

УДК 547.466.1

УСПЕХИ В ОБЛАСТИ СИНТЕЗА ПОЛИПЕПТИДОВ

*B. V. Коршак, С. В. Рогожин, В. А. Даванков, Ю. А. Давидович,
Т. А. Макарова*

ОГЛАВЛЕНИЕ

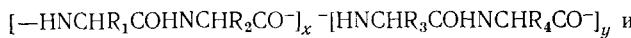
I. Введение	777
II. Синтез полипептидов из α -аминокислот, пептидов и пиперазиндионов-2,5	778
1. Термическая поликонденсация α -аминокислот и пептидов	778
2. Получение полипептидов с использованием конденсирующих средств	788
3. Полимеризация пиперазиндионов-2,5	789
III. Синтез полипептидов из производных α -аминокислот с модифицированной амино- или карбоксильной группами	789
1. Поликонденсация амидов и нитрилов α -аминокислот	790
2. Поликонденсация эфиров α -аминокислот	792
3. Поликонденсация N-карботиофеилипроизводных α -аминокислот и олигопептидов	796
IV. Синтез полипептидов полимеризацией N-карбоксигидридов α -аминокислот	804
1. Получение N-карбоксигидридов α -аминокислот	804
2. Химические свойства N-карбоксигидридов α -аминокислот	808
3. Полимеризация N-карбоксигидридов α -аминокислот	811
4. Сополимеризация N-карбоксигидридов α -аминокислот	835
5. Получение привитых и блок-сополимеров	840

I. Введение

Среди полiamидов имеется большая группа полимеров, резко отличающихся от них по своим свойствам и методам получения. Эта группа полимеров, получившая название полипептидов или поли- α -аминокислот, особенно близка по своему составу и строению к одному из наиболее важных классов полимерных веществ — белкам.

В отличие от белков, где наблюдается строго определенное чередование аминокислот, синтетические полипептиды обычно содержат одну аминокислоту или несколько аминокислот с беспорядочным расположением их вдоль цепи макромолекулы.

Поликонденсацией различных производных низкомолекулярных пептидов оказалось возможным получать блок-полипептиды с беспорядочным распределением блоков, но известным чередованием аминокислот внутри каждого блока, а также полипептиды с известным чередованием, но состоящие из небольшого числа аминокислот



Начиная с работ Фишера¹, Бергмана², Лейкса³, исследования по синтезу и изучению свойств пептидов и полипептидов ведутся широким фронтом.

Результаты исследований, опубликованные до 1957 г., подробно описаны ранее^{4, 5}.

Дальнейшее увеличение числа публикуемых работ, в том числе обзоров, посвященных отдельным вопросам химии полипептидов^{6–13}, указывает на все возрастающее значение синтетических полипептидов.

Одной из главных целей химии белков в последнем десятилетии было выяснение соответствия между биологическими функциями и химической структурой белков¹⁴. Синтез полипептидов — модельных соединений — является одним из возможных путей выяснения роли различных аминокислот, их последовательности и стерической конфигурации, в определении биологических свойств.

Синтетические полипептиды представляют большой интерес и для химии полимеров, так как методы их получения позволяют в настоящее время синтезировать полимеры с различным аминокислотным составом и строением, с молекулярным весом от нескольких сотен до миллиона и выше, а также моделировать природные пептиды, изменять их состав, структуру и свойства. Это позволяет получать полимеры, свойства которых меняются в очень широких пределах, и тем самым решать важные вопросы химии высокомолекулярных соединений.

Ввиду обилия материала мы были вынуждены ограничиться изложением основных результатов опубликованных в 1957—1963 гг. работ по синтезу полипептидов, исключив такие важные разделы, как химические превращения и конформационный анализ полипептидов, а также методы изучения их строения. Кроме того, в обзоре не затронута важная, имеющая самостоятельное значение, область ступенчатого синтеза пептидов и их применение. В обзоре подробно обсуждаются синтетические методы, получившие наибольшее развитие за последние шесть лет.

II. СИНТЕЗ ПОЛИПЕПТИДОВ ИЗ α -АМИНОКИСЛОТ, ПЕПТИДОВ И ПИПЕРАЗИНДИОНОВ-2,5

1. Термическая поликонденсация α -аминокислот и пептидов

Обычный метод поликонденсации аминокислот, содержащих аминогруппу, удаленную от карбоксильной группы $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$; ($n \geq 5$), как оказалось, не может быть успешно применен к аминокислотам и пептидам. При повышенных температурах аминокислоты и пептиды претерпевают различные побочные превращения (декарбоксилирование, дезаминирование, циклодегидрирование и т. д.), приводящие к образованию низкомолекулярных продуктов. Кроме того, близость амино- и карбоксильных групп в α -аминокислотах благоприятствует образованию при повышенных температурах пиперазиндионов-2,5 — димерных циклических производных, отличающихся высокой стабильностью¹⁵. Пиперазиндионы-2,5 образуются также в результате деструкции полипептидов^{16, 17, 18} при продолжительном воздействии высоких температур. Все эти обстоятельства чрезвычайно затрудняют получение линейных полипептидов непосредственно из α -аминокислот. Однако стремление максимально упростить синтез полипептидов продолжает и по сей день привлекать внимание многих исследователей.

Среди различных исследованных аминокислот глицин поликонденсируется легче всего. Мегги¹⁹ предположил, что поскольку глицин способен дегидратироваться при 140—180° в глицерине или этиленгликоле с образованием пиперазиндиона-2,5, а последний термодинамически менее стабилен в широкой температурной области (от 60 до 180°), чем полиглицин, то вполне возможна прямая поликонденсация глицина в полиглицин. Действительно, при нагревании глицина с небольшим количеством соляной кислоты в запаянных ампулах при температуре

выше 140° он превращается в полиглицин. Выход полимера изменяется в зависимости от соотношения глицина: соляная кислота.

Полиглицин не получается при температуре <130°, а если ампулы, которые предварительно нагревались при 140°, выдержать еще 24 часа при 130°, выход полимера заметно падает. Для этой реакции, по-видимому, необходима температура выше 140° и присутствие твердой фазы. Кроме соляной кислоты эту реакцию катализируют фосфорная кислота, хлористый аммоний, гидроокись натрия. Реакция может быть проведена и в присутствии одной воды, однако соляная кислота обеспечивает наилучший выход и качество полимера.

Мегги считает, что полимеризацию глицина можно рассматривать как гетерогенную ступенчатую реакцию между глицином в растворе и твердым полиглицином.



Этот процесс мог бы, казалось, привести к длительному росту полимерной цепи, а следовательно, и средней степени полимеризации *n*. Однако параллельно с ним протекает, вероятно, внутренний гидролиз пептидных связей $(\text{X+Y})\text{-мер} + \text{H}_2\text{O} = \text{X-мер} + \text{Y-мер}$ в результате чего при данных условиях устанавливается равновесие, и величина *n* остается постоянной. Измерив парциальное давление воды в системе, Мегги вычислил, что ΔH этой реакции равняется 3,3 ккал/моль, а $\Delta S=5,9$ ккал/моль·град.

Попытки поликонденсировать другие аминокислоты не увенчались успехом. α -Аминоизомасляная кислота не изменяется при нагревании с небольшим количеством соляной кислоты при 140° (24 часа). При 220—240° были обнаружены следы сублимата, который, как полагает Мегги, представляет собой 3,3,6,6-тетраметилпiperазиндион-2,5. Продолжительное нагревание при этой температуре сопровождалось значительным пиролизом исходной аминокислоты. *D*, *L*-Фенилаланин в аналогичных условиях частично разлагался с образованием смолообразных продуктов; *L*- и *D*, *L*-аланин превращались в темные вязкие продукты, полностью растворимые в воде.

Таким образом, большинство α -аминокислот при нагревании не образует гомополипептидов. Легкость, с которой глицин подвергается поликонденсации, вероятно, связана с отсутствием боковой цепи, способной создавать стерические затруднения.

Фокс и Миддлбрук²⁰⁻²², высказав мнение, что условия термической поликонденсации аминокислот весьма напоминают условия возникновения белковых форм на земле, показали, что из аминокислот, которые не образуют пептидов при индивидуальном нагреве, часто получаются линейные полипептиды, если их подвергнуть совместной термической обработке. В дальнейшем был обнаружен ряд интересных явлений и закономерностей. Так, при нагревании эквимолярных смесей *D*, *L*-форм аспарагиновой кислоты, лейцина, валина и фенилаланина при 200° в течение 0,5—3 часов, помимо заметных количеств растворимых в ацетоне смолистых веществ, были получены полимеры, содержащие в гидролизате перечисленные аминокислоты^{23, 24}. На основании результатов поликонденсации различных пар аминокислот в различных комбинациях Фокс и Харада сделали заключение, что сополимерные пептиды получаются термическим способом лишь при наличии в реакционной смеси либо глутаминовой, либо аспарагиновой кислот²⁵. В табл. 1 представлены результаты биуретового испытания продуктов совместной термической конденсации глутаминовой кислоты с другими α -аминокислотами. Обычно²⁵ *L*- или *D*, *L*-глутаминовую кислоту нагревали 0,5—2 часа с

ТАБЛИЦА 1

Реагенты	Результаты биуретового испытания	Реагенты	Результаты биуретового испытания
Глутаминовая кислота + глицин	+	Пироглутаминовая к-та + +хлоргидрат лизина	+(интенсивно)
Глутаминовая кислота + глицилглицин	+	Пироглутаминовая к-та+лейцин + глицин	+
Глутаминовая кислота + пiperазиндион-2,5	+	Пироглутаминовая к-та+пролин + глицин	+
Пироглутаминовая кислота + +глицин	+	Пироглутаминовая к-та+аспарагиновая к-та+глицин	+
Пироглутаминовая кислота + +пiperазиндион-2,5	0	Пироглутаминовая к-та+хлоргидрат лизина+глицин	+
Пироглутаминовая кислота + +пiperазиндион-2,5 +вода	+	Пироглутаминовая к-та+хлоргидрат лизина+цистин	+
Глутаминовая кислота + аспарагиновая кислота	+	Пироглутаминовая к-та+хлоргидрат лизина+цистин+ +глицин	+
Пироглутаминовая кислота + +аспарагиновая к-та	+	Пиперазиндион-2,5+глицин	0
Глутаминовая кислота + аспарагин	+	Пиперазиндион-2,5+глицин+ +фенилаланин	0
Пироглутаминовая кислота + +аланин	+	Глицин+аспарагиновая кислота	(слабо)
Пироглутаминовая кислота + +валин	+	Глутамин+аспарагиновая кислота	+
Пироглутаминовая кислота + +лейцин	+	Глутамин+аспарагин	+(слабо)
Пироглутаминовая кислота + +фенилаланин	+		
Пироглутаминовая кислота + +серин	Продукт при 160° темнеет до испытания		

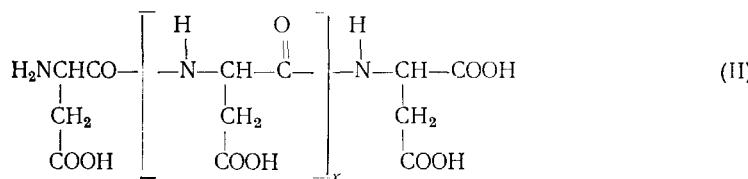
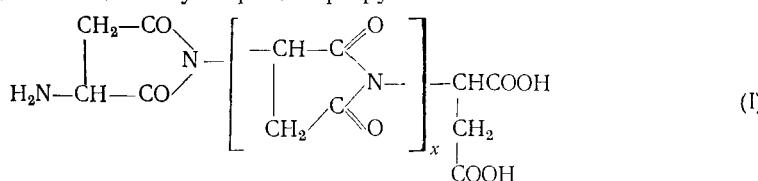
различными аминокислотами в эквимолярных соотношениях при 160—190°. Молекулярный вес сополимеров с глицином достигал 10 000—20 000.

В процессе термической сополиконденсации глутаминовая кислота превращается в пироглутаминовую²⁶, которая плавится в присутствии других веществ при 170° и, по-видимому, выполняет функцию растворителя реакционной смеси, способствуя тем самым более быстрому и полному протеканию реакции. Кроме того, сравнительная оценка выходов продукта показала, что пироглутаминовая кислота реакционноспособнее глутаминовой. Вероятно также, что глутаминовая и пироглутаминовая кислоты могут проявлять себя в качестве «кислотных» катализаторов сополиконденсации аминокислот, поскольку известно, что образование амидной связи катализируется протонами, особенно в присутствии следов воды. Однако авторы не представили никаких доказательств в пользу этого предположения.

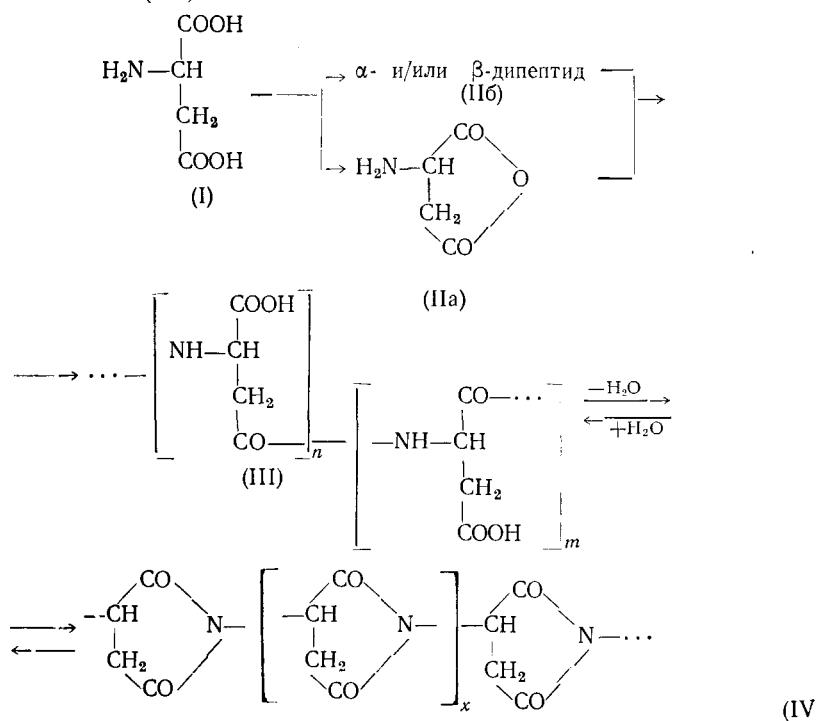
Нагревание аспарагиновой кислоты не приводит к образованию каких-либо жидкых продуктов при температуре ниже 200°, но и она тоже образует сополимеры, которые в отличие от сополимеров с глутаминовой кислотой содержат меньшие пропорции нейтральных и основных кислот. Отличительной особенностью аспарагиновой кислоты является то, что она способна к гомополимеризации при нагревании выше 100°. Это интересное свойство давно привлекло к себе внимание и послужило темой многочисленных исследований.

Показано^{27,28}, что полиаспарагиновая кислота представляет собой полиимид (I), прочно удерживающий воду (примерно одна молекула воды на имидную связь), которую можно удалить лишь тщательным

высушиванием при 200° в вакууме. Полиимид-полигидрат превращается в полиаспарагиновую кислоту со структурой истинного полипептида (II) при непродолжительном нагревании в разбавленном растворе гидроокиси натрия. Средний молекулярный вес полиаспарагиновой кислоты, равный примерно 110 000, определен по концевым группам и скорости седиментации в ультрацентрифуге.



К аналогичному выводу еще раньше пришли Ковач и Конивз с сотрудниками²⁹⁻³⁴, исследовавшие механизм реакции термической поликонденсации аспарагиновой кислоты и структуру образующихся полимерных продуктов. Поликонденсацию аспарагиновой кислоты проводили либо нагреванием в вакууме ($0,1 \text{ mm}$) при 200° , либо кипячением взвеси аспарагиновой кислоты в тетраглицине, что давало возможность удалять воду, выделяющуюся в процессе конденсации, азеотропной отгонкой. Авторы нашли, что при термической поликонденсации аспарагиновой кислоты (I) образуется так называемая «ангидрополиаспарагиновая кислота» (IV) по схеме:

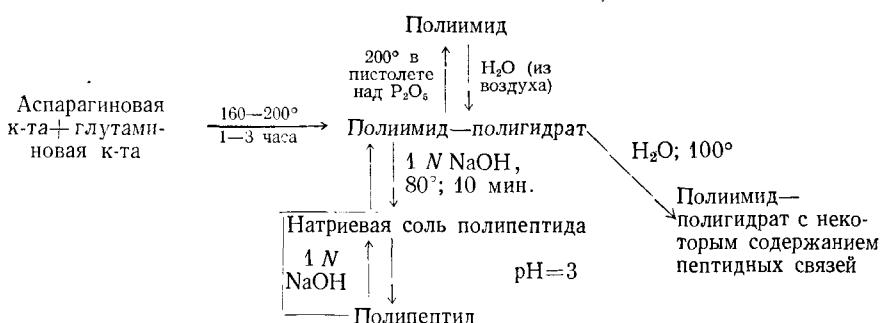


Пользуясь методом деструкции по Гофману, авторы определили отношение α - и β -структурных звеньев в промежуточной α , β -полиаспарагиновой кислоте (III), которое оказалось равным 1:1,3. Вычисленные по методу Ван-Сляйка молекулярные веса различных образцов вещества (III) не превышали 6000—12 000.

Ангидрополиаспарагиновая кислота, полученная различными способами, имела одинаковые свойства: не растворялась в воде и разбавленном растворе бикарбоната натрия, а при частичном гидролизе ($0,1\text{ N NaOH}$) превращалась в α , β -полиаспарагиновую кислоту. Кроме того, при исследовании механизма начальной стадии конденсации показано, что в результате нагревания ацетиласпарагиновой кислоты (145 — 200°) вместо ожидаемого мономерного ангидрида также образуется ангидрополиаспарагиновая кислота (IV).

Нагреванием смеси аспарагиновой и глутаминовой кислот в различных соотношениях при 170 — 180° были получены полимеры довольно высокого молекулярного веса, имеющие, по данным ИК спектроскопии, полилимидную структуру³⁵. Как и в случае гомополимера аспарагиновой кислоты, имидная форма сополимера превращается в полипептид при обработке горячим раствором гидроокиси натрия или кипящей водой. Если выделенный полипептид нагреть, он снова переходит в первоначальную имидную форму, совершенно идентичную исходному полимеру.

Авторы предложили следующую схему взаимных превращений различных форм полиаспарагиновой кислоты и продуктов термической сополиконденсации глутаминовой и аспарагиновой кислот:



В табл. 2 приведены данные о влиянии температуры на сополиконденсацию *L*-аспарагиновой и *L*-глутаминовой кислот³⁵. Как можно видеть, средний молекулярный вес и выход заметно возрастают с увеличением температуры. Зависимость выхода полимера от соотношения исходных кислот, представленная на рис. 1, показывает, что оптимальный выход полипептида достигается при соотношении: 3—4 части аспарагиновой на 1 часть глутаминовой кислоты.

Найдено, что содержание в сополимере глутаминовой кислоты в *N*-концевом положении в 2—2,5 раза больше, чем ее общее содержание в полипептиде (см. табл. 3).

На основании этих данных Фокс и Харада выдвинули предположение^{35—39}, что аминокислоты при сополиконденсации «сами» располагаются в полимерной цепи определенным и упорядоченным образом.

Из результатов поликонденсации глутаминовой и аспарагиновой кислот друг с другом и другими α -аминокислотами следует, что в ре-

акцию поликонденсации можно ввести одновременно все 18 свойственных природным белкам аминокислот. В результате такого синтеза Фокс и Харада получили ряд белковоподобных веществ, названных авторами «протеноидами»; качественный состав их гидролизатов отвечал составу большинства природных белков³⁶⁻³⁸.

«Протеноиды» достаточно легко получаются только при большом избытке аспарагиновой и глутаминовой кислот. При эквимолярном соотношении их со смесями других аминокислот, наряду с полипептидами, образуются побочные продукты (например, пиперазидоны-2,5) и выделение пептидов становится трудной задачей.

Протеноиды получались нагреванием (2 часа, 170–180°) двух частей глутаминовой и двух частей аспарагиновой кислот с одной частью смеси остальных аминокислот, взятых в эквимолярных соотношениях.

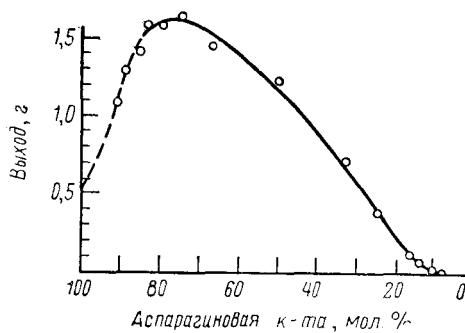


Рис. 1. Выход сополимера аспарагиновой и глутаминовой кислот, как функция соотношения реагирующих аминокислот. Суммарное количество аспарагиновой и глутаминовой кислот в каждом определении было равно 0,025 молей. Температура 180°; продолжительность реакции 3,5 часа. Реакционная смесь в области, обозначенной сплошной линией, находилась в одной фазе

связано с увеличением выхода высокомолекулярной фракции полимера. Образование недиализующегося полимера при одночасовом пропареве наблюдается уже начиная с температуры 150°. Сравнимые с этиими результатами в отсутствие фосфорной кислоты получаются лишь при 170°. В табл. 4 представлено влияние температуры на процесс сополиконденсации.

В присутствии фосфорной кислоты N-концевой состав сополимера мало изменяется, а содержание аспарагиновой кислоты в сополимере быстро возрастает с увеличением отношения аспарагиновой кислоты к глутаминовой в исходной смеси. Разница между отношениями аспарагиновой и глутаминовой кислот, вычисленная по общему и N-конце-

ТАБЛИЦА 2
Сополиконденсация L-аспарагиновой (0,01 M) и L-глутаминовой (0,01 M) кислот

Температура, °C	Выход сырого полимера, г	Выход полимера после дигидратации, г	Средний молекулярный вес сополимера
160	0,64	—	—
170	0,19	0,16	—
180	0,49	0,40	5 400
190	0,88	0,71	13 000
200	0,98	0,83	18 000

Для успеха реакции, кроме избытка кислых аминокислот, необходимо обеспечить удаление воды из сферы реакции, что достигается нагреванием реагентов выше 100°. Глутаминовую кислоту в реакции можно заменить глутамином. Реакция ускоряется ортофосфорной кислотой, влияние которой на процесс сополиконденсации α-аминокислот изучено на примере легко протекающей сополиконденсации аспарагиновой кислоты с глутаминовой и аспарагиновой кислоты с глицином³⁹. Фосфорная кислота повышает выход, но почти не влияет на молекулярные веса полипептидов. При более длительном нагревании увеличивается количество продукта, не диализующегося через целлофановую мембрану, что, вероятно,

ТАБЛИЦА 3

Количество молей аспарагиновой к-ты в реакционной смеси	Количество молей глутаминовой к-ты в реакционной смеси	Содержание глутаминовой к-ты во всем полимере (A), %	Содержание глутаминовой к-ты в N-концевом положении (B), %	B/A
0,01	0,01	29	59	2,0
0,02	0,01	19	54	2,8
0,03	0,01	15	54	3,6

ТАБЛИЦА 4

Влияние температуры на термическую сополиконденсацию аспарагиновой ($0,02\text{ M}$) и глутаминовой ($0,01\text{ M}$) кислот в присутствии $0,8\text{ мл}$ 85%-ной ортофосфорной кислоты

Температура, $^{\circ}\text{C}$	Выход полимера до диялизса, г	Выход полимера после диялизса, г	Отношение содержания аспарагиновой к-ты к глутаминовой в сополимере	Средний молекулярный вес
130	1,15	0		
140	0,39	следы		
150	0,62	0,44		
160	2,00	1,61		
170	1,99	1,76	17	6700
180	2,27	2,09	18	11 800
190	2,28	2,13	11	12 300
200	2,30	2,14	12	33 600
210	2,33	2,18	9	25 600

вому составу, в этом случае даже больше. Из этого следует, что фосфорная кислота способствует эффекту саморегулирования расположения аминокислотных остатков в полипептидной цепи. Относительное содержание фосфорной кислоты в исходной реакционной смеси заметно влияет на скорость конденсации (см. рис. 2). Авторы полагают, что фосфорная кислота в этой реакции может выступать в качестве растворителя и кислотного катализатора, а также способствовать удалению воды из сферы реакции и образованию промежуточных активных соединений⁴⁰.

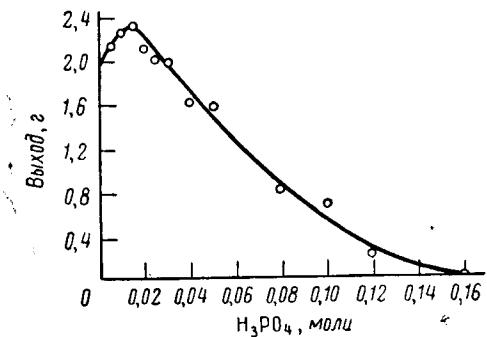


Рис. 2. Зависимость выхода от числа молей 85%-ной фосфорной кислоты при сополимеризации $0,02$ моля аспарагиновой кислоты и $0,01$ моля глутаминовой кислоты

растворах они дают характерную для этой пробы окраску (очевидно, вследствие частичного отщепления аминокислот), причем медленнее, чем природные белки.

Средний молекулярный вес протеонидов меньше, чем у сополимеров аспарагиновой и глутаминовой кислот, полученных в тех же условиях, и равен в среднем ~ 4000 — 8000 .

Все фракции протеониды давали положительную биуретовую, ксантопротеиновую и другие качественные реакции на белок. На ходу протеониды не реагируют с никгидрином. Однако в горячих

ИК спектры показали, что протеноиды имеют типично полипептидную структуру. Кроме того, на спектрах присутствуют полосы поглощения, характерные для имидных связей, но совершенно отсутствуют характеристические пики пиперазиндионов-2,5.

Растворимость протеноидов зависит от способа получения. Сополимеры, полученные обычным способом, были на $\frac{9}{10}$ нерастворимы в воде, но растворимы в растворах солей, например, в 0,1 M фосфатном буфере при pH 7,9 или 3,5%-ном растворе хлористого натрия. Синтетические протеноиды как и природные белки могут высаливаться при добавлении насыщенного раствора сульфата аммония к солевому раствору.

Протеноид способен заменять пептон в бульонной культуре *Lactobacillus arabinosus*; правда, скорость размножения бактерий в бульоне на основе протеноида несколько ниже, но сам факт размножения микробов указывает на то, что связи в протеноиде воспринимчивы к атаке бактериальных протеаз.

Таким образом, по многим свойствам продукты термической сополиконденсации смеси 18 аминокислот близко напоминают природные белки. Однако в процессе нагревания при 170—180° неизбежна частичная рацемизация асимметрических центров аминокислот, и пептидная цепь протеноида в отличие от белковой оказывается построенной из аминокислотных остатков различной конфигурации. Следствием этого является невозможность получения указанным способом полипептидов с пространственной структурой белковых молекул.

Полученных данных недостаточно для полного ответа на вопрос, как располагаются аминокислотные остатки в протеноиде — совершенно произвольно, или же как-то упорядоченно, закономерно. Авторы полагают, что поскольку N-концевое соотношение глутаминовой кислоты, аспарагиновой и нейтральных аминокислот заметно отличается от их соотношения в общем составе и от соотношения реагирующих

ТАБЛИЦА 5

Влияние температуры на аминокислотный состав протеноидов при двух соотношениях аминокислот

Температура, °C	Аспарагиновая кислота, %	Глутаминовая кислота, %	Нейтральные аминокислоты, %
160	66	13	22
170	65	12	23
180	63	13	24
190	56	14	29

Отношение 2:2:1

ТАБЛИЦА 6

Влияние температуры на N-концевой аминокислотный состав протеноидов, полученных при двух соотношениях реагентов

Температура, °C	N-Аспарагиновая кислота $\Sigma N\text{-аминокислот}$, %	N-Глутаминовая кислота $\Sigma N\text{-аминокислот}$, %	N-Нейтральная кислота $\Sigma N\text{-аминокислот}$, %
160	7	57	36
170	6	46	48
180	11	37	53
190	8	13	80

Отношение 2:2:1

Отношение 1:1:1

160	56	14	30
170	55	13	32
180	55	14	31
190	46	19	35

Отношение 1:1:1

160	8	42	50
170	7	30	63
180	10	20	71
190	9	10	81

компонентов в исходной смеси (см. табл. 5 и 6) и поскольку N-концевой аминокислотный состав изменяется в зависимости от температуры синтеза, в то время как общий состав остается постоянным, термическое превращение смеси аминокислот нельзя считать процессом совершенно беспорядочным.

Крампитет⁴¹⁻⁴³ получил несколько протеноидов, нагревая смесь аминокислот в запаянных ампулах в атмосфере азота (3 часа 170°). Протеноид I был синтезирован из 2 частей аспарагиновой кислоты, 2 частей глутаминовой и 1 части смеси других аминокислот, а именно

D,L-аланина, *D,L*-изолейцина, *D,L*-тронина, *D,L*-валина, *D,L*-метионина, *D,L*-фенилаланина, *D,L*-серина, *D,L*-триптофана, *L*-аргинина, *L*-гистидина, *L*-пролина, *L*-лейцина, *L*-тирофина, глицина и монохлоргидрата лизина, взятых в эквимолярном соотношении. Протеноид II содержал 4 части аспарагиновой кислоты, 4 части глутаминовой и 1 часть эквимолярной смеси указанных аминокислот. После очистки сополимеры дают положительные реакции: биуретовую, ксантопротеиновую, Гопкинса — Коуля — Адамекевича, Сальковского и с азокармином В. В N-концевом положении обоих протеноидов в основном находятся остатки аспарагиновой и глутаминовой кислот и лишь в незначительной степени присутствуют нейтральные и основные кислоты. Оказалось, что в количественном отношении гидролиз сополимеров I и II под действием ряда протеолитических энзимов, таких как лепсин, трипсин, эрепсин и папаин, протекает в различной степени. Подобные же результаты получены Фоксом и Харадой, которые изучили влияние химотрипсина и пепсина на два образца протеноида³⁷. На рис. 3 представлены результаты протеолиза синтетических продуктов и казеина. Видно, что казеин полнее расщепляется энзимами, чем протеноид, так как протеазы воздействуют лишь на связи между *L*-аминокислотными остатками. Пепсин, как известно, особенно активен в присутствии остатков кислотного характера. Поэтому протеноиды более восприимчивы к «атаке» именно пепсина, а не других энзимов.

Свободный *D,L*-лизин аналогично дикарбоксаминокислотам при 150—170° превращается в жидкий лактам, а при 180—230° — гомополимеризуется⁴⁴. Лизин также легко конденсируется с глицином, аланином и другими нейтральными аминокислотами, глутаминовой и аспарагиновой кислотами, капролактамом, янтарной, терефталевой и другими кислотами. ИК спектры гомополимера лизина, сополимеров типа лизин — нейтральные аминокислоты и сополимера лизин — глутаминовая кислота показали, что все они представляют собой типичные полипептиды. Лизин — монохлоргидрат не способен к гомополиконденсации, однако он легко сополиконденсируется с глутаминовой кислотой и другими аминокислотами в присутствии ортофосфорной кислоты.

Гомополимер лизина растворим в воде и не дialisируется через целлофановую мембрانу. Сополимеры лизина и глутаминовой кислоты, лизина и глицина представляют собой гелеобразные вещества, а сополимер с аспарагиновой кислотой — губчатую твердую массу. Аморфные

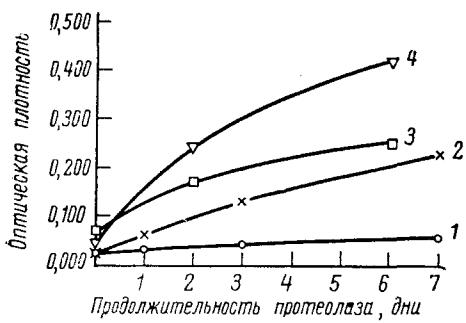


Рис. 3. Протеолиз протеноидов пепсином и химотрипсином. 1 — химотрипсин на 2:2:1-протеноид, 2 — химотрипсин на казеин, 3 — пепсин на 1:1:1-протеноид, 4 — пепсин на казеин

сополимеры лизина с глутаминовой и аспарагиновой кислотами набухают в щелочах и кислотах, но не растворяются в них. Вероятно, это объясняется тем, что полимеры имеют высокую степень разветвления, а частично и трехмерную структуру.

В 1961 г. Фокс, Харада и Рофлинг⁴⁵ сообщили о термической сополимеризации всех 18 α -аминокислот при избытке в реакционной смеси компонентов кислого или основного характера. Один из сополимеров был получен при нагревании смеси аминокислот с избытком аспарагиновой кислоты, другой — в аналогичных условиях, но с избытком лизина. Оба сополимера по многим своим свойствам близко напоминали белки. Первый из протеонидов хорошо растворялся в воде, разбавленном растворе бикарбоната натрия и фосфатном буферном растворе, имел молекулярный вес порядка 3—9 тысяч и изоэлектрическую точку, близкую к 2,8. ИК спектр показал, что в сополимере в значительном количестве присутствуют имидные связи, которые исчезают при обработке протеноида щелочью, давая на спектре типично полипептидную структуру. Сополимер II представлял собой эластичное, резиноподобное вещество, растворимое в минеральных кислотах и лишь на 10% в воде. Молекулярный вес этого сополимера превышал 25 000, он имел изоэлектрическую точку порядка 8,4 и был еще интересен тем, что из него получались пленки.

Вскоре после начала исследования по термическому синтезу пептидов Фокс, Джонсон и Мидлбрук²³ при помощи хроматографического анализа обнаружили, что в гидролизатах содержится больше аминокислот, чем было взято в реакцию. Это, вероятно, можно объяснить тем, что в условиях термической поликонденсации исходные реагенты претерпевают различные химические превращения с образованием новых аминокислот и других продуктов. Показано, например, что аспарагиновая кислота превращается в α - и β -аланин, а при нагревании с мочевиной — в уреидоянтарную кислоту — промежуточный продукт при синтезе ряда пиримидиновых оснований. Интересно также, что пятна, характерные для аланина и аспарагиновой кислоты, были найдены на хроматограммах продуктов гидролиза полимеров, полученных при нагревании фумарата и малеината аммония.

Мегги⁴⁶ сообщил о получении полимеров при нагревании глицина в воде при 140—180° в автоклаве. Выход продуктов изменялся в зависимости от температуры и соотношения реагентов. Реакция катализируется HCl, HNO₃, H₂SO₄, H₃PO₄, NH₄OH, NaOH, KOH.

Вопросу фотосинтеза α -аминокислот и пептидов в водных средах посвящено исследование Багадура^{47—49}. В стерилизованной смеси пароформальдегида, воды и коллоидной окиси молибдена под воздействием электрического света происходит образование аланина и глицина одновременно с образованием небольшого количества валина, гистидина, глутаминовой кислоты и орнитина, причем азот, необходимый для синтеза, фиксируется из атмосферы. Освещение водных растворов глицина в присутствии сахарозы вызывает образование олигомерных пептидов, в частности глицилаланина, глицилнорлейцина и глицилглицина. При облучении 1000-ваттной электролампой (400 часов) стерилизованных растворов глицина и аспарагиновой кислоты в присутствии перекиси бензоила как фотокатализатора и сахарозы как дополнительного источника энергии было отмечено образование новых аминокислот и пептидов. Контрольный опыт в темноте дал отрицательный результат.

Интересно сообщение Елленбогена⁵⁰ о получении полипептидов при освещении ртутью или водородной лампой водных растворов аммонийных солей, через которые непрерывно пропускалась смесь угле-

водородов (от метана до пентана). В качестве катализаторов использовались некоторые соли натрия, кальция, калия и ряд окислов тяжелых металлов. Аминокислотный состав полученных полипептидов изменялся в зависимости от состава реакционной смеси и условий проведения синтеза.

Кроме ранних работ⁵¹⁻⁵⁴, в которых показано, что при термической поликонденсации глицилглицина и глицилаланина обычно образуются пиперазиндионы-2,5, в литературе отсутствуют сведения о поликонденсации ди- и трипептидов, вероятно, вследствие того, что добиться сколько-нибудь существенных результатов в этом направлении не удалось.

2. Получение полипептидов с использованием конденсирующих средств

Синтетические полипептиды часто имеют сравнительно невысокий молекулярный вес; для его повышения можно использовать конденсирующие средства, широко применяющиеся в практике ступенчатого синтеза пептидов с известным чередованием аминокислот. К числу таких конденсирующих средств относятся дициклогексилкарбодимид⁵⁵, тетраэтилпирофосфит⁵⁶, пятиокись фосфора⁵⁷ и т. д. В работе Фурояма, Сакакибара и Акабори⁵⁸ в качестве конденсирующего агента использовался сравнительно легко доступный бис-*o*-фениленпирофосфит. При поликонденсации *l*-лейцилглицилглицина в сухом пиридине (6 часов, 100°) были выделены две фракции полипептида с $M=3220$ и 1730 соответственно. Полученные полипептиды растворялись в 80%-ном водном феноле и 85%-ной муравьиной кислоте.

При использовании дициклогексилкарбодимида⁵⁹ для поликонденсации олигомерных пептидов со свободными карбоксильными и аминогруппами получены полимеры с большим молекулярным весом (см. табл. 7). Реакцию поликонденсации проводили при комнатной темпера-

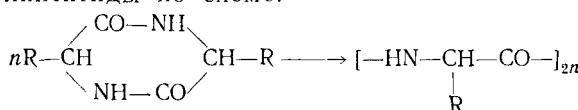
ТАБЛИЦА 7

Исходный пептид	<i>M</i>	Конечный полипептид	
		растворитель	<i>M</i>
Поли- γ -бензил- <i>l</i> -глутамат	200 000	диоксан	950 000
Поли- γ -бензил- <i>l</i> -глутамат	225 000	хлороформ	1 000 000
Поли- ϵ -КБЗ- <i>l</i> -лизин	350 000	хлороформ	840 000
Поли- <i>l</i> -пролин	10 000	вода	32 000
Поли- γ -бензил- <i>l</i> -глутамат + + поли- ϵ -КБЗ- <i>l</i> -лизин (1:1)	200 000 300 000	хлороформ	6 000 000

туре в различных органических растворителях. Авторы предполагают, что конденсация происходит за счет свободных концевых NH₂- и COOH-групп. В случае, когда полипептид на концах молекулы имеет аминную и амидную группы, никакого повышения молекулярного веса не наблюдается. Метод может быть использован для получения высокомолекулярных, в том числе водорастворимых, полипептидов, получение которых другим путем представляет большие трудности. Используя этот метод, можно при наличии свободных карбоксильных и аминогрупп на концах пептидной цепи получать блок-сополимеры и разветвленные полипептиды.

3. Полимеризация пиперазиндионов-2,5

В ряде работ⁶⁰⁻⁶³ показано, что пиперазиндион-2,5 термодинамически менее устойчив, чем полиглиции и сравнительно легко превращается в полипептид в различных условиях. Аналогично гликолиду и лактиду, которые полимеризуются с образованием линейных полиэфиров, можно было ожидать, что и замещенные пиперазиндионы-2,5 будут полимеризоваться в полипептиды по схеме:

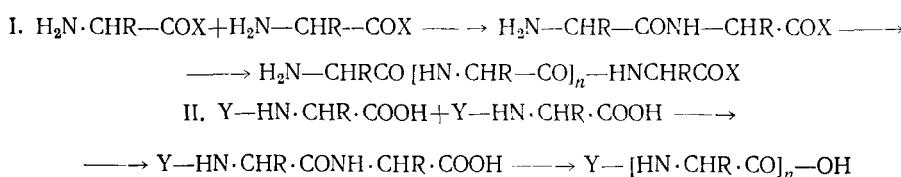


Однако имеется всего несколько работ по полимеризации 3,6-замещенных пиперазиндионов-2,5. Гото⁶⁴ осуществил сополимеризацию 3,6-дизобутилпиперазиндиона с 2-пирролидон-5-карбоновой кислотой при нагревании эквимолекулярной смеси исходных веществ (200° , 36 часов) в глицерине. Выделенный сополимер (выход — 70%) давал положительную биуретовую реакцию. Автор считает, что полученный продукт представляет собой полипептид, который он назвал «протеиновым аналогом». О возможности сополимеризации глутаминовой кислоты с пиперазиндионом-2,5 упоминали Фокс и Харада²⁵. Однако, как они установили, совместное нагревание пиперазиндиона-2,5 с пирролидон-2-карбоновой-5 кислотой в безводных условиях не приводит к образованию полипептида и только после добавления к реакционной смеси некоторого количества воды биуретовая реакция сополимера становится положительной.

Попытки получить полипептиды гидролитической полимеризацией 1-метил-1,4-дифенил- и 3,6-диметилпиперазиндионов-2,5 не увенчались успехом. Холл⁶⁵ получил отрицательные результаты при анионной полимеризации 1,4-диметилпиперазиндиона-2,5 в присутствии металлического натрия, гидрида натрия и ацетилкапролактама.

III. СИНТЕЗ ПОЛИПЕПТИДОВ ИЗ ПРОИЗВОДНЫХ α -АМИНОКИСЛОТ С МОДИФИЦИРОВАННОЙ АМИНО- ИЛИ КАРБОКСИЛЬНОЙ ГРУППАМИ

Недостаточная склонность свободных α -аминоциклот и дипептидов к реакции поликонденсации и ярко выраженная способность к циклизации не позволяет использовать эти продукты для получения высокомолекулярных пептидов в условиях, исключающих рацемизацию асимметрических центров. Для облегчения образования пептидной связи необходимо активировать карбоксильную или аминную группы кислоты. Повышение реакционной способности аминокислот достигается обычно^{4, 5} превращением их в различные O- или N-производные, в которых связи между заместителем и остатком аминокислоты легко подвергаются аммонолизу в случае O-производных или переацилированию в случае N-заместителей.



Чаще всего в качестве таких производных применяют эфиры и тиоэфиры аминокислот и пептидов, амиды, хлорангидриды, азиды, а также N-карбобензокси-, N-карботиофенил-, N-карбонитрофенокси- и другие производные аминокислот.

1. Поликонденсация амидов и нитрилов α -аминокислот

Ковач и Наги сообщили⁶⁶ о получении полиаспаргиновой кислоты при кипячении 5—10%-ного водного раствора *l*-аспарagina. При этом часть аспарagina гидролизуется до аспаргиновой кислоты, а основное его количество превращается в аморфную смесь олиго- и полипептидов, среди которых, в частности, была идентифицирована *l*-аспарагил-аспаргиновая кислота. Средний молекулярный вес выделенных полимерных продуктов оказался равным примерно 500, выход — 63%. Если реакцию проводить при 70—75°, выход падает до 18%. Полимеры более высокого молекулярного веса получены диализом. Средний молекулярный вес различных препаратов после диализа колебался в пределах 1700—3000. Подобно α , β -полиаспаргиновой кислоте эти полипептиды хорошо растворялись в воде и давали положительную биуретовую реакцию; их ИК спектры идентичны со спектрами полиаспаргиновой кислоты.

Гидри^{67, 68} исследовал поликонденсацию амида глицина в водном растворе аммиака. Реакцию проводили, нагревая глицинамид (или его хлоргидрат) с половинным по весу количеством раствора NH₄OH при 100° в течение нескольких часов. Продукт очищали диализом и затем лиофилизовали. В табл. 8 представлены данные о выходе и средней степени полимеризации.

ТАБЛИЦА 8

Состав реакционной смеси	Средняя степень полимеризации	Молярный выход полиглицина, %
2 г хлоргидрата глицинамида + + 1 мл 2 N NH ₄ OH	40	16,5
2 г хлоргидрата глицинамида + + 1 мл 8 N NH ₄ OH	29	74,8
Глицинамид (неперекристаллизованный)	33	27,4
Глицинамид (перекристаллизованный)	34	75,0

П р и м е ч а н и е. Образцы нагревали в закрытых пробирках при 100° в течение 20 часов и более. Степень полимеризации первых двух продуктов определяли формальным титрованием по Серенсену в растворе бромистого лития, а двух других — методом Ван-Сляйка.

Авторы приводят предварительные кинетические данные поликонденсации глицинамида, которые представлены на рис. 4. Как видно из графика, скорость реакции в начальный период достаточно высока, в результате чего поликонденсация может успешно конкурировать с побочными реакциями гидролиза и аммонолиза. Продукты поликонденсации представляют собой белые или слегка окрашенные порошки, нерастворимые в воде, но растворимые в концентрированном растворе бромистого лития. Они дают биуретовую реакцию и полностью гидролизуются в кипящей кислоте до глицина. На ИК спектрах полученных полимеров наблюдаются две широкие полосы поглощения, характерные для деформационных колебаний NH- и CO-групп (1534—1562 и 1634—1648 cm^{-1} соответственно), которые указывают на преимущественное содержание в полимере связей, отвечающих α - и β -формам полиглицина. Об этом свидетельствует также наличие полос поглощения в области 1015 cm^{-1} (α) и 1028 cm^{-1} (β). При более низкой температуре реакции (60°) полиглицин был получен с 20%-ным выходом.

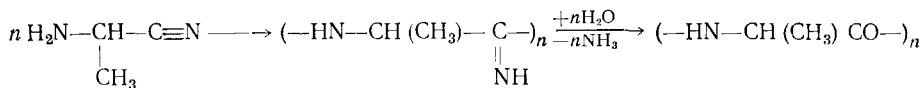
Сополиконденсация глицинамида с амидами других аминокислот не дает значительных выходов полимерных продуктов, но в сополимерах

обнаружены остатки большинства аминокислот, амиды которых использовались в качестве реагентов.

При нагревании аминоацетонитрила⁶⁷ в NH₄OH образуется черный полимер, который не удалось охарактеризовать. Термическая обработка метиленаминоацетонитрила в присутствии сульфида аммония приводит к получению недиализуемого продукта, состоящего в основном из остатков глицина и, вероятно, цистеина. Все полученные пептиды охарактеризованы обычными методами анализа и имеют сравнительно невысокие молекулярные веса порядка 570—930.

Мах высказал гипотезу⁶⁹, что первичный синтез аминокислот и белков проходил в три стадии. Вначале из простых соединений HCN, HCOOH и NH₃ образовался аминоацетонитрил, из которого в результате поликонденсации получился полиглицин. Взаимодействие полиглицина с альдегидами и ненасыщенными соединениями на третьей стадии привело к синтезу полипептидов. Для подтверждения этой гипотезы автор нагревал 1 часть аминоацетонитрила с каолином (20 частей) при 130° в течение 5 часов. Хроматографический анализ показал присутствие в продуктах реакции глицилглицина, диглицилглицина и полиглицина. После сработки полиглицина формалином в присутствии катализаторов основного характера в гидролизате был обнаружен серин.

Лоссе и Андерс⁷⁰ исследовали полимеризацию α -аминопропионитрила на минеральных носителях, рассматривая эту реакцию как один из возможных путей синтеза белка в природе. Одну часть α -аминопропионитрила нагревали с двумя частями минерального адсорбента (Фуллеровская земля) в течение 50 часов при 80° и 5 часов при 130°. При этом 60% исходного нитрила превращается в полиамидин, в результате гидролиза которого получается полиаланин со среднечисловым молекулярным весом порядка 20 000.



Выделенный полипептид охарактеризован обычными методами анализа и сопоставлен с полимером, полученным встречным синтезом из N-карбоксиангидрида аланина. Свойства обоих полипептидов оказались совершенно идентичными. Интересно отметить, что при нагревании α -аминопропионитрила в отсутствие минерального носителя полимеризация практически не идет, а образуется α , α' -имиинодипропионитрил, HN(CH(CH₃)CN)₂.

2. Поликонденсация эфиров α -аминокислот

Алcoxильная группа в эфирах аминокислот достаточно активна и легко подвергается аммонолизу, особенно в присутствии кислых катализаторов⁷¹:

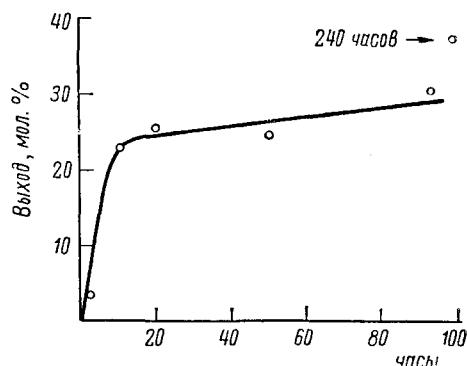
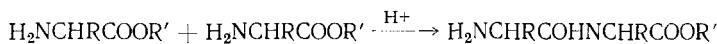


Рис. 4. Скорость образования полиглицина из глициамида при нагревании его в растворе гидроокиси аммония при 100°



Таким образом, поликонденсация эфиров аминокислот казалось бы может представлять удобный путь синтеза линейных полипептидов, однако при их поликонденсации часто преобладает циклизация образующегося эфира дипептида в 3,6-замещенные дикетопиеразины^{72, 73}. Так, метиловые эфиры глицина и D, L-аланина дают соответственно 53 и 96% дикетопиеразинов при их поликонденсации в присутствии 2% CO₂⁷⁴ и SiO₂⁷⁵.

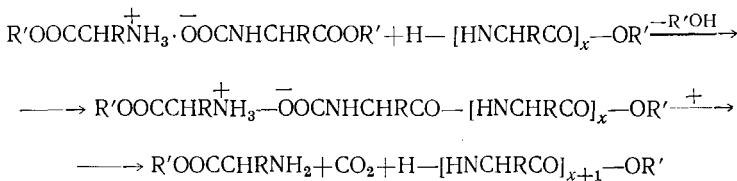
Изучены особенности поликонденсации эфиров глицина и D, L-аланина в присутствии двуокиси углерода и карбаматов эфиров^{76, 77}.

Первой стадией реакции, по мнению авторов, является проходящее с большой скоростью образование карбамата эфира аминокислоты

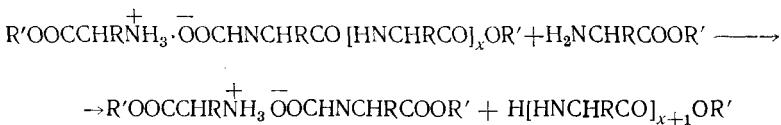


Реакция сильно экзотермична и в случае этилового эфира глицина заканчивается за 2—3 сек. поглощением одного моля CO₂ на два моля эфира⁷⁸. Образовавшийся карбамат достаточно стабилен и распадается на исходные соединения при температуре ~60°.

В симметричном карбамате одна эфирная группа находится в активированном состоянии и легко подвергается аммонолизу. Таким образом, при поликонденсации эфиров аминокислот рост пептидных цепей происходит за счет взаимодействия симметричного карбамата с амино-группами пептидов или (в случае зарождения новой цепи) с амино-группой эфира аминокислоты с образованием несимметричного карбамата^{77, 79}:



Несимметричный карбамат, благодаря своей нестабильности⁸⁰, распадается с регенерацией двуокиси углерода и выделением пептида, содержащего на один аминокислотный остаток больше, чем у исходного пептида, или, что более вероятно, реагирует с новой молекулой мономера с образованием симметричного карбамата и свободного пептида⁸¹:



Повышение активности эфирной группы в симметричном карбамате эфира аминокислоты, благодаря влиянию карбаматной группы, подтверждено изучением поликонденсации этилового эфира глицилглицина. В этом случае увеличение расстояния между карбаматной и эфирными группами приводит к резкому уменьшению их взаимного влияния, что выражается в практически полном отсутствии катализического влияния CO₂ на поликонденсацию эфира глицилглицина⁸².

Процесс поликонденсации, вероятно, имеет ступенчатый характер, скорость которого возрастает с увеличением концентрации инициатора (см. рис. 5).

Самой медленной стадией реакции поликонденсации этилглицината является образование эфира дипептида, который относительно быстро превращается в трипептид и пиперазиндион-2,5. На рис. 6 и 7 показано изменение состава продуктов поликонденсации этилглицината в зависимости от продолжительности реакции. В начале процесса почти половину твердых продуктов составляет дикетопиперазин, относительное количество которого уменьшается по мере завершенности процесса. Количество трипептида достигает максимума, а затем постепенно уменьшается за счет протекающего с большей скоростью превращения его в полимер. Процесс имеет автокатализитический характер и по мере накопления пептидов и роста их длины увеличивается относительная скорость расхода мономера на рост цепей полипептидов.

Определение скорости аммонолиза ρ -нитрофениловых эфиров карбобензоксипроизводных глицина и его ди- и трипептидов указывает на увеличение скорости взаимодействия аминных и эфирных групп с ростом длины цепи, особенно при переходе от мономера к дипептиду, что согласуется

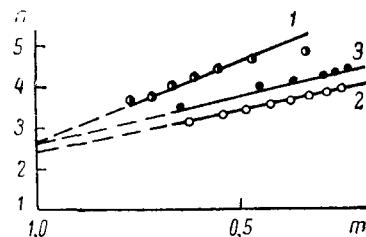


Рис. 5. Зависимость средней степени полимеризации исходной фракции n от расхода мономера t при различных молярных отношениях начальных концентраций CO_2 и мономера (ξ_0): 1 — $\xi_0=0,02$; 2 — $\xi_0=0,04$; 3 — $\xi_0=0,08$

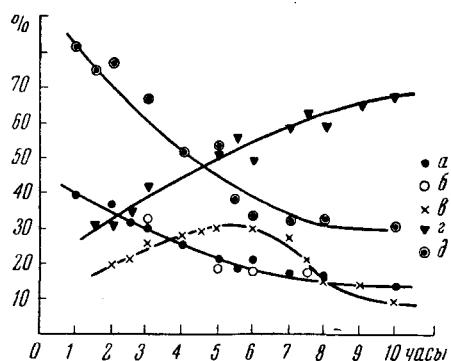


Рис. 6

Рис. 6. Состав продуктов поликонденсации этилового эфира глицина (%): пиперазиндион-2,5 — измерено по увеличению аминного азота (а) и «медным» методом (б); этиловый эфир диглицилглицина (в); тетрапептидная фракция (г); свободный этиловый эфир глицина (д).

Рис. 7. Содержание пиперазиндиона-2,5 и этилового эфира диглицилглицина (в % к исходной навеске мономера). 1 — пиперазиндион-2,5, 2 — этиловый эфир диглицилглицина

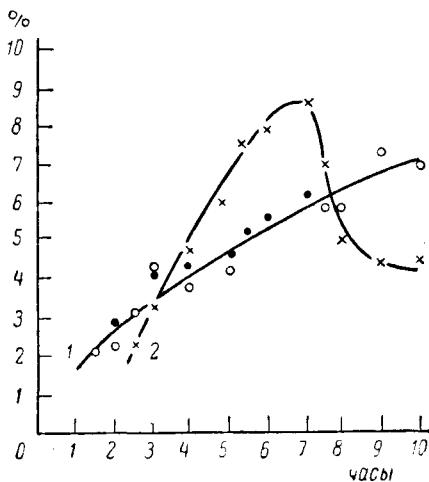


Рис. 7

с представлением об автокатализитическом характере процесса поликонденсации эфиров аминокислот⁸⁶.

В отсутствие CO_2 поликонденсация этилового эфира глицина идет очень медленно и распадается на две стадии. Скорость первой реакции

очень невелика. Затем скорость резко возрастает (см. рис. 8). На второй стадии мономер расходуется значительно быстрее. Прибавление поликонденсата ускоряет реакцию, протекающую также в две стадии, при этом стадия 1 значительно сокращается. Еще большее сокращение стадии 1 происходит при добавлении 20 мол. % метилового эфира

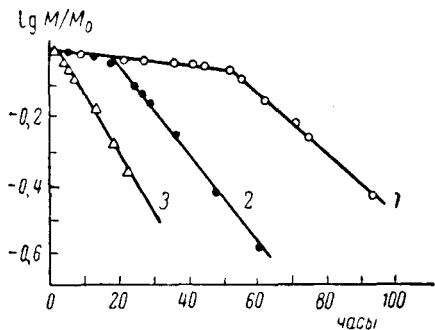


Рис. 8

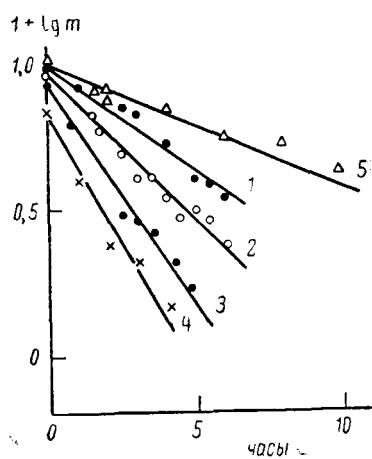


Рис. 9

Рис. 8. Поликонденсация этилового эфира глицина без добавок (1) и в присутствии поликонденсата (2); в присутствии эфира трилептида (3)

Рис. 9. Кинетика расхода мономера при поликонденсации этилового эфира глицина (m). Начальное содержание инициатора ξ_0 : 1 — 0,02; 2 — 0,04; 3 — 0,08; 4 — 0,16 и 5 — 0,01; на оси ординат отложены значения $m_0 - 1 - 2 \xi_0$

аланилглицилглицина, причем, как и в случае добавок поликонденсата, скорость второй стадии практически одна и та же⁸⁷. Оказалось, что и добавление этилового спирта оказывает аналогичное ускоряющее влияние⁸⁸ на поликонденсацию, что авторы объясняют катализитическим влиянием спирта на реакцию аммонолиза.

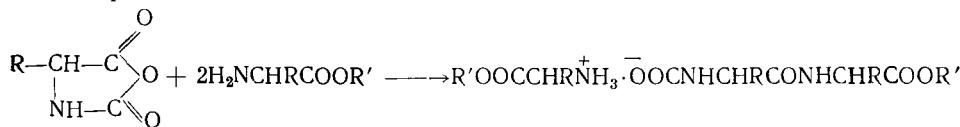
Экстраполяция полученных данных при поликонденсации этилглицината с двуокисью углерода (см. рис. 9) указывает на то, что истинная относительная концентрация мономера $\frac{M_0 - \Delta M_0}{M_0} = m$, где ΔM_0 — количество мономера, связанное CO_2 , при нулевом времени меньше единицы и уменьшается с увеличением концентрации инициатора. Это подтверждает, что в начале реакции происходит быстрое связывание части мономера ($1 - m_0$) и только потом начинается следующая стадия реакции, характеризующаяся первым порядком расхода мономера.

Изучение кинетики поликонденсации этилового эфира глицина в присутствии его карбамата^{89, 90} и двуокиси углерода⁸⁷ показало, что характер процесса не меняется при изменении способа инициирования реакции поликонденсации и подтвердило, что карбамат эфира аминокислоты действительно катализирует поликонденсацию. Для всех исследованных концентраций катализатора мономер расходуется по реакции первого порядка.

Сравнение констант скоростей расхода мономера при инициировании поликонденсации этилового эфира глицина карбаматом и двуокисью углерода показывает, что реакция подчиняется одним и тем же кинетическим закономерностям (см. рис. 10).

Характер поликонденсации эфиров аминокислот не изменяется в присутствии N-карбоксиангидридов кислот^{91—93}. Как и при поликонден-

сации, инициируемой двуокисью углерода, реакция идет в две стадии. При поликонденсации этилглицинат и ангидрида N-карбоксиглицина обнаружено, что на первой стадии реакции эфир расходуется крайне быстро, что, по мнению авторов, связано с образованием несимметричного карбамата:



Вторая стадия, более медленная, проходит по карбаматному механизму с образованием аналогичных продуктов поликонденсации, как и при инициировании процесса двуокисью углерода или карбаматом эфира аминокислоты^{93, 94}.

Из других катализаторов для поликонденсации эфиров аминокислот и пептидов описан металлический натрий и трифенилметилнатрий. Бренер и Рикенбахер⁹⁵ при поликонденсации метиловых эфиров D, L-лизина и L-лейцина (3—4 часа при 5°) со взвесью натрия без растворителя получили с выходом 60—70% полипептиды со средней степенью полимеризации 7 и 10 соответственно. При поликонденсации в этих условиях смеси эфиров L-лейцина, D,L-лизина и D,L-аспарагиновой кислоты образуется трудно растворимый в воде смешанный полипептид с молекулярным весом ~4000. Авторы указывают, что при поликонденсации метилового эфира L-лейцина происходит практически полная рацемизация. Уменьшение выхода дикетопиразинов при поликонденсации эфиров с металлическим натрием авторы объясняют адсорбцией эфиров аминокислот и получением полипептидов на поверхности катализатора, в то время как образование дикетопиразинов происходит главным образом в растворе. При поликонденсации эфиров с трифенилметилнатрием в эфирном растворе средняя степень полимеризации достигает 10—13⁹⁶.

Поликонденсация эфиров олигопептидов рассмотрена в сравнительно небольшом числе работ. Так, Порошин, Шибнев и Казаренко указывают, что при нагревании метилового эфира L-пролилглицил-L-пролина (110°, 15 часов, 3 · 10⁻³ м) образуется сложная смесь полипептидов, которую авторы подробно не анализировали⁹⁷. Де-Тар и другие⁹⁸ при обработке точно рассчитанным количеством триэтиламина p-нитрофенилового эфира бромгидрата β-метокси-L-аспарагилглицилглицина в диметилформамиде или диметилсульфоксиде при комнатной температуре получили полипептид с молекулярным весом ~12 000. Показано, что образование линейного полипептида или циклических соединений определяется в значительной степени концентрацией исходного эфира трипептида. Так, при обработке 15%-ного раствора эфира трипептида выход полипептида очень мал из-за образования циклического гексапептида. Этим методом авторы получили ряд полипептидов, содержащих аспарагиновую кислоту, фенилаланин, глицин; гистидин, глицин; фенилаланин, глицин. Синтез последнего полипептида из бромгидрата p-нитрофенилового эфира фенилаланилглицина особенно интересен, так как

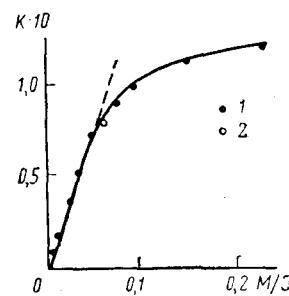
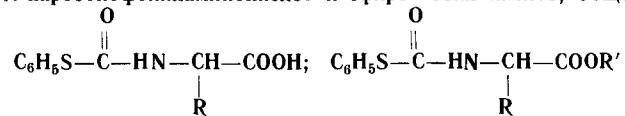


Рис. 10. Зависимость константы скорости расхода мономера $k \cdot \text{сек}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$ от начальной концентрации инициатора (в весовых долях). 1 — иницирование добавкой CO_2 ; 2 — иницирование карбаматом

ТАБЛИЦА 9

Свойства N-карботиофениламинокислот и эфиров этих кислот, общей формулы



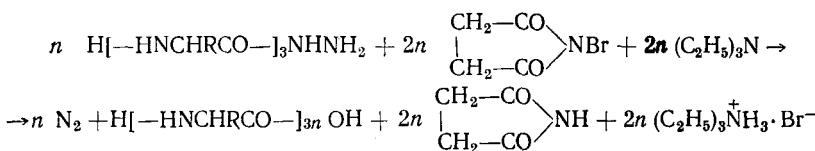
N-карботиофенилпроизводные аминокислот			Эфиры N-карботиофениламинокислот		
Наименование исходной аминокислоты	R	Свойства	R'	Свойства	Ссылка на литературу
β-Аланин	H	T. пл. 104°	C ₂ H ₅	T. пл. 52°	101
DL-Фенилаланин	C ₆ H ₅ CH ₂	T. пл. 56°	C ₂ H ₅	T. пл. 63—5°	101
L-Фенилаланин	C ₆ H ₅ CH ₂	T. пл. 66°, [α] _D ¹⁷ 12,5°	C ₂ H ₅	T. пл. 55—56°, [α] _D ¹⁸ 14,3° (C ₂ H ₅ OH)	121
DL-Валин	(CH ₃) ₂ CH	T. пл. 121°	C ₂ H ₅	T. пл. 54°	121
L-Валин	(CH ₃) ₂ CH	T. пл. 115°, [α] _D ¹⁷ 6,0° (C ₂ H ₅ OH)	C ₂ H ₅	T. пл. 60°, [α] _D ¹⁸ 42,9° (C ₂ H ₅ OH)	121
L-Лейцин	(CH ₃) ₂ CHCH ₂		C ₂ H ₅	Масло	101
DL-Метионин	CH ₃ SCH ₂ CH ₂	T. пл. 99°	C ₂ H ₅	Масло	121
L-Метионин	CH ₃ SCH ₂ CH ₂	T. пл. 65°, [α] _D ¹⁸ 8,9° (C ₂ H ₅ OH)	C ₂ H ₅	T. пл. 53°, [α] _D ¹⁸ 38,4° (C ₂ H ₅ OH)	121
O-бензил-DL-серин	C ₆ H ₅ CH ₂ OCH ₂	—	CH ₃	T. пл. 73—74°	116
ξ-N-Карбобензокси-DL-лизин	C ₆ H ₅ CH ₂ OCOHN(CH ₂) ₄	T. пл. 116—118°	C ₂ H ₅	T. пл. 174—175°	116
L-Нитроаргинин	—	T. пл. 134—136°	C ₂ H ₅	T. пл. 59—60°, [α] _D ¹³ 9,4°	118
L-Аспарагиновая	HOOCCH ₂	T. пл. 100—102°		—	119
γ-Аминомасляная	—	T. пл. 110—111°	C ₂ H ₅	Масло	113
δ-Аминовалериановая	—	T. пл. 125°	C ₂ H ₅	—	114
ξ-Аминокапроновая	—	T. пл. 95°		—	111
То же	—	T. пл. 97—98°	C ₂ H ₅	Масло	109
DL-Аланилглицин	CH ₃	T. пл. 136—7°	C ₂ H ₅	T. пл. 119—120°	121
Глицил-DL-аланин	CH ₃	T. пл. 156°	CH ₃	T. пл. 122—123°	107
Глицил-DL-аланин	—	—	C ₂ H ₅	T. пл. 109—110°	107
L-лейцил-L-аланин	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ и CH ₃	T. пл. 147—148°, [α] _D ²⁷ 30,8° [C ₂ H ₅ OH 1,95 g/100 ml]		T. пл. 105—106°, [α] _D ²⁷ 39,8° [C ₂ H ₅ OH, 2,23 g/100 ml]	111

Глицил- <i>D,L</i> -фенилаланин	$C_6H_5CH_2$	Т. пл. 178—9°	C_2H_5	Т. пл. 107—108°	107
Глицил- <i>L</i> -лейцин	$(CH_3)_2CHCH_2$	Т. пл. 155°, $[\alpha]_D^{26} 15,0^\circ$ [C ₂ H ₅ OH]	C_2H_5	Масло	107
β -Аланил- <i>D,L</i> -аланин	CH ₃	Т. пл. 146,5°	CH ₃	Т. пл. 112—113°	108
γ -Аминобутирил- <i>D,L</i> -ала- нин	CH ₃	Т. пл. 113°	CH ₃	Т. пл. 95°	113
ε -Аминокапроил- <i>L</i> -фенил- аланин	$C_6H_5CH_2$	Т. пл. 130—131°, $[\alpha]_D^{27} 24,1^\circ$ [C ₂ H ₅ OH]	C_2H_5	Масло	109
ε -Аминокапроил- <i>D,L</i> -ала- нин	CH ₃	Т. пл. 133—134°	CH ₃	Т. пл. 80—82°	110
γ -Аминобутирил- γ -амино- масляная		Т. пл. 146°	C_2H_5	Т. пл. 127°	113
δ -Аминовалерил- δ -амино- валериановая		Т. пл. 152—153°	C_2H_5	Т. пл. 97—98°	114
δ -Аминовалерил- <i>D,L</i> -ала- нин	CH ₃	Т. пл. 155°	CH ₃	Т. пл. 115°	114
ε -Аминокапроилглицин		Т. пл. 151°	C_2H_5	Т. пл. 105°	115
ε -Аминокапроил- <i>L</i> -лейцин	$(CH_3)_2CHCH_2$	Масло, $[\alpha]_D^{18} 20,4^\circ$ (CH ₃ COOH)	C_2H_5	Масло	115
ε -Аминокапроил- α -амино- масляная	C ₂ H ₅	Т. пл. 137°	C_2H_5	Т. пл. 89°	115

показывает, что из нитрофениловых эфиров дипептидов образуются не циклические соединения, а линейные полипептиды.

Полипептиды с большим молекулярным весом получены поликонденсацией тиофенилового эфира, α,γ -диметилового эфира γ -L-глутамил-L-глутаминовой кислоты при слабом нагревании⁹⁹. Выделенный полипептид после очистки давал положительные биуретовую и нингидриновую реакции. При помощи бумажной хроматографии авторы показали, что полученный полипептид полидисперсен и содержит высокомолекулярные фракции, остающиеся на стартовой точке после 36-часового хроматографирования.

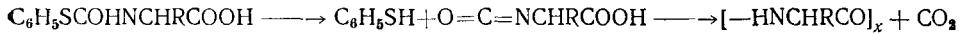
Из других работ по синтезу полипептидов из производных трипептидов интересна работа Вольмана, Галлопа и Патчорника¹⁰⁰, в которой окислением гидразида пролилглицилглицина бромсукцинимидом в диметилформамиде в присутствии триэтиламина получен полипептид с $M=1400$. Авторами предложен механизм реакции:



Метод довольно прост и может быть использован при отсутствии в исходном трипептиде боковых групп, чувствительных к окислению бромсукцинимидом.

3. Поликонденсация N-карботиофенилприводных α -аминокислот и олигопептидов

Ногучи^{101, 102} показал, что при нагревании N-карботиофениламино-кислот до 150—160° происходит отщепление тиофенола и двуокиси углерода с образованием олигопептидов сравнительно невысокого молекулярного веса:



Кроме полипептидов, продукты реакции содержат пiperазиндион-2,5 и другие побочные продукты. При поликонденсации в растворе (часто в присутствии пиридинина) образуются высокомолекулярные полипептиды с M , достигающим более 100 000.

Термической поликонденсацией N-карботиофениламино-кислот можно получать как однородные, так и смешанные полипептиды почти из всех нейтральных и основных аминокислот. Авторы допускают возможность отщепления тиофенола в результате межмолекулярного взаимодействия с последующим отщеплением двуокиси углерода от ангидрида с образованием полипептидной цепи:

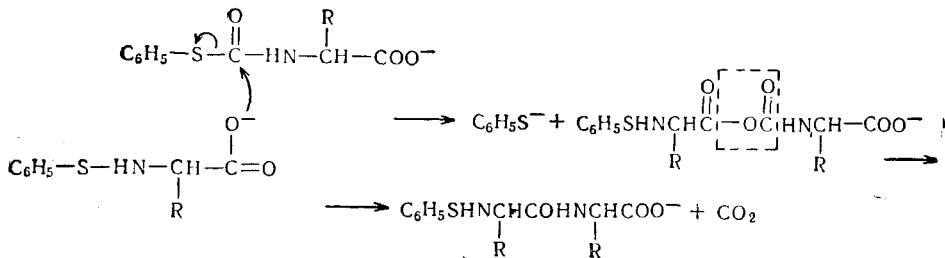


ТАБЛИЦА 10

Свойства полипептидов, полученных термической поликонденсацией N-карботиофениламинокислот: $C_6H_5SCOOHNCH(R)COOH$

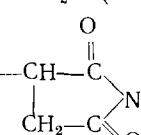
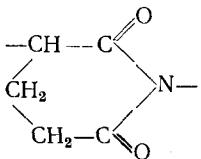
Наименование исходной аминокислоты	Формула структурного звена полипептида	Условия получения полипептида	Свойства полипептида	Ссылки на литературу
				1
2	3	4	5	
Глицин	$-HNCH_2CO$	В бензольном р-ре с пиридином 150 часов при 80°	$M_W=135\ 200^*$. Выход 91%	104
<i>D,L</i> -Аланин	$-HNCHCO$ CH_3	В бензольном р-ре с пиридином 1000 часов при 60°	$M_W=22\ 400$. Выход 69,6%	105
β -Аланин	$-HNCH_2CH_2CO$	В бензольном р-ре с пиридином 1000 часов при 60°	$M_W=37\ 300$. Выход 38,2%	108
То же	$-HNCH_2CH_2CO$	В расплаве при 120° 20 часов и 3 часа при 165° в вакууме	$M_W=43\ 500$. Выход 93,5%. Хорошо адсорбирует $FeCl_3$ в $HCOOH$	108
<i>D,L</i> -Фенилаланин	$-HNCHCO$ $CH_2C_6H_5$	В бензольном р-ре с пиридином 200 часов при 80°	$M_W=59\ 400$. Выход 38%	103
<i>L</i> -Фенилаланин		В диоксане 1000 часов при $60-70^\circ$	$M_W=16\ 800$, $[\alpha]_D^{18} 24,4^\circ$ ($ClCH_2COOH$)	121
<i>D,L</i> -Валин	$-HNCHCO$ $CH(CH_3)_2$	В диоксане 1000 часов при $60-70^\circ$	$M_W=17\ 600$	121
<i>L</i> -Валин	$-HNCHCO$ $CH(CH_3)_2$	В диоксане 1000 часов при $60-70^\circ$	$M_W=12\ 300$, $[\alpha]_D^{18} 29,3^\circ$ ($ClCH_2COOH$)	121
<i>L</i> -Лейцин	$-HNCHCO$ $CH_2CH(CH_3)_2$	В бензоле 670 часов при 80°	$M_W=26\ 889$. Выход 63%	106
<i>L</i> -Аспарагиновая		В расплаве при 140° 30 часов в вакууме	$M_W=1500$. Выход 71 %	119

ТАБЛИЦА 10 (продолжение)

1	2	3	4	5
<i>L</i> -Глутаминовая		В расплаве при 180° 20 часов в вакууме	$M_W=2100$	120
<i>D,L</i> -Метионин	$\begin{array}{c} -\text{HNCHCO}- \\ \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3 \end{array}$	В диоксане 1000 часов при 60—70°	$M_W=10\,500$. Выход 38,7%	121
<i>L</i> -Метионин	$\begin{array}{c} -\text{HNCHCO}- \\ \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3 \end{array}$	В диоксане 1000 часов при 60—70°	$M_W=23\,700$, $[\alpha]_D^{10}+2,6^\circ$ (ClCH_2COOH)	121
ξ -Аминокапроновая	$-\text{HN}(\text{CH}_2)_5\text{CO}-$	В расплаве 130° 23 часа и затем в вакууме при 160°	$M_W=26\,000$. Выход 77%. $[\eta]=0,194$ в 1:1 $\text{AcOH}+\text{ClCH}_2\text{COOH}$	109
<i>O</i> -Бензилсерин	$\begin{array}{c} -\text{HNCHCO}- \\ \\ \text{CH}_2\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	В бензоле с пиридином 150 часов при 70°	$M_W=4900—5300$, т. пл. 185—190°, легко дебензилируется НВг в диоксане до поли- <i>D,L</i> -серина	116
εN -Карбобензокси- <i>D,L</i> -лизин	$\begin{array}{c} -\text{HNCHCO}- \\ \\ (\text{CH}_2)_4 \\ \\ \text{NHCOOCH}_2\text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	В бензоле с пиридином 400 часов при 70°	$M_W=4000$. Выход 48%	117
<i>L</i> -Нитроаргинин	$\begin{array}{c} -\text{HN}-\text{CHCO}- \\ \\ (\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{N})\text{NH} \end{array}$	В диоксане с пиридином 16 дней при 70°	$M_W=1040$, $[\alpha]_D^{13}-14,1^\circ$	118
Глицин+ <i>L</i> -лейцин	$\begin{array}{c} -\text{HN}-\text{CH}_2\text{COHNCH}-\text{CO}- \\ \\ \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2 \end{array}$	В диоксане с пиридином 1000 часов при 60°	Сополимер ~1:1. $M_W=11\,457$. Выход 36%	106
<i>L</i> -лейцин+ <i>D,L</i> -фенилаланин	$\begin{array}{c} -\text{HNCHCOHNCHCO}- \\ \\ \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	В бензольном р-ре 1000 часов при 60°	Сополимер. $M_W=16\,000$. Выход 47,8%	106

<i>L</i> -Лейцил- <i>L</i> -аланин	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ -\text{HNCHCOHNCHCO}- \\ \\ \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2 \end{array}$	В диоксане 1500 часов при 60—70°	$M_W=14\ 300$. Выход 24,6%	111
Глицил- <i>DL</i> -аланин	$\begin{array}{c} \\ \\ -\text{HNCH}_2\text{COHNCH}(\text{CH}_3)\text{CO}- \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	В диоксане с пиридином 1000 часов при 60°	$M_W=34\ 813$	107
Глицил- <i>DL</i> -фенилаланин	$\begin{array}{c} \\ \\ -\text{HNCH}_2\text{COHNCHCO}- \\ \\ \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	В диоксане с пиридином 1000 часов при 60°	$M_W=30\ 603$	107
Глицил- <i>L</i> -лейцин	$\begin{array}{c} \\ \\ -\text{HNCH}_2\text{COHNCHCO}- \\ \\ \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2 \end{array}$	В диоксане с пиридином 1000 часов при 60°	$M_W=38\ 000$	107
β -Аланил- <i>DL</i> -аланин	$\begin{array}{c} \\ \\ -\text{HNCH}_2\text{CH}_2\text{COHNCH}(\text{CH}_3)\text{CO}- \end{array}$	В диоксане при 135° 27 часов и 2 часа при 150° в вакууме	$M_W=26\ 100$. Выход 52%	108
ϵ -Аминокапроил- <i>L</i> -фенилаланин	$\begin{array}{c} \\ \\ -\text{HN}(\text{CH}_2)_5\text{COHNCHCO}- \\ \\ \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	В диоксане при 130—140° 30 часов	Сополимер $M_W=51\ 200$. Выход 79%	109
ϵ -Аминокапроил- <i>DL</i> -аланин	$\begin{array}{c} \\ \\ -\text{HN}(\text{CH}_2)_5\text{CONHCHCH}_3\text{CO}- \end{array}$	В диоксане при 135° 27 часов и 2 часа при 150° в вакууме	Сополимер $M_W=65\ 000$. Выход 82,8%. Сополимер обладает обратимой тепловой денатурацией, достигающей максимума при 50°. Термоплота денатурации 45 ккал/моль	110, 112
γ -Аминомасляная к-та	$-\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{CO}-$	В диоксане при 70° 1,7 часа	$M_W=15\ 000$ (AcOH). Т. пл. 230°. Выход 28,6%	113
γ -Аминобутирил- γ -аминомасляная к-та	$-\text{HN}(\text{CH}_2)_3\text{COHN}(\text{CH}_2)_3\text{CO}-$	В диоксане при 140° 100 часов	$M_W=16\ 500$	113
γ -Аминобутирил- <i>DL</i> -аланин	$-\text{HN}(\text{CH}_2)_3\text{COHNCHCH}_3\text{CO}-$	В диоксане при 140° 100 часов	Сополимер $M_W=71\ 500$	113
δ -Аминовалериол- δ -аминовалериановая	$-\text{HN}(\text{CH}_2)_4\text{COHN}(\text{CH}_2)_4\text{CO}-$	В диоксане при 140° 100 часов	$M_W=13\ 100$. Выход 69,5%	114

ТАБЛИЦА 10 (продолжение)

1	2	3	4	5
δ-Аминовалериол- <i>D,L</i> -аланин	—HN(CH ₂) ₄ COHNCHCH ₃ CO— —HN(CH ₂) ₅ COHNCH ₂ CO—	В диоксане при 140° 100 часов В диоксане 100 часов при 140° в ат- мосфере CO ₂	Сополимер $M_W = 26\ 000$ Сополимер $M_W = 19\ 300$	114 115
ε-Аминокапронилглицин	—HN(CH ₂) ₆ COHNCHCO— CH ₂ CH(CH ₃) ₂	В диоксане 100 часов при 140° в ат- мосфере CO ₂	Сополимер $M_W = 22\ 300$ $[\eta] = 0,257$ (30° в CH ₃ COOH), $[\alpha]_D^{16} 32,7^\circ$	115
ε-Аминокапронил- α -аминомасляная	—HN(CH ₂) ₆ COHNCH(C ₂ H ₅)CO—	В диоксане 100 часов при 140° в ат- мосфере CO ₂	Сополимер $M_W = 34\ 900$ $[\eta] = 0,3$ (30° в CH ₃ COOH). Обладает обра- зимой тепловой денатурацией в вод- ных растворах	115

* M_W — средневесовой молекулярный вес.

В табл. 9 и 10 приведены полипептиды, полученные этим методом, и некоторые свойства исходных N-карбоботиофениламинокислот и полипептидов.

Приведенные в табл. 8 и 9 данные указывают на возможность широкого использования метода поликонденсации N-карбоботиофенилпроизводных аминокислот для получения D,L-полипептидов. При использовании производных дипептидов можно ожидать получения полипептидов с известным чередованием остатков аминокислот.

Однако, как показано Веймоутсом¹²², метод имеет ряд недостатков. При получении полиглицина в описанных условиях образуются значительные количества пиперазиндиона-2,5, выделяющегося на стенках сосуда в количестве более 20% от веса продукта. Обычно ~50% остатка растворимо в горячей воде, и сравнение вязкости растворов этих полимеров с вязкостью растворов аналогичных образцов полиглицина, для которых определены концевые группы, дает значение молекулярного веса в пределах 1000—2500. Ногучи и сотрудники определили молекулярный вес для полиглицина подобной вязкости 135 000¹⁰⁴.

Проверив данные Ногучи по поликонденсации тиокарбонилфенилаланина и саркозина, автор делает вывод, что при поликонденсации N-карбоботиофениламинокислот имеет место образование полипептидов сравнительно низкого молекулярного веса. Кроме того нет никаких доказательств, что эти полимеры являются чисто линейными полипептидами.

Из других N-замещенных аминокислот описана поликонденсация N-карбобензокси-¹²³ и карбофеноксипроизводных аминокислот¹²⁴, в том числе с различными заместителями в фенильном кольце.

Ишизука и Сайто¹²⁵ установили, что наиболее подходящей средой для поликонденсации карбофеноксипроизводных аминокислот является нитробензол. В этом случае значительно сокращается время поликонденсации, и образующийся полипептид имеет более высокий молекулярный вес (см. табл. 11).

ТАБЛИЦА II

Поликонденсация $\text{XC}_6\text{H}_4\text{OCOHNCH}(\text{CH}_3)\text{COOH}$

X	Среда	Температура, °C	Время, часы	Выход, %	Приведенная вязкость*
H	Пиридин — бензол	80	10 000	83,4	0,134
H	Пиридин — толуол	100	50	92,8	0,150
H	Нитробензол	100	16	87,1	0,286
H	То же	120	4,5	96,8	0,274
H	» »	125	8	73,6	0,367
<i>o</i> -CH ₃	» »	110	30	79,0	0,280
<i>p</i> -CH ₃	» »	110	56,5	82,0	0,295
<i>o</i> -NO ₂	Пиридин — толуол	100	8,0	85,3	0,113
<i>o</i> -NO ₂	Нитробензол	100	12,0	62,7	0,419
<i>p</i> -NO ₂	Пиридин — толуол	100	36,0	57,4	0,155
<i>p</i> -NO ₂	Нитробензол	100	12,0	38,4	0,203

* Вязкость определялась для 0,2%-%ного р-ра в 80%-ной дихлоруксусной к-те.

Поликонденсацией N-карбо-*o*-нитрофеноксипроизводных аминокислот и дипептидов этим методом Ишизука^{126–128} получил полилейцин ($M=14\ 000$), поли-*D*, *L*-фенилаланин ($M=12\ 000$), полиглицин ($M=14\ 000$), а также полиаланилглицин ($M=28\ 500$), полиглицилаланин ($M=14\ 000$), поли-*D*, *L*-фенилаланин ($M=12\ 000$), полиглицин ($M=$

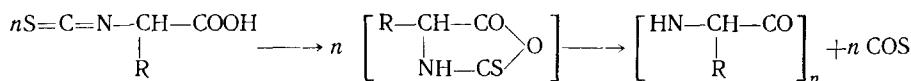
При поликонденсации N-карбо-*p*-метилфеноксаминокислот в смеси бензола с толуолом в запаянной трубке при 60° в течение 1200 часов были получены полиглицин ($M=10\ 500$), поли-*D*, *L*-фенилаланин ($M=17\ 600$), поли-*L*-лейцин ($M=11\ 000$), поли- α -аминомасляная кислота ($M=18\ 300$). Молекулярные веса определены осмометрическим методом в дихлоруксусной кислоте¹²⁹. Полилейцин с приведенной вязкостью 0,28 получен поликонденсацией N-карбофеноокси-*L*-лейцина в нитробензоле при 125° в течение 20 часов¹³⁰.

Брукнер, Шекерка и Ковач⁹⁸ получили высокомолекулярный полипептид из α , γ -диметилового эфира карбобензокси- γ -*L*-глутамил-*L*-глутаминовой кислоты. Исходный дипептид обрабатывали этилхлорформиатом в присутствии триэтиламина. После гидрогенолиза карбобензоксигруппы над палладиевым катализатором отфильтровывали катализатор, а раствор смешанного ангидрида дипептида делили на две части. Первая половина оставлялась на 24 часа при комнатной температуре, затем в вакууме отгоняли растворитель и остаток нагревали 1 час в вакууме. Вторую часть раствора обрабатывали также после добавления триэтиламина. Для выделения свободной поликислоты полученные полипептиды обрабатывали на холода щелочью и очищали через медную соль с последующим диализом. Молекулярный вес полипептида, полученного без триэтиламина, — 12 180, с триэтиламином — 20 000.

Полипептиды очень прочно удерживают воду и после сушки над пятиокисью фосфора в вакууме при комнатной температуре содержат одну молекулу воды на остаток глутаминовой кислоты. Оба продукта — бесцветные порошки, легко растворимые в воде с положительной биуретовой и слабой нингидриновой реакциями.

Активирование аминогруппы может быть достигнуто также при обработке аминокислот изоцианатами. Образующийся амид алкилкарбаминовой кислоты общей формулы: R₁NCONHCR₂COOH, где R₁ — трет-алкил, распадается при температуре выше 175° с образованием полипептида с выходом более 80%. Степень поликонденсации полученных таким образом полипептидов достигает 100¹³¹.

Представляет интерес получение полипептидов поликонденсацией тиоизоцианатов алифатических карбоновых кислот, получающихся при обработке α -аминокислот сероуглеродом с последующим разложением дитиокарбаминовых производных сулемой¹³². Однако в этом случае предполагается, что при нагревании тиоизоцианата происходит образование N-тиокарбангидрида и его полимеризация, а не отщепление заместителя у атома азота.



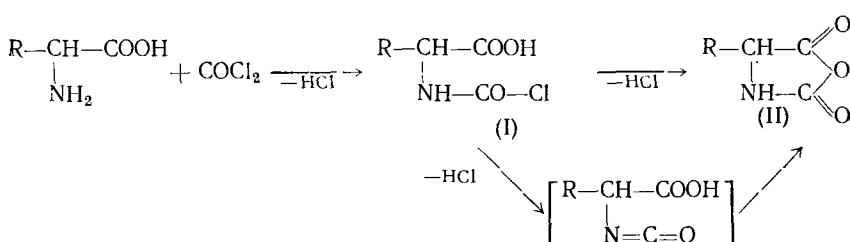
IV. СИНТЕЗ ПОЛИПЕПТИДОВ ПОЛИМЕРИЗАЦИЕЙ N-КАРБОКСИАНГИДРИДОВ α -АМИНОКИСЛОТ

1. Получение N-карбоксиангидридов α -аминокислот

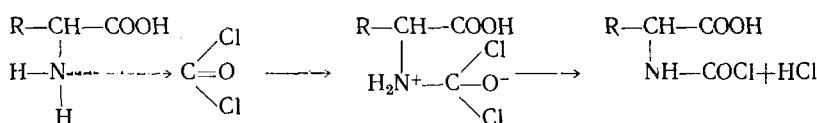
Чаще всего полипептиды получаются полимеризацией N-карбоксиангидридов α -аминокислот, позволяющей синтезировать полимеры с заданным молекулярным весом, изменяющимся в очень широких пределах, и полностью исключить рацемизацию аминокислот.

Наиболее распространенным методом получения циклических ангидридов N-карбокси- α -аминокислот или N-карбоксиангидридов α -аминокислот является предложенное Фуксом¹³³, Фартингом¹³⁴ и Леви¹³⁵ фосгенирование мелкоизмельченных аминокислот, их хлоргидратов или натровых солей, сuspendedированных в инертном растворителе (диоксан, этилацетат) при 30—50°. Можно проводить реакцию при одновременном добавлении эквивалентных количеств раствора фосгена в диоксане и взвеси аминокислоты в диоксане к избытку растворителя¹³⁶. N-карбоксиангидриды и их тиоаналоги получаются также при нагревании хлоргидратов аминокислот с COCl_2 или CSCl_2 в нитробензоле¹³⁷.

Реакция α -аминокислот с фосгеном протекает по схеме:



Первая стадия — образование N-замещенного карбамилхлорида (I) начинается с нуклеофильной атаки карбонильного углерода фосгена аминным азотом:

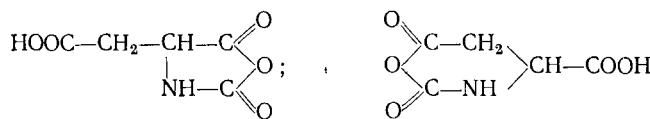


Скорость этого процесса должна возрастать по мере усиления электронодонорного эффекта группы R аминокислоты, приводящего к увеличению основности аминогруппы. Это предположение хорошо согласуется с наблюдаемым увеличением скорости фосгенирования в ряду: глицин < аланин < α -аминомасляная кислота \approx фенилаланин < норлейцин < лейцин < изолейцин < псевдолейцин (C -трет.-бутилглицин), где заместитель R меняется от H до $(CH_3)_3C$ ^{138, 139}.

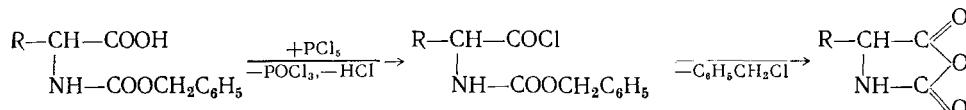
Предварительное насыщение диоксана SO_2 ¹⁴⁰, а также небольшие добавки уксусного ангидрида ускоряют фосгенирование, в то время как загрязнения могут в значительной степени его замедлить¹³⁸.

Стадия циклизации карбамилхлорида (I) в N-карбоксиангидриды аминокислоты (II) проходит самопроизвольно и только в случае пролина и его производных, где замыкание второго кольца связано с возникновением больших напряжений в молекуле, требуется дополнительная обработка карбамилхлорида триэтиламином¹⁴¹ или окисью серебра^{142, 143}.

При синтезе N-карбоксиангидридов трифункциональных аминокислот необходимо защищать функциональные группы, способные реагировать с фосгеном¹⁴⁴. При отсутствии защиты аспарагиновая кислота дает смесь 5- и 6-членных N-карбоксиангидридов¹⁴⁵:



N-карбоксиангидриды получаются также при обработке N-карбокси- и особенно N-карбобензоксизамещенных α -аминокислот хлористым тионилом, пятихлористым или трехбромистым фосфором по схеме:



Этот метод³ обычно применяется для β -аминокислот, образующих способные полимеризоваться шестичленные N-карбоксиангидриды¹⁴⁶.

Интересен метод получения N-карбоксиангидридов различных аминокислот^{149, 150} взаимодействием тионилхлорида или фосгена с динатриевой солью N-карбоксиаминокислоты, легко получающейся из соды и аминокислоты или при одновременном воздействии метилата натрия и CO_2 на аминокислоту^{134, 147, 148}.

Синтез N-карбоксиангидридов из малонового эфира^{151, 152} пригоден лишь для получения рацемических продуктов и не применялся в последние годы.

Для получения высокомолекулярных полипептидов можно использовать только тщательно очищенные N-карбоксиангидриды, которые при получении фосгенированием α -аминокислот обычно загрязнены дихлорангидридом N-карбокси- α -аминокислоты (III) и образующимся из него изоцианатом (IV):

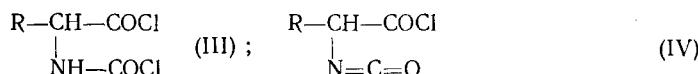


ТАБЛИЦА 12

Синтез N-карбоксиангидридов α -аминокислот, не вошедших в монографию⁴ и обзор⁵

Наименование исходной α -аминокислоты	Метод получения	Метод очистки	Т. пл., °C	Ссылка на ли- тературу				
				1	2	3	4	5
Глицин	фосгенирование			138, 140				
То же	Na-соль N-карбоксиглицина+SOCl ₂	возгонка		150				
Саркозин	Na-соль N-карбоксисарко- зина+SOCl ₂	то же		150				
C-Фенилглицин, D,L	Na-соль N-карбоксифенил- глицина+SOCl ₂	» »		150				
C-(<i>p</i> -нитрофенил)-глицин, D,L	фосгенирование	этилацетат	135	150				
C-пропаргил-глицин, D,L	то же	тетрагидрофуран— петрол. эфир	125—127	299				
Аланин, D,L	» »		42—44	138, 140				
Дегидроаланин	N-карбобензокс-дегидро- аланин+PCl ₅	этилацетат—пет- рол. эфир, возгон- ка	111—113	303				
Фенилаланин, D, L	фосгенирование		.26	138, 279				
То же	Na-соль N-карбоксифенил- аланина+SOCl ₂	возгонка		150				
» »	N-карбобензоксифенилала- нин+PCl ₅	эфир	123—125 (разл.)	173				
α -Аминомасляная, D,L	фосгенирование		112—113	138				
Валин, D,L	то же			140				
То же	N-карбобензоксивалин+ +PCl ₅	эфир	80—81 (разл.)	173				
Норвалин, D,L	N-карбобензоксиворва- лин+PCl ₅	эфир	67—69 (разл.)	173				
Лейцин, L	фосгенирование			138				
То же, D,L	N-карбобензоксилейцин+ +PCl ₅	эфир	48—50	173				
Норлейцин, D,L	N-карбобензоксирорлей- цин+PCl ₅	эфир	78—80	173				
То же	фосгенирование		79	138				
Изолейцин, D,L	то же		70—71	138				
Псевдолейцин, D,L	» »		120	138				
Пролин, L	фосгенирование, обработка (C ₂ H ₅) ₃ N	этилацетат или воз- гонка	45	141				
Серин, D,L	фосгенирование	этилацетат—гексан	82—83	286				
То же,	то же	бензол	115 (разл.)	286				
O-Ацетилсерин, D,L	» »	этилацетат—гексан	62,5— —63,5 (разл.)	286				
То же, L	» »	то же	50—51	286				
O-Бензилсерин, L	» »	эфир—петрол. эфир	72 (разл.)	301				
O-Бензилтирозин, L	» »		142 (разл.)	308				
O-Карбобензокситирозин, L	» »			140				
O-Фенилгомосерин, D,L	» »	этилацетат—пет- рол. эфир	105—106	310				
То же	N-карбобензокси-O-фенил- гомосерин+PCl ₅	то же	105	310				
ϵ N-Карбобензоксилизин, L	фосгенирование	этилацетат—гексан	101— —101,5	281				
То же	то же		98,5— —99,5	140				

ТАБЛИЦА 12 (продолжение)

1	2	3	4	5
То же, D,L	фосгенирование		100	305
δN-Карбобензоксиорнитин, L	»		86	307
β-Бензиласпарагинат, L	»	дихлорэтан	126	297
То же	»	этилацетат—гексан	127—128	144
» »	3-бензил-N-карбобензоксиаспарагинат + PCl_5	то же	127—128	144
» » D,L	фосгенирование дibenзилового эфира	» »	126—127,5	144
β-p-Нитробензил-аспарагиновая кислота, L	фосгенирование			302
β-Пептидоаспаргиновая кислота, D,L	то же			300
γ-Этилглутамат, L	N-карбобензокси-γ-этилглутамат + SOCl_2	этилацетат		182
δ-Метил-α-аминоадипинат, D,L	фосгенирование	хлороформ—петрол. эфир	94—95	309
Метионин, D,L	то же			138
S-Метилцистеин, L	» »	этилацетат—петрол. эфир	74	311
S-Этилцистеин, L	» »		69	311
S-Пропилцистеин, L	» »			311
S-Изопропилцистеин, L	» »			311
S-Бутилцистеин, L	» »	этилацетат—петрол. эфир	55—56	311
S-Пентилцистеин, L	» »			311
S-Гексилцистеин, L	» »	эфир—петрол. эфир	42—43	311
S-α-Метилнафтилцистеин, L	» »	этилацетат—петрол. эфир	105	311
S-Додецилцистеин, L	» »	то же	66—67	311
S-Бензилцистеин, L	» »			298
S-Фенилцистеин, L	» »			298
S-p-толилцистеин, L	» »			298
S-Фенилмеркаптоцистеин, L	фосгенирование	этилацетат—петрол. эфир	117—119	304
γ-Бензиловый эфир S-карбоксицистеина, L	то же			306
δ-Бензиловый эфир S-карбоксиметилцистеина, L	» »		109	306
ε-Бензиловый эфир S-карбоксигидроцистеина, L	фосгенирование			306
Моно-N-карбобензоксицистеин, L	то же	эфир—петрол. эфир	30—32	312
Моноэтиловый эфир N-ацетиллантионина	» »			312
Монобензиловый эфир N-карбобензоксилантинина	» »			312
S-Карбобензоксигомоцистеин, D,L	» »	эфир—петрол. эфир	75—76	313
S-Бензилгомоцистеин, D,L	» »	то же	95—96	313
S-Бензилгомоцистеин, D,L	» »	» »	57	313
S-Этилгомоцистеин D,L	» »			313
S-Пропилгомоцистеин, D,L	» »			313
S-Бутилгомоцистеин, D,L	» »			313
S-Алилигомоцистеин, D,L	» »			313

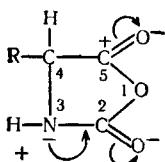
Однако загрязнения легко удаляются при перекристаллизации¹⁵³ и при возгонке в глубоком вакууме. Описано удаление хлорсодержащих примесей обработкой раствора N-карбоксиангидрида в этилацетате со-полимером этил-β-(формил-N-метиламино)-акрилата с дивинилбензолом¹⁵⁴. Хранят N-карбоксиангидриды при температуре не выше —30°.

N-карбоксиангидриды, синтез которых был описан за последние годы, приведены в табл. 12.

Количественное определение N-карбоксиангидридов проводят титрованием их в неводной среде метилатом натрия^{155, 156}, или определением выделяющейся при их кислотном гидролизе двуокиси углерода^{157, 158}, которая поглощается этанольно-диоксановым раствором бензиламина, образующим бензиламмонийную соль N-бензилкарбаминовой кислоты, и титруется раствором NaOCH₃ с тимоловым синим в качестве индикатора.

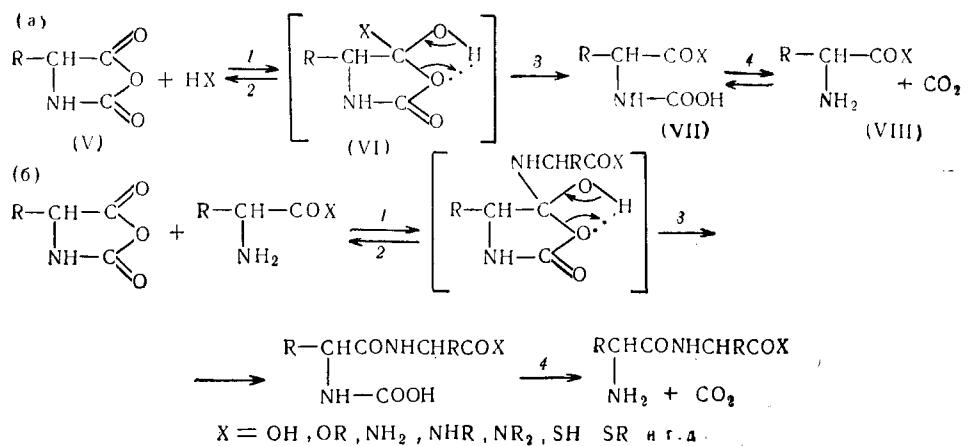
2. Химические свойства N-карбоксиангидридов α -аминокислот

Н-карбоксиангидриды — чрезвычайно реакционноспособные вещества. По строению они представляют собой оксазолидинионы-2,5, замещенные в положение 4.



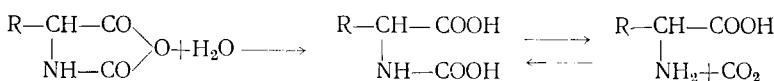
Электроотрицательность атомов кислорода обуславливает появление частичных положительных зарядов на углеродном атоме 5 и атоме азота, что выражается в ослаблении связи N—H и в значительно более высокой активности карбонильного углерода 5 к нуклеофильным реагентам по сравнению с C-атомом 2. Действительно, наиболее характерны для N-карбоксиангидридов реакции нуклеофильного присоединения по карбонильному C-атому 5 и реакции с участием NH-группы.

Взаимодействие с нуклеофильными реагентами HX обычно проходит по схеме:



Образующееся в результате реакции соединение (VIII), обладает свободной аминогруппой и может реагировать с другой молекулой N-карбоксиангидрида подобно любому нуклеофильному реагенту. Поэтому в присутствии большого избытка N-карбоксиангидрида эта реакция приводит к образованию полипептида. С избытком NH образуются лишь соединения типа (VIII).

При взаимодействии с водой, в которой многие N-карбоксиангидриды хорошо растворимы, при низких температурах устанавливается равновесие^{3, 159–162}:

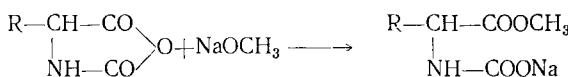


Показано, что разложение N-карбоксиангидридов водой катализируется основаниями и кислотами¹⁶³.

Сероводород, спирты, фенолы и меркаптаны реагируют в присутствии триэтиламина^{164, 165} аналогично воде с образованием соответственно α -аминотиокислот, эфиров и тиоэфиров.

Безводный хлористый водород в инертной среде дает с N-карбоксиангидридами хлоргидраты хлораангидридов аминокислот^{166, 167}, а в спиртовой среде ускоряет алкоголиз, что было использовано для получения эфиров различных α -аминокислот^{168–172}.

Алкоголиз ускоряется также алкоголятами, на чем основано титрование N-карбоксиангидридов метилатом натрия¹⁵⁵:



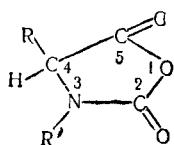
Первичные и вторичные амины как нуклеофильные реагенты, реагируют с N-карбоксиангидридами по приведенной схеме (а), с образованием пептидов и амидов аминокислот^{133, 173–177}. Тиоаналоги N-карбоксиангидридов способны к образованию и ряда других продуктов¹⁷⁸.

Скорость взаимодействия с нуклеофильными реагентами уменьшается с понижением их основности в ряду: OCH_3 , OH , RNH_2 , ArNH_2 , ROH , HOH . При реакции с последними тремя членами ряда образующаяся после их присоединения свободная аминогруппа имеет более сильный нуклеофильный характер и охотно реагирует со свободными молекулами N-карбоксиангидридов по схеме (б) с образованием олигомеров и полимеров даже в присутствии избытка перечисленных реагентов¹⁷⁵.

Скорость реакции зависит также от характера N-карбоксиангидрида и будет тем больше, чем больше частичный положительный заряд на карбонильном С-атоме 5 и чем меньше стерические затруднения для атакующего нуклеофильного реагента. Поэтому активность и скорость полимеризации N-карбоксиангидрида уменьшается с увеличением электронодонорного эффекта и особенно размера заместителя R в ряду: глицин, аланин, α -аминомасляная кислота, фенилаланин, норлайцин, лейцин, изолейцин, псевдолейцин, α -метилаланин^{138, 139, 179}.

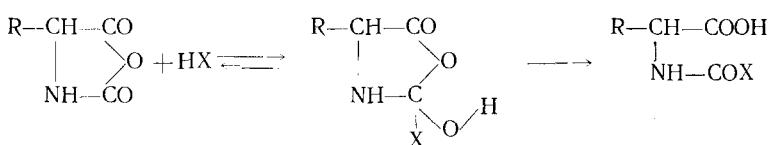
Большое влияние пространственных факторов на скорость взаимодействия N-карбоксиангидридов с первичными и вторичными аминами было показано Баллардом и Бамфордом¹⁷⁹. Обычно пятичленное кольцо N-карбоксиангидрида с атомами азота и кислорода и двумя тригональными атомами углерода плоское и неизогнутое, а R в зависимости от асимметрии С-атома 4 находится по ту или иную сторону

его. В случае N-замещенных ангидридов заместитель у азота R' располагается в *транс*-положение по отношению к R.



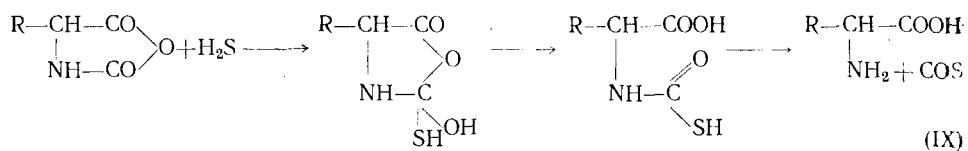
Атакующий реагент приближается к C-атому 5 со стороны, противоположной карбонильному кислороду, по линии, проходящей под небольшим углом к плоскости кольца в непосредственной близости от атома азота. Наличие заместителей R и R' создает большие стерические затруднения для атаки как с той, так и с другой стороны кольца, особенно для громоздких нуклеофильных реагентов, таких как вторичные амины, и резко снижает скорость реакции. В N-карбоксиангидридах пролина и его производных оба заместителя находятся по одну сторону плоскости кольца, что обуславливает более высокую скорость взаимодействия их с вторичными аминами.

Аналогично вторая карбонильная группа также может реагировать с нуклеофильными реагентами по схеме:



с образованием в случае спиртов, меркаптанов и аминов соответственно уретанов, тиоуретанов и производных мочевины. Однако, благодаря меньшему положительному заряду на C-атоме 2, энергия активации этой реакции значительно выше и ее роль повышается лишь с ростом температуры, концентрации и силы нуклеофильного реагента; заметное влияние могут оказывать и стерические факторы.

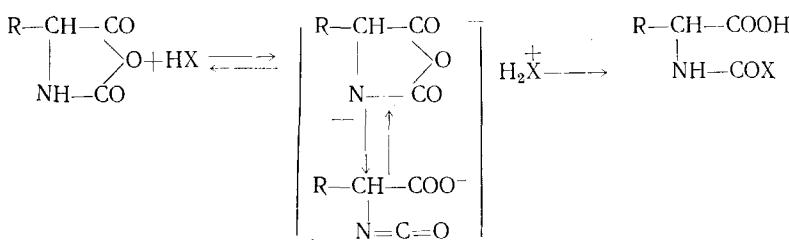
Присоединение по карбонилу 2 принято называть «ошибочным», приводящим к исчезновению аминогруппы на конце растущей цепи и прекращению реакции полимеризации. Возможность такой реакции была подтверждена Бергером¹⁵⁵, который наблюдал образование уретана при реакции N-карбоксиангидрида фенилаланина с раствором метилата натрия. Виланд и Ойлер¹⁶⁵ при взаимодействии N-карбоксиангидридов с сухим сероводородом в присутствии триэтиламина получали α -аминотиокислоты, всегда загрязненные α -аминокислотами, образование которых может быть объяснено разложением соответствующих тиокарбаминовых кислот (IX):



При большом избытке аминов присоединение по карбонилу 2 может проходить в значительной степени^{180, 181}, но количество продуктов

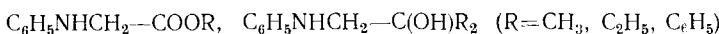
нормального присоединения быстро увеличивается с уменьшением концентрации и основности амина¹⁸⁰.

Однако, N-карбоксиангидрид саркозина присоединяет даже такие сильные нуклеофильные реагенты, как ион метилата, только по карбонильной группе 5¹⁸¹. Возможно, для образования соединений типа: RCH(COOH)NHCOX нужен атом водорода у атома азота. В этом случае нуклеофильная атака может проходить не только по карбонильному углероду 2, но и по атому водорода с образованием производных карбаминовой кислоты через стадию изоцианата^{165, 181}:

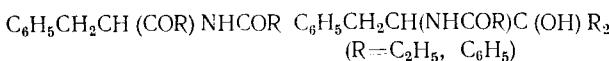


Увеличение сродства основания HX к протону должно способствовать этой реакции, что хорошо согласуется с экспериментальными данными^{181, 182}.

Активная роль NH-группы ярко проявляется при взаимодействии N-карбоксиангидридов с реактивами Гриньяра¹⁸³. В случае N-замещенных N-карбоксиангидридов карбонильная группа 2 не реагирует с RMgHal и N-карбоксиангидрид N-фенилглицина дает лишь соединения:



В то же время N-карбоксиангидрид фенилаланина в тех же условиях образует N-ацилированные аминокетоны и аминоспирты:



Из других реакций N-карбоксиангидридов, не имеющих отношения к их полимеризации, описано их восстановление алюмогидридом лития¹⁸⁴ и применение для синтеза по Фриделю-Крафтсу^{185, 186}.

3. Полимеризация N-карбоксиангидридов α -аминокислот *

N-карбоксиангидриды легко полимеризуются как в блоке, так и в растворе. Молекулярный вес и полидисперсность образующегося полипептида определяются характером инициатора и условиями полимеризации. Блочную полимеризацию проводят обычно при повышенных температурах и получают низкомолекулярные продукты. Для полиме-

* Следует отметить, что полимеризация N-карбоксиангидридов значительно отличается от классических примеров полимеризации и поликонденсации. Ее скорее можно было бы назвать полиприсоединением с последующим отщеплением части молекулы мономера.

ризации в растворе, протекающей при низких температурах, применяют инертные растворители, а в качестве инициаторов — амины, алкоголяты, щелочи или воду. Инициаторы и ингибиторы полимеризации радикального типа не оказывают влияния на полимеризацию N-карбоксиангидридов^{187, 188}.

Первичные и вторичные амины дают полимеры со степенью полимеризации до 200 в зависимости от количества амина.

Используя избыточные количества эфиров аминокислот в реакции с N-карбоксиангидридами удается получать дипептиды^{175, 189, 190}. Однако в этом случае трудно избежать образования высших олигопептидов¹⁹¹ и производных мочевины¹⁹². При низких температурах (-40°) в присутствии триэтиламина, стабилизирующего образующуюся в результате первого акта присоединения карбаминовую кислоту (VII) путем солеобразования, удалось синтезировать ди- и трипептиды с хорошими выходами^{193–198}. Для такого рода ступенчатого синтеза полипептидов перспективно использование и тиоаналогов N-карбоксиангидридов¹⁷⁸.

Наибольший молекулярный вес полипептидов получается при полимеризации N-карбоксиангидридов в присутствии третичных аминов, алкоголятов и гидроокисей щелочных металлов.

Однако воспроизводимость результатов и величина молекулярного веса полипептида зависят также от чистоты исходных соединений и растворителей. Случайные примеси, например, ионы хлора, в количестве $\sim 0,01\%$ могут полностью искажить результаты опыта¹⁹⁹.

Из-за невозможности определять примеси в таких количествах обычными методами, рекомендуется проверять чистоту N-карбоксиангидридов полимеризацией их в стандартных условиях. Так, Идельсон и Блаут²⁰⁰ считали N-карбоксиангидрид γ -бензил-L-глутамата чистым, если он при комнатной температуре в 4%-ном диоксановом растворе давал полимер с молекулярным весом не ниже 360 000, с метилатом натрия в качестве инициатора при $[I_0]/[M_0]$ (см. ниже), равным 1:200.

Полимеризация N-карбоксиангидридов ингибируется большим числом соединений: борной и дихлоруксусной кислотами²⁰¹, хлористым водородом²⁰², альдегидами^{203, 204}, фенилизоцианатом, уксусным ангидридом и т. д. Кислоты ингибируют реакцию²⁰⁵, даже если она инициирована неорганическими солями^{206, 207}. Ацетилхлорид, тионилхлорид, $AlCl_3$ и др. полностью ингибируют полимеризацию N-карбоксиангидрида глицина в количествах до 0,2 моль%²⁰⁸.

Перечень полипептидов, полученных в различных условиях полимеризацией N-карбоксиангидридов α -аминокислот, и некоторые их свойства приведены в табл. 13.

A. Полимеризация в блоке

N-карбоксиангидриды устойчивы лишь при температуре ниже -30° . При комнатной температуре под действием влаги воздуха N-карбоксиангидриды глицина^{3, 174, 210}, L-аланина²¹¹, L-лейцина^{209, 211}, С-фенилглицина и фенилаланина²⁰⁹ превращаются в полимеры. Скорость полимеризации определяется их строением и температурой. Механизм полимеризации кристаллических N-карбоксиангидридов, инициированный влагой воздуха, еще не известен. Форма кристалла остается неизменной в процессе полимеризации и лишь рентгеноструктурный анализ позволяет наблюдать за изменением кристаллической решетки²¹². Из продуктов полимеризации N-карбоксиангидрида сарказина Вессели и Зигмунд²¹³ выделили наряду с 7% полисарказина 4% 1,4-диметил-2,5-дикетопиперазина.

ТАБЛИЦА 13

**Получение полипептидов полимеризацией N-карбоксиангидридов
(примеры, не вошедшие в монографию⁴ и обзор⁵)**

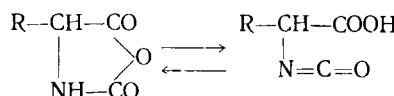
N-карбоксиангидрид	Растворитель	Инициатор	Мол. вес, полипептида	Удаление защитных групп	Ссылки на литературу
1	2	3	4	5	6
Глицин	диоксан	p-броманилин			227
То же	то же	вода			138
C-Пропаргилглицин, D,L	нитробензол	аммиак	n=32		299
Аланин, D,L		додециламин			229
То же	диоксан	вода			138
» »	тетрагидрофуран	метанол, ментол, борнесл, Al, Zn Cd, Li-соединения			295
То же, L и D	бензол	три-n-бутиламин			288
Дегидроаланин	толуол, пиридин	триэтиламин			315
Фенилаланин, D,L	диоксан	вода			138
То же	то же	NaOCH ₃	≤140000		279
» »	хлороформ	Na-OCH ₃	≤120 000		279
» »	хлороформ, бензоль	вода	≤70 000		279
α-Аминомасляная кислота, D,L	диоксан	вода			138
То же D,L и D	нитробензол	бензиламин			288
Лейцин, D,L и L	бензол	три-n-бутиламин			288
Норлейцин, изолейцин, псевдолейцин, D,L	диоксан	вода			138
Пролин, L	пиридин				141
То же	ацетонитрил	NaOCH ₃	50 000— —90 000		316
O-Ацетилоксипролин, L	ацетонитрил			NH ₃ или NaOCH ₃	143
Серин, L	нитробензол	NaOCH ₃			286
O-Ацетилсерин, L	то же	триэтиламин		NaOCH ₃	286
То же, D, L	» »	NaOCH ₃		NaOCH ₃	286
O-Бензилсерин, L	хлорбензол	NaOCH ₃		HBr + диоксан	301
То же, D,L	диоксан	триэтиламин	n=28—30	то же	314
O-Фенилгомосерин, D, L		100—135°; вакуум			310
O-Бензилтирозин, L	диоксан	триэтиламин		HBr + +CH ₃ COOH	308
O-Карбобензокситирозин, L	бензол	вода		HBr + +CH ₃ COOH	318
εN-Карбобензоксилизин, L	то же	то же		HBr + +CH ₃ COOH	318
То же	диоксан	NaOCH ₃	2 000 000	диоксан + +CHCl ₃ + +HCl + HBr	281
То же, D,L	то же	триметиламин	n=31— —41		305
δ-N-Карбобензоксизорнитин, L	» »		n=125	HCl + +CH ₃ COOH	307
β-Бензиласпарагинат, L и D	хлороформ, метиленхлорид, дихлорэтан	NaOCH ₃ , бензиламин	50 000		144, 296, 297

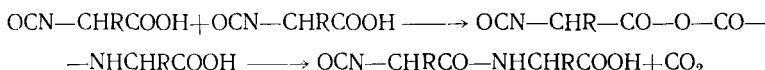
ТАБЛИЦА 13 (продолжение)

1	2	3	4	5	6
β - <i>p</i> -Нитробензил-аспаргинат, <i>L</i>	диметилформамид	диэтиламин			302
β -Пентидааспаргинат, <i>D,L</i>		нагревание в вакууме		$\text{LiOH} + \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	300
γ -Метилглутамат, <i>L</i> и <i>D</i>	этилацетат	NH_4OH	13 000	$\text{NaOH} + \text{Cu(OH)}_2$	317
То же, <i>L</i>	хлороформ	CH_3COOH	$n=500-600$		292
γ -Бензилглутамат, <i>L</i> и <i>D</i>	диоксан, бензол, диметилформамид	NaOCH_3 , NaOH триметиламин	15 000—100 000		288, 289
δ -Метил- α -аминоадипинат, <i>D,L</i>	этилацетат	триэтиламин			309
<i>S</i> -Метилцистенин, <i>L</i>	пиридин				311
<i>S</i> -Этилцистенин, <i>L</i>	пиридин, этанол		$n=11-25$		311
То же		130—140°, вакуум	$n=53$		311
<i>S</i> -Пропил-, <i>S</i> -изопропил-, <i>S</i> -бутил-, <i>S</i> -пентил-, <i>S</i> -гексил-, <i>S</i> -додецил-, <i>S</i> -метилнафтилцистенин, <i>L</i>	пиридин, диоксан, нитробензол, этанол, уксусная кислота	нагревание в вакууме или без вакуума			311
<i>S</i> -Фенилмеркаптоцистенин, <i>L</i>	этиловый эфир тиогликолевой кислоты	нагревание		Одноврем. отщепление тиофенола	304
γ , δ и ϵ -Бензиловые эфиры <i>S</i> -карбокси-, <i>S</i> -карбоксиметил- и <i>S</i> -карбоксиэтил-цистенина, <i>L</i>		нагревание в вакууме			306
Моно- <i>N</i> -карбобензоксицистенин, <i>L</i>		нагревание в вакууме		$\text{HBr} + \text{CH}_3\text{COOH}$	312
<i>S</i> -Этил-, <i>S</i> -Пропил-, <i>S</i> -Бутил-, <i>S</i> -Амил-, <i>S</i> -Бензил-, <i>S</i> -Бензоил-, <i>S</i> -Карбобензоксигомоцистенин, <i>D,L</i>	диоксан, пиридин	триэтиламин, нагревание в вакууме			313
Моноэтиловый эфир <i>N</i> -ацетиллантионина		нагревание в вакууме			312
Монобензиловый эфир <i>N</i> -карбобензоксилантионина	пиридин	а также нагревание в вакууме			312

В расплавленном состоянии все *N*-карбоксиангидриды быстро отщепляют CO_2 и превращаются в полимеры со сравнительно невысокой степенью полимеризации^{171, 214–217}.

Механизм термической полимеризации неясен. Возможно, что промежуточным продуктом является α -изоцианокарбоновая кислота, способная полимеризоваться с последующим отщеплением CO_2 ²¹⁸.





Обрыв растущей цепи может происходить за счет дезактивации концевой изоцианатной группировки.

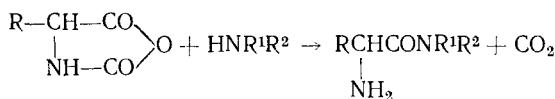
При термической полимеризации N-карбоксиангидрида глицина, содержащего C¹³, Хейнс и Брокман²¹⁹, показали, что в виде CO₂ отщепляется исключительно второй С-атом кольца. Однако это еще не позволяет решить, образуется ли полимер за счет нормального роста цепи по аминному концу или через промежуточную изоцианокарбоновую кислоту, которая, вероятно, присутствует в равновесии с N-карбоксиангидридом^{165, 181}.

Обнаружение значительных количеств дикетопиперазинов при полимеризации N-карбоксиангидридов глицина и аланина при 100—165°²²⁰ также не позволяет сделать окончательного вывода о механизме реакции.

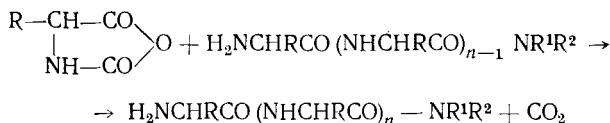
Б. Полимеризация в растворе. Инициирование первичными и вторичными аминами

Все известные N-карбоксиангидриды α -аминокислот, за исключением ангидрида α -метилаланина^{179, 247} в присутствии аминов легко полимеризуются в инертных растворителях (диоксан, бензол, нитробензол, хлороформ, ацетофенон, диметилформамид и др.) в мягких температурных условиях. Полимеризацию можно разделить на три основные стадии.

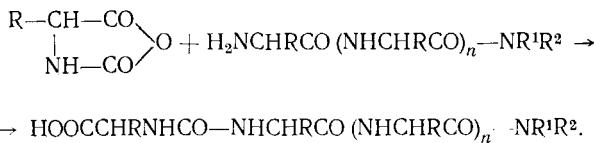
Инициирование:



Рост цепи:

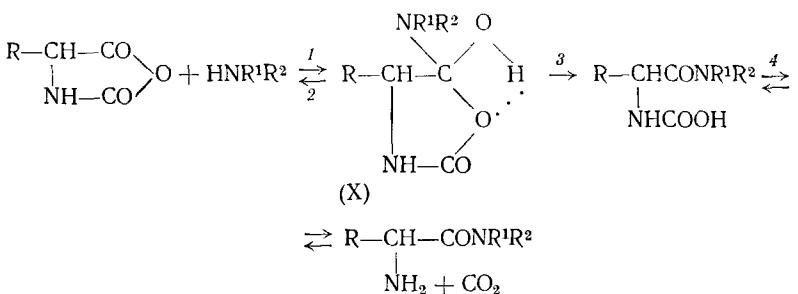


Обрыв цепи:



Инициирование и рост цепи соответствуют «нормальному» присоединению нуклеофильных реагентов по карбонильной группе 5, а обрыв цепи — «ошибочному» присоединению. Средняя степень полимеризации \bar{P}_n образующихся полипептидов (10—200) обычно равна отношению начальных молярных концентраций мономера $[M_0]$ и инициатора $[I_0]$, изменяя которое можно получать полипептиды нужного молекулярного веса.

Инициирование проходит по обычной схеме присоединения нуклеофильных реагентов к N-карбоксиангидридам:



Скорость процесса инициирования зависит от скоростей элементарных реакций 1,2,3. Если из трех стадий реакция 3 самая медленная, то устанавливается равновесие между N-карбоксиангидридом и (X). Если же скорость реакции 1 мала, т. е. инициатор HNR^1R^2 в силу слабой основности или стерических затруднений с трудом присоединяется к карбонильной группе 5 и охотно отщепляется вновь, то стадия 1 определяет скорость всего процесса инициирования. Измеряя изотопический эффект (см. ниже), Хейнс и Шульц¹⁵⁰ пришли к выводу, что так реагируют N-карбоксиангидриды фенилаланина и саркозина с анилином. Константы скоростей реакций 1,2,3 относятся как 0,08 : 75 : 15 в случае фенилаланина и как 0,07 : 86 : 10 в случае саркозина.

Величина скорости инициирования может быть измерена при реакции с большим избытком амина, когда реакция полимеризации не оказывает существенного влияния на расход ангидрида. Оказалось, что в этом случае реакция имеет второй порядок.

Боллард и Бамфорд²²¹ измерили константы скорости K_1 для взаимодействия различных N-карбоксиангидридов с аминами типа: $\text{RHNCH}_2\text{CON}(\text{CH}_3)_2$. Результаты, приведенные в табл. 14, указывают

ТАБЛИЦА 14

Константы скорости K_1 [л·моль⁻¹·сек⁻¹] инициирования полимеризации N-карбоксиангидридов аминами типа $RNH_2CH_2CON(CH_3)_2$ в нитробензоле при 15°

N-карбоксиангидрид R	аланина	саркозина	N-метил- аланина	фенил- аланина	N-изопро- пилгли- цина	α -метил- аланина	L-пролина
R = H	1,13	0,82	0,45	1,0	0,83	0,29	2,68
R = CH_3	0,48	0,57	0,16	0,40	0,48	$8,4 \cdot 10^{-4}$	2,00
R = $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	0,10	7,4	$2 \cdot 10^{-5}$	0,30	$< 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-6}$	0,42

на большое влияние пространственных затруднений, создаваемых заместителями у азота и углеродного атома 4, на скорость взаимодействия со вторичными аминами.

Непосредственное определение скорости инициирования при полимеризации весьма затруднительно. Она может быть лишь приблизительно оценена из суммарной скорости инициирования и полимеризации на ранних стадиях процесса. Так было показано, что инициирование *n*-гексиламином происходит примерно в 10 раз быстрее, чем полимеризация N-карбоксиангидрида γ -бензил-*L*-глутамата в диоксане²⁰⁰. Константа скорости инициирования в этом случае достигает величины $K_1 = 0,2 \pm 0,1 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{сек}^{-1}$ ¹⁹⁹. Инициирование полимеризации N-карбоксиангидрида *D,L*-фенилаланина *p*-хлоралином в 6000 раз медленнее полимеризации, а при инициировании N-этилглицидиндиэтиламидом в бензоле и нитробензоле их скорости примерно равны²²². Сравнительно-

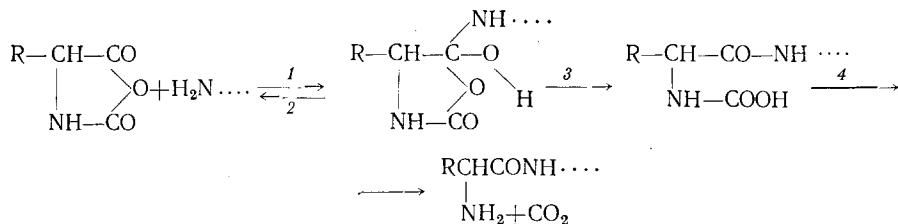
быстрое инициирование наблюдалось в системах N-карбоксиангидрид ϵ N-карбобензокси-L-лизина — аммиак и диоксан²²³ и N-карбоксиангидрид D,L-фенилаланина или D,L-лейцина — натриевая соль D,L-фенилаланина²²⁴.

Болард и Бамфорд²²⁵ изучали влияние длины цепи пептида на скорость инициирования полимеризации N-карбоксиангидридов D,L-лейцина и D,L-фенилаланина в нитробензоле. Оказалось, что диметиламид лейцина в 3—4 раза активнее ди-, три- и высших пептидов, а начавшийся рост цепи протекает с постоянной скоростью, так как активность аминного конца цепи, начиная с димера, практически не меняется.

Из схемы реакции инициирования видно, что инициатор остается на конце полипептидной цепи. Это позволило Ричарду²²⁶, используя в качестве инициатора окрашенный 2,4-динитрофенилэтидиамин, методом бумажной хроматографии впервые непосредственно проследить расход инициатора при полимеризации γ -бензил-L-глутамата. Фотометрирование таких окрашенных полимеров позволило рассчитать их молекулярный вес²²⁸, что можно также сделать, определяя, например, содержание галоида в полипептидах, полученных в присутствии галогеносодержащих инициаторов²²⁷.

Используя в качестве инициаторов полипептиды со свободными аминогруппами или амины с большим молекулярным весом²²⁹, можно получать различные блок-сополимеры. При этом скорости инициирования и роста цепи обычно практически равны и не зависят от степени полимеризации (\bar{P}_n) инициатора²²⁵. Однако в случае полимеризации N-карбоксиангидрида D,L-фенилаланина, инициированной полисаркозином, Болард и Бамфорд^{230, 231} наблюдали прямую зависимость скорости полимеризации от длины цепи инициатора до $\bar{P}_n = 20$, когда полисаркозин в сотни раз эффективнее мономерного саркозиндиметиламида. Дальнейшее увеличение \bar{P}_n не повышало скорость полимеризации. По мнению авторов полисаркозин, не имеющий внутримолекулярных водородных связей, образует эти связи с NH-группами N-карбоксиангидридов, что вызывает повышение их концентрации на поверхности полисаркозина и, как следствие, увеличение скорости полимеризации. Это предположение пока не имеет достаточного подтверждения, так как поведение полипролина и полиоксипролина, также не имеющих NH-групп, не изучено.

Рост цепи. Схема реакции роста цепи аналогична реакции инициирования:



При помощи меченого углерода показано, что при полимеризации, как и следовало ожидать, выделяющийся CO_2 содержит углерод, принадлежащий исключительно карбонильной группе 2 кольца N-карбоксиангидрида¹⁴⁹. Изучая изменение во времени изотопного состава выделяющейся двуокиси углерода, Гейнс с сотрудниками¹⁵⁰ установили,

что отщепление CO_2 (стадия 4) при полимеризации *N*-карбоксиангидридов глицина, саркозина, фенилаланина, *p*-нитрофенилглицина проходит сравнительно быстро. Самой медленной стадией при полимеризации *N*-карбоксиангидридов фенилаланина, фенилглицина и *p*-нитрофенилглицина является реакция 1, тогда как в случае глицина медленнее стадия расщепления кольца (3), а в случае саркозина скорости обеих реакций примерно одинаковы. Таким образом, скорость полимеризации определяется стадией 1 и 3 в зависимости от характера *N*-карбоксиангидрида.

Этот вывод согласуется с более ранними наблюдениями. Полимеризация *N*-карбоксиангидридов обычно ускоряется с повышением температуры²²⁵. При полимеризации саркозина в нитробензоле и ацетофеноне, инициированной саркозиндиметиламидом или полисаркозиндиметиламидом, наблюдается отрицательный температурный эффект^{232, 233}. Скорость полимеризации в этом случае, в соответствии с выводами Гейнса¹⁵⁰, определяется не одной какой-либо элементарной реакцией, а всей их совокупностью.

Реакция отщепления CO_2 от растущей цепи (стадия 4) обратима. Увеличение давления двуокиси углерода замедляет распад концевой карбаминовой группы, которая к тому же может стабилизироваться путем образования карбаматов с концевыми свободными аминогруппами, что приводит к уменьшению их концентрации и падению скорости полимеризации. Поэтому измерения скорости реакции по выделяющейся двуокиси углерода в аппаратуре с постоянным давлением²²⁵ и постоянным объемом²³² обычно отличаются друг от друга.

В гомогенной среде при постоянном давлении CO_2 скорость полимеризации должна быть постоянна, так как активность концевой аминогруппы не изменяется с ростом цепи. Действительно, по окончании стадии иницирования полимеризация является реакцией первого порядка по ангидриду. Это подтвердили Болард и Бамфорд при полимеризации *N*-карбоксиангидридов *D,L*-лейцина, *D,L*-фенилаланина²²⁵ и саркозина²³⁴, а также Брайтенбах и Аллингер²²² при полимеризации ангидрида *D,L*-фенилаланина в нитробензоле и Лундберг и Доти для γ -бензил-*L*-глутамата в диметилформамиде¹⁹⁹.

Короткие цепи^{235–237} полигибридных полипептидов имеют в инертных растворителях беспорядочную β -конформацию, а для длинных цепей более устойчива конформация α -спирали. Можно было ожидать,

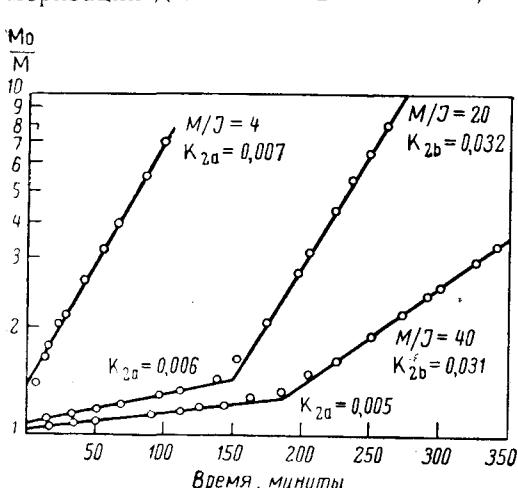


Рис. 11. Скорость полимеризации *N*-карбоксиангидрида γ -бензил-*L*-глутамата в диоксане при 25°. Начальная концентрация мономера $[M_0] = 4\%$; $K_2 [\text{г} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{сек}^{-1}]$

что при полимеризации полипептидная конформационные изменения по достижении достаточной длины и это изменение будет проявляться в процессе полимеризации. Действительно^{199, 238}, скорость полимеризации ангидрида γ -бензил-*L*-глутамата в диоксане, нитробензоле, дихлорэтане, хлороформе и бензоле в присутствии *n*-гек-

силамина возрастает примерно в пять раз при достижении растущими цепями длины в 8 структурных единиц (см. рис. 11). С большим количеством гексиламина ($[M_0]/[I_0]=4$) появление второй, более быстрой стадии не наблюдается, так как при этом образуются лишь короткие цепи, тогда как при инициировании полипептидом с $\bar{P}_n=10$ наблюдается только одна быстрая стадия роста цепи.

Методом ИК спектроскопии показано, что образование α -спиралей поли- γ -бензил-*L*-глутамата начинается при достижении длины цепи 7—13 звеньев²⁰⁰, но не менее 5 звеньев²³⁹. Поэтому резкое увеличение скорости полимеризации Лундберг и Доти связывают с конформационным изменением растущей полипептидной цепи.

Образование новой фракции полимера во второй стадии реакции убедительно показано бумажной хроматографией²²⁶ и измерением электрического двойного лучепреломления (эффект Керра)²⁴⁰.

Дополнительное подтверждение двухстадийности полимеризации получено при изучении полидисперсности поли- γ -бензил-*L*-глутамата^{199, 203, 241}. В диметилформамиде, где наблюдается лишь одна стадия реакции, полимер обладает очень узким молекулярно-весовым распределением. В диоксане, хлороформе, где наблюдается двухстадийность реакции, различные полимерные цепи в зависимости от их конформации растут с разной скоростью и образующийся полипептид обладает широким молекулярно-весовым распределением. При этом средняя степень полимеризации значительно выше теоретической, рассчитанной из соотношения $\bar{P}_n=[M_0]/[I_0]$ и не находится с ним в какой-либо зависимости.

Изучением дисперсии оптического вращения^{242—244} показано, что поли- γ -бензил-*L*-глутамат имеет конфигурацию правой спирали, а его антипод должен иметь левую спираль. Если конфигурация имеет существенное значение, то скорость полимеризации должна зависеть также от содержания оптических антиподов в исходной смеси. Действительно, чистый оптический изомер полимеризуется в два раза быстрее, чем рацемическая смесь *D* и *L* антиподов. При этом вторая стадия наступает в последнем случае значительно позже, что объясняется более поздним образованием устойчивой рацемической α -спиралей^{199, 245}.

При применении поли- γ -бензил-*L*-глутамата как инициатора, полимеризация его *L*-N-карбоксиангидрида идет с большой скоростью и оптическое вращение системы монотонно возрастает по мере роста α -спиралей. В случае ангидрида-рацемата полимеризация идет с вдвое меньшей скоростью, но форма спиралей не меняется от включения в нее *D*-звеньев. В системе *L*-полимер (инициатор) и *D*-ангидрид наблюдается иная зависимость (см. рис. 12). Вначале *D*-звенья входят в

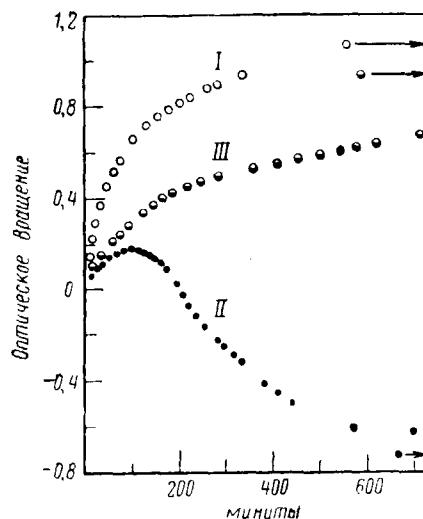


Рис. 12. Изменение оптического вращения системы в процессе полимеризации *N*-карбоксиангидридов γ -бензил-глутамата (*L*—*I*; *D*—*II*; *D,L*—*III*) инициированной *L* полимером. Растворитель — диоксан, 25°, начальная концентрация 2%, кювета $l=20$ см

правую спираль *L*-полимера, не изменяя ее формы, но с накоплением *D*-звеньев, наблюдается инверсия оптического вращения системы с одновременным возрастанием скорости полимеризации, что, вероятно, связано с превращением правой α -спирали *L*-полимера в левую и α -спираль, характерную для *D*-полимера.

При сравнении относительных скоростей присоединения *D* и *L* антиподов к правой α -спирали *L*-полимера оказалось, что *L*-ангидрид почти в пять раз активнее *D*-ангидрида.

Двухстадийность полимеризации, инициированной *n*-гексиламином, наблюдалась также при полимеризации N-карбоксиангидридов *L*-лейцина в нитробензоле¹⁹⁹, О-карбобензокси-*L*-тирозина²⁴⁶, глицина, εN-карбобензокси-*L*-лизина, γ-бензил-*L*-глутамата, *D,L*-аланина, *D,L*-α-аминомасляной кислоты, *D,L*-лейцина и *D,L*-валина в диоксане²⁴⁷. Но в этих случаях полимер обычно выпадает в виде геля, причем ускорение реакции происходит одновременно с появлением новой фазы.

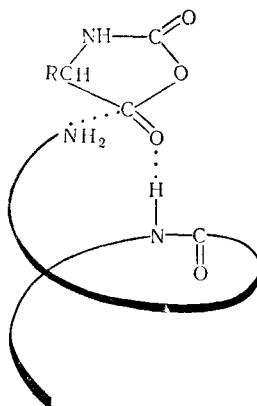
Болард и Бамфорд²⁴⁸ поставили под сомнение двухстадийность гомогенной полимеризации N-карбоксиангидрида γ-бензил-*L*-глутамата. По их наблюдениям, реакция имеет первый порядок по ангидриду и постоянную скорость при инициировании как *n*-гексиламином, так и олигопептидами с $\bar{P}_n = 4,5$ и 15. Доти и Лундберг²⁴⁹ указывают, что вторая, быстрая стадия наблюдается лишь при работе с тщательно очищенными ангидридами. Примеси в незначительных количествах, например гидрохлорид гексиламина — 0,67 мол. %, полностью исключают вторую стадию. Кроме того, такая добавка приводит к получению полимера со значительно меньшим молекулярным весом и более узким молекулярно-весовым распределением.

В последних работах^{234, 250} Болард и Бамфорд указывают, что в большинстве систем не соблюдается условие гомогенности, так как полипептиды обладают плохой растворимостью и уже на стадии три- и тетрамера образуют гель и одновременно скорость полимеризации увеличивается в 5—8 раз. Дальнейшая коагуляция геля в более плотные образования приводит к уменьшению скорости. Вероятно, это связано с адсорбцией полимеризующегося ангидрида на полимерном геле. К этому же случаю была отнесена полимеризация N-карбоксиангидрида γ-бензил-*L*-глутамата, полимер которого, по мнению авторов, не образует истинных растворов в диоксане.

Адсорбция может происходить и в истинных растворах за счет образования водородных связей между молекулами мономера и полимерной цепью, чем, вероятно, и объясняется «цепной эффект» полисарказина²³¹, поли-N-этил и поли-N-бензилглицина²⁵⁰ — рост их активности с увеличением \bar{P}_n при инициировании полимеризации N-карбоксиангидридов со свободными NH-группами. Полимеризация самого N-карбоксиангидрида сарказина в гомогенной среде не имеет автокаталитического характера, так как полисарказин не образует водородных связей с мономером²⁵⁰.

Однако одностадийная полимеризация N-карбоксиангидрида γ-бензил-*L*-глутамата в диметилформамиде, в котором полимер хорошо растворим и образует α -спирали, противоречит как гипотезе Лундberга и Доти о влиянии конформации растущей цепи на скорость полимеризации, так и гипотезе Боларда и Бамфорда о наличии адсорбции на полимерных цепях.

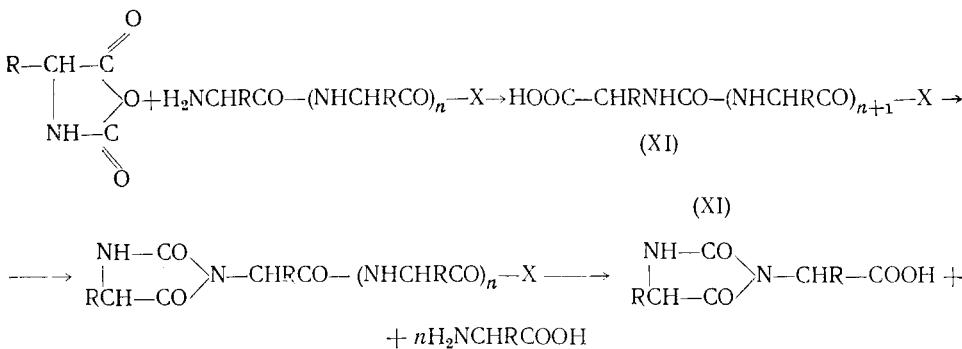
Своего рода объединением этих гипотез является предложенная Вейнгартеном²⁴⁷ схема, по которой активирующая адсорбция молекул ангидрида возможна лишь на концах растущих цепей при условии их спиральной конформации:



Таким образом, присоединяющаяся молекула N-карбоксиангидрида приобретает определенную ориентацию еще до взаимодействия с концевой аминогруппой.

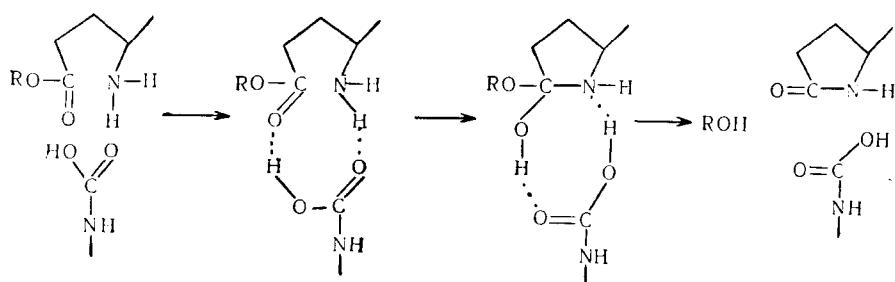
Ниже будет приведена еще одна попытка объяснения двухстадийности процесса полимеризации N-карбоксиангидрида γ -бензил-L-глутамата.

Обрыв цепи. Любое исчезновение свободной аминогруппы на конце полипептидной цепи приводит к остановке ее роста. Остановка роста цепи происходит в результате «ошибочного» присоединения концевой аминогруппы к карбонилу 2 ангидридного кольца^{192, 251, 252} с образованием производного мочевины (XI), способного циклизоваться в гидантоиновое производное (XII). При кислотном гидролизе полипептидов эти производные можно выделить в виде замещенной гидантоин-3-уксусной кислоты (XIII).



Возможно, что циклизация происходит лишь в процессе гидролиза, на что указывает наличие свободных карбоксильных групп в полипептидах^{241, 251, 253}.

Обрыв цепи может также происходить при внутримолекулярном взаимодействии концевой аминогруппы с какой-либо активной группировкой полимерной цепи. Так, при получении поли- γ -бензил-L-глутамата большое значение имеет реакция внутримолекулярной циклизации за счет реакции концевой аминогруппы и эфирной группировки того же структурного звена с выделением бензилового спирта^{199, 241, 254}. Недавно показано, что циклизация катализируется слабыми кислотами, в том числе и карбаминовой кислотой, и проходит по схеме¹⁶⁴:



Инtramолекулярный обрыв цепи в результате миграции ацетильной группы от кислорода к азоту был отмечен при полимеризации N-карбоксиангидридов *o*-ацетилоксипролина²⁵⁵ и *o*-ацетилсерина^{257, 258}.

Кинетика реакции полимеризации. Полимеризация N-карбоксиангидридов весьма удобна для изучения кинетики процесса, скорость которого можно определять как титрованием не вступившего в реакцию мономера^{158, 247}, так и по количеству выделяющейся при полимеризации двуокиси углерода. В последнем случае более надежные результаты получаются при постоянном давлении CO₂^{206, 225}. Закрытые системы с постоянным объемом^{187, 232, 233, 259} для кинетических исследований менее пригодны. Удобен метод, при котором выделяющаяся CO₂ переносится сухим азотом в поглотительный сосуд, где изменение концентрации раствора NaOH²²², гидроокиси бария¹⁹⁹ или бензиламина¹⁵⁸ контролируется кондуктометрически^{199, 222} или титрованием¹⁵⁸. Идельсон и Блаут²⁰⁰ изучали кинетику полимеризации N-карбоксиангидрида γ-бензил-L-глутамата при помощи ИК спектроскопии, позволяющей следить за исчезновением мономера, образованием полимера и конформационными изменениями полимерных цепей.

В большинстве случаев гомогенной полимеризации при достаточной основности инициатора и малой скорости обрыва цепи наблюдается прямая пропорциональность между скоростью реакции и начальными концентрациями мономера [M]₀ и инициатора [I]₀. Кинетика такого процесса была рассмотрена теоретически группой английских авторов^{225, 232} и в общем виде Каачальским с сотрудниками^{260, 261}. Различают три стадии процесса: инициирование (K₁), рост цепи (K₂) и обрыв цепи (K₃), причем процесс может осуществляться по одному из следующих возможных вариантов.

Если скорость реакции инициирования равна скорости роста цепи (K₁=K₂), а обрывом цепи можно пренебречь (K₃=0), то скорость полимеризации выражается уравнением:

$$-\frac{d[M]}{dt} = \frac{d[CO_2]}{dt} = K_2 [I_0] \cdot [M].$$

Таким условиям удовлетворяет гомогенная полимеризация ангидридов, инициированная амидами или эфирами аминокислот, пептидов или полипептидов в растворителях с одностадийным характером процесса и при низких температурах, когда обрыв цепи не играет существенной роли. Средненесловная степень полимеризации образующегося полимера определяется отношением $\bar{P}_n = \frac{[M_0] - [M]}{[I_0]}$ или $\bar{P}_n = [M_0]/[I_0]$ при завершении полимеризации, когда [M]=0. Молекулно-весовое распределение должно быть пуассоновского типа, т. е. полидисперсность мала $\bar{P}_w/\bar{P}_n \approx 1$.

Действительное молекулно-весовое распределение было определено лишь в нескольких случаях. Оно оказалось достаточно узким для поли-

саркозина²⁶², поли- γ -бензил-*L*-глутамата^{199, 263} и поли- ϵ N-карбобензокси-*L*-лизина²⁴⁶, полученных в диметилформамиде.

Если скорости реакций инициирования и роста цепи отличаются друг от друга ($K_1 \neq K_2$), то при небольшой скорости обрыва цепи ($K_3 = 0$), скорость полимеризации выражается уравнением:

$$-\frac{d[M]}{dt} = \frac{d[\text{CO}_2]}{dt} = K_1[I][M] + K_2 \sum_{i=1}^{\infty} N_i^* [M],$$

где $[I]$ представляет мгновенную концентрацию инициатора, N_i^* — концентрацию растущих полимерных цепей, содержащих в данный момент i -звеньев $[I] + \sum_{i=1}^{\infty} N_i^* = [I_0]$. На ранних стадиях процесса, когда $[I_0] \approx [I] \gg \sum_{i=1}^{\infty} N_i^*$ общая скорость реакции определяется в основном первым слагаемым уравнения, а при завершении полимеризации, когда $[I] \ll \sum_{i=1}^{\infty} N_i^* \approx [I_0]$ — вторым слагаемым.

Таким образом, в этом случае полимеризация является реакцией первого порядка по ангидриду, а скорость выделения CO_2 определяется константами K_1 в начале и K_2 в конце полимеризации. Если $K_1 > K_2$, что наблюдается при инициировании сильными основаниями, реакция инициирования заканчивается быстро и скорость роста цепи остается постоянной на протяжении всего процесса. Молекулярно-весовое распределение полимера очень узко и $\bar{P}_n = [M_0]/[I]$. При использовании слабых инициаторов, когда $K_1 < K_2$, реакция инициирования затягивается и общая скорость процесса увеличивается по мере роста числа новых цепей; а образующийся полимер полидисперсен. $\bar{P}_n = [M_0]/[I_0]$ соблюдается лишь в том случае, если весь инициатор успевает прореагировать до конца полимеризации.

Если при быстром инициировании ($K_1 > K_2$, $K_3 \approx 0$) в процессе роста цепи наблюдаются две стадии реакции (K_{2a} и K_{2b}), причем переход от K_{2a} к K_{2b} совершается по достижении длины цепи в s звеньев, то скорость процесса выражается уравнением

$$-\frac{d[M]}{dt} = \frac{d[\text{CO}_2]}{dt} = K_1[I][M] + K_{2a} \sum_{i=1}^{i=s} N_i^* [M] + K_{2b} \sum_{i=s}^{\infty} N_i^* [M].$$

Этот случай разобран Качальским²⁴⁶ на основе кинетических данных, полученных Лундбергом и Доти¹⁹⁹ при двухстадийной полимеризации ангидрида γ -бензил-*L*-глутамата в диоксане. Аналогично предыдущему, полимеризация в этом случае является реакцией первого порядка по ангидриду, скорость которой в основном определяется константой K_{2a} в начале и K_{2b} в конце реакции: $-\frac{d[M]}{dt} = K_2[I_0] \cdot [M]$. Пуассоновским распределением обладают те фракции полимера, степень полимеризации которых меньше s . Фракции с $\bar{P}_n > s$ обладают тем большей полидисперсностью, чем больше различие между K_{2a} и K_{2b} . На основании математического анализа авторы считают, что число β -цепей уменьшается в ходе полимеризации тем медленнее, чем больше величина s , а весовая доля β -полимера падает после достижения максимума, пропорционального величине s . Логично, что время перехода от K_{2a} к K_{2b} зависит лишь от $[M_0]$, но не от $[I_0]$, так как скорость образования полимера с $\bar{P}_n = s$ зависит от концентрации мономера $[M_0]$, а не от числа цепей $[I_0]$.

Необходимо, однако, отметить, что наблюдаемая Доти и Блаут^{199, 200} зависимость между $[M_0]$ и временем перехода от K_{2a} и K_{2b} противоположна той, которую следовало бы ожидать на основе выводов Качальского (рис. 11). Кроме того, в одной из последних работ Качальский²³⁶ отмечает, что найденная Доти полидисперсность ($\bar{P}_w/\bar{P}_n = 8,5$) значительно шире теоретической. Таким образом, выводы анализа кинетики полимеризации с учетом гипотезы Доти и Лундберга о влиянии конформации цепи на скорость ее роста плохо согласуются с результатами эксперимента. С другой стороны, в отношении гипотезы Боларда и Бамфорда о влиянии адсорбции мономера на полимерных цепях на скорость полимеризации нельзя сделать никакого заключения, так как рассмотренный Качальским пример предполагает постоянство K_{2a} и K_{2b} , а гипотеза Боларда исключает это.

Если при большой скорости иницирования и одностадийном характере процесса ($K_1 > K_2$) часть полимеризующихся цепей обрывается ($K_3 \neq 0$) в результате бимолекулярной реакции с ангидридом, то количество выделяющейся CO_2 меньше количества прореагированного ангидрида $[M_0] - [M]$. Разность $[M_0] - [M] - [\text{CO}_2]$ соответствует количеству концевых карбоксильных групп. Качальский^{230, 231} показал, что в этом случае молекулярно-весовое распределение растущих цепей остается пуассоновским, но фракция полимера с концевыми карбоксильными группами полидисперсна, причем для нее $\bar{P}_w/\bar{P}_n \approx 2$. Максимально достижимая степень полимеризации всего полимера при этом равна $\bar{P}_n = K_2/K_3$.

Этот случай близок к реальным условиям полимеризации. Реакция обрыва, редкая при низких температурах (один акт на 300 актов присоединения^{199, 241}) играет большую роль при повышенных температурах, так как энергия активации реакции обрыва несколько выше энергии активации роста, которая в случае γ -бензил-*L*-глутамата составляет всего 6,6 ккал/моль^{199, 200}.

Кинетика полимеризации N-карбоксиангидридов трифункциональных кислот, где возможен внутримолекулярный обрыв цепи, теоретически не рассмотрена.

ТАБЛИЦА 15

Константы скорости полимеризации $K_{2(a)b}$, л·моль⁻¹сек⁻¹ различных N-карбоксиангидридов

N-карбоксиангидрид	Растворитель	Инициатор	<i>t</i> °C	$K_{2(a)b} \cdot 10^2$	Ссылка на литературу
Глицин	диоксан	<i>p</i> -бромалин	37	18	227
Саркозин	бензол	<i>n</i> -гексиламин	25	(12)60	234
<i>L</i> -Аланин	то же	то же	25	(6,3)54	234
То же	нитробензол	» »	25	(4,8)26,4	234
<i>L</i> -Лейцин	то же	» »	25	(1,3)9	199
Фенилаланин	» »	» »	25	(1,6)	234
То же	бензол	» »	25	(5)	234
γ -Бензил- <i>L</i> -глутамат	диоксан	» »	34	2,5—5,2	200
То же	дихлорэтан	» »	25	(1,5)14	199
» »	диметилформамид	» »	25	5,7	199
» »	то же	» »	0	1,9	199
» »	» »	» »	40	8,7	199
» »	диоксан	NaOCH ₃	34	430—630	277
<i>D</i> , <i>L</i>	то же	<i>n</i> -гексиламин	25	(0,4)1,5	199
То же	диметилформамид	то же	25	2,2	199
γ -Метил- <i>L</i> -глутамат	хлороформ	CH ₃ COOH	30	(0,35)2,9	292

В табл. 15 приведены новейшие данные о скоростях полимеризации N-карбоксиангидридов, из которых следует, что скорость полимеризации для глицина и пролина имеет максимальное значение. Рацематы полимеризуются медленнее энантиостереомеров. Неполярные растворители, не способные образовывать водородные связи, ускоряют реакцию¹⁹⁹.

Следует отметить, что определения скоростей полимеризации не отличаются большой точностью из-за трудности очистки N-карбоксиангидридов и растворителей, а также несоблюдения условия гомогенности реакции²⁴⁷, что с трудом устанавливается визуальным путем (сравн.¹⁹⁹ и²⁵⁰). Кроме того, из-за неоднозначности реакции N-карбоксиангидридов с сильными аминами истинная концентрация растущих цепей только приблизительно равна начальной концентрации инициатора. При двухстадийном характере процесса величина K_2 , значительно занижена, так как не все растущие цепи достигают необходимой длины для ускорения реакции. И, наконец, полимеризация, инициированная первичными и вторичными аминами, может проходить одновременно несколькими путями. В противном случае она должна бы быть реакцией первого порядка по инициатору, а скорость роста цепи не зависела бы от природы инициатора.

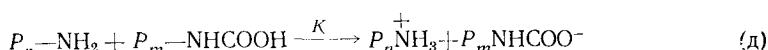
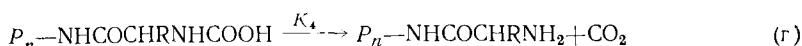
В действительности K_2 зависит от характера инициатора. Так, диэтиламин вызывает, как правило, вдвое более быструю полимеризацию, чем гексиламин²⁴⁷. Кроме того, порядок реакции по инициатору иногда отличен от единицы. При полимеризации N-карбоксиангидридов, D,L-валина, D,L-лейцина, ϵ -N-карбобензокси-D,L-лизина и D,L- α -аминомасляной кислоты в диоксане был найден дробный порядок реакции²⁴⁷. Гейнс и Шульце¹⁵⁰ при полимеризации ангидрида сарказина получили второй порядок по инициатору, а позднее было показано, что скорость пропорциональна выражению

$$a [I_0] + b [I_0]^2 \quad 232, 247,$$

где a и b — постоянные множители.

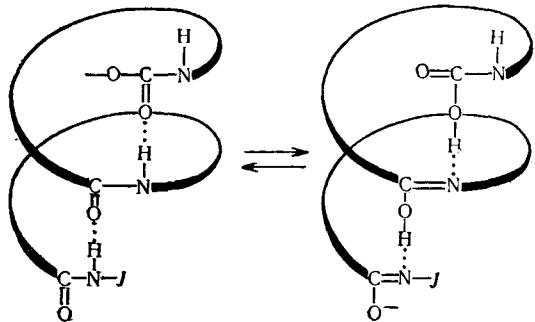
При изучении двухстадийной полимеризации N-карбоксиангидрида γ -бензил-L-глутамата для медленной стадии определены первый порядок по ангидриду и независимость ее скорости от характера инициатора. Вторая же быстрая стадия имела дробный порядок ($3/2$) по ангидриду, и скорость ее зависела от инициатора²²⁸.

Авторы предложили следующий механизм реакции роста цепи, объясняющий особенности этого процесса:



Рост цепи может происходить по общепринятой схеме (в) — (г) со скоростью K_{2a} или по реакции (д) с большей скоростью K_4 . Обычно доля реакции (е) невелика из-за нестабильности карбаминовой кисло-

ты и, как следствие, низкой концентрации аниона карбамата. Однако с образованием α -спирали стабильность аниона может существенно повыситься за счет распределения заряда по всей спирале:



В результате инициатор получает возможность влиять на стабильность аниона карбамата и, следовательно, на скорость полимеризации. Скорость реакции (e) определяется уравнением

$$\frac{d[M]}{dt} = K_{2b} \left(\frac{K_{2a}}{K_4} \right)^{\frac{1}{2}} K^{\frac{1}{2}} [I_0] [M]^{\frac{3}{2}},$$

т. е. реакция имеет порядок $3/2$ по ангидриду, что соответствует экспериментальным данным.

Предложенный механизм представляет собой очень интересную попытку объяснить влияние спиральной конформации и инициатора на скорость полимеризации. Однако нам кажется необходимым отметить, что вторичные амины в соответствии с предложенным механизмом не должны бы оказывать влияния на реакционную способность концевой аминогруппы растущей цепи, так как они не способны участвовать в предполагаемой системе водородных связей.

Бамфорд и Блок²⁶⁴ предлагают иной механизм влияния инициатора на скорость полимеризации, который будет рассмотрен ниже.

B. Инициирование водой

Полимеризация в присутствии воды проходит аналогично полимеризации, инициированной аминами²⁶⁵. Однако стадия инициирования протекает медленно из-за слабой основности воды, а наличие в системе свободных карбоксильных и аминных групп облегчает их ионизацию, что значительно замедляет рост цепи, особенно на первой стадии полимеризации^{224, 266–270}.

Применение воды для инициирования представляет интерес для получения полипептидов с концевыми аминными и карбоксильными группами, способных к дальнейшей конденсации, например по карбодиimidному методу²⁷¹.

При инициировании водой возможны побочные реакции. Полученный таким образом полиглицин содержит до 2% 2,5-дикетопиперазина²⁵³. Полимеризация в полярных растворителях, например диметилформамиде, проходит, вероятно, по другому механизму и приводит к значительным количествам гидантоиновых производных^{207, 272}.

Во многих случаях вода может быть использована не только как инициатор, но и как среда для проведения полимеризации¹⁷⁴. В последние годы была подробно изучена зависимость скорости полимеризации различных N-карбоксиангидридов от pH среды^{163, 273–275, 269}.

Г. Инициирование сильными основаниями

Гидроокись натрия²⁷⁶, метилат натрия, боргидрид натрия²⁰³ и трифенилметилнатрий²⁷⁷, предложенные Блаутом и сотрудниками как инициаторы полимеризации N-карбоксиангидридов, приводят к получению исключительно высокомолекулярных (поли-γ-бензил-L-глутамат 600 000, поли-εN-карбобензокси-L-лизин 2 000 000) и малодисперсных полипептидов, свободных от дикетопиеразинов и других циклических соединений^{278, 279}. Подробное изучение процесса^{203, 277, 280, 281} показало, что полипептиды с максимальным молекулярным весом образуются в таких растворителях, как диоксан, хлороформ, бензол при температурах ниже 30° и концентрации мономера ниже 4 %. В нитробензоле скорость полимеризации почти в 30 раз ниже и полимер имеет значительно меньший молекулярный вес. Между степенью полимеризации и соотношением $[M_0]/[I_0]$ нет пропорциональности и молекулярный вес полимера всегда выше рассчитанного^{203, 281}.

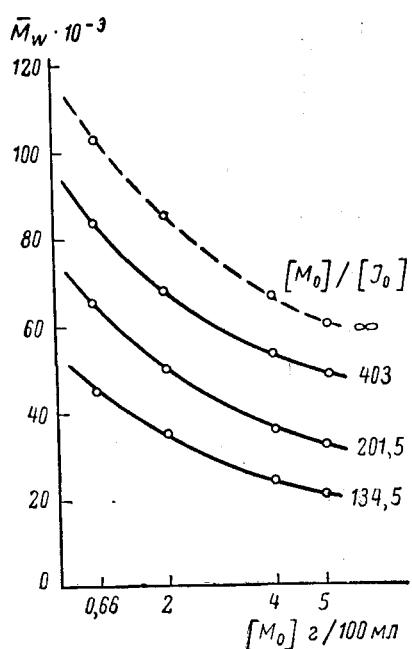


Рис. 13. Зависимость молекулярного веса \bar{M}_w поли-DL-фенилаланина от начальной концентрации $[M_0]$ мономера для различных величин $[M_0]/[I_0]$

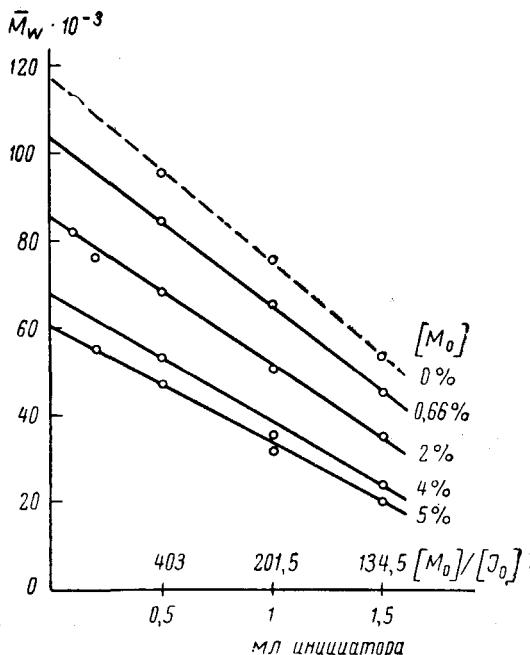
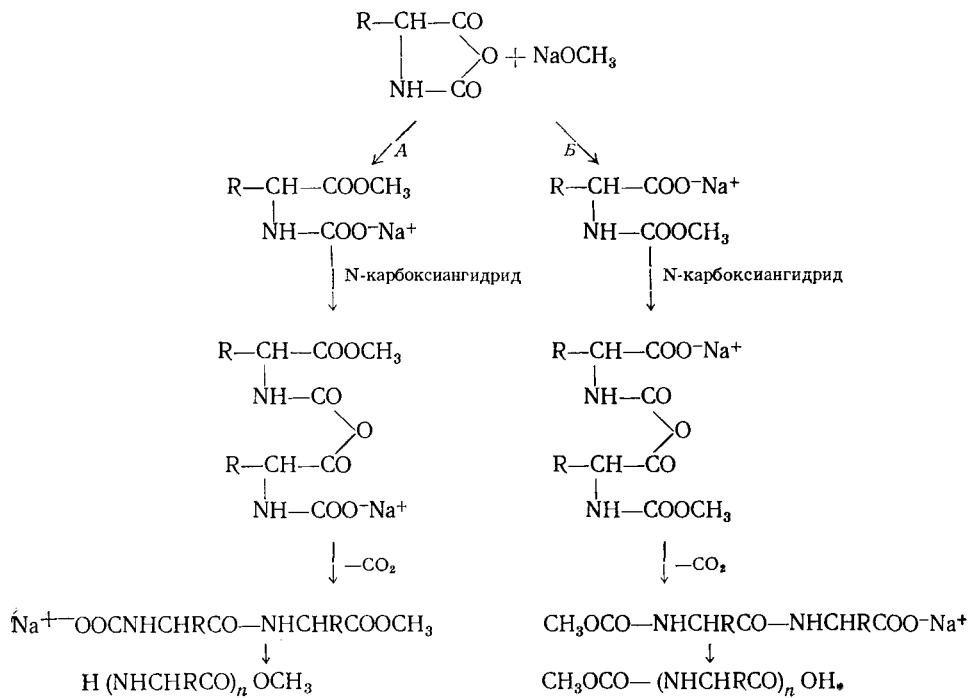


Рис. 14. Зависимость молекулярного веса \bar{M}_w поли-DL-фенилаланина от соотношения $[M_0]/[I_0]$ для различных начальных концентраций мономера $[M_0]$

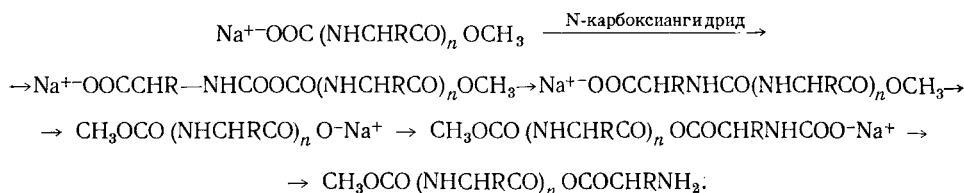
Скорость полимеризации и молекулярный вес полимеров возрастают в ряду метилатов Li, Na, K, Cs²⁸⁰. Полимеризация N-карбоксиангидрида γ-бензил-L-глутамата в диоксане при 34° после короткого автокаталитического периода протекает как реакция первого порядка по мономеру со скоростью в 100 раз большей ($K_2=4,3-6,3$ л · моль⁻¹ сек⁻¹), чем при инициировании первичными или вторичными аминами²⁸⁰. Добавление к реакционной системе новых порций N-карбоксиангидрида не вызывает повышения молекулярного веса полимера. Замена L-ангидрида на рацемат приводит к снижению скорости полимеризации в 17 раз и уменьшению молекулярного веса полимера примерно в 5 раз.

Указанные особенности подтверждены и для нейтральной аминокислоты *D*, *L*-фенилаланина²⁷⁹. На рис. 13, 14 представлена полученная зависимость молекулярного веса M_w полипептида от концентрации ангидрида $[M_0]$ и соотношения $[M_0]/[I_0]$. Полимеризация проводилась при 40° в хлороформе с метилатом натрия. Пунктирные линии, соответствующие $[M_0]=0$ и $[M_0]/[I_0]=\infty$ (0 мм инициатора) получены экстраполяцией. Молекулярные веса определены светорассеянием.

Результаты позволили Блоуту²⁸⁰ предположить, что полимеризация в этом случае идет по ионному механизму:

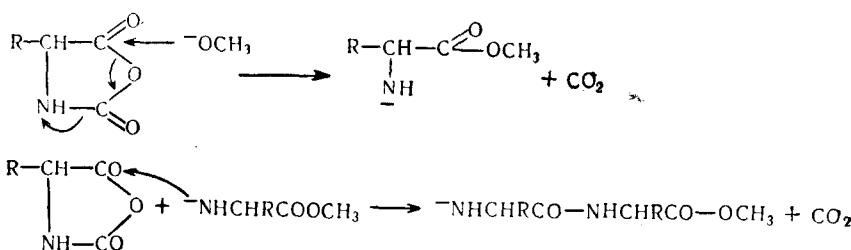


Рост полимерной цепи происходит путем последовательного присоединения полимерного аниона к N-карбоксиангидриду или по карбонилу 5 (путь *A*), или по карбонилу 2 (путь *B*) с образованием смешанных ангидридов, легко отщепляющих CO₂. Обрыв цепи происходит, если за присоединением по карбонилу 5 последует присоединение по второй карбонильной группе и наоборот:



В первом случае полимер должен содержать мочевинные, во втором — ангидридные и уретановые группировки.

Более вероятной²⁸² кажется предложенная теми же авторами схема роста цепи²⁸⁰, в которой принимает участие аминный анион, а отщепление CO₂ связано с простым переходом электронов:



Д. Инициирование третичными аминами

Третичные амины: пиридин^{174, 182, 224, 283-285}, *α*-пиколин, 2,6-лутидин¹⁸², триэтиламин^{103, 259, 286, 287}, три-*p*-бутиламин^{259, 285, 288} и trimethylamin²⁸⁹ являются эффективными инициаторами полимеризации N-карбоксиангидридов со свободной NH-группой. Образующиеся полипептиды, однако, содержат некоторые количества замещенной гидантоин-3-уксусной кислоты^{207, 283}.

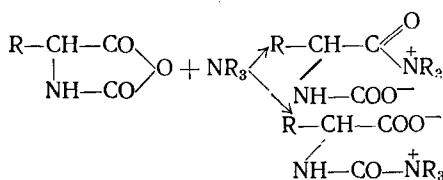
В отношении N-замещенных N-карбоксиангидридов нет единого мнения об их способности полимеризоваться под действием третичных аминов. В противоположность N-карбоксиангидриду N-циклогексилглицина²⁸⁴ ангидрид N-фенилглицина не полимеризуется в пиридине даже при повышенной температуре^{174, 175}. Ангидрид сакозина полимеризуется при комнатной температуре в пиридине^{175, 283} даже при самой тщательной очистке его с помощью фенилмагнийбромида²⁸⁴. В пиридине легко полимеризуются и ангидриды *L*-пролина^{141, 290}, *L*-оксипролина и O-*p*-толуолсульфонил-*L*-оксипролина²⁹⁰. Несмотря на это, Болард и Бамфорд^{182, 206, 259, 285} считают, что полимеризация саркозина, пролина и его производных вызывается случайными загрязнениями, и при тщательной очистке можно до минимума снизить начальную скорость полимеризации²⁵⁹.

Третичные амины вызывают быструю полимеризацию N-карбоксиангидридов в органических растворителях даже при больших значениях $[M_0]/[I_0]$ и дают высокомолекулярные полипептиды, степень полимеризации которых не зависит от отношения $[M_0]/[I_0]$ ²⁰³. Эти черты во многом напоминают полимеризацию, инициированную сильными основаниями.

Полипептиды, полученные в безводной среде с третичными аминами в качестве инициаторов, не могут иметь концевых аминных и карбоксильных групп, т. е. должны иметь циклическое строение.

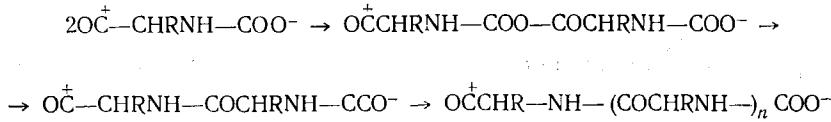
Тщательный анализ полисаркозина ($M=22\,000$) и поли-N-циклогексилглицина, полученных в сухом пиридине, показал, что эти полимеры практически лишены концевых групп²⁸⁴. Были выделены циклические дипептиды — замещенные дикетопиペразины, выход которых в случае поли-N-циклогексилглицина достигал 35%.

По Виланду²⁹¹, в этом случае происходит раскрытие ангидридного кольца третичным амином с образованием цвиттериона:

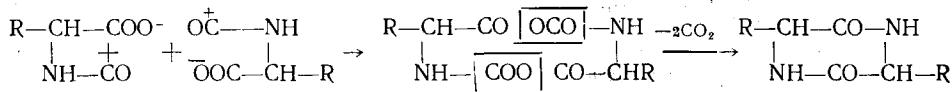


Образование полипептидов, дикетопиперазинов и замещенной гидантоин-3-уксусной кислоты объясняется различной комбинацией цвиттерионов.

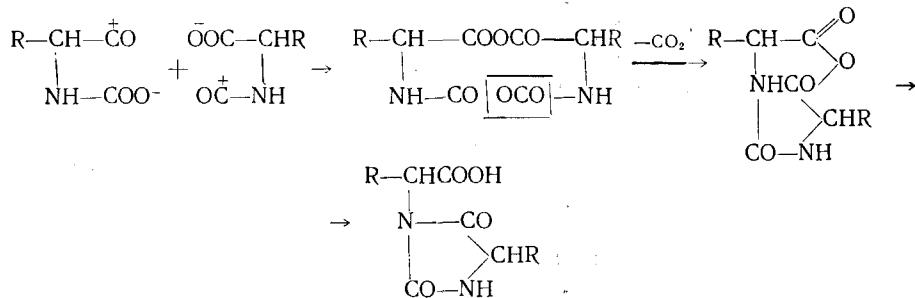
Образование полипептида:



Образование дикетопиперазина:

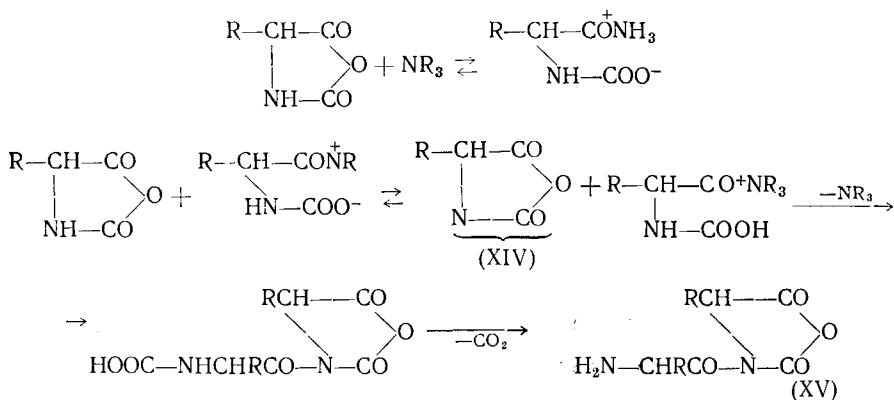


Образование замещенной гидантоин-3-уксусной кислоты:



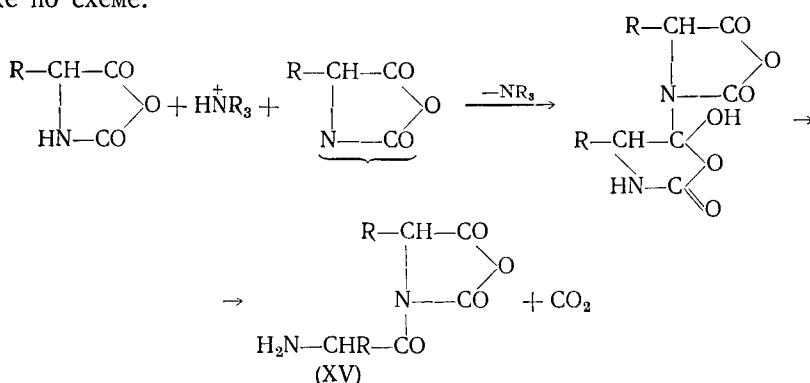
Быстрая полимеризация N-карбоксиангидридов в органических растворителях с катализитическими количествами третичных аминов²⁰³ указывает, однако, на то, что рост полипептидной цепи происходит в основном не в результате взаимодействия двух цвиттерионов, а при их реакции с N-карбоксиангидридами.

Предложенный Боллардом и Бамфордом^{182, 259, 285} механизм реакции N-карбоксиангидридов и третичных аминов исключает возможность полимеризации N-замещенных N-карбоксиангидридов, так как первичными продуктами взаимодействия считаются анион карбандида (XIV) и 3-(α -аминоацил)-оксазолидинион-2,5 (XV):



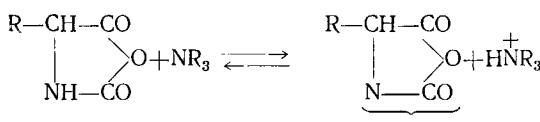
Далее анион (XIV) может взаимодействовать с молекулой ангидрида

также по схеме:



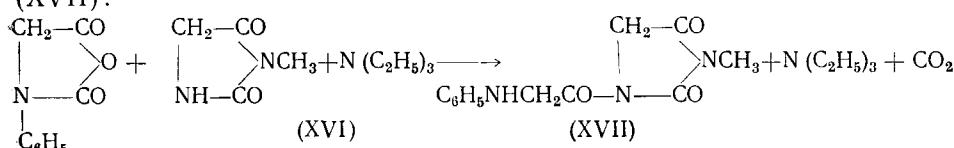
Соединение (XV) дает начало росту цепи как по аминному концу, так и по N-карбоксиангидриду концу.

Однако измерения скорости полимеризации N-карбоксиангидридов γ -этил-L-глутамата в диметилформамиде и D, L-фенилаланина в нитробензоле с пиридином, α -пиколином и 2,6-лutiдином в качестве инициаторов¹⁸² показали, что анион (XIV) образуется не в результате нуклеофильной атаки третичным амином карбонильной группы 5, а путем непосредственной атаки амидного водорода (ср.¹⁸¹):



В противном случае скорость взаимодействия третичного амина с N-карбоксиангидридом должна бы падать в ряду пиридин, α -пиколин, 2,6-лutiдин из-за увеличения пространственных затруднений, а эксперимент показывает увеличение скорости в указанном ряду, связанное с ростом основности аминов.

Обрыв цепи происходит путем внутримолекулярной циклизации бифункциональной полимерной цепи или в результате дезактивации концевой аминогруппы. Образование замещенной гидантоин-3-уксусной кислоты объясняется перегруппировкой соединения (XV). Доказательством предложенного механизма, по мнению авторов²⁵⁹, является тот факт, что быстрая полимеризация N-карбоксиангидрида саркозина происходит лишь в присутствии 3-метилгидантоина (XVI) — аналога N-незамещенного N-карбоксиангидрида, а также то, что из продуктов взаимодействия ангидрида N-фенилглицина, триэтиламина и 3-метилгидантоина удалось выделить 3-метил-1-(N-фенилглицил)-гидантоин (XVII):



Предложенный механизм, как указывалось, исключает возможность полимеризации N-замещенных ангидридов, что нельзя считать окончательно доказанным. Кроме того, он совершенно не объясняет чрезвычайно высокой скорости полимеризации, которая сравнима со скоростью ионной полимеризации. Рост цепи по ангидридному концу не

может существенно увеличить скорость полимеризации, так как предполагает взаимодействие или с активированными молекулами N-карбоксиангидрида, концентрация которых крайне мала, или взаимодействие с концевыми аминогруппами, что уменьшает концентрацию активных центров роста цепи.

Показано²⁶⁴, что и полимеризация со вторичными и первичными аминами часто идет по механизму, характерному для инициирования третичными аминами. Блаут²⁰³ наблюдал большое сходство при полимеризации N-карбоксиангидрида γ -бензил-L-глутамата, инициированной диэтиламином и триэтиламином. В обоих случаях полимеризация проходила с большой скоростью, а молекулярный вес полимера не зависел от соотношения $[M_0]/[I_0]$.

При полимеризации N-карбоксиангидридов саркозина и γ -этил-L-глутамата в присутствии *n*-гексиламина и дизопропиламина Бамфорд нашел, что (см. рис. 15) полимеризация протекает нормально только в случае инициирования *n*-гексиламином (кривые *B* и *C*). Из-за больших стерических затруднений, создаваемых изопропильными группами, инициирование реакции полимеризации саркозина дизопропиламином проходит медленно и реакция ускоряется лишь по мере появления активных концевых аминогрупп растущих цепей (*D*). Казалось бы, это должно соблюдаться и для других ангидридов. Однако, в случае N-незамещенного N-карбоксиангидрида (кривая *A*) стерически-затрудненный дизопропиламин вызывает значительно более быструю полимеризацию, чем гексиламин, что можно объяснить лишь преимущественным протеканием процесса по

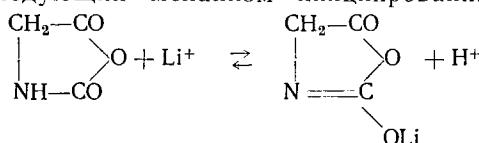
Рис. 15. Скорость выделения CO_2 в системах: *A* — N-карбоксиангидрид γ -этил-L-глутамата + дизопропиламин; *B* — N-карбоксиангидрид саркозина + *n*-гексиламин; *C* — N-карбоксиангидрид с γ -этил-L-глутамата + *n*-гексиламин; *D* — N-карбоксиангидрид саркозина + дизопропиламин 25°, диметилформамид; $[M_0]=0,224$ моль/л; $[I_0]=0,015$ моль/л

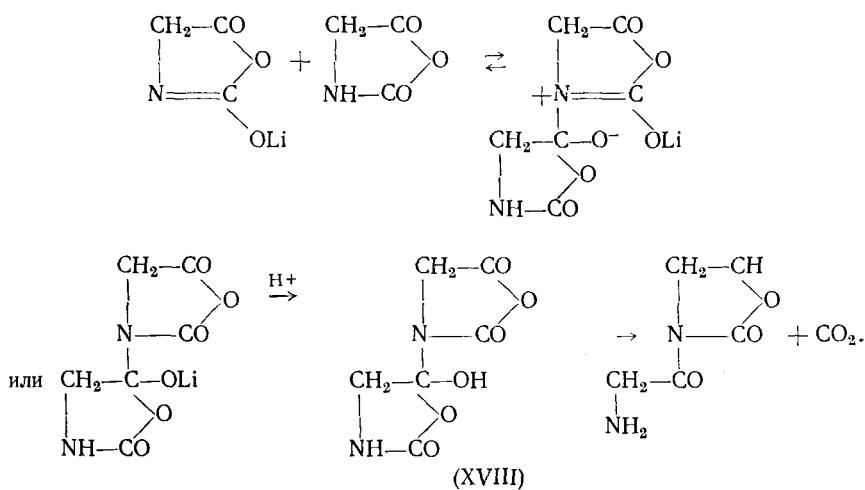
механизму, характерному для третичных аминов. Вывод подтверждается также анализом молекулярных весов полимеров. Если поли- γ -этилглутамат, полученный с гексиламином, имеет $P_n=60$, то при инициировании дизопропиламином величина P_n достигает 150 в одних и тех же условиях полимеризации при $[M_0]/[I_0]=15$. Интересно, что количество выделившейся CO_2 в последнем случае значительно меньше теоретического.

E. Иницирование солями

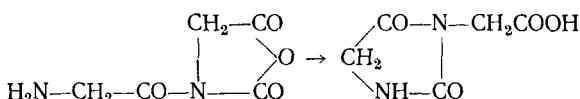
Неорганические соли как инициаторы полимеризации N-карбоксиангидридов были предложены Болардом еще в 1954 г.^{206, 207}, но не нашли широкого применения, так как образующиеся полипептиды содержат до 30—40% гидантоиновых производных. Однако этот тип инициирования очень интересен с химической точки зрения, так как считается, что имеется большое сходство в механизмах взаимодействия N-карбоксиангидридов с солями и третичными аминами^{207, 259}.

Предложен следующий механизм инициирования полимеризации:



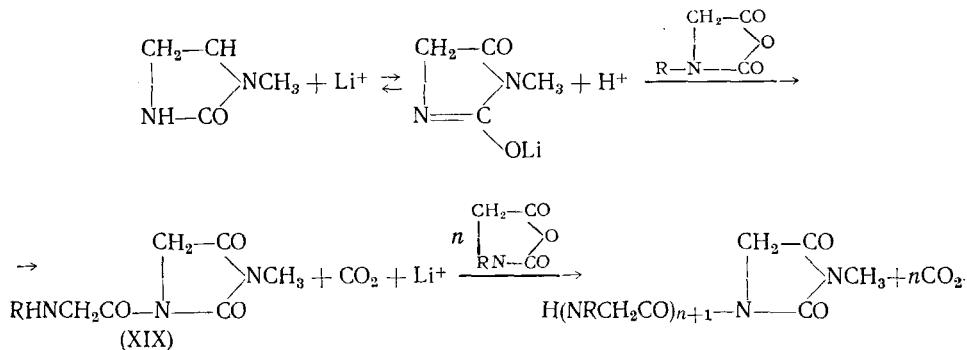


Образующийся промежуточный 3-аминоацетил-оксазолидиндион-2,5 (XVIII) дает начало росту цепи или превращается в гидантоин-3-уксусную кислоту:



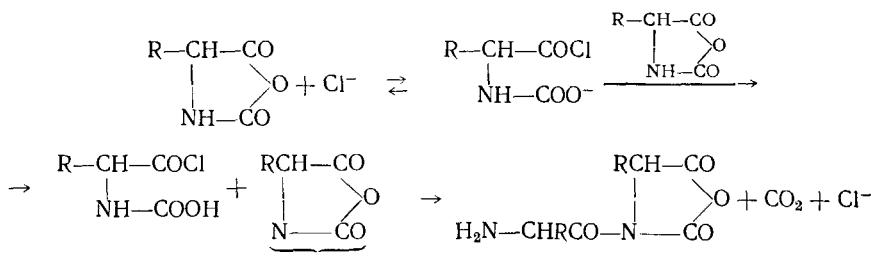
Полипептидные цепи имеют активные концевые группы и могут реагировать друг с другом или образовывать макроциклы.

N-замещенные N-карбоксиангидриды не реагируют с солями, однако, легко полимеризуются в присутствии 3-метилгидантоина:



Первый член цепи 3-метил-1-(N-фенилглицил)-гидантоин (XIX) выделен из продуктов взаимодействия N-карбоксиангидрида N-фенилглицина, 3-метилгидантоина и хлористого лития²⁵⁹.

Позднее оказалось, что LiClO₄ не инициирует полимеризацию ангидридов²⁵⁹. Значит активным компонентом в LiCl является не катион Li⁺, а анион Cl⁻²⁵⁹.



Ж. Инициирование кислотами

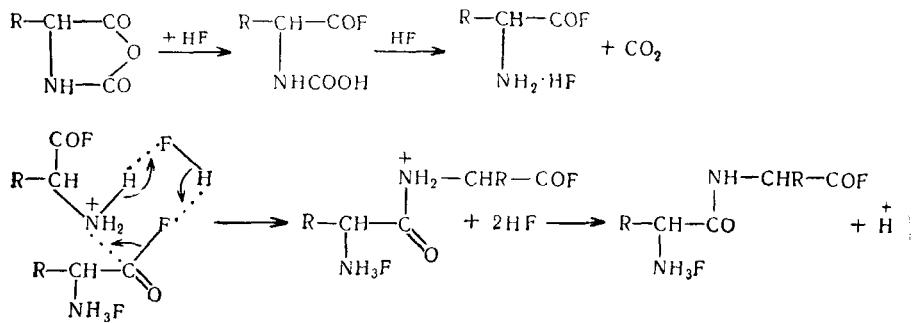
Кислоты обычно ингибируют полимеризацию N-карбоксиангидридов. Однако N-карбоксиангидрид γ-метил-L-глутамата быстро полимеризуется в хлороформе в присутствии уксусной кислоты²⁹². При $[M_0]/[I_0]=2$ реакция протекает вначале с небольшой скоростью ($K_{2a}=0,0035$), но через 30 мин. скорость резко возрастает ($K_{2b}=0,029$) и полимеризация заканчивается за 2 часа с образованием полипептида с $\bar{P}_n=500-600$. Увеличение скорости соответствует $\bar{P}_n=50-60$, что авторы объясняют гель-эффектом.

Интересно, что в диоксане полимеризация не идет, добавление к хлороформу 10% диоксана вызывает появление индукционного периода (70 мин.). В чистой кислоте наблюдается медленное образование трипептидов. Ацилированные продукты и дикетопиеразины в продуктах реакции не обнаружены.

Полимеризация N-карбоксиангидридов в хлороформе вызывается и рядом других кислот²⁹¹.

3. Полимеризация в безводном фтористом водороде

Безводный фтористый водород хорошо растворяет N-карбоксиангидриды и полипептиды²⁹³. Была предпринята попытка использовать его как среду для полимеризации²⁹⁴, которая проходит без посторонних инициаторов, но сопровождается рацемизацией аминокислот и образованием значительных количеств дикетопиеразинов. Степень полимеризации достигает 25–30. Предложен следующий механизм реакции:



И. Инициирование металлоорганическими соединениями

Недавно исследована²⁹⁵ полимеризация N-карбоксиангидрида D,L-аланина в тетрагидрофуране с рядом металлоорганических соединений. Наиболее эффективными оказались диэтилкадмий и триэтилалюминий, менее эффективными — диэтилцинк, фенилмагнийбромид, бутиллитий.

Трибутилбор не инициирует полимеризацию. Полиаланин, полученный с триэтилалюминием, оказался, в отличие от других полимеров, не растворимым в воде. Так как поли-*D*- и поли-*L*-аланин также не растворяются в воде, авторы предположили, что триэтилалюминий вызывает стереоспецифическую полимеризацию N-карбоксиангидрида.

Такой же способностью отличается изопропил алюминия, а также катализитические системы, состоящие из триэтилалюминия и метанола или борнеола, хотя в этом случае нерастворимая фракция составляет только часть продукта. Напротив, смеси диэтилцинка с метанолом и водой и диэтилкадмия с метанолом дают только водорастворимый поли-*D,L*-аланин.

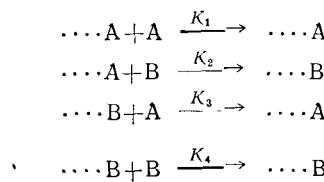
Оптически активные *d*-борнеол и *l*-ментол в качестве инициаторов дают при неполной конверсии мономера полиаланин, обладающий оптической активностью в растворенном состоянии.

4. Сополимеризация N-карбоксиангидридов α -аминокислотой

Известные методы синтеза сополимеров α -аминокислот из N-карбоксиангидридов не позволяют получать сополипептиды с заданной последовательностью остатков аминокислот. Обычно синтез сополипептидов сводится к полимеризации в блоке или растворе смеси N-карбоксиангидридов с применением в качестве инициаторов тех же соединений, что и при их гомополимеризации, т. е. первичных, вторичных и третичных аминов, метилата натрия, амидов аминокислот, полипептидов со свободными аминогруппами, воды и т. д.

Вполне естественно, что сополимеризация является более сложным процессом, чем полимеризация индивидуального N-карбоксиангидрида, и имеет ряд своих особенностей. Большинство опубликованных работ по сополимеризации выполнялось с целью выяснения влияния состава полипептидов на конформацию макромолекул в растворе, вопросам кинетики и механизма реакции удалено меньше внимания. Поэтому значительная часть работ в данном разделе рассмотрена весьма кратко.

Качальский и Села⁵ рассматривают сополимеризацию двух N-карбоксиангидридов, как систему следующих реакций:



где А и В — мономеры,А иВ — растущие пептидные цепи, содержащие конечную аминогруппу аминокислоты А или В, а K_1 , K_2 , K_3 и K_4 — константы скоростей реакций. N-карбоксиангидриды различных аминокислот значительно отличаются по своей реакционноспособности и, следовательно, указанные реакции могут протекать с различными скоростями.

Однако Шалитин и Качальский³¹⁹ нашли, что скорости реакций сополимеризации определяются природой мономера, а не природой конечного аминокислотного остатка растущей цепи и поэтому $K_1 = K_3$, а $K_2 = K_4$.

При сополимеризации N-карбоксиангидридов γ -бензил-*L*-глутамата и ϵ N-карбобензокси-*L*-лизина в диметилформамиде, который хорошо растворяет как гомополимеры, так и сополимеры при 25° с диэтилами-

ном найдено, что скорость сополимеризации равна сумме скоростей полимеризации индивидуальных мономеров (см. рис. 16, 17).

На основании полученных данных скорость сополимеризации $\frac{d[G+L]}{dt}$ может быть представлена как:

$$\frac{d[G+L]}{dt} = K_G [I_0] [G] + K_L [I_0] [L] \quad (1)$$

или

$$\frac{d[G+L]}{dt} = K_{\text{соп}} [I_0] [G+L]$$

где

$$K_{\text{соп}} = \frac{K_G [G] + K_L [L]}{[G] + [L]} \quad (2)$$

Так как K_G больше, чем K_L , то при сополимеризации N-карбоксиангидридов γ -бензил-L-глутамата $[G]$ будет потребляться быстрее, чем N-карбоксиангидрид ϵ -N-карбобензокси-L-лизина $[L]$. Реакционная смесь в конце реакции поэтому будет содержать только следы первого и относительно большие количества второго N-карбоксиангидрида. $K_{\text{соп}}$ в конце реакции практически будет равна K_L .

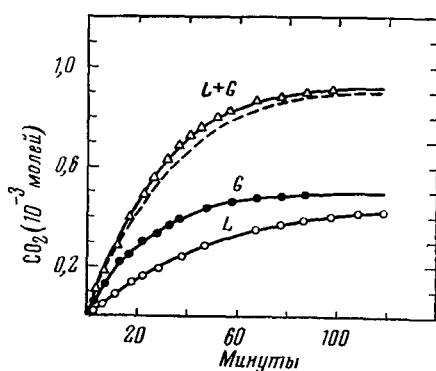


Рис. 16. Полимеризация N-карбоксиангидридов ϵ -N-карбобензокси-L-лизина $[L]$ и γ -бензил-L-глутамата $[G]$ и их смеси $[G+L]$ в диметилформамиде при 25°С с диэтиламином. Пунктирная кривая — сумма кривых L и G

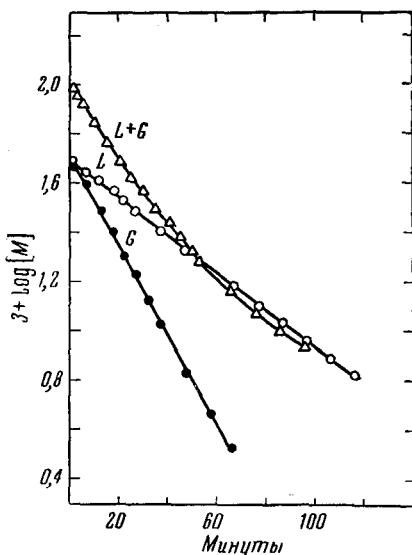


Рис. 17. Расход мономеров L и G в зависимости от времени. $[M]$ — концентрация невступившего в реакцию мономера мол/л

Изменение состава образующегося сополимера во времени наглядно показано на электрофорограмме, снятой в фосфатном буфере при pH 7,8, для глутаминовой кислоты, лизина и для сополимера глутаминовой кислоты и лизина в начальной и конечной стадии сополимеризации (рис. 18).

Как видно, сopolимеры, выделенные в начале реакции, были отрицательно заряжены и направлялись к аноду подобно глутаминовой кислоте, в то время как выделенные в конце реакции были заряжены положительно и направлялись к катоду подобно лизину. Сopolимеры, выделенные после 25, 50 и 93% конверсии мономеров, содержали остатки глутаминовой кислоты и лизина в молярном отношении 3,0; 1,3 и 0,22 соответственно.

Предположение, сделанное относительно механизма сополимеризации, позволило вывести уравнение для состава получающегося сополимера, как функции времени t и начального состава реакционной смеси $\frac{[G_0]}{[L_0]}$:

$$\frac{[G]_x}{[L]_x} = \frac{[G_0]}{[L_0]} \frac{1 - \exp(K_G [I_0])t}{1 - \exp(K_L [I])t}, \quad (3)$$

где $\frac{[G]_x}{[L]_x}$ — отношение остатков глутаминовой кислоты и лизина в сополимере.

При изучении сополимеризации других N-карбоксиангидридов α -аминокислот: L-фенилаланина и ϵ -N-карбобензокси-L-лизина; L-фенилаланина и γ -бензил-L-глутамата; глицина и ϵ -N-карбобензокси-L-лизина; ϵ -N-карбобензокси-L-лизина и D,L-аланина; γ -бензил-L-глутамата и D,L-аланина в диметилформамиде с диэтиламином в качестве инициатора установлено, что полимеризация этих мономерных пар проходит аналогично сополимеризации N-карбоксиангидридов γ -бензил-L-глутамата и ϵ -N-карбобензокси-L-лизина, т. е. скорости сополимеризации равны сумме скоростей полимеризации соответствующих индивидуальных мономеров. Полученные сополипептиды имели молекулярно-весовое распределение, близкое к распределению молекулярных весов соответствующих гомополимеров.

Синтезирован³²⁰ ряд сополипептидов с различным содержанием L-глутаминовой кислоты, L-лизина, L-тирофина и L-фенилаланина, исходя из соответствующих N-карбоксиангидридов в растворе абсолютного бензола при 25°, с метилатом натрия в качестве инициатора ($[M_0]/[J_0] = 400$). Молекулярный вес полученных сополимеров был в пределах 50 000—100 000. На основании кинетических данных авторы сделали заключение, что до 90% конверсии сополимеризация является реакцией первого порядка, после чего наблюдается отклонение.

В табл. 16 представлены данные о составе исходной реакционной смеси и сополипептидов.

Позже^{321, 322} был получен ряд сополимеров с различным содержанием L-глутаминовой к-ты, L-лизина, L-тирофина, L-фенилаланина и L-аланина с $M = 30\ 000$ —550 000.

Блаут и Идельсон³²³ получили 4 высокомолекулярных беспорядочной структуры сополипептида L-лизина и L-глутаминовой кислоты с различным молярным соотношением (7:3; 6:4; 5:5; 4:6) из карбоксиангидридов γ -бензил-L-глутамата и ϵ -N-карбобензокси-L-лизина в

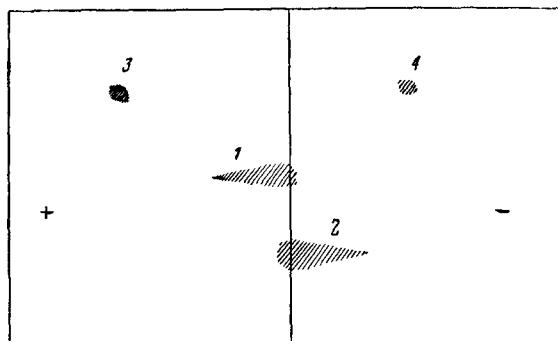


Рис. 18. Электрофорограмма сополимера лизина и глутаминовой кислоты: 1 — сополимер после 20% конверсии, 2 — сополимер после завершения реакции; 3 — глутаминовая кислота; 4 — лизин

ТАБЛИЦА 16
Зависимость⁷ состава сополипептидов от состава исходной смеси

Молярный состав исходной смеси, %				Молярный состав сополипептидов, %			
L-глутамин, к-та	L-лизин	L-фенилаланин	L-тирозин	L-глутамин, к-та	L-лизин	L-фенилаланин	L-тирозин
50,0	33,3	—	16,7	49,8	34,3	—	15,9
47,6	38,4	—	4,0	56,4	37,8	—	5,8
58,0	42,0	—	—	59,0	41,0	—	—
58,0	41,0	—	1,0	56,1	42,6	—	1,3
58,0	38,0	4,0	—	61,6	33,4	5,0	—
56,0	36,0	8,0	—	57,1	33,9	9,0	—
—	100,0	—	—	100	—	—	—
100	—	—	—	—	—	—	—

1%-ном растворе абсолютного бензола при комнатной температуре с метилатом натрия в качестве инициатора ($\frac{[M_0]}{[I_0]} = 200$) и с последующим дебензилированием и декарбобензоксилированием сухим НВг. Полученные сополипептиды со средним молекулярным весом от 36 000 до 110 000 растворялись в воде как при низком, так и при высоком значениях pH и имели минимальную растворимость в нейтральной области pH в зависимости от их состава и заряда, т. е. по характеру растворимости они напоминали полiamфотерные соединения и некоторые протеины.

Для выяснения зависимости конформации макромолекул от состава сополимеров синтезированы³²⁴ сополипептиды S-метил-L-цистеина и L-метионина с молярным соотношением 1 : 9; 2 : 8; 3 : 7; 5 : 5 и сополимеры L-валина и L-метионина с таким же молярным соотношением из соответствующих N-карбоксиангидридов в растворе нитробензола (4%) с метилатом натрия в качестве инициатора ($\frac{[M_0]}{[I_0]} = 200$).

С этой же целью синтезированы¹⁴⁴ поли-β-бензиловые эфиры L и D-аспарагиновой кислоты, поли-γ-бензиловый эфир глутаминовой кислоты, а также серия их сополимеров полимеризацией смеси N-карбоксиангидридов в растворе хлористого метилена с метилатом натрия в качестве инициатора ($\frac{[M_0]}{[I_0]} = 200$) при различном соотношении мономеров (1 : 9; 2 : 8; 3 : 7; 5 : 5; 7 : 3; 9 : 1). Установлено, что поли-β-бензиловый эфир L-аспарагиновой кислоты и поли-γ-бензиловый эфир L-глутаминовой кислоты обладают α-спиральной конформацией, но с противоположным направлением витков.

Для изучения влияния эфирной группировки на конформацию и свойства поли-β-ариловых эфиров L-аспарагиновой кислоты³⁰² сополимеризацией N-карбоксиангидрида β-p-нитробензилового и β-бензилового эфиров L-аспарагиновой кислоты в диметилформамиде с диэтиламином в качестве инициатора получен³⁰² ряд сополимеров с различным молярным соотношением остатков эфиров. Найдено, что сополимеры обладают спиральной конформацией, причем введение в поли-β-бензиловый эфир L-аспарагиновой кислоты более 35—40% p-нитробензильных остатков вызывает изменение направления витков спирали на обратное.

Интересные по своему строению сополипептиды получены³²⁵ сополимеризацией N-карбоксиангидрида γ-бензилового эфира L-глутаминовой кислоты с N-карбоксиангидридами L-аланина, L-лейцина и

L-метионина в различных соотношениях. В полученных сополимерах γ -эфирные группы были заменены на остатки 2-морфолинетиамина. Такие сополипептиды хорошо растворялись в воде и обладали высоким содержанием спиральной конформации в растворе. Добавление к растворам денатурирующих агентов (мочевина) и солей вызывало переход к беспорядочно-свернутой конформации.

Для выяснения влияния стерической конфигурации мономеров и их соотношения на молекулярный вес и свойства образующихся сополипептидов³²⁶ синтезирован ряд полипептидов сополимеризацией 3%-ного раствора смеси N-карбоксиангидридов в бензоле, насыщенном водой (70°, 24 часа). Были взяты N-карбоксиангидриды сильно основного *D* или *L*-лизина и кислого *L*-тирозина в соотношении 1:1 и 3:1. Полученные сополимеры при соотношении мономеров 3:1, независимо от конфигурации лизина, имели средний молекулярный вес $\sim 18\,000$. При соотношении мономеров 1:1 получены сополимеры с молекулярным весом $M_w = 18\,000$ в случае *D,L*-лизина; $M_w = 40\,000$ в случае *D*-лизина и два сополимера с различным молекулярным весом в случае *L*-лизина. Более высокомолекулярный продукт с $M_w = 600\,000$ был значительно богаче *L*-тирозином, чем сополимер с меньшим молекулярным весом, равным 13 000.

С целью синтеза полипептидов, близких по структуре к протеинам, получены³²⁷ полипептиды сополимеризацией (с 0,5 мол. % метилата натрия) эквимолярной смеси N-карбоксиангидридов (4%-ный раствор в диметилформамиде) *L*-лизина и *L*-глутаминовой кислоты, гомополимеры которых имеют α -спиральную конформацию соответственно при рН выше 10,5 и ниже 4,5.

Ождалось, что такие сополимеры могут иметь α -спиральную конформацию при нейтральном рН. Полученные сополимеры имели молекулярный вес $\sim 40\,000$, растворялись в воде. В нейтральном 0,15 M растворе NaCl обнаружено до 15% спиральной конформации, возрастающей до 50% при рН 4 и исчезающей при рН 12 или удалении NaCl.

С целью синтеза амфотерных растворимых полипептидов изучалась сополимеризация N-карбоксиангидридов *L*-глутаминовой кислоты, *L*-лизина и *L*-фенилаланина в соотношении 1:1:3 и *L*-глутаминовой кислоты, *L*-лизина и *L*-лейцина в соотношении 1:1:1,9^{328–330}. Полученные полипептиды имели типичные амфотерные свойства. Они растворялись в разбавленных минеральных кислотах и щелочах, но не растворялись в воде при рН от 4,0 до 10,8, что авторы объясняют агрегацией таких сополипептидов при приближении к изоэлектрической точке, равной для второго полимера 7,3.

Позднее авторы нашли³²⁹, что для увеличения растворимости в нейтральной области рН следует вводить остатки серина, которые наряду с остатками треонина в альбумине обуславливают растворимость последнего. Были получены сополипептиды, содержащие *L*-глутаминовую кислоту и *D,L*-серин в молярных отношениях 4:1, 3:2, 2:3 и 1:4. Два последних сополимера были растворимы даже в воде. Свободный сополимер, содержащий *L*-глутаминовую кислоту, *L*-лизин, *D,L*-серин в соотношении 1:1:2 растворялся при любом значении рН. Для этого сополимера была установлена зависимость уд. вязкости от рН (рис. 19). Как видно, вязкость минимальна в изоэлектрической точке (рН 7), что характерно для амфотерных полиэлектролитов.

Получены также³³¹ растворимые в воде линейные сополипептиды *L*-глутаминовой кислоты, *L*-лизина и *L*-тирозина с соотношением 2,8:2,6:1,0 полимеризацией смеси соответствующих N-карбоксиангид-

ридов в растворе бензола с метилатом натрия в качестве инициатора при $\frac{[M_0]}{[I_0]} = 400$ и последующим декарбобензоксилированием. Сополимер имел $M_w \sim 49\,000$, был растворим в воде, но в 0,15 M растворе NaCl растворялся только при $pH > 10$.

Из соответствующих N-карбоксиангидридов получены³³² тирозинсодержащие сополимеры: глицин—L-тироzin с соотношением 1:1 ($M_w = 7390$) и 2:1 ($M_w = 6520$), L-фенилаланин—L-тироzin с соотношением 1:1 ($M_w = 6370$) и 2:1 ($M_w = 8780$), а также глицин—D,L-аланин—L-тироzin с соотношением 8:4:1 ($M_w = 2360$).

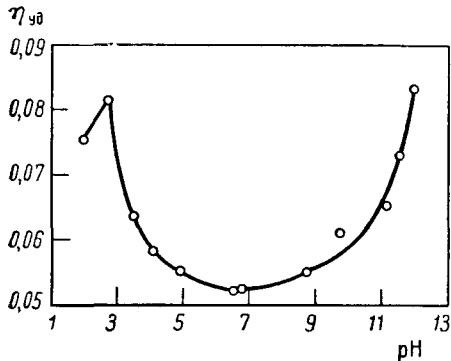


Рис. 19. Зависимость удельной вязкости сополимера глутаминовая к-та : L-ли-зин : DL-серин 1 : 1 : 2 от pH среды
момеров : L-пролин : глицин 1 : 1, 1 : 2, 1 : 3 и L-пролин : глицин : L-оксипролин 1 : 2 : 1.

Описано получение сополипептидов, содержащих L-аргинин и L-лейцин (2,3 : 1), которые обладают слабым ингибирующим действием на коагуляцию крови³³⁴ и L-глутаминовую кислоту и 2,5-, 3,4-диоксиフェニлаланин со слабыми катализитическими свойствами³³⁵.

За последние годы появились патенты на способы получения сополипептидов и их применение в различных областях промышленности. Так, описан способ получения сополипептидов обработкой растворов натриевых солей аминокислот (полученных из белковых соединений, например серум альбумина), хлорпроизводными эфирами слабых кислот, например ClCOOCH₃, а затем SOCl₂, что приводит к образованию смеси N-карбоксиангидридов, которая обычными методами полимеризуется и превращается в волокна и пленки³³⁶.

В другом патенте³³⁷ приводится способ получения сополипептидов из смеси N-карбоксиангидридов L-лейцина и фенилаланина. Молекулярный вес полученных сополипептидов превышает 7000. Эти сополимеры могут быть использованы для получения волокон, различных листов и форм.

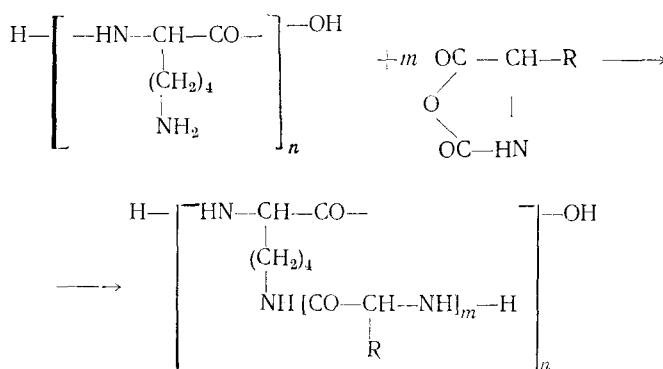
5. Получение привитых и блок-сополимеров

Протеины реагируют в мягких условиях с N-карбоксиангидридами α -аминокислот с образованием полипептилпротеинов. В этих реакциях протеины со свободными аминогруппами подобно синтетическим полипептидам со свободными аминогруппами действуют как полиинициаторы.

Получены³³⁸ разветвленные полiamинокислоты полимеризацией N-карбоксиангидридов D,L-аланина, сарказина и L-лизина на поли-

Так как ряд физических и химических свойств коллагена и желатины обусловлены большим содержанием в них пролина и оксипролина, были синтезированы³³³ модельные полипептиды, содержащие указанные аминокислотные остатки. Сополимеризацией при комнатной температуре смеси соответствующих N-карбоксиангидридов в растворе диоксана с диэтиламином и триэтиламином в качестве инициаторов или в пиридине без инициатора получены сополимеры со следующим молярным соотношением моно-

L-лизине. В данном случае поли-*L*-лизин служил инициатором полимеризации. Были получены поли-(ϵ -N-поли-*D,L*-аланил)-*L*-лизин с $n=20$ и $m=20$; водорастворимый поли-(ϵ -N-полисаркозил)-*L*-лизин с $n=20$, $m=7$ и разветвленный поли-(ϵ -N-поли-*L*-лизил)-*L*-лизин с $n=30$, $m=15$.



Аналогично водный раствор бромгидрата поли-*L*-лизина использован в качестве поливалентного инициатора³³⁹ для полимеризации N-карбоксиангидрида γ -бензилглутамата; в результате получен разветвленный полипептид с $n=280$ и $m=40$, молекулярный вес которого был 1 500 000.

Порошин³⁴⁰ изучил взаимодействие продуктов первичной деструкции казеина — гидролизата пептона с N-карбоксиангидридами глицина, *D,L*-аланина и *D,L*-пролина в охлажденном растворе диоксана или в фосфатном буфере. Продукты взаимодействия подвергались диализу, а затем исследовались на содержание аминокислотных остатков. Установлено, что для полиглицилпептона степень полимеризации (m) глицина = 8—10, а для поли-*D,L*-аланилпептона $m=18$ —20. Полученный поли-*D,L*-аланилпептон использован для полимеризации N-карбоксиангидрида *D,L*-пролина и был получен поли-*D,L*-аланил-поли-*D,L*-пролилпептон, который легко растворялся в воде.

Конигсберг и Бекер³⁴¹ осуществили прививку N-карбоксиангидридов глицина и фенилаланина с меченым карбоксильным углеродным атомом C¹⁴ на ряд протеинов: альбумин, яичный альбумин, химотрипсин, химотрипсиноген, лизозим в 0,067 M фосфатном буферном расгворе при pH от 6,2 до 7,8, в 0,1 M боратном буферном растворе при pH от 8,2 до 9,1, а также в растворе бикарбоната натрия, насыщенном CO₂ при pH 6,9—7,6. Постепенное увеличение количества привитого глицина наблюдалось при изменении pH от 6,2 до 9.

Из примененных растворов наиболее эффективным оказался бикарбонатный. Так, например, в фосфатном буферном растворе был привит 41 моль глициновых остатков на 1 моль протеина, тогда как при прочих равных условиях в растворе бикарбоната натрия было привито 72 моля глициновых остатков на 1 моль протеина.

Клей и другие^{342, 343} обрабатывали альбумин крови коровы и кролика в бикарбонатном растворе или в фосфатном буфере N-карбоксиангидридами глицина, лейцина, фенилаланина, глутаминовой кислоты и лизина. С помощью микротитрования было замечено изменение количества карбоксильных, имидазольных, α - и ϵ -аминогрупп и установлено, что прививка частично (30%) идет по ϵ -NH₂-группам.

Методом пептидилирования³⁴⁴ получена растворимая в воде глиадиновая фракция. С этой целью к глиадину были привиты *D,L*-аланин и N⁴-(3-оксипропил)-*L*-аспарагин. В первом случае реакцию проводили

с N-карбоксиангидридом *D,L*-аланина и глиадином в смеси диоксана и 0,05 *M* фосфатного буферного раствора (рН 6,8 2°, 48 часов) и выделили растворимый в воде поли-*D,L*-аланилглиадин. Содержание аланина увеличилось от 1,4 % в глиадине до 23,6 % в полиаланилглиадине, что соответствует прививке, в среднем, 4,1 миллимолей аланиновых остатков на грамм глиадина.

Во втором случае реакцию проводили с N-карбоксиангидридом бензилового эфира аспарагиновой кислоты и глиадином в диметилформамиде (20°, 48 часов). После выделения полибензил-*L*-аспарагилглиадина его выдерживали 30 минут при 40° с пропаноламином, а затем выделили 4 *M* уксусной кислотой растворимый в воде поли-*N*⁴-(3-оксипропил)-*L*-аспарагилглиадин, обогащенный остатками аспарагиновой кислоты до 6,3 миллимоля на грамм глиадина.

Как было отмечено⁵, пептидилирование не нарушает в большинстве случаев биологических свойств протеинов, изменяя ряд других их свойств.

Учитывая известную устойчивость пептидов валина к кислотному гидролизу, изучалось влияние прививки валина к протеинам на их биологические и химические свойства³⁴⁵. Были получены поли-*D,L*-валилхимотрипсин, поли-*D,L*-валилизозим и поли-*D,L*-валилинсулин при взаимодействии N-карбоксиангидрида *D,L*-валина с протеинами при 4° в фосфатном (рН 7,6) и в боратном (рН 8,5) буферных растворах. Модифицированные протеины необыкновенно устойчивы к кислотному гидролизу. Только 96 часовое кипячение с соляной кислотой вызывает полный гидролиз. Энзиматическая активность поли-*D,L*-валилхимотрипсина сохраняется лишь на 60 % по сравнению с активностью природного протеина, тогда как в случае полиглицилхимотрипсина она остается той же, что и у природного энзима.

Исследовано³⁴⁶ влияние на физиологическую активность желатины прививки: *L*-тироцина, *L*-триптофана, *L*-фенилаланина, *L*-цистеина, *L*-пролина, *L*-глутаминовой кислоты, *L*-лизина, *L*-аланина, *L*-серина, *L*-циклогексилаланина, а также смеси *L*-глутаминовой кислоты и *L*-тироцина; *L*-глутаминовой кислоты и *L*-циклогексилаланина. Найдено, что прививка к желатине аминокислот, содержащих в боковой цепи ароматические, а также циклогексановые циклы, придают желатине повышенную физиологическую активность.

Интересна проблема превращения некоторых энзимов в водонерастворимые продукты, обладающие специфической каталитической активностью, так как «водонерастворимые энзимы» легко могут быть удалены из сферы реакции. Они могут быть также использованы для приготовления колонок с энзиматической активностью. С этой целью был получен³⁴⁷ политиразилтрипсин, который полностью растворялся и сохранял энзиматическую активность трипсина. При сочетании его с диазотированным сополимером *p*-аминофенилаланина и лейцина получен совершенно водонерастворимый трипсин, сохраняющий свою энзиматическую активность, который мог использоваться для приготовления активной трипсиновой колонки для аминокислотного последовательного анализа.

Получен³⁴⁸ политиразилтрипсин, содержащий 20—28 привитых остатков тирозина на 1 моль трипсина путем полимеризации N-карбоксиангидрида *L*-тироцина в водном растворе при использовании трипсина в качестве поливалентного инициатора. При этом установлено, что приблизительно половина ε-аминогрупп трипсина была ацилирована N-карбоксиангидридом тирозина. Средняя длина цепи привитого тирозина ~2,5. В противоположность трипсину политиразилтрипсин

умеренно растворим при рН 5:9. По отношению к денатурирующим агентам (мочевина, соевое масло) и по своей энзиматической активности политирозилтрипсин не отличался значительно от трипсина.

Синтезирован³⁴⁹ водорастворимый блочный полипептид, состоящий из центрального блока — поли-*L*-аланина и двух фланговых поли-*D,L*-глутаминовой кислоты. Синтез проводили в растворе бензола с 2%-ной начальной концентрацией N-карбоксиангидрида γ-бензил-*D,L*-глутаминовой кислоты. В качестве инициатора использован *n*-тексиламин, к которому был добавлен N-карбоксиангидрид *L*-аланина, а затем N-карбоксиангидрид γ-бензил-*D,L*-глутаминовой кислоты. За ходом полимеризации наблюдали по выделяющейся CO₂.

По аминокислотному анализу молярное отношение глутаминовой кислоты к аланину было 1,54. Установлено, что молекула блочного полимера имела блок из *L*-аланина, состоящий из 175 остатков кислоты и два блока *D,L*-глутаминовой кислоты, состоящие из 325 остатков вместе.

Не только природные протеины или синтетические поли- α -амино-кислоты могут служить поливалентными инициаторами полимеризации N-карбоксиангидридов, но и любые полимерные материалы, содержащие свободные первичные или вторичные аминогруппы. Так, при полимеризации стирола в жидком аммиаке с Na в качестве инициатора, при температуре —40°, с последующим добавлением NH₄Cl и отгонкой аммиака получается полистирол с содержанием 11% азота. При полимеризации N-карбоксиангидридов *D,L*-валина в бензольном растворе этого полистирола получен продукт, содержащий 24—29% полистирола, растворимый только в *m*-крезоле. Аналогично были приготовлены сополимеры стирол-глицидилметакрилат-*D,L*-фенилаланин и стирол-глицидилакрилат-*D,L*-фенилаланин³⁵⁰.

Такие своеобразные полиамиды термопластичны и обладают исключительной стойкостью к растворителям.

ЛИТЕРАТУРА

1. E. Fischer, Ber., **34**, 2868 (1901); **37**, 2504 (1904); **38**, 605, 2914 (1905); **39**, 471, 2893 (1906); **40**, 1754 (1907).
2. M. Bergmann, L. Zervas, Ber., **65**, 1192 (1932).
3. H. Leuchs, Ber., **39**, 857 (1906).
4. C. Bamford, A. Elliot, W. Hanby, Synthetic Polypeptides, New York, 1956.
5. E. Katchalski, M. Sela, Adv. protein Chem., **13**, 243 (1958).
6. T. Wieland, Makrom. Chem., **35A**, **65** (1960).
7. D. Elmore, Ann. Repts prog. Chem., **56**, 304 (1959).
8. H. Scheraga, Ann. Rev. Phys. Chem., **10**, 191 (1958).
9. M. Bodánsky, Record. Chem. Progr., **18**, 187 (1957).
10. D. Noguchi, Chem. a. Chem. Ind., **14**, 1027 (1961).
11. R. Schwyzer, Ann. Rev. Biochem., **29**, 183 (1960).
12. E. Katchalski, J. Steinberg, Ann. Rev. Phys. chem., **12**, 433 (1961).
13. Е. Качальский, Химия и технол. полим., **1960**, 42.
14. M. Sela, E. Katchalski, Adv. protein Chem., **14**, 391 (1959).
15. E. Curnoe, Chem. a. Ind., **1956**, 783.
16. F. Graziani, Att. accad. naz. Lincei (5), **25**, 509 (1916), CZ-87, 11, 226.
17. N. Lichtenstein, J. Am. Chem. Soc., **60**, 560 (1938).
18. G. Schramm, J. Leube, Makrom. Chem., **13**, 117.
19. A. Meggy, J. Chem. Soc., **1956**, 1444.
20. S. Fox, Am. Naturalist, **87**, 253 (1953); **89**, 163 (1955).
21. S. Fox, Am. Scientist, **44**, 347 (1956).
22. S. Fox, M. Middlebrook, Federation Proc., **13**, 211 (1954).
23. S. Fox, J. Johnson, M. Middlebrook, J. Am. Chem. Soc., **77**, 1048 (1955).
24. S. Fox, J. Johnson, A. Vegotsky, Science, **124**, 923 (1956).
25. K. Harada, S. Fox, J. Am. Chem. Soc., **80**, 2694 (1958).
26. E. Fisher, T. Dörgenhaus, Ztschr. physiol. Chem., **36**, 476 (1902).

27. A. Vegotsky, K. Harada, S. Fox, J. Am. Chem. Soc., **80**, 3061 (1958).
 28. K. Harada, J. Org. Chem., **24**, 1662 (1959).
 29. J. Kovacs, I. Könyves, A. Puszta i, Experientia, **90**, 459 (1953).
 30. J. Kovacs, I. Könyves, Naturwiss., **41**, 333 (1954).
 31. J. Kovacs, I. Könyves, J. Császár, Там же, **41**, 575 (1954).
 32. H. Mix, J. Kovacs, Там же, **43**, 447 (1956).
 33. J. Kovacs, H. N. Kovacs, I. Könyves, J. Császár, T. Vajda, H. Mix, J. Org. Chem., **26**, 1084 (1961).
 34. J. Kovacs, Polyamino acids, Polypept. Proteins Proc. Intern. Symp. Madison Wisc., **1961**, 37; C. A., **58**, 6923c (1963).
 35. K. Harada, S. Fox, Arch. Biochem. Biophys., **86**, 274 (1960).
 36. S. Fox, K. Harada, Science, **128**, 1214 (1958).
 37. S. Fox, K. Harada, J. Am. Chem. Soc., **82**, 3745 (1960).
 38. S. Fox, K. Harada, A. Vegotsky, Experientia, **15**, 84 (1959).
 39. S. Fox, K. Harada, Arch. Biochem. Biophys., **86**, 281 (1960).
 40. G. Anderson, J. Blodinger, R. Young, A. Welcher, J. Am. Chem. Soc., **74**, 5304, 5307 (1952).
 41. G. Krampitz, Naturwiss., **46**, 558 (1959).
 42. G. Krampitz, Ztschr. Tierernähr und Futtermittel, **13**, 83 (1958).
 43. G. Krampitz, Polyamino acids, Polypept. Proteins. Proc. Intern. Symp. Madison Wisc., **1961**, 55; C. A., **58**, 6923g (1963).
 44. K. Harada, Bull. Chem. Soc. Japan, **32**, 1007 (1959).
 45. K. Harada, S. Fox, D. Röphling, Polyam. acids, Polypept., Proteins. Proc. Intern. Symp. Madison Wisc., **1961**, 47; C. A., **58**, 6926c (1963).
 46. A. Meggy, Англ. пат. 793098 (9.04.1958); C. A., **52**, 19241g (1958).
 47. K. Bahadur, S. Ranganayaki, Paper communicated for the Symposium on Biochemical Origin's held at San Franciscow, USA, April, 1958.
 48. K. Bahadur, S. Ranganayaki, Изв. АН СССР, ОХН, **1958**, 1361.
 49. K. Bahadur, R. Srivastava, Indian, J. Appl. Chem., **23**, 131 (1960).
 50. E. Ellenbogen, Ам. пат. 2965554 (20.12.1960); C. A., **55**, 7309a (1961).
 51. R. Herzog, E. Krahn, Ztschr. Physiol. Chem., **134**, 290 (1924).
 52. E. Abderhalden, R. Haas, Там же, **151**, 114 (1926).
 53. E. Abderhalden, R. Haas, Там же, **153**, 147 (1926).
 54. E. Abderhalden, E. Komt, Там же, **139**, 147 (1924).
 55. V. Bruchner, M. Szekerke, J. Kovacs, Naturwiss., **43**, 105 (1956).
 56. H. Ritaoka, S. Sakakibara, H. Tani, Bull. Chem. Soc. Japan, **31**, 802 (1958).
 57. G. Schramm, H. Wissmann, Chem. Ber., **91**, 1075 (1958).
 58. T. Furuyama, S. Sakakibara, S. Akabori, Bull. Chem. Soc. Japan, **35**, 171 (1962).
 59. E. Blout, M. Des Roches, J. Am. Chem. Soc., **81**, 370 (1959).
 60. A. Meggy, J. Chem. Soc., **1953**, 851.
 61. A. Meggy, J. Appl. Chem., **4**, 154 (1954).
 62. K. Shibata, Acta phytochim. (Japan), **2**, 39, 193 (1925); C. A., **20**, 918 (1926); **22**, 1592 (1928).
 63. А. Полякова, Л. Верещагина, А. Сахарова, Е. Тамбовцева, Изв. АН СССР, ОХН, **1954**, 142.
 64. S. Goto, J. Polym. Sci. **57**, 965 (1962).
 65. K. Hall, J. Am. Chem. Soc., **80**, 6404 (1958).
 66. J. Kovacs, H. Nagy, Nature, **190**, 531 (1961).
 67. C. Guidry, Dissert. Abstr., **23**, 1188 (1962).
 68. T. Ovo, C. Guidry, Nature, **186**, 156 (1960).
 69. N. Mach, Artzl. Forsch., **14**, 11/71 (1960); C. A., **55**, 5615a (1961).
 70. G. Losse, K. Anders, Ztschr. Physiol. Chem., **323**, 111 (1961).
 71. В. Коршак, К. Порошин, Т. Казаренко, Изв. АН СССР, ОХН, **1954**, 663.
 72. Н. Блоктапп, Н. Миссо, Вег., **87**, 581 (1954).
 73. Т. Казаренко, К. Порошин, Ю. Хургин, Изв. АН СССР, ОХН, **1955**, 773.
 74. К. Порошин, Т. Казаренко, Там же, **1959**, 1484.
 75. В. Патрикеев, Т. Казаренко, Там же, **1962**, 170.
 76. В. Коршак, К. Порошин, Т. Казаренко, Там же, **1955**, 1112.
 77. Т. Казаренко, К. Порошин, Ю. Хургин, Там же, **1957**, 174, 563, 642.
 78. К. Порошин, Т. Казаренко, Ю. Хургин, Там же, **1957**, 640.
 79. К. Порошин, Т. Казаренко, Ю. Хургин, Там же, **1956**, 974.
 80. L. Baily, J. Chem. Soc., **1950**, 3461.
 81. К. Порошин, Ю. Хургин, Т. Казаренко, Н. Прохорова, Н. Носкова, Междунар. симпозиум по макромол. химии 1960 г., сек. I, 210—211.
 82. Т. Казаренко, К. Порошин, М. Кузьмина, Изв. АН СССР, ОХН, **1959**, 1663.

83. Т. Казаренко, К. Порошин, М. Кузьмина, Там же, **1960**, 2215.
 84. Т. Казаренко, Т. Носкова, К. Порошин, Там же, **1959**, 1327.
 85. Т. Казаренко, К. Порошин, Ю. Хургин, Там же, **1956**, 974.
 86. Ю. Хургин, М. Дмитриева, ДАН, **143**, 629 (1962).
 87. Т. Казаренко, Н. Носкова, К. Порошин, Изв. АН СССР, ОХН, **1959**, 935.
 88. Н. Степанов, Ю. Хургин, К. Порошин, Там же, **1961**, 160.
 89. К. Порошин, Ю. Хургин, Т. Казаренко, ДАН **124**, 105 (1959).
 90. Ю. Хургин, К. Порошин, Т. Казаренко, Изв. АН СССР, ОХН, **1959**, 941.
 91. К. Порошин, Т. Казаренко, Ю. Хургин, Там же, **1956**, 1500.
 92. К. Порошин, Ю. Хургин, Н. Прохорова, Там же, **1960**, 1687.
 93. К. Порошин, Н. Прохорова, Ю. Хургин, Высокомол. соед., **I**, 907 (1959).
 94. К. Порошин, Ю. Хургин, Н. Прохорова, Изв. АН СССР, ОХН, **1958**, 1428.
 95. М. Вгеппег, Н. Rickenbacher, Helv. chim. acta, **43**, 2152 (1960).
 96. Пат. ФРГ 954419 (20.12.1956); С. А., **53**, 11263b (1959).
 97. К. Порошин, В. Шибнев, П. Казаренко, Изв. АН СССР, ОХН, **1959**, 736.
 98. D. De-Tar, W. Honsberg, U. Honsberg, A. Wieland, M. Gouge, H. Bach, A. Tahara, W. Brinigar, F. Rogers, мл. J. Am. Chem. Soc., **85**, 2873 (1963).
 99. V. Bruckner, M. Szekercs, J. Covacs, Z. Physiol. Chem., **309**, 25 (1957).
 100. Y. Wolman, P. Gallop, A. Patchornik, Там же, **83**, 1263 (1961).
 101. J. Noguchi, Nippon Kagaku Zasshi, **74**, 961 (1953); С. А., **52**, 261c (1958).
 102. J. Noguchi, S. Ishino, K. Miyamori, M. Asai, T. Hayakawa, T. Hirano, Nippon Kagaku Zasshi, **75**, 639 (1954); С. А., **52**, 261d (1958).
 103. J. Noguchi, S. Ishino, K. Miyamori, M. Asai, T. Hayakawa, T. Hirano, Nippon Kagaku Zasshi, **75**, 641 (1959); С. А., **52**, 261d (1958).
 104. J. Noguchi, S. Ishino, K. Miyamori, M. Asai, T. Hayakawa, T. Hirano, Nippon Kagaku Zasshi, **75**, 642 (1954); С. А., **52**, 261g (1958).
 105. J. Noguchi, S. Ishino, K. Miyamori, M. Asai, T. Hayakawa, T. Hirano, Nippon Kagaku Zasshi, **75**, 643 (1954); С. А., **52**, 261g (1958).
 106. J. Noguchi, S. Ishino, K. Miyamori, M. Asai, T. Hayakawa, T. Hirano, Nippon Kagaku Zasshi, **75**, 645 (1954); С. А., **52**, 261h (1958).
 107. J. Noguchi, T. Hayakawa, H. Saikawa, Nippon Kagaku Zasshi, **75**, 819 (1954).
 108. J. Noguchi, S. Ishino, T. Hayakawa, M. Jada, Nippon Kagaku Zasshi, **76**, 457 (1955); С. А., **51**, 17753c (1957).
 109. J. Noguchi, T. Hayakawa, T. Motoi, Nippon Kagaku Zasshi, **76**, 646 (1955); С. А., **51**, 17753g (1957).
 110. J. Noguchi, T. Hayakawa, J. Suzuki, M. Ebata, Nippon Kagaku Zasshi, **76**, 648 (1955); С. А., **51**, 17753a (1957).
 111. J. Noguchi, T. Hayakawa, Nippon Kagaku Zasshi, **76**, 651 (1955); С. А., **51**, 17754d (1957).
 112. J. Noguchi, J. Polym. Sci., **23**, 843 (1957).
 113. J. Noguchi, T. Hayakawa, M. Nishimura, Nippon Kagaku Zasshi, **77**, 463 (1956); С. А., **52**, 8960 (1958).
 114. J. Noguchi, T. Hayakawa, S. Ishizaki, Nippon Kagaku Zasshi, **77**, 466 (1956); С. А., **52**, 8960 (1958).
 115. J. Noguchi, T. Hayakawa, S. Ishizaki, Nippon Kagaku Zasshi, **77**, 469 (1956); С. А., **52**, 8960 (1958).
 116. J. Noguchi, T. Saito, T. Onti, T. Yayashi, Nippon Kagaku Zasshi, **80**, 299 (1959); С. А., **55**, 2508 (1961).
 117. T. Hayakawa, Y. Onti, J. Noguchi, J. Chem. Soc. Japan pure Chem. Sect., **80**, 301 (1959).
 118. T. Hayakawa, T. Mizuno, J. Noguchi, Nippon Kagaku Zasshi, **81**, 618 (1960); С. А., **55**, 6394 (1961).
 119. J. Noguchi, T. Saito, M. Asai, Nippon Kagaku Zasshi, **81**, 620 (1960); С. А., **55**, 6395 (1961).
 120. M. Asai, K. Imai, J. Noguchi, Nippon Kagaku Zasshi, **81**, 624 (1960); С. А., **55**, 6395e (1961).
 121. J. Noguchi, N. Nakayama, T. Shimotani, T. Hayakawa, Nippon Kagaku Zasshi, **77**, 472 (1956); С. А., **52**, 89614 (1958).
 122. E. Weymouth, Chem. and Ind., Brit. Ind. Fair Rev., **1956**, R—34—R—35; Chem. Ztschr. **1960**, 14383.
 123. Y. Liphshitz, A. Zilkha, Bull. Research Council Israel Seck A 5. 265—6 (1956); Япон. пат. 6245 (1.07.1960); С. А., **52**, 8309c (1961).
 124. Y. Iwakura, Y. Ishizuka, Chem. High Polymers (Japan), **II**, 540 (1954); Y. Ishizuka, J. Chem. Soc. Japan, **76**, 802, 1108 (1955).
 125. Y. Ishizuka, T. Saito, Chem. a. Ind., **1959**, 299.
 126. Y. Ishizuka, Nippon Kagaku Zasshi, **77**, 1426 (1956); С. А., **53**, 5149g (1959).
 127. Y. Ishizuka, Nippon Kagaku Zasshi, **77**, 90 (1956); С. А., **52**, 259g (1958).

128. Y. Ishizuka, Япон. пат. 3397 (06.06.1957); С. А., **52**, 6407c (1958).
129. Y. Ishizuka, Nippon Kagaku Zasshi, **77**, 93 (1956); С. А., **52**, 260c (1958).
130. J. Iosio, Япон. пат. 15390 (5.09.1961); РЖХимии **1963**, 20т82п.
131. N. Bortnick, Ам. пат. 2871255 (27.06.1959); С. А., **53**, 9010.
132. G. Losse, H. Weddige, Angew. Chem. **72**, 323 (1960); Пат. ФРГ 1114502 (4.06.1960); С. А., **56**, 7422e (1962).
133. F. Fuchs, Ber., **55**, 2943 (1922).
134. A. Farthing, J. Chem. Soc., **1950**, 3213.
135. A. Levy, Nature, **165**, 152 (1950).
136. D. Ballard, Англ. пат. 854139 (16.11.1960); С., **1962**, 18278; Франц. пат. 1219851 (20.5.1960); С., **1962**, 9516.
137. H. Rinke, Пат. ФРГ 840699 (5.06.1952); С. А., **52**, 16240 (1958).
138. K. Heyns, W. Walter, Ann., **609**, 209 (1957).
139. K. Heyns, W. Walter, H. Grützmacher, J. Polymer Sci., **30**, 573 (1958).
140. G. Richardson, Англ. пат. 717045 (20.10.1954); С. А., **49**, 15951 (1955).
141. A. Randall, J. Chem. Soc., **1962**, 374.
142. A. Berger, J. Kurtz, E. Katchalski, J. Am. Chem. Soc., **76**, 5552 (1954).
143. E. Katchalski, J. Kurtz, G. Fasman, A. Berger, Bull. Res. Council Israel, **5A**, 264 (1956).
144. R. Karlson, K. Norland, G. Fasman, E. Blout, J. Am. Chem. Soc., **82**, 2268 (1960).
145. T. Vajda, V. Bruckner, Acta chim. Acad. Sci. Hung., **16**, 215 (1958).
146. L. Birkofer, R. Modic, Ann., **628**, 162 (1959).
147. A. Farthing, Англ. пат. 651913 (11.4.1951); 651914 (11.4.1951); С. А., **46**, 2571 (1952).
148. W. Prichard, Ам. пат. 2516145 (25.7.1950); С. А., **45**, 645 (1951).
149. K. Heyns, H. Schultze, R. Brockmann, Ann., **611**, 33 (1958).
150. K. Heyns, H. Schultze, Ann., **611**, 40 (1958).
151. T. Curtius, W. Sieber, Ber., **55**, 1543 (1922).
152. T. Curtius, K. Hochschwender, H. Meier, W. Lehmann, A. Benckiser, M. Schenek, W. Wirbatz, J. Gaier, W. Mühlhauser, J. Prakt. Chem. [2] **125**, 211 (1930).
153. W. Baird, E. Parry, S. Robinson, Англ. пат. 646033 (15.11.1950); С. А., **45**, 5177 (1951).
154. D. Ballard, Англ. пат. 896511 (16.05.1962); С. А., **57**, 11304 (1962).
155. A. Berger, M. Sela, E. Katchalski, Anal. Chem., **25**, 1554 (1953).
156. D. Ballard, C. Bamford, F. Weymouth, Analyst, **81**, 305 (1956).
157. A. Patchornik, Y. Shalitin, Bull. Research. Council Israel Sect. **A5**, 300 (1956).
158. A. Patchornik, Y. Shalitin, Analyst. Chem., **33**, 1887 (1961).
159. F. Roughton, Physiol. Revs., **15**, 241 (1935).
160. C. Neuberg, A. Grauer, M. Kreidl, Arch. Biochem. Biophys., **58**, 169 (1955).
161. F. Lipmann, L. Tuttle, J. Biol. Chem., **159**, 21 (1945).
162. M. Siegfried, Ztschr. physiol. Chem., **44**, 85 (1905); **46**, 40h (1905).
163. P. Bartlett, R. Jones, J. Am. Chem. Soc., **79**, 2153 (1957).
164. B. Hargitay, A. Hubert, R. Buyle, Makrom. Chem., **56**, 104 (1962).
165. T. Wieland, K. Euler, Chem. Ber., **91**, 2305 (1958).
166. K. Kopple, J. Katz, J. Am. Chem. Soc., **78**, 6199 (1956)..
167. M. Brenner, I. Photaki, Helv. chim. acta, **39**, 1525 (1956).
168. M. Bergmann, L. Zervas, W. Ross, J. Biol. Chem., **111**, 245 (1935).
169. E. Katchalski, P. Spitnik, J. Am. Chem. Soc., **73**, 2946 (1951).
170. A. Patchornik, M. Sela, E. Katchalski, Там же, **76**, 299 (1954).
171. M. Sela, E. Katchalski, Там же, **76**, 129 (1954).
172. J. Moore, J. Dice, E. Nicolaides, R. Westland, E. Wittle, Там же, **76**, 2884 (1954).
173. В. Ф. Кучеров, М. И. Дорохова, ЖОХ, **21**, 1486, 1491 (1951).
174. F. Wessely, Ztschr. Physiol. Chem., **146**, 72 (1925).
175. F. Sigmund, F. Wessely, Там же, **157**, 91 (1926).
176. W. Hawley, S. Waley, J. Watson, J. Chem. Soc., **1950**, 3009.
177. К. Т. Порошин, Т. Д. Казаренко, Ю. И. Хургин, Изв. АН СССР, ОХН, **1956**, 626; **1956**; 1500; **1957**; 642.
178. A. Cook, A. Levy, J. Chem. Soc., **1950**, 637, 642, 646, 651.
179. D. Ballard, C. Bamford, Там же, **1958**, 355.
180. K. Kopple, J. Am. Chem. Soc., **79**, 662 (1957).
181. K. Kopple, Там же, **79**, 6442 (1957).
182. C. Bamford, H. Block, J. Chem. Soc., **1961**, 4989.
183. F. Wessely, H. Pawley, W. Rizzi, Monatsh. Chem., **86**, 75 (1955).
184. F. Wessely, W. Swoboda, Там же, **82**, 621 (1951).

185. F. Statham, J. Chem. Soc., **1951**, 213.
 186. W. Dawies, Там же, **1951**, 1357.
 187. J. Breitenbach, F. Richter, Makrom. Chem., **4**, 262 (1950).
 188. H. Yuki, Chem. High Polymers Japan, **8**, 65 (1951).
 189. M. Hunt, V. du Vigneaud, J. Biol. Chem., **124**, 699 (1938).
 190. J. Billimoria, A. Cook, J. Chem. Soc., **1949**, 2323.
 191. J. Bailey, Nature, **164**, 889 (1949).
 192. M. Sela, A. Berger, J. Am. Chem. Soc., **77**, 1893 (1955).
 193. J. Bailey, J. Chem. Soc., **1950**, 3461.
 194. J. Rudinger, F. Sorm, Coll. Czech. chem. Comm., **16**, 214 (1951); M. Zaoral, J. Rudinger, Там же, **20**, 1183 (1955); J. Honzla, J. Rudinger, Там же, **20**, 1190 (1955).
 195. F. Wessely, K. Schlögl, G. Körger, Monatsh. Chem., **82**, 671 (1951).
 196. H. Brinzingier, H. Beier, Kolloid. Ztschr., **79**, 324 (1937).
 197. M. Brinzingier, M. Götz, Ber., **81**, 293 (1948). M. Brenner, W. Hofer, Helv. chim. acta, **44**, 1798 (1961).
 198. P. Aubert, R. Jeffreys, E. Knoff, J. Chem. Soc., **1951**, 2195.
 199. R. Lundberg, P. Doty, J. Am. Chem. Soc., **79**, 3961 (1957).
 200. M. Idelson, E. Blout, Там же, **79**, 3948 (1957).
 201. R. Mac Donald, Ам. пат. 2534283 (19.12.1950); C. A., **45**, 3198 (1951).
 202. F. Wessely, K. Riedl, H. Tuppy, Monatsch. Chem., **81**, 864 (1956).
 203. E. Blout, R. Karlson, J. Am. Chem. Soc., **78**, 941 (1956).
 204. H. Yuki, S. Sakakibara, H. Tani, Bull. Chem. Soc., Japan, **29**, 654 (1956).
 205. P. Alexander, J. Bailey, D. Carter, Textile Research J., **20**, 385 (1950).
 206. D. Ballard, C. Bamford, F. Weymouth, Proc. Roy. Soc., **A227**, 155 (1955).
 207. D. Ballard, C. Bamford, F. Weymouth, Nature, **174**, 173 (1954).
 208. G. Moos, H. Budelman, Pai-Fun Chen, J. Polymer Sci., **33**, 273 (1958).
 209. H. Leuchs, W. Geiger, Ber., **41**, 1721 (1908).
 210. K. Meyer, Y. Go, Helv. chim. acta, **17**, 1488 (1934).
 211. Y. Go, H. Tani, Bull. Chem. Soc., Japan, **14**, 510 (1939).
 212. E. Miller, I. Fankuchen, H. Mark, J. Applied Physics, **20**, 531 (1949).
 213. F. Wessely, F. Siegmund, Ztschr. Physiol. Chem., **159**, 102 (1926).
 214. E. Katchalski, I. Grossfeld, M. Frankel, J. Am. Chem. Soc., **70**, 2094 (1948).
 215. E. Katchalski, P. Spitsnik, Там же, **73**, 3992 (1951).
 216. A. Berger, E. Katchalski, Там же, **73**, 4084 (1951).
 217. E. Katchalski, M. Sela, Там же, **75**, 5284 (1953).
 218. O. Bayer, Angew. Chem., **A59**, 265 (1947).
 219. K. Heyns, R. Brockmann, Naturforsch., **9b**, 21 (1954).
 220. К. Порошин, Изв. АН СССР, ОХН, **1956**, 743.
 221. D. Ballard, C. Bamford, J. Chem. Soc., **1958**, 355.
 222. J. Breitenbach, K. Allinger, Monatsch., **84**, 1103 (1953).
 223. R. Becker, M. Stahmann, J. Am. Chem. Soc., **74**, 38 (1952).
 224. D. Coleman, J. Chem. Soc., **1950**, 3222.
 225. D. Ballard, C. Bamford, Proc. Roy. Soc., **A223**, 495 (1954).
 226. W. Ritschard, Makrom. Chem., **29**, 141 (1959).
 227. G. Moos, P. Merritt, F. Chen, J. Polymer Sci., **55**, 515 (1961).
 228. R. Buyle, B. Hargitay, Symposium über Makromoleküle in Wiesbaden. Okt. 1959, Verlag Chemie, Sektion VAI.
 229. T. Isemura, S. Ikeda, F. Tokiwa, J. Noguchi, Bull. Soc. Chem. Japan; **34**, 1236 (1961).
 230. D. Ballard, C. Bamford, Nature, **174**, 477 (1956).
 231. D. Ballard, C. Bamford, Proc. Roy. Soc., **A236**, 384 (1956).
 232. S. Waley, J. Watson, Там же, **A199**, 499 (1949).
 233. S. Waley, J. Watson, Rec. trav. chim. Pays-Bas, **69**, 27 (1960).
 234. D. Ballard, C. Bamford, J. Chem. Soc., **1959**, 1039.
 235. P. Doty, A. Holtzer, J. Bradbury, E. Blout, J. Am. Chem. Soc., **76**, 4493 (1954).
 236. P. Doty, J. Bradbury, A. Holtzer, Там же, **78**, 947 (1956).
 237. E. Blout, A. Asadourian, Там же, **78**, 955 (1956).
 238. P. Doty, R. Lundberg, Там же, **78**, 4810 (1956).
 239. M. Goodman, E. Schmitt, Там же, **81**, 5508 (1959). H. Mark, Makrom. Chem., **35A**, 49 (1960).
 240. W. Ritschard, J.-M. Gilles, Там же, **39**, 140 (1960).
 241. J. Mitchell, A. Woodward, P. Doty, J. Am. Chem. Soc., **79**, 3955 (1957).
 242. J. Yang, P. Doty, Там же, **78**, 498 (1956).
 243. J. Yang, P. Doty, Там же, **79**, 761 (1957).
 244. W. Moffitt, J. Yang, Proc. Nath. Acad. Sci., **42**, 596 (1956).

245. E. Blout, P. Doty, J. Yang, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 749 (1957).
 246. J. Coombes, E. Katchalski, Там же, **82**, 5280 (1960).
 247. H. Weingarten, Там же, **80**, 352 (1958).
 248. D. Ballard, C. Bamford, Там же, **79**, 2336 (1957).
 249. P. Doty, R. Lundberg, Там же, **79**, 2338 (1957).
 250. D. Ballard, C. Bamford, A. Elliott, *Makrom. Chem.*, **35**, 222 (1960).
 251. M. Sela, A. Berger, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 6350 (1953).
 252. M. Sela, A. Berger, *Bull. Research. Council. Israel*, **4**, 110 (1954).
 253. L. Sluyterman, B. Labruyere, *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, **73**, 347 (1954).
 254. W. Hanby, S. Waley, J. Watson, *J. Chem. Soc.* **1950**, 3239.
 255. Y. Shalitin, Ph. D. Thesis, Hebrew University, 1958, Jerusalem.
 256. E. Katchalski, I. Steinberg, *Ann. Rev. Chem.*, **12**, 433 (1961).
 257. M. Frankel, M. Brenner, S. Cordova, *Experientia*, **8**, 299 (1952).
 258. M. Frankel, S. Cordova, M. Brenner, *J. Chem. Soc.*, **1953**, 1991.
 259. C. Bamford, H. Block, A. Pugh, Там же, **1961**, 2057.
 260. E. Katchalski, Y. Shalitin, M. Gehatia, *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 1925 (1955).
 261. E. Katchalski, M. Gehatia, M. Sela, Там же, **77**, 6175 (1955).
 262. J. Fessler, A. Ogston, *Trans. Faraday Soc.*, **47**, 667 (1951).
 263. C. Hall, P. Doty, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 1269 (1958).
 264. C. Bamford, H. Block, *J. Chem. Soc.*, **1961**, 4992.
 265. R. Woodward, C. Schramm, *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 1552 (1947).
 266. D. Coleman, A. Farthing, *J. Chem. Soc.*, **1950**, 3218.
 267. M. Stahmann, L. Graf, E. Patterson, J. Walker, D. Watson, *J. Biol. Chem.*, **189**, 45 (1951).
 268. W. Astbury, C. Dalglich, S. Darmon, G. Sutherland, *Nature*, **162**, 596 (1948).
 269. Th. Miwa, *Dissertation Abs.*, **19**, 232 (1958).
 270. F. Michell, W. Meckstroth, *Makrom. Chem.*, **51**, 107 (1962).
 271. E. Blout, M. Des Roches, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 370 (1959).
 272. C. Bamford, A. Elliott, W. Hanby, *Synthetic Polypeptides*, 1956, стр. 91.
 273. P. Bartlett, D. Dittmer, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 2159 (1957).
 274. R. Becker, M. Stahmann, *J. Biol. Chem.*, **204**, 737 (1953).
 275. Th. Miwa, M. Stahmann, *Abstr. 132-nd Meeting Am. Chem. Soc.* 1957, стр. 13c.
 276. E. Blout, R. Karlson, P. Doty, B. Hargitay, *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 4497 (1954).
 277. E. Blout, M. Idelson, Там же, **78**, 3857 (1956).
 278. E. Katchalski, Химия и технол. полим., **1960**, № 7—8, 42.
 279. C. Lapp, J. Marchall, *J. Chimie Phys.*, **60**, 756 (1963).
 280. M. Idelson, E. Blout, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 2387 (1958).
 281. G. Fasman, M. Idelson, E. Blout, Там же, **83**, 709 (1961).
 282. M. Szwarc, *Makrom. Chem.*, **35**, 132 (1960).
 283. F. Wessely, M. John, *Ztschr. physiol. Chem.*, **170**, 38 (1927).
 284. L. Blick, J. Derkosc, H. Michl, F. Wessely, *Monatsch. Chem.*, **84**, 717 (1953).
 285. D. Ballard, C. Bamford, *J. Chem. Soc.*, **1956**, 381.
 286. G. Fasman, E. Blout, *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 2262 (1960).
 287. A. Patchornik, A. Berger, E. Katchalski, Там же, **79**, 5227 (1957).
 288. A. Downie, A. Elliott, W. Hanby, B. Malcolm, *Proc. Roy. Soc.*, **A242**, 325 (1957).
 289. G. Spach, *Compt. Rend.*, **249**, 543 (1959).
 290. J. Kurtz, G. Fasman, A. Berger, E. Katchalski, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 393 (1958).
 291. T. Wieland, *Angew. Chem.*, **63**, 7 (1951); **66**, 507 (1954).
 292. T. Okuda, S. Sakurai, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **34**, 1872 (1961).
 293. J. Katz, *Nature*, **173**, 265 (1954).
 294. K. Kopple, J. Katz, *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 6199 (1956).
 295. T. Tsuruta, S. Inoue, K. Matsura, *Makrom. Chem.*, **63**, 219 (1963).
 296. E. Blout, R. Karlson, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 1259 (1958).
 297. E. Bradbury, A. Downie, A. Elliott, W. Hanby, *Proc. Roy. Soc.*, **A259**, 110 (1960).
 298. A. Richardson, Ам. пат. 2716647 (30.8.1955); C. A., **49**, 15952 (1955).
 299. K. Schlögl, H. Pelousek, *Monatsh. Chem.*, **91**, 227 (1960).
 300. A. Zilkha, *J. Org. Chem.*, **23**, 2003 (1958).
 301. Z. Bohak, E. Katchalski, *Biochemistry*, **2**, 228 (1963).
 302. M. Goodman, C. Dever, A. Felix, *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 3773 (1962).
 303. S. Sakakibara, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **32**, 13 (1959).
 304. S. Sakakibara, H. Tani, Там же, **29**, 85 (1956).

305. T. Hayakawa, Y. Onchi, Y. Hayashi, J. Chem. Soc. Japan, Pure Chem. Sect. **80**, 301 (1959).
306. T. Hayakawa, H. Niski, J. Noguchi, S. Ikeda, T. Yamashita, T. Isemura, Nippon Kagaku Zasshi, **82**, 601 (1961).
307. J. Noguchi, T. Hayakawa, M. Hiraoka, Nippon Kagaku Zasshi, **82**, 604 (1961).
308. J. Noguchi, T. Saito, T. Hayakawa, J. Chem. Soc., Japan, Pure Chem. Sect., **80**, 82 (1959).
309. A. Kóta, K. Kovács, J. Császár, Acta chim. Acad. Scient. Hung., **21**, 461 (1959).
310. M. Frankel, J. Khobler, J. Chem. Soc., **1958**, 3733.
311. M. Frankel, D. Gertner, H. Jacobson, A. Zilkha, Там же, **1960**, 1390.
312. M. Frankel, D. Gertner, Там же, **1961**, 459.
313. M. Frankel, D. Gertner, Там же, **1961**, 463.
314. J. Noguchi, T. Saito, T. Hayakawa, Y. Hayashi, J. Chem. Soc. Japan, Pure Chem. Sect., **80**, 299 (1959).
315. S. Sakakibara, Bull. Chem. Soc. Japan, **33**, 814 (1960).
316. E. Blout, G. Fasman, Recent Advances in Gelatin and Glue Research London, **1957**, 122.
317. V. Brückner, K. Kovács, J. Kovács, A. Kóta, Acta chim. Acad. Sci. Hung., **5**, 267 (1955).
318. F. Micheel, H. Hülsmann, Chem. Ber., **93** (1960), 13.
319. Y. Shalitin, E. Katchalski, J. Am. Chem. Soc., **82**, 1630 (1960).
320. E. Friedman, T. Gill, P. Doty, Там же, **83**, 4050 (1961).
321. E. Friedman, T. Gill, P. Doty, Там же, **84**, 3485 (1962).
322. T. Gill, P. Doty, J. Biol. Chem., **236**, 2677 (1961).
323. E. Blout, M. Idelson, J. Am. Chem. Soc., **80**, 4909 (1958).
324. S. Bloone, G. Fasman, C. de Loze, E. Blout, Там же, **84**, 458 (1962).
325. R. Kulkarni, E. Blout, Там же, **84**, 3971 (1962).
326. F. Micheel, W. Meckstroth, Makromol. Chem., **51**, 107 (1962).
327. P. Doty, K. Imahori, E. Klempener, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **44**, 424 (1958).
328. H. Yuki, Nippon Kagaku Zasshi, **77**, 44, 48 (1956).
329. H. Yuki, Там же, **77**, 51 (1956).
330. H. Yuki, Там же, **77**, 229, 232, 236 (1956); H. Yuki, S. Sakakibara, H. Tani, Bull. Chem. Soc. Japan, **29**, 654 (1956); H. Yuki, K. Okawa, H. Tani, Там же, **31**, 808 (1958).
331. T. Gill, P. Doty, J. Mol. Biol., **2**, 65 (1960).
332. J. Noguchi, T. Saito, J. Chem. Soc. Japan, **80**, 85 (1959).
333. J. Kurtz, A. Berger, E. Katchalski, Recent Advances in Gelatin and Glue Research. Pergamon Press. London, **1957**, стр. 131.
334. E. Fujii, M. Tokieda, Fukuoka—Igaku Zasshi, **48**, 443 (1957).
335. H. Harmood, H. Cassioly, J. Am. Chem. Soc., **79**, 4360 (1957).
336. Франц. пат. 1099269 (1.9.1955); C. A., **53**, 14583e (1959).
337. Англ. пат. 852914 (2.11.1960); C. A., **55**, 11920c (1961).
338. M. Sela, E. Katchalski, Experientia, **11**, 62 (1955).
339. A. Yaron, A. Berger, Bull. Research. Council Israel., **7A**, 96 (1958).
340. К. Порошин, Изв. АН СССР, ОХН, **1957**, 996.
341. W. Konigsberg, R. Becker, J. Am. Chem. Soc., **81**, 1428 (1959).
342. H. Kley, S. Kornguth, M. Stahmann, Там же, **81**, 4370 (1959).
343. H. Kley, M. Stahmann, Там же, **81**, 4374 (1959).
344. M. Sela, N. Lupo, A. Yaron, A. Berger, Biochim. Biophys. Acta, **62**, 594 (1962).
345. A. Stracher, R. Becker, J. Am. Chem. Soc., **81**, 1432 (1959).
346. M. Sela, R. Arnon, Biochim. et Biophys. Acta, **40**, 382 (1960); Biochem. J., **75**, 91 (1960); R. Arnon, M. Sela, Там же, **75**, 103 (1960); M. Sela, R. Arnon, J. Am. Chem. Soc., **82**, 2625 (1960); Biochem. J., **77**, 394 (1960).
347. Atara Bar-Eli, E. Katchalski, Nature, **188**, 856 (1960).
348. A. Glazer, Atara Bar-Eli, E. Katchalski, J. Biol. Chem., **237**, 1832 (1962).
349. W. Grafzer, P. Doty, J. Am. Chem. Soc., **85**, 1193 (1963).
350. B. Ripley-Duggan, Англ. пат. 787344 (4.12.1957); C. **1958**, 12544.