

УДК 547.96

УСПЕХИ СИНТЕЗА ПЕПТИДОВ НА ПОЛИМЕРАХ

В. С. Веса

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	246
II. Синтез полипептидов на полимерах	247
1. Сущность метода	247
2. Синтез полипептидов на полимерах в твердой фазе	247
3. Синтез полипептидов на полимерах в жидкой фазе	257

I. ВВЕДЕНИЕ

Синтез полипептидов — это не только одна из актуальных теоретических проблем, но и крупная научная и хозяйственная задача. За последнее десятилетие в ряде стран синтез менее сложных полипептидов стал доступным не только в лабораторных, но и в промышленных масштабах. Это, — главным образом, столь важные биологически активные пептиды, — как гормоны окситоцин и вазопрессин, которые в настоящее время выгоднее синтезировать, чем выделять из природных источников. Искусство пептидного синтеза развилось настолько, что несколько лет тому назад трем группам исследователей: Коцюбинскому с сотр.¹ (США), Цану с сотр.² (ФРГ) и Тсоу и Хуангу с сотр.³ (КНР) удалось синтезировать первый простейший белок — гормон инсулин, состоящий из 51 аминокислоты. Полный синтез этого гормона был осуществлен за 221 стадию. Это поистине огромное достижение, которое само по себе характеризует современный уровень развития пептидного синтеза. Однако каждый химик-синтетик прекрасно знает, что многостадийность синтеза приводит к резкому снижению выхода конечного соединения. Так, нетрудно подсчитать, что при проведении двадцатиступенчатого синтеза с 80%-ным выходом на каждой стадии выход конечного продукта составит только 1,2%. На примере синтеза инсулина, где выходы не были 100%-ными, особенно четко выявились недостатки существующего арсенала методов пептидного синтеза.

Образование пептидной связи представляет собой только часть задачи. Более существенное препятствие — очистка полученного пептида от примесей, образующихся в процессе синтеза, которые по своим свойствам чаще всего очень близки к основному продукту. Кроме того, ряд трудностей связан с низкой растворимостью пептидов в органических растворителях, уменьшающейся с ростом числа аминокислотных остатков в молекуле. Все это ставило на повестку дня вопрос о создании более современных методов синтеза полипептидов. В последние годы появился принципиально новый путь преодоления вышеуказанных трудностей — построение пептидной цепи на трехмерных полимерах в твердой фазе и на линейных полимерах в растворе.

II. СИНТЕЗ ПОЛИПЕПТИДОВ НА ПОЛИМЕРАХ

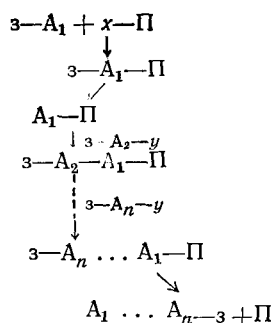
1. Сущность метода

В 1959 г. Меррифилд начал разрабатывать новый метод синтеза пептидов на полимерах в твердой фазе с целью стандартизации и автоматизации синтеза. Через три года появилось первое сообщение об успехах на этом пути⁴. Позже синтез пептидов на полимерах был осуществлен и в жидкой фазе. Сущность метода состоит в том, что первая аминокислота $z-A_1$ присоединяется ковалентной связью к полимеру П. Затем к этой «якорной» аминокислоте последовательно присоединяются аминокислоты A_2, A_3, \dots, A_n . Образовавшийся готовый пептид $z-A_n \dots A_1-P$ отделяется от полимера П путем разрыва ковалентной связи пептид-полимер в самом конце синтеза (см. схему 1, где П — полимер; z — защитная групп; A_1, \dots, A_n — аминокислоты, x и y — активирующие группы).

В твердофазном синтезе благодаря нерастворимости прикрепленных к полимеру пептидов их очистка от исходных и побочных даже мало растворимых примесей легко осуществляется путем промывания подходящими растворителями без опасности потери пептида. Это очень упрощает синтез, сокращает время проведения реакций и облегчает очистку продуктов, в результате чего становится возможной стандартизация и автоматизация процессов. Твердофазный синтез позволяет за сутки ввести в пептид до 6 аминокислотных остатков. При применении избытка аминокислоты на каждой стадии образования пептидной связи выход пептида достигает, как правило, 100%. Таким образом, твердофазный синтез характеризуется простотой операций, быстротой, высокими выходами и чистотой конечных продуктов. Синтез пептидов в жидкой фазе на полимерах имеет некоторые существенные отличия. Во-первых, все компоненты реакции во время синтеза находятся в растворенном виде, а очистка полимер-пептида осуществляется, как правило, отмыванием водой от побочных веществ. Во-вторых, конденсация аминокислот в пептиды проводится другими методами. На последней стадии отделенный от полимера пептид переводится в водную фазу, а полимер остается в органическом слое.

Общая схема 1, как отметил в своих первых работах Меррифилд^{4, 5}, приложима не только к синтезу пептидов, но и к синтезу других классов полимеров. Так, в случае полинуклеотидов индивидуальной единицей А может быть защищенный мононуклеотид, а в случае полисахаридов — соответствующий защищенный моносахарид и т. д.

Схема 1



2. Синтез полипептидов на полимерах в твердой фазе

а. Полимер

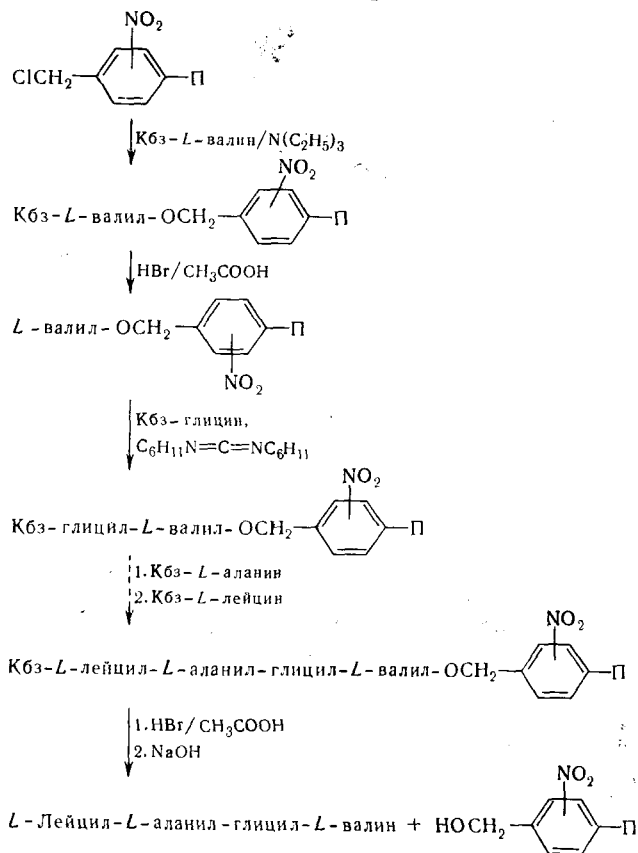
В начальный период разработки метода синтеза пептидов в твердой фазе Меррифилд^{4, 5} провел значительную работу по подбору подходящего полимера. Он испытал целлюлозу, поливиниловый спирт, полиметакрилат, сульфированный полистирол и частично хлорметилированный сополимер стирола с 2% дивинилбензола (ПСДБ — CH_2Cl), который оказался наиболее подходящим для данной цели. Во-первых, этот

полимер совершенно нерастворим во всех органических растворителях, используемых в синтезе, включая нейтральные, кислые и основные, и в то же время достаточно набухает в них, что предопределяет быстрое проникновение реагирующих веществ в поры полимера. Во-вторых, этот полимер имеет устойчивую и пригодную для фильтрации в набухшем состоянии консистенцию. Кроме того, он содержит функциональную группу, способную реагировать с карбоксильной группой аминокислоты или пептида с образованием «якорной» ковалентной связи, селективно расщепляемой в конце пептидного синтеза.

6. Защитная группа и растворитель

Успех синтеза полипептидов на полимерной основе в большой степени зависит от выбора подходящей защитной группы аминокислоты и растворителя. В первых работах для защиты аминокислотной компоненты Меррифилд^{4,5} применял общеизвестную в пептидном синтезе и достаточно легко удаляемую карбобензоксигруппу (Кбз)⁶. Однако он заметил, что при действии бромистого водорода в ледяной уксусной кислоте снимаются не все Кбз-группы, а при увеличении времени реакции разрушается часть «якорных» сложноэфирных связей пептида — полимер. По этим причинам образуются примесные пептиды с более короткими цепями, а часть пептидных цепей теряется. Следовательно, надо было или

Схема 2



укреплять «якорную» бензилэфирную связь, или применять более легко снимаемую защитную группу. В начале Меррифилд^{4,5} пошел по первому пути. С этой целью ПСДБ—CH₂Cl-полимер был подвергнут нитрованию или бромированию. В результате этого потери пептида из-за разрыва «якорной» бензилэфирной связи во время снятия Кбз-групп стали минимальными, но значительно уменьшилась и скорость удаления Кбз-групп, особенно в случае нитрованного полимера. С другой стороны, связь полимер—аминокислота укрепились настолько, что бромистый водород в уксусной кислоте не оказывал на нее никакого действия. Поэтому конечный пептид с нитрованного ПСДБ-полимера снимался щелочным омылением, а это могло привести к особенно нежелательному явлению — некоторой рацемизации пептида. Бромированный полимер по своим свойствам в синтезе пептидов занял промежуточное положение.

Наилучшими растворителями в твердофазном синтезе являются диметилформамид (ДМФ) и хлористый метилен⁵, как это выяснилось при изучении синтеза тетрапептида *L*-лейцил-*L*-аланил-глицил-*L*-валина на нитрованном частично хлорметилированном ПСДБ полимере (схема 2, стр. 248).

«Якорная» аминокислота Кбз-*L*-валин присоединялась ковалентной связью к нитрованному ПСДБ—CH₂Cl-полимеру действием ее триэтиламмониевой соли в подходящем растворителе; затем защитная Кбз-группа снималась 10% HBr в уксусной кислоте⁷. После удаления всех примесей промыванием вносили ДМФ как наилучший растворитель в этом синтезе и Кбз-глицин совместно с конденсирующим агентом *N,N'*-дициклогексилкарбодиимидом (ДЦКД). Реакция длилась при комнатной температуре 0,5 часа. Все побочные продукты, в том числе *N,N'*-дициклогексилмочевина, удалялись промыванием растворителями, а Кбз-группа снималась как описано выше. За этот цикл пептидная цепь удлинилась на одну аминокислоту. Повторением аналогичных циклов с Кбз-*L*-аланином и Кбз-*L*-лейцином был получен упомянутый выше тетрапептид, который удалялся с полимера омылением щелочью⁵. При этом происходила частичная рацемизация пептида.

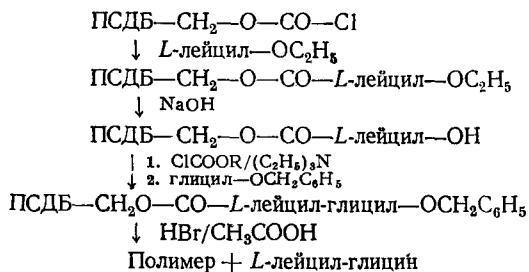
в. Развитие метода

Лецингер с сотр.^{8,9} предложили иную схему синтеза пептидов в твердой фазе. Они синтезировали сополимер стирола с 0,5% дивинилбензола с такими функциональными группами, которые были способны соединиться с первой аминокислотой не по карбоксильной, а по аминоксигруппе (схема 3). Это дало возможность наращивать пептидную цепь по незащищенной карбоксильной группе «якорной» аминокислоты обычными методами. Так был получен дипептид *L*-лейцил-глицин.

Укрепление «якорной» бензилэфирной связи полимер—аминокислота, как мы видели, не привело к желаемым результатам. Поэтому в дальнейшем Меррифилд¹⁰ отказался

от этого пути и стал применять вместо Кбз-группы более легко удаляемую защитную группу — трет.-бутилоксикарбонильную (*t*-Бок), введенную в пептидную химию Мак-Кеем и Альбертсоном¹¹. При этом твердофазный метод получил не только всестороннюю проверку, но и был

Схема 3



значительно развит^{10, 12}. Например, в процессе синтеза брадикинина, полученного раньше, в частности Буассона с сотр.¹³, были включены полуфункциональные, ранее не применявшиеся в твердофазном синтезе аминокислоты: аргинин, серин и пролин^{10, 12}. Твердой фазой был частично хлорметилированный, не нитрованный и не бромированный ПСДБ полимер (схема 4). Благодаря легкости удаления *t*-Бок-защитных групп (1 *N* HCl в уксусной кислоте) потери промежуточных пептидов стали минимальными. Применение избытка *t*-Бок-аминокислоты на стадии образования пептида позволило увеличить выход пептида и исключить применявшееся ранее^{4, 5} ацилирование уксусным ангидридом после каждой реакции образования пептидной связи.

Схема 4

t-Бок-нитро-*L*-аргинил—О—CH₂—ПСДБ

7 раз
 ↓ 1. 1*N* HCl/CH₃COOH
 ↓ 2. (C₂H₅)₃N/ДМФ
 ↓ 3. *t*-Бок-аминокислоты/ДЦКД

t-Бок-нитро-*L*-аргинил-*L*-пролил-*L*-пролилглицил-*L*-фенил-аланил-О-бензил-*L*-серил-*L*-пролил-*L*-фенилаланил-нитро-*L*-аргинил—О—CH₂—ПСДБ

↓ HBr/CF₃COOH

нитро-*L*-аргинил-*L*-пролил-*L*-пролилглицил-*L*-фенилаланил-*L*-серил-*L*-пролил-*L*-фенилаланил-нитро-*L*-аргинин

↓ H₂, Pd

L-аргинил-*L*-пролил-*L*-пролилглицил-*L*-фенилаланил-*L*-серил-*L*-пролил-*L*-фенилаланил-*L*-аргинин

Конечный нонапептид — брадикинин удалялся с твердой фазы по Гутману и Буассона¹⁴ действием HBr в трифторуксусной кислоте. Следует особо отметить, что синтез брадикинина осуществлен в специальном стеклянном сосуде, снабженном системой автоматически действующих датчиков исходных веществ и растворителей^{15, 16, 17}. В результате автоматизации синтеза общее время, необходимое для каждого цикла, было сокращено до четырех часов, а выход пептида увеличился. Так, чистый брадикинин с полной биологической активностью был получен с 32%-ным выходом за 8 дней¹⁰, а согласно более поздней работе¹², где применялся в качестве растворителя хлористый метилен вместо ДМФ, выход брадикинина составил 68%.

В последнее время Ленарт с сотр.^{18, 19} предложил снимать готовый брадикинин с полимера сухим жидким HF в избытке анизола. При этом одновременно с расщеплением сложноэфирной связи пептид — полимер с аргинина удалялись NO₂-группы.

Стюарт и Вули^{20, 21} в поисках антагонистов брадикинина воспользовались автоматическим синтезом пептидов в твердой фазе и за предельно короткий срок получили 23 новых его аналога, в том числе брадикинин, состоящий из *D*-аминокислот. Совершенно аналогичным путем Меррифилд²² присоединил к ПСДБ—CH₂—О-брадикинину *L*-лизин и *L*-метионин и с 65%-ным выходом получил химически чистый и с полной биологической активностью натурального кинина ундекапептид *L*-метионил-*L*-лизил-брадикинин. Во время синтеза ε-амино-группа лизина защищалась не *t*-Бок, а Кбз-группой. Алкилирование сульфидной группы метионина бензилбромидом, образующимся при действии HBr в CF₃COOH на Кбз-группы и О-бензилсерин, предотвращалось присутствием метилэтилсульфида.

Огромное значение для подтверждения общеприменимости нового метода имела возможность включения в пептиды любой аминокислоты.

С этой целью по общей схеме 4 был синтезирован с 56%-ным выходом октапептид 5-изолейцил-ангиотензин II, обладающий полной биологической активностью натурального, и два его аналога²³, а также гексадекапептид²⁴, в которые были успешно включены 4 ранее не использованные в твердофазном синтезе аминокислоты: аспарагин, гистидин, изолейцин и тирозин. В работе²⁴ четко показано, что аспарагин во избежание образования нитрилов²⁵ следует присоединять не карбодимидным методом, а нитрофенилэфирным методом Боданского²⁶, хотя этот метод конденсации Меррифилд после некоторых неудач отвергал^{4, 5}. По этому поводу Боданский и Шихан²⁷, утверждали, что в твердофазном синтезе пептидов наравне с карбодимидным методом конденсации аминокислот может быть применен и нитрофенилэфирный метод. Правда, для подтверждения этого положения никаких экспериментальных данных они не привели. В обзорной статье²⁸ по автоматическому синтезу пептидов Меррифилд уже считает приемлемыми не только карбодимидный, но и оксифталимид-эфирный метод Нефкенса²⁹, а в некоторых случаях исключительно нитрофенилэфирный метод Боданского²⁶.

Недавно появилось краткое сообщение Роте³⁰ о том, что ему удалось на основе меррифилдовского твердого носителя синтезировать, правда, не автоматическим путем, линейный олигомер, состоящий из 14 мономеров ϵ -аминокапроновой кислоты. Куш^{31, 32} приводит более подробные данные по синтезу в твердой полимерной фазе целого ряда аналогичных линейных олигомеров гексаметиленадипинамида $[H-(B-A)-OH]$, где $n=2-5$ и 10], ω -аминоундекановой кислоты $[H(Und)-OH]$, где $n=2-5$ и 10] и ϵ -аминокапроновой кислоты $[H-Cap)-OH]$, где $n=4$ и 8], согласно схеме 5, аналогичной общей схеме синтеза на полимерах.

Накопленный опыт по синтезу пептидов на твердых носителях позволил Марглину и Меррифилду³³ получить с достаточно высокими выходами А и В цепи инсулина за 8 и 11 дней соответственно. Однако полностью синтетический инсулин обладал незначительной биологической активностью, так как в А цепи содержался рацемический остаток аспарагина.

Значительные трудности встречаются при включении в пептидную цепь не только аспарагина, но и серина, а также при снятии S-защитных групп в пептидах. Все эти проблемы, возникшие при синтезе длинных пептидов на носителях, были обсуждены в сентябре 1966 г. в Голландии на VIII Европейском симпозиуме по пептидам.

В твердой фазе на полимерах, как показали Качальский с сотр.³⁴, можно синтезировать не только линейные соединения, но и циклические. С этой целью авторы получили сшитый дивинилбензолом поли-4-окси-3-нитростирол (I), активные гидроксильные группы которого использовали для приготовления высокомолекулярных активированных эфиров N-защищенных пептидов (II) (схема 6).

Схема 5 *

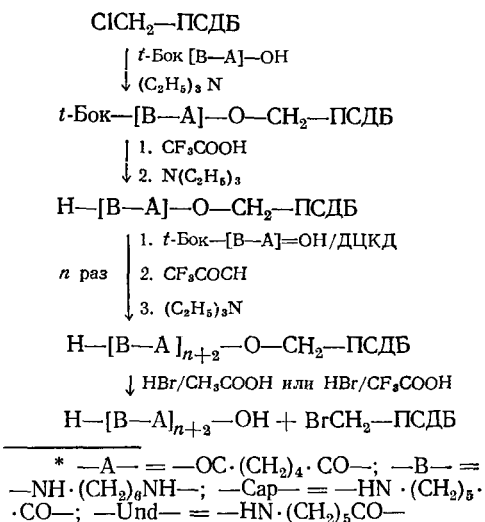
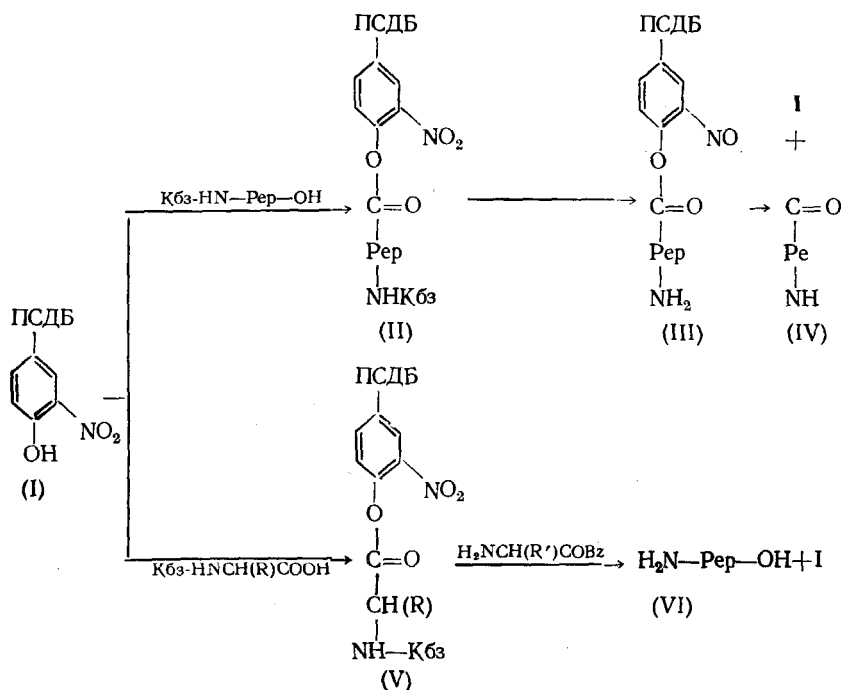


Схема 6



Высокий выход активированного эфира (II) получался только при применении по крайней мере трехкратного избытка $\text{Kбз}-\text{HN}-\text{Pep}-\text{OH}^*$ и ДЦКД. После снятия защитной Кбз-группы образование циклопептидов (IV) происходило благодаря внутримолекулярному аминолизу эфирной связи. Этот метод циклизации оказался лучше ранее известных, так как конечные циклопептиды получались чистыми и с большими выходами (60–80%).

Полимер (I) (схема 6) можно рассматривать как химический реагент-активатор, который способен образовывать с карбоксильными группами аминокислот или пептидов нерастворимые активированные феноловые эфиры (II) и (V). Будучи активированными, последние могут реагировать с соединениями, содержащими незащищенные аминокислоты, образуя пептидную связь. Эти рассуждения Качальский с сотр.³⁵ проверили экспериментально и из нерастворимых эфиров (V) Кбз-*L*-фенилаланина, Кбз-*L*-пролина и др. получили с глицил-OBz** S-Кбз-*L*-цистилглицил-OBz и т. д. линейные пептиды (VI). Во время реакции образования пептидов (VI) исходный полимер (I) высвобождался и легко отделялся от пептида центрифугированием. Удалив Кбз-защитную группу от полученного пептида (VI), можно ввести его снова в реакцию с желаемой нерастворимой активированной полимером аминокислотой (V). При повторении этого процесса можно получить полипептид с заданной структурой.

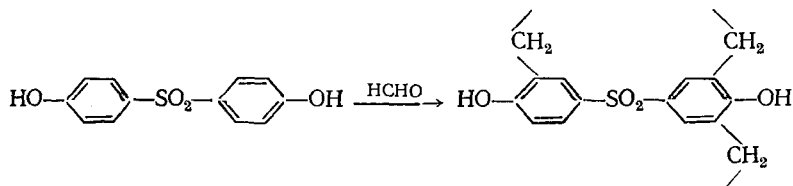
Нерастворимые полимеры фенольного типа, один из которых содержал сульфгидрильную группу в бензольном ядре, синтезировали Щукина с сотр.³⁶ и успешно применили их для построения пептидной цепи согласно схеме 6.

* $\text{H}_2\text{N}-\text{Pep}-\text{OH}$ — пептид.

** Bz — бензил.

Виланд и Бирр³⁷ для активирования карбоксильных групп аминокислот предлагают полимер фенольного типа, получающийся поликонденсацией *p*, *p'*-диоксидифенилсульфона и формалина согласно схеме 7.

Схема 7



Этим нерастворимым полимером были активированы Кбз-глицин, *t*-Бок-*L*-аланин и т. д., которые затем использовались в конденсации с метиловыми эфирами *L*-фенилаланина и *L*-валил-*L*-фенилаланина.

Внимательно рассмотрев все работы по синтезу полипептидов в твердой фазе, нетрудно заметить принципиальные различия в способах использования полимерной фазы. В одних случаях полимер играет одновременно роль защитной группы и носителя пептида, от которого он отделяется в конце синтеза, в других — полимер служит активирующим средством и участвует в реакции образования амидной связи. При синтезе пептидов по первому пути очистка продуктов производится промыванием полимерпептида растворителями, а в конце синтеза снятый с полимера пептид очищается обычным образом. Во втором случае очистка пептида возможна после любой стадии, так как образовавшийся пептид свободен от полимера и находится в растворе. Синтез пептидов в твердой фазе по первому пути, назовем его по праву меррифилдовским, значительно стандартизирован и автоматизирован. Использование полимеров фенольного типа для синтеза пептидов, как мы видели, только начало, но, по-видимому, привлечет еще большее внимание исследователей в будущем.

3. Синтез полипептидов на полимерах в жидкой фазе

Первые работы по синтезу пептидов на полимерах в твердой фазе выявили некоторые недостатки метода. Как мы видели, он мог быть применен только в том случае, если все реакции завершаются достаточно быстро и с количественными выходами, так как иначе конечные полипептиды, удаленные с полимерной основы, будут загрязнены трудноотделимыми пептидами меньшего молекулярного веса. В свою очередь, скорость образования пептидных связей и размеры пептида зависят от проницаемости полимера аминокислотами, пептидами, конденсирующими агентами и т. д. Это свойство очень специфично для каждого конкретно взятого случая и зависит от ряда факторов, часто не поддающихся предвидению.

С целью преодоления вышеупомянутых недостатков твердофазного метода Шемякин с сотр.³⁸ предложили синтез полипептидов на линейных полимерах в жидкой фазе. В этом случае полимер и прикрепленная к нему растущая пептидная цепь, равно как и все агенты, находятся в растворенном виде. В качестве полимерной основы был выбран частично хлорметилованный полистирол (схема синтеза аналогична схеме 2). К нему присоединялся эфирной связью *t*-Бок-глицин. Затем методом оксисукцинимидных эфиров *t*-Бок-аминокислот³⁹ в ДМФ при комнатной температуре строилась пептидная цепь. Удаление избытка агентов и примесей производили промыванием осажденного полимера водой, а конечный тетрапептид глицил-глицил-*L*-лейцил-глицин, полученный с 65%-ным выходом, отщеплялся от полимера HBr в CF_3COOH .

Вторым примером синтеза пептидов, но уже циклических, жидкофазным методом является работа Качальского с сотр.³⁴. Авторы синтезировали растворимый разветвленный сополимер *L*-лизина с 3-нитро-*L*-тирозином, в котором свободные аминогруппы были блокированы ацетилированием, а гидроксильные оставались свободными, способными к образованию сложноэфирных связей с *N*-защищенными аминокислотами или пептидами. Однако этот полимер имел один существенный недостаток, так как высокие выходы Кбз-*N*-активированных эфиров типа (II) (схема 6) можно было получить, используя только значительный избыток Кбз-*N*-пептида. В связи с этим создались дополнительные трудности, связанные с удалением избытка непрореагировавших пептидов из раствора. После снятия защитной группы и нейтрализации соответствующих гидробромидов происходил внутренний амиолиз и образовывались с 60—80%-ным выходом циклопептиды. Этим путем были получены цикло-(глицил-глицил), цикло-(тетра-*L*-аланил) и др. Однако в них содержались примеси пептидных олигомеров, чего не наблюдалось при синтезе циклопептидов в твердой фазе³⁴.

* * *

В разработке нового метода синтеза пептидов на полимерах в твердой фазе достигнуты первые существенные успехи. Особенно это относится к синтезам на ПСДБ— CH_2Cl -полимере, с участием которого изучены условия соединения в пептиды многих аминокислот, в том числе полуфункциональных, и получен ряд линейных олигомеров типа найлона. Замечательно то, что уже синтезированы брадикинин, метиониллизил-брадикинин, ангиотензин II, 5-изолейцил-ангиотензин и ряд аналогов брадикинина *L*- или *D*-ряда. Полная биологическая активность синтезированных вышеупомянутых продуктов *L*-ряда подтверждает тот чрезвычайно важный факт, что во время их синтеза в твердой фазе не происходит рацемизация. Высокая скорость и экономичность синтеза достигнута благодаря значительной его стандартизации и автоматизации. Однако, как уже отмечалось, метод имеет и некоторые существенные недостатки и ограничения, касающиеся включения в пептиды аспарагина, серина, снятие *S*-защитных групп и т. д. Все эти вопросы сейчас решаются исследователями.

Твердофазный метод, как отметил Меррифилд^{4, 5}, позволяет конструировать на полимере не только пептиды, но и другие олигомеры, например нуклеотиды, о синтезе которых уже появились первые сообщения^{40—43}. Все это говорит о том, что твердофазный метод имеет огромные перспективы. Он поможет исследователям получать самые различные по сложности соединения, имеющие неопределимое значение не только для теории, но и для практики.

Из-за недостаточного количества данных сейчас трудно что-нибудь сказать определенное о преимуществах жидкофазного метода по сравнению с твердофазным. Следует только отметить, что с помощью этого метода были получены хорошие результаты в синтезе олигонуклеотидов^{44, 45}. Несомненно, что дальнейшие исследования в этом направлении принесут новые ценные результаты.

ЛИТЕРАТУРА

1. P. G. Katsoyannis, F. Fukuda, A. Tometsko, K. Suzuki, M. Tilak, J. Am. Chem. Soc., 86, 930 (1964).
2. J. Meienhofer, E. Schnabel, H. Bremer, O. Brinkhoff, R. Zabel, W. Sroka, H. Klostermeyer, D. Brandenburg, T. Okuda, H. Zahn, Naturforsch., 18b, 1130 (1963).

3. C. J. Niu, Y. T. Kung, W. T. Huang, L. T. Ke, C. C. Chen, Y. C. Chen, Y. C. Du, R. Q. Jiang, C. L. Tsou, S. C. Hu, S. Q. Chu, K. Z. Wang, *Sci. Sinica (Peking)*, **13**, 1343 (1964).
4. R. B. Merrifield, *Feder. Proc.*, **21**, 412 (1962).
5. R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2149 (1963).
6. M. Bergmann, L. Zervas, *Chem. Ber.*, **65**, 1192 (1932).
7. D. Ben-Ishai, A. Berger, *J. Org. Chem.*, **17**, 1564 (1952).
8. R. L. Letsinger, M. J. Kornet, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 3045 (1963).
9. R. L. Letsinger, M. J. Kornet, V. Mahadevan, D. M. Jerina, *Там же*, **86**, 5163 (1964).
10. R. B. Merrifield, *Там же*, **86**, 304 (1964).
11. F. C. McKay, N. F. Albertson, *Там же*, **79**, 4686 (1957).
12. R. B. Merrifield, *Biochemistry*, **3**, 1385 (1964).
13. R. A. Boissonnas, S. Gutmann, P. A. Jacquenoud, *Helv. Chim. Acta*, **43**, 1349 (1960).
14. S. Gutmann, R. A. Boissonnas, *Там же*, **42**, 1257 (1959).
15. R. B. Merrifield, J. M. Stewart, *Nature*, **207**, 522 (1965).
16. R. B. Merrifield, J. M. Stewart, *Chem. Engng. News*, **43** (25), 40 (1965).
17. C. Male, *New Scientist*, **27**, № 455, 337 (1965).
18. J. Lenart, A. B. Robinson, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 181 (1967).
19. J. Lenart, *J. Org. Chem.*, **32**, 250 (1967).
20. J. M. Stewart, D. W. Woolley, *Nature*, **206**, 619 (1965).
21. J. M. Stewart, D. W. Woolley, *Feder. Proc.*, **24**, 657 (1965).
22. R. B. Merrifield, *J. Org. Chem.*, **29**, 3100 (1964).
23. G. R. Marshall, R. B. Merrifield, *Biochemistry*, **4**, 2394 (1965).
24. D. W. Woolley, *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 2309 (1966).
25. D. T. Gish, P. G. Katsoyannis, G. P. Hess, R. J. Stedman, *Там же*, **78**, 5954 (1956).
26. M. Bodanszky, *Nature*, **175**, 685 (1955).
27. M. Bodanszky, T. T. Sheehan, *Chem. a. Ind.*, **1964**, 1423.
28. R. B. Merrifield, *Science*, **150**, 178 (1965).
29. G. H. I. Nefkens, G. I. Tesser, *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 1263 (1961).
30. M. Rothe, *Angew. Chem.*, **78**, 151 (1966).
31. P. Kusch, *Kolloid Ztsch. Polymere*, **208** (2), 138 (1966).
32. P. Kusch, *Angew. Chem.*, **78**, 611 (1966).
33. A. Marglin, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 5051 (1966).
34. M. Fridkin, A. Patchornik, E. Katchalski, *Там же*, **87**, 4646 (1965).
35. M. Fridkin, A. Patchornik, E. Katchalski, *Там же*, **88**, 3164 (1966).
36. Л. Ю. Скляр, В. И. Горбунов, Л. А. Щукина, *ЖОХ*, **36**, 2220 (1966).
37. Th. Wieland, Ch. Birr, *Angew. Chem.*, **78**, 303 (1966).
38. M. M. Shemyakin, Y. A. Ovchinnikov, A. A. Kiryuchkin, I. V. Kozhevnikova, *Tetrahedron Letters*, **27**, 2323 (1965).
39. G. W. Anderson, J. E. Zimmerman, F. M. Callahan, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 1839 (1964).
40. R. L. Letsinger, J. Fontaine, V. Mahadevan, D. A. Schexnayder, R. E. Leone, *J. Org. Chem.*, **29**, 2615 (1964).
41. R. L. Letsinger, V. Mahadevan, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 3526 (1965).
42. R. L. Melby, D. R. Strobach, *Там же*, **89**, 450 (1967).
43. G. M. Blackburn, M. J. Brown, M. R. Harris, *Chem. Comm.*, **1966**, № 17, 661.
44. H. Hayatsu, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 3182 (1966).
45. F. Cramer, *Angew. Chem.*, **78**, 640 (1966).

Институт химии и хим. технологии
АН Литовской ССР, Вильнюс