аминокислота
Адренокортикотропный гормон (АКТГ, кортикотропин)	"	Стимулирует выделение корой надпочечников глюкокортикоидов	Линейный пептид: 39 аминокислот
Меланоцитстимулирующий гормон (МСГ, меланотропин)	"	У теплокровных способствует образованию меланоблестов, у человека действие неизвестно	α -МСГ: 13 аминокислот, β -МСГ: 18—22 аминокислоты (β -МСГ человека: 22 аминокислоты)
Окситоцин	Гипоталамус (образование), гипофиз (накопление)	Вызывает выделение молока и стимулирует сокращение матки	Гетеродетный циклический пептид

Название и синоним	Место образования	Действие	Химическая классификация
Вазопрессин	Гипоталамус (образование), гипофиз (накопление)	Повышает артериальное давление и действует антидиуретически	Гетеродетный циклический нонапептид
Тиреолиберин (рилизинг-фактор тиреотропина)	Гипоталамус	Выделение тиреолиберина	Трипептид
Гонадолиберин (рилизинг-фактор гонадотропина, люлиберин, фоллиберин)	"	Выделение ЛГ и ФСГ	Декапептид
Кортиколиберин (рилизинг-фактор кортикотропина)	"	Выделение АКТГ	Пептид
Пролактилиберин (рилизинг-фактор пролактина)	"	Выделение пролактина	"
Соматолиберин (рилизинг-фактор соматотропина)	"	Выделение соматотропного гормона	"
Меланолиберин (рилизинг-фактор меланотропина)	"	Выделение МСГ	"
Пролактостатин (гормон, ингибирующий выделение пролактина)	"	Подавление выделения пролактина	"
Соматостатин (гормон, ингибирующий выделение соматотропина)	"	Подавление выделения соматотропина	Гетеродетный циклический тетрадекапептид
Меланостатин (гормон, ингибирующий выделение меланотропина)	"	Подавление выделения МСГ	Пептид
Вещество Р	Гипоталамус, мышечные ткани тонкой кишки	Нейрональное действие, снижение артериального давления, стимуляция гладкой мускулатуры	Линейный ундекапептид
Нейротензин	Гипоталамус	Кининовая активность, регуляция обмена гликогена в печени	Линейный тридекапептид

Название и синоним	Место образования	Действие	Химическая классификация
Инсулин	Поджелудочная железа	Снижение уровня сахара в крови, регуляция углеводного обмена, влияние на белковый и липидный обмен	Гетеродетный циклический пептид (А-цепь: 21 аминокислота; В-цепь: 30 аминокислот)
Глюкагон	То же	Повышение уровня сахара в крови стимуляцией гликогенеза в печени	Линейный пептид: 29 аминокислот
Кальцитонин	Щитовидная железа	Снижение уровня кальция	Гетеродетный циклический пептид: 32 аминокислоты
Паратиреоидный гормон	Паращитовидная железа	Поддержание нормального уровня кальция в крови	Линейный полипептид: 84 аминокислоты
Релаксин [580]	Желтые тела	Расширение шейки матки и расслабление связок между костями с целью облегчения родов	Гетеродетный циклический пептид (А-цепь : 22 аминокислоты; В-цепь: 26 аминокислот)
Хориогонадо-тропин человека	Плацента	Действие, подобное ЛГ	Гликопротеин, 2 субъединицы (α : 92 аминокислоты, β : 174 аминокислоты)
Хориосомато-маммотропин человека	"	Действие, подобное соматотропному гормону и пролактину	Одноцепочечный белок (190 аминокислот, 2 дисульфидные связи)
Гастрин	Слизистая желудка	Стимуляция секреции кислоты в желудке и образование ферментов в поджелудочной железе	Линейный гептадекапептид
Секретин	Слизистая двенадцатиперстной кишки	Стимуляция образования и выделения панкреатического сока, повышение отделения желчи	Линейный пептид: 27 аминокислот
Холецистокинин-панкреозимин	Слизистая двенадцатиперстной кишки	Сокращение желчного пузыря и секреция ферментов поджелудочной железы	Линейный пептид: 33 аминокислоты

Продолжение таблицы 2-13

Название и синоним	Место образования	Действие	Химическая классификация
Ангиотензин II	α_2 -Глобулиновая фракция плазмы	Повышение артериального давления, стимуляция коры надпочечников к образованию альдостерона	Линейный октапептид
Брадикинин (кинин-9)	Плазма	Повышение артериального давления, сокращение гладкой мускулатуры	Линейный нонапептид
Каллидин (кинин-10)	"	Действие, подобное брадикинину	Линейный декапептид
Метиониллизил-брадикинин (кинин-11)	"	То же	Линейный ундекапептид

определяемый гормон доступен в возможно более чистом виде, и существует возможность введения радиоактивной метки (иод-125, тритий);

имеются в распоряжении специфические антитела к гормону. Такие антитела могут быть получены относительно несложно, так как пептидные и белковые гормоны из-за их видовой специфичности сами являются иммуногенами. Для этой цели подходящему подопытному животному (морская свинка, кролик) вводится определяемый гормон, действующий в крови данного животного как антиген и вызывающий образование антител.

Для определения концентрации гормона смешивают меченный, например иодом-125, гормон с антителами к данному гормону. Образуется комплекс ^{125}I —гормон—антитело. При добавлении исследуемого экстракта немеченный гормон, находящийся в исследуемом растворе, конкурирует с меченым в реакции связывания с антителом, вытесняя последний из комплекса. Далее освобожденный гормон отделяют от связанного электрофорезом, хроматографией или осаждением и количественно определяют его, измеряя радиоактивность. Из полученных данных можно рассчитать количество исследуемого немеченого гормона, так как радиоактивность свободного гормона зависит от того, насколько много меченого гормона было вытеснено из комплекса антиген — антитело. Более подробно с этим вопросом можно ознакомиться по литературе [582, 591].

2.3.1.1. Кортикотропин

Кортикотропин (адренокортикотропин, адренокортикотропный гормон, АКТГ) представляет собой линейный полипептид, состоящий из 39 аминокислотных остатков [592, 593]. Проверка аминокислотных последователь-

ностей АКТГ человека, телянка и овцы [594, 595] показала лишь незначительное их отличие, касающееся аминокислотных остатков в положениях 31 и 33:

человек	Ser — Tyr — Ser — Met — Glu — His — Phe — Arg — Trp — Gly — Lys — Pro — Val — 1 5 10
	Gly — Lys — Lys — Arg — Arg — Pro — Val — Lys — Val — Tyr — Pro — Asn — Gly — 15 20 25
	Ala — Glu — Asp — Glu — Ser — Ala — Glu — Ala — Phe — Pro — Leu — Glu — Phe 30 35
свинья	— Leu — Ala — Glu —
тенок, овца	— Ser — Ala — Glu —

Первый полный синтез АКТГ свиньи с первоначально установленной и, как оказалось впоследствии, ошибочной аминокислотной последовательностью описан в 1963 г. Швицером и Зибером [596], первый синтез АКТГ человека — в 1967 г. Баюшем с сотр. После пересмотра аминокислотных последовательностей АКТГ обе исследовательские группы осуществили синтез АКТГ человека классическим методом, в то же время Ямаширо и Лн синтезировали тот же пептид с использованием твердофазной техники. С 1956 г. в основном вышеуказанные группы, а также группы Гейгера, Гофмана, Буассана и др. осуществили синтез отдельных участков последовательности АКТГ и получили ряд аналогов. Подводя итог обширным структурно-функциональным исследованиям этого гормона с некоторой долей упрощения (формально — в соответствии с ранее сказанным), можно выделить в последовательности АКТГ участки с различным биологическим значением. Но сначала необходимо сказать несколько слов о его биологическом действии.

Различные функциональные состояния организма, например стресс или пониженный уровень гормонов коры надпочечников в крови, побуждают переднюю долю гипофиза посредством гормона гипоталамуса кортиколиберина к секреции АКТГ. Образовавшийся гормон по кровяному руслу следует затем к клеткам-мишеням, а именно к клеткам коры надпочечников, вызывая синтез и секрецию стероидных гормонов кортизола, кортизона и кортикостерона. Как только содержание гормонов коры надпочечников в крови достигает необходимого уровня, механизм обратной связи ведет к снижению выделения АКТГ гипофизом. Посредством основного цикла регулирования гипофиз — кора надпочечников АКТГ оказывает также влияние на распад жировых клеток.

Связь хранимой биологической информации с аминокислотной последовательностью АКТГ интенсивно исследовалась в различных лабораториях, особенно группой Швицера. В N-концевом (1-18) участке молекулы содержится практически вся информация для коры надпочечников, для жировых и меланофорных клеток, причем процесс пигментации последних, вероят-

но, не представляет физиологическую функцию АКТГ, а является следствием содержащейся в АКТГ последовательности α -МСГ. Участок последовательности 19—24 несколько усиливает стероидогенную активность гормона к клеткам коры надпочечников, но не оказывает никакого влияния на жировые и меланофорные клетки. Изучение гормон-рецепторных взаимодействий позволяет сделать вывод, что N-концевая (1-10) область, точнее, участок 5—10 представляет собой активный центр, рецепторсвязывающая же область представлена участком 11—18 (Гофман и сотр., 1972 г.). По Швицеру, информация о биологическом действии заключена в участке аминокислотной последовательности 5—10, а адрес ее реализации находится в участке 11—24. В С-концевой области содержится информация о видоспецифичности, антигенности и транспорте гормона. Препараты АКТГ, особенно синтетический АКТГ 1—24 (синактен), используют для лечения аллергии, при особых формах гипофизарной недостаточности, при артритах, а также для торможения воспалительных процессов и при других болезнях. Большое значение имеют также отдельные участки последовательности АКТГ, активные для центральной нервной системы (разд. 2.2.3).

В клетках АКТГ синтезируется в составе общего для нескольких пептидов предшественника — *проопиомеланокортина* [597, 598]. Так как из этого гликопротеина действием протеаз кроме АКТГ и β -липотропина образуются также эндорфины и меланоцитстимулирующий гормон, возникает проблема разграничения понятий «прогормон», «препрогормон» и т. д. На стр. 243 схематически представлен процесс последовательного расщепления предшественника АКТГ и липотропина.

Используя технику клонирования ДНК [599] и анализа нуклеотидных последовательностей [600], Наканиши и сотр. [601] установили нуклеотидную последовательность мРНК-предшественника. Нумерация аминокислотной последовательности положительная справа от N-концевой аминокислоты АКТГ, в левую сторону отсчет идет со знаком минус. Белок-предшественник содержит 8 пар основных аминокислот и одну двойную пару -Lys-Lys-Arg-Arg. В этих местах происходит ферментативное расщепление белка с образованием различных пептидов. β -Липотропин образует С-концевую область и, вероятно, отщепляется непосредственно от предшественника. Общая схема ферментативного расщепления и вид фрагментации к настоящему времени еще не установлены. В отличие от известных последовательностей β -липотропинов свиньи и овцы β -липотропин теленка содержит между 35 и 36 аминокислотными остатками два дополнительных (-Ala-Glu-); этим объясняются различные длины цепей липотропинов (см. схему). Анализ на ЭВМ аминокислотной последовательности «отрицательной» части предшественника дал интересный результат: между позициями —55 и —44 найдена аминокислотная последовательность -Tyr-Val-Met-Gly-His-Phe-Arg-Trp-Asn-Arg-Phe-Gly-, имеющая большое сходство с α - и β -МСГ. Так как в области аминокислотной последовательности предшественника от —111 до —105 присутствует еще один участок, имеющий структурное сходство с МСГ-пептидами, предполагается существование серии дубликаций гена, аналогично имеющей место в случае иммуноглобулинов. О



роли β -липотропина и β -эндорфина, а также о метионинэнкефалине, сказано далее. (CLIP — сокращение для кортикотропиноподобного пептида из промежуточной доли гипофиза, последовательность которого наряду с α -МСГ содержится в АКТГ.)

2.3.1.2. Соматотропный гормон

Соматотропный гормон [602—604] (СТГ, соматотропин, гормон роста) образуется в передней доле гипофиза под контролем соматолиберина. Название «соматотропин», т. е. «действующий на все тело», отражает его широкий спектр активностей, обусловленный анаболическим действием, хотя основная функция гормона — регуляция процесса роста. В частности, СТГ стимулирует рост эпифизарных хрящей и вследствие этого удлинение костей. В период половой зрелости андрогены вызывают сращивание эпифиза с диафизом, что приводит к прекращению роста.

СТГ человека представляет собой полипептидную цепь, содержащую 191 аминокислотный остаток. Молекулы гормона из других организмов отличаются от СТГ человека как длиной цепи, так и степенью гомологичности, поэтому на человека действует лишь СТГ приматов. Весьма незначительно различие аминокислотных последовательностей СТГ человека с хориосоматомаммотропина, действие которого подобно действию СТГ и пролактина.

СТГ человека был впервые выделен Ли с сотр. в 1956 г. Данные об аминокислотной последовательности в последующие годы много раз пересматривались. В 1970 г. Ли [605] сообщил о твердофазном синтезе этого

белка, показавшего в тесте на большой берцовой кости 10% ростовой активности и в тесте на зобе голубя 5% активности пролактина. Этот результат поразителен тем, что первичная структура, положенная в основу химического синтеза, немного позже подверглась пересмотру. Отсюда можно сделать однозначный вывод, что биологическая активность никогда не может быть использована в качестве критерия успешности химического синтеза. На поиск активного центра соматотропного гормона роста направлены усилия многих исследователей, так как длина полипептидной цепи слишком велика, чтобы использовать полный химический синтез в качестве источника этого терапевтически важного гормона. Предпринимаются попытки получения достаточно активных фрагментов путем ферментативного расщепления целой молекулы белка. Такие фрагменты уже могут быть доступны для химического синтеза в значительных количествах, достаточных для терапевтических целей.

В 1979 г. Гудман и Бакстер, а также Годдель с сотр. осуществили синтез СТГ человека методами геной инженерии. В то время как первая группа использовала соответствующий природный ген, вторая встраивала ген, синтезированный комбинацией химических и ферментативных методов. Учитывая существующие трудности химического пептидного синтеза, можно говорить о большом значении ДНК-рекомбинантной техники (разд. 2.3.1.7) для получения этого гормона.

Почти единственный случай применения СТГ человека — гипопизарная карликовость. Отсутствие или недостаточное количество СТГ ведет к карликовости, причем часто при достижении половой зрелости появляется инфантилизм. Слишком высокий уровень секреции гормона в период роста приводит к гигантизму, при передозировке в период роста появляются симптомы акромегалии (чрезмерное удлинение конечностей, носа, ушей, подбородка и др.). Кроме лечения карликовости СТГ используется при мышечной дистрофии, остеопорозе (недостаточное содержание кальция в костях), при желудочных кровотечениях и др.

Вообще аспекты участия СТГ вследствие его анаболического действия весьма многообразны: он способствует транспорту аминокислот в клетки, стимулирует усвоение жирных кислот, биосинтез белков. СТГ обладает также диабетогенным действием, повышенная его секреция может привести к сахарной болезни. Это объясняется торможением периферийного обмена глюкозы.

В определенных тканях, например в скелетных, действие СТГ передается посредством факторов плазмы, названных *соматомединами*.

Биологическая функция соматомедина В, аминокислотная последовательность которого установлена Фриклендом и Сивертсоном, еще не ясна. Его полипептидная цепь состоит из 44 аминокислотных остатков, включает N-концевую аспарагиновую кислоту, C-концевой треонин и 8 остатков цистина [606]. Первичная структура пептида подобна структуре малого трипсинового ингибитора. Соматомедин В ингибирует трипсин, однако не действует на плазмин, тромбин или калликреин.

2.3.1.3. Пролактин

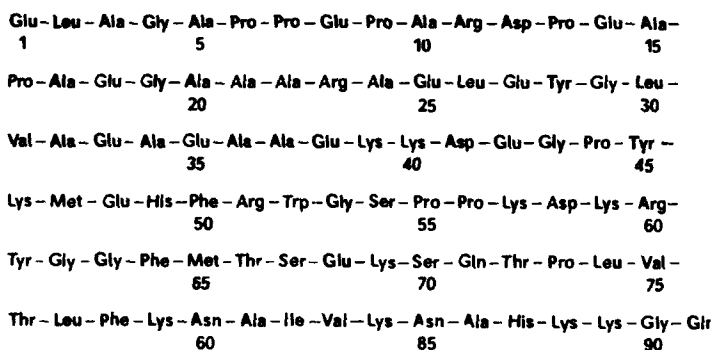
Образование пролактина (лютеотропный гормон, лактогенный гормон, лактотропин) в передней доле гипофиза регулируется соотношением содержания пролактолиберина и пролактостатина. Пролактин регулирует секрецию молока грудными железами, а также их рост. Во время беременности и в период кормления его количество увеличивается. Кроме того, он способствует процессу роста, влияет на обмен пигментов и регуляцию осмоса, подавляет инстинкт насиживания у птиц. Непосредственно в тканях биологический эффект вызывается воздействием на аденилатциклазную систему.

Первичная структура пролактина овцы установлена Ли с сотр. Этот белок состоит из одной полипептидной цепи, включающей 198 аминокислот и сшитой тремя внутримолекулярными дисульфидными мостиками. Из гипофиза теленка и овцы пролактина может быть выделен относительно легко и дифференцированно от соматотропного гормона. Аналогичные эксперименты с гипофизом человека долгое время оставались безуспешными, что вызвало сомнения в существовании человеческого пролактина. Лишь в 1973 г. человеческий пролактин был охарактеризован как гормон, отличающийся от СТГ [607]. Препролактин описан Маурером в 1977 г. [608].

2.3.1.4. Липотропин [598]

Липотропин (липотропный гормон) был открыт в 1964 г. Ли [609] при попытке улучшить процесс выделения АКТГ. Он назвал оба выделенных вещества α - и β -липотропинами, так как они влияли на накопление жира в жировых тканях кроликов. Однако этот эффект наблюдался только на кроликах и не проявлялся на других видах животных, поэтому название «липотропин», по-видимому, неудачно.

По Графу [611], β -липотропин свиньи имеет следующую первичную структуру:



N-Концевая аминокислотная последовательность 1—58 соответствует первичной структуре γ -липотропина. β -Липотропин телянка отличается от β -липотропина свиньи больше всего в N-концевой области и состоит из 93 аминокислотных остатков [612], так как между позициями 35 и 36 приведенная здесь последовательность содержит дополнительный дипептид -Ala-Glu.

Как уже подробно отмечалось в разд. 2.3.1.1, β -липотропин, а следовательно, и эндорфины происходят от общего предшественника проопиомеланокортина [598]. Кроме того, β -липотропин содержит последовательности γ -липотропина и β -МСГ. Участки аминокислотной последовательности β -липотропина соответствуют определенному пептидному гормону:

Участок β -липотропина	Пептидный гормон
1—58	γ -Липотропин
41—58	β -МСГ
61—91	β -Эндорфин
61—76	α -Эндорфин
61—77	γ -Эндорфин
61—79	δ -Эндорфин
61—65	Мет-энкефалин

Собственно β -липотропин не обладает каким-либо гормональным действием на организм человека и может быть охарактеризован как прогормон β -эндорфина и β -МСГ. С помощью радиоиммунного анализа β -эндорфина Иосими с сотр. [613] смогли показать, что так называемый «биг»- β -липотропин (названный также «биг-биг»- β -эндорфином) с M 37 000 присутствует в экстракте человеческих желез. В экстракте желез крысы присутствует тот же белок, но с M 31 000, предположительно соответствующий описанному Майнсом и сотр. [597] предшественнику проопиомеланокортину.

2.3.1.5. Меланоцитстимулирующий гормон

Образование меланоцитстимулирующего гормона [617] (меланотропин, меланостимулирующий гормон, МСГ) протекает под контролем гормонов гипоталамуса меланолиберина и меланостатина в промежуточной доле гипофиза, а при их повреждении — в передней доле. Меланотропин стимулирует у теплокровных позвоночных увеличение образования пигментов в особых клетках, называемых меланофорами, чем достигается темная окраска и тем самым приспособление к окружающей среде. Биологическое значение меланотропина у птиц и млекопитающих еще недостаточно ясно, так, например, α -меланотропин оказывает сильное действие на многие ткани животных и, в известной степени, человека [614].

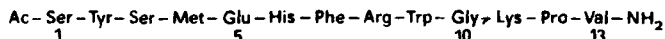
При описании биосинтеза кортикотропина и β -липотропина уже упоминалось, что МСГ образуется в составе общего предшественника проопиомеланокортина. Кроме известных ранее α - и β -МСГ Наканиси и сотр. [601] нашли в составе этого пробелка третью последовательность меланотропи-

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

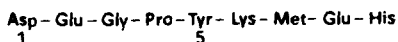
β -MCF Tyr-Lys-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp
1 5 10 14

γ -MCF Tyr-Val-Met-Gly-His-Phe-Arg-Trp-Asp-Arg-Phe-Gly
1 5 10 12

Говоря о α -МСГ, следует сказать об амиде N^{α} -ацетилтридекапептида, аминокислотная последовательность которого совпадает с АКТГ 1—13 (Харрис и Лернер, 1957 г.):



β -Меланотропин (β -МСГ) из различных организмов имеет неодинаковую длину пептидной цепи. Для β -МСГ свиньи приводится следующая первичная структура, соответствующая участку 41—58 β -липотропина:



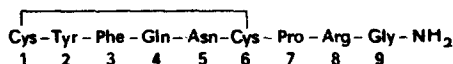
2.3.1.6. Окситоцин и вазопрессин [584, 618, 619]

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

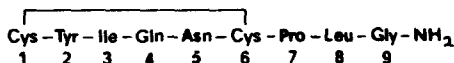
внутрисекреторным органом, а лишь выполняет функцию «депо» гормонов нейросекреторных клеток. Транспортными белками для нейрогипофизарных гормонов долгое время считались нейрофизины, образующиеся в гипоталамусе наряду с окситоцином и вазопрессинном. Нейрофизинами называют линейные, с высоким содержанием цистеина, белки, состоящие из 93—95 аминокислотных остатков. Как правило, каждый биологический вид имеет 2—3 нейрофизина, незначительно отличающихся длиной цепи и (или) аминокислотной последовательностью. Различные данные подтверждают гипотезу о том, что как окситоцин и один нейрофизин, так и вазопрессин и другой нейрофизин имеют общих предшественников в биосинтезе, полипептидные цепи которых образуются при расщеплении нейрофизины и гормоны [620].

Биосинтез вазопрессина идет через стадию образования белка-предшественника, состоящего из 166 аминокислотных остатков [620a]. В предшественнике после *N*-концевой сигнальной последовательности, состоящей из 19 аминокислотных остатков, следует последовательность [8-аргинин]вазопрессина. Затем следует остаток глицина, который при ферментативном отщеплении дает *C*-концевую амидную группу вазопрессина. Далее после пары основных аминокислот следует последовательность нейрофизина II, состоящего из 95 аминокислотных остатков, и затем после следующего остатка аргинина — 39-членный гликополипептид.

Структура окситоцина была установлена в 1953 г. дю Виньо с сотр. и независимо от него Таппи с сотр.



В то время как в гипофизе свиньи присутствует [Lys⁸]вазопрессин, у теленка и других млекопитающих найден [Arg⁸]вазопрессин:



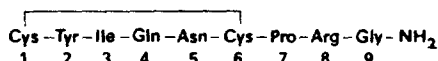
В противоположность этому окситоцин у всех млекопитающих идентичен.

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

Вазопрессин (антидиуретин, адиуретин) обладает антидиуретическим действием, т. е. вызывает обратное всасывание воды почками; под влиянием вазопрессина суточная первичная моча концентрируется (объем первичной мочи составляет 15 л, в то время как объем выделяемой организмом мочи только 1—1,5 л). В относительно больших дозах вазопрессин также повышает давление. Так как уже 2 нг этого гормона могут вызывать у человека заметный антидиуретический эффект, то по своему физиологическому действию и фармакологическим свойствам он принадлежит к

сильнодействующим веществам. При недостатке вазопрессина появляется картина болезни *Diabetes insipidus*, при которой ежедневно выделяется из-за недостаточного обратного всасывания до 20 л мочи. Вследствие близкого структурного родства с окситоцином вазопрессин проявляет слабую аффинность к окситоциновым рецепторам и тем самым некоторое окситоциноподобное действие. Обратный эффект, как уже отмечалось, наблюдается у окситоцина. Кроме того, вазопрессин физиологически участвует в процессах памяти [738].

С филогенетической стороны интересен вазотоцин, объединяющий в себе физиологическое действие как окситоцина, так и вазопрессина и могущий быть названным по этой причине гормоном-предшественником нейрогипофизарных гормонов:



Вазотоцин может быть рассмотрен как $[\text{Ile}^1, \text{Arg}^8]$ вазопрессин или как $[\text{Arg}^8]$ окситоцин. Он найден у низших позвоночных, у которых он ответствен за регуляцию водно-солевого обмена. Дифференциация на ряд окситоцина и ряд вазопрессина, начиная от вазотоцина, может быть объяснена постепенной мутацией генов после предшествовавшей дупликации.

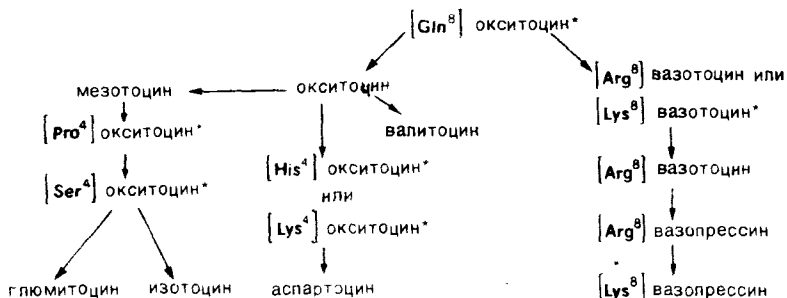
В нейрогипофизах различных классов позвоночных было показано существование 9 биологически активных пептидов (рис. 2-34).

Различные гормоны отличаются лишь замещением в положениях 3, 4 и 8. Применяя ЭВМ, Плишка [621] построил филогенетическое дерево нейро-

	H-Cys-Tyr-X-Y-Asn-Cys-Pro-Z-Gly-NH ₂			
	X	Y	Z	Источник
Окситоцин	Ile	Gln	Leu	Млекопитающие
$[\text{Arg}^8]$ вазопрессин	Phe	Gln	Arg	Млекопитающие
$[\text{Lys}^8]$ вазопрессин	Phe	Gln	Lys	Млекопитающие
Вазотоцин	Ile	Gln	Arg	Птицы, рептилии, амфибии, рыбы
Изотоцин	Ile	Ser	Ile	Костистые рыбы
Мезотоцин	Ile	Gln	Ile	Птицы, рептилии, амфибии, морские животные
Глумитоцин	Ile	Ser	Gln	Хрящевые рыбы (скаты)
Валитоцин	Ile	Gln	Val	Хрящевые рыбы (акулы)
Аспартоцин	Ile	Asn	Leu	Хрящевые рыбы (акулы)

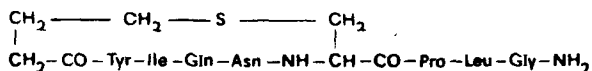
Рис. 2-34. Первичные структуры встречающихся в природе нейрогипофизарных гормонов.

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

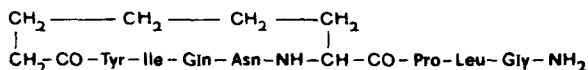


Уже через год после установления структуры окситоцина д-м Вино с сотр. [622] осуществил полный синтез этого гормона; таким образом, впервые был осуществлен химический синтез пептидного гормона. В 1955 г. по другой схеме синтез окситоцина был осуществлен группами Рудингера и Буассона. В последующее время были проведены различные усовершенствованные синтезы, имевшие целью получение как самого гормона, так и его аналогов.

Многие сотни аналогов нейрогипофизарного гормона были синтезированы для изучения связи между структурой и функцией. Цели таких исследований определяются различными мотивами: исследователей интересовали отдельные звенья эволюционного процесса, а также аналоги с улучшенными фармакологическими свойствами, как, например, аналоги с пролонгированным, раздельным действием и особенно аналоги со свойствами ингибиторов. Существенной для биологической активности является 20-членная кольцевая структура. Замещая один или оба атома дисульфидного мостика на CH_2 -группы, получают биологически активные карбоаналоги. Очень часто также удаляют α -аминогруппу, чем повышают уровень активности. Рудингер и Йошт синтезировали различные дезаминокарбоокситиновые аналоги:



двзаминокарбо¹-окситоцин



дезаминодикарбоокситоцин

Проверенная концепция была перенесена также на синтез вазопрессина и хорошо зарекомендовала себя при получении аналогов с различными фармакологическими свойствами. Особый интерес представляют аналоги с продолжительным раздельным действием на молочные железы или матку. Так, например, [2-О-метилтирозин]окситоцин проявляет специфическое действие на матку *in situ* (Рудингер, 1967 г.), в то время как дезамино-[4-глутамил- γ -метиловый эфир, карбо¹]окситоцин (Йошт и др.) действует преимущественно на молочные железы. Большой интерес вызывал синтезированный Маннингом [623] [Thr⁴]окситоцин, оказывающий более специфическое и более сильное действие, чем природный гормон. Повышенный биологический эффект в результате обычной замены аминокислоты без дальнейших структурных модификаций, как было сделано у многих активных аналогов, объясняется отличиями от имеющего место в случае природного окситоцина и еще не полностью интерпретируемым механизмом гормон-рецепторного взаимодействия. Этот феномен был назван «химической» мутацией.

Большие усилия были предприняты для того, чтобы найти корреляцию между химическими и биологическими свойствами нейрогипофизарных гормонов, а также их аналогов и их конформацией в растворах. Вальтер и сотр. [625] на основании исследований ЯМР-спектров [624] предложили «биологически активную конформацию» для окситоцина (рис. 2-35). Это пространственное расположение отличается от модели Урри — Вальтера [626] тем, что боковая цепь тирозина расположена над 20-членным кольцом. Правда, существуют некоторые признаки, позволяющие говорить не о единственной «биологически активной конформации». Скорее всего, один из конформеров, находящихся в равновесии, предпочтительно вступает во взаимо-

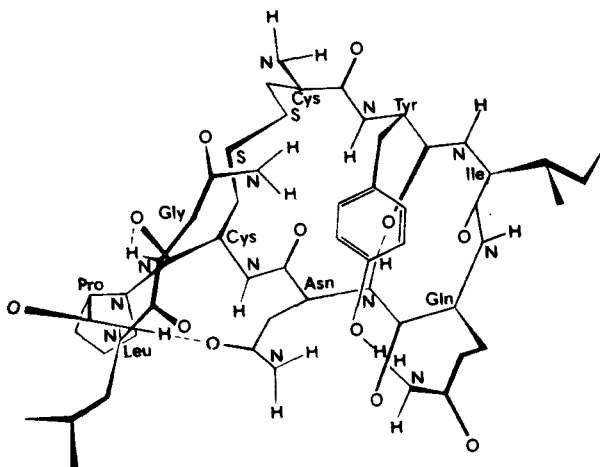


Рис. 2-35. Предположительная биологически активная конформация окситоцина [625].

действие с рецептором. На основе конформационных моделей Вальтер и сотр. [627] вывели определенные принципы для синтеза эффективных аналогов.

Практическое значение имеют также аналоги назопрессинового ряда с пролонгированной и отдельной вазопрессорной и антидиуретической активностью. Из большого числа синтетических аналогов следует выделить лишь некоторые. Высокоактивные аналоги особенно удобны для введения через нос, так как слизистая оболочка носа способна ограничено впитывать препарат.

Действие на почки производимого промышленностью 1-дезамино-[D-Arg⁸]вазопрессина увеличено в 400 раз по сравнению с природным вазопрессином, причем изменения давления крови практически не наблюдается. 1-Дезамино-[Val⁴, D-Arg⁸]назопрессин [628] — синтетическое производное, показавшее отношение между ураниями антидиуретической и прессорной активностей $> 125\,000$ (отношение соответствующих активностей для [Arg⁸]назопрессина равно единице) и вследствие этого имеющее применение при лечении формы диабета Diabetes insipidus. В то же время аналоги назопрессина со специфической прессорной активностью имеют значение в гинекологии для замены адреналина при местной анестезии. N^α-Gly-Gly[Lys⁸]назопрессин (глипрессин) *in vitro* обладает пролонгированным действием [631] и, как и [дез-Gly-NH₂⁹]вазопрессин, представляет практический интерес вследствие действия на центральную нервную систему. Значение нейрогипофизарных гормонов и некоторых их аналогов в связи с деятельностью центральной нервной системы обсуждается в разд. 2.3.3.

Большое внимание уделяется также синтезу специфических антагонистов. Так, в окситоциновом ряду заменой N-концевого цистеина на пеницилламин или β-меркапто-β,β-диметилпропионовую кислоту [629], а также определенными модификациями тирозина в положении 2 получают производные с ингибиторными к окситоциновым рецепторам свойствами. В качестве примера можно привести [o-иод-Тур²]окситоцин [630] или синтезированный Йоштом и др. N²-ацетил-[2-O-метил-Тур]окситоцин.

2.3.1.7. Гормоны гипоталамуса [632—638]

После рассмотрения нейрогормонов окситоцина и вазопрессина, образующихся в нейросекреторных клетках гипоталамуса, выглядит парадоксальным использование названия «гормоны гипоталамуса» для пептидных гормонов, образующихся в различных областях ядра гипоталамуса и действующих на переднюю долю гипофиза. Но за неимением удовлетворительного названия для этой группы гормонов гипоталамуса следует это разграничение сохранить, тем более что в специальной литературе окситоцин и назопрессин классифицируются как нейрогипофизарные гормоны.

Гипоталамус является частью промежуточного мозга и влияет на многие физиологические жизненно важные процессы в организмах млекопитающих. Он представляет собой важный преобразователь, в котором нервные импульсы трансформируются в гормональные сигналы и таким об-

разом осуществляется относительно быстрое приспособление внутрисекреторной системы к внешним изменениям. Существование гормонов гипоталамуса было постулировано Хинсеем, а также Грином и Харрисом (1937—1949 гг.). Многочисленные исследования за следующие двадцать лет привели к выводу, что существует семь освобождающих и три ингибирующих гормонов, которые в передней доле гипофиза либо вызывают выработку гормонов, либо его ингибируют. Согласно так называемой единой концепции, каждый гормон гипоталамуса всегда контролирует гормон аденогипофиза. Новые данные, полученные в 1969—1971 гг. привели к мнению, что как минимум в одном случае эта концепция нарушается. Выделение ЛГ и ФСГ индуцируется одним и тем же гормоном гипоталамуса. В табл. 2-14 приведены все известные к настоящему времени гормоны гипоталамуса.

В соответствии с рекомендациями комиссии IUPAC—IUB по биохимической номенклатуре [639] следует называть рилизинг-факторы *либеридами*, а гормоны, ингибирующие выделение, — *статинами*. Рассматривая функциональное многообразие некоторых гормонов гипоталамуса, как, например, соматостатина (гормон гипоталамуса, тканевый гормон в желудочно-кишечном тракте и нейротрансмиттер в центральной нервной системе), сталкиваются с проблемой названия. Кроме того, не решена проблема названия всей группы гормонов. Нужно выждать, окажется ли более жизнеспособным название *цибернины*, предложенное Гийеменом, или предпочтение будет отдано обобщенному названию *гипофизотропные гормоны*.

Гормоны гипоталамуса образуются в определенных центральных областях гипоталамуса, следуют в *Eminentia mediana* и оттуда в систему воротной вены гипофиза. Обсуждается вопрос о *нерибосомной* системе синтеза

Таблица 2-14. Гормоны, обладающие подавляющим действием, и либерины из гипоталамуса

Гормон	Принятое в англосаксонской литературе сокращение	Название согласно номенклатуре IUPAC—IUB
Гормон, ингибирующий выделение пролактина	PIH	Пролактостатин
Гормон, ингибирующий выделение соматотропина	SIH	Соматостатин
Гормон, ингибирующий выделение меланотропина	MIH	Меланостатин
Рилизинг-фактор тиреотропина	TRH	Тиреолиберин
Рилизинг-фактор гонадотропина	GRH	Гонадолиберин
Рилизинг-фактор ЛГ	LRH	Люлиберин
Рилизинг-фактор ФСГ	FSH-RH	Фоллиберин
Рилизинг-фактор кортикотропина	CRH	Кортиколиберин
Рилизинг-фактор пролактина	PRH	Пролактолиберин
Рилизинг-фактор соматотропина	SRH	Соматолиберин
Рилизинг-фактор меланотропина	MRH	Меланолиберин

этих веществ, но, вероятно, эта точка зрения не будет принята в дальнейшем, так как до сих пор известные гормоны гипоталамуса не имеют каких-либо необычных структурных особенностей (ω -пептидная связь, D-аминокислоты, N-метиламинокислоты и др.). Предположение об образовании из прогормона, напротив, не выглядит ошибочным. В передней доли гипофиза путем гормон-рецепторного взаимодействия на рецепторах клеточных мембран, и затем через аденилатциклазную систему они стимулируют

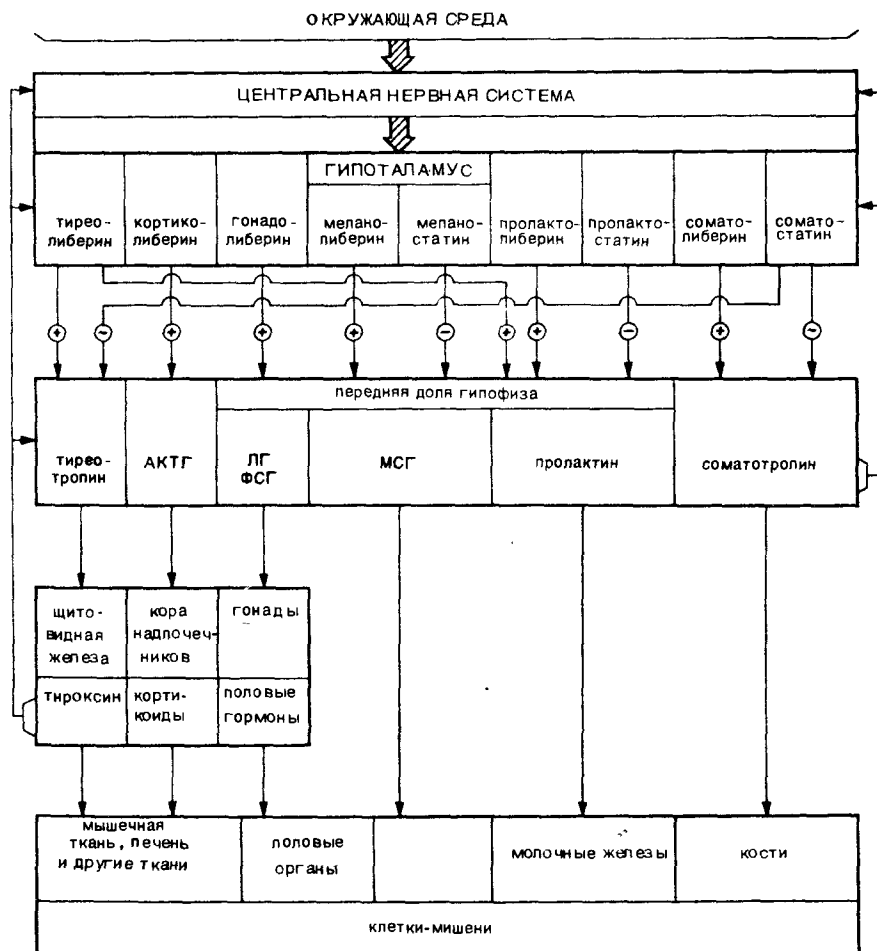


Рис. 2-36. Регуляция передней доли гипофиза гормонами гипоталамуса и действие гонадотропных гормонов [638].

ют выделение гормонов, действующих на секреторные железы. Затем следует быстрая их инактивация и разрушение находящимися вблизи протеолитическими ферментами. За регуляцию обмена гормональных веществ в гипоталамусе ответственна исключительно тонко настроенная гормональная и нервная система, состоящая из сети прямых и обратных связей между высшими мозговыми центрами, гипоталамусом, гипофизом и эндокринными железами. На рис. 2-36 представлены в упрощенной форме регуляция передней доли гипофиза и действие гормонов гипоталамуса, включая цепи обратной связи.

Гормоны гипоталамуса — в высшей степени активные химические соединения. Лишь с развитием радиоиммунного метода определения их содержания стало возможным продвигаться в этой новой области биологически активных пептидов. Небезынтересно упомянуть, что уже 1 нг тиреолиберина оказывает биологическое действие на мышцу, а на изолированном гипофизе исследование этого либерина проводится в пикограммной области. Практическое значение гормонов гипоталамуса следует прежде всего искать в области диагностики для исследования функций гипофиза. Можно быть уверенным, что дальнейшие фундаментальные исследования в этой области откроют новые возможности терапевтического применения в медицине и ветеринарии.

После этих вводных замечаний о гормонах гипоталамуса, принимающих участие в регуляции аденогипофиза, следует еще раз настоятельно указать на то, что выбранное название «гормоны гипоталамуса» также не может быть удовлетворительным. Гипоталамус содержит и другие пептиды с высокой биологической активностью. Вещество Р и нейротензин — наиболее известные примеры, причем в будущем число обнаруженных в гипоталамусе пептидов несомненно будет больше.

Литература о биохимии и физиологии гормонов гипоталамуса весьма обширна, поэтому для более детальной информации следует прежде всего ознакомиться с обзорными работами по этому вопросу [632—638].

2.3.1.7.1. Тиреолиберин

Выделение и установление структуры тиреолиберина (рилизинг-фактор тиреотропина) демонстрирует те трудности, с которыми приходится сталкиваться при работе с гормонами гипоталамуса. Во-первых, эти гормоны образуются в гипоталамусе в нанограммовых количествах, и, во-вторых, масса гипоталамуса свиньи всего 500 мг, поэтому уже правильное взятие крошечных кусочков ткани (около 300 000 гипоталамусов), необходимых для структурных исследований, представляет проблему.

Высокие требования должны предъявляться к разработке и повышению чувствительности как тестовых систем *in vitro* или *in vivo* для биологического контроля процесса выделения, так и методов установления строения полученного в результате весьма незначительного количества чистого вещества. В результате многолетней работы группам Шалли [640] и Гиймена [641] удалось наконец выделить чистый тиреолиберин из тканей гипоталамуса свиньи и овцы соответственно. Последовательные стадии процесса выделения приведены в табл. 2-15.

Таблица 2-15. Стадии очистки при выделении тиреолиберина [642]

Исходный материал (лиофилизированная ткань, ~ 300 000 гипоталамусов овцы, 25 кг)

Стадии очистки	Масса биологически активного материала	Активность тиреолиберина, ед./мг
Экстракция (спирт/хлороформ)	294 г	1
Ультрафильтрация	71 г	3
Разделение на сефадексе G-25 (2 раза)	16 г	16
Распределительная хроматография (2 раза)	246 мг	800
Адсорбционная хроматография (2 раза)	4,2 мг	30 500
Распределительная хроматография	2,0 мг	58 500
Распределительная хроматография	1,0 мг	57 000

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



С 1969 г. описано большое число синтезов тиреолиберинов; число его аналогов, синтезированных для изучения взаимосвязи структуры и функции, превышает 100. Почти все полученные аналоги имеют незначительную по сравнению с нативным гормоном биологическую активность. Более высокую активность (800% активности природного гормона) имеет Me-His²-тиреолиберин [643].

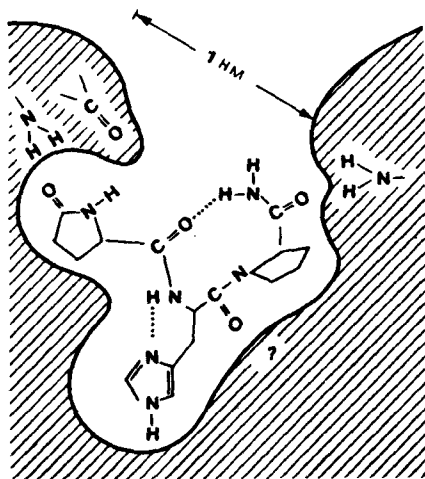


Рис. 2-37. Схема взаимодействия тиреолиберина с рецептором [644].

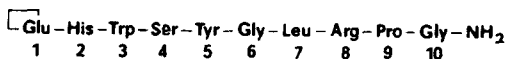
Тиреолиберин регулирует в аденогипофизе синтез и секрецию тиреотропина — гормона, стимулирующего щитовидную железу (рис. 2-36). Вероятно, ему также свойствен эффект стимулирующий выделения пролактина (окончательно в этом вопросе еще нет ясности). Исследование конформации и данные о биологической активности синтетических аналогов тиреолиберина позволили Петерсону и Гийемени [644] предложить трехмерную модель взаимодействия гормона с рецептором (рис. 2-37).

Тиреолиберин нетоксичен, он может быть введен внутривенно, внутримышечно, а также путем приема внутрь. Его применяют при диагностике и терапии заболеваний щитовидной железы. Наблюдаемое антидепрессивное действие на человеческий организм еще окончательно не объяснено. Кроме того, выявляются и другие области применения тиреолиберина в медицине. Вероятно, созданием подходящих аналогов удастся достичь избирательного действия гормона.

2.3.1.7.2. Гонадолиберин (рилизинг-фактор гонадотропина) [647]

Рилизинг-фактор гонадотропина удалось впервые (1971 г.) выделить из гипоталамуса свиньи и овцы группе Шалли [645], а тремя годами позднее также группе Гийемени [646]. Гонадолиберин рассматривается как исключение из так называемой единой концепции, поскольку он вызывает выделение как лютеинизирующего гормона (ЛГ), так и фолликулостимулирующего гормона (ФСГ). Антитела к синтетическому гормону одновременно тормозят выделение ЛГ и ФСГ. Но поиски второго гормона, стимулирующего выделение ЛГ и ФСГ, все-таки продолжаются.

По данным группы Шалли [648], занимавшейся установлением первичной структуры, гонадолиберин имеет следующую последовательность:



К настоящему времени описаны различные варианты синтеза этого либерида, причем приведенный амид декапептида может быть относительно легко синтезирован на твердой фазе. Уже синтезировано очень большое число его аналогов. Исследованием взаимосвязи структуры и функции ищутся получить представление о гормон-рецепторном взаимодействии и затем понять механизм связывания гормона с рецептором и проявления биологического эффекта. Кроме того, для разработки препаратов с пролонгированным действием интересны антагонисты гонадолиберина. Все еще не решенный вопрос о существовании, в соответствии с единой концепцией, двух различных гонадолиберинов мог бы получить более детальное объяснение в результате таких исследований. Повышение биологической активности показывают [D-Ala⁶MeLeu⁷,Des-Gly-NH₂¹⁰, Pro-этиламид⁹]гонадолиберин, [Phe⁵,D-Ala⁶,Des-Gly-NH₂¹⁰,Pro-этиламид⁹]гонадолиберин, [D-Ser⁴,D-Leu⁴,дез-Gly-NH₂¹⁰,Pro-этиламид⁹]гонадолиберин и др., причем последний аналог обнаруживает пролонгированное действие и, кроме того, может быть введен парентерально, путем приема внутрь или через нос. Полезными ингибиторными свойствами обладает [дез-His²,D-Ala⁶]гонадолиберин [649].

Гонадолиберин и его аналоги применяют при диагностике и терапии бесплодия у мужчин и женщин.

2.3.1.7.3. Кортиколиберин

В качестве кортиколиберина принимается 41-членный пептид амунии, который, так же как 41-членный пептид уротексин или 40-членный пептид саувагин, как *in vivo*,

так и *in vitro* дает кортикотропин и β -эндорфин. Между этими тремя пептидами существует отчетливое сходство в первичной структуре.

2.3.1.7.4. Пролактолиберин и пролактостатин (рилизинг-фактор пролактина и гормон, ингибирующий выделение пролактина) [650]

Эти гормоны регулируют образование и выделение пролактина в передней доле гипофиза. Несмотря на множество частично противоречащих друг другу данных, ясных представлений о структуре обоих постулированных гормонов пока нет, но предполагается, что аналогично известным либерином они также могут быть пептидными гормонами или нейротрансмиттерами.

Исходя из различных данных о том, что тиреолиберин стимулирует путем повышения выделения пролактина секрецию молока у животных и человека, была постулирована идентичность тиреолиберина и пролактолиберина [652], но доказательства для этого еще должны быть получены. Вероятно, обнаружится структурное подобие между тиреолиберином и до сих пор еще не известным пролактолиберином.

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

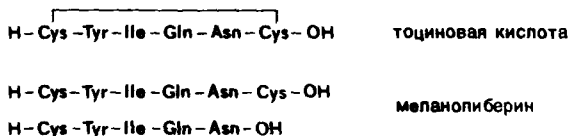
Хотя физиологическая роль МСГ у человека еще неясна, интересен механизм регуляции его выделения в аденогипофизе. В качестве меланостатина были предложены пептиды, в значительной степени происходящие из окситоцина:

Меланостатин I H-Pro-Leu-Gly-NH₂

Меланостатин II H-Pro-His-Phe-Arg-Gly-NH₂

Меланостатин I [653, 654] образуется из окситоцина при ферментативном отщеплении С-концевого амида тетрапептида. Вальтером [655] было доказано существование соответствующей пептидазы, связанной с мембранами в *Eminentia mediana* гипоталамуса. Этим впервые было показано, что определенный гормон (окситоцин) может функционировать как предшественник нового гормона (меланостатина). Из «прогормона второго порядка» окситоцина образуется гормон с совершенно другим биологическим действием. Эта концепция была перенесена и на другие примеры [656]. Меланостатину II приведенной структуры, по-видимому, будет придаваться малое значение.

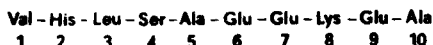
О меланолиберине известно намного меньше. Предположительно это открытое кольцо тоциновой кислоты или соответствующий пептапептид:



Фермент, образующий меланолиберин из окситоцина, был обнаружен в митохондриях *Eminentia mediana* и тканях гипоталамуса группой Вальтера. Но, несмотря на этот факт, общая проблематика регуляции выделения МСГ остается сложной, и факты трудно интерпретируемы. Меланостатин I рекомендован к применению при болезни Паркинсона.

2.3.1.7.6. Соматолиберин (рилизинг-фактор соматотропина)

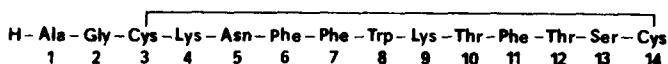
В 1969 г. Шалли и сотр. [657] из гипоталамуса свиньи выделили декапептид следующей структуры:



Он обнаруживает поразительное сходство с N-концевым участком β -цепи гемоглобина свиньи. Хотя выделенный природный пептид и пептид, синтезированный Вебером, как *in vitro*, так и *in vivo* стимулируют выделение соматотропного гормона, радиоиммунный тест дал отрицательный результат. Структура подлинного соматолиберина, вероятно, еще не установлена.

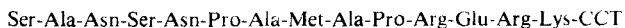
2.3.1.7.7. Соматостатин (гормон, ингибирующий выделение соматотропина) [658, 659]

В экспериментах по хроматографической очистке соматолиберина Гийемен обнаружил фракцию, показавшую ингибирующий эффект на секрецию СТГ. Этот поразительный факт привел к выделению чистого соматостатина. Для работы потребовалось использовать 490 000 лиофилизированных гипоталамусов овцы суммарной массой 36,8 кг. После 8 стадий очистки удалось выделить 8,5 мг чистого соматостатина, который, как было показано установлением первичной структуры, подтвержденной затем синтезом, является гетеродетным циклическим тетрадекапептидом [660]:



Тремя годами позднее Шалли и сотр. [661] описали выделение аналогичного гормона из гипоталамуса свиньи.

В 1978 г. из желудочно-кишечного тракта Прадайролом и в 1980 г. из гипоталамуса Гийеменом и Шалли был выделен так называемый *соматостатин-28* — прогормон соматостатина. В 1981 г. Вюнш подтвердил полиым синтезом его структуру:



Биосинтез проходит через стадию образования препросоматостатина, состоящего из 121 аминокислотного остатка, в котором последовательность соматостатина является C-концевой [661a].

Соматостатин присутствует не только в гипоталамусе, но также и вне его, в центральной нервной системе и, кроме того, в желудочно-кишечном тракте и поджелудочной железе. Он не только тормозит выделение соматотропного гормона, но и влияет на выделение инсулина и его партнера — глюкагона и тем самым играет

важную роль в обмене углеводов. В аденогипофизе выделение соматотропина тормозится соматостатином как *in vitro*, так и *in vivo* и независимо от того, как была вызвана секреция. Он вмешивается также в регуляцию тиреотропной системы и действует при этом как антагонист тиреолиберина. В экспериментах *in vitro* соматостатин ингибирует секрецию пролактина, хотя известны и противоположные результаты. Нет никаких указаний на то, что гормон влияет на выделение МСГ. Секреция АКТГ и гонадотропина соматостатином не подавляется. Соматостатин наряду с тиреолиберинном обнаружен также в нейрогипофизе, где, вероятно, стимулирует выделение $[Arg^8]$ вазопрессина. Аналогично тиреолиберину, гонадолиберину и меланостатину I соматостатин действует вне гипоталамуса в качестве нейротрансмиттера и, вероятно, в качестве партнера тиреолиберина. Кроме того, соматостатин модулирует нейронную активность в центральной нервной системе. В желудке соматостатин вызывает снижение секреции гастрина, пепсина, соляной кислоты и, кроме того, замедляет моторику и кровоснабжение желудка, в то же время в тонкой кишке ингибируется выделение секретина и холецистокининапанкреозимина. Обнаружение соматостатина в D-клетках островков Лангерганса поджелудочной железы вызывает особый интерес в связи с влиянием на секрецию инсулина и глюкагона в B- или A-клетках. Большое значение имеет применение соматостатина для диагностики и терапии, причем кроме лечения диабета возможно также его применение при других заболеваниях, например при акромегалии (стр. 244), панкреатите, синдроме Цоллингера — Эллисона, при желудочных кровотечениях и др.

Таблица 2-16. Биологическая активность некоторых аналогов соматостатина (подавление секреции инсулина, глюкагона и соматотропина; активность соматостатина принята за 100%) [658]

Соматостатин и его производные	Активность (%) в отношении		
	инсу- лина	глюка- гона	сомато- тропи- на
Соматостатин	100	100	100
$[D-Trp^8]$ соматостатин	821	639	800
$[дез-Asn^5]$ соматостатин	10	1	4
$[дез-Ser^{13}]$ соматостатин	4	1	10
$[дез-Asn^5, D-Trp^8]$ соматостатин	60	1	13
$[дез-Asn^5, D-Ser^{13}]$ соматостатин	481	1	1
$[D-Trp^8, D-Ser^{13}]$ соматостатин	261	1	70
$[дез-Asn^5, D-Trp^8, D-Ser^{13}]$ соматостатин	1753	100	13
$[дез-AK^{1,2,4,13}, D-Trp^8]$ соматостатин	75	8	8
$[дез-AK^{1,2,4,12,13}, D-Trp^8]$ соматостатин	72	1	1
$[дез-AK^{1,2,4,5,13}, D-Trp^8]$ соматостатин	36	7	25
$[дез-AK^{1,2,4,5,12}, D-Trp^8]$ соматостатин	70	21	—
$[дез-AK^{1,2,4,5,12,13}, D-Trp^8]$ соматостатин	45	7	9

АК — аминокислотный остаток.

Широта биологического эффекта ограничивает применение соматостатина в медицине. Практическое значение имеют синтетические производные природного гормона с целенаправленным действием и аналоги соматостатина, действующие при приеме внутрь. По имеющимся в настоящее время данным, соматостатин оказывает заметное побочное действие.

Структурно-функциональные исследования соматостатина показали, что N-концевой дипептид, вероятно, не имеет существенного значения для биологического действия. Соматостатин с заменой на D-Trp в восьмом положении обладает в восемь раз более высокой биологической активностью по сравнению с нативным гормоном. Чрезвычайно сильный интерес к аналогам с пролонгированным действием (время полураспада природного гормона в организме составляет лишь несколько

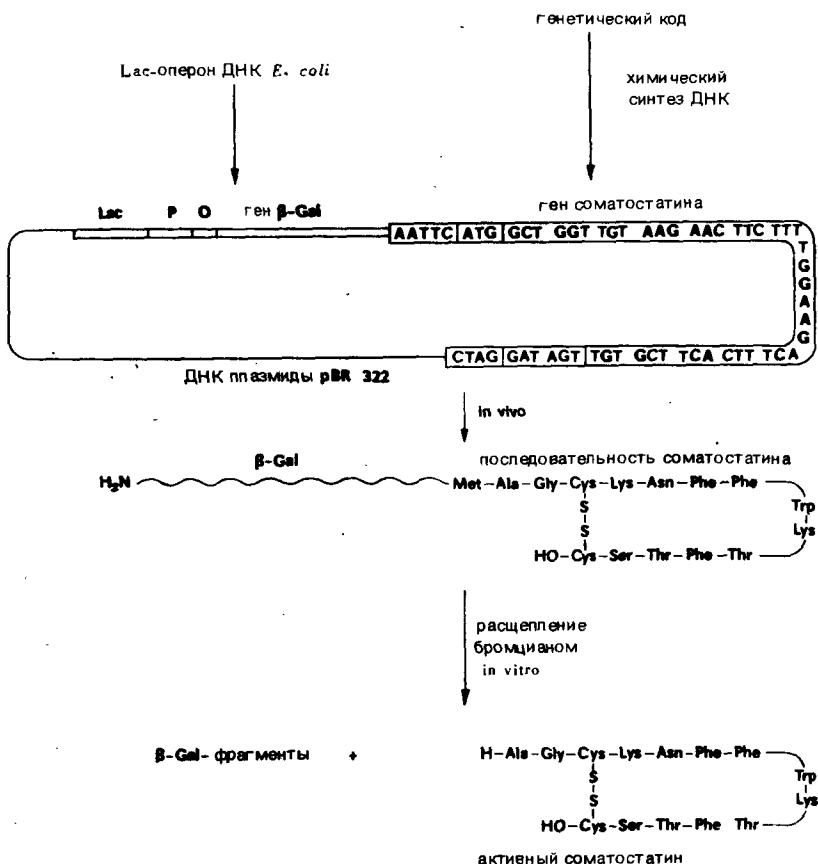


Рис. 2-38. Схема синтеза соматостатина соединением полностью синтетического гена с β -галактозидазным геном в плазмиде pBR 322 *E. coli* [666].

минут) и узконаправленной специфичностью объясняет то, что к настоящему времени синтезировано огромное количество производных соматостатина [662—664]. Относительно аналогов избирательного действия уже получены первые обнадеживающие результаты (табл. 2-16).

Особенно следует отметить результаты группы Вебера [663], проводящей систематические исследования с целью повышения метаболической стабильности соматостатина. Особенно действенными оказались циклические аналоги с укороченной цепью. В связи с избирательностью действия следует упомянуть синтетические аналоги, селективно ингибирующие секрецию гормона роста, гормона роста и глюкагона или гормона роста и инсулина, как, например, синтезированный Гарски [D-Trp^{5,8}]соматостатин [665].

На примере соматостатина впервые был проведен синтез биологически активного пептида с помощью химически синтезированного гена [666]. Синтетический ген соматостатина удалось соединить с β -галактозидазным геном *E.coli* в плазмиде pBR 322. Затем этот ген включился в бактерию. С участием химерной ДНК плазмиды осуществлялся биосинтез полипептида, содержащего последовательность соматостатина. Затем *in vitro* с помощью бромциана от большого химерного полипептида селективно отщеплялся биологически активный соматостатин (рис. 2-38).

Эксперименты по переносу синтетического гена в бактериальную хромосому открывают новую возможность для синтеза биологически активных пептидов.

2.3.1.8. Инсулин [667—670]

Полипептидный гормон инсулин образуется в В-клетках островков Лангерганса. Физиологически недостаточность гормона проявляется в повышенном содержании глюкозы в крови (гипергликемия). Нормальное содержание глюкозы в крови человека ~ 100 мг-% (100 мг/100 мл), у жвачных животных ~ 50 мг-%, у птиц ~ 200 мг-%. Инсулин снижает содержание сахара в крови. В общем инсулин повышает проницаемость клеток для глюкозы, а также для аминокислот, липидов и ионов калия. Инсулин влияет как на активацию гликогенсинтетазы, так и на индукцию глюкокиназы и фосфофруктокиназы. Он стимулирует синтез гликогена и белков. Кроме снижения липолиза ингибируется образование пируваткарбоксилазы и фруктозодифосфатазы. Удовлетворительная интерпретация такого многостороннего действия на молекулярном уровне в настоящее время еще невозможна. Типичным симптомом инсулиновой недостаточности является развитие диабета *Diabetes mellitus*, о происхождении которого известно относительно мало. Эта болезнь объясняется понижением функции В-клеток, причина которого лежит на генетическом уровне. В основе другой формы диабета *juvenile Diabetes* лежит вирусное заболевание. Известная также редкая форма диабета, при которой в организме присутствует достаточное количество или даже избыток инсулина. В этом случае, очевидно, блокируется необходимое для действия инсулина гормон-рецепторное взаимодействие. Невыясненная проблема диабета требует напряженных усилий исследователей, как медиков, так и фармакологов, тем более что в связи с повышающимся уровнем жизни и связанным с этим переселением и малой подвижностью отмечается повышение частотности заболеваемости. Благодаря современной терапии продолжительность жизни больных диабетом увели-

чивается, однако приобретает все большее значение вопрос более поздних нарушений (ангио- и ретинопатии).

Инсулин открыт в 1921 г. Бантингом (лауреат Нобелевской премии 1923 г.) и др. как гормон поджелудочной железы, уменьшающий гипергликемию при диабете. Очистка и кристаллизация проведены в 1926 г. Абе-лем, а в 1955 г. Сенгер опубликовал полную структуру инсулина. (Это выдающееся достижение в 1958 г. также было отмечено Нобелевской премией.) И наконец, в 1969 г. лауреат Нобелевской премии Кроуфут-Ходжкин с помощью рентгеноструктурного анализа установила пространственную структуру молекулы инсулина (рис. 2-42).

Инсулин состоит из двух полипептидных цепей (А-цепи и В-цепи) по 21 и 30 аминокислотных остатков соответственно, соединенных двумя дисульфидными мостиками в бициклическую систему. Кроме того, А-цепь имеет собственный дисульфидный мостик (рис. 2-40). Интересно, что инсулины из разных организмов, несмотря на различные аминокислотные последовательности, в стандартных тестах (спазмолитический тест на мышцах, окисление глюкозы в жировых тканях или в отдельных жировых клетках) показывают примерно равную биологическую активность. Так, инсулин морских свинок отличается от инсулина крысы не менее чем в 17 положениях. Обычно отличия в первичной структуре велики настолько, насколько далеко отстоят организмы друг от друга в филогенетическом развитии.

По молекулярной массе (~6000) и числу аминокислотных остатков в цепи инсулина формально можно отнести к полипептидам. Но зависящая от условий агрегация в димеры и гексамеры (с двумя координационно связанными атомами цинка), наблюдаемая в кристаллах, оправдывает отнесение инсулина к белкам. Далее следует упомянуть тенденцию к комплексообразованию с низкомолекулярными и высокомолекулярными лигандами. Так, например, терапевтическое значение имеет комплекс инсулина с цинком и протамином.

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

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

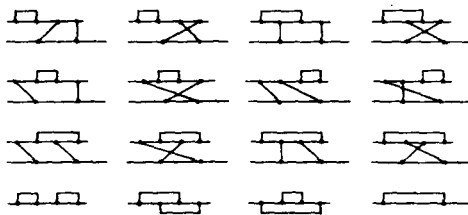


Рис. 2-39. Схема образования изомеров инсулина и мономерных А- и В-цепей с замкнутыми дисульфидными связями (по Цану).

работы достигли цели. Все три группы выбрали стратегическую концепцию раздельного построения цепей и затем статистического окисления в биологически активный инсулин. Сомнения в возможности получения инсулина этим путем были рассеяны работой Диксона и Вардлоу. Ими было проведено совместное окисление восстановленных А- и В-цепей природного инсулина и в результате получен продукт с 1—2%-ной инсулиновой активностью. Имея в виду, что в этих условиях может образоваться кроме 12 изомеров инсулина еще 4 мономера А- и В-цепей с внутренними дисульфидными мостиками и значительное число полимеров (рис. 2-39), результат можно считать обнадеживающим.

Используя улучшенную комбинированную методику (50%-ный избыток А-цепи, рН 10,6), был получен [671] продукт, имеющий 10—20% инсулиновой активности, и выделен инсулин в кристаллическом виде. Выбранные Цаном стратегическая и тактическая концепции для первого синтеза инсулина показаны на рис. 2-40. Схемы синтеза, использованные американскими и китайскими учеными, отличаются лишь в методических деталях.

Уже в середине 1963 г. Кацюянису с сотр. удалось закончить полный синтез А-цепи инсулина овцы, давшей при окислении с природной В-цепью по Диксону продукт с содержанием инсулина 0,26%. В том же году группа Цана [672] описала полный синтез обеих цепей инсулина с результирующей активностью ~1%. Полный выход защищенной А-цепи составил 2,9%, а В-цепи — 7%, причем синтез А-цепи включал 89, а В-цепи 132 стадии. К этому необходимо добавить 3 стадии конденсации.

В 1964 г. полный синтез обеих цепей опубликован также Кацюянисом с сотр. [673], и в 1965 г. группа Ванга закончила синтез инсулина телянка [674], причем в последнем случае был впервые получен, исходя из синтетических цепей, кристаллический инсулин, совпадающий с природным продуктом по всем свойствам. В последующее время были проведены более эффективные синтезы цепей и удалось повысить выходы при их сочетании [669].

Новый стратегический вариант синтеза инсулина появился как следствие открытия Штайнером [675] в 1967 г. проинсулина. При этом обнаружено, что биосинтез инсулина идет через одноцепочечный предшественник. В од-

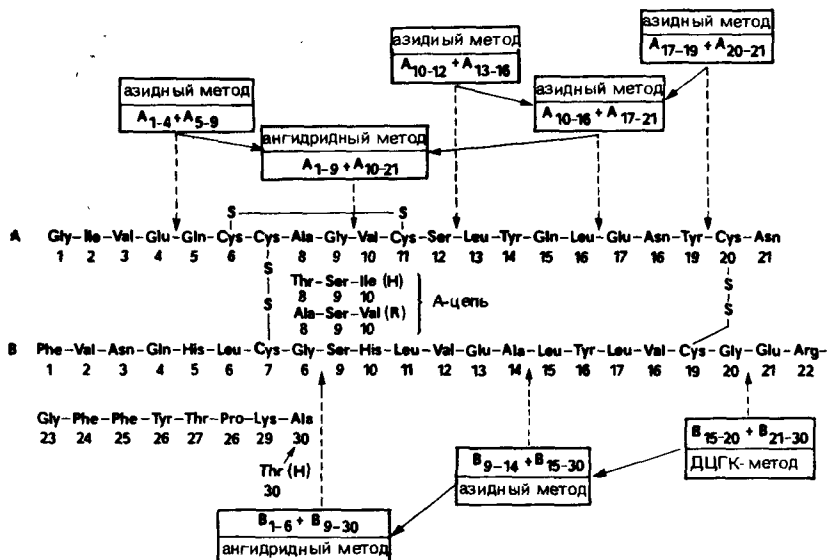


Рис. 2-40. Стратегия синтеза инсулина овцы по Цану [672]. Инсулины человека (H) и телянка (R) отличаются от инсулина овцы участком 8 — 10 А-цепи. Кроме того, инсулин человека имеет отличие в положении В-30.

нопочечном пептиде благодаря подходящему пространственному расположению возможно оптимальное замыкание дисульфидных мостиков. Восстановлением дисульфидных связей и их последующим реокислением был получен проинсулин с ~ 70%-ным выходом. На рис. 2-41 приведена первичная структура проинсулина свиньи, состоящего из 84 аминокислот. Однако первичный продукт биосинтеза инсулина не проинсулин, а *препроинсулин* [676]. В процессе биосинтеза на первом этапе образуется фрагмент, содержащий в соответствии с так называемой сигнальной гипотезой (разд. 3.7.3) N-концевую сигнальную последовательность с информацией о том, что последующая последовательность проинсулина строится прямо на мембране эндоплазматического ретикула и что этот инсулиновый предшественник уже в процессе синтеза должен уходить через мембрану по внутренним каналам ЭР. Еще во время биосинтеза сигнальный пептид отщепляется особой «сигнальной» пептидазой. Проинсулин затем идет в аппарат Гольджи, где расщепляется на инсулин и С-пептид и в кристаллической форме в присутствии цинка накапливается в везикулах. При соответствующем физиологическом раздражении происходит экзоцитоз и содержимое везикул попадает в кровь.

Длина С-цепи неодинакова в различных организмах (у человека 35, свиньи 33 и телянка 30 аминокислотных остатков), кроме того, существуют значительные различия в аминокислотной последовательности, являющие-

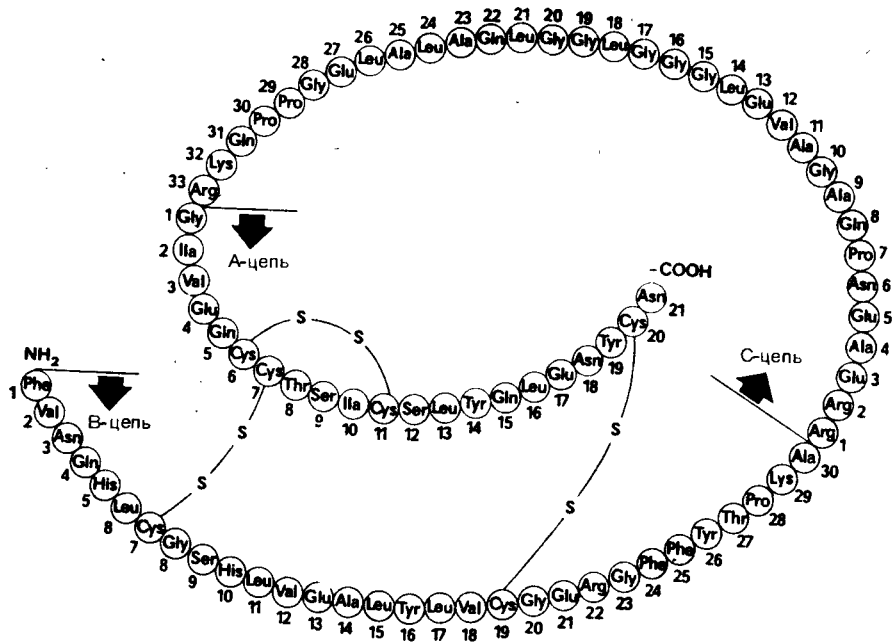


Рис. 2-41. Первичная структура проинсулина свиньи [675].

ся причиной иммуногенных свойств препаратов инсулина, содержащих обычно в незначительном количестве проинсулин.

Полный синтез человеческого проинсулина (86 аминокислотных остатков) описан в 1977 г. Янаихара с сотр. [677], а также начат Цаном [678]:



Не говоря о том, что этот подход сам по себе является заслуживающей внимания научной задачей, такой путь синтеза применим для производства гормона поджелудочной железы инсулина в больших масштабах.

Интересный новый подход к синтезу инсулина вытекает из его пространственной структуры (рис. 2-42). Модель молекулы инсулина можно расположить в пространстве таким образом, что N-конец А-цепи и С-конец В-цепи, т. е. места соединения с С-фрагментом, находятся друг от друга на расстоянии ~ 1 нм. Можно подобрать сшивающий реагент, который формально может взять на себя функцию С-цепи и фиксировать конформацию

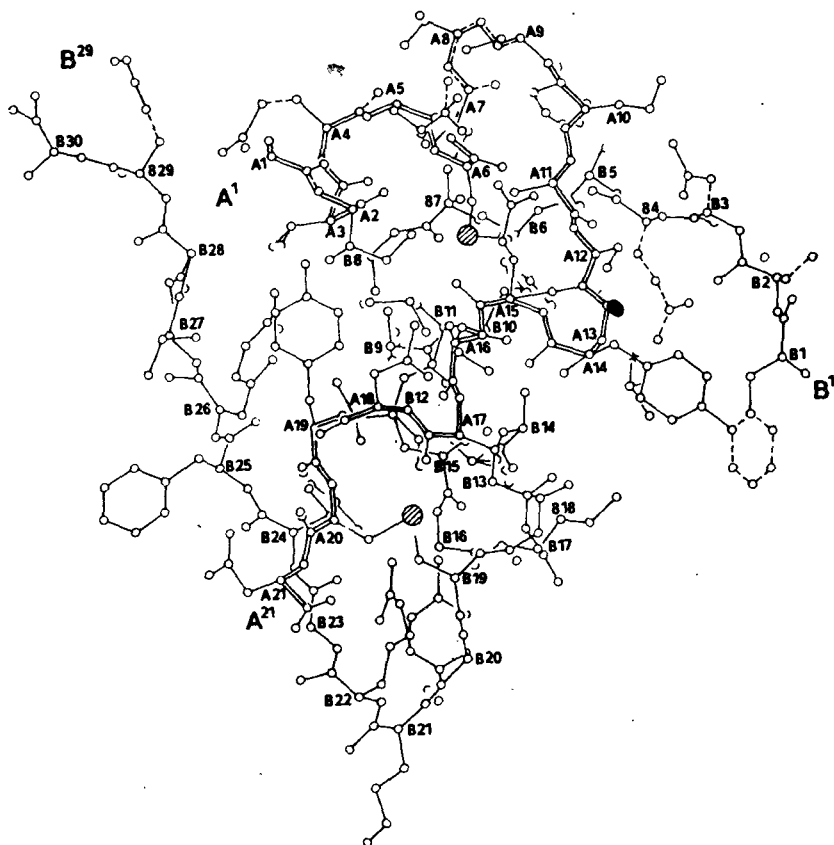


Рис. 2-42. Трехмерная модель мономера инсулина [679].

А- и В-цепей, необходимую для правильного образования дисульфидных мостиков. Систематическими исследованиями по рекомбинации сшитых А- и В-цепей занимались преимущественно Линдсей, Бранденбург и Цан, а также группа Гейгера. Причем использованием сшивающего реагента была продемонстрирована принципиальная возможность синтеза инсулина по такому пути (рис. 2-43).

Однозначное доказательство первичной структуры инсулина, предложенной Сенгером, может быть получено лишь в том случае, когда дисульфидные мостики замыкаются однозначным образом в процессе химического синтеза и дисульфидный обмен исключен. После предварительной работы, проведенной Зервасом и Фотаки, а также Хиски с сотр., это удалось в 1974 г. группе Риттеля [495], осуществившей по этому пути синтез инсулина человека. Исходя из описанного в 1973 г. этой группой цистинового пеп-

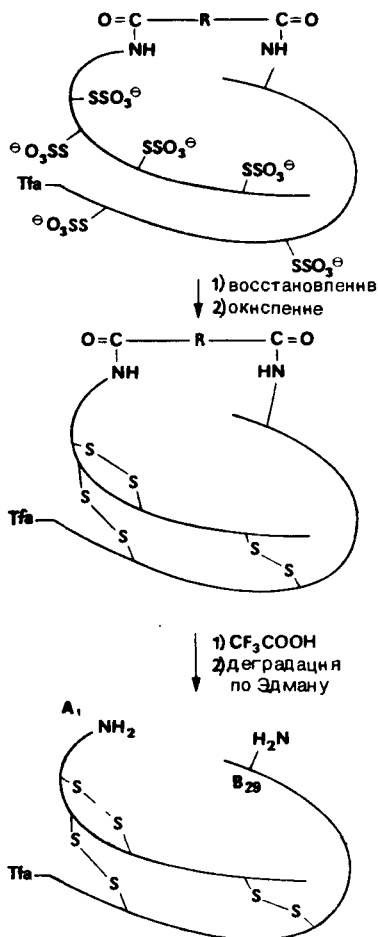
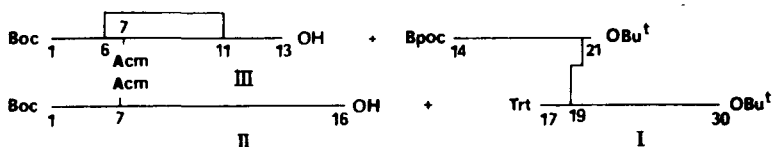


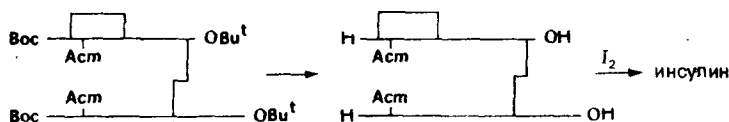
Рис. 2-43. Рекombинация цепей инсулина с применением сшивающих реагентов [680].

тида A(20—21)-B(17—20) после присоединения к участку A-цепи Врос-A(14—19)-ОН и соответственно к участку В-цепи Н-B(21—30)-ОBu^t был получен большой асимметричный цистиновый сегмент I с дисульфидной связью между A²⁰ и B¹⁹:



Данная концепция синтеза предъявляет экстремально высокие требования к селективности защитных групп, причем должны были быть выработаны условия отщепления тритильной группы в присутствии в высшей степени кислотолабильной Врос-группы. Подходящим оказался ацидолиз тритильного остатка в трифторэтаноле как растворителе при контроле pH. Затем сегмент II был сконденсирован с помощью ДЦГК/NOBt с частично защищенным сегментом I. Затем после селективного удаления Врос-группы последовала конденсация с сегментом III, синтез которого также был сопряжен со значительными трудностями. Замыкание внутреннего дисульфидного мостика $A^6 - A^{11}$ окислением иодом, исходя из соответствующих S-тримитилстеиновых остатков, требовало условий, в которых чувствительная к иодолизу S-Асм-группа не затрагивается.

После отщепления N- и C-концевых, а также боковых защитных групп *трет*-бутильного типа была замкнута дисульфидная связь $A^7 - B^7$ окислением иодом и инсулин был очищен методом противоточного распределения:



В этом синтезе не было обнаружено нежелательного процесса дисульфидного обмена. Выход в расчете на чистый человеческий инсулин составил ~50%. Наряду с этим было выделено ~25% [D-Тур-В¹⁶]инсулина, что объясняется сильной рацемизацией при конденсации сегментов I и II по методу Гейгера — Кёнига. При исключении или снижении рацемизации в будущем может быть достигнуто дальнейшее повышение выхода при циклизации.

В заключение следует упомянуть, что для исследования взаимосвязи между структурой и биологическим действием было проведено значительное число синтезов цепей инсулина с различными последовательностями. После комбинирования таких аналогов с природными или синтетическими цепями определялся спектр их биологического действия. Так как природный инсулин относительно легко доступен, структурные изменения в молекуле могут быть проведены с помощью семисинтетических операций, причем такой частичный синтез возможен как исключительно химическим путем, так и с применением ферментативных методов. Подробности приведены в рекомендуемых обзорах. Поскольку инсулин, будучи макромолекулой, действует иммуногенно, для терапевтических целей очень важно, чтобы иммунный ответ в организме больных диабетом оставался на возможно низком уровне. Как правило, у большинства больных это так. В особых случаях применяют инсулин с измененными антигенными свойствами (имеется в виду инсулин из других видов и модифицированный инсулин с уменьшенными антигенными свойствами).

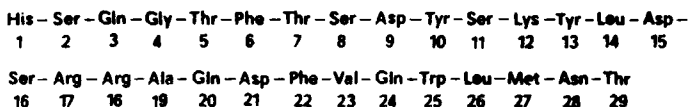
Для понимания всего комплекса структурно-функциональных взаимодействий на молекулярном уровне большое значение имеет изучение инсулиновых рецепторов [681]. В связи с этим следует напомнить об уже обсуждавшейся (разд. 2.3.1) возможности прямого входа инсулина в клетку, этим может быть лучше объяснено долговременное действие гормона.

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

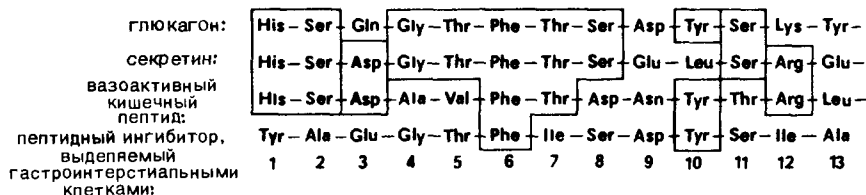
2.3.1.9. Глюкагон

Как и инсулин, глюкагон образуется в поджелудочной железе, но уже в А-клетках островков Лангерганса. Глюкагон, как и адреналин, является антагонистом инсулина и стимулирует гликогенолиз, повышая содержание сахара в крови. Кроме того, он обладает липолитическими свойствами. Действие протекает через аденилатциклазную систему. Глюкагон также увеличивает сокращение сердечной мышцы и повышает частоту ударов сердца.

Глюкагон — одноцепочечный пептид со следующей аминокислотной последовательностью (Броммер и др., 1956 г.):



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



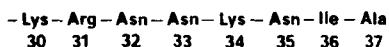
Интересно, что у всех четырех гормонов в положении 6 находится остаток фенилаланина, у первых трех совпадает N-концевой дипептид и только единственный гормон, стимулирующий секрецию поджелудочной железы, имеет в положении 10 остаток лейцина, в то время как остальные несут в этом положении остаток тирозина. Эти факты дали повод Вюншу отнести все 4 гормона к семейству глюкагона.

Полный синтез глюкагона был связан с большими трудностями из-за сложной аминокислотной последовательности. Это высокое содержание гидроксикаминокислот, наличие метионина и триптофана, концевые аминокислоты треонин и гистидин, трудные для синтеза последовательности -Arg-Arg- и -Asp-Thr-, а также недостаток мест разделения на фрагменты,

безопасных с точки зрения рацемизации, и т. д. Лишь при применении тактики максимальной защиты Вюнш и сотр. [685] после многолетней интенсивной работы смогли закончить полный его синтез. После гель-фильтрации на сефадексе G-50 синтетический гормон был получен в кристаллическом виде и по биологической активности оказался полностью идентичным с природным гормоном [685]. Связывая структуру и биологическую активность (повышение содержания сахара в крови), нужно отметить, что лишь две С-концевых аминокислоты могут быть отщеплены без ухудшения действия гормона, в то же время фрагменты 9-23 и 7-29, не обладая биологической активностью, дают полный иммунный ответ.

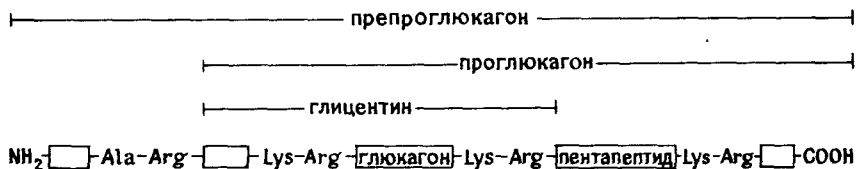
Глюкагон имеет терапевтическое применение при заболеваниях, связанных с понижением содержания сахара в крови (при передозировке инсулина или гиперинсулинизме) или с избытком глюкагона.

Тагер и Штейнер [686] из кристаллического глюкагона (теленка и свиньи) выделили 37-членный полипептид, дающий иммунохимическую реакцию, соответствующую глюкагону. Предполагается, что это фрагмент проглюкагона, так как его 29 N-концевых аминокислот идентичны соответствующему глюкагону. С-Концевой пептид имеет последовательность:



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

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



2.3.1.10. Паратиреоидный гормон

Паратиреоидный гормон парашитовидной железы наряду с кальцитонином и 1,25-дигидроксизолекальциферолом участвует в регуляции фосфатного и кальциевого обмена у млекопитающих. Снижение содержания кальция в крови вызывает секрецию паратиреоидного гормона парашитовидной железой. Это повышает содержание кальция в крови и стимулирует секрецию фосфатов в мочу, чем снижается их содержание в крови. Важнейшие участки воздействия: тонкая кишка (увеличение всасывания ионов кальция), кости (рост связывания ионов кальция) и почки (повышение секреции фосфатов и стимуляция образования 1,25-дигидроксизолекальциферола из его

предшественника 25-гидроксиколекальциферола). Действие в качестве гормона-стимулятора для 1,25-дигидроксиколекальциферола, увеличивающего перенос ионов кальция из тонкой кишки в кровь, приводит к дополнительному увеличению концентрации кальция в крови.

Ниже приведены аминокислотные последовательности для паратиреоидного гормона из разных организмов [688—690]:

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

По первичной структуре паратиреоидный гормон свиньи отличается от гормона теленка в 7 положениях, человеческий имеет отличие в 11 положениях.

По-видимому, не все 84 аминокислоты необходимы для биологической активности. Синтезированные Поттсом и сотр. по методу Меррифида N-концевые последовательности паратиреоидных гормонов теленка и свиньи

показали качественно соответствующую природному гормону специфическую активность при тестировании на почках и костях. Соответствующий фрагмент человеческого гормона был синтезирован ранее (1973 г.) Андреттой по классической методике конденсации фрагментов в растворе.

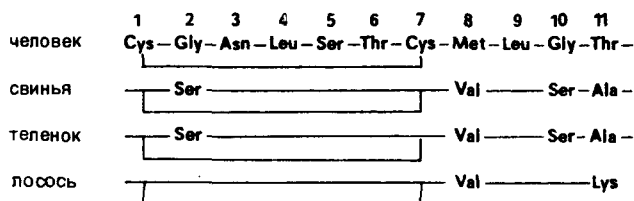
В начале 70-х годов Кон и др. [690] показали, что паратиреоидный гормон образуется в организме из прогормона. В более поздней работе (1977 г.) был описан соответствующий препрогормон [691], который может быть рассмотрен как биосинтетический предшественник.

2.3.1.11. Кальцитонин

Кальцитонин образуется в С-клетках щитовидной железы млекопитающих при повышении содержания кальция в крови. У низших животных вплоть до птиц место образования кальцитонина — ультимобранхиальное тельце (по этой причине не следует больше употреблять старое название «тиреокальцитонин»). Кальцитонин ингибирует перенос ионов кальция из костей в кровь, действуя при этом как регулятор, обратный паратиреоидному гормону.

В 1968 г. четыре различные лаборатории описали установление структуры и синтез кальцитонина свиньи. У выделенных несколько позднее кальцитонинов из других организмов [692] обнаружилось чрезвычайно большое различие в аминокислотных последовательностях. Общие структурные признаки всех кальцитонинов — полипептидная цепь из 32 аминокислотных остатков, С-концевой амид пролина и дисульфидный мостик между 1 и 7 остатками цистеина. Интересно, что кальцитонин, выделенный из ультимобранхиального тельца, в 30—40 раз более активен по сравнению с кальцитонинами млекопитающих. Из многочисленных исследований, проведенных на примере кальцитонина человека (кальцитонин М) [693], показано, что в противоположность другим пептидным гормонам (АКТГ, гастрин, паратиреоидный гормон) у кальцитонина так называемым активным центром, необходимым для проявления биологического действия, является неограниченная часть первичной структуры. По развитию Швидером предположению в данном случае мы, очевидно, имеем дело с так называемым «регнилогическим» типом пептида, в котором область аминокислотной последовательности, необходимая для стимуляции рецептора, разделена на части, т. е. для проявления биологической активности кальцитонина необходим практически весь пептид.

Далее приведены первичные структуры кальцитонинов из разных источников:



	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
человек	Tyr	Thr	Gln	Asp	Phe	Asn	Lys	Phe	His	Thr	Phe
свинья	— Trp — Arg — Asn — Leu — Asn — Arg —										
теленос	— Trp — Lys — Leu — Asn — Tyr — Arg —										
лосось	Leu — Ser — Glu — Leu — His — Leu — Gln — Tyr —										
	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	
человек	Pro	Gln	Thr	Ala	Ile	Gly	Val	Gly	Ala	Pro	NH ₂
свинья	Ser — Gly — Met — Gly — Phe — Pro — Gly — Thr —										
теленос	Ser — Gly — Met — Gly — Phe — Pro — Gly — Thr —										
лосось	— Arg — Asn — Thr — Ser — Thr —										

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

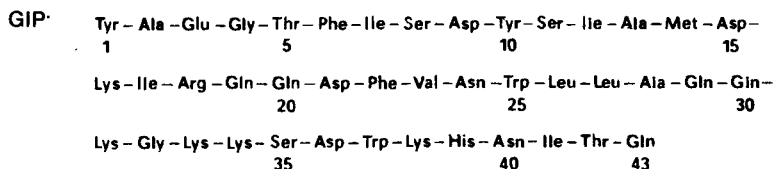
Большое терапевтическое значение кальцитонина и его аналогов с повышенным и пролонгированным действием послужило причиной разработки многочисленных вариантов синтеза. Кальцитонины различных видов (человека, лосося, угря и др.) и особенно стабильные карбоаналоги существуют в виде фармакопейных препаратов.

Значительные успехи были получены при лечении остеодистрофии (osteodystrophia deformans), болезни, проявляющейся выраженным декальцинированием костей. Возможно также терапевтическое применение при старческом остеопорозе (уменьшение массы костей) и в случаях переломов костей.

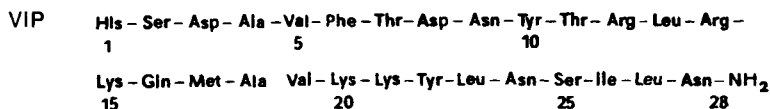
2.3.1.12. Гормоны желудочно-кишечного тракта

Пептидные гормоны желудочно-кишечного тракта являются так называемыми энтероэндокринными гормонами, так как их образование происходит не в специально предназначенных для этого железах, а в определенных тканях, обычно характеризующихся другой первичной функцией. Эти гормоны были также названы тканевыми. Кроме хорошо охарактеризованных пептидных гормонов гастрин, секретин, холецистокинин, панкреозимин и мотилин в желудочно-кишечном тракте найдены и структурно охарактеризованы и другие биологически активные вещества.

Так, общая желудочная секреция блокируется полипептидным ингибитором (GIP) [694], выделяемым гастроинтерстициальными клетками и имеющим структуру



Ранее уже отмечалось, что N-концевой участок 1—13 этого полипептида обнаруживает известную гомологию с первичными структурами глюкагона и секретина. Гомология наблюдается и в отношении вазоактивного кишечного пептида (VIP), действующего на сердечную деятельность. Вазоактивный кишечный полипептид показывает лишь около трети глюкагоновой активности и обладает кроме прочего стимулирующим действием на ткани гладких мышц [695, 696]. Его первичная структура:



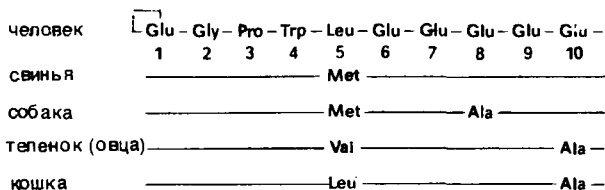
Как показал Бодански, биологическую активность проявляют также его С-концевые фрагменты 14—28 (1%) и 7—28 (5%). Из-за широкого спектра биологических активностей физиологическая роль VIP еще окончательно неясна.

Грегори [697] выделил из человеческой мочи вместе с урогастроном полипептид, являющийся антагонистом гастрина. Оба выделенных ингибитора состоят из 53 или 52 аминокислотных остатков, имеют три внутренних дисульфидных мостика и отличаются лишь С-концевым аргинином.

2.3.1.12.1. Гастрин [698]

Гастрин образуется в слизистой привратника желудка и кровью переносится к фундальным железам желудка. Он стимулирует секрецию соляной кислоты, секрецию ферментов поджелудочной железы и повышает моторку кишечника.

Название «гастрин» введено Эдвисом, выдвинувшим уже в 1905 г. так называемую гастриновую гипотезу на основании того, что экстракт слизистой привратника стимулирует выделение соляной кислоты и тем самым включает в процесс пищеварения пепсин. В 1964 г. Грегори и Трейс описали выделение двух гастринов из слизистой желудка свиньи. Установление первичной структуры показало, что гастрин I является амидом гептадекапептида с остатком пироглутаминовой кислоты на N-конце. Гастрин II обладает такой же аминокислотной последовательностью, но тирозин в положении 12 содержит О-сульфогруппу:



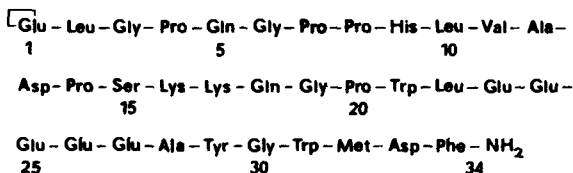
	(SO ₃ H)						
человек	Ala 11	Tyr 12	Gly 13	Trp 14	Met 15	Asp 16	Phe - NH ₂ 17
свинья	<hr/>						
собака	<hr/>						
теленос (овца)	<hr/>						
кошка	<hr/>						

В различных организмах гастрины I и II выделяются в разных пропорциях. В процессе синтеза гастрина Кеннером с соотр. был тестирован иа биологическую активность амид С-концевого N-защищенного тетрапептида Z-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂. В результате был получен неожиданный результат, его биологическое действие оказалось равным 1/10 (в расчете на моль) биологической активности полного гормона. Более 500 аналогов гастрина синтезировано Морлеем [699] для структурно-функциональных исследований. В результате этих обширных исследований введен в медицинскую практику и используется для диагностики секрции желудка пентагастрин Boc-β-Ala-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂, («пентавлои»).

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

Превращение полученного химическим синтезом гастриина I в гастрин II можно осуществить обработкой его комплексом пиридин — SO_3 при pH 10. Но при такой обработке могут протекать различные процессы в аминокислотных остатках в области 14—17 (важной для проявления биологической активности), ведущие к инактивации пептида, например замещение в триптофановом кольце, окисление метионина в его S-оксид, дезамидирование и т. д. Для уменьшения этих изменений Met¹⁵ может быть заменен без уменьшения биологической активности на Leu¹⁵. Это наблюдение имеет большое практическое значение, потому что [Leu¹⁵]гастрин I человека, не имея остатка метионина, более устойчив к окислению и обладает повышенной стабильностью при хранении. Замены в участке 1—13 не оказывают какого-либо влияния на биологическую активность. Гастрины из других организмов, отличающиеся от человеческого этим участком, также проявляют биологическую активность.

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



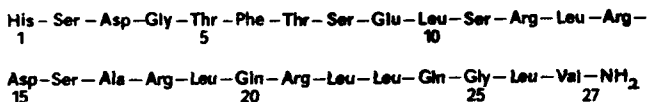
В соответствии с данными по пересмотру первичной структуры Вюнш с сотр. [701] осуществил новый полипептидный синтез «биг»-гастрина I человека.

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

2.3.1.12.2. Секретин

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

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

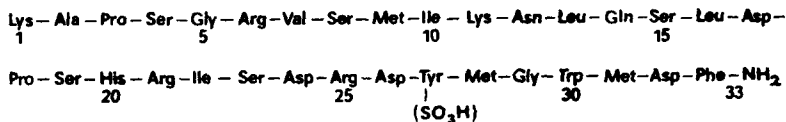


Структура была подтверждена двумя полными синтетами, проведенными Бодански с сотр. в 1967—1968 гг., отличающимися стратегическими концепциями (ступенчатый синтез с помощью нитрофениловых эфиров и фрагментная конденсация). Синтез с использованием фрагментной конденсации в «100-граммовом масштабе», проведенный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

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

2.3.1.12.3. Холецистокининпанкреозимин

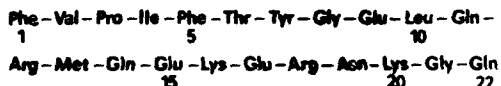
Кажущееся несколько сложным название гормона обусловлено историческими причинами. В 1928 г. Иви и Олдберг сообщили о существовании в сыром экстракте слизистой кишечника вещества, обладающего сократительным действием на желчный пузырь и названного холецистокинином. В таком же экстракте в 1943 г. Харпером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



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

2.3.1.12.4. Мотилин

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



При рассмотрении аминокислотной последовательности не удается найти родственных связей с каким-либо из известных к настоящему времени гормонов желудочно-кишечного тракта. Необычным является распределение гидрофильных и гидрофобных аминокислот в молекуле. В 1975—1976 гг. полиые синтезы мотилина описаны лабораториями Яджимы, Ямады и Михары; Вюиш и сотр. [709] описали синтезы [Nle¹³, Glu¹⁴]мотилина и [Leu¹³, Glu¹⁴]мотилина. Эти работы показали, что метионин в положении 13 несуществен для биологической активности и, заменяя его на другие аминокислоты, удается обойти некоторые трудности синтеза, связанные с наличием последовательности -Arg-Met-. Наличие D-фенилаланина в положении 5 не влияет на биологическую активность гормона; в то же время присутствие D-фенилаланина в положении 1 снижает активность на 80% [710]. Окисление метионина в положении 13 до S-оксида снижает биологическую активность на 20% (относительно природного гормона).

2.3.1.13. Ангиотензин [711—713]

Ангиотензин II сильно повышает артериальное давление, стимулирует образование альдостерона в коре надпочечников и сильно влияет на гладкие мышцы матки и желудочно-кишечного тракта, причем это влияние не имеет физиологического значения. Инактивация гормона происходит в крови под действием фермента ангиотензидазы.

Ангиотензин II (ангиотонин, гипертеизин) образуется в результате двухстадийного ферментативного процесса из белка α₂-глобу-

АНГИОТЕНЗИНОГЕН

Asp — Arg — Val — Tyr — Ile — His — Pro — Phe — His — Leu — Leu — Val — Tyr — Ser —
1 5 10

↓ ренин

Asp — Arg — Val — Tyr — Ile — His — Pro — Phe — His — Leu ангиотензин I
1 5 10

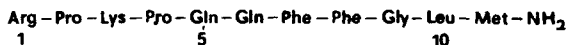
↓ преобразующий фермент

Asp — Arg — Val — Tyr — Ile — His — Pro — Phe ангиотензин II
1 5 8

2.3.1.14. *Вещество Р* [714, 715]

В 1931 г. Эулер и Гаддум обнаружили в мозге и кишечнике лошади вещество, которое снижало артериальное давление и вызывало сокращение кишечных мышц кролика. Высушенный экстракт закодирован буквой Р (от английского powder). Отсюда произошло принятое сейчас название — «вещество Р». В 1967 г. Лиман и сотр. выделили из гипоталамуса крысы вещество пептидного характера, стимулирующее секрцию слюнных желез и названное поэтому «сиалоген». Той же группе удалось в 1970—1971 гг.

установить аминокислотную последовательность гормона и подтвердить ее синтезом:

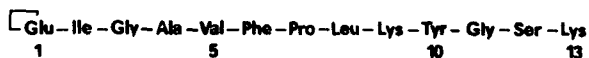


Идентичность вещества Р и сналогена была доказана в 1973 г. Штудером и сотр. [716]. Вещество Р найдено в желудочно-кишечном тракте различных млекопитающих и в мозге человека, млекопитающих, птиц, рептилий, рыб и др. С помощью радиоиммунных методов показано присутствие вещества Р в клетках центральной и периферической нервной системы. Выделение гормона, вероятно, происходит при возбуждении первичных, сенсорных нервов, и в этой части нервной системы вещество Р может служить нейротрансмиттером. Вещество Р подавляет действие морфина и эндорфина. Кроме того, допускают, что оно может играть роль при предотвращении необратимого геморрагического шока. Не следует исключать общую функцию вещества Р при защите от нарушений, вызванных стрессовыми ситуациями. Кроме усиления моторики кишечника, понижения артериального давления крови и повышения слюноотделения вещество Р вызывает множество других физиологических и фармакологических эффектов.

По названным причинам крайне сложно отнести вещество Р к какому-либо определенному классу биологически активных пептидов. Часто его считают гормоном гипоталамуса, однако можно встретить вещество Р включенным в группу тахикининов, и, наконец, не будет ошибочным считать этот пептид нейротрансмиттером.

2.3.1.15. *Нейротензин* [717, 718]

Установление структуры и синтез нейротензина осуществлены Каравеем и Лиманном, которые выделили его в 1973 г. из гипоталамуса теленка. Согласно полученным данным, пептид имеет следующую структуру:



Кроме биологического действия, характерного для кининов плазмы, — понижения артериального давления, повышения проницаемости капилляров, сокращения кишок и матки, нейротензин повышает секрецию ЛГ и ФСГ без влияния на выделение тиреотропина и соматотропина. Он вызывает также гипергликемию и проявляет ряд других активностей. Из структурно-функциональных исследований вытекает, что пентапептид Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu является самым коротким из проявляющих полную нейротензиновую активность. Интересен факт, что пептид *хенопсин* Pvr-Gly-Lys-Arg-Pro-Trp-Ile-Leu, выделенный из кожи лягушки *Xenopus laevis* [719], явно гомологичен с С-концевой областью нейротензина. В тестах на понижение артериального давления и гипергликемическое действие, а также при цианозе хенопсин проявляет ~20% активности нейротензина. Эта активность совпадает с активностью нейротензинового фрагмента 6—13.

2.3.1.16. Кинины плазмы крови [720, 721]

Кинины плазмы вызывают расширение сосудов, снижая тем самым артериальное давление, повышают проницаемость сосудов и оказывают стимулирующее действие на мышцы кишечника, бронхов и матки. Речь идет о тканевых гормонах, образующихся в плазме крови под действием протеазы калликреина из α -глобулинов.

Калликреины крови и поджелудочной железы, образующиеся из различных неактивных предшественников, проявляют разную субстратную специфичность. В то время как калликреин плазмы крови, расщепляя связь Lys-Arg, образует из белков плазмы *брадикинин*, калликреин поджелудочной железы при гидролизе связи Met-Lys соответствующего субстрата дает *каллидин*. Кроме названных кининов: *брадикинина* (*кинин-9*) и *каллидина* (*кинин-10*) — при разбавлении плазмы крови спонтанно образуется *метиониллизилбрадикинин* (*кинин-11*).

брадикинин

Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg

каллидин

Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg

Met-Lys-брадикинин

Met-Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg

В биологическом действии между кининами существует только количественное различие. Решающая роль в открытии и установлении структуры кининов плазмы крови принадлежит лабораториям Верли и Эллиота; синтез более двухсот аналогов кининов связан с именами Бодански, Шредера, Штудера и др.

2.3.2. Пептиды животного происхождения с гормоноподобными активностями

Из животного материала во все возрастающем количестве выделяются пептидные вещества, проявляющие гормоноподобные эффекты. По-видимому, особенно богата такими короткими пептидами с вазоактивным действием кожа амфибий. Из слюнной железы каракатиц был выделен элдоизин, обнаруживающий аналогично другим пептидам гипотензивное действие и вызывающий усиление активности органов, имеющих гладкую мускулатуру. Как правило, физиологическая роль этих пептидов еще неясна; активности, наблюдаемые на определенных моделях, позволяют думать, что они могут иметь фармакологическое значение.

Некоторые представители, такие, как вещество Р, бомбезин, причисляются к нейропептидам. Из кожи амфибий были изолированы новые интересные опиатоподобные пептиды, важнейший из них — дерморфин Tug-D-Ala-Phe-Dly-Tug-Pro-Ser-NH₂, который наряду с [6-оксипролин]дерморфином был изолирован из метанольного экстракта кожи южноамериканских

лягушек *Phyllomedusa sauvagii* и *Phyllomedusa rhodei*. Присутствие D-аланина в обоих пептидах поразительно и совершенно необычно для пептидов немикробного происхождения. Они проявляют интенсивную и продолжительную опиатоподобную активность. При интрацеребровентрикулярной инъекции дерморфин действует в тысячу раз сильнее морфина. Название этого пептида отражает его происхождение и действие (дерма — кожа).

2.3.2.1. Тахикинины

Тахикинины объединяют группу биологически активных пептидов, которые в отличие от медленно действующих кининов быстро оказывают стимулирующий эффект на гладкую мускулатуру [722]. К этой группе принадлежат следующие пептиды:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
физаламин	Glu	Ala	Asp	Pro	Asn	Lys	Phe	Tyr	Gly	Leu	Met-NH ₂
уперолеин	Glu	Pro	Asp	Pro	Asn	Ala	Phe	Tyr	Gly	Leu	Met-NH ₂
эledoизин	Glu	Pro	Ser	Lys	Asp	Ala	Phe	Ile	Gly	Leu	Met-NH ₂
филломедузин		Glu	Asn	Pro	Asn	Arg	Phe	Ile	Gly	Leu	Met-NH ₂
вещество P		Arg	Pro	Lys	Pro	Gln	Gln	Phe	Phe	Gly	Leu-Met-NH ₂
кассинин	Asp	Val	Pro	Lys	Ser	Asp	Gln	Phe	Val	Gly	Leu-Met-NH ₂

Вещество P (разд. 2.3.1.14) образуется в гипоталамусе и помимо биологического действия тахикининов проявляет другие разнообразные биологические активности.

Эledoизин (устаревшее название мошатин) открыт в 1949 г. Эрспаме-ром в слюнных железах головоногих из Средиземного моря (*Eledone moschata* и *Eledone aldrovandi*). В 1962 г. этот понижающий артериальное давление и действующий возбуждающе на гладкую мускулатуру пептид удалось выделить и установить его структуру [723]. Окончательное доказательство структуры путем химического синтеза сделано Сандрином и Буассона [724]. Эledoизин понижает артериальное давление у человека, но его передозировка ведет к учащению дыхания. Эledoизин можно фармакологически отличить от кининов плазмы благодаря качественным и количественным особенностям его действия как *in vivo*, так и *in vitro*. Гипотензивный эффект держится дольше, чем в случае брадикинина. При подкожном введении повышается секреторная активность слюнных желез и желез слизистой желудочно-кишечного тракта. Из структурно-функциональных исследований следует, что нона- и декапептид в два раза более активны, чем нативный гормон, а С-концевой гептапептид обладает полной активностью гормона. Активные аналоги могут быть получены N-ацилированием некоторых пента- и гексапептидных фрагментов.

Гипотезивное действие *физалемина* в 3—4 раза сильнее, чем элдоизина; в то же время он оказывает совершенно незначительное влияние на секреторную активность слюнных желез и гладкую мускулатуру. Выделение гормона из экстракта кожи южноамериканской болотной лягушки *Physalia aetus fuscumaculatus* осуществлено Эрспармером в 1964 г. В том же году Бернарди с сотр. [725] опубликовал его полный синтез.

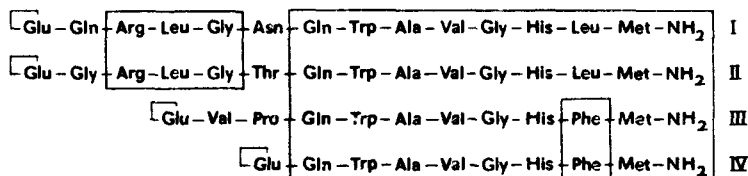
Филломедузин выделен в 1970 г. Анастаси и Эрспармером [726] из кожи южноамериканской лягушки *Phyllomedusa bicolor*. Установление последовательности показало его значительное структурное подобие с уже рассмотренными тахикининами, что также подтверждается спектром активностей. Полный синтез этого декапептида описан де Гастиглионе с сотр. [722].

Уперолеин удалось получить Анастаси с сотр. [727] из кожи австралийской лягушки *Uperoleia rugosa*. Установленная первичная структура была подтверждена полным синтезом [722]. Активность сравнима с филломедузином.

Кассинин выделен из метанольного экстракта кожи африканской лягушки *Kassina senegalesis* также Анастаси с сотр. [728]; определена первичная структура. Как все тахикинины, соединение содержит С-концевую последовательность из трех аминокислотных остатков -Gly-Leu-Met-NH₂ и фенилаланин в положении 5. В отличие от других пептидов этой группы он содержит в своей цепи 12 аминокислотных остатков и, как и вещество Р, не имеет N-концевой пироглутаминовой кислоты. Интересно, что для выделения пептида потребовалась свежая кожа 12 000 лягушек. Используя фрагментную конденсацию, группа Яджима в 1977 г. синтезировала этот пептид [729]. Стимулирующее действие на сокращение подвздошной кишки морской свинки в случае кассинина составляет 0,41 действия вещества Р.

2.3.2.2. Группа бомбезина

Структурно сходны также следующие пептиды, выделенные из кожи амфибий и объединенные в группу бомбезина:



Бомбезин (I), тетрадекапептид с N-концевым остатком пироглутаминовой кислоты, выделен Анастаси с сотр. [730] из метанольного экстракта кожи европейских лягушек *Bombina bombina* и *Bombina variegata*. Пептид вызывает сокращение гладких мышц, понижает артериальное давление и стимулирует функцию желудка и почек. Особое значение имеет исключительно сильное действие бомбезина на терморегуляцию. Инъекция <1 нг

пептида в *cisterna cerebri*, находящейся при 4 °С, взрослой крысы в течение 15 мин вызывает понижение ректальной температуры на 5 °С, сохраняющееся в течение 2 ч [731]. Пептиды центрального действия нейротензин (разд. 2.3.1.15) и хенопсин обладают на несколько порядков меньшей терморегулирующей активностью. По той причине, что кожные железы лягушки связаны с нервными клетками, нельзя считать невероятным присутствие таких терморегулирующих пептидов в центральной нервной системе высших животных.

Алмтензин (II) кожи жабы *Alytes obstetricans* отличается от бомбезина лишь двумя аминокислотными остатками.

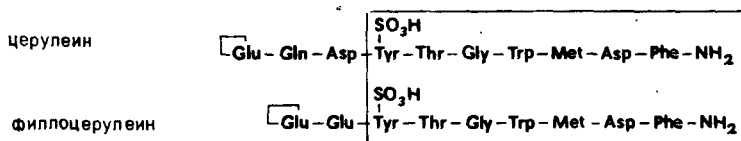
Ранатензин (III) выделен из кожи американской лягушки *Rana pipiens*. Оказывает вазоактивное и миотропное действие.

Алмтензин (II) кожи жабы *Alytes obstetricans* отличается от бомбезина нокислотных остатка член группы бомбезина. Найден в метанольном экстракте австралийской лягушки *Litoria (Hyla) aurea*. Синтез описан в работе [732].

С некоторой осторожностью можно предположить, что в будущем к группе бомбезина [732, 733] прибавятся новые представители.

2.3.2.3. Группа церулеина

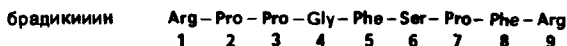
В 1967 г. Эрспамер выделил из кож австралийской лягушки *Hyla caerulea* пептид, названный **церулеином**. Приблизительно в то же время в коже южноамериканской лягушки *Phyllomedusa sauvagi* был найден очень похожий по первичной структуре пептид, получивший, в свою очередь, название **филлоцерулеин**:



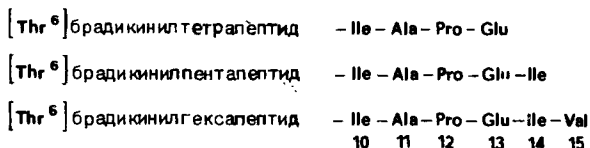
Церулеин по сравнению с брадикинином снижает артериальное давление на более долгое время, однако вызывает более слабые сокращения гладких мышц. Имея похожую структуру с гормоном желудочно-кишечного тракта холецистокининпанкреозимин (разд. 2.3.1.12), церулеин обладает и похожей биологической активностью. Сверх того, оба пептида церулеин и филлоцерулеин совпадают в С-концевом участке с гастрином. Филлоцерулеин в более слабой форме повторяет спектр активностей церулеина.

2.3.2.4. Брадикинины амфибий

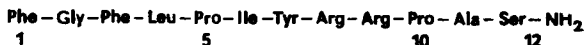
Из метанольного экстракта кожи амфибий выделены различные брадикинины и их аналоги, например брадикинин из *Rana temporaria* [734], *Rana nigromaculata* [735], *Rana pipiens* [736] и *Bombina orientalis*, а также два различных аналога из *Rana nigromaculatus* [735] и *Bombina orientalis*.



Помимо брадикинина, были найдены [Thr⁶]брадикинин и [Val¹, Thr⁶]брадикинин. Язухара и Накаима [737] выделили из кожи *Rana rugosa* кроме [Thr⁶]брадикинина три удлинённых с С-конца аналога:

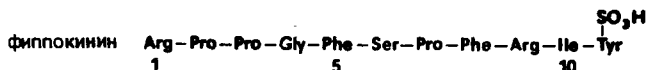


Из кожи *Rana rugosa* был также выделен другой интересный пептид, содержащий 12 аминокислотных остатков и, вследствие своего дегранулирующего действия на тучные клетки, получивший название *гранулиберин-R* [737]:



Интересно то, что в N-концевой области собраны гидрофобные остатки, в то время как С-концевая область построена из гидрофильных и основных аминокислот. Пептид обладает свойствами поверхностно-активного вещества.

Известны и другие удлинённые с С-конца аналоги брадикинина амфибий. Это брадикинилпентапептид из *Rana nigromaculata* (-Val-Ala-Pro-Ala-Ser), брадикинилтетрапептид из *Bombina orientalis* (-Gly-Lys-Phe-His) и *филлокинин* из кожи лягушки *Phyllomedusa rohdei*.



Входящий в состав яда осы *полистескинин* (с. 314) имеет последовательность брадикинина, удлинённую с N-конца.

Структурное совпадение брадикинина плазмы и брадикининов амфибий обнаруживает интересные, но пока неясные генетические связи.

2.3.3. Нейропептиды [738—750]

В последние годы интерес исследователей в значительной степени обращен к нейропептидам. Это прежде всего пептиды, образующиеся в нейронах и обладающие сигнальной функцией для других клеток. Важные представители нейропептидов — секретируемые нервными клетками нейротормоны, попадающие в кровь, а также в спинномозговую жидкость и таким

путем достигающие тех клеток, на рецепторы которых они действуют. Если нейропептиды выделяются в синаптическую щель, то их можно рассматривать как нейротрансмиттеры, или нейромедиаторы (к ним относятся тиреолиберин, вещество Р, прокталин). Фармакологи к нейроактивным пептидам относят те нативные пептиды или их части и синтетические аналоги, которые вызывают реакцию нервной системы. К нейропептидам принадлежат такие уже рассмотренные пептиды, как АКТГ, α -МСГ, β -МСГ, гормоны гипоталамуса, окситоцин, вазопрессин, вещество Р, нейротензин, ССК, VIP, гастрин, ангиотензин II, бомбезин, дерморфин, а также пептид, индуцирующий дельта-фазу сна, β -липотропин, нейрофизины, инсулин, карнозин, таурин, триптофилпептид, энкефалины, эндорфины, экзорфины, кинторфин. Кроме того, известно ~ 50 факторов, присутствующих у беспозвоночных.

Эффекты, наблюдаемые при действии нейропептидов на центральную нервную систему, весьма разнообразны. Они могут действовать как нейротрансмиттеры (разд. 2.3.1.14), контролировать физиологический сон, оказывать влияние на процессы обучения, обладать обезболивающим действием и др. Эти факты заставили по-новому взглянуть на традиционные представления о действии и функциях гормонов. Действительно, становится все труднее однозначно разграничить гормональное действие от других инициированных биологических или физиологических эффектов. Различные пептидные гормоны воздействуют непосредственно на мозг и влияют на поведение и обучаемость. С целью изучения возможности применения для терапевтического лечения болезни Паркинсона, шизофрении, нарушений памяти и др. было осуществлено клиническое испытание многих пептидных препаратов. Наибольший интерес вызывают АКТГ, МСГ и вазопрессин, оказывающие действие на центральную нервную систему в некоторых поведенческих экспериментах на животных. Из различных поведенческих тестов прежде всего, должен быть назван так называемый тест «избегания», в котором животное пассивно или активно учится избегать неприятной ситуации (например, электрошока). Приобретенные рефлексы устойчивы лишь некоторое время, а затем постепенно угасают. Де Виду [751] удалось выделить из мозга подопытных животных (крыс) пептид, охарактеризованный как [дез-Gly-NH₂⁹]вазопрессин. Этот пептид, вероятно, образуется из [Arg⁸]вазопрессина и проявляет отчетливое действие в тесте избегания. Так, при введении данного пептида, а также самого вазопрессина в мозг заметно повышается устойчивость выработанного поведенческого рефлекса. Фаза исчезновения рефлекса удлиняется. При половой мотивации эффект проявляется особенно отчетливо.

АКТГ также влияет на выработанное поведение. Сотрудниками де Вида была установлена прямая взаимосвязь между поддержанием пассивной реакции избегания у крыс и соответствующим уровнем АКТГ в плазме крови. Вскоре после этого обнаружилось, что некоторые фрагменты АКТГ при отсутствии гормонального эффекта влияют на способность крыс к обучению. В частности участки последовательности АКТГ 4—10 (I) и 4—9 (II), а также полученный Органомом аналог Org 2766 (III) обуславливают за-

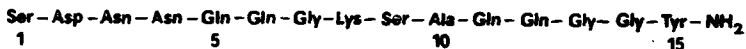
Met - Glu - His - Phe - Arg - Trp - Gly	I
Met - Glu - His - Phe - Arg - Trp	II
Met (O) - Glu - His - Phe - D - Lys - Phe	III

медление процесса угасания фазы различных условных рефлексов. Сверх того, эти пептиды, а также вазопрессин устраняют искусственно вызванную амнезию (у крыс можно вызвать потерю памяти действием пуромидина или CO_2) к реакции избегания. Интересно, что антиамнестический эффект может быть достигнут даже через 14 сут после экспериментальной амнезии.

Влияние АКТГ на способность крыс к обучению, по-видимому, объясняется возрастанием побуждения животных к запоминанию и повышением их внимания. Пептид Org 2766, вводимый через рот, и другие пептиды из последовательности АКТГ, учитывая их возможное значение как средства для улучшения способностей к обучению, были исследованы на человеке [752].

Непрямые, но убедительные данные дают основание предполагать, что вазопрессин принимает участие в процессах обработки информации. Эффект, вызванный вазопрессином или (дез-Gly-NH₂⁹)вазопрессином, в отношении упомянутой ранее реакции избегания ограничивается лишь центральной нервной системой и проявляется практически лишь при введении препарата в мозг. Антитела против этого производного вазопрессина и самого вазопрессина специфически снимают их дальнейшее действие на центральную нервную систему. И наконец, Штерба и сотр. смогли показать гистологически, что отростки пептидэргических нейронов гипоталамуса идут не только в нейрогипофиз, но также и в другие области мозга, причем связь с так называемой амигдалой особо подчеркивается. Возможно, на эту область, являющуюся, как установлено, центром ощущений страха, действуют гормоны нейрогипофиза. Нарушения в этом участке мозга ведут к общему снижению реакций на угрожающие внешние ситуации, к гиперсексуальности, к неконтролируемому приему пищи и др.

Значение нейропептидов как модуляторов нейронной активности и как нейротрансмиттеров постоянно растет. Уже было упомянуто, что функции нейротрансмиттера приписываются веществу Р. Место контакта двух нейронов (нервных клеток) называется синапсом. Перенос информации от одной (пресинаптической) нервной клетки к другой (постсинаптической) осуществляется посредством нейротрансмиттеров, таких, как ацетилхолин, норадреналин, дофамин, гистамин, серотонин, глицин, глутаминовая и γ -аминомасляная кислоты, таурин и др. Помимо этих небольших молекул и вещества Р в переносе информации, по-видимому, принимают участие и другие пептиды. При возбуждении пресинаптической клетки трансмиттер выделяется в синаптическую щель, диффундирует от пресинаптической мембраны к мембране постсинаптической целевой клетки и вызывает после взаимодействия с высокоспецифическим рецептором электрический сигнал или же подавляет сигнал, вызванный другими нейротрансмиттерами в дру-



И наконец, нужно сказать о *хромодиопсине*, образующемся в мозгу золотых рыбок при выработывании рефлекса, связанного с распознаванием цветов.



Leu-энкефалин H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH

Немного позже Симантов и Снайдер [772] выделили оба пентапептида из мозга теленка. Соотношение содержания Met-и Leu-энкефалинов в природных источниках различно. Вскоре после установления структуры энкефалинов были опубликованы различные варианты их полных синтезов [773]. Пространственная структура Leu-энкефалина [774], установленная с помощью рентгеноструктурного анализа, приведена на рис. 2-44.

Одновременно с проведением полных синтезов энкефалинов началось интенсивное изучение структурно-функциональных взаимосвязей. Это прежде всего объясняется большим интересом к терапевтически применимым аналогам, т. е. аналогам, обладающим обезболивающим действием, но лишенным недостатков, присущих опиатам (симптом абстиненции, привыкание и др.). Фармакологическое исследование нейропептидов сопряжено со многими трудностями, тесно связанными с их быстрой деградацией под действием ферментов, а также с проблемой проникновения сквозь гематоэнцефалический барьер, разделяющий мозг и кровь. Прямым введением энкефалина в мозг было показано, что, вероятно, из-за его быстрого расщепления протеазами можно наблюдать лишь небольшой эффект.

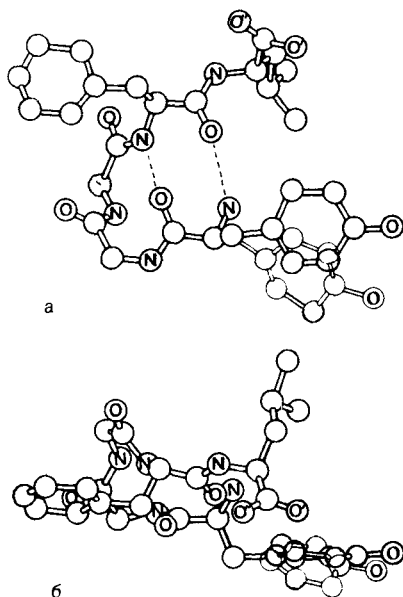
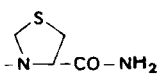
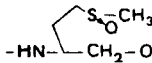
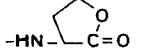


Рис. 2-44. Предлагаемая конформация Leu-энкефалина [774]. *а* и *б* — проекции на разные плоскости одной и той же модели (*б* — проекция на плоскость, перпендикулярную *а*). Тонкими линиями показано второе возможное пространственное расположение боковой цепи тирозина.

Заменой глицина в положении 2 на D-аланин или другие D-аминокислоты, а также другими изменениями в структуре природного вещества можно получить повышенную устойчивость к ферментативному расщеплению. Считается [775], что ферментативная устойчивость — единственное требование для анальгетического действия. Более того, изменения в структуре позволили улучшить транспорт пептида и его взаимодействие с соответствующими рецепторами. Приведем несколько примеров особенно активных синтетических аналогов:

H-Tyr-D-Met-Gly-Phe-Pro-NH ₂	[776]		
H-Tyr-D-Thr-Gly-Phe-Thz-NH ₂	[777]		амид тиазолин-4- карбоновой кислоты
H-Tyr-D-Met-Gly-Phe-Thz-NH ₂	[777]		
H-Tyr-D-Ala-Gly-MePhe-Met(O)-OH	[778]		сульфоксид метионинола
H-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Hse-лактон	[779]		лактон гомосерина

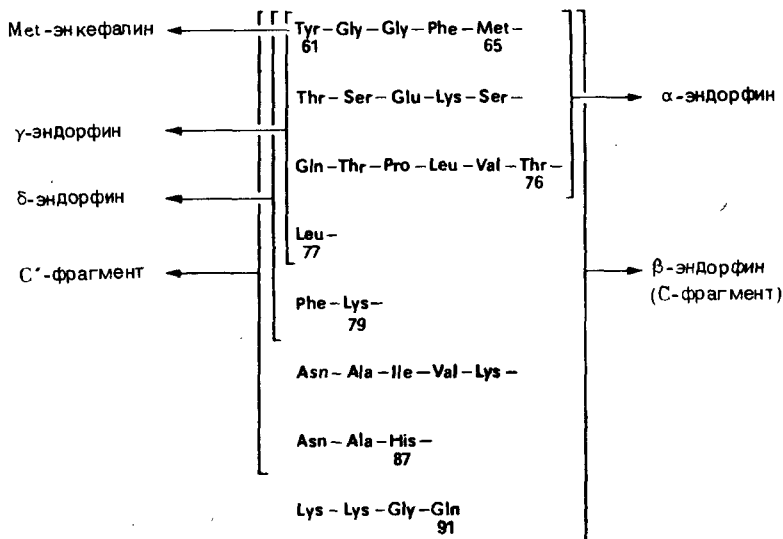
В 1979 г. из гипоталамуса крысы был выделен интересный пептид H-Tyr-Arg-OH, названный *киоторфином* и обладающий, как и его синтетический аналог H-Tyr-D-Arg-OH, в 4—20 раз более сильным действием, чем энкефалин.

Киоторфин как нейроактивный дипептид не может взаимодействовать с опиатным рецептором, ему приписывают освобождающее и одновременно стабилизирующее энкефалин действие. Этим самым объясняется его сильный анальгетический эффект. При выборе названия были учтены экзогенное происхождение пептида и его морфиноподобное действие. Фрагмент β-цепи казеина телят, имеющий последовательность Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Phe, получил название *β-казоморфин-7*.

Отщеплением двух C-концевых аминокислот с помощью карбоксипептидазы Y получают β-казоморфин-5 Tyr-Pro-Phe-Phe-Gly, который обладает большей опиатной активностью, чем гептапептид. Пептид Tyr-D-Ala-Phe-Pro-Tyr-NH₂ — представитель наиболее активных синтетических аналогов. Сильный эффект на освобождение инсулина оказывает β-казоморфин-4, опиатное действие которого крайне низкое.

В связи с тем что последовательность Met-энкефалина совпадает с участком 61—65 β-липотропина (разд. 2.3.1.4), следует обратить внимание на другие фрагменты этого пептида. Из гипофиза верблюда Ли и сотр. выделили 31-членный фрагмент β-липотропина, показавший незначительное липотропное (мобилизующее жиры) действие и содержащий последовательность Met-энкефалина. Гольдштейном была установлена опиатоподобная активность этого пептида. Эти данные дали Ли основание назвать выделенный пептид β-эндорфином. Позже, когда были открыты другие эндорфины, это название стало общим для эндогенных опиатов.

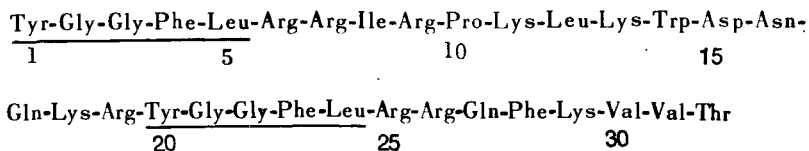
Исходя из частично очищенного экстракта смеси тканей гипофиза и гипоталамуса свиньи, Гийемен и сотр. провели выделение как β -эндорфина, так и двух других эндорфинов, названных α - и γ -эндорфинами. Из гипофиза многих животных выделен так называемый С-фрагмент β -липотропина [781], оказавшийся идентичным с β -эндорфином. Более короткий С-фрагмент также проявляет себя как опиат [781]. Ниже приведены первичные структуры и названия метионинсодержащих эндорфинов, являющиеся С-концевыми частями β -липотропина свиньи.



Химическое родство этих пептидов несомненно. Все эндорфины имеют своим N-концевым участком Met-энкефалин. Интересно, что β -липотропин, формально являющийся предшественником эндорфинов, сам по себе не обладает опиатным действием. Последовательности β -эндорфина человека и β -эндорфины из других источников имеют относительно небольшие различия, что не оказывает какого-либо влияния на биологическую активность [782]:

Thr-1	Gly	Gly	Phe	Met-5	Thr	Ser	Glu	Lys	Ser	Gln	Thr	Pro	Leu	Val	Thr-15
Leu	Phe	Lys	Asn	Ala	Ile	Ile	Lys	Asn	Ala	Tyr-27	Lys	Lys	Gly	Glu	31
свинья					Val	His					Gln				
верблюд, теленок, овца					Ile	His					Gln				

Поскольку в β -липотропине отсутствует последовательность Leu-энкефалина, что для этого эндогенного опиатного пептида должен существовать другой предшественник. В 1979 г. Кангава и др. [783] описали выделение «биг»-Leu-энкефалина из экстракта свиного гипоталамуса. Этот пептид, названный α -неоэндорфином, построен из 10 аминокислотных остатков: Tyr-Dly-Dly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro-Lys. Соответствующий нонапептид без С-концевого лизина носит название β -неоэндорфин [784]. В 1982 г. Нума с сотр. установил первичную структуру препродинорфина, который содержит также последовательность неоэндорфина. Последовательность 209—240 предшественника, состоящего из 256 аминокислотных остатков, идентична с динорфином-32 (выделена последовательность Leu-энкефалина):



Последовательность 1—17 идентична динорфину (частично охарактеризованному еще в 1979 г.), который получил свое название благодаря высокой активности в биологических тестах на морских свинках. Открытый вначале динорфин обозначается как динорфин А, а тринадцатичленный пептид последовательности 20—32 динорфина-32 — как динорфин В. Другой фрагмент, динорфин-(1—8), был обнаружен в гипоталамусе в таких же или даже больших количествах, чем динорфин А, причем механизм его выделения, т. е. расщепления связи Ile-Arg, еще недостаточно ясен. Из-за сходства с предшественником энкефалина (см. далее) этот предшественник обозначен как препроэнкефалин В. Однако в настоящее время неизвестно, является ли Leu-энкефалин физиологическим продуктом этого предшественника, поэтому название «препродинорфин» предпочтительнее.

В 1982 г. была выяснена первичная структура предшественника человеческого энкефалина, состоящего из 267 аминокислотных остатков [785a]. Препроэнкефалин содержит шесть последовательностей Met-энкефалина и одну последовательность Leu-энкефалина и не содержит последовательностей других опиатных пептидов, таких, как динорфин, α -неоэндорфин или эндорфин.

К настоящему времени эндорфины найдены в центральной нервной системе, в спинномозговой жидкости, в почках, в нервных волокнах желудочно-кишечного тракта, в крови, плазме и гипофизе. Для изучения распределения эндорфинов используется иммуно-цитохимическая техника и радиоиммуноанализ. Поскольку различные опиатные пептиды имеют значительное структурное сходство, стало возможным получить антитела для всей группы пептидов. Показано, что высокомолекулярные эндорфины, прежде всего, вероятно, стабильный к протеазам β -эндорфин, концентрируются в гипофизе и гипоталамусе. Энкефалины найдены преимущественно в

других областях мозга, в *substantia gelatinosa* спинного мозга, в нервных сплетениях, а также в экзокринных клетках желудочно-кишечного тракта. Так как концентрация энкефалина в экстракте головного мозга после гипотизэктомии остается неизменной, можно утверждать, что существует вторая нейронная система, содержащая свои β -эндорфин и энкефалин.

Наилучшими тестовыми системами для эндорфинов оказались подвздошная кишка морской свинки и семявыносящий проток мыши. В нервных клетках этих периферийных тканей имеются рецепторы опиатов. Эндорфины, действуя как агонисты опиатов, вызывают дозозависимое уменьшение волн сокращения семявыносящего протока мыши и подвздошной кишки морской свинки. С помощью антагониста опиатов налоксона можно снять сокращение, вызванное эндорфинами, на основании чего может быть сделан вывод о специфическом взаимодействии с рецепторами опиатов. Эндорфины проявляют свое опиатное действие не только на названные изолированные органы, но и действуют как анальгетирующие препараты. Внутривенное введение эндорфинов как болеутоляющих средств малоэффективно, вероятно, из-за их незначительной устойчивости к протеазам. При введении в головной мозг или его желудочки больших доз можно получить кратковременный анестезирующий эффект. По этой причине необходимы синтетические аналоги, более стабильные к ферментативному расщеплению. β -Эндорфин — хорошее болеутоляющее средство, оказывающее по некоторым данным более сильное действие, чем морфин. К сожалению, надежда, что эндорфины могут служить эффективными обезболивающими средствами, не приводящими к привыканию, не оправдалась. В общем трудно представить, чтобы организм был зависим от своих собственных «опиатов». Прямое введение эндорфинов, а также их синтетических аналогов в мозг вызывает обезболивание и, после повторного введения, сильную толерантность и чувство зависимости (наркоманию). Отсюда следует, что эндорфины, как и морфин, тормозят действие аденилатциклазы клеток нейробластомы. Такая взаимосвязь, следствием которой являются толерантность и привыкание, делает крайне маловероятным то, что эндорфины могут служить в качестве «ненаркотических» болеутоляющих препаратов.

Нейромодулирующая функция эндорфинов при регулировании болевой чувствительности привела также к гипотезе, что эндорфины могут играть некоторую роль при акупунктурном обезболивании (иглоукалывание). Иглоукалывание действительно ведет к повышению содержания эндорфинов в спинномозговой жидкости. Подавление боли с помощью акупунктуры может быть блокировано налоксоном. На возможную взаимосвязь между стрессом и эндорфинной системой мы уже ссылались. Энкефалинам приписывается также роль в патогенезе психических болезней (шизофрения, галлюцинации и др.). Энкефалин тормозит выделение различных нейротрансмиттеров. Нужно упомянуть и о влиянии эндорфинов на проницаемость нейромембран ионами натрия. Принято считать, что эндорфины, являясь составной частью пептидергических нейронов, могут выполнять нейрорегуляторную функцию при взаимодействии с другими нейронами. Хотя к настоящему времени физиологические функции эндорфинов выяснены неполно, можно с уверенностью сказать, что контроль болевой чувствительности является лишь одним из аспектов их спектра дей-

вия. Возможна также взаимосвязь с работой автономных нервных систем (например, кровообращение, терморегуляция, сон, аппетит). В качестве практических аспектов выделяются снижение отдельными аналогами артериального давления и регуляция выделения пролактина.

2.3.4. Пептиды с иммунологическим действием

В последние годы сильно возрос интерес к пептидам, оказывающим действие на иммунную систему. Приведем некоторые примеры.

Тетрапептид *тафцин* (I) получен путем ферментативного расщепления γ -глобулиновой фракции, он оказывает стимулирующее действие на фагоцитоз:

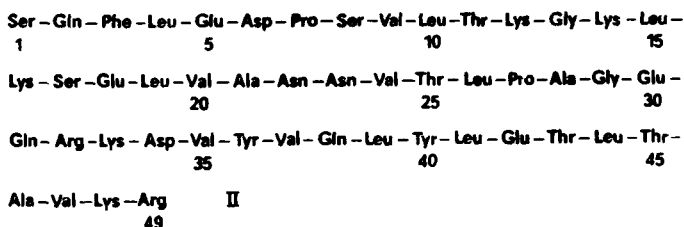


Термин *фагоцитоз* происходит от греч. phagein — поглощать, поедать и kytos — клетка. Клетки с фагоцитарной способностью в состоянии поглощать чужеродные частицы. В зависимости от размеров фагоцитируемых частиц выделяют макрофаги, способные к эндоцитозу больших частиц, и полиморфнонуклеарные лейкоциты, способные поглощать только мелкие частицы. Последние названы Мечниковым микрофагами.

Тафцин впервые выделен в 1970 г. из лейкокинина [786]. Он получен из белка ферментативно посредством действия лейкокиназы или ограниченным расщеплением трипсином. Обнаружено, что эффект стимуляции полиморфнонуклеарных лейкоцитов лейкокинином связан с тафцином, который содержится в Fc-фрагменте γ -глобулина [787]. Синтетический тафцин [787] по биологическому действию и физико-химическим свойствам полностью соответствует природному пептиду. Потенциальная возможность применения тафцина в качестве лекарства против различных инфекционных заболеваний привела к обширным исследованиям взаимосвязи структуры и активности [787—790].

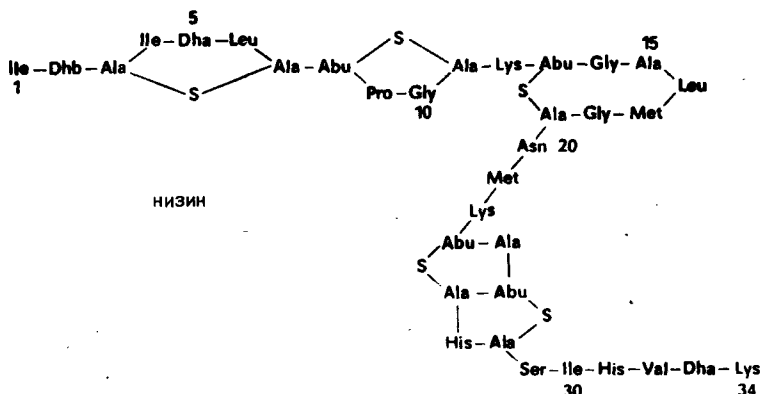
Из экстракта тимуса в последнее время также выделен ряд интересных пептидов [791]. Синтез *тимозина* α_1 описан в 1979 г. независимо Вангом с сотр., а также Бирром и Штолленверном.

Тимопоэтин II (II), стимулирующий образование Т-клеток, выделен в 1975 г. Шлесингером и Гольдштейном из тимуса телят:



Двумя годами позднее из того же материала Гольдштейн и сотр. [793] выделили второй гормон, названный *тимозином* α_1 (III):

Равным образом очень сложно классифицировать пептидные антибиотики (известно более 300). Довольно часто их подразделяют на линейные пептиды и циклические структуры, причем последние подразделяют на гомодетные пептиды и гетеродетные пептиды (деспептиды). К линейным пептидам-антибиотикам относятся *грамцицины* А—С, продуцируемый



Streptococcus lactis низин и структурно ему подобный субтили́н. В молекуле низина помимо дегидроаланина (Dha) и α -аминодегидромасляной кислоты (Dhb) имеется несколько гетеродетных пентациклических структур, включающих лантионин (Ala-S-Ala) или β -метиллантионин (Abu-S-Ala).

На примере низина и субтилина было показано наличие природных α, β -ненасыщенных аминокислот. Каждый из этих двух антибиотиков содержит два остатка дегидроаланина и один α -аминодегидромасляной кислоты. Субтили́н состоит из 32 аминокислотных остатков и продуцируется *Bacillus subtilis*.

Смесь антибиотиков, выделенная из *Streptomyces carzinostaticus*, помимо трех веществ А, В, С, обладающих антибактериальной активностью, содержит 109-членный линейный полипептид, получивший название *неокарциноста́тин*. В противоположность веществу А, имеющему один дисульфидный мостик, в неокарциноста́тине два мостика. В дозах 0,1—1,6 мг/кг неокарциноста́тин показывает противоопухолевую активность.

В качестве короткоцепочечного антибиотика можно назвать трипептид L-аргинил-D-аллотреонил-L-фенилаланин, выделенный из культуральной среды гриба *Keratinophyton terreum*, подавляющий, однако, только рост грибов, но не бактерий. Его антибиотическое действие снимается L-гистидином.

Большинство пептидных антибиотиков имеет циклическую структуру, которая может содержать помимо пептидной сложнотетрамерную и другие виды химических связей. Циклическое строение, а также наличие в молекуле D-аминокислот и других небелковых элементов придает таким антибиотикам высокую устойчивость к протеолитическим ферментам. Часто сложная структура препятствует широкому использованию химического синтеза. Из-за высокой токсичности систематическое применение находят лишь отдельные пептидные антибиотики.

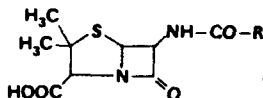
Биосинтез пептидных антибиотиков осуществляется по принципу, отличному от принципа биосинтеза белков на рибосоме. Исследования, впервые предпринятые Липманном [796] на примере бактериального пептидно-

го синтеза грамицидина, тироцидина и бацитрацина, показали, что для биосинтеза используется принцип S-аминоацильного активирования с определенным ориентированием молекулы на ферментной матрице.

Далее будут рассмотрены подробнее некоторые представители пептидных антибиотиков, причем для их классификации использовали рекомендации Хассала [797], основывающиеся на механизме действия антибиотика.

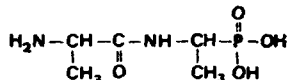
2.3.5.1. Пептидные антибиотики, подавляющие биосинтез клеточных стенок бактерий

Помимо цефалоспоринов, D-циклосерина, фосфомицина ингибиторным эффектом на рост клеточных стенок бактерий обладают природные и полусинтетические пенициллины, а также пептидные антибиотики бацитрацин, ванкомицин, яниемидин и др. Пенициллин, продуцируемый *Penicillium notatum*, включает тиазолиновое кольцо, конденсированное с лактамным кольцом, и меняющийся радикал R:



Пенициллин G, называемый также бензилпенициллином ($R = -CH_2-C_6H_5$), очень часто применяют в медицине. Образование его из аминокислот (цистеин, валлин и др.) дает формальное основание отнести пенициллин к пептидным антибиотикам. Антибиотическая активность пенициллина тесно связана с лабильностью лактамного кольца, в частности с реакционной способностью амидной группы. Пенициллин тормозит последнюю стадию биосинтеза клеточной стенки — поперечную сшивку между цепями пептидоглюкана.

Фосфонопептиды образуют новый класс синтетических антибактериальных соединений [798]. Типичный представитель — алафосфин (дипептид, состоящий из аланина и 1-аминоэтилфосфоновой кислоты):



Бацитрацины, продуцируемые *Bacillus licheniformis*, открыты еще в 1945 г. Выделение их было осуществлено с помощью противоточного распределения. Основной компонент, бацитрацин A, имеет следующую структуру:

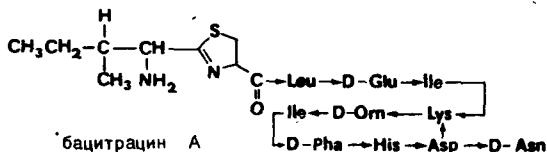


Рис. 2-45. Первичная структура актиномицина $C_1(a)$ и пентапептидного лактонового кольца (б) [800].

К антибиотикам, блокирующим матричную функцию ДНК, принадлежат актиномицины и хиноксалины.

Актиномицины, продуцируемые штаммами стрептомицетов [799, 800], окрашены в оранжево-красный цвет; они проявляют высокую антибиотическую и цитостатическую активность и относятся к очень токсичным хромопептидам. Актиномицин А, выделенный Ваксманом и др. в 1940 г., — первый антибиотик, полученный в кристаллическом виде. В настоящее вре-

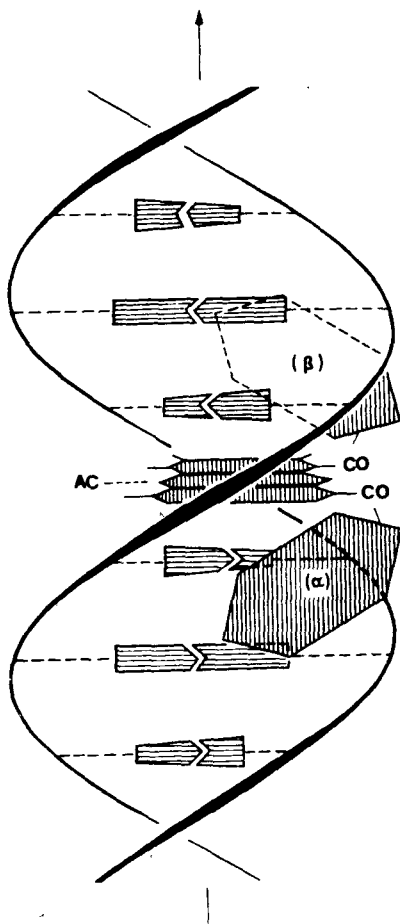


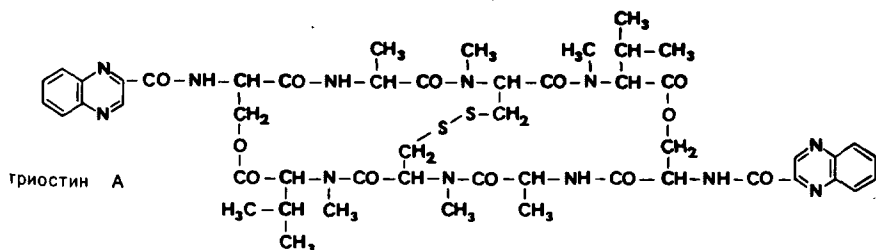
Рис. 2-46. Схема биологического действия актиномицина C_1 [800]. Хромоформный остаток актиномицина (AC) входит между парамн G — C двойной спирали ДНК. α и β — пептидные лактонные кольца.

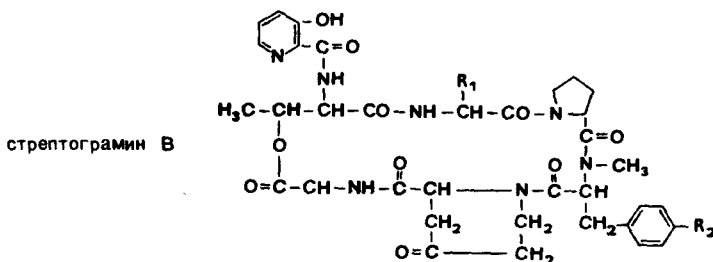
мя известно свыше 30 природных и значительное число синтетических и полусинтетических актиномицинов. Для них характерна структура, состоящая из двух пентапептидных лактонных колец, соединенных аминифеноксанином (хромофор). Наиболее известный и широко используемый представитель актиномицинов — актиномицин С (называемый в англосаксонской литературе актиномицином D). По предложению Майенхофера и Атертона [801], его следует называть [ди-(2'-D-валин)]актиномицином ($\text{Val}_2\text{-AM}$) (рис. 2-45).

Актиномицины ингибируют рост грамположительных микроорганизмов уже в концентрации $< 0,1$ мкг/мл и, следовательно, обладают пенициллиноподобным действием. Однако их широкое применение лимитирует высокая токсичность. Для мышей летальная доза актиномицина С составляет 0,5—1 мг/кг, доза, переносимая в течение многих дней, — 0,1 мг/кг. Цитостатическое действие актиномицина С позволяет применять его для лечения некоторых редких видов рака (лимфогранулематоз, хорионкарцинома, опухоль Вильмса; особенно в последнем случае можно ожидать успеха).

Биологическое действие актиномицинов основано на образовании комплексного соединения с ДНК (рис. 2-46), при этом подавляется ДНК-зависимый синтез РНК (транскрипция). Уже одна молекула актиномицина, приходящаяся на ~1000 пар оснований, приводит к 50%-ному ингибированию синтеза мРНК. Более высокая концентрация актиномицина подавляет также репликацию ДНК. Из того что актиномицины в противоположность пенициллинам не имеют принципиального различия в действии на бактериальные клетки и клетки инфицированного организма-хозяина, неизбежно следует высокая токсичность этих пептидных антибиотиков. Цитостатическую активность актиномицинов используют при исследованиях в области клеточной биологии.

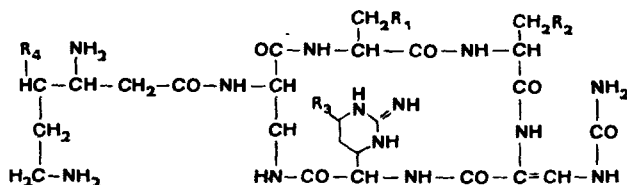
Хиноксалины [802] обладают интересным спектром активностей, действуя как цитостатические, антивирусные и антибактериальные препараты. Антибиотики очень токсичны для млекопитающих. Они продуцируются различными штаммами стрептомицетов. Важнейшие представители — *хиномицины* и *триостины*





Стрептограмины *пристинамицин I* и *стафиломицин S* имеют ограниченное терапевтическое применение; структурно похожий пептидный антибиотик микамицин используется в Японии как стимулятор роста животных.

Благодаря туберкулостатической активности особый интерес представляют выделяемые из различных видов стрептомицетов *туберактиномицин*, *капреомицин* и *виомицин* (туберактиномицин В):



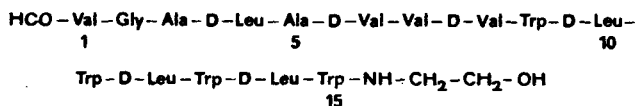
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
туберактиномицин А	ОН	ОН	ОН	ОН
виомицин	ОН	ОН	ОН	Н
туберактиномицин N	ОН	ОН	Н	ОН
туберактиномицин O	ОН	ОН	Н	Н
капреомицин 1А	ОН	NH ₂	Н	Н
капреомицин 1В	Н	NH ₂	Н	Н

Структура туберактиномицинов была установлена Сибой с сотр. и подтверждена на примере синтеза туберактиномицина О. Та же группа осуществила полиый синтез капреомицина.

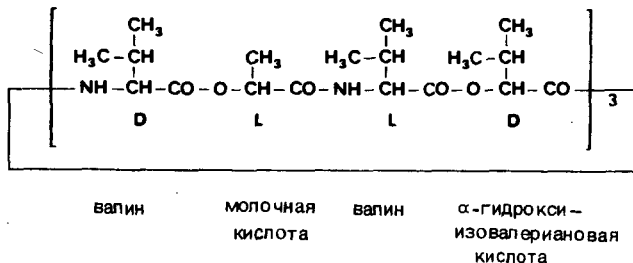
2.3.5.3. Мембраноактивные антибиотики

К настоящему времени выделено и охарактеризовано множество антибиотиков, обладающих определенной активностью к мембрамам. По механизму действия их часто разделяют на две группы: ионофоры [803] и антибиотики, вызывающие нарушения в мембранах.

Продуцируемые *Bacillus brevis* грамицидины А — С — линейные пентадекапептиды с N-концевой формильной и С-концевой β-этаналамидной группами. В зависимости от N-концевой аминокислоты (валин или изолейцин) грамицидины дифференцируются на валинграмицидины А — С и изолейцинграмицидины А — С. От приведенного ниже валинграмицидина А формы В и С отличаются заменой триптофана в положении 11 на фенилаланин и тирозин соответственно:



Валиномицин — циклический додекапептид, состоящий из трех одинаковых участков последовательности:



Гидрофобные боковые остатки придают комплексу K^+ -валиномицин хорошую растворимость в неполярных углеводородных слоях мембран, и, таким образом, становится возможным транспорт ионов K^+ через мембрану. В случае грамицидина А обсуждается возможность образования ионных каналов. Полагают, что линейный пептид образует канальную структуру, проходящую через мембрану, через которую идет поток ионов,

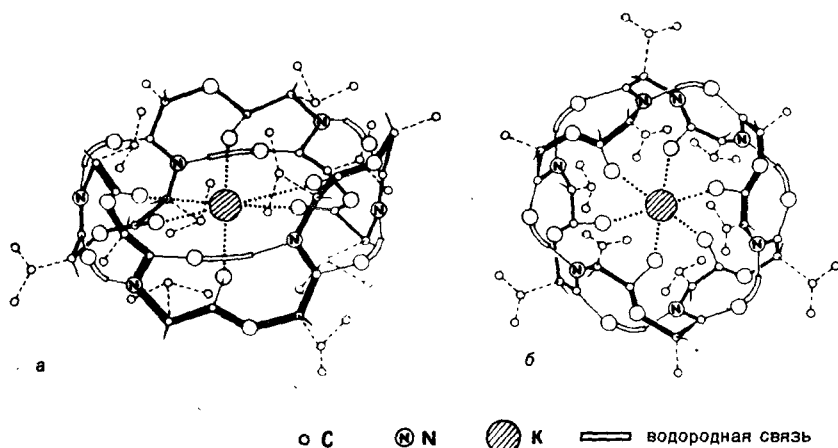
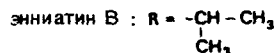
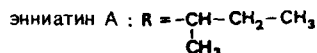
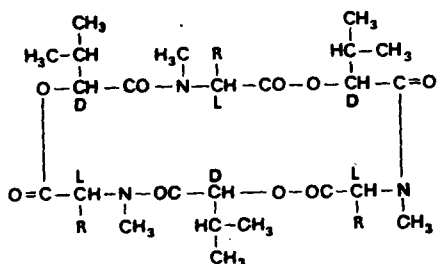


Рис. 2-47. Конформация комплекса валиномицин- K^+ [804]. *a* — вид сбоку, *б* — вид вдоль оси симметрии.

причем молекула, образующая канал, не совершает каких-либо движений.

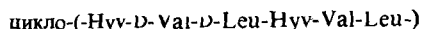
Энниатин — циклический гексадецепептид с повторяющейся последовательностью D- α -гидроксивалерионил-L-метилизолейцина (**энниатин A**) или D- α -гидроксивалерионил-L-метилвалина (**энниатин B**):



Беауверицин обладает похожей структурой ($\text{R} = -\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$).

Эиниатины были выделены в 1947—1948 гг. из разных видов фузариума Платтнером с сотр., в 1963 г. Фоглер и сотр. осуществили их химический синтез.

Серратомолид — тетрапептид с повторяющимися остатками D- β -гидроксидекаановой кислоты (D-Hyd) и L-серина (цикло-(D-Hyd-L-Ser)₂). Представители несимметричных пептолидов — **споридезмолиды**. Для **споридезмолида I** установлена следующая структура (Huv = L- α -гидроксиизовалериановая кислота):



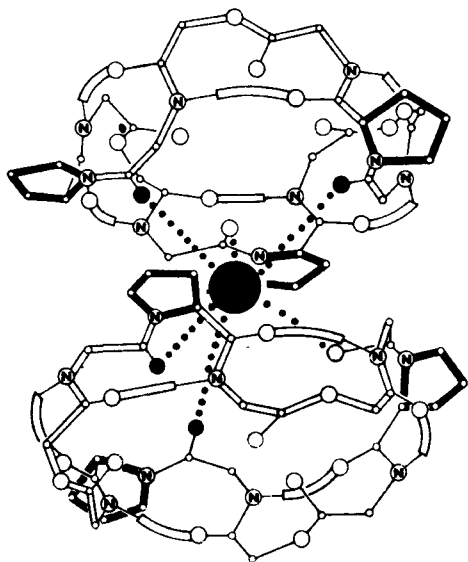


Рис. 2-48. Предполагаемая «сэндвичевая» структура одного из аналогов валиномицина [805].

Множество синтезов пептолидов проведено Шемякиным и сотр. Его ученики, Овчинников, Иванов и др., в рамках программы изучения взаимосвязи структуры пептолидов и их активности синтезировали более 60 аналогов энинатина, ~ 100 аналогов валиномицина и провели большую работу по изучению конформаций. Оказалось, что антибактериальные свойства циклодеписептидов находятся в тесной взаимосвязи со способностью образовывать комплексы с катионами. Аналоги, не обладающие комплексообразующими свойствами, не оказывают антибактериального действия. Валиномицин, энинатин, антидот антимаинид (разд. 2.3.6), а также их многочисленные аналоги связываются с катионами в отношении 1:1. Кроме того, Иванов и сотр. смогли установить, что в определенных условиях могут существовать прочные комплексы с другой стехиометрией. Рис. 2-48 показывает предлагаемую [805] для ряда валиномицина структуру комплекса в виде сэндвича.

Промежуточное положение между ионофорами и второй группой мембраноактивных пептидных антибиотиков занимает *аламетицин*. Аламетицин вместе с природными аналогами *сузукациллином* и *трихотоксином* причисляют к амфифильным пептидным антибиотикам, которые в липидных мембранах создают флуктуирующий, независимый от напряжения поток ионов и поэтому представляют большой интерес как модельные системы нервной проводимости.

Вследствие агрегации этих пептидов образуются поры, которые могут иметь различную проницаемость, поэтому они особенно хороши для изучения механизма проводимости ионных каналов.

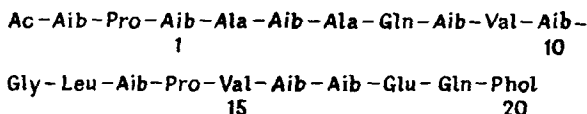


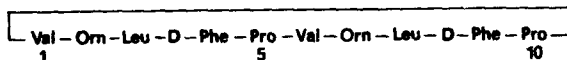
Рис. 2-49. Первичная структура аламетицина. Aib — α -аминноизомасляная кислота, Phol — фенилаланиол.

Первоначально предполагалось, что аламетицин имеет структуру циклооктадекапептида [807]. В пересмотренной и подтвержденной синтезом первичной структуре (рис. 2-49) остаток N-концевой α -аминоизомасляной кислоты (Aib) ацетилирован, в то время как на С-конце присутствует остаток фенилаланна [808].

Наряду с уже упоминавшейся мембранной и антибиотической активностью аламетицина следует также отметить его мембранорастворяющее действие к асцитным клеткам карциномы Эрлиха, а также эритроцитам. Подобно аламетицину на мембраны действуют также его природные аналоги сузаккаллиин А и трихотоксин А40, которые имеют также значительную гомологию в первичной структуре [809, 810].

Приведенные далее циклические пептиды воздействуют на структуру мембраны, сначала попадая путем адсорбции и проникновения в пористые клеточные стенки и затем взаимодействуя с белковолипидными комплексами, что в свою очередь приводит к разрушению мембраны. Антибактериальная активность грамицидина S и структурно похожего на него тироцидина обусловлена, вероятно, именно свойствами поверхностно-активного вещества.

Грамицидин S впервые выделен в СССР в 1944 г. группой Гаузе и Бражниковой из штамма *Bacillus brevis*. В 1946 г. Синге с сотр. установили его первичную структуру. Молекула состоит из двух идентичных пентапептидов, соединенных между собой и образующих десятичленный цикл. Приведенное ниже строение антибиотика подтверждено Швицером и Зибером [811] полным химическим синтезом:



В 1967 г. Ваки и Идзумия, проводя циклодимернизацию активированного производного пентапептида, помимо грамицидина S получили с 32%-ным выходом циклический пентапептид. Этот полуграмицидин S показал себя биологически неактивным.

Грамицидин S действует только на грамположительные и не влияет на грамотрицательные возбудители. Изучение взаимосвязи структуры и активности показало, что без потери активности можно заменить пролин на глицин или сарказин н орнитин на лизин. Замена D-фенилаланин на D-аланин или глицин, получают аналоги со слабым биологическим действи-

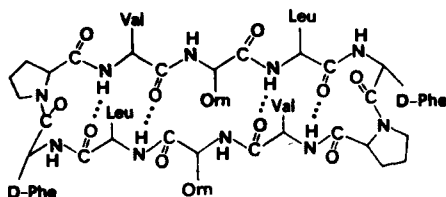


Рис. 2-50. Конформационная модель грамицидина S.

ем, встраивание в эти положения L-аланина ведет к полной потере активности. На рис. 2-50 приведена модель грамицидина S, построенная на основе конформационных исследований [812, 813]. Можно увидеть антипараллельную β -структуру с четырьмя внутримолекулярными водородными связями между остатками валина и лейцина и особое пространственное расположение обеих последовательностей.

Тироцидины, открытые в 1952 г., также продуцируются *Bacillus brevis*. Тироцидины А—Е различаются, по существу, ароматическими аминокислотами и обладают пентапептидным участком, сходным с грамицидином S:

Тироцидин	Последовательность
А	цикло -(Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro-Phe-D-Phe-Asn-Gln-Tyr-)
	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
В	цикло-(— — — — — Trp — — — —)
С	цикло-(— — — — — Trp-D-Trp — — — —)
Д	цикло-(— — — — — — — — — Phe)
Е	цикло-(— — — — — — — — — Asp — Phe)

Тироцидины действуют преимущественно на грамположительные возбудители. Смесь тироцидинов используют часто в комбинации с 20% грамицидина для лечения кожных инфекций, а также инфекций полости рта и горла. Тироцидиновый аналог с открытой цепью биологически неактивен, в то время как соответствующий аналог грамицидина сохраняет около 1/12 активности природного вещества.

Полимиксины представляют собой циклические пептиды, содержащие остатки жирных кислот, продуцируемые *Bacillus polymyxa* и действующие против грамотрицательных возбудителей, в том числе против *Pseudomonas*.

Установление структуры полимиксинов оказалось весьма сложной задачей и первоначально не приводило к правильным результатам. Лишь в связи с многочисленными работами по полному синтезу, проведенными Штудером, Фоглером, Сузуки и др. (1959—1965 гг.), удалось получить однозначные данные о структуре полимиксинов, а также отнести к этой группе

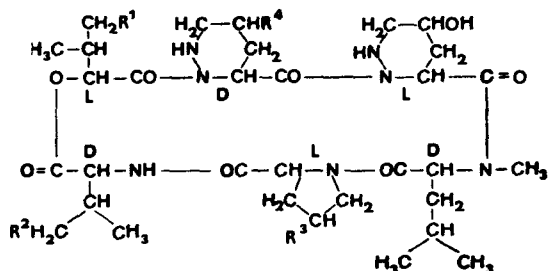
циркулины *A* и *B* (Муррей и Тетраулт, 1948 г.), выделенные из культуральной жидкости *Bacillus circulans*, и колистины (Каяма, 1950 г.), найденные в культуральной жидкости *Bacillus colistinus*. Во всех случаях в основе структуры лежит разветвленный циклический гексапептид с остатком α, γ -диаминомасляной кислоты в разветвлении, образующим кольцевую структуру посредством γ -амидной связи с остатком треонина и соединенным α -аминогруппой с тетрапептидом. Концевая аминогруппа несет остаток разветвленной жирной кислоты — (+)-6-метилоктановой ((+)-изопеларгоновой) или 6-метилгептановой (изооктановой).

Заслуживает значительного внимания наличие L- α, γ -диаминомасляной кислоты (Dbu). Первоначально N-концевому остатку этой кислоты приписывалась D-конфигурация.

$\textcircled{R} - \text{Dbu} - \text{Thr} - \textcircled{X} - \text{Dbu} - \text{Dbu} - \textcircled{Y} - \textcircled{Z} - \text{Dbu} - \text{Dbu} - \text{Thr} -$					
Полимиксин	R	X	Y	Z	
B ₁	Метилоктаноил-	Dbu	D-Phe	Leu	
B ₂	Изооктаноил-	Dbu	D-Phe	Leu	
D ₁	Метилоктаноил-	D-Ser	D-Leu	Thr	
D ₂	Изооктаноил-	D-Ser	D-Leu	Thr	
Колистин A = E ₁	Метилоктаноил-	Dbu	D-Leu	Leu	
Колистин B = E ₂	Изооктаноил-	Dbu	D-Leu	Leu	
Циркупин A	Метилоктаноил-	Dbu	D-Leu	Ile	

Все представители группы полимиксинов — довольно токсичные соединения. Полимиксины и колистины применяют локально при желудочно-кишечных инфекциях; они обладают некоторым побочным нефротоксическим действием.

В заключении следует упомянуть о *мономицинах* — семействе из 15 гексапептидов, также относящихся к ионофорам. Они образуют прочные комплексы с ионами K⁺, Rb⁺, Cs⁺ и нестойкие (в равных условиях) с ионами Li⁺, Na⁺. Мономицины имеют следующую структуру:



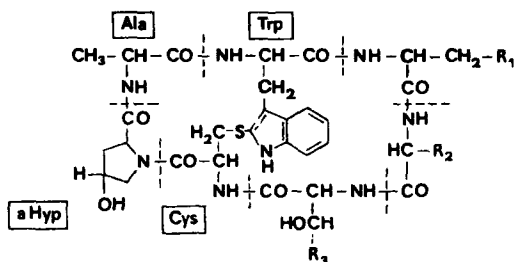
Моноамицин	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
A	H	H	CH ₃	H
B ₁	H	H	CH ₃	H
B ₂	H	CH ₃	H	H
B ₃	CH ₃	H	H	H
C	CH ₃	H	CH ₃	H
D ₁	CH ₃	H	CH ₃	H
D ₂	H	CH ₃	CH ₃	H
E	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H
F	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H
G ₁	H	H	CH ₃	Cl
G ₂	H	CH ₃	H	Cl
G ₃	CH ₃	H	H	Cl
H ₁	CH ₃	H	CH ₃	Cl
H ₂	H	CH ₃	CH ₃	Cl
I	CH ₃	CH ₃	CH ₃	Cl

2.3.6. Пептидные токсины

В последние годы особенно интенсивно исследуются природные вещества, относящиеся к ряду пептидных токсинов. Эти вещества выделены из животного и растительного материала, а также из микроорганизмов.

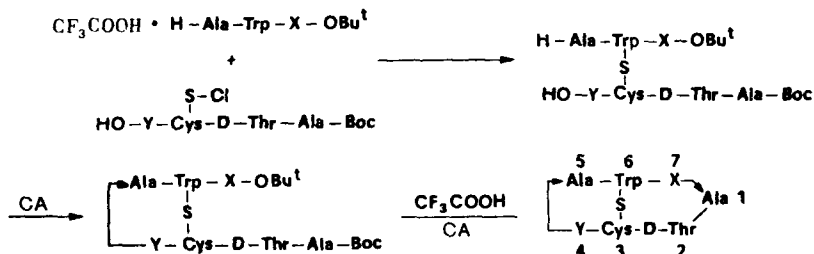
Структура яда бледной поганки (*Amanita phalloides*) установлена, а затем подтверждена синтезом в лаборатории Виланда в 1979 г. [814, 815]. Бледная поганка продуцирует десятки циклических пептидов: ядовитые *фаллотоксины* (LD₅₀ для мыши ~ 2 мг/кг), в течение нескольких часов разрушающие печень; циклический декапептид *антаманин*, способный быть при своевременном применении антагонистом к фаллоидинам; *аматоксин*, в основном ответственный за ядовитость гриба (LD₅₀ для мыши ~ 0,5 мг/кг).

К фаллотоксинам, в основе структуры которых лежит поперечносшитый циклический гептапептид, относятся *фаллоидин*, *фаллоин*, *фаллицин* и *фаллацидин*. В то время как первые три представителя ряда отличаются лишь степенью гидроксирования остатка эритролейцина, фаллацидин имеет на месте D-треонина остаток D-эритро-β-гидроксиаспарагиновой кислоты и в соседнем положении остаток валина вместо аланина. В остальном он совпадает со структурой фаллоидинов:

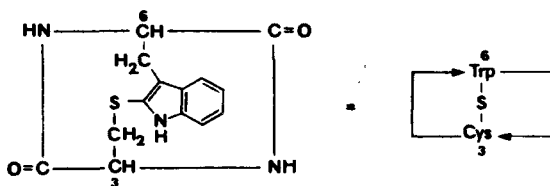


Фаллотоксин	R ₁	R ₂	R ₃
Фаллоидин	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ -\text{C}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	$-\text{CH}_3$	$-\text{CH}_3$
Фаллоин	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{C}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	$-\text{CH}_3$	$-\text{CH}_3$
Фаллицин	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ -\text{C}-\text{CH}_2-\text{OH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	$-\text{CH}_3$	$-\text{CH}_3$
Фаллоцидин	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ -\text{C}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{CH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$-\text{COOH}$

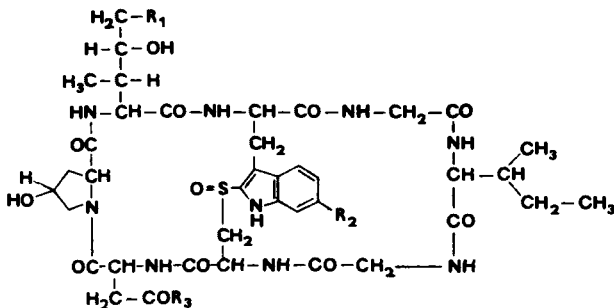
Ядовитость фаллотоксинов связана с циклической гептапептидной структурой, а также с тиоэфирной связью бокового радикала триптата, соединяющей положение 2 индольного кольца с остатком цистеина. При выяснении связи между структурой и функцией были синтезированы различные аналоги фаллотоксинов. Виландом с сотр. [816] осуществлен полный синтез аналогов, в которых *алло*-гидроксипролин (положение 4) или γ,δ -дигидроксилейцин (положение 7) заменены на другие аминокислоты. Синтез проведен по следующей схеме:



Той же исследовательской группой синтезирован так называемый *мини-фаллотоксин*, представляющий интерес как первый член ряда фаллотоксинов. Это соединение не ядовито и не обладает аффинными свойствами к F-актину.



Построенные из L-аминокислот аматоксины — циклические октапептиды, содержащие на месте тиозфирной связи сульфоксидный мостик:



Аматоксин	R ₁	R ₂	R ₃
α-	—OH	—OH	—NH ₂
β-	—OH	—OH	—OH
γ-	—H	—OH	—NH ₂
	—OH	—H	—OH

Свыше 90% смертельных случаев отравления грибами объясняются наличием аматоксинов [817]. Эти яды в высокой концентрации (0,2—0,4 мг/г биомассы) присутствуют в бледной поганке (*Amanita phalloides*) и в ее белой разновидности (*Amanita virosa*). Аматоксины есть также и в других грибах, например рода *Galerina* и у некоторых видов *Leptiota*. В 1966 г установлен механизм действия аматоксинов. Эти токсины уже в концентрации 10⁻⁸ моль/л полностью подавляют транскрипцию ДНК в мРНК, в результате блокируется биосинтез белков печени, и это приводит к отмиранию (некрозу) большей части клеток печени. Хотя действие аматоксинов начинается, вероятно, уже через полчаса, распад клеток наступает через 2—3 сут после отравления.

Виландом описана относительно простой тест на аматоксины, основанный на фиолетово-синей цветной реакции, которую дают аматоксины с коричным альдегидом в присутствии паров хлороводорода. Так как имеющийся в газетной бумаге лигнин содержит альдегид, реагирующий подобным образом, определение проводят следующим образом: свежесрезанный кусочек гриба, в котором предполагается наличие аматоксинов, с помощью ножа прижимают к краю газеты до появления отчетливого влажного пятна. Бумагу высушивают на воздухе и увлажняют 8 н. HCl. Появляющаяся в течение 15 мин отчетливая синяя окраска говорит о токсичности гриба.

Особый интерес вызывает открытие, что бледная поганка помимо приведенных токсинов также содержит в незначительной концентрации циклический декапептид, который может подавить отравляющее действие фаллоидина и α -аманитина. Структура этого противоядия, получившего название *антаманид*, установлена с помощью масс-спектрометрии и подтверждена синтезом:



Однако защита против смертельного действия грибных токсинов будет надежной лишь в том случае, если необходимую дозу антаманида (для мыши 0,5 мг/кг против 5 мг/кг фаллоидина) ввести раньше или одновременно с токсином.

Антаманид и различные аналоги образуют комплексы с ионами щелочных и щелочноземельных металлов. Связь между антитоксической активностью и комплексообразующими свойствами оставалась долгое время неясной. Конформации эквивалентных комплексов антаманида с Li^+ , K^+ , Na^+ или Ca^{2+} сходны как в растворе, так и в кристаллическом состоянии. В седловидной структуре катион связан четырьмя кислородными атомами карбонильных групп. Ивановым с сотр. [818] обсуждается возможность образования комплекса-аналога с соотношением 2:1 и строением, подобным валиномициновому «сэндвичу» (разд. 2.3.5.3), причем предполагается воз-

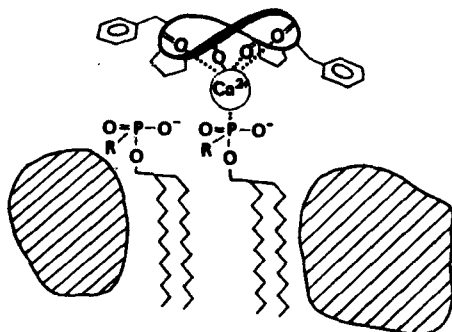
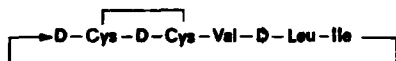


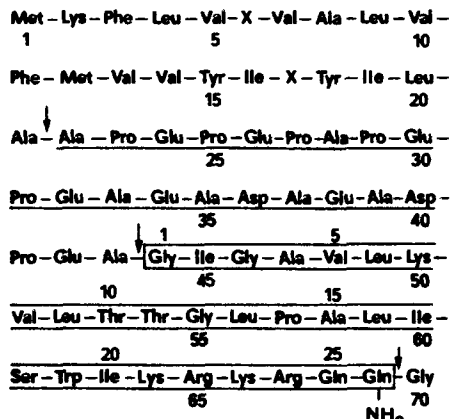
Рис. 2-51. Предполагаемый принцип взаимодействия антаманида с биомембраной [818]. Заштрихованы области белкового компонента мембраны.

возможным взаимный переход между комплексами с различной стехиометрией. В отношении антитоксической активности антаманида постулируется взаимодействие комплекса с белковыми компонентами биомембраны (рис. 2-51), благодаря чему блокируются значительные области поверхности мембран, что в свою очередь меняет их проницаемость к названным токсинам.

Малформин, продукт метаболизма *Aspergillus niger*, помимо антибактериального действия обладает цитотоксической активностью, вызывает ростовые деформации у высших растений. Структура, установленная в 1958 г., была подтверждена в 1973 г. синтезом:



Из пчелиного яда выделено множество основных пептидов, важнейшие из которых — меллитин, апамин и пептид, дегранулирующий тучные клетки [819, 820]. По данным Крейла и др. [821], биосинтетическим предшественником меллитина является препромеллитин, состоящий из 70 аминокислотных остатков и имеющий на N- и C-концах остатки метионина и глицина соответственно. За сильногидрофобной N-концевой частью следует средняя богатая остатками пролина область, включающая в себя все кислые аминокислоты пептида, к которой примыкает участок 44—69, соответствующий активному меллитину, а также C-концевой остаток глицина:

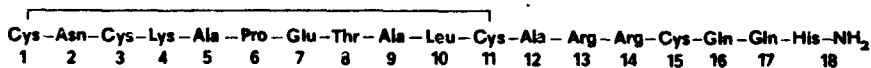


В соответствии с «сигнальной» гипотезой Блобеля препоследовательность 1—21, называемая также сигнальным пептидом, имеет в своей структуре информацию, делающую возможным образование комплекса мРНК и рибосомы с рибосомным рецепторным белком. Благодаря этому последующая пептидная последовательность, синтезированная непосредственно в эндоплазматическом ретикулуме, проходит через мембрану во внутреннее пространство канальцев ретикула и может таким образом быть секретирована наружу. Сигнальный пептид по окончании синтеза

всего белка отщепляется сигнальной протеазой, локализованной на внутренней части мембраны. Для образования меллитина из промеллитина требуется отщепление С-концевого остатка глицина с одновременным образованием амидной группы и расщепление связи Ala⁴³-Gly⁴⁴. В противоположность рассмотренному промеллитину пчелиной матки промеллитин рабочих пчел имеет N-концевой проучасток из 6—9 аминокислот, не совпадающий с соответствующим участком 35—43 приведенной выше последовательности препромеллитина.

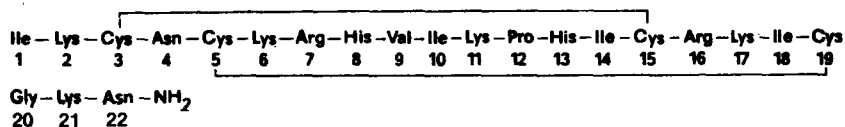
Меллитин представляет собой амид гексакозапептида, соответствующий последовательности 44—69 препромеллитина пчелиной матки. Гемолизирующее действие и способность понижать поверхностное натяжение объясняются распределением гидрофобных аминокислотных остатков в N-концевой части и гидрофильностью С-концевой части («инвертирующее мыло на пептидной основе»). Синтез меллитина описан в 1971 г. Любке с сотр.

Апамин впервые выделен и очищен в 1965 г. Хаберманом, двумя годами позднее установившим его структуру:



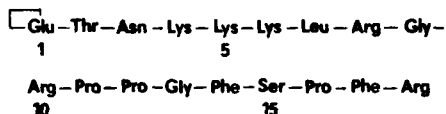
Полиный синтез осуществлен в 1975 г. [822, 823]. Апамин — нейротоксический компонент пчелиного яда.

Третьим пептидным компонентом яда пчел является пептид, вызывающий дегрануляцию тучных клеток (MCD-пептид) и имеющий следующую последовательность:

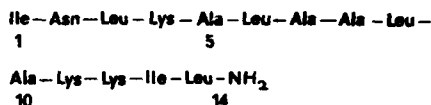


Этот пептид обладает противовоспалительным действием. Лечебное действие пчелиного яда при ревматических заболеваниях объясняется присутствием этого пептида. После успешного синтеза, осуществленного Бирром в 1977 г., новые интереснейшие данные могли бы дать исследование действия пептида на клеточные мембраны тучных клеток, а также исследование противовоспалительного действия при варьировании аминокислотной последовательности.

Яд осы более беден активными пептидами. Фармакологически кининоподобным действием обладает *полистескинин*, выделенный из *genus Polistes*. Этот кинин осы представляет собой брадикинин, удлиненный с N-конца на 9 аминокислот:

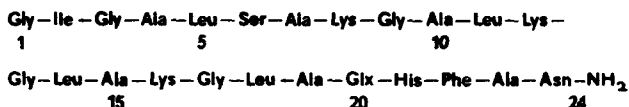


В 1977 г. Накаджима с сотр. [824] из яда *Vespula lewisii* выделил пептид, обладающий дегранулирующим действием на тучные клетки и получивший название *мастопаран*. Его действие подобно действию гранулиберина R (разд. 2.3.2.4), но он имеет явные структурные отличия как от гранулиберина, так и от MCD-пептида:

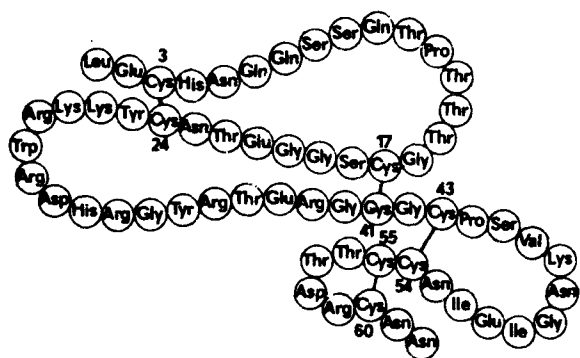


В ядах других ос также найдены подобные пептиды.

Известное структурное сходство с меллитиним показывает выделенный из защитного секрета европейской жерянки (*Bombina*) бомбинин, отличающийся гемолитической активностью:



Яды у змей образуются в верхнечелюстных слюнных железах и состоят из сложной смеси высокотоксичных пептидов с антигенным действием, белков, а также ферментов. В то время как токсины вызывают паралич и смерть укушенного животного, определенные ферменты (гиалуронидаза и др.) способствуют проникновению яда и начинают процесс переваривания проглоченной пищи. В соответствии с их действием токсичные пептиды разделяют на кардиотоксины (яды, действующие на сердечные мышцы и вызывающие необратимую деполяризацию мембран мышечных и нервных клеток) и нейротоксины (нервные яды, блокирующие нервно-мышечную трансмиссию). Лучше всего изучены нейротоксины ядовитых змей, в свою очередь подразделяющиеся на короткоцепочечные полипептидные токсины (60—62 аминокислоты) и длинноцепочечные соединения (71—74 аминокислоты). Кобротоксины, первичная структура которого приведена ниже, синтезирован в 1972 г. на твердой фазе Изумия с сотр.



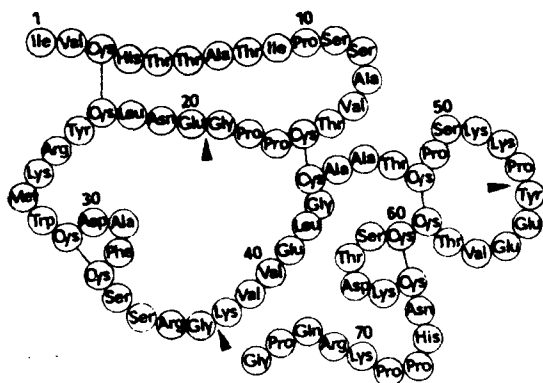


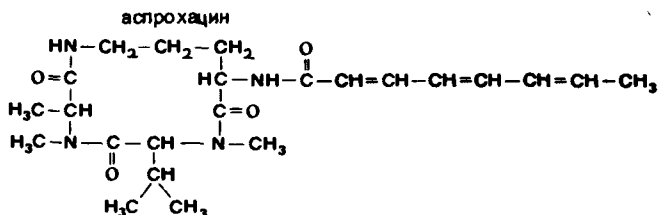
Рис. 2-52. Первичная структура α -бунгаротоксина [825]. Стрелками показано предпринятое для полного синтеза разделение на фрагменты.

В лабораториях Иванова в Институте биоорганической химии им. М. В. Шемякина классическим методом, с использованием принципа максимальной защиты, осуществлен синтез α -бунгаротоксина — токсина из яда тайваньской змеи *Bungarus multicinctus*, состоящего из 74 аминокислот и имеющего 5 дисульфидных мостиков. Полностью защищенный пептид был получен конденсацией фрагментов (1—19, 20—37, 38—53, 54—74) исключительно по остаткам глицина и пролина (рис. 2-52).

На этом примере стало возможным показать, что полипептид из 70 аминокислотных остатков может быть синтезирован в растворе с максимальной гидрофобной защитой боковых функций [825]. Следующий объект синтеза этой лаборатории — нейротоксин II из яда среднеазиатской кобры *Naja Naja Oxiana*, состоящий из 61 аминокислоты.

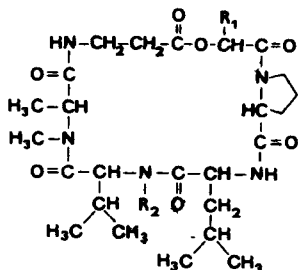
2.3.7. Пептидные инсектициды

В последние годы в природе найдены некоторые циклопептиды, действующие как инсектициды. Аспрохацин, образующийся как продукт метаболизма *Aspergillus ochraceus*, состоит из N-метилаланина, N-метилвалина и орнитина, а также октатриенкарбоновой кислоты, соединенной с α -аминогруппой орнитина:



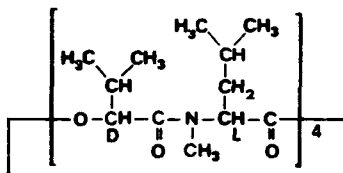
Аспрохацин показывает высокую токсичность для шелковичных червей.

В 1970 г. Сузуки и сотр. установил структуры выделенных из культуры *M. anisopliae* и обладающих инсектицидным действием циклических депсипептидов *деструксинов С и D*.



Деструксин	R ₁	R ₂
C	HO—CH ₂ —CH(CH ₃)—CH ₂ —	H ₃ C—
D	H ₃ C—CH(COOH)—CH ₂ —	H ₃ C—
Дезметил-	H ₃ C—CH(CH ₃)—CH ₂ —	H—

Бассианолид — продукт обмена энтомопатогенных грибов *Beauveria bassiana* и *Verticillium lecanii* (структура также установлена группой Сузуки [826]):



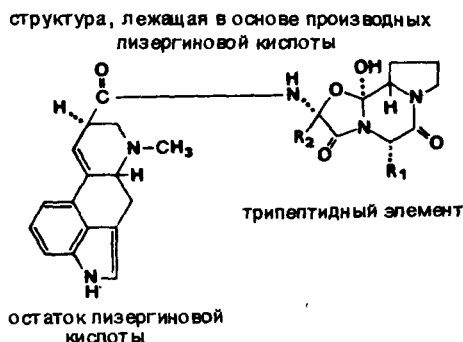
Это циклический депсипептид, состоящий из двух структурных элементов, N-метиллейцина и α-гидроксиизовалериановой кислоты, был получен синтетически. Бассианолид обладает высокой токсичностью для шелковичных червей.

В связи с рассмотрением пептидных инсектицидов должны быть упомянуты исследования Подушки, Сламы и др., занимавшихся ювенильной гормональной активностью обычных пептидных производных. Этиловый эфир L-изолейцил-L-аланил-4-аминобензойной кислоты имеет, например, структурное сходство с аналогами ювенильных гормонов, построенными из монотерпенов и ароматических соединений с замещением в положении 4. Повышения активности удалось достигнуть заменой остатка изолейцина на *трет*-бутилоксикарбонильную группу. Еще сильнее действует со-

ответствующее α -хлоризобутирильное производное, уже 1 мг которого достаточно, чтобы путем иарушения процесса превращения нимфы во взрослую форму уничтожить 2 т клопов семейства *Pyrrhocoridae*.

2.3.8. Пептидные алкалоиды [827, 828]

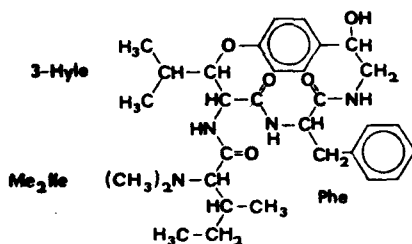
Лизергиновые производные алкалоидов спорыньи, например эрготаминового типа, имеют в структуре циклический трипептидный элемент, в образовании которого принимают участие D-пролин, L-лейцин, L-фенилаланин или L-аланин. Соединение с карбоксильной группой осуществляется или через аланин (эрготаминовый тип), или через валин (эрготоксиновый тип):



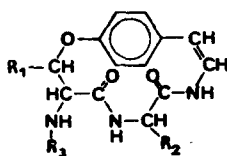
	R ₁	R ₂
Эрготамин	—CH ₂ —C ₆ H ₅	—CH ₃
Эргозин	—CH ₂ —CH(CH ₃) ₂	—CH ₃
Эргоксистин	—CH ₂ —C ₆ H ₅	—CH(CH ₃) ₂
Эргокриптин	—CH ₂ —CH(CH ₃) ₂	—CH(CH ₃) ₂

Биосинтез осуществляется, исходя из триптофана и изопентенилпирофосфата. Пептидная часть алкалоидов эрготаминового и эрготоксинового типа синтезируется мультиферментным комплексом.

Пептидные алкалоиды пандаминового типа в последнее время во все возрастающем количестве находят в некоторых семействах растений [827]. Франгулалин, основной алкалоид коры крушины (*Rhamnus frangula* L.), был впервые выделен Чеше с сотр. [829]. Он присутствует также в других видах крушины. Аминокислоты, входящие в структуру алкалоида: лейцин, N,N-диметилизoleyцин (Me₂Ile) и 3-гидроксилейцин (3-Hyle). Франгулалин и приведенные далее родственные ему пептидные антибиотики структурно происходят из пандамина, алкалоида из *Panda oleosa*.



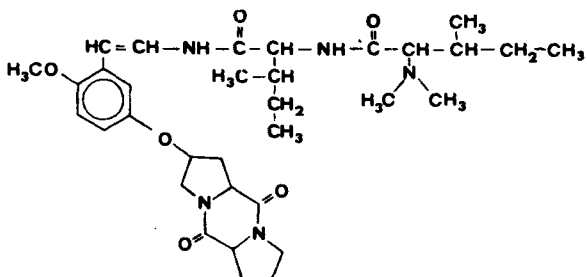
Помимо N-диметилизолейцина, 3-гидроксилейцина и фенилаланина пандамин содержит небелковый компонент — производное 1-амино-2-гидроксиэтилбензола. В франгуланине и других алкалоидах этой группы на месте гидроксизтанового мостика находится этеновая группа:

R₁R₂R₃

Франгуланин	—CH(CH ₃) ₂	—CH ₂ —CH(CH ₃) ₂	Me ₂ Ile—
Интергерренин	—C ₆ H ₅	—CH ₂ —CH(CH ₃) ₂	Me ₂ Ile—
Интергеррессин	—C ₆ H ₅	—CH ₂ —C ₆ H ₅	Me ₂ Ile—
Скутиамин	—CH(CH ₃) ₂	—CH ₂ —C ₆ H ₅	Me ₂ Ile—Pro—

Типичной для приведенных пептидных алкалоидов является 14-членная кольцевая система, содержащая 4-алкоксистириламинный остаток. При установлении структуры особенно эффективной была масс-спектрометрия.

Зизифин (Збирал с сотр., 1965 г.) — пример алкалоида с пептидным компонентом линейной структуры. Строение молекулы достоверно установлено при использовании химических методов, масс-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии.



Литература

1. Fischer E., Ber., **39**, 530 (1906).
2. Schönheimer R., Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. **154**, 203 (1926).
3. Bergmann M., Zervas L., Ber., **65**, 1192 (1932).
4. Bergmann M. et al., J. Biol. Chem. **109**, 325 (1935).
5. Fruton J. S., Adv. Protein Chem. **5**, 1 (1949).
6. Wieland Th., Angew. Chem. **63**, 7 (1951).
7. Wieland Th., Angew. Chem. **66**, 507 (1954).
8. Grassmann W., Wunsch E., Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe (Wien), **13**, 444 (1956).
9. Wieland Th., Heinke B., Angew. Chem. **69**, 362 (1957).
10. Goodman M., Kenner G. W., Adv. Prot. Chem. **12**, 465 (1957).
11. Schwyzer R., Chimia **12**, 53 (1958).
12. Wieland Th. Angew. Chem. **71**, 417 (1959).
13. Meienhofer J., Chimia, **16**, 385 (1962).
14. Rydon H. N., Peptide Synthesis, Lecture Series, Nr..5, Royal Institute of Chemistry, London, 1962.
15. Rudinger J., Pure Appl. Chem. **7**, 335 (1963).
16. Wieland Th., Determann H., Angew. Chem. **75**, 539 (1963).
17. Johnson B. J., Ann. Rep. Med. Chem. **1969**, 307.
18. Hardy P. M., J. Chem. Soc. (B), **1969**, 491.
19. Katsoyannis P. G., Ginos J. Z., Ann. Rev. Biochem., **38**, 881 (1969).
20. Meienhofer J., Chemical Aspects of Peptide and Protein Synthesis, in: Protein Nutrition (H. Brown, Ed.), Ch. C. Thomas Publishers. Springfield, 1974.
21. Wunsch E., Angew. Chem. **83**, 773 (1971).
22. Katsoyannis P. G. The Chemistry of Polipeptides, Plenum Press, New York, London, 1973.
23. Greenstein J. P., Winitz M., Chemistry of Amino Acids, Vol.2, Wiley, New York, 1961.
24. Bodanszky M., Klausner Y. S., Ondetti M. A., Peptide synthesis, Wiley, New York, 1976.
25. Lübke K., Schröder E., The Peptides, Academic Press, New York, 1966.
26. Pettit G. R., Synthetic Peptides, Vol. 1-4, Elsevier, Amsterdam, 1970-1976.
27. Amino-acids, Peptides, and Proteins (G. T. Young, Ed.), Vol. 1-4, The Chemical Society, Burlington House, London, 1969-1972.
28. Пептиды: Пер. с англ. Под ред. Гросса Э., Майенхофера Дж. — М.: Мир, 1983.
29. Wunsch E., Synthese von Peptiden, in: Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie (E. Müller, Ed.), Vol.15, 1/2, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1975.
30. Lübke K., Schröder E., Kloss G., Chemie und Biochemie der Aminosäuren, Peptide und Proteine, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1975.
31. Amino-acid, Peptide and Protein Abstracts (P. A. Clare, Ed.), Information Retrieval Ltd., London, 1972.
32. Prag 1958, Coll. Czech. Chem. Comm., Special Issue, **24**, 1-160 (1959).
33. München 1959, Angew. Chem., **71**, 741-743 (1959).
34. Basel 1960, Chimia, **14**, 366-418 (1960).
35. Москва, 1961, Ж.Меид. общ., **7**, 353-486 (1962):Coll. Czech. Chem. Comm., **27**, 2229-2262 (1962).

36. Peptides 1962 (G. T. Young, Ed.), Pergamon Press, Oxford, 1963.
37. Peptides 1963 (L. Zervas, Ed.), Pergamon Press, Oxford, 1966.
38. Budapest 1964, (V. Brucner, K. Medzihradsky, Ed.) Acta Chim. Acad. Sci. Hung., **44**, 1-239 (1965).
39. Kessler H., Zimmermann G., Förster H., Engel J., Oepen G., Sheldrick W. S., Angew. Chem., **93**, 1085 (1981).
- 39a. Peptides 1966 (H. C. Beyerman, A. van den Linde, W. Massen van den Brink, Eds.), North-Holland, Amsterdam, 1967.
40. Peptides 1968 (E. Brigas, Ed.), North-Holland, Amsterdam, 1968.
41. Peptides 1969 (E. Scoffone, Ed.), North-Holland, Amsterdam, 1971.
42. Peptides 1971 (H. Nesvadba, Ed.), North-Holland, Amsterdam, 1972.
43. Peptides 1972 (H. Hanson, H.-D. Jakubke, Eds.), North-Holland, Amsterdam, 1973.
44. Peptides 1974 (Y. Wolman, Ed.), Keter Press, Jerusalem, 1975.
45. Peptides 1976 (A. Loffet, Ed.), Editions de l'Université de Bruxelles, 1976.
46. Peptides 1978 (I. Z. Siemion, G. Kupryszewski, Eds.), Wydawnictwa Uniwersytetu Wrocławskiego, 1979.
47. Peptides: Chemistry and Biochemistry, Proc. 1st Amer. Peptide Symp., Yale University, 1968 (B. Weinstein, S. Lande, Eds.), Marcel Dekker, New York, 1970.
48. Progress in Peptide Research, Vol. II, Proc. 2nd Amer. Peptide Symp., Cleveland, 1970 (S. Lande, Ed.), Gordon and Breach, New York, London, Paris, 1972.
49. Chemistry and Biology of Peptides, Proc. 3rd Amer. Peptide Symp., Boston, 1972 (J. Meienhofer, Ed.), Ann. Arbor Science Publ. Inc., Michigan, 1972.
50. Peptides: Chemistry, Structure and Biology, Proc. 4th Amer. Peptide Symp., New York, 1974 (R. Walter, J. Meienhofer, Eds.), Ann. Arbor Science Publ. Inc., Michigan, 1975.
51. Peptides, Proc. 5th Amer. Peptide Symp., San Diego, 1977 (M. Goodman, J. Meienhofer, Eds.), Wiley, New York, 1977.
52. Peptides: Structure and Biological Function, Proc. 6th Amer. Peptide Symp. (E. Gross, J. Meienhofer, Eds.), Pierce Chemical Comp., Rockford, Ill., 1979.
53. Материалы японских пептидных симпозиумов 1963-1975 гг. публиковались только на японском языке.
54. Peptide Chemistry 1976, Proc. 14th Symp. on Peptide Chem., Hiroshima, 1976 (T. Nakajima, Ed.), Protein Research Foundation, Osaka, 1977.
55. Peptide Chemistry 1977, Proc. 15th Symp. on Peptide Chem., Osaka, 1977 (T. Shiba, Ed.), Protein Research Foundation, Osaka, 1978.
56. Peptide Chemistry 1978, Proc. 16th Symp. on Peptide Chem., Fukuoka, 1978 (N. Izumiya, Ed.), Protein Research Foundation, Osaka, 1979.
57. Peptide Chemistry 1979, Proc. 17th Symp. on Peptide Chem., Osaka, 1979 (H. Yonehara, Ed.), 1980.
58. Peptide Chemistry 1980, Proc. 18th Symp. on Peptide Chem., Nishinomiya, 1980 (K. Okawa, Ed.), Protein Research Foundation, Osaka, 1981.
59. Yajima H. et al., Chem. Pharm. Bull. Japan, **16**, 1342 (1968).
60. Medzihradsky K., Medzihradsky-Schweiger H., Acta Chem. Acad. Sci. Hung., **44**, 15 (1965).
61. Sifferd R. H., du Vigneaud V., J. Biol. Chem., **108**, 753 (1935).
62. Wünsch E., Drees F., Chem. Ber., **99**, 110 (1966).
63. Sakakibara S., Shimonishi Y., Bull. Chem. Soc. Japan, **38**, 1412 (1965).
64. McKay S. C., Albertson N. F., J. Am. Chem. Soc., **79**, 4686 (1957).
65. Weygand F., Nintz E., Z. Naturforschg., **20b**, 429 (1965).
66. Schwyzler R., Angew. Chem. **71**, 742 (1959).

67. *Gish D. T., Carpenter F. H.*, J. Am. Chem. Soc., **75**, 5872 (1953).
68. *Chamberlin J. W.*, J. Org. Chem., **31**, 1658 (1966).
69. *Patchornik A. et al.* J. Am. Chem. Soc., **92**, 6333 (1970).
70. *Birr C. et al.*, см. [42], с. 175.
71. *Carpino L. A.*, J. Am. Chem. Soc., **79**, 98 (1957).
72. *Schwyzer R. et al.*, Helv. Chim. Acta, **42**, 2622 (1959).
73. *Schnabel E.*, Annalen, **707**, 188 (1967).
74. *Birr C., Frödl R.*, Synthesis, **1970**, 474.
75. *Schnabel E. et al.* Annalen, **716**, 175 (1968).
76. *Nagasawa T. et al.* Bull. Chem. Sov. Japan, **46**, 1269 (1973).
77. *Позднев В. Ф.* — ХПС, **6**, 764 (1974).
78. *Moroder L. et al.* Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **357**, 1651 (1976).
79. *Tarbell D. S. et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **69**, 730 (1972).
80. *Meienhofer J.*, см. [37], с. 55.
81. *Boissonas R. A., Preitner G.*, Helv. Chim. Acta, **36**, 875 (1955).
82. *Kisfaludy L., Dualsky S.*, Acta Chim. Acad. Sci. Hung., **24**, 301, 309 (1960).
83. *Blaha K., Rudinger J.*, Coll. Czech. Chem. Commun. **30**, 985 (1965).
84. *Izumiyu N. et al.*, Bull. Chem. Soc. Japan, **43**, 1883 (1970).
85. *Erickson B. W., Merrifield R. B.*, см. [49], с. 191.
86. *Birr C. et al.*, Annalen, **763**, 162 (1972).
87. *Carpino L. A., Han G. Y.*, J. Am. Chem. Soc., **92**, 5748 (1970).
88. *Losse G. et al.*, Angew. Chem., **76**, 271 (1964).
89. *Kader A. T., Stirling C. J. M.*, J. Chem. Soc., **1964**, 258.
90. *Schwyzer E. et al.*, Angew. Chem., **71**, 742 (1959).
91. *Kalbacher H., Voelter W.*, Angew. Chem., **90**, 998 (1978).
92. *Kasafirek E.*, Tetrahedron Letters, **1972**, 2021.
- 92a. *Мархинин Е. К., Подклетнов Н. Е.* — ДАН СССР, 1977, **235**, с. 1203.
93. *Wünsch E., Spangenberg R.*, Chem. Ber., **104**, 2427 (1971).
94. *Eckert H. et al.*, Angew. Chem., **90**, 338 (1978).
95. *Veber D. F. et al.*, J. Org. Chem., **42**, 3286 (1977).
96. *Sakakibara S. et al.*, Bull. Chem. Soc. Japan, **38**, 1522 (1965).
97. *Haas W. L. et al.*, J. Am. Chem. Soc., **88**, 1988 (1966).
98. *Jäger G., Geiger R.*, см. [42], с. 78.
99. *Sieber P., Iselin B.*, Helv. Chim. Acta, **51**, 622 (1968).
100. *Stevenson D., Young G. T.*, Chem. Commun., **1967**, 900.
101. *McKay F. C., Albertson N. F.*, J. Am. Chem. Soc., **79**, 4686 (1957).
102. *Matsueda G. R., Stewart J. M.*, см. [50], с. 333.
103. *Kemp D. S. et al.*, Tetrahedron Letters, **1975**, 4625.
104. *Tun-Kyi A., Schwyzer R.*, Helv. Chim. Acta, **59**, 1642 (1976).
105. *Goerdeler J., Holst A.*, Angew. Chem., **71**, 775 (1959).
106. *Zervas L. et al.*, J. Am. Chem. Soc., **85**, 3660 (1963).
107. *Schönheimer R.*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **154**, 203 (1926).
108. *Du Vigneaud V., Behrens O. K.*, J. Biol. Chem., **117**, 27 (1937).
109. *Nesvadba H., Roth H.*, Mh. Chem., **98**, 1432 (1967).
110. *Horner L., Neumann H.*, Chem. Ber., **98**, 1715 (1965).
111. *Weygang F., Czendes E.*, Angew. Chem., **64**, 136 (1952).
112. *Hillmann A., Hillmann G.*, Z. Naturforschg., **6b**, 340 (1951).
113. *Waley S. G.*, Chem. Ind., **1953**, 107.
114. *Scoffone E. et al.* Tetrahedron Letters, **1965**, 605.
115. *Holley R. W., Holley A. D.*, J. Am., Chem. Soc., **74**, 3069 (1952).

116. *Steglich W., Batz H.-G.*, *Angew. Chem.*, **83**, 83 (1971).
117. *Fukuda T., Fujino M.*, см. [55], с. 19.
118. *Reese L.*, *Annalen*, **242**, 1 (1887).
119. *Nefkens G. H. L.*, *Nature*, **185**, 309 (1960).
120. *Schwyzler R. et al.*, *Chimia*, **16**, 295 (1962).
121. *Helfrich B. et al.*, *Ber.*, **58**, 852 (1925).
122. *Hillmann-Elies A. et al.*, *Z. Naturforschg.*, **8b**, 445 (1953).
123. *Tamaki T. et al.*, *Yuki Gosei Kagaku*, **29**, 599 (1971).
124. *Hiskey R. G. et al.*, *J. Org. Chem.*, **37**, 2472, 2478 (1972).
125. *Wünsch E.*, см. [29], с. 315.
126. *Fischer E.*, *Ber.*, **39**, 2893 (1906).
127. *Brenner M. et al.*, *Helv. Chim. Acta*, **33**, 568 (1950).
128. *Wang S.-S. et al.*, *J. Org. Chem.*, **42**, 1286 (1977).
129. *Bergmann M., Zervas L.*, *Ber.*, **66**, 1288 (1933).
130. *Roeske R. W.*, *Chem. Ind.*, **1959**, 1121.
131. *Taschner E. et al.*, *Annalen*, **646**, 134 (1961).
132. *Stelakatos G. C. et al.*, *J. Chem. Soc. (C)*, **1970**, 964.
133. *MacLaren J. A.*, *Austr. J. Chem.*, **25**, 1293 (1972).
134. *Stewart F. H. C.*, *Austr. J. Chem.*, **20**, 2243 (1967).
135. *Young G. T. et al.*, *Nature*, **217**, 247 (1968).
136. *Miller A. W., Stirling C. J. M.*, *J. Chem. Soc. (C)*, **1968**, 2612.
137. *Zervas L. et al.*, *J. Chem. Soc. (C)*, **1966**, 1191.
138. *Sheehan J. C., Umezawa K.*, *J. Org. Chem.*, **38**, 3771 (1973).
139. *Fruton J. S. et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 5469 (1965).
140. *Kemp D. S., Reczek J.*, *Tetrahedron Letters*, **1977**, 1031.
141. *Nefkens G. H. L.*, *Nature*, **193**, 975 (1962).
142. *Kenner G. W., Seelly J. M.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 3259 (1972).
143. *Rühlmann K. et al.*, *Annalen*, **683**, 211 (1965).
144. *Kricheldorf H. R.*, *Annalen*, **763**, 17 (1972); *Birkhofer L., Müller F.*, см. [40], с. 151.
145. *Sieber P.*, *Helv. Chim. Acta*, **60**, 2711 (1977).
146. *Wieland Th., Racky W.*, *Chimia*, **22**, 375 (1968).
147. *Weygand F. et al.*, *Chem. Ber.*, **101**, 3623 (1968).
148. *König W., Geiger R.*, *Chem. Ber.*, **105**, 2872 (1972); **103**, 2041 (1970).
149. *Sakakibara S. et al.*, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **40**, 2164 (1967).
150. *Goodman M., Stueben K. C.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 3980 (1959); **84**, 1279 (1962).
151. *Johnson B. J. et al.*, *J. Org. Chem.*, **33**, 4521 (1968); **34**, 1178 (1969); **35**, 255 (1970).
- 151a. *Mumukh Ю. Б., Надеждина Л. Б.* — *ЖОХ*, **1965**, **35**, с. 1312.
152. *Hofmann K. et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 2814 (1950).
153. *Schwyzler R.*, *Angew. Chem.*, **71**, 742 (1959).
154. *Weygand F., Steglich W.*, *Chem. Ber.*, **92**, 33 (1959).
155. *Bergmann M. et al.*, *Annalen*, **224**, 40 (1934).
156. *Clubb M. E. et al.*, *Chimia*, **14**, 373 (1960); *Bodanszky M., Sheehan J. C.*, *Chem. Ind.*, **1960**, 1268.
157. *Yajima H. et al.*, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **16**, 1342 (1968).
158. *Guttmann S., Pless J.*, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.*, **44**, 21 (1965).
159. *Bajusz S.*, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.*, **44**, 23 (1965).
160. *Zervas L. et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 3300 (1961).
161. *Wünsch E.*, *Naturwiss.*, **59**, 239 (1972).
162. *Jäger G., Geiger R.*, *Chem. Ber.*, **103**, 1727 (1970).
163. *Gish D. T., Carpenter R. H.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 5872 (1953).

164. *Habeeb A. F. S. A.*, *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **38**, 493 (1960).
165. *Nishimura O., Fujino M.*, *Chem. Pharm. Bull. Japan*, **24**, 1568 (1976).
166. *Photaki I. et al.*, *J. Chem. Soc. Perkin I*, **1976**, 259.
167. *Holley R. W., Sondheimer E.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 1326 (1954); *Fischer R. F., Whetstone R. R.*, *ibid.*, **76**, 5076 (1954).
168. *du Vigneaud V., Behrens O. K.*, *J. Biol. Chem.*, **117**, 27 (1937).
169. *Eckstein H.*, *Annalen*, **1976**, 1289.
170. *Van Batenburg D. D., Kerling K. E. T.*, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **8**, 1 (1976).
171. *Shaltiel S.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **29**, 178 (1967).
172. *Weygand F. et al.*, *Tetrahedron Letters*, **1966**, 3754.
173. *Schnabel E. et al.*, *Annalen*, **716**, 175 (1968).
174. *Haas W. L. et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 1988 (1966).
175. *Moroder L. et al.*, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **357**, 1647 (1976).
176. *Jäger G. et al.*, *Ber.*, **101**, 3537 (1968).
177. *Losse G., Krychowski U.*, *J. Prakt. Chem.*, **312**, 1097 (1970).
178. *Coyle S., Young G. T.*, *Chem. Commun.*, **1976**, 980.
179. *Sakakibara S., Fujii T.*, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **43**, 3954 (1970); *ibid.*, **42**, 1466 (1969).
180. *Fujii T. et al.*, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **49**, 1595 (1976).
181. *Amiard G. et al.*, *Bull. Soc. Chim. France*, **191**, 1464 (1955).
182. *Jones J. H., Ramage W. I.*, *Chem. Commun.*, **1978**, 472.
183. *Fletcher A. R. et al.*, *см. [46]*, с. 169.
184. *Nefkens G. H. L. et al.*, *Rec. Trav. Chim.*, **79**, 688 (1960).
185. *Alakhov Yu. B. et al.*, *Chem. Commun.*, **1970**, 406.
186. *Löw M. et al.*, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **359**, 1637 (1978); *ibid.*, **359**, 1617, 1629 (1978).
187. *Wünsch E. et al.*, *Chem. Ber.*, **100**, 816 (1967); *Z. Naturforschg.*, **22b**, 607.
188. *Izumiya N. et al.*, *см. [49]*, с. 269.
189. *Chorer M., Klausner Y. S.*, *Chem. Commun.*, **1976**, 596.
190. *Marchiori F. et al.*, *Gazz. Chim. Ital.*, **93**, 823, 834 (1963).
191. *Klieger E.*, *Annalen*, **724**, 204 (1969); *Yajima H. et al.*, *Chem. Pharm. Bull. Japan*, **19**, 1900 (1971).
192. *Storey H. T. et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 6170 (1972).
193. *Harris J. I. et al.*, *Biochem. J.*, **62**, 154 (1956).
194. *Okawa K., Tani A.*, *J. Chem. Soc. Japan*, **75**, 1197 (1950).
195. *Callachan F. M. et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 201 (1963).
196. *Iselin B., Schwyzzer R.*, *Helv. Chim. Acta*, **39**, 57 (1956).
197. *Weygand F. et al.*, *Chem. Ber.*, **99**, 1944 (1966); *ibid.*, **101**, 923 (1968).
198. *Lapatsanis L.*, *см. [46]*, с. 105.
199. *Birkhofer L. et al.*, *Chem. Ber.*, **94**, 1263 (1961).
200. *Pojer P. M., Angyal S. J.*, *Tetrahedron Letters*, **1976**, 3067.
201. *Mizoguchi T. et al.*, *J. Org. Chem.*, **33**, 903 (1968).
202. *Ho T. L., Olah G. A.*, *Angew. Chem.*, **88**, 847 (1976).
203. *Thomas P. J. et al.*, *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **32**, 1767 (1967).
204. *Wünsch E. et al.*, *Chem. Ber.*, **91**, 542 (1958).
205. *Schröder E.*, *Annalen*, **670**, 127 (1963).
206. *Wünsch E., Jenisch J.*, *Chem. Ber.*, **97**, 2490 (1964).
207. *Holton R. A., Davis R. G.*, *Tetrahedron Letters*, **1977**, 533.
208. *Du Vigneaud V. et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **52**, 4500 (1930).
209. *Kamber B., Rittel W.*, *Helv. Chim. Acta*, **51**, 2061 (1968).

210. *Hiskey R. G. et al.*, J. Org. Chem., **26**, 1152 (1961).
211. *Kamber B.*, Helv. Chim. Acta, **56**, 1370 (1973).
212. *Akabori S. et al.*, Bull. Chem. Soc. Japan, **37**, 433 (1964).
213. *Fujino M., Nishimura O.*, Chem. Commun., **1976**, 998.
214. *Zervas L., Photaki I.*, Chimia, **14**, 375 (1960); J. Am. Chem. Soc., **84**, 3887 (1962).
215. *Amiard G. et al.*, Bull. Soc. Chim. France, **192**, 698 (1956).
216. *Coyle S., Young G. T.*, J. Chem. Soc. (D), **1976**, 980.
217. *Veber D. F. et al.*, Tetrahedron Letters, **1968**, 3057; J. Am. Chem. Soc., **94**, 5456 (1972).
218. *Hermann P., Hoffmann G.*, см. [45], с. 121.
219. *Arold H., Eule M.*, см. [43], с. 78.
220. *Holland G. F., Cohen C. A.*, J. Am. Chem. Soc., **80**, 3765 (1958).
221. *Guttmann S.*, Helv. Chim. Acta, **49**, 83 (1966); см. [37], с. 11.
222. *Weber U., Hartmann P.*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **351**, 1384 (1970).
223. *Wünsch E., Spangenberg R.*, см. [41], с. 30.
- 223a. *Chimiak A., Pastuszek J. J.*, Peptides 1978, Proceedings of the XV European peptide symposium. Wrocław 1979, p.101.
224. *Mukaiyama T., Takahashi K.*, Tetrahedron Letters, **1968**, 5907.
225. *Weinert M. et al.*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **350**, 1556 (1969); ibid., **352**, 719 (1971).
226. *Medzihradzky K., Medzihradzsky-Schweiger H.*, Acta Chim. Acad. Sci. Hung., **44**, 14 (1965).
227. *Yajima H. et al.*, Chem. Pharm. Bull. Japan, **16**, 1342 (1968).
228. *Sieber P. et al.*, Helv. Chim. Acta, **59**, 2135 (1970).
229. *Hughes E. D., Ingold C. H.*, J. Chem. Soc., **1933**, 1571.
230. *Iselin B.*, Helv. Chim. Acta, **44**, 61 (1961).
231. *Sasaki T. et al.*, см. [55], с. 15.
232. *Curtius T.*, Ber., **35**, 3226 (1902).
233. *Honzl J., Rudinger J.*, Coll. Czech. Chem. Commun., **26**, 2333 (1961).
234. *Sieber P. et al.*, Helv. Chim. Acta, **53**, 2135 (1970).
235. *Kemp D. S. et al.*, J. Am. Chem. Soc., **92**, 4756 (1970).
236. *Schnabel E.*, Annalen, **659**, 168 (1962).
237. *Albertson N. F.*, Org. Reactions, **12**, 157 (1962).
238. *Wieland T., Bernhard H.*, Annalen, **572**, 190 (1951).
239. *Boissonnas R. A.*, Helv. Chim. Acta, **34**, 874 (1951).
240. *Vaughan Jr. J. R.*, J. Am. Chem. Soc., **73**, 3547 (1951).
241. *Stewart F. H. C.*, Austr. J. Chem., **18**, 887 (1965).
242. *Yajima H. et al.*, Chem. Pharm. Bull. Japan, **17**, 1958 (1969).
243. *Anderson G. W. et al.*, J. Am. Chem. Soc., **89**, 5012 (1967).
244. *Anderson G. W. et al.*, J. Am. Chem. Soc., **89**, 178 (1967).
245. *Zaoral M.*, Coll. Czech. Chem. Commun., **27**, 1273 (1962).
246. *Tilak M. A.*, Tetrahedron Letters, **1970**, 849.
247. *Belleau B., Malek G.*, J. Am. Chem. Soc., **90**, 1651 (1968).
248. *Kiso Y., Yajima H.*, Chem. Commun., **1972**, 942.
249. *Wendelberger G.*, см. [29], том 2, с. 68.
250. *Wieland T. et al.*, Angew. Chem., **83**, 333 (1971).
251. *Leuchs H.*, Ber., **39**, 857 (1906).
252. *Hirschmann R. et al.*, J. Am. Chem. Soc., **88**, 3163 (1966).
253. *Hirschmann R. et al.*, J. Am. Chem. Soc., **90**, 3254 (1968).
254. *Hirschmann R. et al.*, J. Org. Chem., **36**, 49 (1971).

255. *Hirschmann R., Denkwalter R. G.*, Naturwiss., **57**, 145 (1970).
256. *Iwakura Y.*, Biopolymers, **9**, 1419 (1970).
257. *Wieland T. et al.*, Annalen, **573**, 99 (1951).
258. *Schwyzzer R. et al.*, Helv. Chim. Acta, **38**, 69 (1955).
259. *Beaumont S. M. et al.*, Acta Chim. Sci. Hung., **44**, 37 (1965).
260. *Jakubke H.-D.*, Z. Naturforschg., **20b**, 237 (1965).
261. *Jakubke H.-D., Voigt A.*, Chem. Ber., **99**, 2944 (1966).
262. *Jakubke H.-D. et al.*, Chem. Ber., **100**, 2367 (1967).
263. *Bodanszky M.*, Nature, **175**, 685 (1955).
264. *Bodanszky M. et al.*, J. Org. Chem., **38**, 3566 (1973).
265. *Rothe M., Kunitz F. A.*, Annalen, **609**, 88 (1957).
266. *Kupryszewski G.*, Roczn. Chem., **35**, 595 (1961).
267. *Kupryszewski G., Formela M.*, Roczn. Chem., **35**, 1533 (1961).
268. *Kovacs J., Kisfaludy L., Ceprini M. Q.*, см. [39], с. 23.
269. *Kazmierczak R., Kupryszewski G.*, Roczn. Chem., **37**, 659 (1963).
270. *Barth A.*, Annalen, **686**, 221 (1965).
271. *Johnson B. T., Ruethinger T. A.*, J. Org. Chem., **35**, 255 (1970).
272. *Klausner Y. S. et al.*, см. [51], с. 536.
273. *Jakubke H.-D.*, Chem. Ber., **97**, 2816 (1964).
274. *Weygand F., Steglich W.*, Angew. Chem., **73**, 757 (1961).
275. *Anderson G. W. et al.*, J. Am. Chem. Soc., **85**, 3039 (1963).
276. *Nefkens G. H. L., Tesser G. I.*, J. Am. Chem. Soc., **83**, 1263 (1961).
277. *Jeschkeit H.*, Z. Chem., **8**, 20 (1968).
278. *Jeschkeit H.*, Z. Chem., **9**, 266 (1969).
279. *Dzieduszycka M. et al.*, см. [42], с. 28.
280. *Kemp D. S., Chien S. W.*, J. Am. Chem. Soc., **89**, 2743 (1967).
281. *Okamoto K., Shimanura S.*, J. Pharm. Soc. Japan, **93**, 333 (1973).
282. *Bankowski K., Drabarek S.*, Roczn. Chem., **45**, 1205 (1971).
283. *Jones H. H., Young G. T.*, J. Chem. Soc. (C), **1968**, 436.
284. *Jakubke H.-D., Klessen Ch., Neubert K.*, J. Prakt. Chem., **319**, 640 (1977).
285. *König W., Geiger R.*, Chem. Ber., **103**, 788 (1970).
286. *Lloyd K., Young G. T.*, Chem. Commun., **1968**, 1400.
287. *Muzalewski F., Kowalczyk J.*, см. [46], с. 143.
288. *Jakubke H.-D.*, Z. Chem., **6**, 52 (1966).
289. *Garg H. G.*, J. Sci. Ind. Res. India, **29**, 236 (1970).
290. *Bodanszky M., Klausner Y. S.*, см. [22], с. 21.
291. *Hollitzer O. et al.*, Angew. Chem., **88**, 480 (1976).
292. *Wieland Th. et al.*, Annalen, **655**, 189 (1962).
293. *Wolman Y. et al.*, J. Chem. Soc., **1967**, 689.
294. *Kovacs J. et al.*, J. Am. Chem. Soc., **89**, 183 (1967).
295. *Woodward R. B., Olofson R. A.*, J. Am. Chem. Soc., **83**, 1010 (1961).
296. *Woodward R. B. et al.*, J. Org. Chem., **34**, 2742 (1969).
297. *Neuenschwander M. et al.*, Helv. Chim. Acta, **61**, 2437 (1978).
298. *Sheehan J. C., Hess G. P.*, J. Am. Chem. Soc., **77**, 1067 (1955).
299. *Sheehan J. C. et al.*, J. Am. Chem. Soc., **87**, 2492 (1965).
300. *Sheehan J. C., McGregor D. N.*, J. Am. Chem. Soc., **84**, 3000 (1962).
301. *Wolman Y. et al.*, Chem. Commun., **1967**, 629.
302. *Ito H. et al.*, Chemistry Letters Tokyo, **1977**, 539.
303. *Wünsch E., Dress F.*, Chem. Ber., **99**, 110 (1966).
304. *Weygand F. et al.*, Z. Naturforschg., **21b**, 426 (1966).

305. Gross H., Bilk L., *Tetrahedron*, **24**, 6935 (1968).
306. Jeschkeit H., *Z. Chem.*, **9**, 111 (1969).
307. Yajima H. et al., *Chem. Pharm. Bull. Japan*, **21**, 1612 (1973).
308. König W., Geiger R., *Chem. Ber.*, **103**, 788 (1970).
309. König W., Geiger R., *Chem. Ber.*, **103**, 2024, 2034 (1970).
310. Itoh M., *Bull. Chem. Soc. Japan*, **46**, 2219 (1973).
311. Yajima H. et al., *Chem. Pharm. Bull. Japan*, **21**, 2566 (1973).
312. Романовский П. Я. и др. — *Биоорганическая химия*, **1**, 1263 (1975).
313. Przybylski J., Jeschkeit H., Kupryszewski G., *Rocz. Chem.*, **51**, 939 (1977).
314. Fujino M. et al., *Chem. Pharm. Bull. Japan*, **22**, 1857 (1974).
315. Nishimura O. et al., *Chem. Pharm. Bull. Japan*, **23**, 1212 (1975).
316. Kemp D. S. et al., *Tetrahedron Letters*, **1974**, 2695.
317. Riniker B. et al., см. [46], с. 631.
318. Jakubke H.-D., Klessen Ch., *J. Prakt. Chem.*, **319**, 159 (1977).
319. König W., Geiger R., *Chem. Ber.*, **103**, 2034 (1970).
320. Jakubke H.-D., Klessen Ch., Berger E., Neubert K., *Tetrahedron Letters*, **1978**, 1497.
321. Jakubke H.-D., Klessen Ch., Döring G., неопубликованные данные.
322. Goldschmidt S., Obermeier F., *Annalen*, **588**, 24 (1954).
323. Mitin Yu. V., Glinskaya O. V., *Tetrahedron Letters*, **1969**, 5267.
324. Mitin Yu. V. et al., см. [43], с. 57.
325. Mukaiyama T. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 4490 (1968).
326. Mukaiyama T. et al., *Tetrahedron Letters*, **1970**, 1901.
326a. Шелых Г. И., Власов Г. П., Митин Ю. В. — *ЖОХ*, **1973**, **43**, с. 396.
327. Gawne G. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 5669 (1969).
328. Bates A. J. et al. см. [43], с. 124.
329. Castro B. et al., *Synthesis*, **1976**, 751.
330. Castro B. et al., *Tetrahedron Letters*, **1975**, 1219.
331. Shioriri T. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 6203 (1972); *Tetrahedron Letters*, **1973**, 1595.
332. Bastrow L. E., Hruby V. J., *J. Org. Chem.*, **36**, 1305 (1971).
333. Horner L. et al., *Annalen*, **626**, 26 (1959).
334. Bestmann H. J., Mott L., *Annalen*, **693**, 132 (1966).
335. Castro B., Dormoy J. R., *Tetrahedron Letters*, **1973**, 3243.
336. Yamada S., Takeuchi Y., *Tetrahedron Letters*, **1971**, 3995.
337. Wieland Th., Seeliger A., *Chem. Ber.*, **104**, 3992 (1971).
338. Ugi I. et al., *Chem. Ber.*, **94**, 2814 (1961).
339. Hoffmann P. et al., in: *Isonitrile Chemistry*, Ch.2 (Ugi I., Ed.), Academic Press, New York, 1971.
340. Ugi I. et al., см. [45], с. 159.
341. Ugi I., *Intra-Sci. Chem. Rep.*, **5**, 229 (1971).
342. Ugi I., et al., см. [44], с. 71.
343. Patchornik A. et al., см. [46], с. 135.
344. Brenner M. et al., *Helv. Chim. Acta*, **40**, 1497 (1957).
344a. Mitin Yu. V., Zapevalova N. P., *Tetrahedron Letters*, **1979**, **12**, 1081.
345. Kemp D. S. et al., см. [50], с. 295.
346. Bergmann M., Fraenkel-Conrat H., *J. Biol. Chem.*, **119**, 1937 (1937); *ibid.*, **124**, 1 (1938).
347. Isowa Y. et al., *Yuki Gosei Kagaku Kyokaishi*, **36**, 195 (1978).
348. Kullmann W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **91**, 693 (1979).
349. Widmer F., Johansen T., *Carlsberg Res. Commun.*, **44**, 37 (1979); *ibid.*, **45**, 453 (1980).

350. *Morihara K., Oka T.*, Biochem. J., **163**, 531 (1977); J. Biochem., **82**, 1055 (1977).
351. *Morihara et al.*, Nature, **280**, 412 (1977).
352. *Oka T., Morihara K.*, см. [55], с. 79.
353. *Luisi P. L. et al.*, J. Mol. Catalysis, **2**, 133 (1977).
354. *Saltmann R. et al.*, Biopolymers, **16**, 631 (1977).
355. *Pelligrini A., Luisi P. L.*, см. [51], с. 556.
356. *Kuhl P., Könnecke A., Döring G., Däumer H., Jakubke H.-D.*, Tetrahedron Letters, **1980**, 893.
356a. *Мартинек К., Семенов А. Н., Березин И. В.*, — ДАН СССР, **1980**, **254**, с. 121.
357. *Goodman M., Glaser C.*, см. [47], с. 267.
358. *Williams M. M., Young G. T.*, J. Chem. Soc., **1964**, 3701.
359. *Kemp D. S., Chien S. W.*, J. Am. Chem. Soc., **89**, 2745 (1967).
360. *Weygand F. et al.*, Tetrahedron, Suppl., **8**, 9 (1966).
361. *Benoit N. L., Chen F. M. F.*, см. [52], с. 261.
362. *Kemp D. S.*, см. [42], с. 1.
363. *Goodman M., Levine L.*, J. Am. Chem. Soc., **86**, 2918 (1964).
364. *Goodman M., Glaser C.*, Chem. Engng. News., **46**, 40 (1968).
365. *Young G. T.*, см. [39], с. 55.
366. *Liberek B.*, Tetrahedron Letters, **1963**, 925.
367. *Kovacs J. et al.*, Chem. Commun., **1970**, 53; *ibid.*, **1968**, 1066.
368. *Almy J., Cram D. J.*, J. Am. Chem. Soc., **91**, 4459 (1969).
369. *Kovacs J. et al.*, J. Am. Chem. Soc., **93**, 1541 (1971).
370. *Liberek B.*, Tetrahedron Letters, **1963**, 1103.
371. *Anderson G. W., Callahan F. M.*, J. Am. Chem. Soc., **80**, 2902 (1958).
372. *Williams M. W., Young G. T.*, J. Chem. Soc., **1963**, 881.
373. *Kemp D. S. et al.*, J. Am. Chem. Soc., **92**, 1043, 5792 (1970).
374. *Weygand F. et al.*, Angew. Chem., **75**, 282 (1963).
375. *Weygand F. et al.*, Chem. Ber., **99**, 1451 (1966).
376. *Weygand F. et al.*, Z. Naturforschg., **23b**, 279 (1968).
377. *Izumiya N., Muraoka M.*, J. Am. Chem. Soc., **91**, 2391 (1969).
378. *Bodanszky M., Conklin L. E.*, Chem. Commun., **1967**, 773.
379. *Halpern B. et al.*, Tetrahedron Letters, **1967**, 3075.
380. *Hirschmann R. et al.*, J. Am. Chem. Soc., **90**, 3255 (1968).
381. *Bosshard H. R., Schechter I., Berger A.*, Helv. Chim. Acta, **56**, 717 (1973).
382. *Goodman M. et al.*, Bioorg. Chem., **6**, 239 (1977).
383. *Wolters E. T. et al.*, J. Org. Chem., **39**, 3388 (1974).
384. *Borsook H.*, Adv. Protein Chem. **8**, 127 (1953), обзор.
385. *Feinberg R. S., Merrifield R. B.*, Tetrahedron, **30**, 3209 (1974).
386. *Könnecke A. et al.*, Mn. Chem., **112**, 469 (1981).
387. *Fujino M. et al.*, Chem. Pharm. Bull. Japan, **26**, 585 (1978); см. [54], с. 28.
388. *Benoit L. et al.*, см. [46], с. 165.
389. *Merrifield R. B.*, J. Am. Chem. Soc., **85**, 2149 (1963).
390. *Nicholls R. V. V.*, Angew. Chem., **67**, 333 (1955).
391. *Merrifield R. B.*, Adv. Enzymol., **32**, 221 (1969); *Marshall G. R., Merrifield R. B.* in: Biochemical Aspects of Reactions on Solid Supports (G. K. Stark, Ed.), pp. 11-169, Academic Press, New York, 1971; *Merrifield R. B.* in: Chemistry of Polypeptides (P. G. Katsoyannis, Ed.), pp. 335-361, Plenum, New York, 1973; *Erickson B. W., Merrifield R. B.*, in: The Proteins (H. Neurath, R. L. Hill, Eds.), 3 Ed., Bd. 2, pp. 255-537, Academic Press, New York, 1976.

392. *Meienhofer J.* in: *Hormonal Proteins and Peptides* (C. H. Li, Ed.), Bd. 2, pp.45-267, Academic Press, New York, 1973.
393. *Manning M.* in: *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, Suppl.1, pp.492-510, 1976.
394. *Losse G., Neubert K.*, *Z. Chem.*, **10**, 48 (1970).
395. *Birr Ch.* in: *Reactivity and Structure Concepts in Organic Chemistry* (K. Hafner et al., Eds.), Bd. 8, Springer-Verlag, Berlin — Heidelberg-New York, 1978.
396. *Stewart J. M., Young J. D.*, *Solid Phase Peptide Synthesis*, Freeman, San Francisco, 1969.
397. *Jones J. H.*, см. [27], т. 2, с. 159.
398. *Wünsch E.*, *Angew. Chem.*, **83**, 773 (1971).
399. *Bayer E. et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 1735 (1970).
400. *Parr W., Brohmann K.*, *Tetrahedron Letters*, **1971**, 2633.
401. *Sheppard R. C.*, см. [42], с. 111.
402. *Atherton E. et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 6584 (1975).
403. *Wieland Th., et al.*, *Annalen*, **727**, 130 (1969).
404. *Buis J. T.*, Dissertation Universität Nijmegen, p.5, 1973.
405. *Southard G. T. et al.*, *Tetrahedron Letters*, **1969**, 3505.
406. *Pietta P. G., Marshall G. R.*, *Chem. Commun.*, **1970**, 650.
407. *Flanigan E., Marshall G. R.*, *Tetrahedron Letters*, **1970**, 2403.
408. *Tilak M. A., Hollinden C. S.*, *Tetrahedron Letters*, **1968**, 1297.
409. *Bayer E. et al.*, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **352**, 759 (1971).
410. *Weygand F. et al.*, см. [40], с. 183.
411. *Wang S. S., Merrifield R. B.*, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **4**, 309 (1972).
412. *Birr Ch. et al.*, см. [42], с. 175.
413. *Tesser G. T., Ellenbrock B. W. J.*, см. [39], с. 144.
414. *Gross E. et al.*, *Angew. Chem.*, **85**, 672 (1973).
415. *Mitchell A. B. et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 7357 (1976).
416. *Blake J., Li C. H.*, *Chem. Commun.*, **1976**, 504.
417. *Sparrow J. T. et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 1422 (1976).
418. *Rich D. H., Gurwara S. K.*, *Tetrahedron Letters*, **1975**, 301.
419. *Wang S. S.*, *J. Org. Chem.*, **41**, 3258 (1976).
420. *Merrifield R. B.*, *Pure Appl. Chem.*, **50**, 643 (1978); *Tetrahedron Letters*, **1979**, 4935.
421. *Kenner G. W. et al.*, *Chem. Commun.*, **1971**, 636.
422. *Loffet J. A.*, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **3**, 297 (1971).
423. *Bodanszky M., Sheehan J. T.*, *Chem. Ind.*, **1966**, 1597.
424. *Tesser G. T., Ellenbroek B. W. J.*, см. [39], с. 124.
425. *Atherton E. et al.*, см. [46], с. 207.
426. *Chang C. D., Meienhofer J.*, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **11**, 246 (1978).
427. *Pless J., Bauer W.*, *Angew. Chem.*, **85**, 142 (1973).
428. *Rebek J.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 4052 (1973).
429. *Hagenmair H.*, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **353**, 1973 (1972).
430. *Hagenmair H.*, *Tetrahedron Letters*, **1970**, 283.
431. *Bayer E. et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 1735 (1970).
432. *Mitchell A. R., Roeske R. W.*, *J. Org. Chem.*, **35**, 1171 (1970).
433. *Anfinsen C. B. et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 1353 (1972).
434. *Esko K., Karlson S.*, *Acta Chem. Scand.*, **24**, 1415 (1970).
435. *Elliot D. F. et al.*, *J. Chem. Soc. Perkin I*, **1972**, 1862.
436. *Jakubke H.-D., Baumert A.*, см. [42], с. 132.
437. *Dorman D. S.*, *Tetrahedron Letters*, **1969**, 2319.

438. *Losse G., Ulbrich R.*, Tetrahedron, **28**, 5823 (1972).
439. *Brunfeldt K. et al.*, Acta Chem. Scand., **23**, 2906 (1969).
440. *Merrifield R. B. et al.*, Anal. Chem., **38**, 1905 (1966).
441. *Brunfeldt K. et al.*, Acta Chem. Scand., **23**, 2830 (1969).
442. *Birr Ch. et al.* см. [42], с. 175.
443. *Jakubke H.-D. et al.*, 4th Int. Symp. on Affinity Chromat., Abstracts B-62, 1981.
444. *Merrifield R. B.*, Biochemistry, **3**, 1385 (1964).
445. *Marshall G. R., Merrifield R. B.*, Biochemistry, **4**, 2394 (1965).
446. *Marglin A., Merrifield R. B.*, J. Am. Chem. Soc., **88**, 5051 (1966).
447. *Bayer E. et al.*, Tetrahedron Letters, **24**, 4853 (1968).
448. *Manning M.*, J. Am. Chem. Soc., **90**, 1348 (1968).
449. *Gutte B., Merrifield R. B.*, J. Am. Chem. Soc., **91**, 501 (1969).
450. *Sano S., Kurihara M.*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **350**, 1183 (1969).
451. *Ontjes D. A., Anfinsen C. F.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **64**, 428 (1969).
452. *Wieland Th. et al.*, Annalen, **727**, 130 (1969).
453. *Li C. H., Yamashiro D.*, J. Am. Chem. Soc., **92**, 7608 (1970).
454. *Potts jr. J. T. et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **68**, 63 (1971).
455. *Sharp J. J. et al.*, J. Am. Chem. Soc., **95**, 6097 (1973).
456. *Hancock W. S. et al.*, Am. Chem. Soc. **93**, 1799 (1971).
457. *Noda K. et al.*, Naturwiss., **58**, 147 (1971).
458. *Yajima H., Kiso Y.*, Chem. Pharm. Bull. Japan, **22**, 1078 (1974).
459. *Treagar G. W. et al.*, Nature New Biol., **232**, 87 (1971).
460. *Ohno M. et al.*, J. Am. Chem. Soc., **93**, 5251 (1971).
461. *Matsuo H. et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **45**, 822 (1971).
462. *Aoyagi H. et al.*, Biochem. Biophys. Acta, **263**, 827 (1972).
463. *Izumiya N. et al.*, см. [49], с. 269.
464. *Yamashiro D., Li C. H.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **54**, 883 (1973).
465. *Colescott R. L. et al.*, см. [50], с. 463.
466. *Семёнов А. Н., Мартинек К.*, Биоорганическая химия, **6**, 1559 (1980).
467. *Merrifield R. B.*, Intr. Sci. Chem. Rep., **5**, 183 (1971).
468. *Niall H. D.*, Nature New Biol., **230**, 90 (1971).
469. *Letsinger R. L. et al.*, J. Am. Chem. Soc., **85**, 3045 (1963).
470. *Felix A. M., Merrifield R. B.*, J. Am. Chem. Soc., **92**, 1385 (1970).
471. *Shemyakin M. M. et al.*, Tetrahedron Letters, **1965**, 2323.
472. *Mutter M. et al.*, Angew. Chem., **83**, 883 (1971).
473. *Mutter M., Bayer E.*, Angew. Chem., **86**, 101 (1974).
474. *Hagenmair H.*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **356**, 777 (1975).
475. *Göhring W., Jung G.*, Annalen, **1975**, 1765, 1776, 1781.
476. *Pfaender P. et al.*, см. [44], с. 137.
477. *Frank H., Hagenmair H.*, Experientia, **31**, 131 (1975).
478. *Fridkin M. et al.*, J. Am. Chem. Soc., **88**, 3164 (1966).
479. *Wieland Th., Birr Ch.*, Angew. Chem., **78**, 303 (1966).
480. *Fridkin M. et al.*, см. [50], с. 395.
481. *Kalir R. et al.*, Eur. J. Biochem., **42**, 151 (1974).
482. *Wolman Y. et al.*, Chem. Commun., **1967**, 629.
483. *Ito H. et al.*, Chemistry Letters, **1975**, 577.
484. *Horiko K.*, Tetrahedron Letters, **1976**, 4103.
485. *Brown J., Williams R. E.*, Canad. J. Chem., **49**, 3765 (1971).
486. *Jung G. et al.*, см. [50], с. 433.
487. *Mutter M. et al.*, см. [46], с. 239.

488. Fridkin M. et al., J. Am. Chem. Soc., **87**, 4646 (1965).
489. Flanigan E., Marshall G. R., Tetrahedron Letters, **1970**, 2403.
490. Schwyzler R., Sieber P., Helv. Chim. Acta, **41**, 2186, 2190, 2199 (1958).
491. Schwyzler R. et al., Helv. Chim. Acta, **47**, 441 (1964).
492. Rothe M. et al., Angew. Chem., **77**, 347 (1965).
492a. Bats J. W., Friedrich A., Fuess H., Kessler H., Mästle W., Rothe M., Angew. Chem., **91**, 573 (1979).
493. Du Vigneaud V. et al., J. Am. Chem. Soc., **75**, 4879 (1953).
494. Kamber B., Helv. Chim. Acta, **56**, 1370 (1973).
495. Sieber P. et al., Helv. Chim. Acta, **57**, 2617 (1974).
496. Hiskey R. G., Ward jr. B. F., J. Org. Chem., **35**, 1118 (1970).
497. Zervas L. et al., J. Am. Chem. Soc., **87**, 4922 (1965).
498. Hiskey R. G. et al., J. Am. Chem. Soc., **91**, 7525 (1969).
499. Freedman M. in: The Chemistry and Biochemistry of the Sulfhydryl Group, pp.199-229, Pergamon Press, Oxford, 1973.
500. Losse G., Bachmann G., Chem. Ber., **97**, 2671 (1964).
501. Gibian H., Lübke K., Annalen, **644**, 130 (1961).
502. Schwyzler R., Carrion J. P., Helv. Chim. Acta, **43**, 2101 (1960).
503. Ugi I., Fetzer U., Angew. Chem., **73**, 621 (1961).
504. Plattner P. A. et al., Helv. Chim. Acta, **46**, 927 (1963).
505. Shemyakin M. M. et al., Tetrahedron, **19**, 955 (1963).
506. Schwyzler R., Tun-Kyi A., Helv. Chim. Acta, **45**, 859 (1962).
507. Ivanov V. T. et al., см. [37], с. 337.
508. Шемякин М. М. и др., Журн. общ. химии, **36**, 1391 (1966).
509. Rothe M., Kreiss W., Angew. Chem., **85**, 1113 (1973).
510. Rothe M., Kreiss W., Angew. Chem., **89**, 117 (1977).
511. Shemyakin M. M. et al., Tetrahedron, **21**, 3537 (1965).
512. Abgekürzte Nomenklatur synthetischer Polypeptide, IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **349**, 1013-1016 (1968).
513. Bamford B. H., Elliott A., Hanby W. E., in: Physical Chemistry (E. Hutchinson, Ed.), Vol. V: Synthetic polypeptides, Academic Press, New York, 1956.
514. Katchalski E., Adv. Protein Chem. **6**, 123 (1959).
515. Katchalski E., Sela M., Adv. Protein Chem. **13**, 243 (1966).
516. Blout E. R., Polyamino Acids, Polypeptides and Proteins (M. A. Stahman, Ed.), University of Wisconsin Press, Madison, Wisc., 1962.
517. Fasman D., Poly- α -Amino Acids, Protein Models for Conformation Studies, Vol.1, Biological Macromolecules Series, Dekker, New York, 1967.
518. Johnson B. J., J. Pharm. Sci., **63**, 313 (1974).
519. Brack A., Spach G., C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. Paris, Ser. D, **271**, 916 (1970).
520. Zeiger A. R. et al., Biopolymers, **12**, 2135 (1973).
521. Wieland Th., Angew. Chem., **63**, 7 (1951).
522. Wieland Th. et al., Annalen, **633**, 185 (1960).
523. Knorre D. G., Shubina T. N., см. [38], с. 77.
524. Sheehan J. C. et al., J. Am. Chem. Soc., **87**, 2492 (1965).
525. Poduška K., Coll. Czech. Chem. Commun., **33**, 3779 (1968).
526. Schneider C. H., Wirz W., Helv. Chim. Acta, **55**, 1062 (1972).
527. Muramatsu I. et al., Chemistry Letters, **1977**, 1057.
528. Kisfaludy L. et al., Tetrahedron Letters, **1974**, 1785.
529. Bodanszky M. et al., J. Org. Chem., **39**, 444 (1974).

530. Van Zon A., Beuerman H. C., *Helv. Chim. Acta*, **59**, 1112 (1976).
531. Kisfaludy L., Nyeki O., *Acta Chem. Acad. Sci. Hung.*, **86**, 343 (1975).
532. Penke B. et al., см. [45], с. 101.
533. Meienhofer J., *Chemtech.*, **1973**, 242.
534. Erickson B. W., Merrifield R. B., in: *The Proteins*, Vol.2, Academic Press, New York, 1976.
535. Zapevalova N. P., Maximov E. E., Mitin Yu. V., см. [46], с. 231.
536. Riniker B. et al., см. [46], с. 631.
537. Gil-Av E., Feibusch B., *Tetrahedron Letters*, **1967**, 3345.
538. König W., Nicholson G. I., *Anal. Chem.*, **47**, 951 (1975).
539. Weygand F., Ragnarsson U., *Z. Naturforschg.*, **21b**, 1141 (1966).
540. Offord R. E., Di Bello C. (Eds.), *Semisynthetic Peptides and Proteins*, Academic Press, New York, 1978.
541. Tesser G. I., Boon P. J., *Semisynthesis in Protein Chemistry*, Recl. Trav. Chim. des Pays-Bas, **99**, 289 (1980).
542. Schnabel E. et al., *Annalen*, **749**, 90 (1971).
543. Klausner Y. S., Bodanszky M., *Bioorg. Chem.*, **2**, 354 (1973).
544. Eberle A., Schwyzer R., *Helv. Chim. Acta*, **58**, 1091 (1975).
545. Vorbrüggen H., Krolkiewicz K., *Angew. Chem.*, **87**, 877 (1975).
546. Riniker B. et al., *Helv. Chim. Acta*, **58**, 1086 (1975).
547. Felix A. M., *J. Org. Chem.*, **39**, 1427 (1974).
548. Yajima H. et al., *Chem. Commun.*, **1974**, 107.
549. Yajima H. et al., *Chem. Pharm. Bull. Japan*, **23**, 1164 (1975).
550. Matsuura S., *Chem. Commun.*, **1976**, 451.
551. Semmelhack M. F., Heinsohn G. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 5139 (1972).
552. Ohno M., Anfinsen C. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 4098 (1970).
553. Blecher H., Pfaender P., *Annalen*, **1973**, 1263.
554. Meyers C., Glass J. D., см. [50], с. 325.
555. Glass G. D., Pelzig M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 2739 (1975).
556. Boissonnas R. A., Preitner G., *Helv. Chim. Acta*, **36**, 875 (1953).
557. Blaha K., Rudinger J., *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **30**, 585 (1965).
558. Losse G. et al., *Annalen*, **715**, 196 (1968).
559. Galpin I. J. et al., см. [46], с. 665.
560. Fujii N., Yajima H., *J. Chem. Soc.*, **1981**, 831.
561. Yanaihara N. et al., см. [55], с. 195.
562. Föhles J. et al. in: *15th Eur. Peptide Symp.*, Gdansk, Abstracts, p.65. 1978.
563. Schwyzer R., Sieber P., *Nature*, **199**, 172 (1963).
564. Bajusz S. et al., *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.*, **52**, 335 (1967).
565. Ivanov V. T. et al., см. [45], с. 219; [46], с. 41.
566. Wunsch E., *Z. Naturforschg.*, **22b**, 1269 (1967).
567. Bodanszky M. et al., *Chem. Ind.*, **1966**, 1757.
568. Feurer M., см. [51], с. 448.
569. Hamprecht B., *Angew. Chem.*, **88**, 211 (1976).
570. Cuatrecasas P., *Biochem. Pharm.*, **23**, 2353 (1974).
571. Cuatrecasas P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **63**, 450 (1969).
572. Lefkowitz R. J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **65**, 745 (1970).
573. Goodfriend T., Lin S. Y., *Clin. Res.*, **17**, 243 (1969).
574. Lübke K. et al., *Angew. Chem.*, **88**, 790 (1976).
575. Kalota G. B., *Science*, **201**, 895 (1978).
576. Shome B. et al., *Endocrinol. Metab.*, **39**, 199, 203 (1974).

577. Gonadotropins and Gonadal Function (N. R. Mondgal, Ed.), Academic Press, New York, 1974.
578. Sairam M. R., Li C. H., Arch. Biochem. Biophys., **165**, 709 (1974).
579. Niall H. D. et al., Rec. Progr. Hormone Res., **29**, 387 (1973).
580. Schwabe C. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., **75**, 503 (1977); Science, **197**, 914 (1977).
581. Hormonal Proteins and Peptides (C. H. Li, Ed.), (a) Vol. 1, 1973; (b) Vol. 2, 1973; (c) Vol. 3, 1975; (d) Vol. 4, 1977.
582. Methods in Investigate and Diagnostic Endocrinology (S. A. Berson, R. S. Yalow, Eds.), Vols. 2a, 2b.; Peptide Hormones North-Holland, Elsevier, New York, 1973.
583. Peptide Hormones, Hormone Action (B. W. O'Malley, J. G. Hardman, Eds.), Part B; Methods Enzymol., **37**, 1975.
584. Rudinger J., The Design of Peptide Hormone Analogs, in: Drug Design (E. J. Ariens, Ed.), Vol. 11/II, Academic Press, New York, 1972.
585. Goth E., Fövényi J., Polypeptide Hormones, Akademiai Kiado, Budapest, 1971.
586. Ross M. J., National Institutes of Health Recombinant DNA Technical Bulletins, **3**, 1 (1980).
587. Peptide Hormones (J. A. Parson, Ed.), University Park Press, Baltimore, 1976.
588. Karlson P., Naturwiss., **62**, 126 (1975).
589. Guillemin R., Neurosciences, **16**, Suppl. 1 (1978).
590. Hormone-Receptor Interaction: Molecular Aspects (G. S. Levey, Ed.), Dekker, New York, 1976.
591. Methods of Hormone Radioimmunoassay (B. M. Jaffe, Behrman, Eds.), Academic Press, New York, 1974.
592. Blackwell R. E., Guillemin R., Ann. Rev. Physiol., **35**, 357 (1973).
593. Schwyzler R. et al., in: Structure-Activity Relationships of Protein and Polypeptide Hormones (M. Margoulies, F. C. Greenwood, Eds.), pp.167-175, Experta Medica, Amsterdam, 1972.
594. Riniker B. et al., Nature New Biol., **235**, 114 (1972).
595. Li C. H., Biochem. Biophys. Res. Commun., **49**, 85 (1972).
596. Schwyzler R., Sieber P., Helv. Chim. Acta, **49**, 134 (1963).
597. Mains R. E., Eiper B. A., Ling N., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 3014 (1977).
598. Chrétién M., Seidah N. G., Chemistry and Biosynthesis of Pro-opiomelanocortin, Mol. Cell. Biochemistry, **34**, 101 (1981).
599. Cohen S. N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **70**, 3240 (1973).
600. Sanger F., Coulson A. P., FEBS Lett., **87**, 107 (1978).
601. Nakakinishi S. et al., Nature, **278**, 423 (1979); см. [52], с. 957.
602. Growth and Growth Hormone (A. Pecile, E. E. Müller, Eds.), Experta Medica, Amsterdam, 1972.
603. Root A. W., Human Pituitary Growth Hormone, Thomas, Springfield, Ill., 1972.
604. Advances in Human Growth Hormone Research (S. Raiti, Ed.), pp.74-612, DHEW Publication. NIH, 1974.
605. Li C. H., Yamashiro D., J. Am. Chem. Soc., **92**, 7608 (1970).
606. Fryklund L., Sievertsson H., FEBS Letters, **87**, 55 (1978).
607. Niall D. H. et al. Recent Progr. Hormone Res., **29**, 387 (1973).
608. Maurer R. A. et al., Biochem. J., **161**, 189 (1977).
609. Li C. H., Nature **201**, 924 (1964); ibid. **208**, 1093 (1965).
610. Smith L., Biochem. Education, **8**, 1 (1980).
611. Graf L. et al., Biochem. Biophys. Acta, **229**, 276 (1971).
612. Chang A. C. Y. et al., см. [52], с. 957.

613. Yoshimi H. et al., *Life Sci.*, **22**, 2189 (1978).
614. Schwyzer R., Eberle A., *Front. Hormone Res.*, **4**, 18 (1977).
615. Eberle A., Schwyzer R. in: *Surface Membrane Receptors* (R. A. Bradshaw et al., Eds.), Plenum Press, New York, p.291, 1976.
616. Eberle A. et al., *Bull. Schweiz. Acad. Med. Wiss.*, **34**, 99 (1978).
617. *Melanocyte Stimulating Hormone: Control, Chemistry and Effects* (F. J. Tilders et al., Eds.), Karger, Basel, 1977.
618. Du Vigneaud V., in: *Perspectives in Biological Chemistry* (R. E. Olson, Ed.), p.133, Dekker, New York, 1970.
619. Acher R. et al., *Eur. J. Biochem.*, **40**, 585 (1973).
620. Acher R., *Angew. Chem.*, **91**, 905 (1979).
620a. Land J. H., Schütz G., Schmale H., Richter D., *Nature*, **295**, 299 (1982).
621. Pliska V., *Neuroscience Letters, Suppl.*, **1**, 225 (1978).
622. Du Vigneaud V. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 3115 (1954).
623. Manning M. et al., *Biochemistry*, **9**, 3925 (1970).
624. Walter R. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 4528 (1974).
625. Walter R., см. [43], с. 324.
626. Urry D. W., Walter R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 956 (1971).
627. Walter R. et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **336**, 294 (1974); *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 972 (1978).
628. Manning M. et al., *J. Med. Chem.*, **16**, 975 (1973); *Endocrinology*, **94**, 1106 (1974).
629. Chan W. Y. et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **146**, 364 (1974).
630. Marbach P., Rudinger J., *Experientia*, **30**, 696 (1974).
631. Procházka Z. et al., *Col. Czech. Chem. Commun.*, **43**, 1285 (1978); *ibid.*, **31**, 4581 (1966).
632. *Hypophysiotropic Hormone of the Hypothalamus: Assay and Chemistry* (J. Meites, Ed.), Williams & Wilkers Comp., Baltimore, 1970.
633. Voelter W., *Chemiker-Ztg.*, **98**, 554 (1974); **100**, 130 (1976).
634. *Hypothalamic Hormones. Chemistry, Physiology, Pharmacology and Clinical Use* (M. Motta et al., Eds.), *Proc. Sero. Symp.*, Vol.6, Academic Press, New York, 1975.
635. *Hypothalamic Hormones. Structure, Synthesis and Biological Activity* (D. Gupta, W. Voelter, Eds.), Verlag Chemie, Weinheim, 1975.
636. *Frontiers in Neuroendocrinology* (L. Martini, W. F. Ganong, Eds.), Vol.4, Raven Press, New York, 1976.
637. Vale W. et al., *Ann. Rev. Physiol.*, **39**, 473 (1977).
638. Blech W., *Endokrinologie*, **69**, 369 (1977); **71**, 214 (1978); **72**, 77 (1978).
639. Voelter W., *The Nomenclature of Peptide Hormones*, *J. Biol. Chem.*, **250**, 3215 (1975).
640. Nair R. M. G. et al., *Biochemistry*, **9**, 1103 (1970).
641. Burgus R. et al., *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. Paris, Ser. D*, **269**, 1870 (1969).
642. Burgus R. et al., *Nature*, **226**, 322 (1970).
643. Rivier J. et al., *J. Med. Chem.*, **15**, 479 (1972).
644. Peterson R. E., Guillemin R. G., *Amer. J. Med.*, **57**, 591 (1974).
645. Schally A. V., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 393 (1971).
646. Amoss M. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 205 (1974).
647. Blech W., *Endokrinologie*, **71**, 214 (1978).
648. Matsuo H. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 1334 (1971).
649. Labrie F. et al., *Endocrinology*, **98**, 289 (1976).
650. Blech W., *Endokrinologie*, **71**, 325 (1978).

651. Lowry P. J., *J. Endocrinol.*, **62**, 163 (1974).
652. Portens S. E., Malven P. V., *Endocrinology*, **94**, 1699 (1974).
653. Celis M. E. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 1428 (1971).
654. Nair R. M. G. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 1376 (1971).
655. Walter R. et al., *Brain Res.*, **60**, 449 (1973).
656. Walter R. in: *Psychoneuroendocrinology* (N. Hatonani, Ed.), p.285, Karger, New York, 1974.
657. Schally A. V. et al., *Endocrinology*, **84**, 1493 (1969).
658. Blech W., *Endokrinologie*, **72**, 77 (1978).
659. Vale W. et al., *Somatostatin, Rec. Progr. Horm. Res.*, **31**, 365 (1975).
660. Burgus R. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 684 (1973).
661. Schally A. V. et al., *Biochemistry*, **15**, 509 (1976).
661a. Goodman R. H. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5869 (1980).
662. Rivier J. et al., *см.* [50], с. 863.
663. Veber D., *см.* [52], с. 409.
664. Rivier J., *Int. Symp. on Somatostatin, Freiburg, Abstr.*; 1977; *Diabetes*, **26**, Suppl. 1, 360.
665. Garsky V. M. et al., *см.* [52], с. 547.
666. Itakura K. et al., *Science*, **198**, 1056 (1977).
667. Klostermeyer H., Humbel R. E., *Angew. Chem.*, **78**, 871 (1966).
668. Zahn H., *Naturwiss.*, **54**, 396 (1967).
669. Lübke K., Klostermeyer H., *Adv. Enzymol.*, **35**, 445 (1970).
670. Geiger R., *Chemiker-Ztg.*, **100**, 111 (1976).
671. Du Y.-C. et al., *Sci. Sin.*, **10**, 84 (1961).
672. Meienhofer J. et al., *Z. Naturforsch.*, **18b**, 1120 (1963).
673. Katsoyannis P. G. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 930 (1964).
674. Kung Y.-t. et al., *Sci. Sin.*, **14**, 1710 (1965).
675. Steiner D. F. et al., *Science*, **157**, 697 (1967).
676. Chan J. S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 1964 (1976).
677. Yanaihara N. et al., *см.* [55], с. 195.
678. Föhles J. et al., *15th Europ. Pept. Symp.*, Gdansk, p.65, 1978.
679. Blundell T. L. et al., *Rec. Progr. Horm. Res.*, **27**, 1 (1971).
680. Geiger R., Obermeier R., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **55**, 60 (1973).
681. Cuatrecasas P., *Fed. Proc.*, **32**, 1838 (1973).
682. Villa-Komaroff L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3727 (1978).
683. Goeddel D. Y. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 106 (1979).
684. Wunsch E. et al., *Chem. Ber.*, **101**, 3659 (1968).
685. Wunsch E. et al., *Chem. Ber.*, **101**, 3664 (1968).
686. Tager H. S., Steiner D. F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 2321 (1973).
687. Patzelt C. et al., *Nature*, **282**, 260 (1979).
687a. Habener J. F. et al., in: *Peptides, Synthesis — Structure — Function, Proc. 7th Am. Peptide Symp.*, p. 457 (1981).
688. Brewer H. B. et al., *Amer. J. Med.*, **56**, 759 (1974).
689. Keutmann H. T. et al., *Biochemistry*, **17**, 5723 (1978).
690. Hamilton J. W. et al., *Fed. Proc.*, **32**, 269 (1973).
691. Maurer R. A. et al., *Biochem. J.*, **161**, 189 (1977).
692. Potts J. T. et al. in: *Calcitonin 1969* (S. Taylor, G. Foster, Eds.), Heinemann, London, 1970.
693. Rittel W. et al., *Experientia*, **32**, 246 (1976).
693a. Jacobs J. W. et al., *Science*, **213**, 457 (1981).
694. Brown J. C. et al., *Canad. J. Biochem.*, **49**, 255, 867 (1971).

695. Said S. I., Mutt V., *Eur. J. Biochem.*, **28**, 199 (1972).
696. Suzuki S. *et al.*, *см.* [54], с. 151.
697. Gregory H., *Nature*, **257**, 325 (1975).
698. Kenner G. W., *Chem. Ind.*, **1972**, 791.
699. Morley J. S., *Proc. Roy. Soc. B.*, **170**, 97 (1968).
700. Noyes B. E. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1770 (1979).
701. Wünsch E. *et al.*, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **362**, 179 (1981).
702. Gregory R. A., Tracy H. J., *Gut*, **15**, 683 (1974).
703. Moore S. *et al.*, *см.* [52], с. 503.
704. Mut V., Jorpes J. E., *Rec. Progr. Horm. Res.*, **23**, 483 (1967).
705. Wünsch E., *Naturwiss.*, **59**, 239 (1972).
706. Jorpes J. E. *et al.*, *Acta Chem. Scand.*, **18**, 2408 (1964).
707. Mut V., Jorpes J. E., *Eur. J. Biochem.*, **6**, 156 (1968).
708. Brown J. C. *et al.*, *Canad. J. Physiol. Pharm.*, **49**, 212 (1971); *Gastroenterology*, **62**, 401 (1972); *Canad. J. Biochem.*, **51**, 533 (1973); *ibid.*, **52**, 7 (1974).
709. Wünsch E. *et al.*, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **357**, 477 (1976).
710. Fujino M. *et al.*, *см.* [54], с. 61.
711. Fisher J. W., *Kidney Hormones*, Academic Press, London, 1971.
712. Werning C., *Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System*, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart, 1972.
713. Peart W. S., *Roy. Soc. Ser.*, **B 173**, 317 (1969).
714. V. Euler U. S., Pernow P., *Substance P*, Raven Press, New York, 1977.
715. Skrabanek P., Powell D., *Substance P*, Ann. Res. Rev., Eden Press, Montreal, 1978.
716. Studer R. O. *et al.*, *Helv. Chim. Acta*, **56**, 860 (1973).
717. Carraway R., Leeman S., *J. Biol. Chem.*, **248**, 6854 (1973); *см.* [50], с. 679.
718. Bisette G. *et al.*, *Life Sci.*, **23**, 2173 (1978).
719. Araki K. *et al.*, *Chem. Pharm. Bull. Japan*, **21**, 2801 (1973).
720. Erdös E. G., Wilde A. F., *Bradykinin, Kallidin und Kallikrein*, in: *Handbuch der experimentellen Pharmakologie*, Bd. XXV, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1970.
721. Frey E. K. *et al.*, *Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren*, 2 Aufl., Enke-Verlag, Stuttgart, 1968.
722. De Castiglione R., Angelucci F., *см.* [45], с. 529.
723. Ersparmer V., Anastasi A., *Experientia*, **18**, 58 (1962).
724. Sandrin E., Boissonnas R. A., *Experientia*, **18**, 59 (1962).
725. Bernardi L. *et al.*, *Experientia*, **20**, 492 (1964).
726. Anastasi A., Falcomeri Ersparmer G., *Experientia*, **26**, 866 (1970).
727. Anastasi A. *et al.*, *Experientia*, **31**, 394 (1975).
728. Anastasi A. *et al.*, *Experientia*, **33**, 857 (1977).
729. Sasaki T. *et al.*, *см.* [55], с. 11.
730. Anastasi A. *et al.*, *Experientia*, **27**, 166 (1971).
731. Brown M. *et al.*, *Science*, **196**, 998 (1977).
732. De Castiglione, Angelucci F., *см.* [50], с. 529.
733. De Castiglione R. *et al.*, *см.* [43], с. 463.
734. Anastasi A. *et al.*, *Comp. Biochem. Physiol.*, **14**, 43 (1965).
735. Nakajima T. *et al.*, *Chem. Pharm. Bull. Japan*, **16**, 769 (1968).
736. Nakajima T. *et al.*, *Fed. Proc.*, **29**, 282 (1970).
737. Yasuhara T., Nakajima T., *Chem. Pharm. Bull. Japan*, **25**, 2464 (1977); *см.* [54], с. 159.
738. *Peptides in Neurobiology* (H. Gainer, Ed.), Plenum Press, New York, 1977.

739. *Neuropeptide Influences on the Brain and Behavior* (L. H. Miller, C. A. Sandman, A. J. Kastin, Eds.), Raven Press, New York, 1977.
740. *Centrally Acting Peptides* (J. Hughes, Ed.), Macmillan, London, 1977.
741. *Collu R., Ducharme J. R., Barteau A., Central Nervous System Effect of Hypothalamus Hormones and Other Peptides*, Raven Press, New York, 1979.
742. *Graf L., Palkovits M., Ronai A. Z., Endorphins '78*, Academiai Kiado, Budapest, 1978.
743. *Walker R. J., Polypeptides as Central Transmitters*, *Gen. Pharmacol.*, **9**, 129 (1978).
744. *Brown M., Vale W., Central Nervous Effects of Hypothalamic Hormones*, *Endocrinology*, **96**, 1333 (1975).
745. *Monnier M., Schoenberger G. A. S., Neuro-humoral Coding of Sleep by the Physiological Sleep Factor Delta*, in: *Neurochemical Coding of Brain Function* (R. D. Myers, R. R. Drucker, Eds.), Odín, New York, 1974.
746. *Dunn A. H., The Chemistry of Learning and the Formation of Memory*, in: *Molecular and Functional Neurobiology* (W. H. Gispen, Ed.), pp.347-387, Elsevier, Amsterdam, 1976.
747. *De Wied D., Witter A., Greven H. M., Behaviorally Active ACTH Analogues*, *Biochem. Pharmacol.*, **24**, 1463 (1975).
748. *De Wied D. et al., Pituitary Peptides and Memory*, *cm.* [50], c. 635.
749. *Prange A. J. et al., Peptides and the Central Nervous System*, in: *Handbook of Psychopharmacology* (L. L. Iversen et al., Eds.), Vol. 7, Plenum Press, New York, 1978.
750. *Sterba G., Das oxytocinerge neurosekretorische System der Wirbeltiere. Beitrag zu einem erweiterten Konzept*, *Zool. Jahrb. Abtl. Zool. Physiol. Tiere*, **78**, 409 (1974).
751. *De Wied D., Life Sci.*, **20**, 195 (1977).
752. *Van Riezen H., Rigter H., Arzneimittelforsch.*, **28**, 1294 (1978).
753. *Brown B. E., Life Sci.*, **17**, 1241 (1975).
754. *Brown B. E., Starrat A. N., J. Insect Physiol.*, **21**, 1879 (1975).
755. *Van Riezen H. et al., cm.* [739], c. 11.
756. *Ungar G., Agents and Actions*, **1**, 155 (1970).
757. *Ungar G., Life Sci.*, **14**, 595 (1974).
758. *Ungar G., Peptides and Behavior*, in: *International Review of Neurobiology* (C. C. Pfeifer, J. R. Smythies, Eds.), Vol. 17, pp. 37-59, Academic Press, New York, 1975.
759. *Ungar G. et al., cm.* [50], c. 673.
760. *Beaumont A., Hughes J., Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **19**, 245 (1979).
761. *Terenius L., Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **18**, 189 (1978).
762. *Klee W. A., Nirenberg M., Nature*, **263**, 609 (1976).
763. *Opiates and Endogenous Opioid Peptides* (H. W. Klosterlitz, Ed.), North-Holland, Amsterdam, 1976.
764. *Goldstein A., Science*, **193**, 1081 (1976).
765. *Goldstein A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 1742 (1971).
766. *Snyder S. H., Nature*, **257**, 185 (1975).
767. *Iverson L. L., Nature*, **258**, 567 (1975).
768. *Hughes J., Brain Res.*, **88**, 295 (1975).
769. *Hughes J. et al., Nature*, **258**, 577 (1975).
770. *Fredrickson R. C. A., Life Sci.*, **21**, 23 (1977).
771. *Miller R. J., Cuatrecasas P., Naturwiss.*, **65**, 507 (1978).
772. *Simantov R., Snyder S. H., Life Sci.*, **18**, 781 (1976).
773. *Voelter W. et al., Chem. Ztg.*, **101**, 194 (1977).

774. *Smith G. D., Griffis J. E. F.*, Science, **199**, 1214 (1978).
775. *Bajusz S., Patthy A.*, см. [742], с. 63.
776. *Bajusz S. et al.*, FEBS Letters, **76**, 91 (1977).
777. *Yamashiro D. et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **78**, 1124 (1977).
778. *Roemer D. et al.*, Nature, **268**, 547 (1977).
779. *Dutta A. S. et al.*, Life Sci., **21**, 559 (1977).
780. *Lazarus L. H. et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**, 2156 (1976).
781. *Li C. H., Chung D.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**, 1145 (1976).
782. *Li C. H.*, Arch. Biochem. Biophys., **183**, 593 (1977); см. [52], с. 823.
783. *Kangawa K. et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **86**, 153 (1979).
784. *Kangawa E. et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **99**, 871 (1981).
785. *Kakidani H. et al.*, Nature, **298**, 245 (1982).
785a. *Comb M. et al.*, Nature, **295**, 663 (1982).
786. *Najjar V. A., Nishioka K.*, Nature, **228**, 672 (1970).
787. *Nishioka K. et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **47**, 172 (1972); Biochim. Biophys. Acta, **310**, 217 (1973).
788. *Fridkin M. et al.*, см. [45], с. 541.
789. *Nozaki S. et al.*, см. [54], с. 131.
790. *Konopinska D. et al.*, см. [45], с. 535.
791. Biological Activity of Thymic Hormones (D. W. Van Bekkum, Ed.), Kooyker Scientific Publications, Rotterdam, 1975.
792. *Schlesinger D. H., Goldstein A. L.*, Cell, **5**, 361 (1975).
793. *Goldstein A. L. et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 725 (1977).
794. *Bach J. F. et al.*, Ann. N. Y. Acad. Sci., **249**, 186 (1975); Nature, **266**, 55 (1977).
795. *Bricas E. et al.*, см. [51], с. 564.
796. *Lipmann F.*, Accounts Chem. Res., **6**, 361 (1973).
797. *Hassall C. H.*, см. [50], с. 891.
798. *Allen J. G. et al.*, Nature, **272**, 56 (1978).
799. *Brockmann H.*, Fortschr. Chem. Org. Naturst., **18**, 1 (1960); Angew. Chem., **72**, 939 (1960).
800. *Lackner H.*, Angew. Chem., **87**, 400 (1975).
801. *Meienhofer J., Atherton E.*, Adv. Appl. Mikrobiol., **16**, 203 (1973).
802. *Katagiri K. et al.* in: Antibiotics III (J. W. Corwran, F. H. Hahn, Eds.), p.234, Springer-Verlag, Berlin, 1975.
803. *Ovchinnikov Yu. A., Ivanov V. T., Shkrob A. M.*, Membrane Active Complexones, Elsevier, Amsterdam, 1974.
804. *Ovchinnikov Yu. A.*, см. [43], с. 17.
805. *Ivanov V. T.*, Ann. N. Y. Acad. Sci., **264**, 221 (1975).
806. *Fonina L. A. et al.*, см. [45], с. 635.
807. *Payne J. W. et al.*, Biochem. J., **117**, 757 (1970).
808. *Burgess A. W., Leach S. L.*, Biopolymers, **12**, 2691 (1973).
809. *Jung G.*, in: Peptides: Structure and Biological Function, Gross E., Meinhofer J. (Eds.), Pierce Chemical Comp., Rockford, Ill., 1979.
810. *Boheim G. et al.*, Biochem. Biophys. Acta, **507**, 485 (1978).
811. *Schwyzler R., Sieber P.*, Angew. Chem., **68**, 518 (1956).
812. *Hodgkin D. C., Oughton R. M.*, Biochem. J., **65**, 782 (1957).
813. *Ohnishi M., Urry D. W.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **36**, 194 (1969).
814. *Wieland Th., Faulstich H.*, Crit. Rev. Biochem. (CRC), **5**, 185 (1978).
815. *Wieland Th.*, Chemie in unserer Zeit, **13**, 56 (1979).
816. *Munekata E. et al.*, см. [46], с. 381.

- 817. *Faulstich H.*, Naturwiss., **66**, 403 (1979).
- 818. *Ivanov V. T. et al.*, см. [50], с. 195.
- 819. *Habermann F.*, Erg. Physiol. Chem. Exp. Pharmacol., **60**, 220 (1968).
- 820. *Gauldi J. et al.*, Eur. J. Biochem., **61**, 369 (1976).
- 821. *Suchanek G. et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **75**, 701 (1978).
- 822. *Van Rietschoten J. et al.*, Eur. J. Biochem., **56**, 35 (1975).
- 823. *Sandberg B. E. B., Ragnarsson U.*, Int. J. Peptide Protein Res., **7**, 503 (1975).
- 824. *Hirai Y. et al.*, см. [55], с. 155.
- 825. *Ivanov V. T. et al.*, см. [45], с. 219.
- 826. *Kanaoka M. et al.*, см. [55], с. 109.
- 827. *Warnhoff E. W.*, Peptide Alkaloids, Fort. Chem. Org. Naturst., **28**, 163 (1970).
- 828. *Takai M. et al.*, Chem. Pharm. Bull. Japan, **23**, 2556 (1975); *ibid.*, **24**, 2118 (1976).
- 829. *Tschesche R. et al.*, Chem. Ber., **100**, 3937 (1967).

3. Белки

3.1. Значение. Исторический аспект

Белки — высокомолекулярные соединения, полностью или большей частью построенные из аминокислот и составляющие большую часть органических веществ, содержащихся в живой клетке. Например, клетка кишечной палочки *Escherichia coli* содержит 3000 различных белков, а человеческий организм ~ 1 000 000. Молекулы белков состоят из одной или нескольких полипептидных цепей, организованных в характерную трехмерную структуру. Индивидуальные белки имеют определенный химический состав. Их молекулярные массы охватывают интервал от 6000 до более миллиона.

Обмен веществ, структура и функция каждой клетки в решающей степени определяются белками. Химические реакции в клетке, которые *in vitro* протекали бы исключительно медленно, ускоряются особыми каталитическими белками, ферментами, в сотни тысяч раз. Само собой разумеется, что при этом подвергается влиянию не состояние равновесия реакции, а скорость его наступления. Другие белки выполняют внешние или внутренние защитные функции.

Структурные и каркасные белки — важные элементы защитных и соединительных тканей; иммуноглобулины играют решающую роль в иммунной системе организма, фибриноген и тромбин действуют как факторы свертывания крови. Особые белки принимают участие в построении мембран и тем самым ответственны за отделение клетки от внешней среды и разделение внутриклеточного пространства. Белки-переносчики осуществляют, например, электронный перенос при дыхании и фотосинтезе, в других случаях они транспортируют продукты обмена веществ. Кислород в крови переносится гемоглобином, железо — трансферрином, медь — церулоплазмином и жирные кислоты — альбуминами плазмы. Резервные белки, такие, как альбумин яичного белка или казеин молока, образуют запас аминокислот для растущего эмбриона. Ферритин — «кладовая» железа в селезенке, глиадин (из пшеницы), цеин (из маиса) и туберин (из картофеля) — известные растительные резервные белки. Сократительные белки актин и миозин действуют совместно в двигательном процессе мышечных клеток (мышечное сокращение). Рецепторные белки, например сАМР-рецепторный белок, способствуют специфическому связыванию активного вещества в соответствующем месте. Белки с антивирусными свойствами, интерфероны, образуются после первичной вирусной инфекции организма и подавляют дальнейшее размножение вирусов. Часть растворимых глобулярных белков служит для поддержания осмотического давления.

Ряд белков относится к гормонам (разд. 2.3.1). Токсические белки, токсины, образуются микроорганизмами, но распространены также в животном и растительном мире. Этот подбор вполне достаточен для того, чтобы иметь первое представление о центральной роли класса веществ, называемого белками.

Принцип построения белков определен генетическим материалом клетки. Информация, содержащаяся в ДНК, определяет число и последовательность аминокислот в образующейся в процессе биосинтеза полипептидной цепи. После отделения от рибосомы спонтанно образуется структура, необходимая для выполнения определенной биологической функции. Установление этой биологически активной белковой структуры необходимо для понимания процессов жизнедеятельности, протекающих на молекулярном уровне.

Наряду с жирами и углеводами белки — основная составная часть пищи человека. В индустриальных странах главным источником пищевых белков являются продукты животного происхождения, в то время как в развивающихся странах в пище преобладают биологически неполноценные растительные белки. Для удовлетворения потребности постоянно растущего населения помимо увеличения производства животных и растительных продуктов, выведения сортов зерновых с повышенным содержанием недостающих аминокислот и повышения ценности биологически неполноценных растительных белков добавлением синтетических аминокислот все большее значение приобретает дальнейшее развитие микробиологических процессов получения белков одноклеточных микроорганизмов [10 — 15]. Микробиологические процессы основаны на способности определенных микроорганизмов использовать в обмене веществ в качестве источника углерода такие вещества, как углеводороды нефти, спирты или сырье, содержащее углеводы (крахмал, меласса, целлюлоза). Обзор важнейших процессов дан в табл. 3-1.

Таблица 3-1. Микробиологическое производство белков одноклеточных [10]

Источник углерода	Источник азота	Микроорганизм	Выход, кг продукта/кг субстрата
n-Алканы Этанол Углеводы	Аммиак, соли аммония	Дрожжи <i>Candida lipolytica</i>	1,0
		<i>Saccaromyces</i>	0,66
		<i>Torula</i>	0,5
Целлюлоза	Аммиак, соли аммония	Бактерии	
		<i>Tricoderma viridis</i>	0,5
		<i>Methylococcus</i>	1,0
		<i>Methylomonas</i>	0,5
Углекислый газ	Нитраты, мочевины	Водоросли	
		<i>Chlorella</i>	0,01 ^a

^a Выход рассчитан как соотношение энергии света к энергии, содержащейся в биомассе.

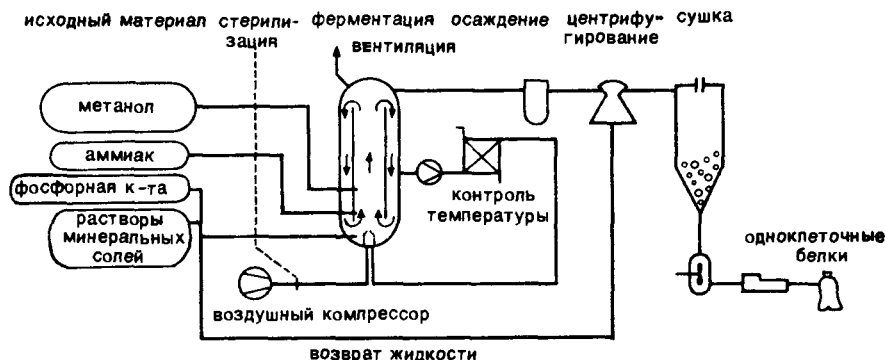


Рис. 3-1. Микробиологический процесс синтеза белка на основе метанола.

Преимущества микробиологического процесса заключается в быстром получении биомассы с высоким содержанием белков хорошего качества и в независимости процесса производства от климата и времени года. Лишь белки водорослей более целесообразно производить в местах с постоянной и интенсивной солнечной радиацией.

В настоящее время промышленные установки на основе метанола и нефти с производительностью до 100 000 т биомассы в год работают в СССР, Италии, Англии и Японии [16]. В ГДР сооружена установка с производительностью 55 000 т/год (производство фермозина), использующая в качестве сырья фракции дизельного топлива.

На рис. 3-1 приведена схема микробиологического процесса на основе метанола.

Белки микробного происхождения в настоящее время применяются вместе сои и рыбной муки прежде всего как корм в животноводстве (при выкармливании птицы, свиней, для подкормки рыбы), причем текстура, окраска и вкус таких кормов могут меняться в соответствии с привычками животных. Для непосредственного питания человека белки микробного происхождения пока еще не применяются. Состав биомасс, полученных в различных процессах, приведен в табл. 3-2.

Применяемая до сих пор лишь в незначительном объеме целлюлоза в будущем станет основным сырьем для микробиологического синтеза белка. Подходящие для этого бактериальные штаммы изучаются. Оптимизацией условий ферментации (марганец в качестве микроэлемента) была достигнута степень превращения до 60%. Из 1 кг соломы получают, например, 250 — 300 г биомассы.

Прямое использование зеленой массы растений, особенно белков, содержащихся в зеленых листьях, является дальнейшей возможностью для устранения нехватки белков. В листьях белки составляют ~30% сухой массы и могут быть экстрагированы с 50 — 60%-ным выходом. Животные, поедая листья, используют белки лишь на ~18%. По биологической ценности белки листьев сравнимы с белками соевых бобов.

Еще в 1784 г. было высказано мнение, что белки образуют самостоятельный класс веществ. Дальнейшее уточнение понятия приписывают Малдеру, предложившему называть белки (1839 г.) *протеинами* (от греческого

Таблица 3-2. Состав биомассы различных микробиологических продуцентов белка [10]

Компоненты биомассы	Состав биомассы, %						
	Дрож- жи (ал- кано- вые)	Метанольные бактерии		Грибы	Водо- росли	Соевая мука	Сухое молоко
		фирма ICI	фирма Hoechst				
Суммарный белок	60	89	91	31,7	72,6	45	34
Жиры	9	9,5	0,5	4,9	7,3	1,8	1
Нуклеиновые кислоты	5	15	1				
Минеральные вещества	6	9,5	3,5	2	4,7	6	8
Аминокислоты	54	65	102			40	
Вода	4,5	2,8	4,0	13,5	3,6	12	5

protos — первый, первичный). (Сам термин «протеины» был введен еще Берцелиусом.) После первых попыток Кюна установить строение белков ферментативными методами Косселю на рубеже XX века удалось выделить целый ряд белковых веществ. Примерно в то же время Хофмайстер и Фишер установили принцип химического построения белков, затем подтвержденный последним с помощью целенаправленного химического синтеза [17 — 19].

Первым белком, полученным в кристаллическом состоянии, стал яичный альбумин. В 1925 г. Абель осуществил кристаллизацию инсулина, а 10 годами позднее Зумнер описал кристаллизацию уреазы. Вирус табачной мозаики получен в кристаллическом состоянии в 1935 г.

В период между 1925 — 1930 гг. Сведберг с помощью ультрацентрифугирования произвел определение молекулярных масс различных белков. Одновременно применение других аналитических методов, как, например, электрофореза и различных видов хроматографии, привело к развитию аналитической белковой химии. В 1951 — 1956 гг. Сенгер [20, 21] установил аминокислотную последовательность инсулина. Используемые при этом методы легли в основу систематического определения первичной структуры многих белков. Созданный Эдманом в 1966 г. секвенатор и применение масс-спектрометрии в сочетании с ЭВМ как средством регистрации, обработки и оценки масс-спектрометрических данных привели к тому, что к настоящему времени опубликовано более 15 000 работ, посвященных определению аминокислотных последовательностей, и установлены первичные структуры более чем для 1000 белков.

После 1945 г. началось систематическое исследование пространственной структуры белков. Основываясь на работах по белковым конформациям

Полига и Кори, Кеидрю и Перутц с помощью рентгеноструктурного анализа монокристаллов установили пространственные структуры миоглобина и гемоглобина, продемонстрировав этим возможность, основываясь на полученных *in vitro* структурных данных, делать выводы о механизме биологической активности белков *in vivo*. На примере первой установленной пространственной структуры фермента лизоцима описаны на молекулярном уровне процессы связывания и расщепления субстрата.

В 1969 г. Меррифилд сделал попытку осуществить химический синтез фермента рибонуклеазы.

3.2. *Классификация белков*

Из множества белков, существующих в живых организмах, первичные структуры в настоящее время известны лишь для некоторых. Пока не представляется возможным систематически классифицировать белки по структурно-функциональным параметрам. Используются различные принципы классификации, часто перекрещивающиеся и во многих отношениях несовершенные.

Взяв за основу происхождение организма, различают растительные, животные, вирусные и бактериальные белки, в то же время учитывая органы и клеточные органеллы — белки плазмы, мышечные белки, белки молока, яиц, рибосомные белки, белки клеточного ядра, микросом и мембран.

По общим биологическим функциям можно подразделить белки на ферменты, структурные, транспортные, резервные и рецепторные белки.

На различии в растворимости и строении молекулы основано подразделение белков на глобулярные и фибриллярные.

Глобулярные белки растворимы в воде и разбавленных солевых растворах и обладают шарообразной формой молекулы (эллипсоид вращения). Компактная структура возникает при определении сворачивании полипептидной цепи; в основе такой структуры, по существу, лежит гидрофобное взаимодействие неполярных боковых цепей аминокислот. Помимо этого во взаимодействии отдельных участков цепи играют роль водородные связи и в некоторой степени ионные связи. Хорошая растворимость глобулярных белков объясняется локализацией на поверхности глобулы заряженных аминокислотных остатков, которые, окружая себя гидратной оболочкой, обеспечивают хороший контакт с растворителем. К глобулярным белкам относятся все ферменты и, за исключением структурных, большинство других биологически активных белков.

Со времени зарождения белковой химии принято деление глобулярных белков на альбумины, глобулины, гистоны, проламины, протамины, глутелины. Оно основано на более или менее выраженных различиях в растворимости, распределении зарядов и аминокислотном составе отдельных белков.

Альбумины хорошо кристаллизуются, растворимы в воде в интервале pH 4 — 8,5, осаждаются 70 — 100%-ным (от насыщения) раствором сульфата

та аммония. Широко распространенные полифункциональные *глобулины* более высокомолекулярны, чем альбумины, труднее растворимы в воде с типичным минимумом растворимости в изoeлектрической точке, растворимы в солевых растворах и чаще всего содержат углеводную часть.

Гистоны — низкомолекулярные основные, из-за высокого содержания лизина и аргинина, белки. Растворимы в воде и кислотах, как, впрочем, и сильноосновные *протамины*, содержащие до 85% аргинина. Гистоны и протамины образуют устойчивые ассоциаты с нуклеиновыми кислотами и выступают в качестве регуляторных и репрессорных белков (нуклеопротеины).

Признаком *проламинов* является высокое содержание глутаминовой кислоты (30 — 45%) и пролина (15%). Они нерастворимы в воде, но растворяются в 50 — 90%-ном этаноле. Вместе с содержащими глутаминовую кислоту (до 45%) *глутелинами* они чаще всего встречаются в белках зерна.

Фибриллярные белки практически нерастворимы в воде и солевых растворах, обладают волокнистой структурой. Полипептидные цепи, расположенные параллельно одна другой в форме длинных волокон, образуют структурные элементы соединительных тканей. Важнейшие представители этой группы структурных белков — коллагены, кератины и эластины (разд. 3.8.3).

От обычных белков, состоящих исключительно из протеиногенных аминокислот, следует отличать сложные белки, называемые также *конъюгированными белками* или *протеидами*. Это вещества, содержащие помимо белковой части небелковый органический или неорганический компонент, необходимый для функционирования, могущий быть связанным с полипептидной цепью ковалентно, гетерополярно или координационно и вместе с аминокислотами присутствующий в гидролизате. Важнейшие представители сложных белков: гликопротеины (простетическая группа — нейтральные сахара (галактоза, манноза, фукоза), аминосахара (N-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин) или кислые производные моносахаридов (уроновые или сиаловые кислоты)), липопротеины, содержащие триглицериды, фосфолипиды и холестерин, металлопротеины с ионом металла, связанным ионной или координационной связью, фосфопротеины, связанные эфирной связью через остаток серина или треонина с фосфорной кислотой, нуклеопротеины, ассоциирующиеся с нуклеиновыми кислотами в рибосомах или вирусах, а также хромопротеины, содержащие в качестве простетической группы окрашенный компонент. Обзор структур важнейших белков см. в разд. 3.8.

3.3. *Выделение и очистка [22—25]*

Выделение нерастворимых фибриллярных белков не сопряжено с особыми трудностями, в то же время очистка индивидуальных глобулярных белков из животных или растительных тканей, бактериальных культур и клеточных суспензий сильно затруднена одновременным присутствием в растворе многих других белков, углеводов, нуклеиновых кислот, липидов и других

биомолекул. К этому добавляется чувствительность белка к протеолитическим ферментам, влияние температуры и других факторов, вызывающих денатурацию. Лишь в исключительных случаях, например при выделении гемоглобина из эритроцитов, казеина из молока или альбумина из яичного белка, белковая часть превосходит в количественном отношении остальные компоненты настолько, что уже обычное осаждение приводит к относительно чистому продукту. В других случаях требуются сложные многостадийные операции очистки, которые на каждой стадии необходимо контролировать с помощью аналитических или биологических тестов.

На первой стадии разрушают биологический материал. Обычно начинают с разрезания и затем механического размельчения в гомогенизаторе. Для разрыва клеточных стенок используются различные методы: обработка ультразвуком, встряхивание со стеклянными шариками, растирание замороженного материала в ступке, осмотический шок, осмотический лизис дистиллированной водой, обработка поверхностно-активными веществами или воздействие протеазами. Нежелательные составные части клеток могут быть отделены центрифугированием, нуклеиновые кислоты отделяют осаждением протаминсульфатом, углеводы — электрофорезом, липиды — низкотемпературной экстракцией органическими растворителями.

При выделении желаемого белка обычно сначала экстракцией водой или разбавленным соевым раствором получают обогащенную белковую фракцию. Собственно, процесс разделения может основываться на различной (в определенных условиях) растворимости, различном размере, различном электрическом заряде или различных адсорбционных свойствах молекул белков, а также на различной биологической активности. К выделению индивидуального белка может привести также взаимодействие с комплексобразующими веществами, например альбуминами, альгинатами, пектинами [26].

Разработанные к настоящему времени методы разделения исключительно эффективны, однако лишь их комбинированное применение приводит к получению белков, удовлетворяющих необходимым критериям чистоты.

Разделение на основе различной растворимости относится к наиболее старым методам выделения и очистки белков. При *изоэлектрическом осаждении* разделение достигается благодаря минимальной растворимости глобулярного белка в изоэлектрической точке (ИЭТ). Следует обратить внимание, что ИЭТ белков помимо прочего зависит от ионной силы раствора. ИЭТ некоторых белков приведены в табл. 3-6.

Для разделения белков на фракции можно использовать *метод высаливания* NaCl , KCl , NH_4Cl и особенно $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; последний предпочтителен, так как создает высокую ионную силу раствора и очень хорошо растворим в воде (при 0°C 709,6 г/л). Растворимость отдельных белков помимо прочего зависит от их заряда. Механизм высаливающего действия солей при осаждении белка рассмотрен в пазд. 3.5.2.

Разделение белковой смеси возможно при добавлении смешивающихся с водой органических растворителей, таких, как этанол или ацетон (*фракционирование растворителем*), что ведет к снижению диэлектрической проницаемости системы. В результате снижаются гидратация и растворимость белка и при достаточно высокой

Таблица 3-3. Важнейшие методы разделения белков

Метод	Свойство, положенное в основу метода
Осаждение (изоэлектрическое осаждение, осаждение растворителем, осаждение солями)	Различная растворимость
Противоточное распределение	То же
Распределительная хроматография	" "
Диализ и ультрафильтрация	Различный размер молекул
Центрифугирование	Размер и форма молекул; плотность белковой массы
Гель-хроматография (гель-фильтрация, гелепроникающая хроматография)	Размер и форма молекул
Электрофорез (электрофорез без носителя, электрофорез на носителе: гель-электрофорез, диск-электрофорез, изоэлектрическое фокусирование, изотактоэлектрофорез, иммуноэлектрофорез ^a)	Различный заряд частиц
Ионообменная хроматография	То же
Аффинная хроматография	Бiosелективное взаимодействие белок—лиганд

^a Наряду с зарядом используется различная биоспецифичность.

концентрации органического растворителя происходит осаждение белковой фракции. При низких температурах (0 — 10° С) фракционирование растворителем, как и осаждение высаливанием, протекает без денатурации. Применение органических растворителей для осаждения белков имеет преимущество, так как после осаждения белков нет необходимости избавляться от солей. Фракционирование растворителем было разработано [27, 28] специально для разделения белков плазмы, но позднее применено в процессах разделения других белков. На рис. 3-2 приведена схема разделения белков плазмы с использованием изменения рН и концентрации органического растворителя (фракционирование по концентрации).

Другим методом очистки белков, основанным на различии в растворимости, является *противоточное распределение* по Крейгу [29, 30]. Сегодня оно осуществляется с помощью полностью автоматических установок, позволяющих проводить распределение разделяемых компонентов при многих тысячах ступеней переноса. Состояние равновесия при каждом распределении между двумя фазами описывается законом распределения Нернста. При разделении двух веществ эффект разделения будет тем выше, чем больше фактор переноса β , равный соотношению коэффициентов распределения K_1 и K_2 .

Противоточное распределение зарекомендовало себя при очистке пептидных веществ и промежуточных продуктов синтеза пептидов. Наиболее часто применяют следующие системы растворителей: бутанол — уксусная кислота, трихлоруксусная кислота — толуолсульфокислота, хлороформ — бензол — метанол — фенол — вода и многие другие комбинации. Сложнее подобрать систему для разделения белков из-

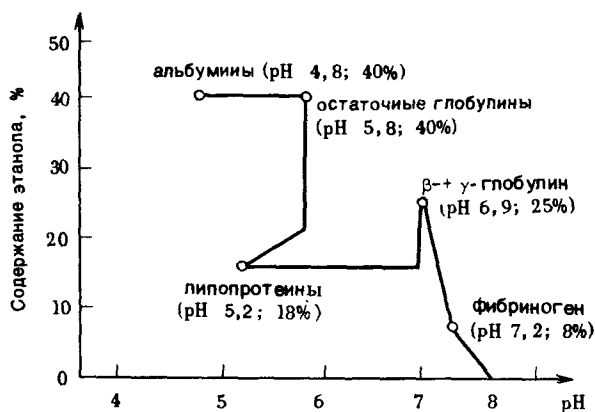


Рис. 3-2. Фракции плазмы [27, 28].

за их малой растворимости в органических растворителях и опасности денатурирования. Крейт и Хаусмаи [31] провели разделение рибонуклеазы и лизоцима в системе этанол — вода — сульфат аммония (3746 и 3420 соответственно ступеней переноса) при полном сохранении биологической активности. В той же лаборатории гомогенный (по данным ультрацентрифугирования) сывороточный альбумин (M 68 000) в системе бутанол — трихлоруксусная — уксусная кислота — этанол в присутствии стабилизатора при 401 ступени распределения был разделен на 4 фракции (рис. 3-3). Чистый альбумин характеризуется коэффициентом распределения $K = 0,857$. Для

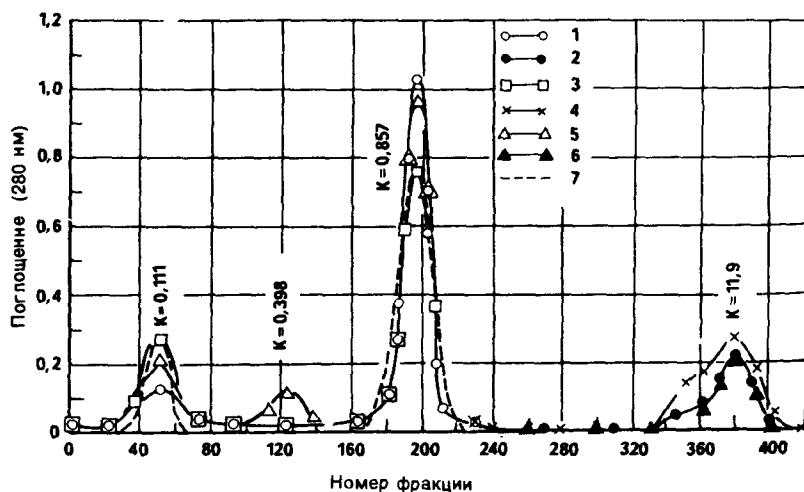


Рис. 3-3. Фракции сывороточного белка [31].

противоточного распределения высокомолекулярных белков предложено использовать растворы, содержащие полимеры, такие, как полиэтиленгликоль и полипропиленгликоль с декстраном, и образующие с водой двухфазную систему. Однако в этом случае время расслоения очень велико и, кроме того, отделение белка от полимеров, содержащихся в растворе, сопряжено с существенными трудностями.

Важнейшие методы разделения белков, основанные на различии *молекул по размеру*, — это диализ, ультрафильтрация, центрифугирование и гель-хроматография. С помощью *диализа* и *ультрафильтрации* [32] отделяют преимущественно низкомолекулярные компоненты от белков. При проведении диализа полупроницаемая мембрана (размер пор 5 — 100 нм) беспрепятственно пропускает воду, небольшие ионы и молекулы, в то время как крупные молекулы белков задерживаются. Движущей силой процесса разделения является перепад концентраций между раствором и растворителем на мембране. При ультрафильтрации процесс разделения ускоряется путем приложения повышенного давления (0,5 — 10 бар). В качестве мембран чаще всего применяются синтетические материалы на основе производных целлюлозы и полиамида, делающие возможным при различных размерах пор (1 — 10 нм) разделение пептидов, пептидных производных и белков.

При *ультрацентрифугировании* для разделения используется седиментация, зависящая от размера, плотности и формы молекулы белка. *Центрифугирование в градиенте плотности* (зональное центрифугирование) часто применяется для разделения белков, а также для разделения органелл и вирусов. Одной из характеристик белка служат данные седиментационного анализа в ультрацентрифуге (разд. 3.5.4). Положение возникающих белковых зон можно наблюдать с помощью оптических методов.

Гель-хроматографией [33 — 37] (при работе в водной фазе — *гель-фильтрацией*) называется молекулярно-ситовой процесс, близкий к хроматографическим методам разделения, при котором неподвижной (стационарной) фазой является, как правило, трехмерная структура полисахаридного или акриламидного геля. В зависимости от степени сшивки и размера пор геля, находящегося в набухшем состоянии, молекулы белка движутся через колонку с разной скоростью. При использовании геля с определенной степенью сшивки и размером пор скорость движения зависит от размера и формы молекул. Более крупные молекулы движутся в основном в пространстве между частичками геля и выходят из колонки первыми, мелкие молекулы проникают в поры геля и вследствие этого движутся значительно медленнее. Варьируя размеры пор, можно фракционировать белки с молекулярными массами от нескольких сотен до многих миллионов. В развитии гель-хроматографии, считающейся сегодня важнейшим и эффективнейшим методом разделения белков, особенно большую роль сыграла шведская фирма АВ-Farmacia. С 1959 г. она поставляет на рынок декстрановый гель сефадекса, получаемый из сшитого эпихлоргидрина декстрана с $M 30\,000 — 50\,000$. Декстран, высокомолекулярный глюкозан с преимущественно α -1,6-гликозидными связями, получают из сахарозы микробиологическим способом.



Рис. 3-4. Изучение седиментации методом ультрацентрифугирования (ширрен-оптика).

Таблица 3-4. Гели для гель-хроматографии

Тип геля	Торговое название	Рабочий диапазон мол. масс	Фирма
Декстрано- вый гель	Сефадекс (от G-10 до G-200)	700—600 000	Pharmacia
	LH-20/LH-60	4 000/10 000	"
	Молселект (от G-10 до G-200)	700—600 000	Reanal
	Сефароза (от 6В до 2В)	4 000 000—40 000 000	Pharmacia
Агарозный гель	Биогель (от А-0,5 до А-150)	500 000—150 000 000	Bio-Rad
Полиакрил- амидный гель	Биогель (от Р-2 до Р-300)	2 500—400 000	"
	Акрилекс (от Р-2 до Р-300)	2000—300 000	Reanal
	Ультрагель (от АсА 54 до АсА 22)	70 000—600 000	LKB
Полиакрил- амидагарозный гель			
Полиакрило- илморфолино- вый гель	Энзакрил (от К0 до К10)	1000—2 000 000	Koch-Light

В дополнение к полисахаридным гелям фирмой Bio-Rad (США) предлагаются биогели на полиакриламидной основе (табл. 3-4). Введение в практику макропористых полистирольных смол, ненабухающих пористых стеклянных шариков и иммобилизация гидрофобных радикалов на декстрановой матрице сделали возможным гель-хроматографическое фракционирование в среде органических растворителей. Алкилированные декстраны (типа сефадекс-LH) находят широкое применение в синтетической пептидной химии [38].

Другими важными методами разделения и очистки белков являются *электрофорез* и *ионообменная хроматография*. Оба метода основаны на различных свойствах частиц, несущих неодинаковый заряд. Величина и знак заряда для каждого белка характеризуются числом ионизируемых боковых групп аминокислотных остатков и, как в случае аминокислот (разд. 1.4.2), могут быть установлены из кривой титрования. Выше ИЭТ находится зона рН с отрицательным, а ниже ИЭТ — зона рН с избыточным положительным зарядом молекулы.

При *электрофорезе* заряженные частички под влиянием электрического поля движутся с различной, зависящей от отношения заряда к массе скоростью к аноду или катоду и таким образом могут быть отделены друг от друга. Различают электрофорез без носителя, при котором белковые молекулы движутся непосредственно в потоке буфера, и электрофорез с носителем (зонный электрофорез), при котором в качестве носителя используют различные материалы.

Классический электрофорез без носителя осуществляют в U-образной ячейке, в которой на буферный раствор, содержащий белок, насланвается чистый буферный раствор. Выбором подходящего рН достигают одинакового знака заряда белков, ко-

торые затем в виде, например, анионов движутся к положительному электроду и проникают в зону буферного раствора. Здесь они могут быть локализованы оптическими методами (по различию в показателях преломления) в виде так называемых «кизвилистых узоров».

Высокое разрешение и высокая производительность достигаются в современном электрофорезе без носителя, в котором электрическое поле приложено к текущему между двумя охлаждаемыми пластинами буферному раствору. Под действием поля белки отклоняются от направления потока буфера на определенный угол.

При наиболее продуктивном в аналитической химии белка *электрофорезе с носителем* в качестве носителя для потока буферного раствора используют целлюлозы, гели и пленки. Работают с напряженностью поля 6 — 10 В/см (низковольтный электрофорез) и при охлаждении с напряженностью до 100 В/см (высоковольтный электрофорез).

Гель-электрофорез проводится в агарозном или полиакриламидном геле. Это исключительно гибкий метод разделения; варьируя структуру геля и состав буферного раствора, можно проводить разделение на основе различия в молекулярных массах, изoeлектрических точках и биоспецифическом сродстве. Особенно высокого разрешения достигают при геле-электрофорезе в полиакриламиде [39], так как здесь дополняют друг друга электрофорез и молекулярно-ситовый эффект. Сыворотка, например, расщепляется на 20 полос, в то время как при электрофорезе в агарозе появляется лишь 5 полос.

Еще лучшее разделение дает *диск-электрофорез* [40, 41], при котором используют дискретную (прерывающуюся) разделительную систему из различных буферных растворов и работают с акриламидными гелями, имеющими различные размеры пор. Несколько (минимум два) слоев геля с различными рН наслаивают один на другой, благодаря чему процессу разделения предшествует концентрирование компонентов и в результате получаются очень узкие полосы белков.

Изoeлектрическое фокусирование [42 — 45] в линейном градиенте рН позволяет разделить белки, характеризующиеся различными изoeлектрическими точками. Для создания градиента используют носители с цвиттер-ионными свойствами — алифатические полиаминополикарбоновые кислоты, имеющие M 200 — 700. При движении в градиенте рН суммарный заряд белка постоянно меняется, и в области рН, близких к изoeлектрической точке, становится равным нулю. Соответствующий белок «фокусируется», образуя узкую зону. При препаративном «фокусировании» в колонке стабилизация градиента рН осуществляется с помощью градиента плотности используемого буферного раствора, однако чаще работают с плоскими слоями полиакриламидного или гранулированного геля. Опубликовано краткое сообщение о непрерывном электрофокусировании без носителя [46]. Эффективность электрофокусирования высока. Так, возможно, например, разделить белки, различающиеся по ИЭТ лишь на 0,01 единицы рН. При разделении сыворотки образуется более 40 белковых полос.

При *изотахофорезе* (iso — равный, tacho — скорость) [47, 48], также обладающем высокой разрешающей способностью, разделяемую белковую смесь вводят в специальный электролит, содержащий ионы с более высокой подвижностью (лидирующие) и ионы с меньшей подвижностью (терминирующие), чем подвижность ионов белка при равных скоростях перемещения. При добавлении специфических промежуточных ионов, «поддерживающих интервал», разделяются белки с очень близкими подвижностями. Препаративное разделение белков проводят большей частью в колонках с полиакриламидным гелем при применении амфолитов в качестве буферных и «поддерживающих интервал» веществ, причем разделенные компоненты элюируются из колонки с помощью подходящей системы.

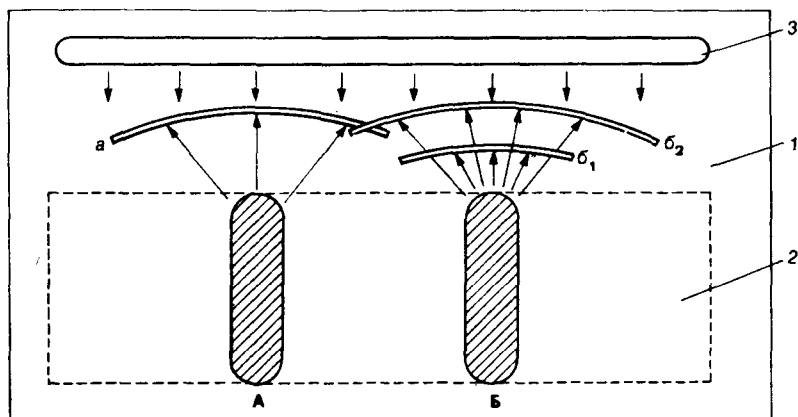


Рис. 3-5. Принцип иммуноэлектрофореза (по Рапопорту).

1 — слой агара; 2 — электрофоретически разделяемая сыворотка (смесь антигенов); 3 — антисыворотка (смесь антител). А — серологически однородная электрофоретическая фракция (a — полоса преципитации к А); Б — электрофоретическая фракция, серологически состоящая из двух компонентов (σ_1 и σ_2 — полосы преципитации к Б).

В случае *иммуноэлектрофореза* [49 — 51] принцип электрофореза сочетается с биоспецифической аффинностью белка (рис. 3-5). Белки-антигены сначала разделяются гель-электрофоретически. При встрече с диффундировавшими внутрь геля антителами происходит образование комплексов антиген — антитело, наблюдаемых в виде серповидных полос преципитации. Иммуноэлектрофорез имеет особое значение в медицинской диагностике (разделение и идентификация сывороточных белков и др.). Рис. 3-6 поясняет эффективность этого метода по сравнению с другими видами электрофореза.

При разделении белков *ионообменной хроматографией* [52] применяют прежде всего ионообменные смолы на полисахаридной основе, например аниониты DEAE-целлюлозу (диэтиламиноэтилцеллюлозу) или DEAE-сефадекс и катиониты КМ-целлюлозу (карбоксиметилцеллюлозу) или КМ-сефадекс, в которых функциональные ионообменные группы связаны с гидроксильными группами моносахаридных остатков. Гидрофильная основа ионообменников не приводит к денатурации белков. Белки, в кислой среде в виде катионов и в щелочной среде в виде анионов, связываются с соответствующим ионообменником, а затем элюируются буферным раствором с возрастающей ионной силой (концентрационный градиент) или с изменяющимся pH (градиент pH). При концентрационном градиенте ионизованные белки разделяются в результате взаимодействия с ионами соли, в случае градиента pH разделение вызвано изменением электрических зарядов белков. Ионообменная хроматография предложена в 1956 г. Петерсоном и Собером. На рис. 3-7 приведена диаграмма элюирования смеси различных гемоглобинов.

На биоселективном взаимодействии с лигандами, фиксированными на носителе, основано *разделение белков с помощью аффинной хроматографии* [54 — 61]. Ли-

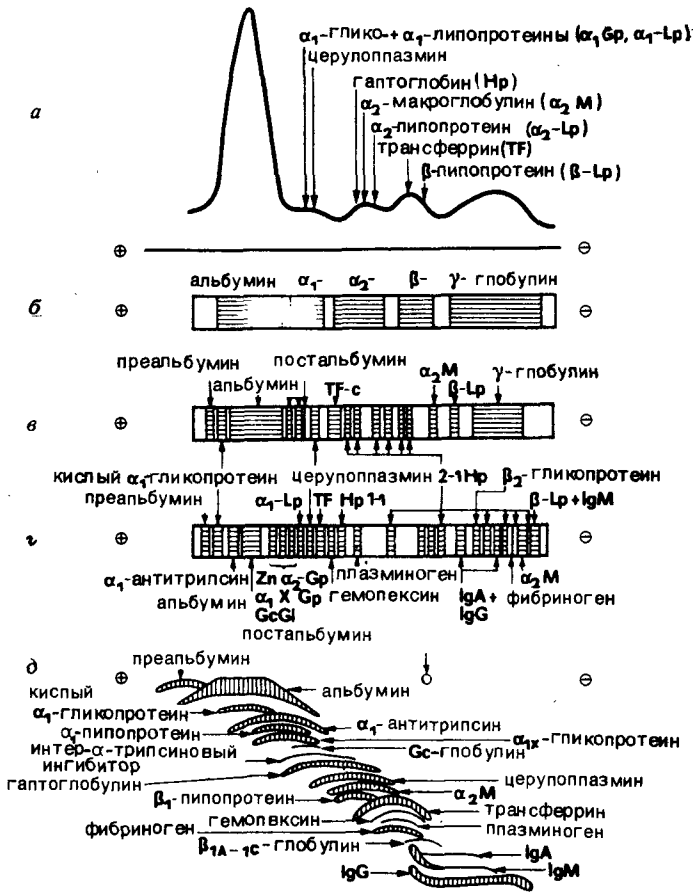


Рис. 3-6. Электрофоретическое разделение белков плазмы человека пятью различными методами при pH 8. *а* — электрофорез без носителя; *б* — электрофорез на бумаге; *в* — электрофорез в крахмальном геле; *г* — электрофорез в полиакриламидном геле; *д* — иммуноэлектрофорез (полосы преципитации к поливалентной антисыворотке человека). Стрелки показывают положение отдельных белков плазмы.

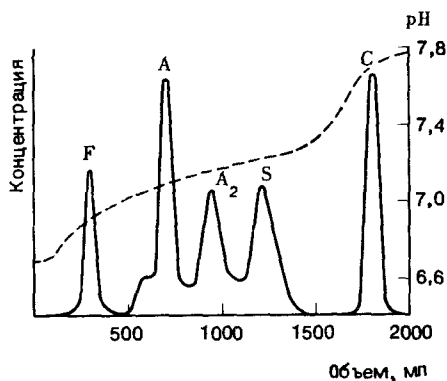


Рис. 3-7. Диаграмма элюирования при разделении различных гемоглобинов (F, A, A₂, S и C) на КМ-сефадексе С-50.

ганд, обычно низкомолекулярный (кокурентный ингибитор, кофермент, модифицированный субстрат, специфический антиген), ковалентно (сложноэфирная или амидная связь) связывается с инертным нерастворимым носителем путем азосочетания, с помощью бромциана или бифункциональных реагентов. При реакции с комплементарным белком образуется устойчивый комплекс белок — лиганд, из которого белок может быть освобожден селективно изменением pH или ионной силы. Взаимодействие белка с лигандом облегчается встраиванием между лигандом и матрицей гибкой «ножки». В качестве матрицы применяются агароза, пористое стекло, целлюлоза, сшитые декстраны и др*.

Пористое стекло (диаметр пор 5 — 250 нм), как и наиболее широко применяемые носители на основе агарозы, отличается низкой неспецифической сорбцией и высокой емкостью. Аффинная хроматография нашла широкое применение при разделении ферментов, полипептидных и белковых гормонов, антител, антигенов, а также транспортных и рецепторных белков.

Белки, полученные с помощью различных методов разделения и очистки, считаются чистыми, если их гомогенность доказывается появлением только одной белковой полосы, например, при диск-электрофорезе или характерной диффузионной константой или константой седиментации при ультрацентрифугировании.

Другой тест на чистоту вытекает из диаграммы растворимости; в случае гомогенного белка вплоть до достижения точки насыщения количество добавленного и количество растворившегося белка связаны линейной зависимостью. Критериями чистоты также служат аминокислотный состав, изоэлектрическая точка, а также в некоторой степени кристаллизруемость. В случае биологически активных белков, например ферментов, вывод о чистоте может быть сделан из критериев активности (субстратная специфичность, оптимальные pH и температура, кинетические эксперименты).

*В последнее время широкое применение в качестве матрицы для аффинных сорбентов находит жесткий макропористый гидрофильный сополимер 2-гидроксиэтилметакрилата и этиленгликольдиметакрилата (сферон) [Туркова Я. Аффинная хроматография. — М.: Мир, 1980]. — Прим. перев.

3.4. Обнаружение и количественное определение

Для *качественного определения* белков известны различные, не всегда специфичные, классические цветные реакции, основанные часто на присутствии определенных аминокислотных остатков (табл. 3-5). С этой целью можно использовать также денатурацию при осаждении белков путем добавления трихлоруксусной, пикриновой, хлорной или фосфорновольфрамовой кислот, солей тяжелых металлов (Cu, Pb, Zn, Fe и др.) и путем нагревания в изoeлектрической точке.

Для *количественного определения* может быть использована биуретовая реакция, хотя в случае пептидов также наблюдается положительный результат. Реакция основана на образовании фиолетового медного комплекса, интенсивность окраски которого (540 — 560 нм) может быть измерена колориметрически. Гораздо более высокую чувствительность имеет метод Лаури [62], в котором при участии остатков Tгp, Tyr и Cys образуется комплекс белка с фосфомолибденовой кислотой и медью. Это наиболее часто применяемый колориметрический метод определения малых количеств белка. Образующийся голубой комплекс (максимум абсорбции при 750 нм) достаточно устойчив для количественного определения. В качестве стандартного белка служит сывороточный альбумин. Предел обнаруживания 5 — 10 мкг/мгл раствора. Определению по методу Лаури мешают трис-

Таблица 3-5. Цветные реакции, применяемые для качественного определения белков

Реакция	Условия проведения	Реагирующий участок белка	Окраска
Биуретовая	Смешивают сильнощелочной раствор пробы с раствором сульфата меди(II)	Пептидная связь	Пурпурно-фиолетовая
Миллона	Нагревают раствор пробы с $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ и конц. H_2SO_4	Tyr	Красно-коричневый осадок
Паули	Смешивают щелочной раствор пробы с диазобензолсульфокислотой	Tyr, His	Красная
Хопкинс-Коле	Смешивают пробу с глиоксиловой кислотой и под слой вводят конц. H_2SO_4	Tгp	Фиолетовое кольцо
Сакагучи	Смешивают пробу с растворами α -нафтола и гипобромита	Arg	Красная
Фопина	Смешивают пробу с 1,2-нафтахинон-4-сульфоновой кислотой	Tyr, Tгp	"
Ксанто-протеиновая	Смешивают пробу с конц. HNO_3	Tyr, Phe	Желтая (после добавления щелочи оранжевая)

буферы, гуанидин- и тиолсодержащие соединения. Эти факторы не оказывают влияния на результаты при *определении белка по Бредфорду* [63]. Метод основан на изменении окраски специфического красителя в зависимости от концентрации белка. При классическом количественном *определении по Кьельдалю* аналитическая проба разрушается при кипячении с концентрированной серной кислотой в присутствии катализатора, причем органически связанный азот образует эквивалентное количество сульфата аммония. Выделяющийся при добавлении щелочи аммиак поглощается раствором борной кислоты и определяется титрованием 0,01 н. H_2SO_4 .

Возможно прямое определение белка путем измерения *оптической плотности* (поглощения) *при 280 нм*, основанное на присутствии в белке остатков тирозина и триптофана. Зная удельный коэффициент экстинкции ϵ (оптическая плотность 1%-ного раствора белка при 280 нм и длине оптического пути 1 см), можно, исходя из измеренной экстинкции раствора белка неизвестной концентрации, установить содержание белка (в мг/1 мл).

С помощью других физико-химических методов (рефрактометрия, измерение плотности, измерение светорассеяния с помощью нефелометра) можно также определить содержание белка с большей или меньшей точностью и специфичностью.

3.5. Физико-химические свойства [5, 64, 65]

3.5.1. Цвиттер-ионная природа белковой молекулы

Амфолитная природа белка базируется на количестве кислых и основных групп в боковых цепях и их распределении, так как в общем случае концевые амино- и карбоксильные группы вносят очень малый вклад в суммарный заряд молекулы.

В зависимости от pH раствора молекулы белка несут положительный (в кислой области) или отрицательный (в щелочной области) избыточный заряд, причем в обоих случаях гидратация и растворимость возрастают. Независимо от знака заряда решающий фактор, определяющий гидратацию, — разность между суммами положительных и отрицательных зарядов на молекуле белка.

В изоэлектрической точке белковая молекула представляет собой цвиттер-ион, т. е. положительные и отрицательные заряды в молекуле взаимно уравновешиваются и суммарный заряд молекулы равен нулю; растворимость и гидратация минимальны, отсутствует движение в электрическом поле. Изоэлектрическая точка может быть определена из кривой титрования, отражающей суммарное состояние ионизации молекулы. В случае глобулярных белков ионизируемые группы преимущественно локализованы на поверхности молекулы. Группы, находящиеся внутри или принимающие участие в образовании водородных связей, могут быть зарегистрированы титрованием после денатурации. Кроме того, изоэлектрическая точка может быть установлена путем определения минимума растворимости и

различных буферных растворах, электрофорезом при различных рН или электрофокусированием в градиенте рН, образованием амфолитов. У белков, содержащих много основных аминокислот, изоэлектрические точки находятся в щелочной, а у богатых аминодикарбоновыми кислотами белков — в кислой области рН. В табл. 3-6 приведены изоэлектрические точки некоторых белков.

Таблица 3-6. Изоэлектрические точки некоторых белков

Белок	Изоэлектрическая точка
Пепсин	1,0
Яичный альбумин	4,59
Сывороточный альбумин	4,8
Коллаген	6,7
β -Лактоглобулин	5,2
α_1 -Глобулин (человека)	5,8
α_2 -Глобулин (человека)	7,3
Гемоглобин (человека)	7,07
Гемоглобин (лошади)	6,92
Миоглобин	7,0
Цитохром с	10,6
Уреаза	5,0
Химотрипсинаген	9,5
Рибонуклеаза	9,6
Лизоцим	11,6
Протамин	11,8

Изоэлектрическая точка зависит от ионной силы и вида применяемого буфера, так как нейтральные соли оказывают влияние на степень ионизации ионогенных групп боковых цепей.

белок — катион \rightleftharpoons белок — цвиттер-ион \rightleftharpoons белок — анион

На этих равновесиях основано физиологически важное буферное действие белков. Гемоглобин, например, играет важную роль в стабилизации рН крови. Нормальное значение рН крови лежит между 7,35 и 7,40, изменение этой величины на 0,3 — 0,5 единицы опасно для жизни.

3.5.2. Растворимость

Растворимость белка, помимо рН раствора, природы растворителя (диэлектрическая проницаемость), концентрации электролита (ионная сила) и вида противоиона, несомненно зависит от структурных особенностей моле-

кулы данного белка. Уже говорилось о различной растворимости глобулярных и фибриллярных белков, на которой основан классический принцип их подразделения, и о снижении растворимости белков при добавлении нейтральных по отношению к белку солей или растворителей.

Большое значение для растворимости белка имеет концентрация электролита. Белки с ярко выраженным асимметрическим распределением заряда, как, например, сывороточные глобулины, требуют для растворения или стабилизации раствора определенной концентрации соли. Этот солевой эффект основан на снижении ассоциации или агрегации белковых молекул, вызванном присоединением низкомолекулярных противоионов. Результатом являются повышенная гидратация и улучшение растворимости белка, его реассоциация при этом затруднена. Высаливание, ведущее к осаждению белка, основано на понижении гидратации белка за счет гидратации ионами электролита. Так как для различных белков необходима различная высаливающая концентрация электролита, высаливание относится к важным и удобным методам грубого фракционирования белков.

3.5.3. Денатурация [66]

Денатурация — любые вызванные физическими и химическими воздействиями изменения, которые при сохранении первичной структуры белка сопровождаются большей или меньшей потерей его биологической активности и других индивидуальных свойств белка. При денатурации ослабляются гидрофобные взаимодействия, разрываются водородные связи, а в присутствии восстановителей и дисульфидные связи. Денатурация с разрывом невалентных связей обычно обратима. Путем образования новых невалентных связей, а также благодаря взаимодействию с денатурирующим веществом новая конформация стабилизируется. Возникающее метастабильное состояние при восстановлении физиологических условий может вернуться к нативной конформации (*ренатурация*). Принципиально возможна ренатурация и при восстановительном расщеплении дисульфидных связей (рис. 3-8).

При произвольном дисульфидном обмене, неспецифическом окислении и при образовании ковалентных связей иного вида *денатурация необратима*. Тепловая денатурация в начальной стадии ведет, например, к региоселективным изменениям конформации, которые могут быть *обратимыми*. На последующей стадии неконтролируемая агрегация ведет к образованию неупорядоченного клубка.

Переход от нативного состояния с минимальной энергией к неупорядоченной денатурированной форме сопровождается увеличением энтропии. Но конечно, одновременно повышается упорядоченность окружающих молекул воды, поскольку происходит дополнительная гидратация освобождающихся гидрофобных групп боковых цепей, так что этот эффект в значительной степени компенсируется. При денатурации меняются и другие свойства белковой молекулы: уменьшаются растворимость и способность кристаллизоваться из-за появления дополнительных ионизируемых групп,

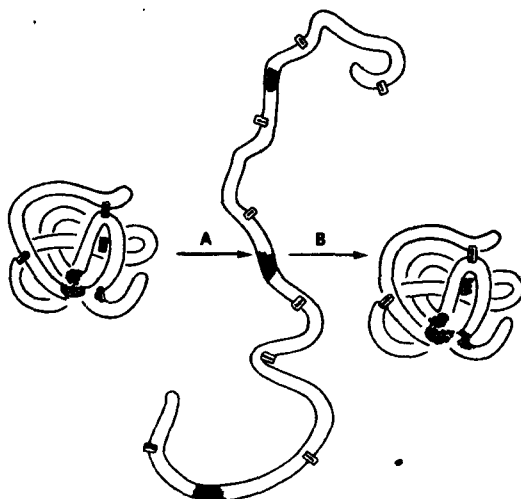


Рис. 3-8. Денатурация и ренатурация на примере панкреатической рибонуклеазы (по Анфинсену).

объясняемого разворачиванием пептидных цепей; сдвигается изоэлектрическая точка; повышается вязкость; увеличивается из-за освобождения фенольных гидроксильных групп поглощение в УФ-области.

Физически денатурация может быть вызвана механическими (сильное перемешивание, встряхивание) или физическими воздействиями (нагревание, ультрафиолетовое, рентгеновское и радиоактивное облучение, обработка ультразвуком и абсорбция на границе раздела). Химическая денатурация достигается прежде всего с помощью соединений, разрывающих водородные связи (6 — 8 М раствор мочевины, 4 М раствор гидрохлорида гуанидина), обработкой кислотами и щелочами ($3 < \text{pH} < 9$), а также воздействием поверхностно-активных веществ, например, 1%-ным раствором додецилсульфата натрия. Чувствительность отдельных белков к денатурирующим средствам различна.

3.5.4. Молекулярная масса

Молекулярные массы белков, состоящих из одной полипептидной цепи, лежат в интервале от 10 000 до 100 000, для большинства многоцепочечных (олигомерных) белков — от 50 000 до многих миллионов.

Для определения молекулярной массы и одновременно формы молекулы подходят различные физико-химические методы, которые грубо можно подразделить на кинетические и равновесные. *Кинетические методы* основаны на оценке процесса переноса частиц, например определение вязкости,

измерение скоростей седиментации и диффузии в ультрацентрифуге и определение электрофоретической и гель-хроматографической подвижности при использовании декстрановых и полиакриламидных гелей с определенным размером пор. При *равновесных методах* раствор белка находится в термодинамически равновесном состоянии.

К равновесным методам относятся измерение светорассеяния и осмотического давления, а также метод малоуглового рентгеновского рассеяния.

Метод измерения светорассеяния основан на том факте, что с увеличением размера частиц эффект Тиндаля в растворе белка сильно возрастает. С помощью фотометра для рассеянного света измеряется соотношение интенсивностей падающего и рассеянного под углом 45° или 90° света. В идеальных условиях разность светорассеяния чистого растворителя и раствора белка прямо пропорциональна числу и размеру молекул белка.

Осмотическое давление определяется с помощью мембранных осмометров, причем для белков граница определяемых молекулярных масс лежит вблизи 20 000. Ниже этой границы применение мембранных осмометров проблематично, для этой области лучше подходит осмометр, основанный на измерении давления паров. В случае мембранных осмометров разность высоты столбиков жидкости в сравнительном и измерительном капиллярах показывает величину осмотического давления. При применении динамического принципа измерения, при котором определяется и автоматически компенсируется поток растворителя через полупроницаемую мембрану, время определения существенно сокращается.

При определении молекулярных масс в *ультрацентрифуге* [67 — 69] различают метод измерения скорости седиментации и равновесное центрифугирование. В то время как в первом случае измеряют скорость седиментации, во втором — определяют положение седиментационного равновесия.

В случае измерения *скорости седиментации* необходимы поля центробежных сил, обеспечивающие полное осаждение белков. Белок, находящийся в виде коллоидного раствора, обладает большей плотностью, чем растворитель. В ходе центрифугирования на молекулу белка действует значительная центробежная сила, которая, вызывая движение молекулы через среду, обеспечивает скорость перемещения, пропорциональную трению молекулы в среде. Скорость седиментации прямо пропорциональна молекулярной массе. Для определения молекулярной массы необходимы приборы со скоростью вращения ротора до 60 тыс. об/мин. Раствором белка заполняют прозрачную ячейку. Изменения концентрации, возникающие в процессе центрифугирования, могут прослеживаться с помощью оптических методов, например посредством шлирен- или интерференционной оптики, а также посредством прямого измерения абсорбции в УФ-области (скаанирующая система).

Определение молекулярной массы с помощью аналитической ультрацентрифуги основано на работах Сведберга, шведского химика, специалиста в белковой химии, разработавшего в 1925 г. центрифугу. Молекулярная масса может быть вычислена по следующей формуле:

$$M = \frac{RTs}{D(1 - \rho_L V_{\text{Prot}})}$$

где s — коэффициент седиментации (имеет размерность времени; единица измерения коэффициента седиментации называется сведбергом; $s = 1 \cdot 10^{-13}$ с); R — газовая постоянная; T — температура в кельвинах; V_{Ptot} — парциальный удельный объем белка; ρ_L — плотность растворителя; D — коэффициент диффузии.

Парциальный удельный объем белка V_{Ptot} может быть получен измерением плотности. Для того чтобы найти молекулярную массу, необходимо еще знать коэффициент диффузии D , который для сферической молекулы можно вычислить теоретически. Однако реальные молекулы имеют форму, отличающуюся от сферы, поэтому коэффициент диффузии определяют экспериментально центрифугированием белка при меньшем числе оборотов и измерением вызванного диффузией уширения границы между белковой зоной и раствором.

При определении молекулярной массы по методу *седиментационного равновесия* знание коэффициента диффузии не является необходимым. В этом случае используют более низкое число оборотов. По сравнению с предыдущим методом, для которого необходимо гравитационное поле до 400 000 g, здесь достаточно центробежной силы, в 10 — 15 тыс. раз превосходящей земное притяжение. Через несколько часов или через несколько суток процесс седиментации и обратной диффузии достигает состояния равновесия, при котором перемещение частиц отсутствует. Измерив градиент концентрации белка от мениска до дна ячейки, можно вычислить его молекулярную массу. Медленное установление равновесия — недостаток метода. Этого можно избежать при проведении определения по Арчибальду. В этом «низкоскоростном» методе для расчетов можно использовать градиент концентрации, образующийся в измерительной ячейке у мениска жидкости (до отделения белковой зоны). Метод нулевой концентрации в мениске, предложенный в 1964 г., делает возможным достижение седиментационного равновесия при высокой скорости ротора (высокоскоростной метод), в этом случае белковая зона уже отделена от мениска. Это дает возможность сократить время эксперимента до 2 — 4 ч.

Следует также упомянуть метод *центрифугирования в градиенте плотности*. Обычно работают в возрастающем градиенте плотности сахарозы при высокой скорости ротора. Расстояние, на которое перемещается белок в градиенте, обратно пропорционально его молекулярной массе. Молекулярную массу неизвестного белка с достаточной точностью можно определить, сравнивая его с добавленным стандартным белком известной молекулярной массы.

При определении молекулярной массы с помощью *гель-фильтрации* [70, 73] применяют сефадексы различного типа (G-50, G-100, G-150, G-200), агарозы (сефарозы 2B, 4B, 6B) или полиакриламиды (биогели P-100, P-150, P-300). Процесс проводят как в хроматографических колонках, так и на тонкослойных пластинках. Принцип метода уже рассматривался в разд. 3.3.

При помощи градуировочной кривой, полученной при элюировании стандартных белков с различной молекулярной массой, и используя простейшее аппаратное оформление, можно провести определение молекулярной массы с погрешностью 5 — 10%.

Об эффективности гель-фильтрации можно судить по рис. 3-9.

Молекулярную массу белков можно также определять посредством *гель-электрофореза в полиакриламиде* [41]. Мономеры, предназначенные для образования геля, растворяют в буфере и полимеризуют в стеклянных трубках или между пластинками при использовании в качестве сшивающего агента бисакриламида. Большая разделяющая способность метода объясняется молекулярно-ситовым эффектом.

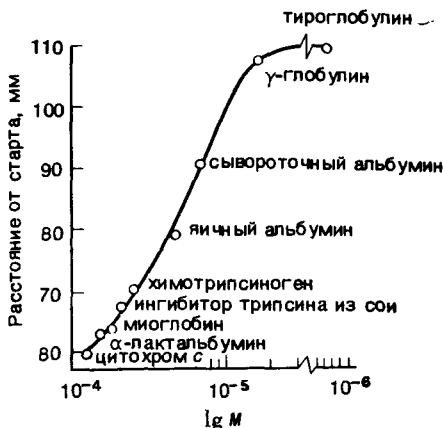


Рис. 3-9. Определение молекулярной массы методом тонкослойной гель-фильтрации.

Электрофорез проводят в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН). Таким путем можно определить молекулярные массы субъединиц олигомерных белков [74 — 76]. Молекулы ДСН образуют за счет гидрофобного взаимодействия комплексы с полипептидными цепями, характеризующиеся постоянным отношением ДСН : белок. Тогда электрофоретическую подвижность можно выразить как функцию молекулярной массы и сравнить с подвижностью стандартного белка. Метод отличается высокой скоростью (2 — 4 ч) и требует для одного определения, как правило, лишь 10 — 50 мкг белка. В последнее время ДСН-электрофорез проводят также на стеклянных шариках с контролируемым размером пор (120 — 200 нм). Комплекс ДСН — белок не адсорбируется на носителе, интервал определяемых молекулярных масс 3 500 — 12 000 [77].

Из-за зависящей от концентрации тенденции многих белков к агрегации или диссоциации на субъединицы определение молекулярных масс становится проблематичным, интерпретация результатов различных физико-химических методов часто также является сложной. Обычно суммируют значения для различных фракций и затем делят полученную величину на число частиц в растворе или относят среднюю величину не к числу, а к средней массе частиц. Метод ультрацентрифугирования позволяет найти среднюю молекулярную массу.

3.5.5. Форма молекул

Существуют различные методы определения формы молекул. Величиной, характеризующей форму молекулы белка, является соотношение осей f/f_0 (как уже было сказано, почти все белки имеют форму, отличную от сферы):

$$f/f_0 = a / \left(\frac{3V_{\text{Prot}} \cdot M}{4\pi N} \right)^{1/3}$$

где f — молярный коэффициент трения, f_0 — коэффициент трения для идеальной сферической молекулы, a — стоксовский радиус, N — число Авогадро, V_{Prot} — парциальный удельный объем белка, M — молекулярная масса.

При экспериментах по ультрацентрифугированию из константы седиментации при знании стоксовского радиуса можно вычислить отношение осей f/f_0 . Под стоксовским радиусом понимают радиус молекулы при наименьшей площади ее поперечного сечения. Он может быть получен из гель-хроматографической константы эксклюзии (r — эффективный диаметр пор):

$$K_D = (1 - a/r)^2 [1 - 2,104(a/r) + 2,09(a/r)^3 - 0,95(a/r)^5]$$

Отношение осей белковой молекулы, форма которой охарактеризована как эллипсоид вращения, для большинства глобулярных белков лежит в интервале между 2 и 30, в то время как для фибриллярных белков это соотношение > 30 .

Форма молекулы может быть также определена путем измерения вязкости, а также методом двойного лучепреломления в потоке. С помощью электронной микроскопии возможно прямое определение формы молекулы. При этом пользуются методом негативного контрастирования при применении тетраоксида осмия или других тяжелых металлов в качестве контрастирующих средств.

3.6. Принципы структурной организации белковых молекул

По рекомендации Линдерстрема — Ланга были введены термины «первичная, вторичная и третичная структура», характеризующие уровни структурной организации белков. *Первичная структура* белка дает сведения о числе и последовательности связанных друг с другом пептидной связью аминокислотных остатков. *Вторичная структура* описывает конформацию полипептидной цепи, возникающую при образовании водородных мостиков между карбоксильными кислородными атомами и атомами амидного азота в составе скелета молекулы. Под *третичной структурой* понимают трехмерную укладку полипептидной цепи, вызванную внутримолекулярным взаимодействием боковых цепей.

Введенный в 1958 г. Берналом термин *четвертичная структура* охватывает наблюдающийся у ряда белков процесс ассоциации нескольких интактных полипептидных цепей в определенный молекулярный комплекс. В этом случае связывание обеспечивают межмолекулярные взаимодействия. Вторичная, третичная и, если есть, четвертичная структуры в сумме дают *конформацию* белка.

Этот чисто академический принцип подразделения не следует переоценивать. Спорна прежде всего дифференциация вторичной и третичной

структур, поскольку в обоих случаях конформация поддерживается нековалентными связями. Но все-таки такое подразделение правомерно хотя бы потому, что изменение элементов вторичной структуры протекает намного быстрее, чем структурные перестройки третичной структуры.

Правила структурной организации глобулярных белков рассмотрены Шульцем [81]*. Согласно им, в структуре таких белков следует выделять большее число уровней организации. Иерархия берет свое начало от аминокислотной последовательности. Затем следует вторичная структура с регулярной укладкой полипептидной цепи, характеризующейся максимальным образованием водородных связей. Вторичная структура может образовывать до 75% всей полипептидной цепи. Иногда в молекуле белка можно выделить *агрегаты вторичной структуры* (сверхвторичная структура), являющиеся регулярными образованиями из нескольких участков полипептидных цепей, например двойная α -спираль или складчатый лист-спираль. Пример более высокой ступени организации глобулярных белков — *образование доменов*. Они возникают у крупных белков и характеризуются как независимые пространственные структуры. Иммуноглобулины, например, образуют при соответствующем сворачивании полипептидных цепей от 2 до 4 доменов. В химотрипсине активный центр находится внутри, между двумя доменами. В данном случае домены имеют структуру складчатого листа-цилиндра и связаны один с другим лишь одной полипептидной цепью. И наконец, глобулярные белки, построенные из нескольких доменов, могут упаковываться в еще более крупные структурные образования. Возникающие при этом агрегаты обычно построены симметрично, причем структура входящих в их состав мономеров, вероятно, не меняется.

3.6.1. Первичная структура

Установление первичной структуры начинается с определения аминокислотного состава и молекулярной массы выделенного и очищенного белка. Белки, состоящие из нескольких полипептидных цепей, разделяются с помощью денатурирующих реагентов (концентрированный раствор мочевины или ДСН) на мономеры. Дисульфидные мостики расщепляют восстановлением меркаптоэтанолом. Для предотвращения дисульфидного обмена и окисления образующихся свободных меркаптогрупп их блокируют каким-либо методом, например алкилированием иодуксусной кислотой с образованием S-карбоксиметильного производного или цианэтилированием акрилонитрилом. После определения N- и C-концевых аминокислот полипептидная цепь расщепляется химически или ферментативно (в нескольких вариантах) на меньшие перекрывающиеся фрагменты. Для каждого фрагмента устанавливается аминокислотная последовательность. И наконец, комбинируя отдельные последовательности, приходят к полной последовательности исходной полипептидной цепи.

К настоящему времени опубликовано свыше 15 000 работ о первичных структурах более 1 000 белков. Все известные первичные структуры заре-

* См. также книгу: Шульц Г., Ширмер Р. Принципы структурной организации белков: Пер. с англ. — М.: Мир, 1982. — Прим. ред.

гистрированы в «*Атласе белковых последовательностей и структур*» [83]. Методические основы анализа первичной структуры разработаны Сенгером с сотр. в 1945 — 1954 гг.

3.6.1.1. Селективное расщепление полипептидных цепей

Расщепление пептидной цепи, необходимое для определения последовательности аминокислот, осуществляют с помощью частичного химического или ферментативного гидролиза. При *ферментативном расщеплении* чаще всего используют протеазы: трипсин, химотрипсин, пепсин, папаин, субтилизин, эластазу и термоллизин [84].

Трипсин расщепляет пептидные связи, в которых карбоксильная функция представлена лизином или аргинином. Селективность расщепления может быть повышена блокированием боковых цепей лизина (Z-, Tfa- или Dnp-остатки на ϵ -аминогруппе) или аргинина (циклогександионное производное по гуанидиновой группе) [85]. Блокированные остатки не затрагиваются, и, таким образом, расщепление идет селективно либо по лизину, либо по аргинину. Цистеин также может быть включен в триптическое расщепление, если модифицировать меркаптогруппу этиленмином. Образующееся S- β -аминоэтильное производное структурно похоже на лизин, и пептидная цепь расщепляется со стороны его карбоксила.

Химотрипсин преимущественно расщепляет те пептидные связи, карбоксильная функция которых относится к ароматическим аминокислотам. В длинных полипептидных цепях гидролизуются также связи, образованные лейцином, валином, аспарагином и метионином. Пепсин обладает слабо выраженной специфичностью. Расщепляются связи, образованные триптофаном, фенилаланином, тирозином, метионином и лейцином.

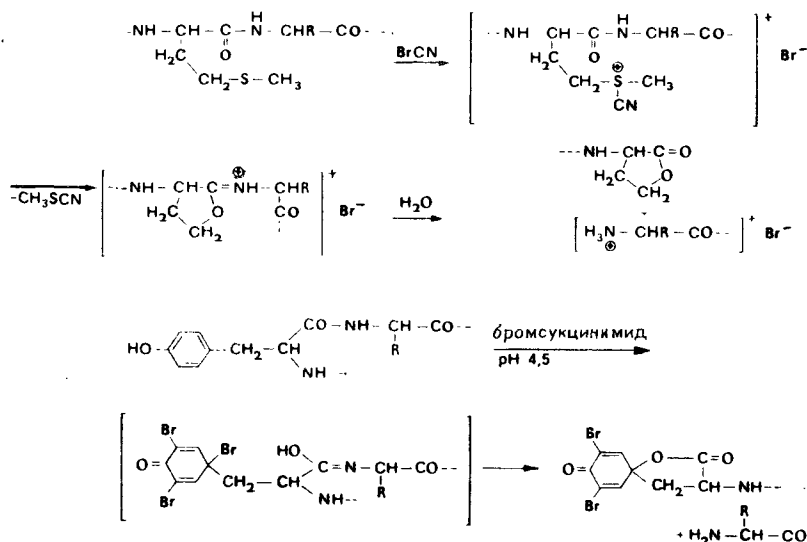
Субтилизин прежде всего расщепляет связи по соседству с серным, глицином и ароматическими аминокислотами. *Эластаза* менее специфична и преимущественно гидролизует связи нейтральных аминокислот. Основными точками воздействия малоспецифичного *папаина* являются остатки аргинина, лизина и глицина, кислые аминокислоты не затрагиваются. *Термоллизин* предпочтительно расщепляет полипептидную цепь по аминокислотным остаткам с гидрофобной боковой цепью.

В общем случае ферментативный гидролиз протекает тем специфичнее, чем короче время инкубации с протеазой. При этом большое значение имеет чистота выбранного фермента. Для удаления из трипсина последних остатков химотрипсина применяют, например, селективно ингибирующие вещества, такие, как дифенилкарбамилхлорид или L-(1-тозиламидо-2-фенил)-этилхлорметилкетон.

Расщепление полипептидных цепей, содержащих дисульфидные мостики, обычно приводит к сложной смеси низших пептидов. При реконструкции полипептидной цепи установление исходного порядка дисульфидных связей — довольно трудная задача. Один из путей ее решения дает диагностический электрофорез по Хартли, при котором пептиды после ферментативного гидролиза сначала разделяют электрофоретически на полосе бумаги.

Окислением надмуравьиной кислотой расщепляют цистиновые мостики, при этом образуются два новых пептида, содержащие цистеиновую кислоту. Затем полосу бумаги закрепляют на листе бумаги большего размера и повторяют электрофорез в направлении, перпендикулярном первоначальному. При этом не претерпевшие изменений пептиды располагаются по диагонали листа, а кислые пептиды, в состав которых входит цистеиновая кислота, оказываются вне ее и могут быть непосредственно идентифицированы.

Помимо приведенных ферментативных методов для селективного расщепления пептидных цепей используются химические методы [87, 88]. Так, например, бромциан расщепляет пептидные связи, образованные с участием карбоксильной группы метионина, а N-бромсукцинимид — связи тирозина или триптофана.



Для расщепления пептидной связи по остатку цистеина последний сначала реакцией с 2-нитро-5-тиоцианобензойной кислотой превращают в S-цианоцистеин, амидная связь которого может быть гидролизована легко без побочных реакций [90, 91].

Смесь пептидов, образующихся в результате использования различных методов расщепления, сначала должна быть разделена, и каждый из пептидов очищен. Целевой компонент перед анализом последовательности должен быть гомогенен по данным как минимум четырех различных методов разделения: ионообменной хроматографии, электрофореза, бумажной или тонкослойной хроматографии и противоточного распределения.

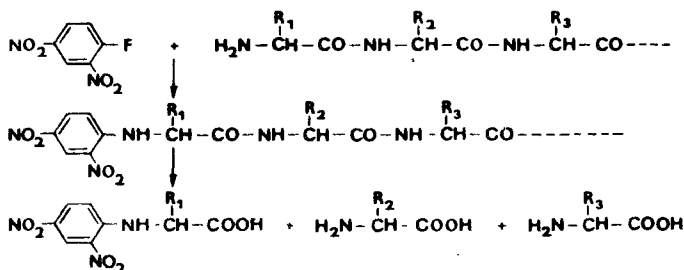
3.6.1.2. Установление аминокислотной последовательности [92 — 95]

Помимо приведенных далее методов следует сослаться (разд. 2.3.1.1. и 3.8.4.5) на возможность установления аминокислотной последовательности анализом соответствующей белку мРНК. Этот путь приобрел значение благодаря достижениям в определении первичной структуры нуклеиновых кислот (Фредерик Сенгер, Нобелевская премия за 1980 г.).

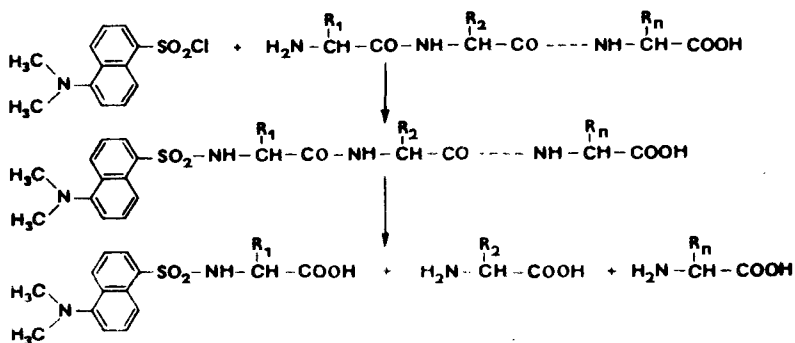
3.6.1.2.1. Определение концевых аминокислот

Химические методы определения концевых остатков основаны главным образом на превращении или модификации концевых аминокислот. После полного гидролиза производные концевых аминокислот отделяются от остальных немодифицированных аминокислот и идентифицируются.

Наиболее известен *динитрофенильный метод Сенгера* [97]. В этом методе пептид или белок обрабатывается 2,4-динитрофторбензолом (реагент Сенгера) и образующаяся в результате гидролиза ДНФ-аминокислота экстрагируется и идентифицируется.



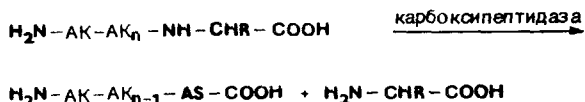
Значительно чувствительнее *дансильный метод* (5-диметиламинонафтилсульфонилный метод) [98], в котором N-концевая аминокислота идентифицируется после тонкослойной хроматографии в виде интенсивно флуоресцирующего желтым светом пятна дансильного производного. Предел обнаружения 10^{-14} моль.



Другими, однако, менее важными методами блокирования N-концевой аминокислоты являются арилсульфонирование при взаимодействии с иафтил- или бензолсульфохлоридом, карбамирование цианатом калия, карбоксиметилирование бромуксусной кислотой и др.

И наконец, определение N-концевой аминокислоты может быть принято с помощью *лейцинаминопептидазы*.

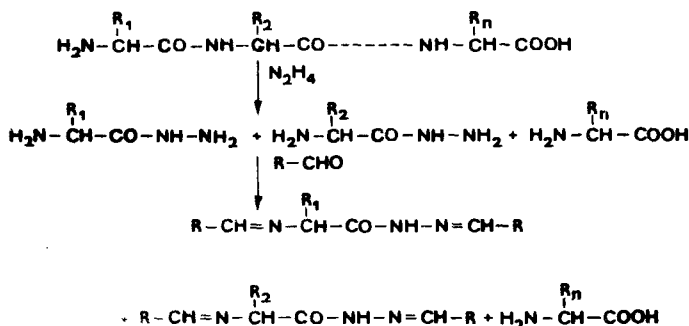
Для определения C-концевой аминокислоты используют чаще всего экзопептидазы — карбоксипептидазы А, В и Y.



Специфичность обеих экзопептидаз различна. Карбоксипептидазой А, впервые использованной Ленсом в 1949 г. для определения C-концевых остатков в инсулине, отщепляются все аминокислоты, кроме Lys, Arg, Pro и His. Карбоксипептидаза В отщепляет Lys, Arg, Orn и S-аминоэтилцистеин. Оба фермента взаимно дополняют друг друга и, как правило, применяются в комбинации.

Карбоксипептидаза Y из дрожжей обладает широкой специфичностью и отщепляет все аминокислоты, кроме Gly, связанного с Pro.

Из химических методов определения C-концевой аминокислоты наибольшее значение имеет *метод Акабори* [99]. При кипячении с безводным гидразином (100 °С, 5 ч) все аминокислоты, за исключением C-концевой, превращаются в гидразиды. Отделение значительного избытка гидразидов аминокислот осуществляется реакцией с изовалериановым (или другим) альдегидом. Можно также смесь, полученную непосредственно после гидразинолиза, обработать динитрофторбензолом и после подкисления выделить ДНФ-аминокислоту.



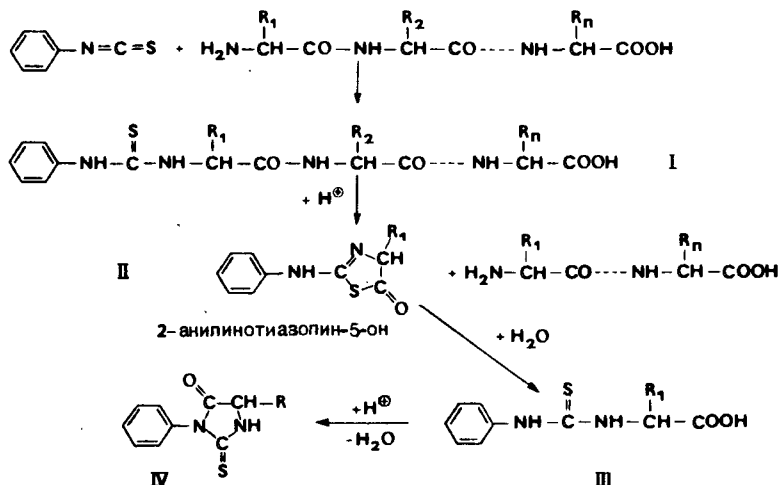
Этим методом не могут быть определены C-концевые цистеин, глутамин, аспарагин и триптофан; аргинин частично превращается в орнитин.

Другой метод определения С-концевой аминокислоты основан на восстановлении концевой карбоксильной группы литийалюминийгидридом. Белок перед восстановлением полезно этерифицировать диазометаном. Полный гидролиз дает легко выделяемый и идентифицируемый аминокислотный спирт, соответствующий С-концевому остатку аминокислоты.

3.6.1.2.2. Ступенчатая деградация полипептидной цепи

3.6.1.2.2.1. Химические методы

Важнейший химический метод ступенчатой деградации пептидов с N-конца — фенилтиогидантоиновый метод (деградация по Эдману) [100].



При обработке пептида фенилизотиоцианатом при pH 9 и 40 °C сначала образуется производное тиомочевины (I), которое в кислой среде расщепляется на 2-анилинтиазолин-5-он (II) и пептид, укороченный на одну аминокислоту. Относительно нестабильный тиазолион непригоден для идентификации. Он гидролизует в фенилтиокарбаминную кислоту (III), переходящую с замыканием кольца в 3-фенил-2-тиогидантоин (ФТГ-аминокислота) (IV). Прямая изомеризация тиазолиона в тиогидантоин происходит при нагревании в кислой среде. Образующиеся ФТГ-аминокислоты IV экстрагируют и идентифицируют с помощью бумажной, тонкослойной или газовой хроматографии. Количественное определение осуществляется спектрофотометрически при 268 — 270 нм. Оставшийся пептид выделяется и подготавливается к следующему циклу деградации.

Идентификацию ФТГ-аминокислот можно также осуществить с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [101 — 103]. Время проведения одного процесса хроматографического разделения составляет 7 мин; метод характе-

ризует высокая достоверность, причем работают на нанограммовом уровне. Работают на колонках с SiO_2 при применении давления и градиента растворителей.

Особо чувствительным методом определения фенол- и метилтиогидантоинов аминокислот является масс-спектрометрия [104 — 106]. В качестве окрашенного реагента для деградации предложен 4'-N,N-диметиламиноазобензол-4-изотиоцианат [107].

Другими вариантами ступенчатой деградации являются комбинация метода Эдмана с дансильным методом [108 — 110], микроопределение на фильтровальной бумаге, тонкослойная хроматография на полиамидных слоях и конденсация с пентафторфенилизотиоцианатом. В противоположность фенилизотиоцианату фторпроизводное допускает применение при газохроматографическом определении тиогидантоинов детектора с электронным захватом [111].

Принципиально деградация по Эдману при непрерывном повторении циклов возможна вплоть до С-конца. Однако на практике возможно определение последовательности примерно 10 аминокислотных остатков, так как отщепление протекает не всегда количественно, а дополнительное неспецифическое расщепление пептидной цепи вносит ошибку в результаты. Решить проблему удалось Эдману и Беггу [112, 113] одновременно с автоматизацией процесса. На рис. 3-10 приведена принципиальная схема так называемого белкового секвенатора. В отличие от неавтоматизированного варианта здесь нестабильный 2-анилинотиазолин-5-он автоматически переносится в коллектор фракций и затем, вне реакционной ячейки, превращается в ФТГ-аминокислоту.

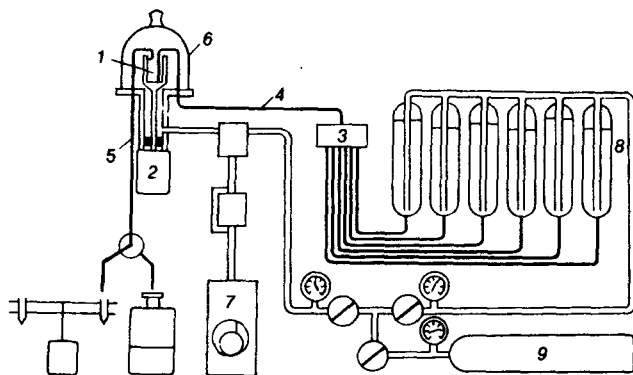


Рис. 3-10. Схема коммуникаций жидкофазного секвенатора белков [112, 113].

*В настоящее время для разделения ФТГ-аминокислот, как правило, используют сорбенты на основе SiO_2 , модифицированного октильными или октадецильными группами. — Прим. перев.

Реакционный сосуд 1 представляет собой цилиндрический, термостатируемый при 50 °С стеклянный стакан, вращаемый электромотором 2 со скоростью 1425 об/мин. Раствор, находящийся в ячейке, под действием центробежных сил распределяется на поверхности в виде тонкой пленки. Необходимые реагенты и растворители, подача которых регулируется краном 3, поступают по специальной трубке 4 на дно вращающегося стеклянного стакана, раствор после экстракции удаляется из реакционного сосуда через боковую трубку 5. Такая конструкция позволяет осуществить все необходимые операции: растворение, упаривание, вакуумную сушку и экстракцию. При этом каждый раз укорачиваемая на одну аминокислоту полипептидная цепь всегда остается в реакционной ячейке. Стеклянный цилиндр закрыт стеклянным колпаком 6 и может вакуумироваться вакуумным насосом 7. Реагенты и растворители находятся в соответствующих сосудах для хранения 8, находящихся под давлением азота. Разность в давлениях между сосудами и реакционной камерой позволяет осуществлять непрерывную подачу в реакционный сосуд желаемых реагентов и растворителей.

Цикл, необходимый для отщепления одной аминокислоты, включает ~30 операций и продолжается 93,6 мин. Таким образом за 24 ч удастся отщепить и идентифицировать около 15 аминокислотных остатков. Так как выход на цикл составляет 97 — 98%, теоретически возможно при данных условиях ступенчато отщепить до 100 аминокислот. Для небольших пептидов «классический» автомат подходит меньше, так как недостаточное различие растворимостей пептида и тиазолоина затрудняет селективную экстракцию последнего.

Лишь модификация процесса, осуществленная Брауницером и др. [114, 115], сделала возможным полное ступенчатое расщепление полипептидной молекулы вплоть до С-концевой аминокислоты. Введением в ϵ -аминогруппы боковых цепей остатков лизина, входящих в состав пептидов триптического расщепления, гидрофильных остатков нафталинсульфокислоты была снижена вымываемость даже коротких пептидов и тем самым обеспечены условия работы на секвенаторе. В дополнение к такой модификации может быть предпринята деградация по *квадрольному методу* [116]. Квадрол [N, N, N', N'-тетракис-(2-гидроксипропил)этилендиамин], хорошо растворяющий модифицированные белки, рекомендован в качестве буферного вещества для реакции Эдмана. Но обычно его применение ведет к преждевременному окончанию деградации из-за сильной вымываемости коротких пептидов.

Альтернативным путем для установления последовательности коротких пептидов является *деградация по Эдману на твердой фазе*. По аналогии со способом Меррифила деградируемый пептид связывается ковалентно с полимерным носителем и ступенчато расщепляется с N-конца. Принципиальная применимость этого метода доказана во многих лабораториях. В качестве носителя чаще всего используют устойчивый к трифторуксусной кислоте аминоалкилполистирол. Присоединение секвенируемого пептида более предпочтительно через амидную связь.

Первый твердофазный секвенатор предложен в 1970 — 1971 гг. Лоурсенom [117, 118]. Он значительно дешевле, чем секвенатор Эдмана, и подходит для работы с

пептидами, имеющими до 30 остатков. Все реакции деградации проходят в термостатируемой колонке.

Реагенты и растворители, скорость подачи которых регулируется с помощью клапанов, прокачиваются через колонку. Продукты реакции на каждом шаге деградации собираются коллектором фракций. Всему операциям управляет программирующее устройство.

Секвенирование на твердой фазе затрудняется присутствием в пептиде карбоксильных групп (образование циклических имидов, прекращение процесса, если амидная связь образована через β - или γ -карбоксильные группы) [119, 120]. Для решения этой проблемы Лоурсен [121] предложил связывать с носителем лизинсодержащие триптические пептиды через ε -аминогруппу с помощью бифункциональных реагентов, например *l*-фениленидиизотиоцианата, или проводить связыванием с носителем после предварительного блокирования карбоксильных групп [122].

Помимо этого существуют другие возможности удерживания на носителе анализируемого триптического фрагмента белка [123, 124]. Так, Ниалл с сотр. [125] применил в качестве носителя для автоматического секвенирования на наномольном уровне синтетические полиаминокислоты типа $H-(Norleu-Arg)_{27}-NH_2$.

В некоторых других твердофазных секвенаторах в качестве носителя применяется 3-аминопропилстекло [126]. Введение аминогрупп осуществляется обработкой 3-аминопропилтриэтоксисилом. Полнпептидные цепи фиксируются на 3-аминопропилстекле после активации карбоксильных групп подходящим методом либо в случае лизинсодержащих пептидов с помощью *l*-фениленидиизотиоцианата. Модифицированные носители на основе стекла отличаются постоянной емкостью при присоединении пептидов и хорошей проницаемостью для потока жидкости в колонке. Лоудон и Пархам [127] предложили использовать в качестве носителя пористое стекло с определенным размером пор (CPG-стекло), содержащее карбоксильные группы, активированные *N*-гидроксисукцинимидом и способные присоединять пептиды с образованием амидных связей. Деградация по Эдману пептида, адсорбированного на поверхности оксида алюминия за счет ионных связей, предложена Виландом и сотр. В качестве реагента для секвенирования предложен изотиоцианат бензолсульфокислоты. Манеке и Гюндель предложили полимерный деградирующий реагент — полннзотиоцианат. Введенный Штарком [128] метод тиоцианатного расщепления с С-конца был использован в твердофазном варианте [129]. С его помощью удалось идентифицировать последние 6 аминокислот рибонуклеазы.

О достижениях техники разделения при анализе последовательностей белков и пептидов сообщается в обзоре [130].

3.6.1.2.2. Ферментативные методы

В разд. 3.6.1.2.1 отмечалось, что карбоксипептидазы А, В и У преимущественно используются для определения С-концевых аминокислот. Однако при более длительном воздействии пептидная цепь может быть путем отщепления отдельных аминокислот деградирована с С-конца. Для этого необходимы определенные предпосылки. Фермент не должен содержать активных

эндопротеаз или других пептидаз (ингибирование диизопропилфторфосфатом). Кроме того, процесс нарушают С-концевые D-аминокислоты, амидные группы, пролины и гидроксипролины. Во многих нативных белках С-концевая часть доступна лишь после денатурации белка. И наконец, выделение аминокислот из реакционной смеси в порядке, соответствующем их последовательности, затруднительно, так как отщепление разных аминокислот идет с различной скоростью.

При деградации пептидов с N-конца аналогичным образом можно работать с лейцинаминопептидазой.

Другой путь ферментативной деградации возможен при использовании *дипептидиламинопептидазы I* [131]. Этот фермент последовательно отщепляет дипептиды с N-конца, которые затем могут быть разделены и идентифицированы. Второй набор дипептидов получают при повторении деградации той же полипептидной цепи, но укороченной на одну аминокислоту. В случае коротких пептидов полная последовательность вытекает из сопоставления данных обеих дипептидных деградаций и данных анализа полного гидролизата интактного пептида.

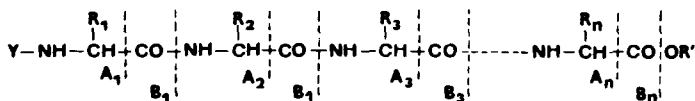
Для больших пептидов Овчинников и Кирюшкин [132] рекомендовали применение комбинированного хромато-масс-спектрометрического метода идентификации дипептидов и обработку результатов анализа на ЭВМ при использовании картотеки масс-спектров, содержащей данные для 400 возможных дипептидов.

В методе, предложенном Каллаханом и сотр. [133], пептид и дипептидаза находятся с одной стороны мембраны. Отщепленный дипептид диффундирует через мембрану и затем идентифицируется с помощью тонкослойной хроматографии.

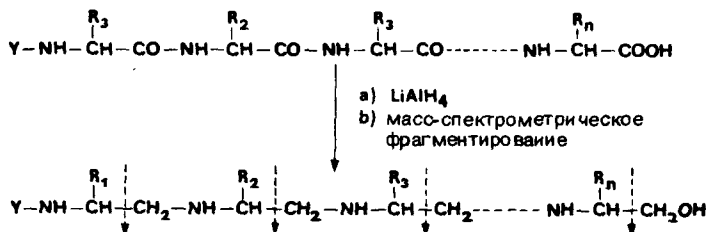
3.6.1.2.2.3. Физические методы

В последнее время для анализа аминокислотных последовательностей наряду с химическими широко используются различные физические методы. Шайблат [134] определил последовательность некоторых ди- и трипептидов с помощью ЯМР. Метод основан на изменениях спектра в зависимости от pH среды и последовательности пептида.

Большее значение имеет *масс-спектрометрический метод* установления последовательности [135]. Он основан на наблюдении за ионами, характерными для каждой последовательности и образующимися в результате расщепления связей C—CO или CO—N. В простых случаях появление амино- (A) и аминокацилфрагментов (B) и их интенсивности позволяют судить о порядке следования аминокислот и длине цепи исследуемого пептидного производного:



Обработка и отнесение спектров в случае длинных пептидов и пептидов с полифункциональными аминокислотными остатками особенно сложны, так как в этих случаях фрагментация на А и В часто перекрывается множеством других типов фрагментации. Первый метод масс-спектрометрического анализа последовательности был разработан в 1959 г. Биманном с сотр. [136] и основан на легкой расщепляемости С — С-связей в группах $-\text{NH}-\text{CHR}-\text{CH}_2-\text{NH}-$, образующихся при восстановлении пептида литийалюминийгидридом:



Восстановление позволило одновременно преодолеть трудности, связанные с плохой летучестью пептидных производных ($Y = \text{ацетил}$).

Дальнейшее развитие техники эксперимента дало возможность введения непосредственно в ионизационную камеру масс-спектрометра трифторацетильных, ацетильных и других ацилированных пептидов.

Метод масс-спектрометрии особенно удобен при выяснении структуры пептидных антибиотиков, присутствие в которых непротеиногенных аминокислот и D-энантиомеров исключает использование ферментативного расщепления.

При анализе последовательностей особенно удачна комбинация методов масс-спектрометрии и газовой хроматографии [137 — 140]. Сложные олигопептидные смеси, образующиеся при частичном гидролизе, после превращения в летучие производные разделяют на газовом хроматографе и идентифицируют с помощью масс-спектрометра. Установление последовательности осуществляют с помощью ЭВМ, основываясь на данных идентификации всех олигопептидов. Серин, тирозин и триптофан не вносят каких-либо трудностей.

3.6.2. Вторичная и третичная структуры [78, 81, 141 — 147]

Установленная секвенированием последовательность аминокислот может рассматриваться лишь в качестве одного из уровней структурной организации белка. Она закодирована в соответствующем гене и находится в тесной связи со вторичной и третичной структурами белка, его конформацией и биологической активностью. Образование вторичной и третичной структур

происходит в процессе или сразу после окончания биосинтеза белка (разд. 3.7.3). За их стабилизацию помимо ковалентных пептидных и дисульфидных связей ответственны прежде всего нековалентные взаимодействия боковых радикалов аминокислот.

3.6.2.1. *Пространственное расположение полипептидной цепи*

Для установления вторичной и третичной структур химические методы неприменимы. Для этой цели преимущественно применяют рентгеноструктурный анализ, причем из получаемой дифракционной картины рассчитывают распределение электронных плотностей в кристалле белка. Точное установление пространственных структур белков стало возможным благодаря работам Полинга и Кори. На аминокислотах, их амидах и простых пептидах в основном с помощью рентгенографических исследований были определены длины связей и валентные углы. Оказалось, что пептидная связь в значительной степени обладает характером двойной связи. Она является планарной, поэтому в пептидной цепи на один аминокислотный остаток приходится лишь два места поворота. Одним является поворот вокруг $C^\alpha-N$ -связи (угол φ), другим — вращение вокруг оси $C^\alpha-C$ -связи (угол ψ). Значения φ и ψ для всех остатков аминокислот определяют пространственное расположение цепи.

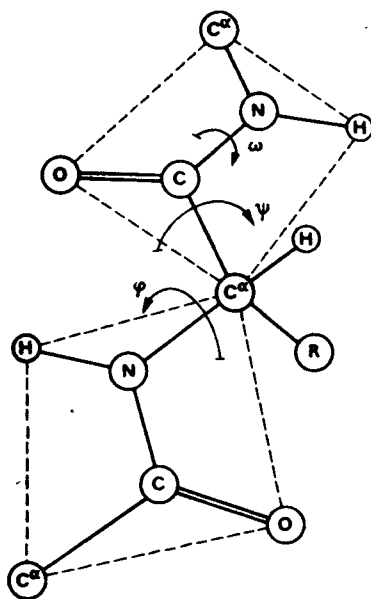


Рис. 3-11. Возможные углы поворота в полипептидной цепи.

Из планарности пептидной связи следует, что угол поворота $\omega = 0$ (рентгеноструктурными исследованиями белков была показана возможность незначительного поворота с выходом из планарности). По определению углы φ и ψ получают положительное значение, если, при наблюдении от C^α -атома, вращение осуществляется по часовой стрелке. Принципиально для этих углов разрешены не все значения; это ограничение определяется радиусами взаимодействия не связанных друг с другом атомов. Рамачандран и др. [148, 149] исследовали на различных моделях с помощью ЭВМ все возможные комбинации углов поворота φ и ψ (в табл. 3-7 приведены минимальные расстояния между ковалентно не связанными атомами, которые были взяты для расчетов стерически разрешенных и запрещенных конформаций белковой молекулы при отклонении ее от планарности амидной связи). Из-за стерических ограничений практически реализуется лишь 15% всех возможных значений φ и ψ .

Таблица 3-7. Минимальные расстояния (нм) между ковалентно не связанными атомами, полученные из вандерваальсовых радиусов (в скобках приведены минимальные расстояния по Рамачандрану)

	C	O	N	H
C	0,32 (0,30)	0,28 (0,27)	0,29 (0,28)	0,24 (0,22)
O		0,27 (0,26)	0,27 (0,26)	0,24 (0,22)
N			0,27 (0,26)	0,24 (0,22)
H				0,20 (0,19)

На φ, ψ -диаграмме (рис. 3-12) *транс*-пептидных конформаций Рамачандрана разрешенные комбинации углов φ и ψ лежат в заштрихованной области (расчет произведен с нормальными радиусами атомов; табл. 3-7). Используя минимальные контактные расстояния, разрешенную зону расширяют (ограничена штриховой линией), и в окрестностях точки $\varphi = \psi = 240^\circ$ появляется новая разрешенная область.

Комбинации разрешенных углов φ и ψ , рассчитанные Рамачандраном для модели из твердых сфер, соответствуют максимально устойчивым конформациям. Значительно влияют на стерически разрешенные конформации объемные боковые радикалы аминокислот. Приведенная на рис. 3-12 φ, ψ -диаграмма базируется на расчетах, сделанных для аланина. Для глицина разрешено значительно больше комбинаций углов, чем, например, для валина или изолейцина.

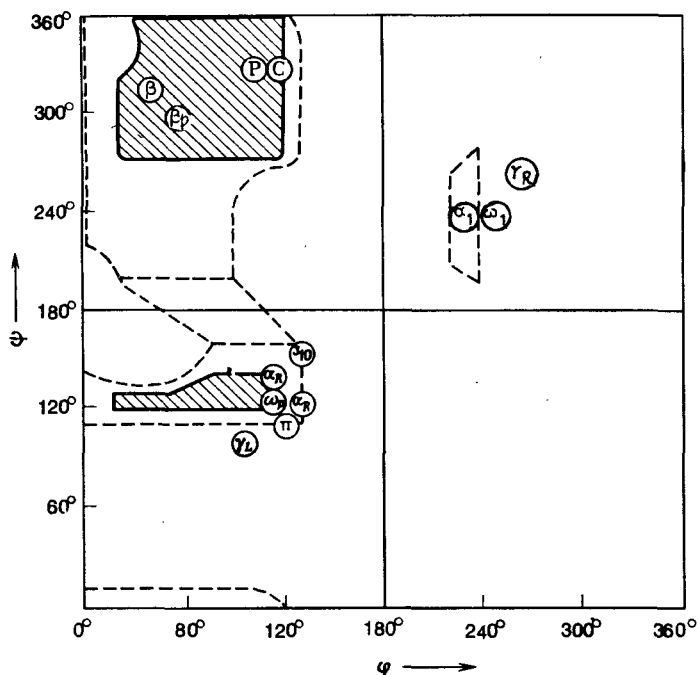


Рис. 3-12. Диаграмма разрешенных значений углов φ и ψ [148, 149].
 Обозначения: Р — полипролиновая спираль; С — коллагеновая спираль; β — антипараллельная β -структура; β_p — параллельная β -структура; α_R и α_L — лево- и правовращающая α -спираль; ω_R и ω_L — лево- и правовращающая ω -спираль; γ_R и γ_L — лево- и правовращающая γ -спираль; 3_{10} — 3_{10} -спираль.

В 1951 г. Полинг [150, 151] разработал две относительно простые структурные модели, спиральную и складчатого листа, объясняемые исключительно планарностью пептидной связи и водородными связями между пептидными группами и образующие основу для построения высших структур. Модели нашли свое подтверждение в пространственно-структурных исследованиях Перутца [152].

Определение вторичной структуры белков возможно также с помощью лазерной спектроскопии комбинационного рассеяния [153]. Установление вторичной структуры глобулярных белков с помощью ЭВМ открывает дальнейшие интересные возможности [154].

3.6.2.1.1. Спиральные структуры [155, 156]

Идентичность значений углов φ и ψ при каждом атоме пептидной связи в пептидной цепи неизбежно дает спираль с определенным числом n аминокислотных остатков на виток, характерной высотой h витка и определенным подъемом d на каждый остаток (рис. 3-13). Принимая во внимание планарность пептидной связи, величины n и d однозначно определяются из углов φ и ψ , а зная n и d , можно получить высоту витка спирали h .

Возможно существование нескольких различных спиральных структур, возникающих при образовании водородных связей между структурными элементами пептидной связи (NH- и CO-группы), из которых наиболее известна α -спираль (рис. 3-14) с параметрами: $n = 3,6$, $d = 0,15$ нм и $h = 0,54$ нм. В случае α -спирали за счет внутримолекулярных водородных связей образуется 13-членная кольцевая структура. Правильно назвать такую структуру можно так: $\alpha(3,6_{13})$ -спираль. Другими упорядоченными конформациями спирального типа для остова молекулы белка являются 3_{10} -спираль, $\pi(4,4_{16})$ -спираль и $\gamma(5,1_{17})$ -спираль.

В глобулярных белках доминирует правовращающая α -спираль, кроме того, в отдельных белках (гемоглобин, лизоцим) показано наличие 3_{10} -спирали. В α -кератине высота витка α -спирали меньше (0,51 нм), чем соответствующая величина (0,54 нм) в нормальной α -спирали.

Принципиально α -спираль может быть образована как L-, так и D-аминокислотными остатками. Склонность полипептидной цепи к образованию спиральной структуры в значительной степени зависит от природы боковых цепей аминокислот. Различают стабилизирующие спираль аминокислоты (Ala, Val, Leu, Phe, Trp, Met, His, Gln) и дестабилизирующие (Gly, Glu, Asp, Ile, Thr, Lys, Arg, Tyr, Asn, Ser). В случае кислых и основных аминокислот дестабилизирующее действие определяется наличием зарядов на боковых группах. В полиглутаминовой кислоте и полилизине, например, α -спираль образуется при pH 2 и 12 соответственно, т. е. при преобладании незаряженных боковых функциональных групп. При одноименно заряженных боковых группах силы отталкивания сильнее, чем прочность стабилизирующих водородных связей. В случае, изолейцина дестаби-

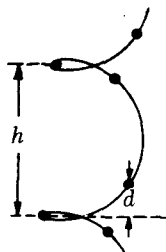


Рис. 3-13. Спираль с тремя остатками на виток (по Хагеймайеру).

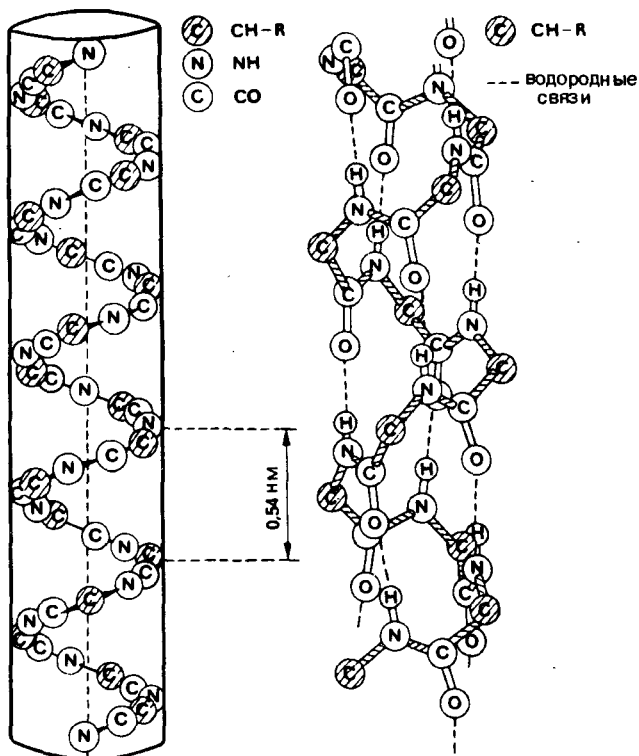


Рис. 3-14. Структура α -спирали (по Рапопорту).

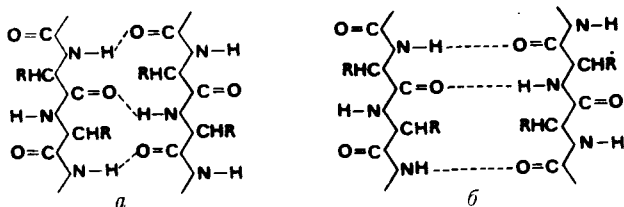
лизирующее действие объясняется стерическим эффектом. Наличие пролина всегда ведет к прерыванию спирали, образуемой полипептидной цепью (точка излома), так как в этом случае атом азота зафиксирован в составе пирролидинового кольца и не способен образовывать водородную связь. α -Спиральность полипептидной цепи может быть приблизительно определена сравнением удельного оптического вращения до и после денатурации. При денатурации белков наблюдается увеличение угла вращения влево.

3.6.2.1.2. Структура складчатого листа

Как и в спиральной структуре, максимальное замыкание водородных связей может достигаться между двумя идущими в противоположном направлении пептидными цепями. Стерические затруднения, вызванные боковыми группами, вынуждают пептидные группировки к повороту относительно

друг друга. Образующаяся структура называется структурой *складчатого листа* или β -структурой.

В зависимости от параллельности или антипараллельности хода двух соседних цепей различают два вида структур: *параллельную* (а) и *антипараллельную* (б) структуры складчатого листа.



Соседние полипептидные цепи, идущие в противоположном направлении, в пространственном представлении (рис. 3-15) обнаруживают «плиссированность», причем боковые радикалы аминокислотных остатков стоят попеременно с разных сторон складчатого листа. Штрихами показаны водородные связи. Соответствующие пары углов φ и ψ для параллельной и антипараллельной структур могут быть получены из рис. 3-12.

β -Структура присутствует в фиброине шелка. Она может также образовываться в различных белковых доменах, например в доменах карбоксипептидазы А и лизоцима.

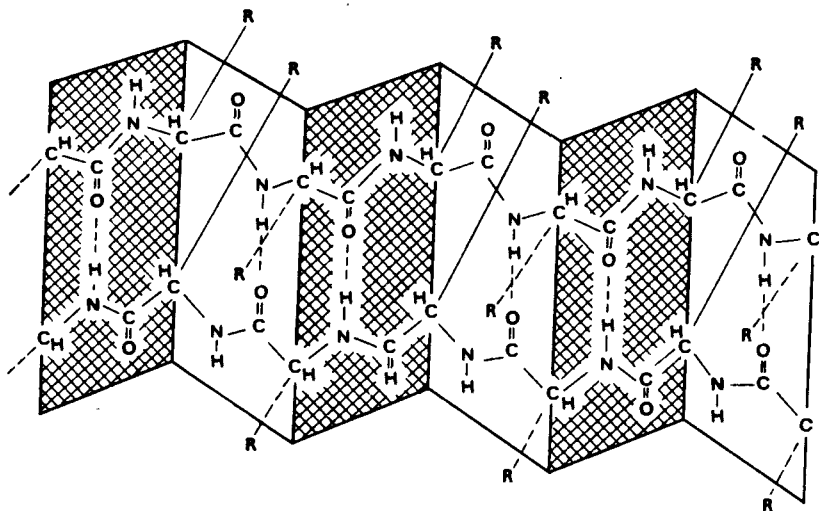


Рис. 3-15. Антипараллельная структура складчатого листа.

3.6.2.1.3. Неупорядоченные конформации полипептидной цепи

Как в случае спиральной структуры, так и структуры складчатого листа пары углов φ и ψ для всех аминокислотных остатков лежат в одной точке диаграммы Рамачандрана (рис. 3-12). Напротив, в случае неупорядоченной конформации эти пары углов для различных аминокислотных остатков не находятся в одной точке, а распределяются по разрешенной области диаграммы. Вследствие этого образуется огромное разнообразие конформаций, причем распределение всех комбинаций углов не является равномерным статистическим в математическом смысле. Ограничения возможных конформаций вытекают из взаимного расположения имеющихся боковых групп, а также из их взаимодействий с растворителем. По энергетическим причинам это приводит к предпочтению определенных локальных конформаций.

Неупорядоченные белковые конформации появляются при процессах денатурации, при переходах спираль — клубок, у синтетических полиаминокислот и др. Кинетические и теоретические проблемы переходов спираль — клубок освещены в обзорных работах [157, 158].

Это определение не следует прямо переносить на конформации глобулярных белков. Например, у химотрипсина неупорядоченные области несравнимы со статистическим клубком. Более того, пары углов φ и ψ для каждого аминокислотного остатка принимают свои определенные значения.

3.6.2.1.4. Третичная структура глобулярных белков

До сих пор при рассмотрении периодических структурных элементов полипептидной цепи не принималось во внимание влияние боковых радикалов аминокислот на конформацию белковой молекулы. Но белки, в особенности глобулярные, характеризуются трехмерным расположением полипептидной цепи, за стабилизацию которого помимо обсуждавшихся водородных связей в основном ответственны нековалентные взаимодействия.

При той причине, что белки функционируют в водной среде, а вода обладает исключительно сильно выраженным деассоциирующим действием, образование белковых конформаций не может быть объяснено одним лишь большим числом водородных связей в спиральной и β -структурах. Помимо водородных связей решающий вклад в стабилизацию конформаций вносят ионные связи, вандерваальсовы дисперсионные силы и особенно гидрофобные взаимодействия. Под гидрофобными взаимодействиями понимают тот факт, что в водной среде гидрофобные группы плотно контактируют друг с другом с тем, чтобы уменьшить поверхность контакта с водой. Причина этого лежит в том, что соприкосновение гидрофобных групп с окружающими молекулами воды энергетически невыгодно. Об этом говорит то, что значение ΔH° слегка превышает нулевое. Рассмотрим окружение некоторого гидрофобного бокового радикала таким образом, что оно будет охарактеризовано определенным упорядоченным состоянием молекул воды. Если две гидрофобные группы вступают во взаимодействие, то умень-

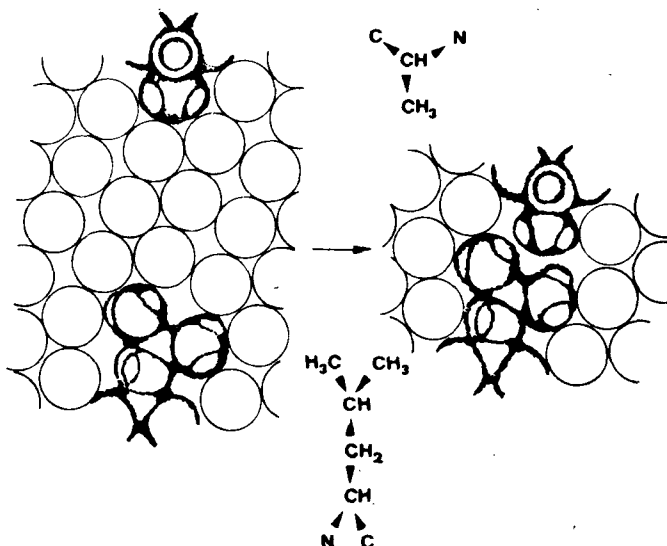


Рис. 3-16. Гидрофобные взаимодействия.

шается упорядоченность молекул воды (рис. 3-16). В соответствии с уравнением

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

результатом этого является прирост энтропии и, следовательно, появление отрицательной свободной энтальпии.

Фактором, благоприятствующим гидрофобным взаимодействиям, является изменение энтропии, точнее говоря, ее прирост. В случае глобулярных белков полярные и прежде всего почти все ионные группы находятся на поверхности, чем облегчается гидратация молекулы белка, имеющая большое значение для стабилизации пространственной структуры. У некоторых белков удаление воды неизбежно связано с их денатурацией. Большая часть неполярных остатков, напротив, находится внутри молекулы белка. Они укладываются плотно один к другому и практически выдавливают воду из первоначально еще непрочной клубковой структуры полипептидной цепи, что приводит к компактности и стабильности гидрофобного ядра. Само собой разумеется, что часть функциональных (ионных) групп боковых цепей находится внутри молекулы белка. Группы, оказавшиеся замаскированными, не подвергаются внешним воздействиям (изменение pH, реакции модификации и др.). Более того, измененная реакционная способность таких функциональных групп, имеющая значение для каталитического действия ферментов, определяется гидрофобным окружением и взаимодействием с

другими группами. В общем случае пространственная укладка полипептидной цепи глобулярных белков характеризуется относительно небольшой долей периодических структурных элементов (β -структура, α -спираль) и обнаруживает несимметричное и нерегулярное строение. В конечном счете причиной образования конформаций высокой стабильности является кооперативность между водородными и гидрофобными связями, а также другими нековалентными взаимодействиями, причем для биологически активных белков в физиологических условиях проявляются термодинамически стабильные конформации с минимальной свободной энергией.

Обобщая, остается сказать, что конформация остова белковой молекулы вносят решающую долю в формирование конформации глобулярного белка. Однако с помощью нековалентных взаимодействий (гидрофобные, диполь-дипольные взаимодействия, ионные связи, дисперсионные силы) осуществляется образование стабильной трехмерной структуры белка, имеющей исключительное значение для биологической функции глобулярного белка.

Следует указать также, что гидрофобные взаимодействия сами могут иметь значение для стабилизации определенной конформации (α -спираль, β -структура) остова молекулы белка.

3.6.2.2. Методы установления пространственной структуры белков

При рентгеноструктурном анализе белка неизвестной структуры регистрируется интерференционная картина от кристалла белка. Исходя из положения, числа и интенсивности рефлексов (максимумов интерференции) при определенных условиях, можно установить структуру рассеивающего кристалла [159, 160]. Вычисление распределения электронных плотностей осуществляется по формуле

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{h=-\infty}^{+\infty} \sum_{k=-\infty}^{+\infty} \sum_{l=-\infty}^{+\infty} |F(hkl)| \cos 2\pi [hx + ky + lz - \alpha(hkl)]$$

Вся установка для рентгеноструктурного анализа автоматизирована и связана с ЭВМ. Вычисляют распределение электронных плотностей $\rho(x, y, z)$ в элементарной ячейке. Каждый рефлекс характеризуется с помощью индексов Миллера h , k и l . V — объем элементарной ячейки, $F(h, k, l)$ — структурный фактор и $\alpha(h, k, l)$ — соответствующий фазовый угол. Последний должен быть определен косвенными методами, в то время как остальные величины вытекают из дифракционной картины.

Значения электронной плотности вычисляются по слоям, в которых точки равной плотности соединяют линиями. Таким образом, получают послойную диаграмму кристалла белка.

Установить структуры больших молекул белка стало возможным только при применении производных с тяжелыми атомами. Тяжелый атом, например атом рту-

ти, встраивается в поверхность молекулы. Это приводит к незначительным изменениям в структуре (изоморфное замещение), однако изменяет интенсивности рентгеновских рефлексов.

При применении нескольких производных с тяжелыми атомами на основе появляющихся изменений интенсивностей можно определить фазовый угол и затем рассчитать электронные плотности. Проведение такого структурного анализа кристаллов весьма трудоемко даже тогда, когда для сложных расчетов в распоряжении исследователя имеется высокопроизводительная вычислительная техника. Так, с кристалла белка и кристаллов различных изоморфных производных того же белка должно быть получено, измерено и скорректировано множество рефлексов. За этим следует установление положения тяжелых атомов и определение фазового угла для каждого рефлекса. Затем для нескольких десятков тысяч точек должны быть рассчитаны электронные плотности, и в заключение результаты должны быть интерпретированы.

Поскольку определение электронных плотностей с небольшим разрешением (0,5 нм) не столь трудоемко, обычно начинают исследование структуры кристалла белка с этого этапа. Тонкая структура, т. е. положение отдельных атомов, требует разрешающей способности 0,15 нм. Развитие этого метода, осуществленное в 1952 — 1960 гг. лабораториями Кендрию и Перутца, стало значительным научным достижением. Обзоры по установлению пространственной структуры белков написаны Хоппе [161], а также Дикерсоном и Гайсом [78]. К настоящему времени известны пространственные структуры более 50 белков.

Есть указания на принципиальную возможность анализа структуры кристалла белка с помощью *электронного излучения*, а также посредством метода *нейтронного рассеяния* [162]. В будущем, вероятно, приобретут значение математические методы, которые позволят осуществлять на ЭВМ расчет третичной структуры на основе данных о первичной структуре [163]. Первые попытки, в основном в применении к спиральным белкам (миоглобин), привели к интересным результатам [164]. Хеглер и Хониг [165] рассчитали на примере полипептидной цепи, составленной из глицина и аланина, условия, необходимые для образования компактной глобулярной структуры белка.

В случае аденилаткиназы данные, полученные из предсказания структуры белка, сопоставимы с данными рентгеноструктурного анализа. Совпадение выявилось в идентификации α -спиралей, а также в установлении контактов между тремя полипептидными цепями пятицепочечной β -структуры. Наиболее точно были определены точки «перелома» белковой цепи [166]. К другим стратегиям установления конформаций некристаллизующихся белков можно отнести кинетические исследования де- и ренатурации с целью локализации центров свертывания [167] и палеонтологические сопоставления, позволяющие выявить родственные связи между белками [168].

Для изучения конформации в физиологических условиях применяются различные спектроскопические методы. *ЯМР-спектроскопия* высокого разрешения, особенно в сочетании с КД-техникой, позволяет проводить на-

дежный анализ и интерпретировать сложные спектральные параметры. В противоположность упорядоченному состоянию в кристаллах в растворе наблюдается большое число конформаций.

Взаимодействие пептидов и белков с их окружением (гормон — рецептор, фермент — субстрат) приводит к конформационным изменениям участвующих молекул, которые можно проследить спектроскопически так же, как конформационные изменения, вызванные влиянием растворителей, комплексобразованием с ионами металлов или биологическими рецепторами.

Изменения конформации полипептидной цепи (α -спираль, β -структура, статистический клубок) могут быть также определены с помощью *инфракрасной спектроскопии*. Характерные полосы «амид I» и «амид II» изменяют положение максимума в зависимости от конформации. Измерение дихроизма в инфракрасной области с помощью плоскополяризованного излучения дает возможность однозначно различить α -спираль и β -структуру.

В УФ-области конформационные изменения белков лишь в незначительной степени влияют на абсорбцию, поэтому здесь наиболее достоверным методом является дифференциальная спектроскопия. Из сдвига спектра в коротко- или длинноволновую область, не связанного с изменениями интенсивности, могут быть получены данные о конформации белка в водном растворе.

Дисперсия оптического вращения (ДОВ) и круговой дихроизм (КД) изучались на большом числе белков [171, 172], но интерпретация этих данных относительно сложна.

Стремясь облегчить интерпретацию, пробуют установить связь между эффектом Коттона и данными рентгеноструктурного анализа. Этим методом было, например, показано высокое содержание α -спиралей в миоглобине и немного меньшее (с учетом β -структуры) в лизоциме, карбоксипептидазе А и папаине, в то время как в рибонуклеазе и химотрипсине α -спиральность оказалась очень низкой. Хорошая корреляция рентгеноструктурных данных и результатов ДОВ и КД была получена на миоглобине и лизоциме, т. е. на белках с высокой спиральностью, но не удалась на химотрипсине.

Очевидно, в неспиральных белках на эффект Коттона сильно влияют другие элементы пространственной структуры, например асимметрия, присущая дисульфидным связям или ароматическим остаткам в окружении асимметричных центров, что приводит к более или менее сильным искажениям. Кроме того, проявляемый эффект в случае β -структуры намного ниже, чем в случае α -спирали. Ситуация усложняется еще тем, что и другие структуры обуславливают эффект Коттона подобно α -спиралям.

Несмотря на эти ограничения, хироптические методы получили большое значение при конформационном анализе белков. Результативным является прямое сравнение данных, полученных на нативных и денатурированных белках, а также распространение исследований на химически модифицированные белки.

Метод *водородно-дейтериевого обмена* позволяет определять в белке число и вид водородных связей. Метод основан на том, что атом водорода

да, связанный со свободной электронной парой другого атома, может в виде протона очень быстро обмениваться с протонами растворителя. Атомы водорода, связанные с атомами углерода, в обмене участия не принимают. На этой основе выработаны различные экспериментальные варианты метода.

Например, за обменом протонов пептидных связей можно наблюдать непосредственно, следя за исчезновением полосы деформационных колебаний $N-H$ при 1550 см^{-1} . В то же время при длительной обработке тяжелой водой (D_2O) все замещаемые атомы водорода обмениваются на дейтерий. Затем в воде посредством ИК-спектроскопии или измерения плотности снимается кинетика замещения дейтерия. Однозначность получаемых результатов ограничена даже при том условии, что применяются очень чистые белки.

В заключении можно констатировать, что как приведенные здесь, так и другие методы исследования конформаций полипептидов и белков в растворе по отдельности дают информацию лишь о некоторых аспектах структуры белка, однако совместное применение различных методов ведет к получению более надежных результатов.

3.6.3. Четвертичная структура [173 — 174]

Под четвертичной структурой понимают построение олигомерного белка из определенного комплекса нескольких полипептидных цепей. Ассоциация двух или нескольких полипептидных цепей происходит под действием межмолекулярных взаимодействий между полярными, ионизируемыми и неполярными боковыми группами посредством диполь-дипольных взаимодействий, водородных связей, гидрофобных взаимодействий и образования ионных пар. В исключительных случаях четвертичная структура также стабилизируется дисульфидными мостиками.

Все четвертичные структуры характеризуются как стехиометрическим составом, так и геометрией строения. Наименьшая, как правило связанная нековалентно, часть белка, имеющего четвертичную структуру, называется *субъединицей*.

Четвертичная структура может быть как гомогенной, так и гетерогенной. В первом случае в функциональную структуру ассоциированы только идентичные полипептидные цепи, в то время как элементами белков с гетерогенной четвертичной структурой являются неидентичные цепи. Оказалось, что у глобулярных белков с $M > 50\,000$ всегда доминирует четвертичная структура. До 1974 г. было известно приблизительно 650 белков с четвертичной структурой, из них ~ 500 ферментов. Принцип образования четвертичной структуры имеет важное значение для функции белка. Например, становятся возможными кооперативные реакции, имеющие значение для регуляторных процессов в клетке.

Регуляторные ферменты, в отличие от нерегуляторных одноцепочечных, состоят в основном из субъединиц.

Таблица 3-8. Молекулярные массы и состав некоторых белков, имеющих четвертичную структуру

Белок	Источник	M	Субъединицы	
			Число	M
Гемоглобин	Кровь млекопитающих	64 250	4 ($\alpha_2\beta_2$)	α : 15 130 β : 15 870
Вирус табачной мозаики	Инфицированные листья	39 400 000	2130	17 530
Конканавалин А	<i>Canavalia ensiformis</i>	55 000	2 ^a	27 000
Лактоглобулин	Холерные вибрионы	36 750	2 ^a	18 375
Энтеротоксин		84 000	6 ^a	14 000
Церулоплазмин	Плазма	125 000	4 ($\alpha_2\beta_2$)	α : 16 000 β : 53 000
Нервный ростовой фактор	Мышь	26 520	2 ^a	13 260
Репрессор лактозы	<i>E. coli</i>	150 000	4 ^a	39 000
Каталаза	Печень телеика	240 000	4 ^a	60 000
Алкогольдегидрогеназа	Дрожжи	141 000	4 ^a	35 000
Люцифераза	<i>Renilla</i>	34 000	3 ^a	12 000
Малатдегидрогеназа	Нейроспора	54 000	4 ($\alpha_2\beta_2$)	13 500
Аспартаткиназа	<i>Bac. polymyxa</i>	116 000	4 ($\alpha_2\beta_2$)	α : 17 000 β : 43 000
Лейцинаминопептидаза	Хрусталик глаза, почки свиньи	330 000 255 000	6 ^a 4 ^a	58 000 63 500
Глутаминсинтаза	Мозг свиньи, почки свиньи	370 000 370 000	8 ^a 4 ^a	46 000 90 000
Фосфофруктокиназа	Дрожжи	770 000	6 ^a	130 000
Аргининдекарбоксилаза	<i>E. coli</i>	850 000	10 ^a	82 000

^a Идентичные субъединицы.

Построение из субъединиц дает, наконец, значительную экономию генетического материала.

Принципы организации олигомерных ферментов рассмотрены в обзоре [175].

Установление четвертичной структуры возможно непосредственно с помощью электронной микроскопии и рентгеноструктурного анализа. В то

же время известны различные методы диссоциации олигомерного белка на субъединицы для последующего их изучения. Диссоциация возможна при обработке 1%-ным додецилсульфатом натрия, 6 М гуанидингидрохлоридом и 8 М мочевиной. Часто уже достаточно изменения ионной силы, pH, концентрации белка, температуры, добавления или удаления кофактора или других химических модификаций.

Большое значение при доказательстве и определении молекулярной массы субъединиц имеют ультрацентрифугирование, ДСН-электрофорез в полиакриламиде, гель-фильтрация и другие уже рассмотренные ранее методы (разд. 3.5.4). В этой связи надо упомянуть, что в условиях диссоциации не только регуляторные, но и каталитические функции ферментов сильно повреждаются или совершенно теряются.

В табл. 3-8 приведены примеры белков, имеющих четвертичную структуру.

3.7. Биосинтез белков [176 — 179]

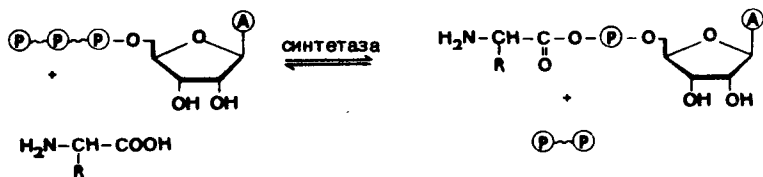
Несмотря на то что существует еще много неясных вопросов, в выяснении механизма биосинтеза белка в последние годы достигнуты значительные успехи. Различают в основном три основные стадии процесса:

- 1) активации аминокислот и их связывание с тРНК;
- 2) образование полипептидной цепи на рибосоме;
- 3) отделение готового белка от рибосомы.

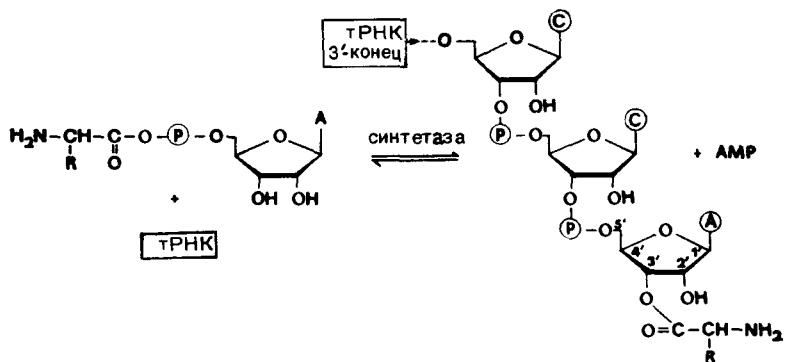
Для протекания каждой стадии процесса необходимы специфические ферменты и кофакторы.

3.7.1. Активация аминокислот и их связывание с тРНК

Активация карбоксильных групп аминокислот осуществляется в цитоплазме под действием специфических аминоацил-тРНК-синтетаз при участии аденозинтрифосфата и Mg^{2+} . Сначала при элиминировании пирофосфата образуется смешанный ангидрид аминокислоты и фосфатного остатка адениловой кислоты, который существует только в виде комплекса с ферментом.



На последующей стадии реакции активированная аминокислотная группа переносится на тРНК, причем действует та же синтетаза и при отщеплении аденозинмонофосфата образуется сложноэфирная связь с рибозой 3'-концевого аденозина тРНК:



Для каждой из 20 аминокислот имеется особая тРНК и особая аминоацил-тРНК-синтетаза. Структуры ряда синтетаз известны. Их молекулярные массы соответствуют интервалу 46 000 — 140 000 для одно- и двухцепочечных ферментов и 220 000 — 290 000 для четырехцепочечных $\alpha\beta_2$ -типа. Они построены из субъединиц симметрично, но в противоположность другим глобулярным белкам — ферментам — обладают менее компактной структурой. Места связывания аминокислоты и тРНК могут быть локализованы на различных субъединицах.

Димерный белок *тирозил-тРНК-синтетаза*, для которой сделан рентгеноструктурный анализ с разрешением 0,27 нм, характеризуется M 90 000 и размером молекулы 13 нм. Узнавание ферментом нужной аминокислоты и тРНК происходит с исключительной точностью. Комплекс фермент — аминокислота образуется путем электростатического взаимодействия с элементами белковой структуры, а также за счет полярных и гидрофобных связей с боковой цепью аминокислоты. Условием для образования комплекса является наличие правильной конфигурации аминокислоты.

Транспортная РНК, функционирующая в качестве переносчика аминокислоты, состоит из 73 — 93 нуклеотидных остатков и соответственно $M \approx 25$ 000. В состав тРНК помимо обычных нуклеиновых оснований (А, U, G, C) входит ряд редких оснований, часть из которых образуется путем метилирования обычных. Редкие элементы структуры могут препятствовать спариванию оснований в неспариваемых областях петель и защищать молекулу от гидролитического разрушения нуклеазами.

Известны нуклеотидные последовательности более чем 120 тРНК. Они имеют похожие вторичные структуры, условно названные структурами клеверного листа.

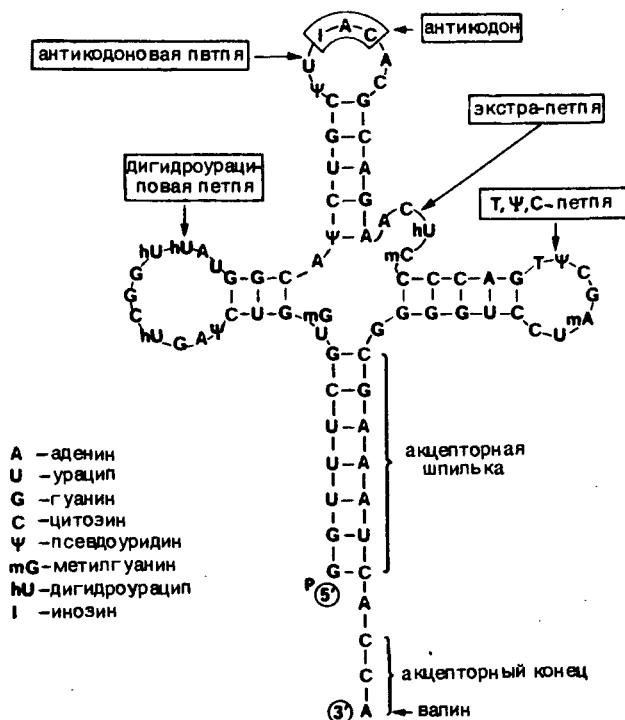


Рис. 3-17. Вторичная структура тРНК^{Val} из дрожжей (структура клеверного листа).

Все тРНК имеют аминоксил-акцепторную «шпильку» (7 пар оснований), заканчивающуюся общей для всех аминокислот последовательностью -С-С-А, дигидроуридиловую «шпильку» (3 — 4 пары оснований), антикодонавую «шпильку» (5 пар оснований) и ТΨС-«шпильку» с 4 — 5 парами оснований (рис. 3-17).

Петли, находящиеся на шпильках, символизируют структуру клеверного листа; шпильки и петли образуют в каждом отдельном случае своеобразную «руку». Антикодонавая и ТΨС-петля состоят из 7 оснований каждая, дигидроурациловая из 7 — 10 и экстра-петля из 4 — 21 основания; последняя образует переменную «руку».

Рентгеноструктурным анализом была определена третичная структура фенилаланиновой тРНК из дрожжей [182, 183]. Согласно этим данным, молекула имеет форму буквы L. Угол буквы образован дигидроурациловой, ТΨС- и переменной «руками». Все области шпилек имеют структуру двойных спиралей.

На рис. 3-18 рибозофосфатная цепь показана как сплошная полоса. Можно увидеть заштрихованные «руки» тРНК и водородные мостики между парами оснований. В фермент-субстратном комплексе внутренняя часть L и поверхность фермента находятся в тесном контакте (пунктирная линия).

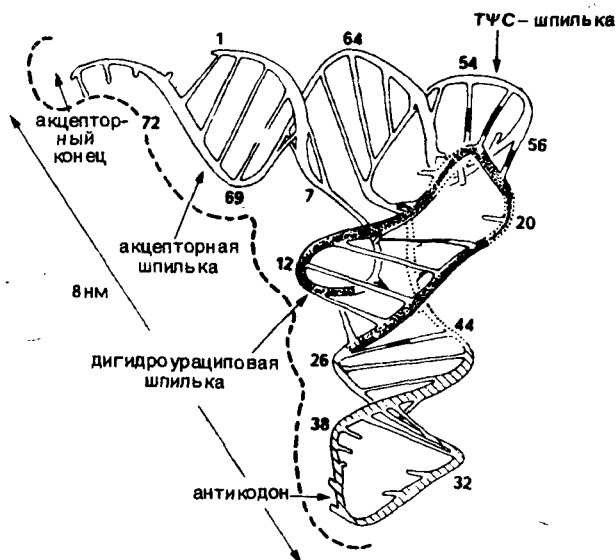


Рис. 3-18. Третичная структура тРНК^{Phe} из дрожжей.

Если тРНК этерифицируется какой-либо «неправильной» аминокислотой, тогда такая сложноэфирная связь снова расщепляется необычно быстро работающим корректирующим механизмом [186, 187]. Гидролиз сложноэфирной связи («неправильных» эфиров), катализируемый синтетазой, протекает еще до диссоциации комплекса фермент — тРНК. Об этапах активации аминокислот при биосинтезе белка сообщает Хаар [188].

3.7.2. Образование полипептидной цепи на рибосоме

Информация, необходимая для построения определенной аминокислотной последовательности, содержится в дезоксирибонуклеиновой кислоте (ДНК). Молекула ДНК является полинуклеотидом, образованным основаниями аденином (А), гуанином (G), цитозином (С), тиминном (Т), остатками фосфорной кислоты и 2-деоксирибозой в качестве углеводного компонента. Все ДНК построены как регулярные двойные спирали, структура которых стабилизирована водородными связями между комплементарными парами оснований А — Т и G — С. В ДНК каждые три следующих один за другим нуклеотида (триплетный код) кодируют одну аминокислоту [189 — 192]. Для 20 протеиногенных аминокислот существуют 64 кодовые единицы (кодона), из которых по 6 приходится на аминокислоты Leu,

Таблица 3-9. Генетический код

1-е основание	2-е основание				3-е основание
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	term	term	A
	Leu	Ser	term	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Arg, Ser, по 4 — на Pro, Thr, Val, Ala и Gly, 3 — на Ile, 2 — на Phe, Tyr, Cys, His, Gln, Asn, Glu, Asp, Lys и по одной приходится на Met и Trp.

Содержащиеся в генетическом коде триплеты UAG, UAA и UGA не кодируют какую-либо аминокислоту, а определяют конец цепи. Ранее они были названы «бессмысленными» (nonsense) кодоны.

Для начала биосинтеза белка информация, содержащаяся в ДНК, должна быть прежде всего перенесена к рибосоме. Это осуществляется через матричную (информационную) РНК (мРНК), представляющую собой одноцепочечную рибонуклеиновую кислоту, содержащую рибозу на месте дезоксирибозы и урацил на месте тимина. Построение мРНК осуществляется по принципу идентичной репликации на локально расплетенном участке ДНК (рис. 3-19) и называется транскрипцией.

Помимо модели Уотсона — Крика процесс репликации может быть объяснен моделью Родлея («side-by-side»-модель, SBS-модель). Процесс начинается с параллельной укладки цепей ДНК. Нити, связанные друг с другом водородными связями комплементарных оснований, принимают форму волнистой ленты. Каждая цепь образует сначала на длине полупериода повторяемости (10 оснований) правовращающую спираль, затем переламывается и далее идет обратно как левовращающая спираль. Характерные свойства (спаривание и укладка оснований, период повторяемости) остаются в модели SBS. Модель, ставящая под сомнение уникальность модели Уотсона — Крика, помимо прочего, лучше интерпретирует репликацию

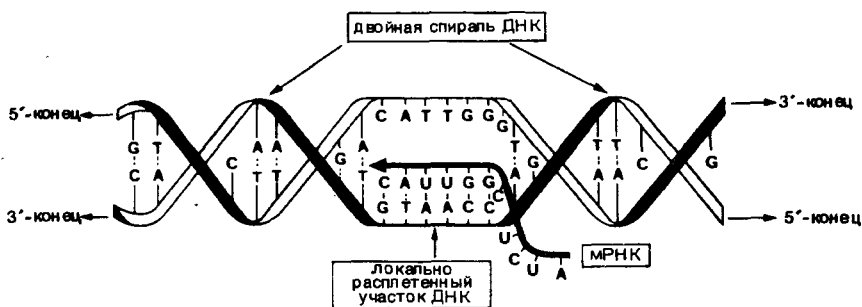


Рис. 3-19. Ферментативный синтез мРНК на матрице ДНК (асимметричная транскрипция ДНК).

длинных цепей ДНК, а также бактериальных кольцевых ДНК. Последние конформационные исследования на двухцепочечных ДНК допускают возможность переходов между двойной спиралью и расплетенной структурой.

Расплетенная переходная конформация названа *цис*-лестничной. В ней сахарофосфатные цепи находятся в *цис*-положении по отношению к парам оснований, которые в свою очередь располагаются как ступеньки лестницы. Нити ДНК могут без разрыва переходить из *цис*-лестничной конформации в другие, и наоборот.

При транскрипции генетическая информация одного или нескольких генов (участков ДНК) копируется и переносится на мРНК. Молекула мРНК затем идет в цитоплазму, связывается с рибосомой и образует матрицу для синтеза полипептидной цепи. С молекулой мРНК связано множество рибосом, образующих подобие ожерелья. Образуется структура, называемая полирибосомой и полисомой.

Рибосомы сами по себе являются рибонуклеопротеинами с содержанием нуклеиновых кислот ~60%. Они находятся в свободном состоянии прежде всего в цитоплазме и в связанном — в эндоплазматическом ретикулууме. Все рибосомы состоят из двух субъединиц, на которые они диссоциируют в зависимости от концентрации Mg^{2+} . У наиболее хорошо изученных рибосом *E. coli* большая (50 S) субъединица включает 5 S- и 23 S-рибосомные РНК, а также 34 различных белка; малая (30 S) субъединица состоит из 16 S-рибосомной РНК и 21 белка. Рибосомы эукариот образованы 60 S- и 40 S-субъединицами.

На рис. 3-20 схематически показаны в рибосоме *E. coli* главные места связывания аминоацил- и пептидил-тРНК, расположенные на большой субъединице. Молекула мРНК движется в «желобе» между субъединицами.

На следующей ступени биосинтеза белка нуклеотидная последовательность мРНК переводится на язык аминокислотной последовательности. Этот процесс, получивший название «трансляции» [193], начинается со связывания мРНК и иницирующей аминоацил-тРНК с 30 S-субъединицей рибосомы (инициация).

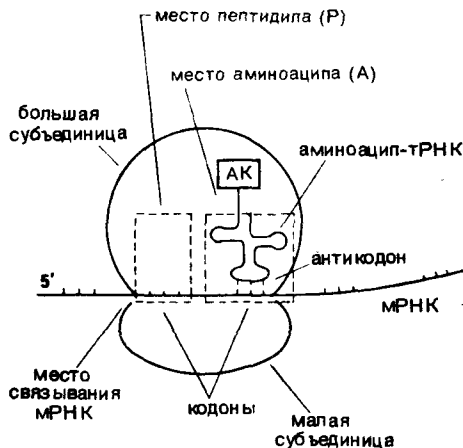


Рис. 3-20. Схема структуры рибосомы *E. coli* с местами связывания аминокислоты и пептида (по Ленинджеру).

В прокариотах, а также, вероятно, во всех остальных организмах в роли иницирующей аминокислоты выступает метионин, кодируемый кодоном AUG [194]. Соответствующая метионил-тРНК перед началом процесса ферментативным трансформированием переводится в формилметионил-тРНК.

В сложном начальном процессе принимают участие три белковых фактора инициации IF_1 , IF_2 и IF_3 . Сначала мРНК ассоциируется с комплексом IF_3 — 30 S-субъединица, затем при участии IF_2 и GTP идет присоединение формилметионил-тРНК. Образовавшийся иницирующий комплекс вместе с большой субъединицей формирует готовый к синтезу белка 70 S-рибосомный комплекс.

В процессе удлинения цепи (элонгация) новая аминокислот-тРНК присоединяется к активному 70 S-рибосомному комплексу. Своей антикодоновой петлей она входит во взаимодействие с соответствующим кодоном мРНК (образование водородных связей), причем правильное положение аминокислот-тРНК на аминокислотсвязывающем месте (А-место) обеспечивает фактор элонгации Tu ($EF - Tu$). Процесс обеспечивается предварительным специфическим связыванием молекулы аминокислот-тРНК с комплексом GTP с $EF - Tu$ и последующим гидролизом GTP до GDP и неорганического фосфата.

Замыкание первой пептидной связи идет через нуклеофильную атаку аминогруппой аминокислот-тРНК сложноэфирной группы соседней формилметионил-тРНК и катализируется пептидилтрансферазой, относящейся к большой субъединице. Для подготовки к присоединению следующей аминокислоты пептидил-тРНК, еще связанная на А-месте, должна пе-

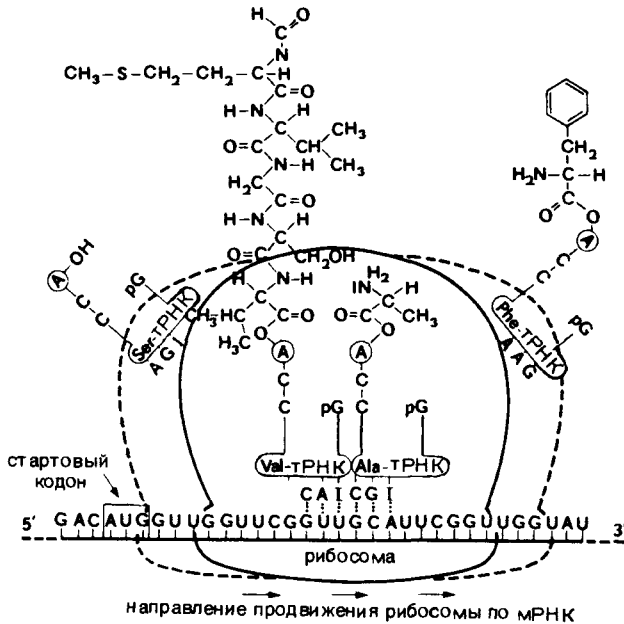


Рис. 3-21. Схема транслокации.

реместиться на Р-место (транслокация). В транслокации принимают участие особый белковый фактор транслокации G (EF-G) и молекула GTP. В результате транслокации осуществляется продвижение рибосомы к следующему кодону мРНК.

Освободившееся таким образом место кодонспецифически занимает следующая аминокислотил-тРНК. Начинается новый цикл наращивания полипептидной цепи. Схема процесса приведена на рис. 3-21.

3.7.3. Отделение полипептидной цепи от рибосомы

Трансляция, т. е. «переписывание» нуклеотидной последовательности аминокислот полипептидной цепи, продолжается до тех пор, пока А-место рибосомы не достигнет терминирующего кодона. Затем в несколько отдельных стадий протекает процесс отщепления связанной на рибосоме полипептидил-тРНК. Сначала осуществляется сдвиг пептидил-тРНК с места связывания А на место связывания Р (пептидил). Затем под влиянием так называемых терминаторных белков («release factors» RF₁, RF₂, RF₃) пептидилтрансфераза катализирует гидролитическое расщепление сложно-

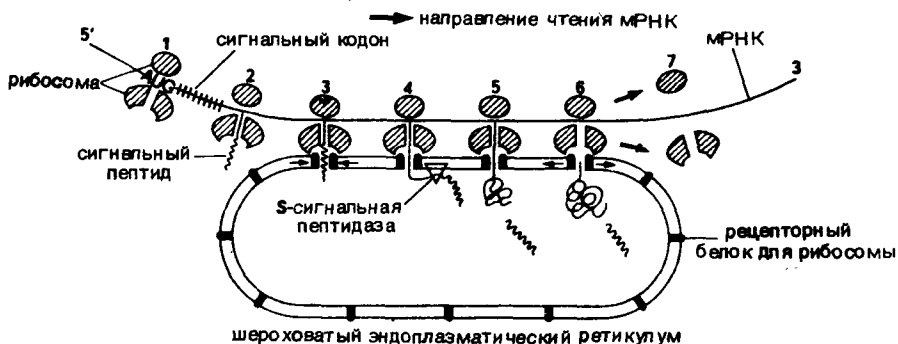


Рис. 3-22. Сигнальная гипотеза — схема протекания процесса биосинтеза секреторных белков.

эфирной связи между С-концевой карбоксильной группой пептида и гидроксильной группой остатка рибозы. Одновременно освобождаются последняя тРНК и мРНК, рибосома диссоциирует на субъединицы, и может начинаться новый цикл синтеза белка. Сегодня считается достоверным, что синтезированные полипептидные цепи покидают рибосому в биологически активной форме. Об этом, помимо прочего, говорят ферментативные активности, которые могут быть показаны на последней фазе синтеза белка на рибосоме. Формильная группа и не требующийся более метионин отщепляются ферментативно. Непосредственно после отщепления происходит замыкание дисульфидных мостиков и другие ковалентные модификации, например гидроксилирование, метилирование или фосфорилирование. Биосинтез покидающих клетку секреторных белков протекает на мембране эндоплазматического ретикулума. По «сигнальной» гипотезе [195, 196] информация об особом пути и месте синтеза содержится в так называемых «сигнальных» кодонах мРНК, следующих непосредственно за стартовым кодоном AUG и кодирующих последовательность сигнального пептида.

Сигнальный пептид, состоящий обычно из 15 — 20 гидрофобных аминокислот, вступает через рибосомный рецепторный белок во взаимодействие с эндоплазматическим ретикулумом и начинает локально-специфический синтез белка. Еще до завершения синтеза он отщепляется «сигнальной пептидазой» от остальной цепи. Полипептидная цепь секреторного белка выводится через систему каналов эндоплазматического ретикулума и вслед за этим сворачивается в нативную конформацию.

Сравнение сигнальных последовательностей белков, продуцируемых одной железой, показывает поразительное сходство. Так, сигнальные последовательности панкреатических ферментов трипсина и химотрипсина различаются лишь в положении 6:

Ala-Lys-Leu-Phe-Leu-Phe-Leu-Ala-Phe-Leu-Leu-Ala-Tyr-Val-Ala-Phe
(Leu)

В последние годы было проведено направленное выделение и установление структуры ряда препробелков: препроинсулина [197], препропаратиреоидного гормона [198], препролактина [199] и др. Таким образом, «сигнальная» гипотеза существенно способствовала пониманию тонких механизмов биосинтеза белка.

3.7.4. Регуляция биосинтеза белка [200]

Регуляция биосинтеза белка, протекающего с исключительно высокой (до 100 пептидных связей в секунду!) скоростью и точностью, осуществляется на уровнях транскрипции и трансляции. Механизм экспрессии гена был выяснен Жакобом и Моно [201] на примере лактозной системы *E. coli*. Являясь источником углерода для *E. coli*, лактоза действует как индуктор для синтеза трех ферментов — пермеазы, β -галактозидазы и трансацетилазы, делающих возможным использование необычных питательных веществ. Информация, необходимая для биосинтеза ферментов, содержится в трех структурных генах, которые вместе с ответственным за транскрипцию операторным геном образуют единый комплекс — оперон. Индуктор действует через ранее включенный регуляторный ген на операторный ген. В отсутствие лактозы репрессор (аллостерический белок) вступает во взаимодействие с регуляторным геном и таким образом блокированием всего оперона прекращает синтез ферментов.

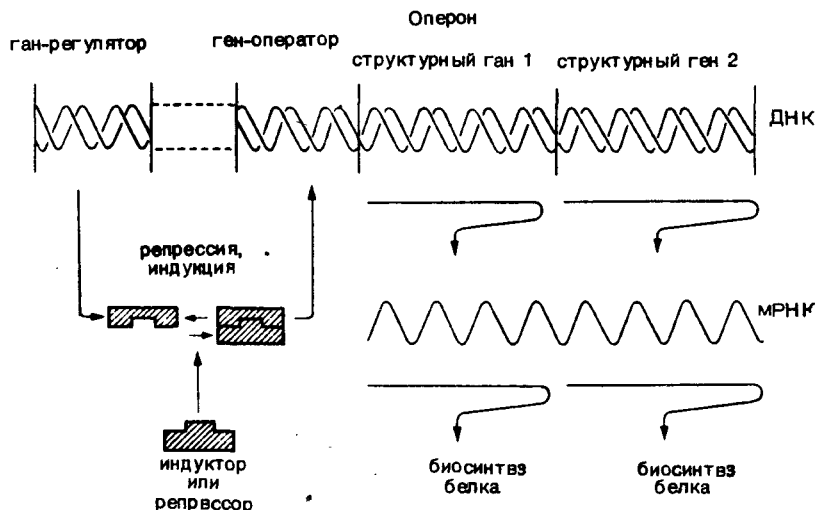


Рис. 3-23. Регуляция процесса биосинтеза белков [3].

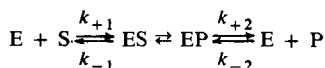
На специфическом подавлении отдельных стадий биосинтеза белка основано действие ряда антибиотиков (разд. 2.3.5). Так, актиномицин интеркоалицией и рифамицин селективным подавлением РНК-полимеразы нарушают процесс транскрипции. Хлорамфеникол нарушает трансляцию, блокируя реакцию переноса пептидила в рибосоме. Стрептомицин ассоциирует с 30 S-субъединицей рибосомы и ведет к ошибкам в переносе, а очень похожий на аминокислотный конец тРНК пурамицин вызывает преждевременный обрыв синтезируемой цепи.

3.8. *Избранные примеры функциональных белков*

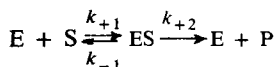
3.8.1. Ферменты [202 — 211]

Ферментами называются простые или сложные, состоящие из нескольких субъединиц белки, которые, будучи высокоспецифичными биокатализаторами, ускоряют наступление равновесия химической реакции вне или внутри клетки, снижая энергию активации соответствующей реакции. Многие ферменты для осуществления каталитического действия помимо белкового компонента нуждаются в кофакторе, например ионе металла (Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+}), и/или коферменте (простетическая группа). Коферменты действуют как переносчики электронов и функциональных групп: атомов водорода, ацетильных, метильных и аминогрупп. Они часто идентичны с витаминами — необходимой составной частью пищи высших организмов.

Ферментативный катализ характерен образованием фермент-субстратного комплекса (ES), который переходит в комплекс фермент — продукт (EP) и затем диссоциирует на фермент и продукт:



В оптимальных условиях, т. е. при определенных температуре и pH, образование комплекса фермент — продукт происходит спонтанно, и этим процессом, как и обратной реакцией, можно пренебречь:



Существование фермент-субстратного комплекса было надежно установлено экспериментально. При данном количестве фермента повышение концентрации субстрата ведет к увеличению скорости реакции, максимум которой достигается при насыщении фермента субстратом.

Количественную взаимосвязь между скоростью реакции и концентрацией субстрата описывает уравнение Михаэлиса — Ментен:

$$V_0 = \frac{V_{\max} S}{K_M + S}$$

где V_0 — начальная скорость, V_{\max} — максимальная скорость, S — концентрация субстрата, K_M — константа Михаэлиса.

Константа Михаэлиса соответствует концентрации субстрата, при которой скорость равна половине максимальной. K_M и V_{\max} можно найти графически, используя выражение, обратное уравнению Михаэлиса — Ментен и называемое уравнением Лайнуивера — Берка

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Для построения графика используют координаты $1/V_0$ и $1/S$.

У *аллостерических ферментов*, состоящих из нескольких субъединиц [213 — 215], кривая зависимости скорости реакции от концентрации субстрата имеет характерный сигмовидный вид. Такой фермент независимо от наличия субстрата имеет две различные конформации, находящиеся в равновесии. Активность этого фермента контролируется *аллостерическими эффекторами* (обычно несложными органическими веществами). Связывание эффектора происходит на одной из субъединиц в аллостерическом центре, пространственно отделенном от места связывания субстрата, и вызывает конформационные изменения других субъединиц. Фермент активируется, если эффектор является *активатором*, и ингибируется, если с аллостерическим центром связывается *ингибитор*. Аллостерические ферменты обычно участвуют в контроле первых ступеней мультиферментных цепей.

Различают конкурентные и неконкурентные ингибиторы ферментов. *Конкурентные ингибиторы* структурно подобны субстрату и занимают его место в субстратсвязывающем центре. Избытком субстрата они могут быть снова удалены. *Неконкурентные ингибиторы* реагируют с другими важными структурными частями фермента, например с группой SH, и не могут быть удалены избытком субстрата.

В качестве международной единицы ферментативной активности принят *катал*; 1 кат равен ферментативной активности, обуславливающей превращение 1 моль субстрата в 1 с.

По специфичности действия ферменты разделяют на 6 основных классов, которые в свою очередь подразделяются на подклассы и подгруппы.

В настоящее время известно около 2000 ферментов, из которых десятая часть получена в кристаллическом состоянии. Общие принципы их высокоспецифичного каталитического действия известны, но, однако, многие вопросы молекулярного механизма действия, тонкой регуляции и генетического контроля еще неясны.

В последние годы использование ферментов для технологических процессов превращения веществ, например в химической и фармацевтической промышленности, приобрело большое значение. При этом прежде всего

Таблица 3-10. Классификация ферментов по специфичности действия

Основные классы и важнейшие подклассы	Катализируемая реакция	Примеры
1. Оксидоредуктазы	Реакции окисления и восстановления	Лактат-, алкоголь-, малат-, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы Глюкозо- и моноаминооксидаза, оксидазы аминот-Фенилаланин-4-гидроксилаза, стероид-II-β-гидроксилаза
Дегидрогеназы (с NAD ⁺ или NADP ⁺)		
Оксидазы (с кислородом в качестве акцептора)		
Гидроксилазы (обеспечивают встраивание кислорода)		
2. Трансферазы	Перенос групп	Метил-, гидроксиметил-, карбомилтрансферазы Трансальдолаза, транскетолаза Ацетилтрансферазы, тиолаза Все трансаминазы Гексо-, глюко-, фосфофруктокиназы, РНК-полимеразы, РНКазы
C ₁ -Трансферазы		
Альдегидо- и кетотрансферазы		
Ацилтрансфераза		
Аминотрансферазы		
Фосфотрансферазы		
3. Гидролазы	Гидролитическое расщепление связей	Ацетилхолинэстераза, липазы
Эстеразы	Расщепление сложных эфирных связей	α-Гликозидазы (α-амилаза, глюкоамилаза), β-гликозидазы (целлюлазы, β-глюкуронидаза), нуклеозидазы
Гликозидазы	Расщепление гликозидов	
Экзопептидазы	Расщепление пептидной связи	Дипептидилпептидазы, аминок- н карбоксипептидазы
Эндопептидазы		Трипсин, химотрипсин
Амидазы	Расщепление амидных связей	Аспарагиназа, глутаминаза, уреазы, аргиназа
	Расщепление ангидридных связей кислот	АТРаза, пирофосфатаза
4. Лиазы	Элиминирование и присоединение по двойной связи	Декарбоксилазы аминокислот, пируватдекарбоксилаза, альдолазы
C-C-Лиазы		

Продолжение табл. 3.10

Основные классы и важнейшие подклассы	Катализируемая реакция	Примеры
С-О-Лиазы	Изомеризация	Аконитаза, карбоангидраза
С-N-Лиазы		Енолаза, фумараза, аспартаза
5. Изомеразы		Пролинрацемаза, рацемазы других аминокислот
Рацемазы		
Эпимеразы		
цис-транс-Изомераза	Соединение двух молекул субстрата с участием АТФ	Рибулозофосфат-3-эпимераза
6. Лиазы (синтетазы)		Изомераза малеилацетоксусной кислоты
С-О-Лиазы		Все тРНК-синтетазы аминокислот
С-N-Лиазы		
С-С-Лиазы		
С-S-Лиазы		
		Аспарагин-, глутамин-, глутатионсинтетазы
		Пируваткарбоксилаза
		Ацетил- и сукцинат-CoA-синтетазы

используются *иммобилизованные ферменты*, что имеет следующие преимущества: возможность повторного применения, непрерывное проведение процесса при низких температурах и легкую отделяемость продукта. Имобилизацию осуществляют за счет *адсорбции на носителе* (синтетические или природные полимеры, стекло, активированный уголь), *включением в носитель* (микрокапсулирование), *ковалентным связыванием с носителем* через подходящую функциональную группу и *ковалентной сшивкой* молекул фермента би- или полифункциональными реагентами (например, при обработке диальдегидами, диаминами, производными дикарбоновых кислот и др.). В процессе имобилизации биологическая активность фермента должна максимально сохраняться.

Далее будут более детально описаны структура и действие некоторых наиболее важных ферментов.

3.8.1.1. Рибонуклеаза [216]

Рибонуклеаза А из поджелудочной железы теленка состоит из одной полипептидной цепи, включающей 124 аминокислотных остатка и сшитой четырьмя дисульфидными мостиками. Фермент относится к фосфодиэстера-

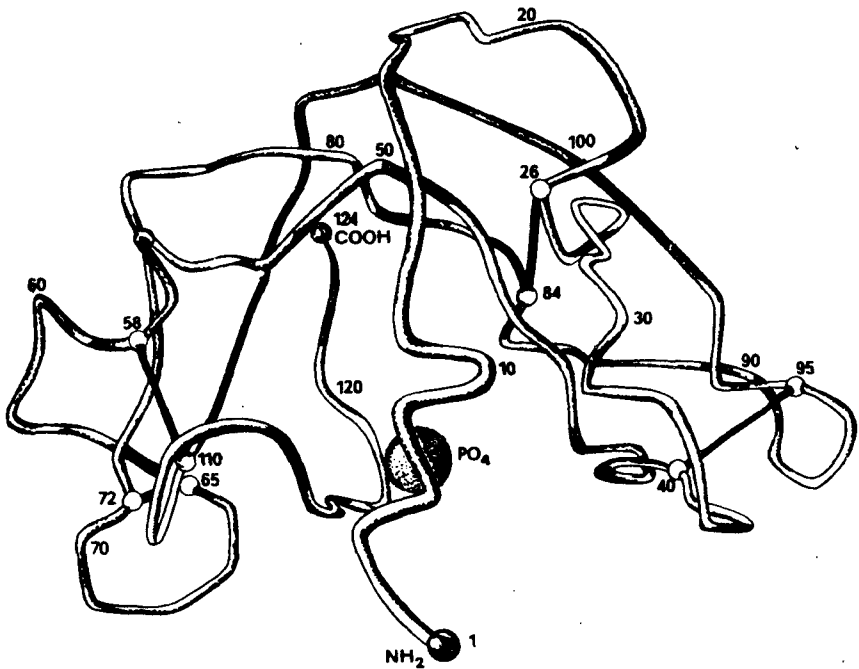


Рис. 3-25. Модель пространственной структуры рибонуклеазы А [218].

ченную структуру. Большое значение имело открытие, что при реокислении восстанавливается нативная конформация и вместе с этим полная биологическая активность фермента. Из 105 возможных вариантов замыкания дисульфидных связей при ренатурации реализуется только один, т. е. пространственная структура белка предопределена его аминокислотной последовательностью.

По данным Рихардса [219], рибонуклеаза А при обработке бактериальной протеазой субтилизинном расщепляется между остатками Ala-20 и Ser-21 на так называемый *S-пептид* (1 — 20) и *S-белок* с последовательностью 21 — 124, содержащий 4 дисульфидных мостика. Оба компонента после разделения показывают ничтожную биологическую активность. Однако, если смешать их один с другим, биологическая активность восстанавливается, т. е. *S-пептид* и *S-белок* с помощью невалентных связей «собираются» в так называемую *рибонуклеазу S*, обладающую пространственной структурой, близкой к нативной конформации.

Для рибонуклеазы *S* пространственная структура определена с разрешением 0,35 нм [220, 221]. Результаты совпадают с моделью Карты. Найдено, что около половины *S-пептида* находится в виде α -спирали. Вся молекула содержит ~15% спиральной и ~75% β -структуры.

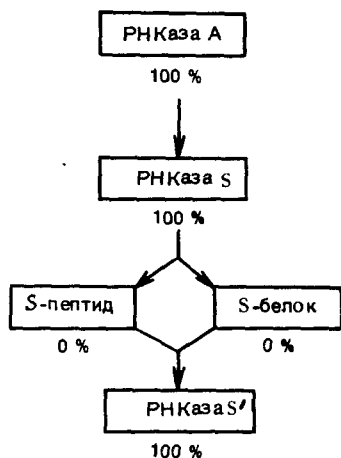


Рис. 3-26. Схема ферментативного расщепления рибонуклеазы А и рекомбинации продуктов расщепления.

По данным Скоффеи и сотр. [222], синтезировавших большое число аналогов S-пептида, он, будучи один, образует *статистический клубок*. Спиральная конформация возникает лишь после соединения с S-белком. Для связывания S-пептида и S-белка существует остаток феиладельина в положении 8. Для полного достижения биологической активности достаточно участка 1 — 14 S-пептида.

Рибонуклеаза была первым ферментом, который удалось получить полным химическим синтезом. Гутт и Меррифилд синтезировали цепь с С-конца на твердой фазе с использованием автоматического синтезатора (разд. 2.2.7.1). Концепция группы Мерка (разд. 2.2.5.3) состояла в построении фрагментной конденсацией S-белка и соединении его с синтетическим S-пептидом. Невысокая (20 — 30%) величина полученной биологической активности объясняется неоднородностью конечного продукта синтеза.

В поджелудочной железе помимо рибонуклеазы А присутствуют рибонуклеазы В, С и D. Эти ферменты относятся к гликопротеинам и имеют различное содержание углеводов. Например, рибонуклеаза В соединена через остаток аспарагина в положении 34 с пятью остатками маннозы и двумя остатками глюкозы. Для ряда рибонуклеаз, найденных в грибах и бактериях, определена структура, описан синтез *рибонуклеазы* T_1 , состоящей из 104 аминокислотных остатков.

3.8.1.2. Лизоцим

Лизоцим — бактериолитическая гидролаза, широко распространенная в бактериях, растениях, позвоночных и беспозвоночных. Фермент катализи-

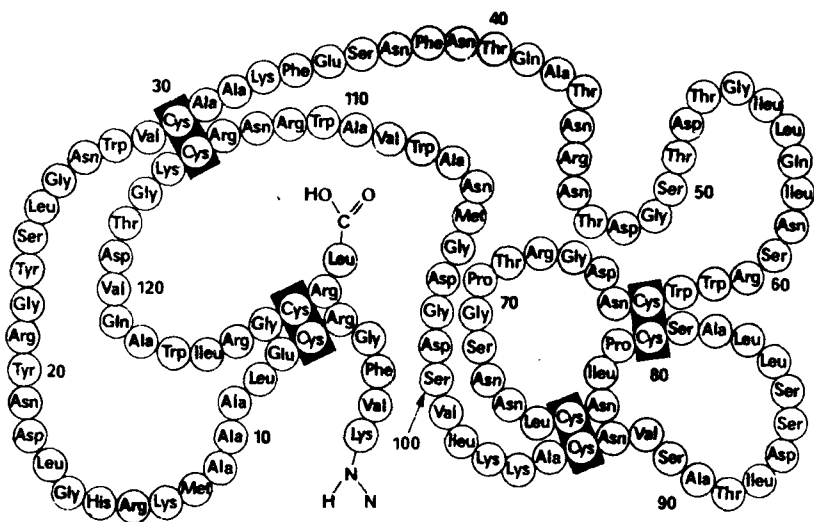


Рис. 3-27. Первичная структура лизоцима из куриного яйца [223].

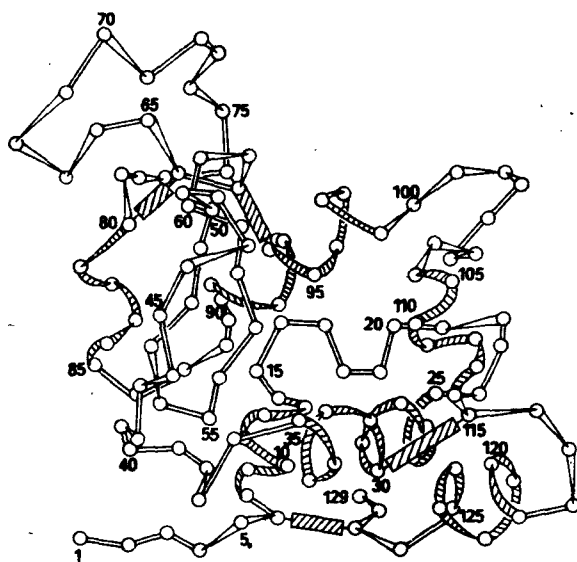


Рис. 3-28. Модель пространственной структуры лизоцима из куриного яйца [224].

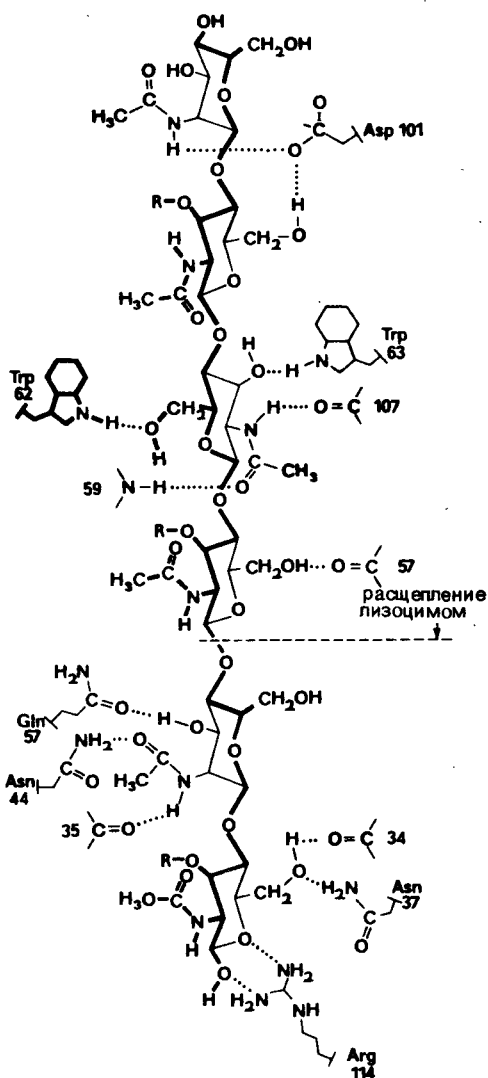


Рис. 3-29. Аминокислоты, принимающие участие в образовании активного центра лизоцима [4].

рует гидрологическое расщепление пептидогликанов бактериальных мембран по β -1,4-связи между N-ацетилглюкозамин и N-ацетилмураминовой кислотой, выполняя тем самым важную защитную функцию против проникновения бактерий в организм.

Животные лизоцимы состоят из одной полипептидной цепи, включающей 129 аминокислотных остатков, гомологичны между собой и, как и в случае рибонуклеазы, при участии 4 дисульфидных мостиков сворачиваются в характерные третичные структуры.

Для установления пространственной структуры выполнен рентгеноструктурный анализ лизоцима из куриного яйца [224].

Поскольку кристалл лизоцима характеризуется тетрагональной сингонией (пространственная группа $P 4_3 2_1 2$) и большая часть углов равна 0 или 180° , потребовалось измерить «всего» 9000 рефлексов. 42% полипептидной цепи представляют собой α -спираль, некоторые участки цепи в неспиральной области образуют β -структуры. Так, например, участок 41 — 54 дает антипараллельную структуру складчатого листа. Субстратсвязывающий центр фермента лежит в длинном желобе на внешней стороне и охватывает минимум 12 совместно действующих аминокислотных остатков (рис. 3-29).

Рентгеноструктурными исследованиями комплексов лизоцима с ингибиторами, например комплекса, состоящего из лизоцима и конкурентного ингибитора N-аце-

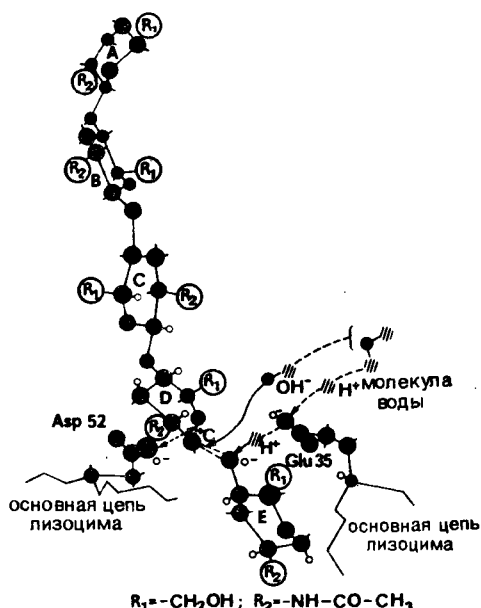


Рис. 3-30. Механизм катализа лизоцимом по Филлипсу.

тилглюкозаминтрисахарида, были получены более детальные представления об активном центре фермента [225]. Распределение электронных плотностей получено из данных так называемого *дифференциального синтеза Фурье*; для трех различных ингибиторных комплексов были получены совпадающие максимумы электронной плотности.

Связывание субстрата изучалось на примере гексасахарида, построенного из N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмураминовой кислоты (рис. 3-29). Модельный субстрат укладывается в глубокий разрез молекулы лизоцима и фиксируется водородными связями. Расщепляемая гликозидная связь субстрата встраивается между карбоксильными функциями глутаминовой кислоты (положение 35) и аспарагиновой кислоты (положение 52); это позволяет закончиться синхронному процессу расщепления связи (рис. 3-30).

3.8.1.3. *Химотрипсин*

Химотрипсин — наиболее хорошо изученный протеолитический фермент. Он катализирует гидролитическое расщепление пептидной (или сложноэфирной) связи, в образовании которой принимают участие феиаланин, тирозин или триптофан. Образование химотрипсина происходит в поджелудочной железе; первоначально образуется неактивный химотрипсиноген (зимоген) — резервная форма фермента. Основным компонент, химотрипсиноген А, представляет собой полипептидную цепь из 245 аминокислотных остатков и 5 дисульфидных мостиков. Активация и образование активного α -химотрипсина осуществляются сложным путем. После триптического расщепления связи Arg¹⁵-Ile¹⁶ последовательно один за другим из молекулы отщепляются дипептиды Ser¹⁴-Arg¹⁵ и Thr¹⁴⁷-Asn¹⁴⁸. В результате однопечечный предшественник переходит в трехпечечную молекулу фермента. Цепи А, В и С химотрипсина соединены исключительно дисульфидными связями. Рис. 3-32 показывает пространственную модель химотрипсина, установленную на основе рентгеноструктурных данных.

Ферментативное действие химотрипсина, как и других панкреатических протеаз (трипсина, эластазы), соответствует механизму общего кислотного катализа, в котором принимают участие в качестве «системы переноса заряда» остатки аминокислот His⁵⁷, Asp¹⁰² и Ser¹⁹⁵. Передача электронной плотности от заряженной при pH 8 отрицательно карбоксильной группы аспарагиновой кислоты через имидазольное кольцо гистидина к кислороду боковой цепи серина обуславливает повышение его нуклеофильности настолько, что может осуществляться нуклеофильное воздействие на карбонильный углеродный атом пептидной связи. На промежуточно образующемся О-ацильном производном серина перенос заряда обрывается, и на последующей стадии деацилирования снова немедленно восстанавливается. Гидролитическое расщепление пептидной связи может быть рассмотрено как перенос ацила, при котором осуществляется перемещение ацильного остатка с аминогруппы на молекулу воды (рис. 3-31).

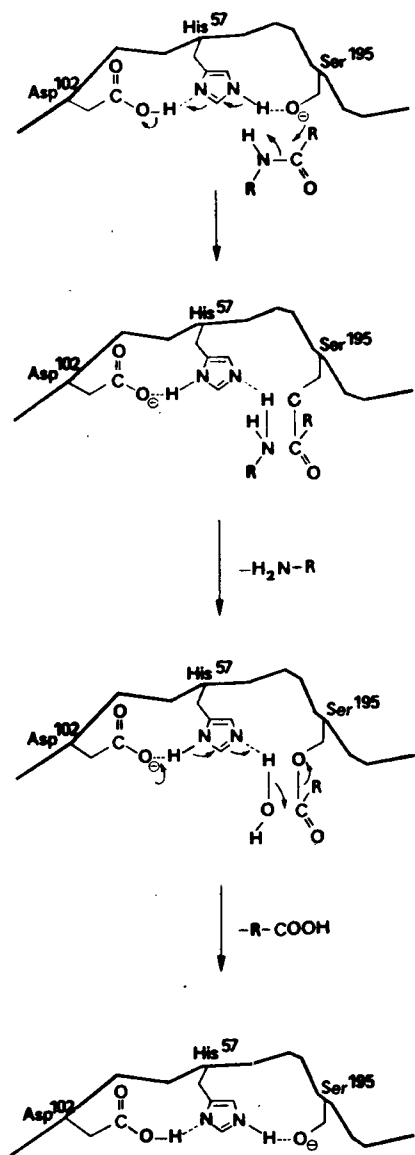


Рис. 3-31. Протеолиз, катализируемый химотрипсином.

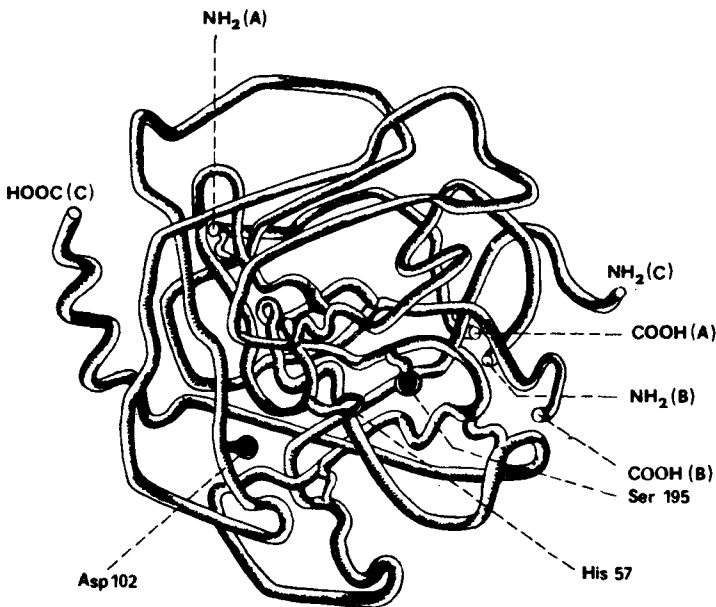


Рис. 3-32. Трехмерная структура химотрипсина [226, 227].

3.8.1.4. Карбоксипептидаза А

Карбоксипептидаза А — это металлофермент, который, будучи экзопептидазой, гидролитически отщепляет С-концевые, прежде всего ароматические, остатки аминокислот. Для работы фермента необходим ион Zn^{2+} , который с некоторыми ограничениями может быть замещен на ионы других переходных металлов.

Карбоксипептидаза А образуется под действием трипсина из неактивного предшественника — прокарбоксипептидазы (M 87 000). Полипептидная цепь фермента состоит из 307 аминокислот (M 34 409) и содержит один дисульфидный мостик.

По данным рентгенографического анализа [228, 229] молекула фермента имеет эллиптическую форму размером $5,2 \times 4,4 \times 4,0$ нм. Внутри молекулы находится β -структура, состоящая из 8 параллельных и 8 антипараллельных участков и обрамленная с обеих сторон 8 спиралями.

Ион цинка лежит в одной из складок на поверхности и принимает активное участие в каталитическом процессе. Он образует координационные связи с остатками гистидина (положения 69 и 196), глутаминовой кислоты (положение 72), а также с карбонильным кислородом расщепляемой пеп-

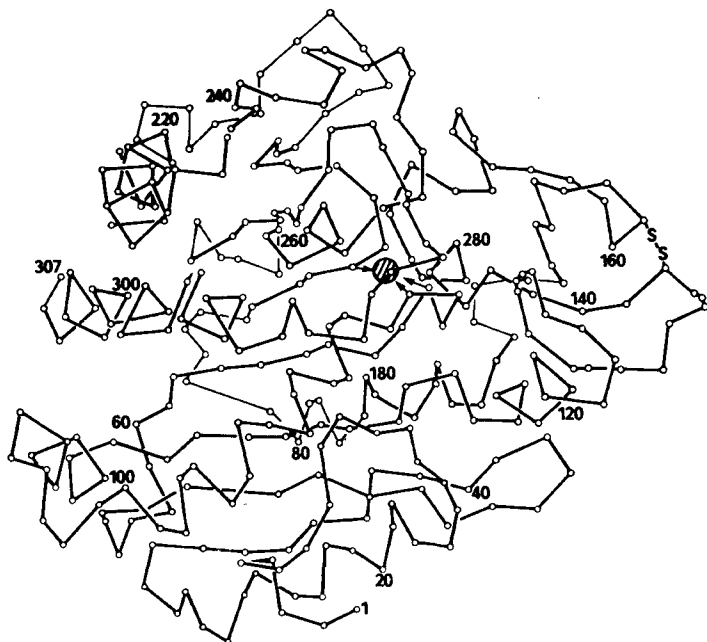


Рис. 3-33. Укладка полипептидной цепи в карбоксипептидазе А.

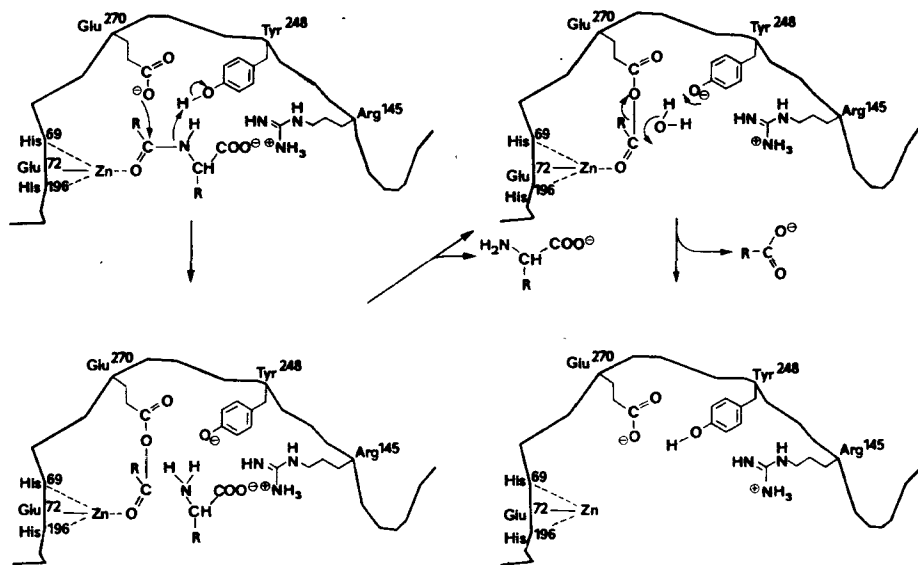


Рис. 3-34. Каталитическое отщепление С-концевой аминокислоты карбоксипептидазой А.

тидной связи. Дисульфидный мостик, идентифицированный рентгеноструктурным анализом с разрешением 0,2 нм, связывает цистеины в положениях 138 и 168 [223]. Из рентгеновских данных далее очевидно, что остаток аргинина-145 связывает С-концевой карбоксилатный анион субстрата. Одновременно благодаря тому, что позиция аргинина изменяется, остаток тирозина-248 может принять роль донора протона для группы NH расщепляемой цепи. Остаток глутаминовой кислоты-270 благоприятствует нуклеофильной атаке молекулы воды на карбоксильную группу пептидной связи, сильно поляризованную координацией с ионом цинка. Механизм действия карбоксипептидазы поясняет рис. 3-34.

3.8.2. Транспортные и резервные белки

3.8.2.1. Миоглобин

Миоглобин — первый глобулярный белок, пространственная структура которого установлена рентгенографически [231]. Поскольку к моменту начала исследований первичная структура миоглобина была еще не известна, установление первичной и третичной структур должно было проходить параллельно. По Эдмундсону [232], миоглобин состоит из одной полипептидной цепи, включающей 153 аминокислотных остатка, и одной железопорфириновой группы (гем) на молекулу. Миоглобин относится к гемопротейнам, могущим обратимо связывать кислород; в клетках скелетной мышцы он

Val	Leu	Ser	Glu	Gly	Glu	Trp	Gln	Leu	Val	Leu	His	Val	Trp	Ala	Lys
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Val	Glu	Ala	Asp	Val	Ala	Gly	His	Gly	Gln	Asp	Ile	Leu	Ile	Arg	Leu
17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
Phe	Lys	Ser	His	Pro	Glu	Thr	Leu	Glu	Lys	Phe	Asp	Arg	Phe	Lys	His
33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
Leu	Lys	Thr	Glu	Ala	Glu	Met	Lys	Ala	Ser	Glu	Asp	Leu	Lys	Lys	His
49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64
Gly	Val	Thr	Val	Leu	Thr	Ala	Leu	Gly	Ala	Ile	Leu	Lys	Lys	Lys	Gly
65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
His	His	Glu	Ala	Glu	Leu	Lys	Pro	Leu	Ala	Gln	Ser	His	Ala	Thr	Lys
81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
His	Lys	Ile	Pro	Ile	Lys	Tyr	Leu	Glu	Phe	Ile	Ser	Glu	Ala	Ile	Ile
97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112
His	Val	Leu	His	Ser	Arg	His	Pro	Gly	Asn	Phe	Gly	Ala	Asp	Ala	Gln
113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128
Gly	Ala	Met	Asn	Lys	Ala	Leu	Glu	Leu	Phe	Arg	Lys	Asp	Ile	Ala	Ala
129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144
Lys	Tyr	Lys	Glu	Leu	Gly	Tyr	Gln	Gly							
145	146	147	148	149	150	151	152	153							

Рис. 3-35. Первичная структура миоглобина кашалота [232].

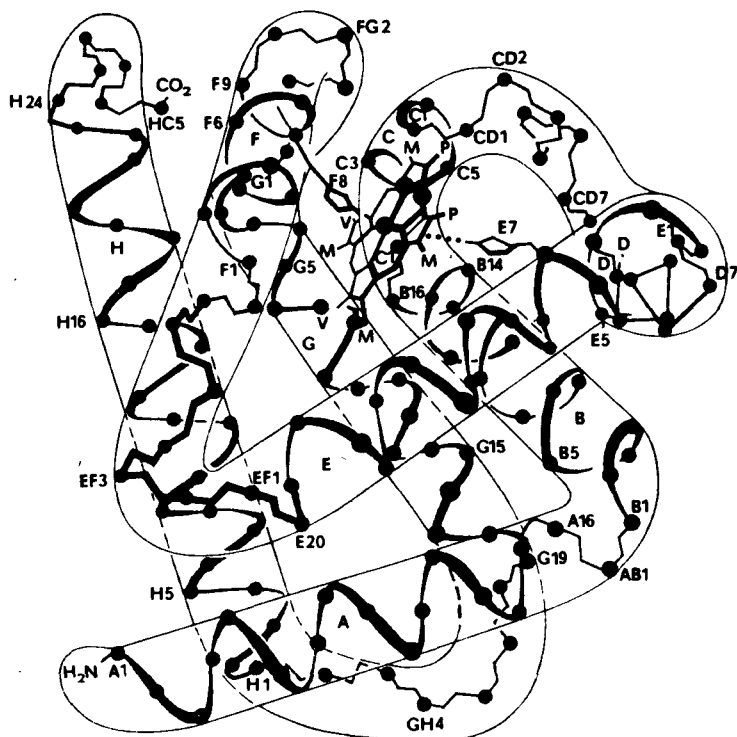


Рис. 3-36. Схема структуры миоглобина кашалота с выделением спиральных областей [233].

ответствии за резервирование кислорода, а также за увеличение скорости его диффузии через клетки. Филогенетически миоглобин — предшественник гемоглобина.

Рентгеноструктурный анализ, проведенный с разрешением 0,6, 0,4 и 0,2 нм, дал форму сплюсненной сферы размером $2,5 \times 4,4 \times 4,4$ нм с «карманом» для гема. Молекула не содержит дисульфидных связей и характеризуется α -спиральностью на 77%. Выделяют 8 спиральных областей (А — Н), в построении которых принимает участие в сумме 121 аминокислотный остаток.

При разрешении 0,2 нм впервые удалось наблюдать «визуально» правовращающий α -винт. Рис. 3-37 показывает распределение электронной плотности в цилиндрической проекции среза одной из цепей миоглобина. На верхней части рисунка на карту электронной плотности нанесена α -спираль (α), а ниже дано пояснение расположения атомов в α -спирали, причем точки β и β' соответствуют двум возможным местам расположения α -углеродных атомов (β).

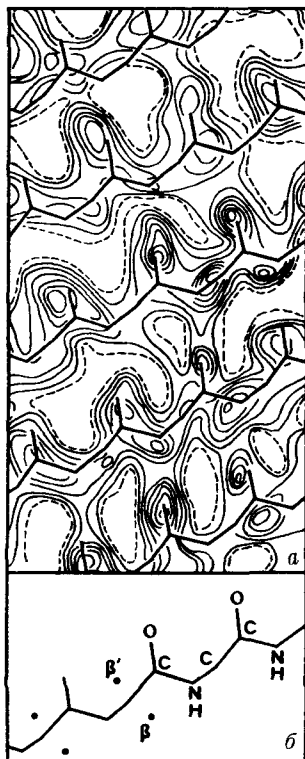


Рис. 3-37. Распределение электронных плотностей на одном из участков полипептидной цепи миоглобина (по Кендрю и др.).

Гем, ответственный за связывание кислорода, находится в «гидрофобном кармане», образованном особыми, для этого предназначенными аминокислотами. Гем представляет собой макроцикл протопорфирина с координационно связанным ионом двухвалентного железа, находящимся в центре молекулы. Ион железа координационно связан с четырьмя расположенными по сфере атомами азота протопорфирина и двумя остатками гистидина (F8 и E7), относящимися к глобиновому компоненту. Такая пространственная фиксация гема делает возможным связывание молекулы кислорода в качестве шестого лиганда со стороны гема, повернутой к гистидину F8. Имидазольное кольцо гистидина E7 непрямо, через молекулу кислорода, координирует с центральным ионом железа (II) (рис. 3-38).

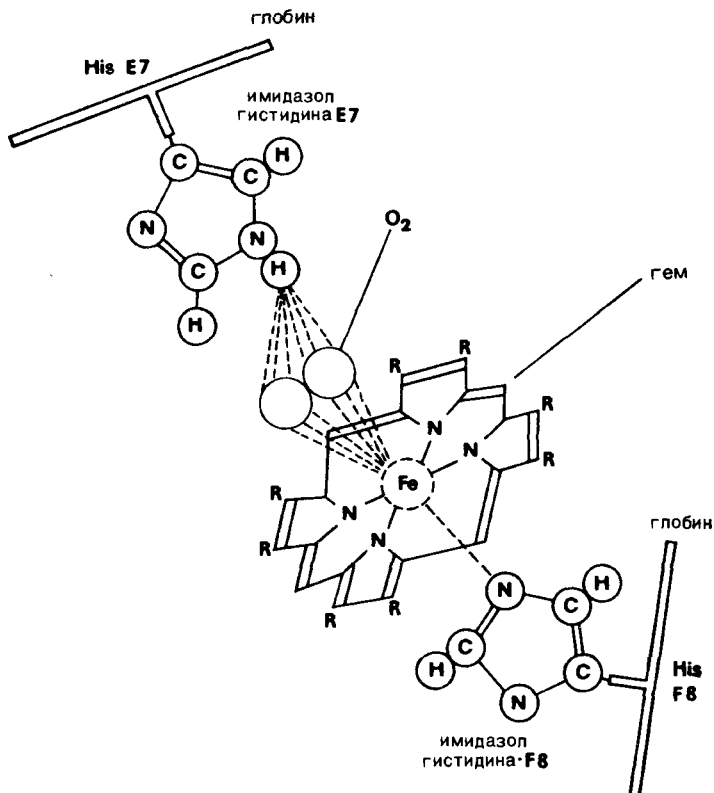


Рис. 3-38. Схема связывания кислорода миоглобином.

3.8.2.2. Гемоглобин [234, 235]

Гемоглобин — «дыхательный» белок крови. Он осуществляет транспорт кислорода по кровеносной системе легких к другим органам и центрам потребления. Например, в мускульных тканях транспортируемый кислород передается миоглобину, который осуществляет его накопление.

Гемоглобин по своему строению гомологичен миоглобину и практически представляет собой тетрамер миоглобина — оба белка действуют взаимосвязанно в биологических системах. Такая кооперация в действии, помимо прочего, требует от гемоглобина высокого сродства к кислороду при его высоком парциальном давлении и низкого сродства при недостатке кислорода. Рис. 3-39 графически демонстрирует связывание кислорода гемоглобином и миоглобином. Форма кривой сигмоидная для гемоглобина и гиперболическая с крутым подъемом для миоглобина.

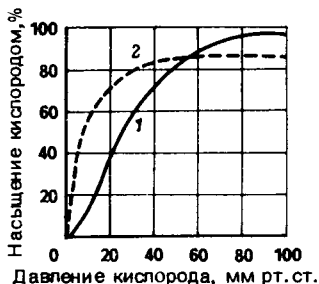


Рис. 3-39. Кривая связывания кислорода гемоглобином и миоглобином при 37 °C и pH 7,4. 1 — гемоглобин человека, 2 — миоглобин человека.

Вследствие этого миоглобин насыщается кислородом уже при низком парциальном давлении, таким образом при сокращении мышц может быть компенсирован недостаточный приток кислорода из кровеносной системы.

Молекула гемоглобина состоит из четырех попарно идентичных полипептидных цепей, каждая из которых несет гем. Сворачивание полипептидной цепи и фиксирование гема осуществляются по тем же принципам, что и в миоглобине. М 64 500, содержание железа 0,334%. В крови взрослого человека содержится ~ 1 кг гемоглобина.

Полипептидные цепи гемоглобина называют α и β , а двойное симметричное строение молекулы записывают как $\alpha_2\beta_2$. Цепи α и β химически сходны или, обобщая, гомологичны. В крови взрослых помимо основного гемоглобина HbA (96,5 — 98,5%) присутствует в незначительных концентрациях гемоглобин HbA₁ ($\alpha_2\delta_2$). Кроме того, в процессе индивидуального развития (онтогенеза) человека образуются два других гемоглобина. Так, в первые недели после оплодотворения доказано образование так называемого *эмбрионального гемоглобина*, или *прегемоглобина* (HbP, $\alpha_2\varepsilon_2$), а в крови плода обнаружен так называемый *гемоглобин плода* (HbF, $\alpha_2\gamma_2$). Последний вследствие своего повышенного сродства к кислороду облегчает передачу кислорода из материнской крови к плоду. Нужно отметить, что в зависимости от условий развития в молекуле гемоглобина помимо постоянных α -цепей присутствуют две другие идентичные цепи.

В первичной структуре α -, β - и γ -цепей находят многочисленные гомологичные области. β -, γ -, а также δ -цепь построены каждая из 146 аминокислотных остатков; α -цепь на 5 остатков короче. Для анализа степени гомологичности различных полипептидных цепей необходимо рассматривать более короткие последовательности. Различие между α - и β -цепями гемоглобина незначительно, в то время как между этими цепями и цепью миоглобина оно намного существеннее (рис. 3-40).

Гемоглобины людей разной расовой принадлежности, а также гемоглобин шимпанзе одинаковы. Точечные мутации приводят иногда к аномали-

[illegible]

ям, чаще всего паталогическим. Наиболее известен гемоглобин серповидных эритроцитов, возникающий при замене глутаминовой кислоты в положении 6 на валин и вызывающий деформацию клеток и их агрегацию.

Структура оксигемоглобина лошади при грубом разрешении установлена Перутцем с сотр. [237, 238]. Хотя при разрешении 0,55 нм (6 изоморфных производных, 1200 рефлексов) оказалась невозможной непосредственная локализация отдельных аминокислотных остатков, было однозначно показано тетрамерное строение молекулы и положение четырех гемов. На основании этих данных α - и β -цепи обладают почти идентичной третичной структурой, очень близкой структуре миоглобина.

В более уточненной модели (0,2 нм) Перутц описал положение всех $\sim 10\,000$ атомов с погрешностью $\pm 0,1$ нм. Из всех имеющихся структурных данных для оксигенированного и неоксигенированного гемоглобинов можно сделать вывод, что третичная структура гемоглобина не имеет видоспецифичности.

Образование четвертичной структуры осуществляется прежде всего путем гидрофобных взаимодействий между отдельными полипептидными цепями. Возникают расширенные области контактов между α - и β -цепями, которые вместе с этим являются предпосылкой для обратимого кооперативного связывания гемоглобином четырех молекул кислорода. При присоединении кислорода к гемю образуется оксигемоглобин, четвертичная структура которого лишь незначительно отличается от неоксигенированной формы. α -Гемы взаимно сближаются на 0,1 нм, а β -гемы удаляются один от другого на 0,65 нм.

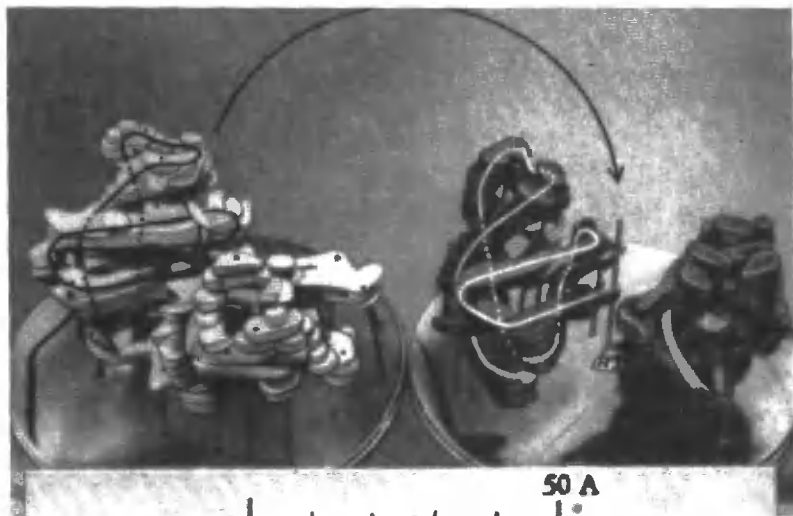


Рис. 3-41. Модели четырех протомерных полипептидных цепей гемоглобина [237, 238].

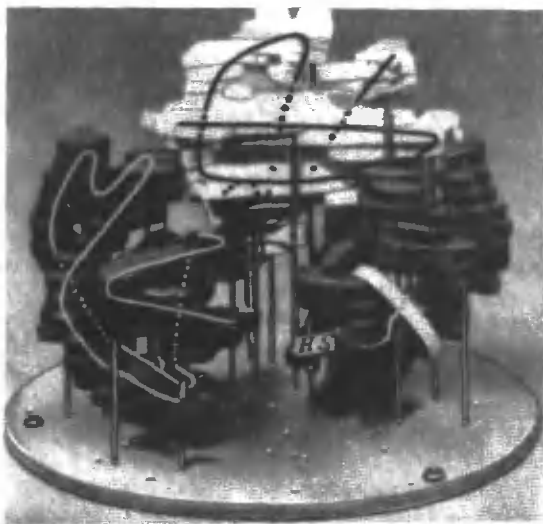


Рис. 3-42. Модель структуры оксигемоглобина лошади (разрешение 0,55 нм) [237, 238].

Структурные изменения одной субъединицы влияют на пространственное строение всей молекулы и тем самым на другие пространственно удаленные гемы. Контактные области дают возможность обоим димерам ($\alpha_1\beta_1$ и $\alpha_2\beta_2$) в процессе связывания кислорода скользить один по другому. Этот аллостерический эффект объясняет сигмоидную форму кривой оксигенации [239, 240].

Большое сходство в третичной структуре с гемоглобином и многоглобином показывает выделенный из личинки одного из видов комара *Chrysonotus* эритрокруорин, пространственная структура которого установлена Хубером и др. [241]. Высокая способность этого гемопротеина связывать кислород позволяет личинкам комара находиться в водной среде, бедной кислородом.

3.8.2.3. Металлопротеины

Ряд белков характерен своей способностью специфично связывать ионы металла. Ионы металла находят прежде всего в качестве функционирующей составной части ферментов, например ион меди в группе оксидоредуктаз (фенолоксидазы, цитохромоксидазы и др.) и ион марганца в аргиназе и

фосфотрансферазах. Особый интерес вызывают содержащие ионы железа и молибдена белковые компоненты *нитрогеназы* — мультиферментного комплекса, имеющегося в микроорганизмах, способных связывать атмосферный азот. В качестве примера цинксодержащего фермента можно назвать карбоангидразу.

Типичными накапливающими железо белками млекопитающих являются *ферритин* и *гемозидерин*, несущие четверть всего железа, содержащегося в организме. Лишенный железа апоферритин имеет форму чашки и состоит из 24 субъединиц ($M\ 445\ 000$). Железо в ферритине представлено в форме железогидроксидоксидных мицелл, причем на молекулу может приходиться до 4300 атомов Fe(III) . С помощью ферритина избыточное железо накапливается внутри клеток в различных органах (печень, костный мозг, селезенка) и при появлении потребности мобилизуется действием NADH-зависимой ферридуктазы.

Функционально очень близок к ферритину гемозидерин, образующийся, в частности, при определенных заболеваниях и откладывающийся прежде всего в печени и селезенке. Содержание железа в гемозидерине, например, из селезенки лошади может составлять до 34%.

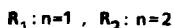
Важными металлотранспортными белками являются *зидерофилины* и *церулоплазмин*. В первом случае речь идет о безгемовых связывающих железо гликопротеинах (трансферрин плазмы, лактоферрин, кональбумин), выполняющих преимущественно транспортные функции и действующих бактериостатически. Трансферрин относится к β -глобулинам плазмы крови и ответствен за транспорт принятых с пищей ионов железа к органам, осуществляющим его хранение. Окрашенный в голубой цвет церулоплазмин осуществляет как транспорт, так и накопление ионов. Это состоящий из четырех цепей $\alpha_2\beta_2$ -гликопротеин, содержащий 8 ионов меди на молекулу. Белок, существующий в плазме млекопитающих, имеет $M \approx 140\ 000$ и содержание углеводов 16%.

3.8.3. Структурные белки

Структурные белки объединяют те фибриллярные белки, которые в животных организмах выполняют типичные опорную и каркасную функции. Они имеют характерный аминокислотный состав, нерастворимы в воде и не атакуются протеолитическими ферментами. Вследствие плохой усвояемости и низкого содержания важных аминокислот они не подходят в качестве пищевых белков.

У структурных белков находят следующие типы конформаций полипептидных цепей: *α -спираль*, *β -структуру складчатого листа* и *суперспираль*. Важнейшие представители этих белков — кератины, белки шелка и коллагены. В ряде других структурных белков особые физические свойства достигаются благодаря трехмерным сшивкам полипептидных цепей ковалентными мостиками. *Резилин*, белковый компонент хитиновых пластинок, содержащийся, в частности, в местах приращения крыльев насекомых,

придает, например, наружному скелету специфическую гибкость. Поперечная сшивка цепей осуществляется через три остатка тирозина. *Эластин*, структурный белок «эластичных» компонентов сухожилий, сосудов и др., характеризуется высоким содержанием гидрофобных аминокислот (суммарное содержание валина, лейцина и изолейцина равно 27%). В данном случае прочность и эластичность вызваны сшивками через пиридинаминокислоту *дезмозин*.



Сшивка осуществляется после биосинтеза белка при участии боковой цепи лизина. В кислом гидролизате эластина найдена другая «сшивающая» аминокислота — *изодезмозин*, имеющий остаток R_2 в положении 2 (а не в 4) пиридинового кольца.

3.8.3.1. Кератины

Кератин шерсти и волос имеет в качестве основного структурного элемента α -спиральные полипептидные цепи, стабилизированные водородными связями и межспиральными дисульфидными мостиками. Аминокислотный состав этого α -кератина обнаруживает высокое (11%) содержание цистеина и гидрофобных аминокислот.

Каждые три правовращающих α -спирали навиты одна на другую в стержнеобразную структуру, получившую название *протофибрилла* и имеющую диаметр 2 нм. Из-за скручивания период идентичности сокращается от 0,54 нм для нормальной α -спирали до 0,51 нм. С помощью электронной микроскопии удалось показать, что каждые 9 протофибрилл накладываются кольцевыми витками на 2 других, образуя при этом структуру, похожую на кабель, называемую *микрофибриллой* и имеющую диаметр 8 нм. Многие сотни микрофибрилл, уложенных для увеличения механической прочности в богатую цистеином белковую матрицу, снова образуют так называемые *макрофибриллы* с диаметром 200 нм. Макрофибриллы лежат параллельно оси волокна в отмерших клетках *шерсти*. Конечный диаметр всей структуры достигает 20 000 нм.

Исключительными свойствами волокна шерсти являются растяжимость и эластичность. При сильном растяжении α -спирали растягиваются с разрывом водородных связей до длины, равной удвоенной первоначальной. Эластичность основана на сшивке спиралей дисульфидными мостиками.

В противоположность волокнам шерсти волокна природного шелка растягиваются незначительно. Полипептидные цепи *фиороина* шелка содержат в основном глицин, аланин и серин (~87%). Другие аминокислоты

присутствуют в незначительных концентрациях, а цистеин и метионин отсутствуют полностью. Фиброин шелка — представитель β -кератинов.

В антипараллельных, прилегающих одна к другой полипептидных цепях преобладает повторяющаяся последовательность $\text{-Gly-Ser-Gly-Ala-Gly-Ala-}$. Цепи образуют антипараллельную β -структуру, стабилизированную оптимальным образованием водородных связей между CO- и NH- группами. При этом остатки глицина выступают с одной, а серина и аланина — с другой стороны складчатого листа. Расстояния между отдельными листами равны примерно 0,35 и 0,57 нм.

Совместная укладка пар полипептидных цепей приводит к образованию пространственно вытянутого белкового комплекса, укрепленного *серицином* — вторым (однако водорастворимым) белком шелка. Характерные свойства волокна шелка — незначительная растяжимость и высокая эластичность объясняются прочными ковалентными связями вытянутых полипептидных цепей и слабыми вандерваальсовыми взаимодействиями между листами β -структур.

3.8.3.2. Коллагены [243 — 247]

Коллагены — наиболее часто встречающиеся белки животных организмов (составляют 25 — 30%). Они входят в состав сухожилий, кожи, хрящей,

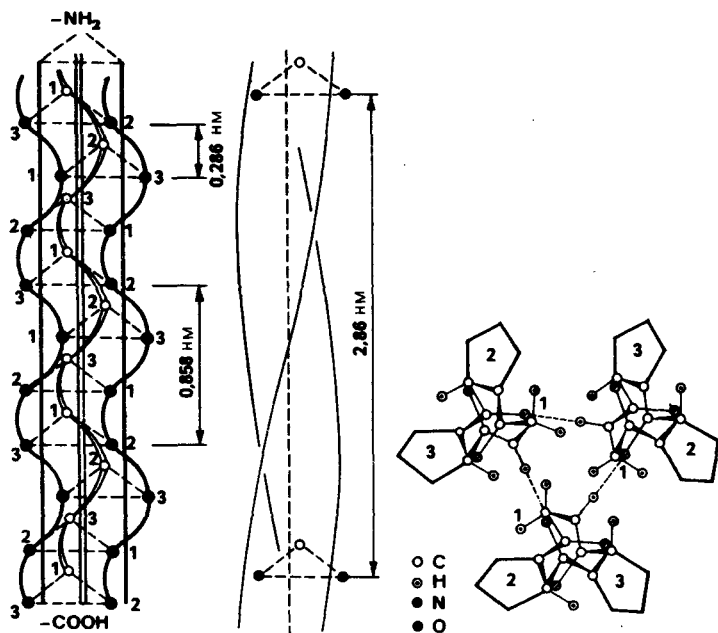


Рис. 3-43. Структура коллагена (по Ричу и Крику).

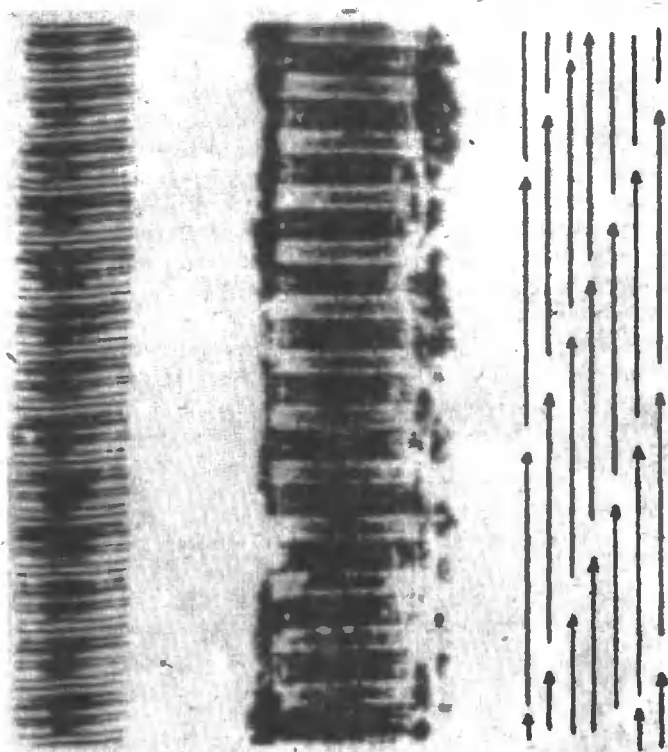


Рис. 3-44. Электронно-микроскопический снимок фибрилл коллагена [248].

стенок сосудов и связывающих тканей. Содержание пролина и гидроксипролина необычайно высоко и составляет 9 — 12%, но больше всего в коллагенах глицина (35%) и аланина (11%), цистеин и метионин содержится только в коллагенах беспозвоночных. Примечательно присутствие гидроксисирина и 1 — 2% углеводов.

Основной структурный элемент коллагена — палочкообразные молекулы *тропоколлагена* (M 300 000, длина 3000 нм и диаметр 1,5 нм). Тропоколлаген построен из трех полипептидных цепей примерно равной длины, из которых две обычно идентичны и называются α_1 -цепями. Коллаген хрящей содержит три идентичные α_1 -цепи, в то время как все цепи коллагена

из кожи тунца различны. Установление аминокислотной последовательности показало, что α_1 -цепь состоит из 1012 аминокислотных остатков и имеет $M \approx 1000\ 000$. Цепи тропоколлагена находятся в форме левовращающей вытянутой спирали, причем каждые три аминокислотных остатка образуют один виток; период идентичности 0,86 нм. Структуру определяют последовательности $(\text{Gly-X-Pro})_n$, $(\text{Gly-X-Hyp})_n$ и $(\text{Gly-Pro-Hyp})_n$, которые обуславливают скручивание трех отдельных цепей в *правовращающую суперспираль*. Спиральная структура в этом случае стабилизируется водородными связями между пептидными группами отдельных цепей. Эти связи могут относительно легко разрушаться, например, при нагревании водного раствора. Из охлажденного раствора, застывающего подобно желатине, можно выделить α_1 -цепи.

Тропоколлаген укладывается в фибриллы диаметром до 500 нм. В каждой фибрилле отдельные молекулы уложены параллельно и смещены одна относительно другой на $1/4$ длины, при этом на поверхности фибриллы образуется типичный *поперечнополосатый рисунок*. В зависимости от типа коллагена расстояние между полосками равно от 60 до 70 нм.

Фибриллы можно сделать видимыми в электронном микроскопе после окрашивания солями тяжелых металлов или наблюдать с помощью малоуглового рентгеновского рассеяния. Реакцией с фосфорновольфрамовой кислотой, солями уранила или хрома(III) полярные области соседних основных элементов коллагена сшиваются между собой на многих участках.

В процессе биосинтеза коллагена в фибробластах сначала образуется водорастворимый протоколлаген, не содержащий гидроксипролина и гидроксизина. Обе гидроксиаминокислоты образуются позднее при действии на молекулу белка особой проколлагенгидроксилазы. После спонтанного образования трехспиральной структуры в молекулу через ОН-группы гидроксизина встраивается углеводный компонент (галактоза, глюкоза). Окончательное формирование коллагеновой фибриллы происходит во внеклеточном пространстве после секреции предшественника.

3.8.4. Белки с защитными функциями

3.8.4.1. Иммуноглобулины

При проникновении посторонних белков или других антигенных компонентов, например макромолекулярных углеводов, в организме животных начинает действовать защитный *механизм антиген — антитело* (иммунный ответ). В процессе этой оборонительной реакции индуцируется биосинтез особых белков, так называемых *антител*, которые посредством высокоспецифичных рецепторов соединяются с антигенами с образованием нерастворимого комплекса антиген — антитело, делая проникший антиген безопасным для организма [249 — 252].

Реакция антиген — антитело наиболее подробно изучена на иммуноглобулинах — антителах, образующихся в плазме крови. Эти «защитные белки» находятся в γ -глобулиновой фракции плазмы. Речь идет о гли-

Таблица 3-11. Классификация иммуноглобулинов человека (Ig) [253]

Свойство	IgG	IgM	IgA		IgD	IgE
			сыворот- ка	секрет		
Коэффициент седиментации	6,5—7S	19S	7S	11S	6,8—7,9S	8,2S
Мол. масса (L-цепь, всегда 23 000)	155 000	940 000	170 000	380 000	185 000	196 000
		Пентамер		Димер		
Тип Н-цепей и мол. масса	$\gamma 1-\gamma 4$ 50 000— 60 000	μ 71 000		α 64 000	δ 60 000— 70 000	ϵ 75 500
Состав (L = χ или λ)	$L_2\gamma_2$	$(L_2\mu_2)_5$	$L_2\alpha_2$	$(L_2\alpha_2)_2$	$L_2\delta_2$	$L_2\epsilon_2$
Содержание углеводов, %	2—3	10—12		8—10	12,7	10—12
Доля относительно иммуноглобулинов сыворотки, %	70—75	7—10		10—22	0,03—1	0,05
Концентрация в сыворотке (мг/100 мл)	1300 (800—1800)	140 (60—280)	210 (100— 450)		3 (1—40)	0,03 (0,01— 0,14)
Валентность при связывании	2	5(10)	1	2	?	2
Полупериод биологического действия, сут	8(IgG 3)—21	5,1	5,8		2,8	2—3
Связывание комплемента	Да	Да	Нет		Нет	Нет

копротеинах с различными молекулярными массами и различным содержанием углеводов, которые можно в значительной степени разделить иммуноэлектрофорезом и разбить на пять основных групп.

Каждый иммуноглобулин построен из двух легких и двух тяжелых полипептидных цепей, которые в каждом случае соединены одна с другой двумя дисульфидными связями.

IgG-глобулины (γ_{7S}), называемые ранее легкими антителами, имеют M 155 000 и коэффициент седиментации 7S. С помощью претеолиза папаином и последующего

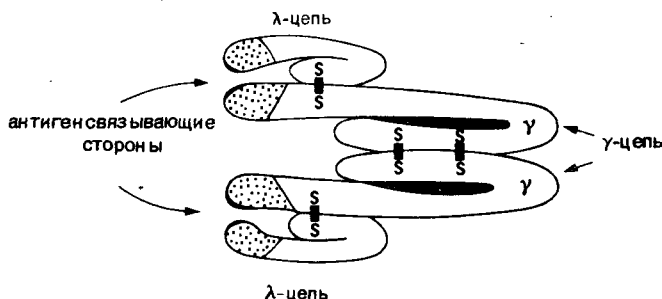


Рис. 3-45. Структура иммуноглобулина IgG.

восстановления они могут быть расщеплены на две полипептидные λ -цепи с M 23 000 (ранее называемые L-цепями, от light — легкий) и две полипептидные γ -цепи с M 50 000 + 60 000 (ранее называемые H-цепями от heavy — тяжелый). Расщепление обратимо, так как после разделения λ - и γ -цепей они могут вновь соединяться в интактную иммунологически активную молекулу $\gamma_2\lambda_2$. Специфичность молекулы достигается характерной аминокислотной последовательностью в N-концевой области полипептидной цепи до 107 остатка (вариабельная область). В C-концевой области цепи находится в основном константный участок последовательности.

Известна первичная структура ряда иммуноглобулинов IgG- и IgM-типов, а также белка Бенса — Джонса (иммуноглобулина L-типа), появляющегося в моче при определенных заболеваниях (например, при миеломе). Этот белок, находящийся в растворе в виде димера, содержит 214 аминокислот. В нем отсутствуют метионин и спиральная структура. Некоторое представление о третичной структуре антитела удалось дать Эдмунсону и Хиллсману [254]; они сделали рентгеноструктурный ана-

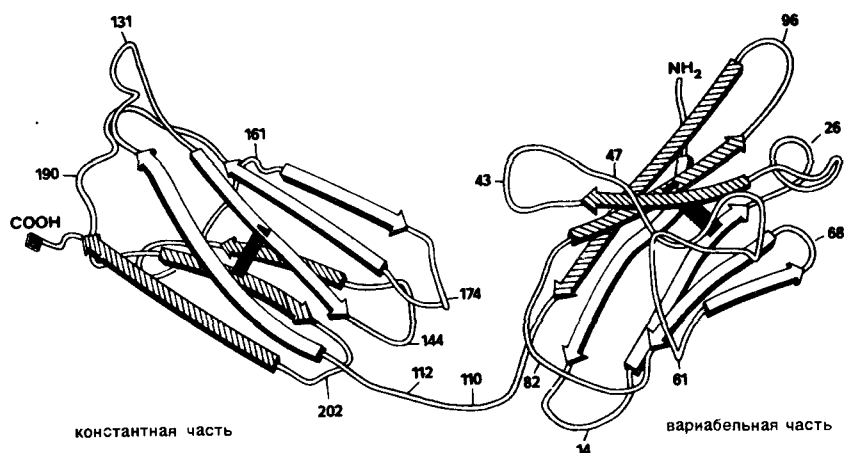


Рис. 3-46. Схема конформации белка Бенса — Джонса L-типа (разрешение 0,35 нм).

лиз белка Бенса — Джонса с разрешением 0,35 нм (рис. 3-46). Можно видеть оба домена с вариабельной областью (всего 111 аминокислотных остатков) и константной областью (всего 105 аминокислотных остатков). Каждый из доменов содержит по два слоя антипараллельных отрезков цепи, представляющих собой β -структуры и показанных на рисунке стрелками. Оба домена добавочно стабилизируются дисульфидными связями (показаны черными) и связаны между собой через растянутую структуру.

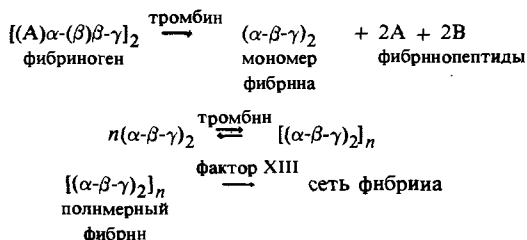
Полного понимания молекулярного механизма образования антител пока не существует. По матричной теории Полинга каждая клетка, образующая антитела, может синтезировать неограниченное число различных структур, а по теории выбора клона, предложенной Бурнетом, генетическая информация о числе и структуре молекул антител содержится в ДНК. Современные представления о структурных основах образования и действия антител изложены в работе [255].

3.8.4.2. Фибриноген — фибрин

Особенно важную защитную функцию выполняют белки в процессе свертывания крови у позвоночных. На последней стадии этого сложного процесса, включающего 12 факторов (из них 11 белковых) и начинающегося при повреждении сосуда, растворимый белок плазмы *фибриноген*, синтезируемый в печени, переходит в фибрин, закрывающий рану.

Фибриноген содержится в человеческой плазме в концентрации 200 — 300 мг на 100 мл и составляет приблизительно 3 — 4% суммарного содержания плазменных белков. В образовании молекулы, состоящей из двух идентичных субъединиц, принимают участие три пары полипептидных цепей ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$), лежащих параллельно одна другой и сшитых между собой в N-концевой области многими дисульфидными связями. Отдельные цепи имеют различный размер (для α -цепи M 67 000, для β -цепи — 56 000 и γ -цепи — 47 000). Фибриноген имеет M 340 000 (по данным малоуглового рентгеновского рассеяния в растворе $335\,000 \pm 25\,000$). Предполагается, что его пространственная структура имеет вид вытянутого цилиндра длиной 45 нм и диаметром 9 нм. Гидратация фибриногена (5 г воды на 1 г белка) необычно высокая для белков.

Переход фибриногена в фибрин осуществляется под влиянием протеазы тромбина в присутствии ионов кальция по следующей схеме:



Сначала от N-концов α - и β -цепей отщепляются один за другим так называемые фибринопептиды А и В, причем отщепление всегда протекает по связи Arg — Gly. *Фибринопептид А человека* имеет последовательность Ala-Asp-Ser-Gly-Glu-Gly-Asp-Phe-Leu-Ala-Glu-Gly-Gly-Gly-Val-Arg; для *фибринопептида В человека* определена последовательность Pyl-Glu-Gly-Val-Asn-Asp-Glu-Glu-Gly-Phe-Phe-Ser-Ala-Arg. Физиологическая функция фибринопептидов, помимо прочего, заключается во временном связывании факторов свертывания крови на месте их действия.

Мономерный фибрин, образующийся при расщеплении, агрегируется в пучки волокон, переходящие затем в стабилизированные водородными связями фибриновые сгустки. Транспептидаза, образующаяся под действием фактора свертывания крови XIII из четырехцепочечного α_2 -глобулина *М* 350 000, осуществляет ковалентную сшивку сгустков фибрина, замыкая изопептидные связи между γ -карбоксильными и ε -аминогруппами боковых цепей остатков глутаминовой кислоты и лизина. Образующийся полимер фибрина нерастворим в воде и в 8 М растворе мочевины. Обратный процесс растворения сгустков фибрина идет под действием *плазмина* (фибринолизин) — трипсиноподобной протеазы, протеолитически расщепляющей фибрин до растворимых продуктов. Сам плазмин образуется из неактивного предшественника плазминогена при его специфической активации урокиназой почек (*М* 53 000) или стрептокиназой (*М* 47 000) из β -гемолитических стрептококков.

3.8.4.3. Лектины

Лектины (от лат. *legere* — выбирать) — гликопротеины, в отдельных случаях безуглеводные белки, прежде всего растительного происхождения, характеризующиеся особыми способностями связывать углеводы и углеводсодержащие поверхности клеток. Из-за их способности агглютинировать эритроциты и другие клеточные структуры они также имеют название *фитогемоглютининов*. Белковый компонент обычно состоит из нескольких субъединиц. Характерным в аминокислотном составе является отсутствие серусодержащих аминокислот и повышенное содержание серина и треонина. Через эти аминокислоты осуществляется связывание углеводного компонента, среднее содержание которого составляет 5% и состав ограничивается в основном моносахаридами галактозой, маниозой, фукозой и N-ацетилглюкозаминном.

Молекулярное взаимодействие между лектинами и посторонними углеводами сравнимо с реакцией антиген — антитело в человеческом и животных организмах. Однако специфичность лектинов шире, и, что является наиболее важным отличием, они содержатся в соответствующем растении постоянно, т. е. их образование не индуцируется контактом с остатком сахара.

Биологические функции лектинов многообразны и еще не выяснены во всех деталях. Их защитное действие у семян заключается в частичной защите от поедания насекомыми. Лектины, связывающие N-ацетилглюкозамин, препятствуют образованию хитина при синтезе клеточных стенок в грибах и таким образом защищают растения от инфекции.

Как было показано на примере инфицирования листьев табака непатогенным штаммом бактерии *Pseudomonas solanacearum*, лектины обуславливают фиксацию бактерий на клеточных стенках инфицированных растений.

Похожие бактерии агглютинируются лектином картофеля. Этот лектин с $M 92\,000$ состоит из двух субъединиц и проявляет специфичность к остаткам N-ацетилглюкозамина; имеет необычно высокое содержание углеводов ($\sim 50\%$) и содержит гидроксипролин

Многочисленные представители лектинов находятся в растениях из семейства бобовых. Функция этих легиуминовых лектинов состоит в узнавании и фиксации симбиотических бактерий, связывающих азот воздуха. Известный *конканавалин А* (Con A) из бобов был получен в кристаллическом состоянии уже в 1919 г. Он состоит из четырех субъединиц по 238 аминокислот каждая с суммарной $M 110\,000$. Каждая субъединица содержит ион кальция и ион магния. Ионы металлов необходимы как для осуществления процесса связывания углеводов, так и для стабилизации пространственной структуры белка. *Вицилин* из бобов *Phaseolus aureus* Roxb. — гликопротеин с содержанием 0,2% глюкозамина и 1% маннозы. Каждая из четырех субъединиц содержит боковую углеводную цепь из 13 углеводных остатков.

Большое значение для медицины имеет применение лектинов для определения группы крови. Метод основан на избирательном взаимодействии лектинов с эритроцитами систем ABO и MN. Так, например, лектин из *Dolichos biflorus* специфически связывает N-ацетилгалактозамин рецепторов, определяющих группу крови A_1 . Предпочтительная агглютинация раковых клеток по сравнению со здоровыми используется для определения раковых трансформаций в клеточных культурах. Так, безуглеводный лектин из земляных орехов ($M 120\,000$, 4 субъединицы) лучше связывается с раковыми клетками молочной железы, чем с соответствующими нормальными клетками.

3.8.4.4. Белки, препятствующие замерзанию

Белки, защищающие от замерзания (гликопротеиновые антифризы), — общее название для ряда родственных гликопротеинов, содержащихся в плазме крови антарктических рыб и вместе с солями, прежде всего хлоридом натрия, снижающих точку замерзания плазмы. Присутствие этих белков препятствует застыванию крови и сохраняет жизнедеятельность организма до температуры $-1,85^\circ\text{C}$.

При разделении гликопротеинов плазмы электрофорезом получают активную фракцию этих белков, состоящую из 5 компонентов с $M 11\,000 + 32\,000$. Все компоненты содержат только аланин и треонин, структура углеводной части соответствует дисахариду D-галактозил-D-N-ацетилгалактозамину.

Анализ аминокислотных последовательностей компонентов активной фракции обнаружил наличие в полипептидных цепях повторяющегося участка -Ala-Ala-Thr- с двумя дополнительными остатками аланина на C-конце полипептидной цепи. Для этих белков предполагается гибкая вытянутая структура, образующая в воде неидеальные и нерегулярные формы и тем самым нарушающая нормальный рост кристаллов льда. Гидрофильная

сторона молекулы гликопротеина образует специфические водородные связи, идущие прежде всего от гидроксильных групп углеводной части.

Помимо активного, защищающего от замораживания белка в плазме содержатся три меньших, неактивных гликопротеина (M 2700 — 7800), у которых в молекуле на каждые два остатка треонина приходится дополнительно один остаток пролина. Их концентрация в крови рыб составляет 10 — 15 мг/мл при суммарном содержании гликопротеинов 25 мг/мл. Их функция, по-видимому, состоит в стимуляции антифризной активности беспрониновых белков плазмы.

3.8.4.5. *Интерфероны*

Интерфероны — это гликопротеины, состоящие из белкового компонента (~ 160 аминокислотных остатков) и специфического углеводного компонента. Они синтезируются в животных клетках после возбуждения экзогенным стимулятором и отличаются антивирусным, клеточно- и иммунорегуляторным действием, а также особыми антиопухолевыми свойствами. Оптимальный эффект достигается в гомологичной или близкородственной системе, поэтому для человека наиболее действенны человеческие интерфероны.

Особое значение имеет антивирусное действие интерферонов, на котором основан главный защитный механизм у человека и животных, действующий против многочисленных вирусных возбудителей. После проникновения вируса в клетку активируется в нормальном состоянии неактивный ген интерферона клетки. Следует перенос информации на мРНК и инициация рибосомного биосинтеза белка в цитоплазме. После завершения синтеза присоединяется углеводный компонент и полная молекула интерферона секретируется клеткой. Взаимодействием со специфическим рецептором на поверхности клетки интерферон индуцирует образование внутриклеточных ферментов, которые препятствуют копированию вирусной информации, т. е. блокируя синтез вирусных белков, прерывают цепь инфекционного процесса.

В противоположность антителам, нейтрализующим чуждую молекулу путем прямого контакта и часто появляющимся во внеклеточном пространстве даже через годы, интерфероны действуют лишь несколько часов. В какой степени кооперируют обе системы одна с другой, в настоящее время еще трудно сказать.

К другим примерам действия интерферона относятся благоприятное влияние на иммунную реакцию организма, например при инфекции и трансплантации органов, активация специфических иммунных клеток, а также подавление очень быстро делящихся клеток, например опухолевых.

Успех при применении интерферона в клинической практике был достигнут при лечении вирусных заболеваний, например хронического гепатита. Применение при терапии рака пока оценивается сдержанно. Успешным было послеоперационное лечение пациентов с остеосаркомой.

Для получения интерферона используются клеточные линии лейкоцитов, фибробластов, побуждаемые к синтезу и выделению интерферона вирусной инфекцией или такими индукторами, как поли(I:C), DEAE-декстран и cGMP-аскорбиновая кислота. Так как в данном процессе выход нужного белка в высшей степени незначителен, особое внимание уделяется генной технологии. Однако в этом случае может образовываться лишь чисто белковый компонент интерфеоид.

В зависимости от происхождения интерфероны различаются по аминокислотной последовательности, содержанию сахара, молекулярной массе, антигенной специфичности и фармакологическим свойствам.

Для интерферона из фибробластов человека (*M* 20 000) известна полная аминокислотная последовательность белкового компонента. Установление первичной структуры осуществлено бельгийскими [256] и японскими [257, 258] учеными, причем обе лаборатории исходили из выделенной из фибробластов соответствующей мРНК. По нуклеотидной последовательности была выведена соответствующая аминокислотная последовательность:

```

1                               10
Met-Ser-Tyr-Asn-Leu-Leu-Gly-Phe-Leu-Gln-Arg-Ser-Ser-Asn-Phe-
                20                               30
Gln-Cys-Gln-Lys-Leu-Leu-Trp-Gln-Leu-Asn-Gly-Arg-Leu-Glu-Tyr
                        40
Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-Met-Asn-Phe-Asp-Ile-Pro-Glu-Glu-Ile-Lys-
                50                               60
Gln-Leu-Gln-Gln-Phe-Gln-Lys-Glu-Asp-Ala-Ala-Leu-Thr-Ile-Tyr-
                        70
Glu-Met-Leu-Gln-Asn-Ile-Phe-Ala-Ile-Phe-Arg-Gln-Asp-Ser-Ser-
                80                               90
Ser-Thr-Gly-Trp-Asn-Glu-Thr-Ile-Val-Glu-Asn-Leu-Leu-Ala-Asn-
                        100
Val-Tyr-His-Gln-Ile-Asn-His-Leu-Lys-Thr-Val-Leu-Glu-Glu-Lys-
                110                               120
Leu-Glu-Lys-Glu-Asp-Phe-Thr-Arg-Gly-Lys-Leu-Met-Ser-Ser-Leu-
                        130
His-Leu-Lys-Arg-Tyr-Tyr-Gly-Arg-Ile-Leu-His-Tyr-Leu-Lys-Ala-
                140                               150
Lys-Glu-Tyr-Ser-His-Cys-Ala-Trp-Thr-Ile-Val-Arg-Val-Glu-Ile-
                        160                               166
Leu-Arg-Asn-Phe-Tyr-Phe-Ile-Asn-Arg-Leu-Thr-Gly-Tyr-Leu-Arg-Asn

```

Бросается в глаза высокое содержание гидрофобных аминокислот лейцина, изолейцина, тирозина и наличие всего одного остатка пролина. Связывание углеводной части осуществляется, по всей вероятности, через N-гликозидную связь с остатком аспарагина-80 либо через O-гликозидную связь с остатками треонина или серина.

Аминокислотной последовательности интерферона предшествует типичная для секреторных белков сигнальная последовательность, селективно отщепляемая во время или сразу после прохождения мембраны. Первичная структура сигнального пептида следующая:

Met-Thr-Asn-Lys-Cys-Leu-Leu-Gln-Ile-Ala-Leu-Leu-Cys-Phe-

Ser-Thr-Thr-Ala-Leu-Ser

Литература

1. Advances in Protein Chemistry, Vol. 1—32, Academic Press, New York, 1944—1978.
2. *Neurath H.*, The Proteins-Composition, Structure and Function, Vol. 1—5, Academic Press, New York, London, 1963—1970.
3. *Lübke K., Schröder E., Kloss G.*, Chemie und Biochemie der Aminosäuren, Peptide und Proteine, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, 1975.
4. *Dickerson R. E., Geis I.*, Struktur und Funktion der Proteine, Verlag Chemie, Weinheim, 1975.
5. Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry (S. J. Leach, Ed.), Part B, Academic Press, New York, 1970.
6. *Fasold H.*, Die Struktur der Proteine, Verlag Chemie, Weinheim, 1972.
7. *Legget-Bailey J.*, Techniques in Protein Chemistry, Elsevier, Amsterdam, 1969.
8. *Hoffmann S.*, Molekulare Matrizen, Bd.II: Proteine, Academic-Verlag, Berlin, 1978.
9. *Haurowitz F.*, The Chemistry and Function of Proteins, Academic Press, New York, 1963.
10. *Präve P., Faust U.*, Chemistry in Britain, **14**, 552 (1978).
11. *Crahmer R.*, Wiss. Fortschr., **22**, 368 (1972).
12. *Müller H. G., Ruckpaul K.*, Wiss. Fortschr., **22**, 227 (1972).
13. *Voss G.*, Erdöl-Kohle-Erdgas-Petrochemie m.Brennstoffchemie, **26**, 249 (1973).
14. *Bauch J. et al.*, Chem. Techn., **30**, 284 (1978).
15. *MacLaren D. D.*, Fod prod. Dev., **9**, 26 (1975).
16. *Faust U. et al.*, J. Ferment. Technol., **55**, 6 (1977).
17. *Hofmeister F.*, Naturw. Rundsch., **17**, 529, 545 (1902).
18. *Fischer E.*, Chem. Ztg., **26**, 935 (1902).
19. *Fischer E.*, Ber., **40**, 1754 (1907).
20. *Ryle A. P. et al.*, Biochem. J., **60**, 541 (1955).
21. *Sanger F.*, Endeavour, **16**, 48 (1957).
22. *Alexander P., Block R. J.*, Analytical Methods of Protein Chemistry, Pergamon Press, Oxford, 1961.
23. *Haschemeyer R. H., Haschemeyer A. E. V.*, Proteins, Wiley, New York, 1973.
24. *Niederwieser A., Pataki G.*, New Techniques in Amino Acid, Peptide and Protein Analysis, Humphrey, Ann Arbor, Michigan, 1971.
25. *Work T. S., Work E.*, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 1—3, North-Holland Publishing Co., Amsterdam, London, 1975.
26. *Schwenke K. D. et al.*, Nahrung, **21**, 395 (1977).
27. *Cohn E. J.*, J. Am. Chem. Soc., **68**, 459 (1946).
28. *Cohn E. J., Edsall J. T.*, Proteins, Amino Acids and Peptides, Reinhold, New York, 1958.
29. *Tavel P. V., Sigher R.*, Adv. Protein. Chem., **11**, 237 (1956).
30. *Schwenke K. D.*, Z. Chem., **5**, 322 (1965).
31. *Hausmann W., Craig L. C.*, J. Am. Chem. Soc., **80**, 2703 (1958).
32. *Strathmann H.*, Chem. Techn., **7**, 333 (1978).
33. *Determann H.*, Gelchromatographie, Springer Verlag, Berlin-New-York-Heidelberg, 1967.
34. *Ackers G. K.*, Adv. Protein. Chem., **24**, 343 (1970).
35. *Friedli H., Kistler P.*, Chimia, **26**, 25 (1972).
36. *Fischer L.*, An Introduction to Gel Chromatography, Elsevier, North-Holland, New York, 1972.
37. *Curling J.*, Int. Lab., **1976**, 37.
38. *Galpin I. J. et al.*, J. Chromatogr., **106**, 125 (1975).

39. *Gordon A. H.*, Electrophoresis of Proteins on Polyacrylamid and Starch Gels, Elsevier, North-Holland, 1971.
40. *Maurer H. R.*, Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis, 2 Aufl., W. de Gruyter, Berlin, New York, 1971.
41. *Maurer H. R.*, Disk-Electrophorese, W. de Gruyter, Berlin, 1968.
42. *Radola B. J.*, Biochem. Biophys. Acta, **295**, 412 (1973); **386**, 181 (1974).
43. *Wellner D.*, Electrofocussing in Gels, Anal. Chem., **43**, 597 (1971).
44. *Allen R. C.*, *Maurer H. R.*, Electrophoresis and Isoelectric Focussing in Polyacrylamid Gels, W. de Gruyter, New York, 1974.
45. *Arbuthnot J. P.*, *Beeley J. A.*, Isoelectric Focussing, Butterworths, London, 1975.
46. *Wagner H.*, *Speer W.*, J. Chromatog., **157**, 259 (1978).
47. *Everaerts F. M. et al.*, Isotachophoresis-Theory, Instrumentation and Applications, Elsevier, New York, 1976.
48. *Beckers J. L.*, *Everaerts F. M.*, J. Chromatog., **68**, 207 (1972); **69**, 165.
49. *Backhausz R.*, Immunodiffusion und Immunoelktrophorese; Grundlagen, Methoden und Ergebnisse, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1967.
50. *Clausen J.*, Immunochemical Techniques for the Identification and Estimation of Macromolecules, Elsevier, North-Holland, New York, 1971.
51. *Grabar P.*, *Burtin P.*, Immunoelktrophoretische Analyse, Elsevier, North-Holland, 1964.
52. *Shung-Ho Chang et al.*, Anal. Chem., **48**, 1839 (1976).
53. *Dozy A. M.*, *Huisman T. H. J.*, J. Chromatog., **40**, 62 (1969).
54. *Axen R. et al.*, Nature, **214**, 1302 (1967).
55. *Cuatrecasas P. et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **61**, 636 (1968).
56. *Cuatrecasas P.*, J. Biol. Chem., **245**, 3059 (1970).
57. *Cuatrecasas P.*, Nature, **228**, 1327 (1970).
58. *Cuatrecasas P.*, *Parikh I.*, Biochemistry, **11**, 2291 (1972).
59. *Cuatrecasas P.*, Adv. Enzymol., **36**, 29 (1972).
60. *Porath J.*, Biochimie, **55**, 943 (1973).
61. *Scouten W. H.*, Int. Lab., **1974**, 13.
62. *Lowry O. et al.*, J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).
63. *Bradford M. M.*, Anal. Biochem., **72**, 248 (1976).
64. *Tanford C.*, Physical Chemistry of Macromolecules, Wiley, New York, 1961.
65. *Edsall J. T.*, *Wyman J.*, Biophys. Chemistry, Vol. 1, Academic Press, New York, 1958.
66. *Tanford G.*, Protein Denaturation, Adv. Protein Chem., **23**, 121 (1968); **24**, 1 (1970).
67. *Svedberg Th.*, *Pedersen K. O.*, The Ultracentrifuge, Oxford, University Press, London, 1940.
68. *Schachmann H. K.*, Ultracentrifugation in Biochemistry, Academic Press, New York, 1959.
69. *Schachmann H. K.*, Biochemistry, **2**, 887 (1963).
70. *Whitaker J. R.*, Anal. Chem., **35**, 1950 (1963).
71. *Andrews P.*, Biochem. J., **91**, 222 (1964).
72. *Auricchio F.*, *Bruni C. B.*, Biochem. Z., **340**, 321 (1964).
73. *Determann H.*, Gelchromatography, Springer-Verlag, Berlin — Heidelberg — New York, 1968.
74. *Swank R. T.*, *Munkres K. D.*, Anal. Biochem., **39**, 462 (1971).
75. *Tanford C.*, Adv. Protein Chem., **23**, 122 (1968).
76. *Reynolds J. A.*, *Tanford C.*, J. Biol. Chem., **245**, 5161 (1970).
77. *Frenkel M. J.*, *Blagrove.*, J. Chromatog., **111**, 397 (1975).

78. *Dickerson R. E., Geis I.*, Funktion und Struktur der Proteine, Verlag Chemie, Weinheim, 1971.
79. *Fasold H.*, Die Struktur der Proteine, Verlag Chemie, Weinheim, 1972.
80. *Hess G. P., Rupley J. A.*, Structure and Function of Proteins, Ann. Rev. Biochem., **40**, 1013 (1971).
81. *Schulz G. E.*, Angew. Chem., **89**, 24 (1977).
82. *Kirschenbaum D. M.*, Anal. Biochem., **53**, 223 (1973); **56**, 208 (1974); **61**, 567; **66**, 123, 303 (1975); **83**, 521 (1977).
83. *Dayhoff M. O.*, Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington, 1969 u. ff.
84. *Hill R. L.* Adv. Protein Chem., **20**, 37 (1965).
85. *Toi K. et al.*, J. Biol. Chem., **242**, 1036 (1967).
86. *Brown J. R., Hartley B. S.*, Biochem. J., **89**, 59 (1963).
87. *Witkop B.*, Adv. Protein Chem., **16**, 221 (1961).
88. *Witkop B.*, Science, **162**, 318 (1968).
89. *Gross E., Witkop B.*, J. Am. Chem. Soc., **83**, 1510 (1961).
90. *Stark G. R.*, J. Biol. Chem., **248**, 6583 (1973).
91. *Degani Y., Patchornik A.*, Biochemistry, **13**, 1 (1974).
92. *Edman P.*, Mol. Biol. Biochem. Biophys., **8**, 211 (1970).
93. *Blackburn S.*, Protein Sequence Determination Methods and Techniques, M. Dekker, New York, 1970.
94. *Groft L. R.*, Handbook of Protein Sequences, Suppl. A, Joynson — Bruvers, Oxford, 1974.
95. *Bridgen J.*, Sci. Tool., **24**, 1 (1977).
96. *Tsernoglou D. et al.*, Biochem. Biophys. Acta, **491**, 605 (1977).
97. *Sanger F.*, Biochem. J., **39**, 507 (1945).
98. *Gray W. R., Hartley B. S.*, Biochem. J., **89**, 59 (1963).
99. *Akabori S. et al.*, Bull. Chem. Soc. Japan, **29**, 507 (1956).
100. *Edman P.*, Acta Chem. Scand., **4**, 277 (1950).
101. *Downing M. R., Mann K. G.*, Anal. Biochem., **74**, 298 (1976).
102. *Frank G., Strubert W.*, Chromatographia, **6**, 522 (1973).
103. *Zeeuws R., Strosberg A. D.*, FEBS Letters, **85**, 68 (1978).
104. *Fairwell T., Barness U. T., Lovins R. F.*, Biochemistry, **9**, 2260 (1970).
105. *Hagenmair H. et al.*, Z. Naturforsch., **25b**, 681 (1970).
106. *Sun T., Lovins R. E.*, Anal. Biochem., **45**, 176 (1972).
107. *Creaser E. H., Bentley K. W.*, Biochem. J., **153**, 607 (1976).
108. *Gray W. R.*, Methods in Enzymology, Vol. 11, pp. 139, 469, Academic Press, New York, 1967.
109. *Gray W. R., Smith J.*, Anal. Biochem., **33**, 36 (1970).
110. *Gray W. R., Hartley B. S.*, Biochem. J., **89**, 379 (1963).
111. *Lequin R. M., Niall H. D.*, Biochem. Biophys. Acta, **257**, 76 (1972).
112. *Edman P., Begg C.*, Eur. J. Biochem., **1**, 80 (1967).
113. *Edman P.*, Protein Sequence Determination (S. B. Needleman, Ed.), Springer-Verlag, New York, 1970.
114. *Braunitzer G. et al.*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **354**, 867 (1973).
115. *Braunitzer G. et al.*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **354**, 1563 (1973).
116. *Kleinschmidt T., Braunitzer G.*, Annalen, **1978**, 1060.
117. *Laursen R. A., Bonner A. G.*, Chem. Engng. News., **48**, 52 (1970).
118. *Laursen R. A.*, Eur. J. Biochem., **20**, 89 (1971).
119. *Schellenberger A. et al.*, Z. Chem., **12**, 63 (1972).
120. *Mech C., Jeschkeit H., Schellenberger A.*, Eur. J. Biochem., **66**, 133 (1976).

121. Laursen R. A. et al., FEBS Letters, **21**, 67 (1972).
122. Previero A. et al., FEBS Letters, **33**, 135 (1973).
123. How-Ming Lee, Riordan J. F., Anal. Biochem., **89**, 136 (1978).
124. Herbrink P. et al., FEBS Letters, **60**, 313 (1975).
125. Niall H. D. et al., FEBS Letters, **41**, 62 (1974).
126. Wachter E. et al., FEBS Letters, **35**, 97 (1973).
127. Loudon G. M., Parham M. E., Tetrahedron Letters, **5**, 437 (1978).
128. Stark G. R., Meth. Enzymol., **25**, 369 (1972).
129. Rangarajan M., Darbre A., Biochem. J., **157**, 307 (1976).
130. Deyl Z., J. Chromatog., **127**, 91 (1976).
131. Lindley H., Biochem. J., **126**, 683 (1972).
132. Ovchinnikov Yu. A., Kiryushkin A. A., FEBS Letters, **21**, 200 (1972).
133. Callahan P. X. et al., Fed. Proc., **31**, 1105 (1972).
134. Sheinblatt M., J. Am. Chem. Soc., **88**, 2597 (1966).
135. Heyns K., Grützmacher H. F., Fortschr. Chem. Forschg., **6**, 536 (1966).
136. Biemann K. et al., J. Am. Chem. Soc., **88**, 2845 (1966).
137. Schier G. M. et al., Biomed. Mass. Spectrom., **3**, 32 (1976).
138. Kelly J. A., Biemann K., Biomed. Mass. Spectrom., **2**, 326 (1975).
139. Nau H., Angew. Chem., **88**, 74 (1976).
140. Nau H., Biemann K., Anal. Biochem., **73**, 139 (1976).
141. Kendrew J. C., The Three-Dimensional Structure of the Protein Molecule, Sci. Am., **205**, 96 (1961).
142. Anfinsen C. B., Angew. Chem., **85**, 1065 (1973).
143. Levinthal C., Sci. Am., **214**, 42 (1966).
144. Tanaka Seiji, Scheraga H. A., Macromolecules, **10**, 291 (1977).
145. Baldwin R. L., Ann. Rev. Biochem., **44**, 453 (1975).
146. Tanaka Seiji, Scheraga H. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **72**, 3802 (1975).
147. Wetlaufer D. B., Ristow S., Ann. Rev. Biochem., **42**, 135 (1973).
148. Ramachandran G. N., Sasisikharan V., Adv. Protein Chem., **23**, 282 (1968).
149. Venkatachalan C. M., Ramachandran G. N., Ann. Rev. Biochem., **38**, 45 (1969).
150. Pauling L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **37**, 205 (1951).
151. Pauling L., Corey R. B., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **37**, 735 (1951).
152. Perutz M. F., Nature, **1951**, 1053.
153. Lippert J. L. et al., J. Am. Chem. Soc., **98**, 7075 (1976).
154. Levitt M., Green J., J. Mol. Biol., **114**, 181 (1977).
155. Chothia C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 4130 (1977).
156. Davies K., Educ. Chem., **13**, 71 (1976).
157. Neves D. E., Scott R. A., Macromolecules, **10**, 339 (1977).
158. Teramoto A., Fujita H., J. Macromol. Sci.; Rev. Macromol. Chem. C **15** (2), 165 (1976).
159. Holmes K. C., Blow D. M., The Use of X-Ray Diffraction in the Study of Protein and Nucleic Acid Structure, Wiley, New York, 1966.
160. Fruberg S., Naturw. Rundsch., **20**, 185 (1967).
161. Hoppe W., Naturwiss., **55**, 65 (1968).
162. Hoppe W. et al., Naturwiss., **55**, 333 (1968).
163. Schulz G. E., Nachr. Chem. Techn., **22**, 20 (1974).
165. Hagler A. T., Honig B., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **75**, 554 (1978).
166. Schulz G. E. et al., Nature, **250**, 140 (1974).
167. Wetlaufer D. B., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **70**, 697 (1973).
168. Schulz G. E., Schirmer R. H., Nature, **250**, 142 (1974).
169. Wüthrich K., Chimia, **24**, 409 (1970).

170. Bovey F. A., Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, Academic Press, New York, 1969.
171. Jirgensons B., Optical Rotatory Dispersion of Proteins and Other Macromolecules, 2 Aufl., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1972.
172. Beyschok S., Science, **154**, 1288 (1966).
173. Klotz I. M. et al., Ann. Rev. Biochem., **39**, 25 (1970).
174. Darnall D. W., Klotz I. M., Arch. Biochem. Biophys., **166**, 651 (1975).
175. Jaenicke R., Naturwiss., **65**, 569 (1978).
176. Campbell P. N., Sargent J. R., Techniques in Protein Biosynthesis, Academic Press, New York, 1967.
177. Träger L., Einführung in die Molecularbiologie, VEB Gustav Fischer-Verlag, Jena, 1969.
178. Lucas-Lenard J., Lipmann F., Ann. Rev. Biochem., **40**, 409 (1971).
179. Holler E., Angew. Chem., **90**, 682 (1978).
180. Zachau H. G., Angew. Chem., **81**, 645 (1969).
181. Holley R. W., Angew. Chem., **81**, 1039 (1969).
182. Rich A., Rajhandary U. L., Ann. Rev. Biochem., **45**, 805 (1976).
183. Kim S. H., Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., **17**, 181 (1976).
184. Rich A., Biochemie, **56**, 1441 (1974).
185. Shoemaker H. J. P., Schimmel P. R., J. Biol. Chem., **251**, 6823 (1976).
186. Eldred E. W., Schimmel P. R., J. Biol. Chem., **247**, 2961 (1972).
187. Igloi G. L. et al., Biochemistry, **16**, 1696 (1977).
188. Haar F., Naturwiss., **63**, 519 (1976).
189. Wittmann G., Jokusch H., Molekularbiologie-Bausteine des Lebendigen (Th. Wieland, G. Pfeleiderer, Eds.), p.49, Umschau-Verlag, Frankfurt/M., 1967.
190. Ochoa S., Naturwiss. Rundsch., **19**, 483 (1968).
191. Mirenborg M., Angew. Chem., **81**, 1017 (1969).
192. Khorana H. G., Angew. Chem., **81**, 1027 (1969).
193. Ochoa S., Naturwiss., **55**, 506 (1968).
194. Smith A. E., Marcker K. A., Nature, **226**, 607 (1970).
195. Blobel G., 11th FEBBS Meeting, Kopenhagen, 1977.
196. Zwilling R., Umschau, **78**, 170 (1978).
197. Chan S. J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**, 1964 (1976).
198. Kemper B. et al., Biochemistry, **15**, 15 (1976).
199. Maurer R. S. et al., Biochem. J., **161**, 189 (1977).
200. Wallenfels K., Weil R., см.[189], стр.67.
201. Jacob F., Monod J., J. Mol. Biol., **3**, 318 (1961).
202. Barman T. E., Enzyme Handbook, Vol. I, II, Springer-Verlag, Berlin — Heidelberg — New York, 1969.
203. Betz A., Enzyme — Gewinnung, Analyse, Regulation, Verlag Chemie, Weinheim, 1974.
204. Jencks W. P., Catalysis in Chemistry and Enzymology, McGraw-Hill, New York, 1969.
205. Blow D. M., Seitz T. A., Ann. Rev. Biochem., **39**, 63 (1970).
206. Bell R. M., Koshland D. E., Science, **172**, 1253 (1971).
207. Kirsch J., Ann. Rev. Biochem., **42**, 205 (1973).
208. Lienhard G. E., Science, **180**, 149 (1973).
209. Page M. I., Angew. Chem., **89**, 456 (1977).
210. Richter O., Umschau, **1976**, 581.
211. Jaenicke R., Naturwiss., **65**, 569 (1978).
212. Gutfreund H., Enzymes: Physical Principles, Wiley, New York, 1972.

213. *Koshland D. E.* in: the Enzymes, 3 ed., Vol. 1. p. 341, Academic Press, New York, 1970.
214. *Koshland D. E.*, *Sci. Am.*, **229**, 52 (1973).
215. *Monod J. et al.*, *J. Mol. Biol.*, **12**, 88 (1965).
216. *Richards F. M.*, Structure and Activity of Ribonuclease, in: Structure and Activity of Enzymes, Academic Press., London, 1964.
217. *Smyth D. G.*, *Stein W. H.*, *Moore S.*, *J. Biol. Chem.*, **238**, 227 (1963).
218. *Kartha G. et al.*, *Nature*, **213**, 862 (1967); *ibid.*, **214**, 234 (1967).
219. *Richards F. M.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **44**, 162 (1958).
220. *Wyckoff H. M. et al.*, *J. Biol. Chem.*, **242**, 3984 (1967).
221. *Wyckoff H. M. et al.*, *J. Biol. Chem.*, **245**, 305 (1970).
222. *Scoffone E. et al.*, *Chem. Commun.*, **1967**, 1273.
223. *Canfield R. E.*, *Liu A. K.*, *J. Biol. Chem.*, **240**, 1997 (1965).
224. *Blake C. C. F. et al.*, *Nature*, **206**, 757 (1965).
225. *Johnson L. N.*, *Phillips D. C.*, *Nature*, **206**, 762 (1965).
226. *Sigler B. P. et al.*, *J. Mol. Biol.*, **35**, 143 (1968).
227. *Blow D. M. et al.*, *Nature*, **221**, 337 (1969); **225**, 802, 811.
228. *Lipscomb W. N. et al.*, *J. Mol. Biol.*, **19**, 423 (1966).
229. *Quijcho F. A.*, *Lipscomb W. N.*, *Adv. Protein Chem.*, **25**, 1 (1971).
230. *Lipscomb W. N.*, International Congress of Biochemistry, Abstracts 128, 1970.
231. *Kendrew J. C. et al.*, *Nature*, **185**, 422 (1960).
232. *Edmundson A. E.*, *Nature*, **205**, 883 (1965).
233. *Dickerson R. E.* in: The Proteins (H. Neurath, Ed.), Vol. 2, p.603, Academic Press, New York, 1964.
234. *Antonini E.*, *Brunori M.*, *Ann. Rev. Biochem.*, **39**, 977 (1970).
235. *Buse G.*, *Angew. Chem.*, **83**, 735 (1971).
236. *Braunitzer G.*, *Naturwiss.*, **54**, 407 (1967).
237. *Perutz M. F. et al.*, *Nature*, **185**, 416 (1960).
238. *Cullis A. F. et al.*, *Proc. Roy. Soc. (London)*, **265**, 161 (1961).
239. *Sund H.*, *Weber K.*, *Angew. Chem.*, **78**, 217 (1966).
240. *Fermi G.*, *J. Mol. Biol.*, **97**, 237 (1975).
241. *Huber R. et al.*, *Naturwiss.*, **56**, 262 (1969).
242. *Bradbury J. H.*, *Adv. Protein Chem.*, **27**, 111 (1973).
243. *Rich A.*, *Crick F. H.*, *J. Mol. Biol.*, **3**, 483 (1961).
244. *Grassmann W.*, *Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe*, **23**, 196 (1965).
245. *Nemetschek Th.*, *Chem. Labor Betrieb*, **20**, 433 (1969).
246. *Reich G.*, *Kollagen. Eine Einführung in Methoden, Ergebnisse und Probleme der Kollagenforschung*, Theodor Steinkopff-Verlag. Dresden, 1967.
247. *Traub W.*, *Piez K. A.*, *Adv. Protein Chem.*, **25**, 243 (1971).
248. *Kühn K.*, *Naturwiss.*, **54**, 101 (1967).
249. *Kabat E. A.*, Einführung in die Immunochemie und Immunologie, Springer-Verlag, Berlin — Heidelberg — New York, 1971.
250. *Edelmann G. M.*, *Gall W. E.*, *Ann. Rev. Biochem.*, **38**, 425 (1969).
251. *Kleine T. O.*, *Z. Klin. Chem.*, **7**, 313 (1969).
252. *Sela M.*, *Science*, **166**, 1365 (1969).
253. ABC Biochemie, S. 290, VEB Brockhaus Verlag, Leipzig, 1976.
254. *Hiltschmann N.*, *Nova Acta Leopoldina*, **39/1**, 15 (1973).
255. *Kabat E. A.*, *Adv. Protein Chem.*, **32**, 1 (1978).
256. *Derynck R. et al.*, *Nature*, **285**, No5766, 542 (1980).
257. *Taniguchi T. et al.*, *Gene*, **10**, 11, 15 (1980).
258. *Taniguchi T. et al.*, *Nature*, **285**, 547, 549 (1980).

Предметный указатель

Агматин 72

1-(1-Адамантил)-1-метилэтоксикарбонильная группа 109

Аденозилгомоцистеин 71

Аденозилметионин 70

Адренкортикотропный гормон *см.* Кортикотропин

Азетидин-2-карбоновая кислота 22

Азидный метод 99, 138—141, 172, 178

Азлактонный синтез 43

Азлактоны 43, 44, 170—172

Акромегалия 244, 260

АКТГ *см.* Кортикотропин

Активированные эфиры 146 и сл.

— полимеры 198, 199, 200

Актин 340

Актиномицины 201, 299 и сл., 398

Аламетицин 305, 306

Аланин 14, 17, 20, 27, 28

— абсолютная конфигурация 26

— биосинтез 50

— ИК-спектроскопия 35

— молекулярное вращение 23, 24

— наличие 20, 48

— пространственное расположение 26

β -Аланин 20, 155

DL-Аланин, изопропиловый эфир 52

Алафосфин 298

Алителин 89, 236, 284

2-Алкоксиксазолон 172

Алкогедегидрогеназа 387

N-Алкиламинокислоты 11

Алкилирование шиффовых оснований 44

N-Алкилтио-тиокарбониламинокислоты 29

Аллиин 21

Альбумины 340, 343, 345, 355, 357

α -Аманитин 299, 311

Аматоксин 299, 309 и сл.

Амелетин 289

Амидазы 400

1-Амидино-3,5-диметилпиразол 128

Амидирование 128

трет-Амилосикарбонильная группа 108

Аминоадипиновая кислота 11, 23

δ -Аминоадипилцистеинилвалин 232

L-2-Амино-4-(4'-амино-2',5'-циклогексидирил)масляная кислота 21, 22

Аминоацилсвязывающее место 394 и сл.

Аминоацил-тРНК-синтетаза 388, 389

Аминоацильная перегруппировка 164 и сл.

6-Аминогексановая кислота 9, 32

Аминозащитные группы 101 и сл.

α -Амиокарбоновых кислот нитрилы 42

α -Амиокапролактамы 41

L-Амиокапролактамыгидролаза 41

α -Амиокапролактамацетамид 41

ε -Амиокапроновая кислота *см.* 6-Аминогексановая кислота

Аминокислоты 9 и сл.

— абиогенное образование 48, 49

— абсолютная конфигурация 26

— алкилирование 70

— амфотерность 30

— анализ 55 и сл.

— антагонисты 20, 22

— асимметрический синтез 47 и сл.

— ацилирование 71

— биосинтез 49 и сл.

— вкусовые качества 29

— выделение из белковых гидролизатов 38, 39

— групповое разделение 39

— изoeлектрические точки 32

— комплексобразование с металлами 67

— конфигурация 25

— константы диссоциации, pK 31, 32

— кривые титрования 31

- микробиологический синтез 39
- молекулярное вращение 23, 24
- незаменимые 18
- непотеиногенные 20, 232
- номенклатура 10, 11
- получение 38
- — меченых 45 и сл.
- пребиотический синтез 48
- пространственная модель 26
- протеиногенные 17 и сл.
- разделение рацематов 51, 52
- растворимость 30
- рацемизация 51 и сл.
- D-соединения 9, 23
- сокращения 12, 13
- спектры ДОВ 24, 25
- — ИК 35—36
- — КД 24—26
- — УФ 35
- — ЯМР 35 и сл.
- стереохимия 20 и сл.
- стерическая корреляция 27
- температуры разложения 33
- удельное вращение 23, 24
- эфиры 39, 73
- Аминокислоты 95, 96
- Аминолиз эфиров 147 и сл.
- Аминомасляная кислота 9, 11
- L-2-Амино-4-(метилфосфино)масляная кислота 22
- Амиопропионовая кислота 9
- α -Амино-3-хлор-2-изоксалин-5-уксусная кислота 21
- L-Аминоклопропанкарбоновая кислота 20
- Анализ аминокислотной последовательности 65, 367 и сл.
- Аналитические автоматы 56, 59, 60
- Ангиотензин 234, 278 и сл.
- Ангиотензин II 89, 168, 194, 229, 240, 278
- Андерсона—Каллахана тест 175
- Антамид 194, 305, 309, 312
- Антиген—антитело реакция 240, 424
- Апамин 313, 314
- Апоферритин 420
- Аргинин 10, 15, 17, 18, 34, 96, 125
- Аргининдекарбоксилаза 387
- Аспарагин 10, 11, 16, 17, 121, 188
- биосинтез 50
- наличие 16
- расщепление рацемата 53
- Аспарагинил 11
- Аспарагиновая кислота 15, 17, 96, 188, 210
- биосинтез 50
- декарбоксилирование 71
- применение 38
- проекция Ньюмена 29
- семиальдегид 40
- ферментативный синтез 40
- ЯМР-спектры 36, 37
- L-Аспартаза 41
- Аспартаткиназа 387
- Аспартил 11
- Аспартоин 249
- Аспрохацин 316
- Аффинная хроматография 353, 354
- Ацетамидометильная группа 135, 205
- N-Ацетилимидазол 191
- Ацетиллизин 12
- Ацетоацетильная группа 110
- Ацетуровая кислота 43
- N-Ациламиноокислоты 55, 71, 102
- анилиды 54
- фенилгидразиды 54
- Ацилмочевина 153 и сл., 158
- Ацилпереносящий белок 194
- Бассианолид 317
- Бейтса реагент 161
- Бацитрацин 232, 298
- Беауверин 304
- Белки 340 и сл.
- амфолитный характер 356
- анализ аминокислотной последовательности 367 и сл.
- антифризы 429, 430
- бактерий 343
- Бенса—Джонса 426, 427
- биологическая значимость 19
- биосинтез 341, 388 и сл.
- — корректирующий механизм 391
- буферное действие 357
- водорослей 343
- выделение 343, 345 и сл.
- высаливание 358
- гидратация 358
- гидролиз 38, 39
- глобулярные 344, 364
- денатурация 358 и сл.
- изоэлектрические точки 356, 357

- классификация 344 и сл.
- количественное определение 355, 356
- конформация 364
- — скелета 383
- критерии чистоты 354
- листьев 342
- методы фракционирования 346 и сл.
- микробиологический синтез 341, 342
- молекулярные массы 359 и сл.
- незаменимых аминокислот содержание 19
- обнаружения реакции 355
- одноклеточных 341, 342
- определение концевых групп 367 и сл.
- — пространственной структуры 383 и сл.
- плазмы 344, 353
- резервные 340, 344, 412 и сл.
- рентгеноструктурный анализ 383, 384
- структура вторичная и третичная 374 и сл.
- — первичная 364 и сл.
- — четвертичная 363, 386 и сл.
- субъединицы 387
- фибриллярные 345
- Белковый секвенатор 370 и сл.
- Бензгидриловые эфиры *см.* Дифенилметилловые эфиры
- Бензилоксалол-5-метиленоксикарбонильная группа 109
- Бензиловая группа 113, 128, 129, 132, 135, 187, 193
- Бензил-(4-нитрофенил)карбонат 151
- Бензиловые эфиры 117, 118
- Бензилоксикарбониларгинин гидробромид 127
- Бензилоксикарбониласпарагиновая кислота- β -бензиловый эфир 37
- — α -бензиловый- β -*трет*-бутиловый эфир 12
- Бензилоксикарбонил-S-бензилцистеин 4-нитрофениловый эфир 174
- 1-Бензилоксикарбониламино-2,2,2-трифторэтильная группа 129, 132
- Бензилоксикарбонильная группа 100, 102 и сл., 107, 114, 124, 129 и сл., 187, 223
- Бензилсульфонильная группа 110
- О-Бензилтреонин 133
- 1-Бензил-3-этилкарбодиимид 155
- S-Бензилцистеин 12
- Бензоильная группа 99, 112
- Бензотриазолилокситрис-(диметиламино)фосфонийгексафторфосфат 161
- Бергера*—*Шехтера*—*Босхарда* тест 177
- Бетаины 70
- «Бессмысленные» кодоны 392
- «Биг»-гастрин 94, 276, 277
- Биогенные амины 72 и сл.
- 1,2-Бисацилгидразины 140
- Бис-L-гистидината никеля(II) гидрат 68
- Бистлицината меди(II) гидрат 68
- Бис-D,L-пролината меди(II) дигидрат 68
- Биуретовая реакция 355
- 2-[Бифенилил-(4)]пропил-2-оксикарбонильная группа 106, 109
- Бодански* тест 176
- Бомбезин 89, 236, 282 и сл.
- Бомбинин 315
- Бовтрис(трифторацетат) 126, 188, 193
- Брадикинин 94, 190, 194, 281, 284 и сл.
- 5-Бром-7-нитроиндолинильная группа 163
- Бунгаротоксин 221, 226, 316
- трет*-Бутил-5-[4,6-диметилпиримидил-2-тио]карбонат 105
- трет*-Бутил-(4-нитрофенил)карбонат 151
- трет*-Бутиловые эфиры 118, 120
- трет*-Бутилоксикарбонилазид 105
- трет*-Бутилоксикарбонильная группа 104—106, 108, 114, 124, 129, 131, 187, 188
- трет*-Бутилтиольная группа 134, 135
- трет*-Бутильная группа 112, 132, 193
- Бумажная хроматография 57
- Бухерера* синтез 42
- Вазопрессин 89, 91, 93, 94, 204, 222, 229, 238, 247 и сл., 286
- Вазотоцин 249, 250
- Валин 11, 13, 14, 17
- биосинтез 50
- проекция *Ньюмена* 29
- *трет*-бутиламид 64
- Валиномицин 208, 303 и сл., 305
- Валитоцин 249, 250
- Вейганда* тест 176
- Вещество А 297
- Вещество Р 94, 194, 233, 238, 255, 279 и сл., 281, 282, 286, 287
- Вилкинсона* комплексный катализатор 47
- Виниловые эфиры 149
- Вномицин 302

- Вирусные белки 344
Випилин 426
Вторичная структура 363, 364, 374 и сл.
Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) 60, 226
- Габриеля* синтез 42
Газовая хроматография 55, 61
— разделение энантиомеров 62, 63
— получение производных 61
 α -Галогенкарбоновых кислот хлорангидриды 99, 105
Галперн — *Вайнштейна* тест 176
Гастрин 89, 94, 239, 260, 273, 275 и сл., 278, 286
Гель-фильтрация 349, 361, 388
Гель-хроматография 349
— коммерчески доступные гели 350
Гель-электрофорез 351
Гемоглобин 344, 387, 415 и сл.
— первичная структура 417
— пространственная модель 418
— связывание кислорода 416
Гемозидерин 420
Гендерсона — *Хассельбалха* уравнение 32
Генетический код 17, 392
Генная технология 244, 261, 270
Ген-оператор 397
N-Гептафторбутирилпропиловые эфиры аминокислот 61, 62
Гетерополиаминокислоты 209
Гидантоины 44, 73, 74
Гидроксиацильная перегруппировка 206
1-Гидроксибензотриазол 128, 156
Гидроксибензотриазоловые эфиры 150
N-Гидроксиглутарилимидные эфиры 150
2-Гидроксиимино-2-циануксусной кислоты этиловый эфир 156
Гидроксилазы 400
Гидроксилизин 11, 19
N-Гидроксиморфолиновые эфиры 150
Гидроксиметиламинокислоты 32
N-Гидрокси-5-норборнен-2,3-дикарбоксимид 150, 156
— эфир 150
3-Гидрокси-4-оксо-3,4-дигидро-1,2,3-бензотриазин 156
3-Гидрокси-4-оксо-3,4-дигидрохиназолин 157
— эфир 150
N-Гидроксиперидиновые эфиры 147, 149, 173
3-Гидроксипиридазон-6, эфир 150
N-Гидроксипирдин-2,3-карбоксимидные эфиры 150
Гидроксипролин 11, 19, 131, 423, 424
— *алло*-модификация 27
N-Гидроксисукцинимидные эфиры 113, 127, 149, 151
N-Гидроксипуретановые эфиры 150
2-Гидроксифениловые эфиры 150
N-Гидроксифталимидные эфиры 150
2-Гидрокси-3-этиламинокарбонилфениловые эфиры 150
7-Гидрокси-2-этил-(бензо-1,2-оксазол-ий)тетрафторборат 173
2-Гидроксиэтилсульфонилметильный носитель 186
Гидролазы 166, 400
Гидрофобные взаимодействия 383
Гипафорин 70
Гипоталамуса гормоны 89, 252 и сл.
Гиппуровая кислота 43, 98, 99, 141, 166
Гистамин 72
Гистидин 15, 17, 18, 96, 129, 221
Гистоны 345
Глиадин 240
Гликоаминокислоты 75
Гликопротеины 75, 345
Гликозидазы 400
Глицилглицин 92, 99
Глицин 14, 17, 99, 154, 172, 233
— биосинтез 50
— вкусовые качества 29
— кривая титрования 31
— наличие 48, 421
— этиловый эфир 12
Глобулины 353
Глутамитонин 249, 250
Глутамат натрия (моно) 29, 38, 43
Глутамил 11
Глутамин 10, 11, 16, 121, 188, 217
— биосинтез 50
— номенклатура 11
— расщепление 17
Глутаминил 11
Глутаминовая кислота 10, 11, 16, 17, 85, 187, 210
— биосинтез 42
— выделение 39
— применение 41

- микробиологический синтез 41
- кривая титрования 31
- *Штрекера* синтез 43
- Глутаминсинтетаза 387
- Глутатион 86, 87, 100, 231
- Глюкагон 89, 94, 194, 221, 226, 239, 259, 260, 270 и сл.
- Гомополиаминокислоты 209
- Гомосерии 21, 40
- Гомосериндегидрогеназа 40
- Гомоцистеин 21
- Гонадолиберин 156, 229, 253, 254, 257, 260, 288
- Гонадотропин 235
- Гонадотропная рилизинг-гормон см. Гонадолиберин
- Гормон роста 93, 193, 194, 204, 214, 243 и сл., 254, 260, 280
- Гормоны тканей 89
- Грамицидин S 306

- Дансиламинокислоты 29
- Дансильный метод 51, 367
- Дегидроаланин 183, 297
- Дегидрогеназы 400
- Дезаминирование 69
- Дезмозин 19, 421
- Декстрановые гели 349
- Денатурация 358 и сл.
- Депсипептиды 204
- Деструксины 317
- Диабет 249, 252, 260, 262
- Диагональный электрофорез 365, 366
- Диазоуксусный эфир 69
- Диализ 349
- Диаминомасляная кислота 11, 21
- Диаминопимелиновая кислота 23
- Диаминопропионовая кислота 21
- L-транс*-2,3-Дикарбоксиазирин 22
- 4-N,N-Диметиламиноазобензил-4-изотиоцианат 370
- α,α -Диметил-3,5-диметоксибензилоксикарбонильная группа 104
- 5,5-Диметил-3-оксоциклогексен-1-ильная группа 114
- N,N-Диметилтриптамин 72
- 3,5-Диметоксибензилоксикарбонильная группа 104
- 2,4-Динитрофениловые эфиры 132, 149
- 3,4-Диоксифенилаланин см. ДОФА
- Диоксопиперазины 74, 84, 99, 203, 211
- Дипептидиламинопептидаза I 373
- Дипиридил-2-дисульфид 160
- Диск-электрофорез 351
- Дисульфидная связь 87, 88, 204
- — расщепление 364
- Дитиосуциноильная группа 185
- Ди-*трет*-бутилкарбонат 105
- Дифенилметилловые эфиры 119
- Дифенилметильная группа 121, 122, 129, 132, 135, 205
- 4,6-Дифенилтиено[3,4-*d'*][1,3]диоксол-2-он-5,5-диоксид 148
- Дифенилтиофосфонильная группа 115
- 2,4-Дихлорбензилоксикарбонильная группа 107
- 5,7-Дихлор-8-оксихинолин 156
- 1,3-Дициклогексил-2,4-бис-(циклогексимино)1,3-диазетидии 157
- N,N-Диэтилтриптамин 72
- Домены 364
- ДОФА 20, 47
- Дофамин 72

- Желатина 424**

- Защитные группы 96, 100 и сл.
- — амидных функций 115 и сл.
- — аминных функций 101—115
- — временные 96
- — карбоксильных функций 115 и сл.
- — отщепление и стабильность 107—110, 223, 224
- — постоянные 96
- Зизифин 319

- Изоаспарагин 12
- Изоборнилосикарбонильная группа 109
- Изобутириламидометильная группа 135
- 1-Изобутилоксикарбонил-2-изобутилокси-1,2-дигидрохинолин (ИИДХ) 143
- Изодезмозин 19, 421
- алло*-Изолейцин 11, 27, 176
- Изолейцин 14, 17
- микробиологический синтез 40
- эимеризация 52
- Изомеразы 401
- Изомочевина 152
- Изоникотинилосикарбонильная группа 108
- Изонитрозомалонодинитрил 156
- Изопептидная связь 86
- Изотахорез 351

- Изотопного разбавления метод 66
Изотопин 249, 250
5-(О-Изоуреидо)-L-норвалин 22
Изозлектрнческая точка 32, 351
Изозлектрическое фокусирование 351
Изумия тест 176
 α -(2-Имнноксагидро-4-пиримидил)глицин 21
Иминодинитрилы 42
Иминокислоты 15
Иммунный ответ 424 и сл.
Иммуноглобулины 340, 364, 424 и сл.
Иммуноэлектрофорез 352
Ингибиторы ферментов 399
Индуктор 397
Инициации факторы 394
Инсулин 87, 89, 100, 194, 205, 206, 214, 217, 218, 222, 234, 239, 260, 262 и сл., 286, 343
Интергерренин 319
Интергеррессин 319
Интерколяция 398
Интерфероны 340, 430 и сл.
2-Иодтзоксикарбонильная группа 108
Ионообменная хроматография 59 и сл., 352
- Кадаверин 72
Казеин 340
 β -Казоморфин 291
Каллидин 281
Калликреин 281
Канаванин 22
Капреомицин 302
Карбоаналоги 250
Кальцитонин 239, 273 и сл.
Карбоангидраза В 219
Карбодиимидный метод 138, 153 и сл.
N-Карбоксиангидриды 74, 141, 144, 145
 α , γ -Карбоксиглутаминовая кислота 23
Карбоксикомпонент 95, 96
Карбоксипептидазы 169, 368, 372, 380, 410 и сл.
N,N-Карбонилдимидазол 186
Карбзтоксигруппа 100, 102
Кардиотоксины 315
Карнозин 100, 286
Кассинин 236, 282, 283
Катал 399
Каталаза 387
Катализаторы рутенийфосфинные 47
- Катепсин 211
Кемпа тест 142, 176
Кератины 378, 420 и сл.
Кинины плазмы 281
Киоторфин 286, 291
Клеверного листа структура 389 и сл.
Кобротоксин 194, 315
Коламин 72
Колистин 308
Коллагены 357, 422 и сл.
Комплекс фермент — продукт 398
— фермент — субстрат 398
Конденсационные методы 137 и сл.
Конканавалин А 387, 429
Константа катализа 399
Конформационный анализ 30, 384, 385
Конформации стабилизация 381
Кормовые белки 19, 341
Кортикотропин 89, 93, 94, 156, 194, 215, 226, 227, 229, 230, 234, 237, 240 и сл., 245, 246, 260, 273, 286, 287
Кортиколиберин 253, 254
Коттона эффект 24, 29, 385
Креатин 71
Ксантопротеиновая реакция 355
Куриуса перегруппировка 140
- β -Лактоглобулин 357, 387
Лантионин 21, 297
Лаури метод 355
N-Лауроилглутаминовая кислота 71
Льюиса кислоты 158, 174
Лейкокинин 295
Лейцин 14, 17, 51
Лейцинаминопептидаза 177, 368, 373, 387
Лектины 428, 429
Летсзингера синтез 195, 212
Лиазы 400
Либерины 253
Лигазы 401
Лигандообменная хроматография 63
Лизин 15, 17, 18, 19, 86, 96, 103, 187, 210
— биосинтез 50
— кривые титрования 31
— микробиологический синтез 39, 40
— применение 38
— ферментативный синтез 41
Лизоцим 194, 219, 226, 344, 348, 351, 378, 380, 404 и сл.
— активный центр 405 и сл.
— комплекс с ингибитором 407

- механизм действия 408
- первичная структура 405
- Липопротеины 345
- Липотропин 242, 245 и сл., 286, 291
- Литорин 236
- Люлиберин 156, 253, 254
- Лютропин см. Пролактин
- Лютеинизирующий гормон 254, 257, 280
- Лютеотропный гормон см. Пролактин
- Лютропин см. Лютеинизирующий гормон
- Люцифераза 387
- Макропептиды** 84
- Макрофибриллы 421
- Максимальной защиты тактика 221, 222
- Малатдегидрогеназа 387
- Малоновый эфир в синтезе 45 и сл.
- Малформин 313
- Манниха* конденсация 163
- Масс-спектрометрический анализ аминокислот 64, 65
- Мастопаран 315
- Матричная РНК 392 и сл.
- Мезитилен-2-сульфонильная группа 126
- Мезотоцин 249, 250
- Меланолиберин 246, 253, 254, 258
- Меланостатин 246
- Меланотропин см. Меланоцитстимулирующий гормон
- Меланотропина рилизинг-гормон см. Меланолиберин
- Меланоцитстимулирующий гормон 89, 90, 220, 237, 242, 246 и сл., 258, 260, 286
- Мелатонин 72
- Меллитин 313, 314
- Мембранные белки 344
- Меррифилда* синтез 98, 100, 120, 131, 179 и сл., 214, 215
- Металлокомплексы 67, 355
- Металлопротеины 345, 419, 420
- Метеорит мерчинсонский, присутствие аминокислот 48
- N-Метиламиноокислот синтез 47, 70
- 1-Метил-2-бензоилвинильная группа 114
- N-Метилвалин 11
- Метилловые эфиры 104, 117, 118
- Метилсульфонилэтоксикарбонильная группа 108
- 4-Метилсульфонилфениловый эфир 124, 149
- 2-(Метилтио)-этоксикарбонильная группа 115
- Метилтиометильная группа 132
- 4-Метилтиофениловый эфир 124
- α -Метил-2,4,5-триметилбензилоксикарбонильная группа 109
- Метиониллизилбрадикинин 281
- Метионин 10, 15, 17, 18, 19, 46, 104, 106, 188
 - биосинтез 51
 - защита 136, 137
 - применение 38
 - спектры КД 25
 - *Штрекера* синтез 43
- Метод
 - *Аджиномото* 43
 - *Акабори* 368
 - активированных эфиров 146—150, 173, 190, 210, 213, 221, 225
 - ангидридов 132, 141 и сл.
 - — симметричных 143, 144
 - — смешанных 112, 123, 138, 141 и сл., 178, 202, 225
 - *Бредфорда* 356
 - водородно-дейтериевого обмена 385, 386
 - *Вюнша—Вейганда* 155, 178
 - *Гейгера—Кёнига* 156, 178, 217, 269
 - двухфазный 213
 - дициклогексилкарбодимидный (ДЦГК) 113, 114, 130, 153 и сл., 178, 186, 189, 190, 225
 - *Дормана* 190
 - ДЦГК с добавками 138, 155 и сл., 174
 - *Дюпона* 43
 - жидкофазный 195 и сл.
 - изоксазолиевых солей 114, 152
 - N-карбоксиянгидридов 144 и сл., 196, 209
 - квадрольный 371
 - кристаллизации 195, 197
 - *Камбера* 134
 - *Лаури* 355
 - *Митина* 159
 - *Мукаймы* 159, 178
 - тионилхлоридный 117
 - *Уги* 162, 163, 173
 - фосфатный 208

- фосфоразо 158
- *Хиски* 134, 205
- хлорагидридный 99, 105, 115, 133, 208
- 4-Метокснбензильовый эфир 118
- 4-Метокснбензильооксикарбонильная группа 104
- 4-Метокснбензильсульфонильная группа 126
- 4-Метокснбензильная группа 121, 122, 135
- 2-Метоксн-4-нитрофениловый эфир 150
- 4-Метокснфениловый эфир 118
- Механизм индукции — репрессии ферментов 397
- Мнкамнии 302
- Микросом белки 344
- Микрофибриллы 421
- Миллона* реакция 355
- Минимальной защиты тактика 221, 222
- Минифаллотоксин 311
- Миоглобин 218, 219, 357, 412 и сл.
- пространственная структура 413
- связывание кислорода 414, 415
- электронных плотностей распределение 414
- Миозин 340
- Михаэлиса — Ментон* уравнение 398, 399
- Модель «site-by-site» 392
- Молочная кислота 28
- — молекулярное вращение различных производных 28
- Монамиции 308, 309
- Мотилин 93, 274, 278
- Мышечные белки 344

- Нагароза** 167
- Налоксон** 294
- Натрия додецилсульфат** 359, 362
- Нейропептиды** 89, 90, 233, 285 и сл.
- Нейротезин** 255, 280, 286
- Нейротоксины** 315, 316
- Нейротрансмиттеры** 72, 89, 90, 233, 247, 260, 280, 286, 287, 294
- Нейтральными солями осаждение** 346
- Нейрофизины** 248, 286
- Неокарциностаин** 297
- α -Неоэндофин** 293
- Нервный ростовой фактор** 387
- Низин** 297

- Ниигидриная реакция** 56, 190
- 3-Нитро-4-аминометилбензоиламидный носитель** 185
- Нитроаргинин** 104, 126
- 4-Нитробензильовые эфиры** 118, 119, 193
- Нитробензильооксикарбонильная группа** 104, 127
- 4-Нитробензильсульфгидроксамовая кислота** 156
- 6-Нитровератрилоксикарбонильная группа** 104, 107
- Нитрогеназы** 420
- 2-Нитро-4-сульфофениловый эфир** 149
- 2-Нитрофениловые эфиры** 149
- 4-Нитрофениловые эфиры** 114, 127, 149, 151
- 2-Нитрофенилнитрогруппа** 110, 111, 120, 130, 131, 205
- 2-Нитрофеноксиацетильная группа** 110
- 3-Нитрофталевоы кислоты ангидрид** 191
- Норвалин** 11
- Норлейцин** 11
- Нуклеоамнокислоты** 75
- Нуклеопротенины** 345

- Овальбумин** 340
- 1,3-Оксасолидиндионы см. N-Карбоксн ангидриды**
- Оксигемоглобин** 418
- Оксидазы** 400
- D-аминокислот 18
- Оксидоредуктазы** 400
- Окснтоции** 89, 94, 100, 194, 204, 216, 222, 226, 229, 247 и сл.
- Олигомеризация цианидов** 48
- Оперио** 397
- Опнатиые пептиды** 90, 289 и сл.
- Опнатиые рецепторы** 230, 289, 294
- Определенне аминокислот по Ван Слайку** 68
- Опнтического вращення дисперсия** 24, 25, 385
- Оринтин** 23, 85, 101

- Паидамин** 318
- Папайн** 167, 168, 365
- Паратиреоидный гормон** 89, 94, 194, 235, 271 и сл.
- Пассерини реакция** 163, 207

- Паули реакция 355
 Пелликулярная смола 181
 Пельветин 232
 Пенициллин 298
 Пентагастрин 229, 276
 Пентаметилбензиловый эфир 118
 Пентафторфениловые эфиры 149, 152
 Пентафторфенилизотиоцианат 370
 Пентахлорфениловые эфиры 149, 152
 Пепсин 54, 167, 169, 178, 211, 260, 357, 365
 Пептидазы 400
 Пептидильсвязывающее место 394 и сл.
 Пептидилтрансфераза 166, 395
 Пептидная связь 83, 84, 85
 Пептиды 83 и сл.
 — циклические 204 и сл.
 — гетеромерные 87
 — гомодетные 87
 — циклические 83, 90, 201 и сл.
 Пептидный пул 89
 Пептидный синтез 92 и сл.
 — — быстрый 214
 — — в водной среде 196
 — — жидкофазный 195 и сл.
 — — на полимерном носителе 98, 178 и сл.
 — — с полимерными реагентами 199 и сл.
 — — стратегия 98, 211 и сл.
 — — тактика 98, 220 и сл.
 — — ферментативный 166 и сл.
 — — чередующийся твердофазно-жидко-
 фазный 197, 215
 — — «in situ» 213
 Пептидные алкалоиды 318 и сл.
 Пептидные антибиотики 90, 206, 298
 Пептидные гормоны 90, 232 и сл., 236
 Пептидные инсектициды 316 и сл.
 Пептидные лактоны 90, 206
 Пептидные токсины 309 и сл.
 Пептидный синтезатор 191, 192
 Пептоиды 89
 Пептолиды 89, 201, 207
 Первичная структура 86, 358, 363 и сл.
 Переаминирование 69
 Пивалиновая кислота 142
 Пипекотиновая кислота 22
 Пиперидинкарбонильная группа 129
 Пиперидинооксикарбонильная группа 109
 β -Пиразолаланин 20, 21
 Пиридилдифенилметильная группа 129, 135
 Пиридил-4-метилловые эфиры 118
 Пиридил-2-тиоэфир 150
 Пироглутамилпептиды 121, 231, 232
 Пирролинон 29
 Плазмин 428
 Плазминоген 428
 Пластинная реакция 166, 211
 Полиакриламидный электрофорез 351, 361, 362, 388
 Полиаминокислоты 209 и сл.
 Полигексаметиленкарбодиймид 155
 Полиглутаминовая кислота 210, 378
 Полиизотиоцианат 372
 Полилизин 209, 378
 Полимерный носитель нерастворимый 179 и сл.
 — — растворимый 195 и сл., 200
 Полимиксины 21, 307, 308
 Поли[1-оксибензотриазол]стирол 200
 Полипептиды 84
 Полистескинин 285, 314
 Полиэтилениминовый носитель 196
 Поли(1-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохиолин) 200
 Пребиотические конденсирующие реагенты 49
 Пребиотический синтез аминокислот 48
 Прегемоглобин 416
 Препробелки 397
 Препроинсулин 265
 Препролактин 245
 Препромеллитин 313
 Препропаратиреоидный гормон 273
 Пристинамицин I 302
 Проинсулин 226, 263 и сл.
 Проктолин 288
 Пролактин 235, 245, 257, 260
 Пролактина ингибирующий выделение гормон 245, 253, 254, 258
 Пролактолиберин 245, 253, 254, 258
 Проламины 344
 Пролизин 167
 Пролит-тРНК-синтетаза 22
 Пролин 11, 13, 15, 22, 154, 172, 217
 — биосинтез 50
 — прерывание спирали 379
 Промеллитин 313, 314
 Проопиомеланокортин 242, 246
 Пропаноламин 72

- Протеиды 345
 Протеиногенные аминокислоты 17
 Протофибриллы 421
 Псилоцин 72
 Пул аминокислот 10
 Пуромипин 398
 Путресцин 72

Радиоиммунное определение 230, 236, 240
Рамачандрана диаграмма 377
 Ранатензин 89, 236
 Распределение по *Крейгу* 347
 Растворителями осаждение 346, 347
 Расщепление N-бромсукцинимидом 366
 — бромцианом 90, 219, 261, 366
 Рацемизация аминокислот 51
 — в пептидном синтезе 169 и сл.
 — методы определения 175 и сл., 216
 Резилин 420
 Релвксин 239
 Ренатурация 358
 Ренин 279
 Репрессор 397
 Репепторные белки 340, 344
 РИА см. Радиоиммунное определение
 Рибонуклеазы 87, 100, 146, 193, **194, 204**, 214, 218, 344, 357, 401 и сл.
 Рибосомы 341, 393 и сл.
 Рилизинг-факторы 230
 Рифамицин 398
 Родвниновый синтез 44
 РНК-полимеразы подавление 398
 тРНК-третичная структура 391
Руггли—Циглера принцип разбавления 201

Сакагучи реакция 355
 Саркозин 21, 48, 84
Сведберга единица 360, 361
 Секретин 89, 94, 213, 226, 270, 274, 277
 Селенофениловый эфир 149
 Семисиитез 169, 218 и сл.
 Серин 10, 14, 17, 90, 104, 132, 133, 141, 187, 221
 — биосинтез 50
 — в фиброине шелка 421
 — стерическая корреляция 27
 — применение 38
 — проекции *Ньюмена* 29
 Серицин 422
 Серотонин 72

 Серратомолид 208, 304
 Сефалекс 349, 350, 352, 361
 Сефвроза 350
 Сиалоген 279
 Сигнальная гипотеза 265, 313, 396, 397
 «Сигнальные» пептиды 265, 313, 396
 Сиднонимины 68, 69
 Сидноны 68, 69
 Синтез через гидантоины 44
 Синтетазы 401
 Скотофобин 93, 288
 Скuttiамин 319
 Сладкие пептиды 90, 276
 Сомволтнберин 244, 253, 254
 Соматомедины 244
 Соматостатин 194, 204, 253, 256 и сл., 288
 Соматостатин-28 259
 Соматотропина рилизинг-гормон см. Соматолиберин
 Соматотропный гормон см. Гормон роста
 Спираль — клубок переход 381
 Спиральные структуры 378 и сл., 383, 385
 Спонтанная кристаллизация 52, 53
 Споридезмолиды 304
 Стабилизирующие спираль аминокислоты 378
 Статины 253
 Ствфилококковая нуклеаза 194, 218, 219
 Стафиломицин S 302
 Стахидрин 70
 N-Стеарилглутаминовая кислота 71
 Стекло как носитель в аффинной хроматографии 354
 Стоп-кодоны 392, 395
 Стрептограмин В 301
 Стрептокиназа 428
 Стрептомицин 398
 Структурные белки 344
 Субтилизин 167, 365, 403
 Субтилин 297
 Сузукациллин А 305
 S-Сульфогруппа 137
 Суперспираль 424
 Сферон 354

 Табачий мозаики вирус 387
 Таурин 233, 286
 Твфдин 295

- Тахикинины 282 и сл.
Тациназа N 167
Тентоксин 90
Терминаторные белки 395
Термическая конденсация 48, 49
Термолизин 167, 365
Тетрагидропиранильная группа 132, 133
1,3-Тиазолидин-2,5-дион см. N-Тиокарбоновой кислоты ангидрид
Тимозин α_1 295, 296
Тимопоэтин II 295
Тиогидантоиновый синтез 44
Тиогидантоины 74
N-Тиокарбоновой кислоты ангидрид 146, 213, 221
Тиоредоксин 218
Тиофениловые эфиры 114, 147, 149
Тирамин 72
Тиреолиберин 229, 253, 254 и сл., 260, 288
Тиреотропин 257, 280
Тирозин 10, 13, 16, 17
— выделение 38
— биосинтез 50
— УФ-спектр 35
Тирозил-тРНК-синаптаза 389
Тирозина бензиловый эфир 133
— *трет*-бутиловый эфир 133
Тироксин 20
Тироцидин 298, 307
Титрования кривые 31, 32, 356
Тозиламинокарбонильная группа 115
Тозильная группа см. 4-Толуолсульфонильная группа
4-Толилметилсульфонильная группа 110
2-(4-Толилсульфонил)этоксикарбонильная группа 108
2-(Толуол-4-сульфонил)этиловый эфир 118
4-Толуолсульфонильная группа 100, 103, 111 и сл., 126, 129
Тонкослойная хроматография 58 и сл.
Тонкослойный электрофорез 58
Трансаминирование см. Переаминирование
Транскрипция 393
Транслокация 395
Транспортная РНК 389 и сл.
Транспортные белки 344, 412 и сл.
Трансферазы 400
Трансферрин 240
Треонин 11, 15, 17, 89, 96, 104, 111, 132, 133, 141, 187
— биосинтез 51
— масс-спектры 65
— применение 38
Третичная структура 363, 381 и сл.
2,4,6-Триметилбензиловый эфир 118
Триметилсилиловый эфир 119
Триметилсилильная группа 132
2,4,6-Тринитробензолсульфокислотой окрашивание 57
Триостин А 301
Трипсин 168, 211, 219, 244, 365
Трипсина ингибитор 194, 214, 220
Триптамин 72
Триптофан 10, 11, 16, 17, 18, 19, 33, 104, 111, 131
— защита 130
— применение 38
— УФ-спектр 35
Тритиевая метка 46
Трифенилметильная (трительная) группа 103, 113, 120, 124, 129, 135, 205
Трифторацетилглицин 12
N-Трифторацетил-L-лепептида эфир 64
Трифторацетильная группа 110, 112, 171
2,2,2-Трихлор-*трет*-бутилоксикарбонильная группа 108
2,4,5-Трихлорфениловые эфиры 149, 152
Тромбин 340, 427
Тропоколлаген 423
Туберактиномицин 302
Туберин 340
Ультрафильтрация 347, 349
Ультрафиолетовая дифференциальная спектроскопия 385
Ультратрифуга 343, 360, 361, 388
Уперолеин 282, 283
Уреаза 343, 357
Урогастрон 275
Урокиназа 428
Фаллацидин 309, 310
Фаллицин 309, 310
Фаллоидин 309, 310
Фаллоин 309, 310
Фаллотоксины 309 и сл.
Фенациловые эфиры 118
Фенацильная группа 130

- 4-Фенилазобензилоксикарбонильная группа 104, 108
 (4-Фенилазофенил)изопропилоксикарбонильная группа 109
 Фенилазофенилловый эфир 149
 Фенилаланин 16, 17, 46, 51
 Фениловые эфиры 119
 Фенилтиогидантоины 76, 369
 Ферментативные электроды 67
 Ферменты 344, 398 и сл.
 — аллостерические 399
 — иммобилизованные 54, 55, 169, 401
 — классификация 400, 401
 Фиброин шелка 14, 380, 421
 Физалемин 89, 94, 236, 282, 283
 Филлокинин 285
 Филломедузин 236, 282, 283
 Филлоцерулеин 236, 284
 Фитогемагглютинины 428
 Фосфатидиламинокислоты 74, 75
 Фосфолипаза A2' 219
 Фосфонийэтоксикарбонильная группа 115
 Фосфонопептиды 298
 Фосфопротены 345
 Фосфорлазид 161
 Фосфориламиннокислоты 74
 Фосфофруктокиназа 387
 Фрагментная конденсация 216, 217, 225
 Фракционирование по Коу 347, 348
 Франгулаин 319, 320
 Фталильная группа 104, 112
 Фталнимидометилловый эфир 119
 ФТГ-аминокислоты 369
- Хенопсин 280
 Херциин 70
 Химостатны 21
 Химотрипсин 168, 169, 211, 364, 365, 381, 408 и сл.
 Химотрипсиноген 357
 8-Хинолиловые эфиры 149, 173
 Хиноксалин 301
 Хиномидин 301
 Хиразил-Val 64
 Хламидоцин 90
 Хлорамфеникол 398
 Хлорацетамидометильная группа 135
 N-Хлорацетиламиннокислоты 54, 71
 Хлорацетильная группа 100, 102, 110
 Хлорбензилоксикарбонильная группа 104
 Хлорметильная группа 183, 186
 N-(5-Хлорсалицилал)-группа 114
 Хлоругольной кислоты алкиловые эфиры 141, 142
 5-Хлор-8-хинолиновые эфиры 149
 Холецитокининпанкреозимин 89, 94, 260, 274, 277, 284
 Хопкинс-Коле реакция 355
 Хорнонадотропин человека
 Хориосоматомаммотропин человека 243
 Хроматография высокого давления 60
 Хромодиопсин 289
 Хромопротеины 345
- Центрионная структура 20, 30, 356
 Центрифужный реактор 192
 Центрифугирование, использование процесса 349, 360, 361
 Церуленин 89, 236, 284
 Церулоплазмин 420
 4-Цианбензилоксикарбонильная группа 104
 2-Циан-трет-бутилоксикарбонильная группа 108
 Цианметилловые эфиры 149
 Цибернины 253
 1-Циклогексил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимидметилиодид 155
 Циклодимеризация 203
 Циклопентилоксикарбонильная группа 109
 D-Циклосерин 22
 Циклотрипролил 84, 203
 Циркулины 308
 Циркулярный диоксизм 24—26, 385
 Цистеин 10, 15, 17, 38, 87, 221
 — биосинтез 50
 — защита 134 и сл.
 — применение 38
 Цистин 10, 27, 38, 214, 218, 219
 — мезоформа 27
 Цитохром c 190, 194, 357
 Цитруллин 23
- Частичный гидролиз 365
 Четырехкомпонентная конденсация 162—163, 173

- Шерсти волокно 421
Штрекера синтез 42 и сл., 47
- Щеточная смола 181
- Эленн А 301
 Эдмана деградация 369
 — секвенатор 343
 Эйзенн 232
 Эластаза 365
 Эластин 421
 Эледонин 89, 94, 236, 282, 283
 Электроды с оксидазой аминокислот 67
 Электрофорез 34, 350, 351
 — без носителя 351
 — с додецилсульфатом натрия 362
 Элонгации процесс 394
 Эндорфины 231, 243, 248, 286, 289 и сл.
 Энкефалины 168, 230, 243, 246, 289 и сл.
- Эннатин 304
 Энтеротоксин 387
 Эргозин 318
 Эрнтрокруорин 419
 Эстеразы 400
 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимидгидрохлорид 155
 Этилкарбамоильная группа 135
 N-Этил-N-метилглицин 12
 Этнловые эфиры 104, 117, 118
 N-Этил-5-фенилизоксазолнй-3-сульфонат (*Вудворда* реагент К) 152
 Этионин 21
 N-Этоксикарбонилфталимид 112
 1-Этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолин (ЭЭДХ) 143
- Ювенильных гормонов аналоги 317
- Янга тест 175

Содержание

	Предисловие редактора перевода	5
	Предисловие к третьему изданию	7
1.	Аминокислоты	9
1.1.	Номенклатура аминокислот	10
1.2.	Природные аминокислоты	13
1.2.1.	Протеиногенные аминокислоты	17
1.2.2.	Непротеиногенные аминокислоты	20
1.3.	Стереохимия аминокислот	23
1.3.1.	Оптическая активность аминокислот	23
1.3.2.	Конфигурация и конформация аминокислот	26
1.4.	Физико-химические свойства аминокислот	30
1.4.1.	Растворимость	30
1.4.2.	Кислотно-основные свойства	30
1.4.3.	Спектры поглощения аминокислот	35
1.5.	Получение аминокислот	38
1.5.1.	Выделение из белковых гидролизатов	38
1.5.2.	Микробиологические методы	39
1.5.3.	Ферментативные методы	41
1.5.4.	Методы химического синтеза	41
1.5.4.1.	Аминолиз галогенкарбоновых кислот	42
1.5.4.2.	Синтез Штрекера	42
1.5.4.3.	Азлактонный синтез по Эрлейнмейеру — Плехлю	43
1.5.4.4.	Гидантоиновый синтез	44
1.5.4.5.	Алкилирование шифовых оснований	44
1.5.4.6.	Синтезы с малоновым эфиром	45
1.5.4.7.	Синтез меченых аминокислот	45
1.5.4.8.	Асимметрические синтезы	47
1.5.4.9.	Пребиотические синтезы	48
1.5.4.10.	Биосинтез аминокислот	49
1.6.	Разделение рацематов аминокислот	51
1.6.1.	Методы кристаллизации	52
1.6.2.	Химические методы	53
1.6.3.	Ферментативные методы	53
1.7.	Анализ аминокислот	55
1.7.1.	Хроматографические методы	55
1.7.1.1.	Бумажная хроматография	57
1.7.1.2.	Тонкослойная хроматография	58
1.7.1.3.	Ионообменная хроматография	59
1.7.1.4.	Газовая хроматография	61
1.7.1.5.	Хроматографическое разделение энантиомеров	62
1.7.2.	Масс-спектрометрический анализ аминокислот	64

1.7.3.	Методы анализа с использованием изотопов	66
1.7.4.	Ферментативные методы	67
1.8.	Специфические реакции аминокислот	67
1.8.1.	Образование комплексов с металлами	67
1.8.2.	Реакции с азотистой кислотой	68
1.8.3.	Окислительное дезаминирование	69
1.8.4.	Переаминирование	69
1.8.5.	N-Алкилирование	70
1.8.6.	N-Ацилирование	71
1.8.7.	Декарбоксилирование	71
1.8.8.	Этерификация	73
1.9.	Циклические производные аминокислот	73
1.10.	Фосфорил- и фосфатидиламинокислоты	74
1.11.	Гликоаминокислоты	75
1.12.	Нуклеоаминокислоты	75
	Литература	76
2.	Пептиды	83
2.1.	Общие свойства пептидов	83
2.1.1.	Что такое пептиды? Их строение	83
2.1.2.	Классификация и номенклатура	84
2.1.3.	Нахождение пептидов в природе и их значение	89
2.2.	Пептидный синтез	92
2.2.1.	Основные положения	92
2.2.2.	Основной принцип пептидного синтеза	95
2.2.3.	История развития пептидного синтеза	98
2.2.4.	Защитные группы	100
2.2.4.1.	Защитные группы для аминной функции	101
2.2.4.1.1.	Защитные группы ацильного типа	102
2.2.4.2.	Защитные группы для карбоксильных и амидных функций	115
2.2.4.2.1.	Истинные карбоксизащитные группы	116
2.2.4.2.2.	Тактические карбоксизащитные группы	122
2.2.4.3.	ω -Защитные группы трифункциональных аминокислот	125
2.2.4.3.1.	Защита гуанидиновой функции аргинина	125
2.2.4.3.2.	Защита имидазольной функции гистидина	128
2.2.4.3.3.	Защита индольной функции триптофана	130
2.2.4.3.4.	Защита алифатической гидроксильной функции	131
2.2.4.3.5.	Защита ароматической гидроксильной функции	133
2.2.4.3.6.	Защита тиольной функции цистеина	134
2.2.4.3.7.	Защита тиозфирной функций метионина	136
2.2.5.	Методы образования пептидной связи	137
2.2.5.1.	Азидный метод	138
2.2.5.2.	Ангидридный метод	141
2.2.5.2.1.	Метод смешанных ангидридов	141
2.2.5.2.2.	Метод симметричных ангидридов	143
2.2.5.2.3.	N-Карбоксиангидриды (НКА)	144
2.2.5.3.	Метод активированных эфиров	146
2.2.5.4.	Карбодимидный метод	153
2.2.5.4.1.	Применение дициклогексилкарбодимида	154
2.2.5.4.2.	Применение модифицированных карбодимидов	154
2.2.5.4.3.	Применение карбодимидов с добавками	155
2.2.5.5.	Пептидные синтезы с применением соединений фосфора	158
2.2.5.5.1.	Метод Митина	159
2.2.5.5.2.	Метод Мукаеяма	159
2.2.5.5.3.	Применение других производных фосфора	160

2.2.5.6.	Методы конденсации, представляющие теоретический интерес ..	162
2.2.5.7.	Ферментативный синтез пептидов	166
2.2.6.	Проблемы рацемизации при пептидных синтезах	169
2.2.6.1.	Механизмы рацемизации	170
2.2.6.1.1.	Азлактонный механизм	170
2.2.6.1.2.	Рацемизация при прямом α -депротонировании	174
2.2.6.2.	Определение степеней рацемизации	175
2.2.7.	Пептидные синтезы на полимерных носителях	178
2.2.7.1.	Синтез пептидов на твердой фазе (синтез Меррифилда)	179
2.2.7.2.	Жидкофазные методы	195
2.2.7.3.	Чередующийся твердофазно-жидкофазный пептидный синтез	197
2.2.7.4.	Пептидный синтез с применением полимерных реагентов	199
2.2.8.	Синтез циклических пептидов	201
2.2.8.1.	Синтез гомодетных циклических пептидов	201
2.2.8.2.	Синтез гетеродетных циклических пептидов	204
2.2.9.	Синтез полиаминокислот и регулярных полипептидов	208
2.2.9.1.	Синтезы гомо- и гетерополиаминокислот	209
2.2.9.2.	Синтез регулярных полипептидов	210
2.2.10.	Стратегия и тактика пептидного синтеза	211
2.2.10.1.	Стратегия пептидного синтеза	211
2.2.10.1.1.	Ступенчатое наращивание пептидной цепи.	212
2.2.10.1.2.	Стратегия фрагментной конденсации	216
2.2.10.1.3.	Семисинтез	218
2.2.10.2.	Тактика пептидного синтеза	220
2.2.10.2.1.	Выбор комбинации защитных групп	220
2.2.10.2.2.	Метод конденсации	225
2.2.10.3.	Возможности и ограничения пептидного синтеза	226
2.3.	Биологически активные пептиды	230
2.3.1.	Пептидные и белковые гормоны	232
2.3.1.1.	Кортикотропин	240
2.3.1.2.	Соматотропный гормон	243
2.3.1.3.	Пролактин	245
2.3.1.4.	Липотропин	245
2.3.1.5.	Меланоцитстимулирующий гормон	246
2.3.1.6.	Окситоцин и вазопрессин	247
2.3.1.7.	Гормоны гипоталамуса	252
2.3.1.7.1.	Тиреолиберин	255
2.3.1.7.2.	Гонадолиберин (рилизинг-фактор гонадотропина)	257
2.3.1.7.3.	Кортиколиберин	257
2.3.1.7.4.	Пролактолиберин и пролактостатин (рилизинг-фактор пролактин и гормон, ингибирующий выделение пролактина)	258
2.3.1.7.5.	Меланолиберин и меланостатин (рилизинг-фактор меланотропина и гормон, ингибирующий выделение меланотропина)	258
2.3.1.7.6.	Соматотлиберин (рилизинг-фактор соматотропина)	259
2.3.1.7.7.	Соматостатин (гормон, ингибирующий выделение соматотропина)	259
2.3.1.8.	Инсулин	262
2.3.1.9.	Глюкагон	270
2.3.1.10.	Паратиреоидный гормон	271
2.3.1.11.	Кальцитонин	273
2.3.1.12.	Гормоны желудочно-кишечного тракта	274
2.3.1.12.1.	Гастрин	275
2.3.1.12.2.	Секретин	277
2.3.1.12.3.	Холецистокининпанкреозимин	277
2.3.1.12.4.	Мотилин	278
2.3.1.13.	Ангiotензин	278
2.3.1.14.	Вещество Р	279

2.3.1.15.	Нейротензин	280
2.3.1.16.	Кинины плазмы крови	281
2.3.2.	Пептиды животного происхождения с гормоноподобными активностями	281
2.3.2.1.	Тахикинины	282
2.3.2.2.	Группа бомбезина	283
2.3.2.3.	Группа церулена	284
2.3.2.4.	Брадикинины амфибий	284
2.3.3.	Нейропептиды	285
2.3.3.1.	Пептиды, осуществляющие «перенос памяти»	288
2.3.3.2.	Эндорфины	289
2.3.4.	Пептиды с иммунологическим действием	295
2.3.5.	Пептидные антибиотики	296
2.3.5.1.	Пептидные антибиотики, подавляющие биосинтез клеточных стенок бактерий	298
2.3.5.2.	Пептидные антибиотики, подавляющие синтез и функционирование нуклеиновых кислот	299
2.3.5.3.	Мембраноактивные антибиотики	302
2.3.6.	Пептидные токсины	309
2.3.7.	Пептидные инсектициды	316
2.3.8.	Пептидные алкалоиды	318
	Литература	320
3.	Белки	340
3.1.	Значение. Исторический аспект	340
3.2.	Классификация белков	344
3.3.	Выделение и очистка	345
3.4.	Обнаружение и количественное определение	355
3.5.	Физико-химические свойства	356
3.5.1.	Цвиттер-ионная природа белковой молекулы	356
3.5.2.	Растворимость	357
3.5.3.	Денатурация	358
3.5.4.	Молекулярная масса	359
3.5.5.	Форма молекул	362
3.6.	Принципы структурной организации белковых молекул	363
3.6.1.	Первичная структура	364
3.6.1.1.	Селективное расщепление полипептидных цепей	365
3.6.1.2.	Установление аминокислотной последовательности	367
3.6.1.2.1.	Определение концевых аминокислот	367
3.6.1.2.2.	Ступенчатая деградация полипептидной цепи	369
3.6.2.	Вторичная и третичная структуры	374
3.6.2.1.	Пространственное расположение полипептидной цепи	375
3.6.2.1.1.	Спиральные структуры	378
3.6.2.1.2.	Структура складчатого листа	379
3.6.2.1.3.	Неупорядоченные конформации полипептидной цепи	381
3.6.2.1.4.	Третичная структура глобулярных белков	381
3.6.2.2.	Методы установления пространственной структуры белков	383
3.6.3.	Четвертичная структура	386
3.7.	Биосинтез белков	388
3.7.1.	Активация аминокислот и их связывание с тРНК	388
3.7.2.	Образование полипептидной цепи на рибосоме	391
3.7.3.	Отделение полипептидной цепи от рибосомы	395
3.7.4.	Регуляция биосинтеза белка	397

3.8.	Избранные примеры функциональных белков	398
3.8.1.	Ферменты	398
3.8.1.1.	Рибонуклеаза	401
3.8.1.2.	Лизоцим	404
3.8.1.3.	Химотрипсин	408
3.8.1.4.	Карбоксипептидаза А	410
3.8.2.	Транспортные и резервные белки	412
3.8.2.1.	Миоглобин	412
3.8.2.2.	Гемоглобин	415
3.8.2.3.	Металлопротеины	419
3.8.3.	Структурные белки	420
3.8.3.1.	Кератины	421
3.8.3.2.	Коллагены	422
3.8.4.	Белки с защитными функциями	424
3.8.4.1.	Имуноглобулины	424
3.8.4.2.	Фибриноген — фибрин	427
3.8.4.3.	Лектины	428
3.8.4.4.	Белки, препятствующие замерзанию	429
3.8.4.5.	Интерфероны	430
	Литература	432
	Предметный указатель	438

УВАЖАЕМЫЙ ЧИТАТЕЛЬ!

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу: 129820, Москва, И-110, ГСП, 1-й Рижский пер., д. 2, издательство «Мир».

Ханс-Дитер Якубке, Ханс Ешкайт

Аминокислоты, пептиды, белки

Научный редактор Т. И. Почкаева

Мл. научный редактор И. А. Колчин

Художник И. И. Каледин

Художественный редактор М. Н. Кузьмина

Технические редакторы: Н. Б. Панфилова и Л. С. Тимофеева

Корректор Н. В. Башкирева

ИБ № 3937

Подписано к печати 28.03.85. Формат 60×90^{1/16}. Бумага офсетная № 2.

Гарнитура таймс. Печать офсетная.

Объем 14,25 бум. л. Усл. печ. л. 28,50. Усл. кр.-отт. 28,50.

Уч.-изд. л. 33,73. Изд. № 3/2904. Тираж 2700 экз.

Зак 334 Цена 5 р. 40 к.

Набрано в издательстве «Мир»

на фотонаборном комплексе «Компьюграфик»

129820, ГСП Москва, 1-й Рижский пер., 2.

Тульская типография Союзполиграфпрома

при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли.

300600, Тула, проспект им. В. И. Ленина, 109.

54
Якубке
Х.-Д. Якубке
Х. Ешкайт

Аминокислоты

Пептиды

Белки
