

# У С П Е Х И Х И М И И

т. XLVI

1977 г.

Вып. 5

УДК 542.95 : 547.466

## МЕТОДЫ СИНТЕЗА ПЕПТИДОВ

*Ю. В. Митин, Н. П. Запевалова*

Рассмотрены химические методы активирования карбоксильных групп аминокислот, используемые для синтеза пептидов. Приведены возможные механизмы реакции. Даны примеры синтеза некоторых пептидов.

Библиография — 151 ссылка.

### ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	852
II. Активированные эфиры N-ациламинокислот	852
III. Активирование карбоксильной группы N-ациламинокислот в присутствии аминокомпонента	863
IV. Другие методы активирования карбоксильной группы	871

### I. ВВЕДЕНИЕ

В настоящем обзоре рассмотрены методы активирования карбоксильных групп N-ациламинокислот, которые можно использовать для создания пептидной связи. Обзор включает в себя материалы, опубликованные после 1964 г. Методы синтеза пептидов, опубликованные до 1965 г. подробно рассмотрены в широко известных монографиях, посвященных химии пептидов<sup>1, 2</sup>. В обзоре не рассматриваются методы защиты функциональных групп аминокислот, вопросы выделения и очистки пептидов, а также способы определения оптической чистоты синтетических пептидов.

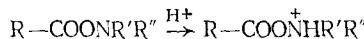
### II. АКТИВИРОВАННЫЕ ЭФИРЫ N-АЦИЛАМИНОКИСЛОТ

Активированные эфиры N-защищенных аминокислот являются очень удобными соединениями для синтеза пептидов. Возможность выделения, очистки и хранения активированных эфиров значительно облегчает пептидный синтез. Кроме того, возможно широкоеарьирование свойств активированных эфиров, в особенности ариловых эфиров, путем подбора подходящих заместителей в бензольном кольце.

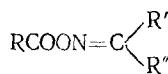
Без преувеличения можно сказать, что наибольшей популярностью в последние годы пользуются N-оксисукцинимидные эфиры<sup>3, 4</sup>. По частоте использования они превосходят даже паранитрофениловые<sup>5</sup> и 2,4,5-трихлорфениловые эфиры<sup>6</sup>. Синтез N-оксисукцинимидных эфиров не представляет трудности; их легко получают с помощью дациклогексилкарбодимида или смешанных ангидридов<sup>7</sup>, либо исходя из N-оксисукцинимидных эфиров дихлоруксусной<sup>8</sup> или трифтормуксусной кислоты<sup>9</sup>.

После того, как для синтеза пептидов были предложены N-оксисукцинимидные эфиры, внимание многих исследователей стали привлекать эфиры на основе производных гидроксиламина. Причиной этого является высокая реакционная способность этих эфиров, доступность реагентов и низкая степень рацемизации или отсутствие ее.

В качестве ацилирующих агентов были предложены эфиры N,N-диалкилгидроксиламинов, в частности эфиры 1-оксипиридинина<sup>10, 11</sup>, которые были синтезированы с помощью карбодиимида или смешанных ангидридов. Эфиры N,N-диалкилгидроксиламинов обладают сравнительно слабой ацилирующей способностью, однако в присутствии уксусной кислоты как катализатора ацилирование протекает с заметной скоростью при комнатной температуре. Усиление реакционной способности можно объяснить протонированием азота гидроксиламина.



С помощью 1-оксипиридининовых эфиров были синтезированы некоторые небольшие пептиды<sup>12-14</sup>, однако недостаточно высокая активность этих эфиров не позволила широко использовать их в пептидной химии. Несколько работ были посвящены эфирам альдоксимов и кетоксимов<sup>15-18</sup>.

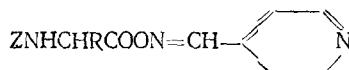


где R'— алкил, арил; R''— алкил, H.

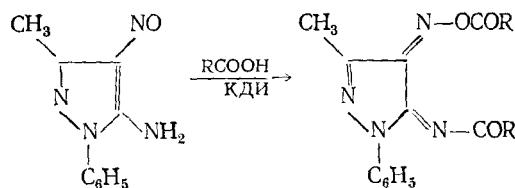
Эфиры кетоксимов представляют собой стабильные кристаллические вещества, обладающие довольно высокой реакционной способностью по отношению к аминам. При реакции их с эфирами аминокислот или свободными аминокислотами при комнатной температуре получаются пептиды с выходом 50—90%. Рацемизация при синтезе трипептида Андерсона составила 20%<sup>15, 16</sup>, однако вряд ли эта величина отражает свойства активированного эфира, так как эфир 3-нитроацетофеноксисма, на котором проводилось изучение рацемизации, был синтезирован с помощью карбодиимида, исходя из Z-Gly-L-Phe-OH. Нет сомнения, что рацемизация в основном имела место при синтезе самого эфира, что, впрочем, не исключает появление рацемического продукта и при сочетании активированного эфира с этиловым эфиром глицина.

Более эффективным оказался синтез пептидов с помощью эфиров кетоксимов в присутствии уксусной кислоты<sup>17</sup>. Добавление 1—1,5 молей уксусной кислоты увеличивает выход пептидов в среднем на 20—30%. Эфиры кетоксимов позволяют синтезировать пептиды серина и треонина без защиты гидроксильных групп, а также  $\omega$ -нитроаргинина с выходом 83—98%. Растворимость в воде простых кетоксимов облегчает задачу выделения и очистки пептидов после реакции. Метод рекомендуется для ступенчатого синтеза различных пептидов.

Интересные результаты были получены в случае эфиров 4-пиридинальдоксина<sup>18</sup>:



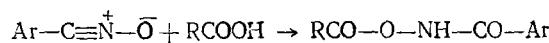
По своей активности в присутствии уксусной кислоты эфиры 4-пиридинальдоксина приближаются к активности 2,4,6-трихлорфениловых эфиров и превосходят *пара*-нитрофениловые эфиры. С использованием эфиров 4-пиридинальдоксина были синтезированы некоторые пептиды — фрагменты ангиотензина. Достоинством эфиров 4-пиридинальдоксина является легкость удаления продуктов реакции и избытка эфира, так как и 4-пиридинальдоксим и его эфиры легко растворяются в кислой среде. К эфирам оксимов можно также отнести и эфиры 1-фенил-3-метил-4-нитрозо-5-аминопиразола<sup>19</sup>:



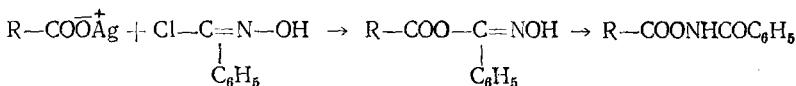
КДИ — карбодиимид.

Они обладают высокой ацилирующей активностью и позволяют синтезировать пептиды с высоким выходом (90—95%) за время, не превышающее 1 час. С помощью такого рода эфиров были синтезированы некоторые ди-, три- и тетрапептиды; рацемизация при этом отсутствовала полностью (тест Вейганда<sup>20</sup> и Изумия<sup>21</sup>). Эти эфиры обладают еще одной интересной особенностью: они имеют красную окраску, в то время как продукт реакции (замещенный 4-нитрозо-5-аминопиразол) зеленого цвета, что облегчает контроль за реакцией конденсации.

Эфиры гидроксамовых кислот также привлекают к себе внимание ряда исследователей. Представляет интерес работа по синтезу эфиров бензгидроксамовых кислот из соответствующих окисей нитрилов<sup>22</sup> по схеме:



Выход эфиров при такой реакции колебается от 65 до 100%. Эфиры бензгидроксамовых кислот достаточно активны и при комнатной температуре реагируют с эфирами аминокислот, давая пептиды с выходом, не превышающим 75%. Причиной невысоких выходов является перегруппировка Лоссена. Активированные эфиры такого же типа могут быть получены также конденсацией N-защищенных аминокислот с гидроксамовыми кислотами с помощью карбодиимида<sup>22</sup>, либо взаимодействием серебряных солей N-защищенных аминокислот с хлорангидридом бензгидроксамовой кислоты<sup>23, 24</sup>; в случае триэтиламмонийных солей получаются меньшие выходы:

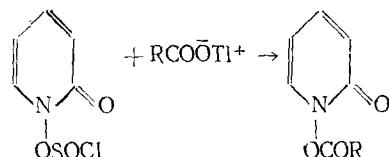


Хотя большинство эфиров представляют собой кристаллические вещества, для пептидного синтеза нет необходимости выделять их. Присутствие уксусной кислоты при реакции эфиров бензгидроксамовой кислоты с аминами заметно ускоряет процесс. Что касается рацемизации, то авторы<sup>24</sup> считают, что она не превышает 0,1% для целого ряда пептидов.

Интересными являются также эфиры на основе N-оксиуретанов (например,  $\text{HONCOOC}_2\text{H}_5$ , который одновременно является и гидроксамовой кислотой, и эфиром карбаминовой кислоты). Эти эфиры были синтезированы с помощью карбодиимида и смешанных ангидридов с выходом более 90%<sup>25</sup>. Они отличаются прежде всего тем, что обладают значительной устойчивостью к перегруппировке Лоссена. Эфиры N-оксиуретанов легко реагируют как с эфирами аминокислот в органической среде, так и с солями аминокислот в водной среде. Выходы пептидов составляют более 90 и около 80% соответственно. Применение N-оксиуретана в качестве добавки при карбодиимидном синтезе пептидов снижает степень рацемизации до 0—2% (тест Андерсона). При этом, в отличие от N-оксисукциниимида<sup>26</sup>, не было замечено никаких

побочных процессов, даже если смесь N-оксиуретана с карбодиимидом выдерживали при комнатной температуре много дней<sup>25</sup>.

Родственными, но, пожалуй, несколько необычными эфирами являются эфиры 1-окси-2-пиридона<sup>27, 28</sup>. Эти эфиры можно синтезировать, исходя из хлорангидридов ациламинокислот и 1-окси-2-пиридона, либо используя хлоросульфит 1-окси-2-пиридона и таллиевые соли ациламинокислот<sup>28</sup>

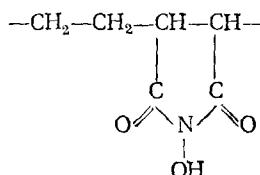


1-Окси-2-пиридоновые эфиры отличаются высокой ацилирующей активностью, однако, вследствие низкой стабильности и сложности получения, они до сих пор не нашли применения в синтезе пептидов.

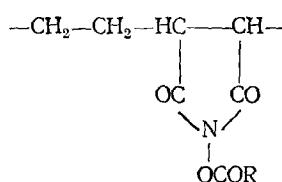
Несмотря на широкое распространение в синтезе пептидов N-оксисукцинидных эфиров, продолжаются поиски новых N-оксииimidов двухосновных кислот. Так, были синтезированы и испытаны эфиры N-оксиглутаримида<sup>29</sup>. Эти эфиры, полученные с помощью дициклогексилкарбодиимида, обладают высокой реакционной способностью, однако заметного преимущества по сравнению с N-оксисукцинидными эфирами они не имеют.

То же можно сказать, вероятно, относительно N-оксифталимидных эфиров, впервые предложенных в 1961 г.<sup>30</sup> и недавно использованных в синтезе некоторых пептидов последовательности окситоцина<sup>31</sup>.

Особый интерес представляют активированные эфиры, получаемые на основе полимеров, содержащих N-оксииimidные группы. Сополимеризацией этилена с малеиновым ангидридом и последующей обработкой гидроксиламином получен полимер, содержащий звенья, подобные N-оксисукцинидику:



Полимер такого типа может быть получен как растворимым в органических растворителях<sup>32</sup>, так и нерастворимым, сшитым<sup>33, 34</sup>. С помощью карбодиимида можно присоединить N-защищенную аминокислоту RCOOH к полимеру; при этом получается полимерный активированный эфир

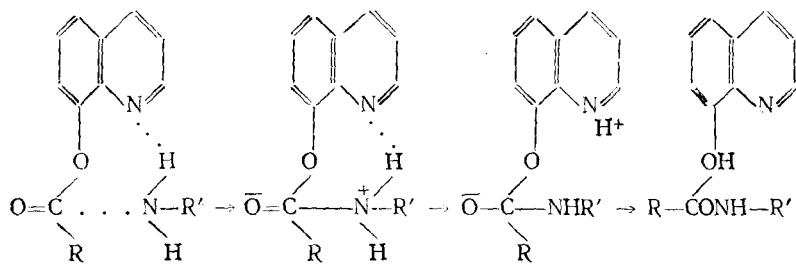


который может реагировать с раствором аминокомпонента в диметилформамиде. Выход пептидов при этом, как правило, превышает 90%, если активированный эфир брать в трехкратном избытке. При эквимолекулярных количествах реагентов выход пептидов колеблется

в широких пределах (от 40 до 100%), в зависимости от природы аминокислот.

Удобство полимерных активированных эфиров состоит в том, что они исключают процедуру избавления от избытка активированного эфира и эфирного компонента. Вместе с тем они обладают высокой ацилирующей активностью, сравнимой с активностью обычных N-оксисукцинильных эфиров. С помощью полимерных активированных эфиров был синтезирован гептапептид, соответствующий последовательности 159—165 карбоксипептидазы А (H—Ser—Pro—Cys—Ser—Glu—Thr—Tyr—OH) с общим выходом до удаления защитных групп — 59,5%, и после удаления защитных групп — 47,6%<sup>33</sup>. Синтез октапептида Boc—Met—Asp(OBzl)—Ser(Bzl)—Ser(Bzl)—Thr—Ser(Bzl)—Ala—Ala—OBzl проведен с общим выходом 27%, постадийные выходы лежат в интервале 57—100%<sup>32</sup>.

Значительное внимание уделяется активированным эфирам, активность которых объясняется внутримолекулярным основным катализом, и прежде всего 8-оксихинолиновым эфиром<sup>35—39</sup>. Кинетические исследования аминолиза этих эфиров позволили предложить следующий механизм реакции<sup>36</sup>:



Такое влияние нуклеофилов, расположенных рядом со сложноэфирным карбонилом, прослеживается и на других примерах, о которых речь пойдет ниже.

Эфиры 8-оксихинолинов синтезируют либо с помощью карбодиимида, либо используя смешанные ангидриды, с выходом 70—90%. 8-Оксихинолиновые эфиры большинства карбобензоксиаминокислот представляют собой стабильные кристаллические вещества, легко растворимые в обычных органических растворителях. Реакция с аминокомпонентами проходит при комнатной температуре в течение 4—20 часов, выходы пептидов составляют 75—97%. Интересно, что ни уксусная кислота, ни соли тяжелых металлов никак не влияют на кинетику реакции аминолиза, что согласуется с механизмом внутримолекулярного катализа<sup>36</sup>. При синтезе Z—Leu—Phe—Val—OBu-*t* рацемизации не было замечено<sup>37</sup>. Эфиры 5-хлор-8-оксихинолина и 5,7-дихлор-8-оксихинолина по своей активности несколько превосходят эфиры 8-оксихинолина и могут быть синтезированы теми же методами<sup>38</sup>. Их применимость для синтеза пептидов была продемонстрирована на примере ряда ди-, три-, тетра- и пентапептидов, полученных с выходом 65—97%. Следует, правда, отметить, что во всех случаях использовались лишь сравнительно простые аминокислоты: глицин, аланин, валин, лейцин, фенилаланин и S-бензилцистеин.

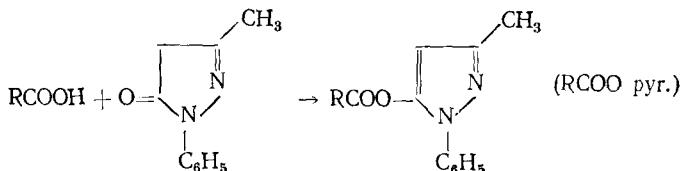
В отличие от эфиров 8-оксихинолина, эфиры 3-окси- и 6-оксихинолина обладают заметно меньшей реакционной способностью, особенно эфиры 6-оксихинолина<sup>39</sup>. Кроме 8-оксихинолина, для синтеза активированных эфиров использовался 8-оксихинальдин<sup>40</sup>. Более того,

сополимеризацией 5-винил-8-бензилоксихинальдина с дивинилбензолом был получен полимер, содержащий 8-оксихинальдиновые группы. После удаления бензильной группы сополимер использовался для синтеза полимерных активированных эфиров карбобензоксиаланина<sup>40</sup>. Аминолиз этиловым эфиром глицина привел к дипептиду Z-Ala-Gly-OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> (с выходом 87%).

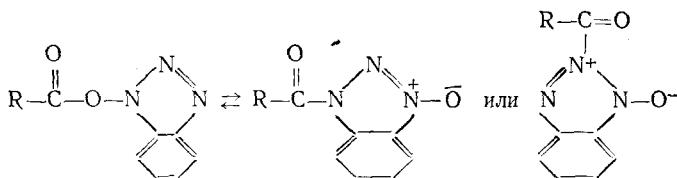
Эффект внутримолекулярного основного катализа еще в большей степени проявляется в случае эфиров на основе 2-оксиридилина<sup>41</sup> и 2-меркапторидилина<sup>42</sup>. Эфиры 2-оксиридилина были синтезированы с помощью карбодииамида в пиридине. В других растворителях синтез 2-пиридилиловых эфиров осуществить не удалось. Большинство полученных 2-пиридилиловых эфиров *трет*-бутилоксикарбониламинокислот представляют собой кристаллические, легко растворимые вещества с очень высокой активностью. По данным кинетических измерений, период полупревращения в реакции с аминами лежит в интервале от 8 до 86 минут. В тех же условиях *пара*-нитрофениловые эфиры имеют период полупревращения от 540 до 1900 минут. Однако такая высокая реакционная способность наблюдалась только в неполярных растворителях (хлороформ, хлористый метилен и др.). В полярных растворителях, например диметилформамиде, активность 2-пиридилиловых эфиров резко уменьшается. Это объясняется инактивирующим влиянием полярных растворителей на внутримолекулярный основной катализ<sup>41</sup>.

Пиридилиловые эфиры легко реагируют с аминокомпонентами, образуя пептиды с выходом 80—96%. Их можно использовать для синтеза пептидов на полимерном носителе; так, окситоцин был получен с выходом 70% при использовании пятикратного избытка 2-пиридилиловых эфиров на каждой стадии. Пиридилиловые эфиры довольно легко реагируют со спиртами и оксикислотами, поэтому их можно использовать для синтеза депептидов. Аналогичными свойствами обладают 2-пиридилиловые тиоэфиры, легко получаемые с помощью карбодииамида, смешанных ангидридов или хлорангидридов. Они также легко реагируют с аминами и спиртами в неполярных растворителях; в полярных же растворителях (диметилформамид, диметилсульфоксид) их активность падает. В отличие от 2-пиридилиловых эфиров, 3-пиридилиловые и 4-пиридилиловые эфиры ациламинокислот обладают меньшей активностью, что можно объяснить отсутствием внутримолекулярного основного катализа. Однако их реакционная способность все же довольно высока, в особенности для 3-пиридилиловых эфиров, которые по своей активности превосходят даже *пара*-нитрофениловые эфиры<sup>43</sup>. В отличие от 2-пиридилиловых эфиров, 3-пиридилиловые эфиры обладают большей стабильностью. При реакции с аминокомпонентами они образуют пептиды с выходом от 50 до 97%.

Все пиридилиловые эфиры выгодно отличаются тем, что образующиеся при синтезе пептидов оксиридины легко отмываются от продуктов реакции. Близкими к 2-пиридилиловым эфирам являются в некотором смысле эфиры енольной формы замещенного пиразолона<sup>46</sup>. Они легко получаются с помощью карбодииамида или смешанных ангидридов, например:

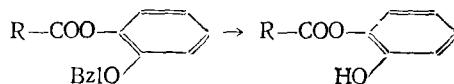


Эфиры енольной формы пиразолонов обладают значительной активностью, близкой к активности *пара*-нитрофениловых эфиров, и легко реагируют с аминокомпонентами, образуя пептиды с выходом 70—80 %. Эфиры енола пиразолона можно использовать для синтеза пептидов в водноорганической среде, вводя в реакцию в качестве аминокомпонента соли аминокислот. Выходы пептидов в этом случае составляют 60—73 %. Степень рацемизации, определенная по методу Андерсона, оказалась равной 8,4 %; правда, необходимо иметь в виду, что активированный эфир Z—Gly—Phe—Орут синтезировали из дипептида Z—Gly—Phe—OH с помощью дициклогексикарбодииимида, что могло привести к некоторой рацемизации уже на стадии синтеза самого активированного эфира. Исключительно высокой реакционной способностью обладают эфиры 1-оксибензотриазола, полученные с помощью карбодииимида<sup>44</sup>. Например, реакция активированного эфира карбобензоксифенилаланина с этиловым эфиром валина при 0° приводит к образованию более 90 % пептида уже через 5 мин. Интересно, что эфиры 1-оксибензотриазола претерпевают перегруппировку при переходе из раствора в кристаллическую форму. В растворе они существуют в виде O-эфиров, в кристаллическом состоянии — в виде N-ацилбензотриазолоксида.

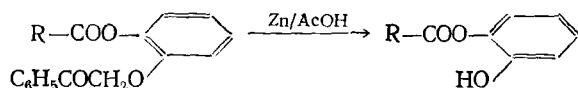


Однако до сих пор описано лишь три эфира 1-оксибензотриазола (ОВТ): Z—Phe—ОВТ, Z—Gly—ОВТ и Z—Thr—ОВТ. По-видимому, высокая активность эфиров 1-оксибензотриазола является причиной трудности обращения с ними. Вероятно, 1-оксибензотриазол целесообразно использовать просто как добавку при карбодииimidном синтезе, о чем будет сказано ниже.

Другим видом активированных эфиров, у которых повышенная реакционная способность объясняется внутримолекулярным катализом, являются эфиры пирокатехина (*ортого*-оксифениловые эфиры). Они могут быть синтезированы либо из *ортого*-фениленсульфита, либо, с гораздо большим выходом, из *ортого*-бензилоксифенола конденсацией с помощью карбодииимида с последующим снятием бензильной группы гидрогенолизом или действием бромистого водорода в уксусной кислоте<sup>45</sup>:



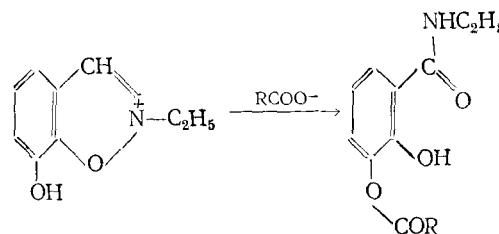
Можно также исходить из *ортого*-фенацилоксифенола, так как фенацильная группа снимается в более мягких условиях, чем бензильная<sup>46</sup>:



*Орто*-оксифениловые эфиры ациламинокислот отличаются довольно высокой активностью. Так, *ортого*-оксифениловый эфир фталоилглицина при реакции с этиловым эфиром глицина при комнатной температуре через 1 час образует 91 % пептида<sup>45</sup>. Для сравнения можно указать, что в этих же условиях фениловый эфир фталоилглицина образует меньше

1% пептида; и, самое главное, найдено, что рацемизация при использовании *ортого*-оксифениловых эфиров полностью отсутствует. Благодаря этому *ортого*-оксифениловые эфиры использовались для синтеза полипептидов конденсацией *ортого*-оксифениловых эфиров различных трипептидов, например Lys—Ala—Ala<sup>46, 50</sup>. Эфиры 4,5-дихлор-2-оксифенола приблизительно в три раза активнее *ортого*-оксифениловых эфиров, однако для синтеза пептидов они не использовались из-за трудности их получения<sup>45</sup>.

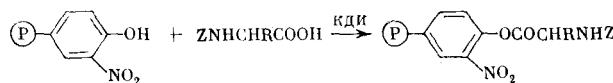
Эфиры, содержащие гидроксильную группу в *ортого*-положении к сложноэфирной, получаются в конечном счете при взаимодействии катиона 2-этил-7-оксибензизоксазолия с ациламинокислотами<sup>51, 52</sup>:



(ряд промежуточных продуктов не приводится).

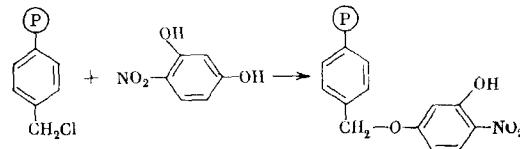
Образующиеся активированные эфиры отличаются высокой активностью. Так, соответствующий эфир карбобензоксиглицина при взаимодействии с фенилаланином в водном растворе бикарбоната натрия через 15 мин. образует 91% карбобензоксиглицилфенилаланина. Эфиры пептидов, в частности карбобензоксиглицилфенилаланина, полученные на основе катиона 2-этил-7-оксибензизоксазолия, очень устойчивы к рацемизации даже в довольно жестких условиях (12 часов в 0,4 M растворе триэтиламина в диметилформамиде). По-видимому, фторборат 2-этил-7-оксибензизоксазолия является одним из самых интересных реагентов для синтеза пептидов<sup>51</sup>. Многообещающими являются эфиры на основе *ортого*-нитрофенола, подробно изученные в последнее время Боданским и сотр.<sup>53—56</sup>. *Орто*-нитрофениловые эфиры в отличие от *пара*-нитрофениловых, обладают большей реакционноспособностью; скорость их аминолиза меньше зависит от природы растворителя, что объясняется внутримолекулярным влиянием *ортого*-нитрогруппы. Высокая активность этих эфиров позволила успешно применить их для синтеза защищенного окситоцина, причем выход на каждой стадии составлял 80—95%.

Что касается других типов активированных эфиров, то большое внимание уделяется эфирам на полимерной основе. Преимущество их в том, что значительно облегчается процедура выделения синтезируемого пептида. Это имеет значение особенно для активированных эфиров на основе нитрофенолов, так как нитрофенолы трудно отмываются от пептидов. Полимерные фенолы получают либо сополимеризацией замещенных стиролов с дивинилбензолом<sup>57—59</sup>, либо с помощью реакции в цепи полимера<sup>60, 61</sup>, либо используя фенол-формальдегидную конденсацию<sup>62</sup>. Полимерные активированные эфиры ациламинокислот синтезируют с помощью карбодиимида<sup>59, 60</sup>:

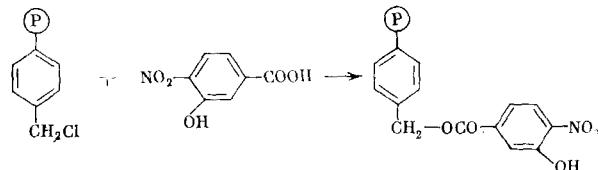


С применением таких эфиров были синтезированы некоторые ди- и трипептиды<sup>59</sup>, а также брадикинин с общим выходом 39%. Разумеется, этот метод можно использовать только в тех случаях, когда все промежуточные защищенные пептиды растворимы в органических растворителях.

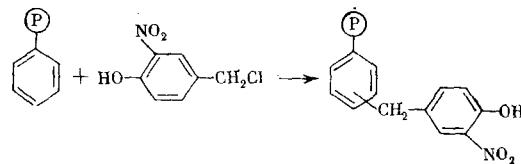
Было найдено также, что полимерный носитель, полученный полимеризацией замещенного стирола, не отличается хорошей механической прочностью, что приводит к разрушению полимерных зерен<sup>60</sup>. Это явилось причиной поисков других способов приготовления полимерного носителя, содержащего нитрофенольные группы. Для этого использовали хлорметилированный спильтый полистирол, и к нему присоединяли нитрорезорцин в присутствии основания<sup>61</sup>.



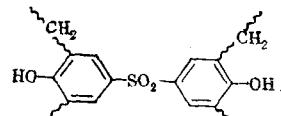
Такой полимерный носитель обладал большей механической прочностью и использовался для синтеза различных пептидов. В другом случае к хлорметилированному полистиролу присоединяли 3-окси-4-нитробензойную кислоту<sup>60</sup>



либо использовали 4-окси-3-нитробензилхлорид, который реагировал с сополимером стирола с дивинилбензолом в присутствии хлористого алюминия<sup>63</sup>:

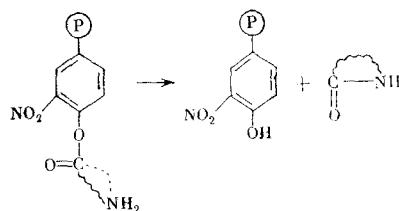


Во всех случаях активированные эфиры синтезировали с помощью карбодиимида, а затем, используя полуторакратный избыток полимерного активированного эфира, получали некоторые пептиды, однако, несмотря на избыток активированного эфира, выход пептидов был меньше, чем в тех случаях, когда синтез проводили в растворе<sup>60</sup>. Полимерный активированный эфир, полученный на основе конденсационной смолы



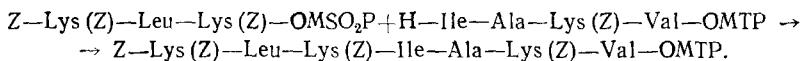
имел аналогичные свойства; выходы пептидов, синтезированных на его основе, не превышали 70%<sup>62</sup>.

Таким образом, полимерные активированные эфиры приведенной структуры, хотя и обладают рядом положительных качеств, не дают заметного преимущества по сравнению с аналогичными низкомолекулярными соединениями. Пожалуй, они имели преимущество только в случае их применения для циклизации пептидов<sup>64</sup>. Пептид, присоединенный к полимерному нитрофенолу, после снятия защиты с амино-группы на конце цепи может претерпевать только внутримолекулярную циклизацию; межмолекулярная конденсация при этом практически исключена.

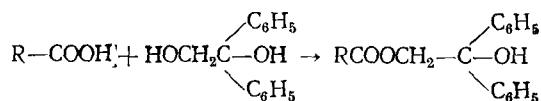


Выход циклопептидов был больше, чем в аналогичных случаях с растворимым активированным эфиром.

Интересными свойствами обладают сложные эфиры ациламинокислот и пептидов на основе 4-метилтиофенола<sup>65-68</sup>. Метилтиофениловые эфиры обладают очень слабой ацилирующей активностью, и метилтиофенильная группа может рассматриваться в качестве защитной группы. Однако при окислении сульфида до сульфона с помощью перекиси водорода или перокисей активность такого эфира резко возрастает, и его можно применять для эффективного синтеза пептидов. Применимость эфиров метилтиофенола (MTP) была продемонстрирована на примере синтеза гепталентида Z-Lys(Z)-Leu-Lys(Z)-Ile-Ala-Lys(Z)-Val)OMTP, который был получен конденсацией 4-метилсульфонилфенилового эфира (MSO<sub>2</sub>P) трипептида с MTP-эфиром тетрапептида с выходом 73%<sup>66</sup>:

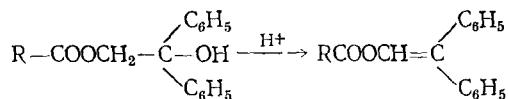


К сожалению, при этом имела место частичная потеря оптической активности (~5%). Кроме того, такой способ активирования, связанный с применением сильных окислителей (30%-ная H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> или 85%-ная *m*-хлорпербензойная кислота), противопоказан для пептидов, содержащих метионин, цистein или цистин<sup>68</sup>. Другие аминокислоты вполне устойчивы в условиях активирования; их метилтиофениловые и метилсульфонилфениловые эфиры представляют собой стабильные кристаллические вещества. При снятии защитных групп можно получить соли эфиров аминокислот. Метилтиофениловые эфиры являются одним из примеров эфиров с переменной активностью. Другим примером такого рода эфиров могут служить эфиры 1,1-дифенилэтленгликоля, первичную оксигруппу которого можно легко этерифицировать с помощью хлористого тионила в пиридине<sup>69</sup>:

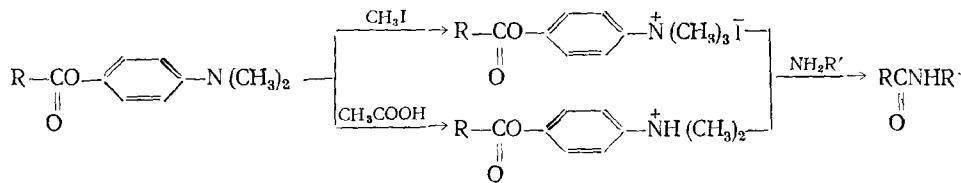


Такой эфир является неактивным, однако при обработке его трифтормукусной кислотой он легко отщепляет воду, превращаясь в активиро-

ванный 2,2-дифенилвиниловый эфир.

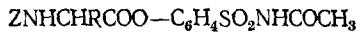


Этот эфир легко реагирует при комнатной температуре с аминокомпонентом, образуя пептид с выходом 80% за 1,5 часа. Для связывания выделяющегося дифенилацетальдегида вводится малоновый эфир. Используя 2,2-дифенилвиниловый эфир на последней стадии синтеза антаманида, удалось провести циклизацию с выходом 20%, что является неплохим результатом по сравнению с другими методами<sup>69</sup>. Аналогичными свойствами обладают эфиры на основе *пара*-диметиламинофенола, которые могут быть получены с помощью дициклогексилкарбодиимида или методом смешанных ангидридов<sup>70</sup>. Диметиламинофениловые эфиры инертны по отношению к аминам, однако, будучи протонированы или обработаны иодистым метилом, они легко реагируют с аминогруппой, образуя пептиды



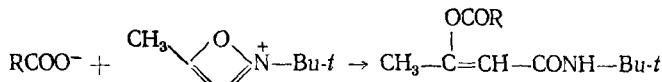
С применением диметиламинофениловых эфиров был синтезирован ряд ди-, три- и тетрапептидов с выходом 50—98%<sup>71</sup>.

Среди других видов активированных эфиров большой интерес представляют пентафторфениловые эфиры, которые синтезируют либо с помощью карбодиимида или смешанных ангидридов, либо с помощью комплекса пентафторфенола с дициклогексилкарбодиимидом<sup>72</sup>. Пентафторфениловые эфиры отличаются исключительно высокой активностью и позволяют синтезировать пептиды с выходом, превышающим, как правило, 90%. С помощью пентафторфениловых эфиров было синтезировано большое количество пептидов, в том числе окситоцин, кортикотропин, антаманид<sup>73, 74</sup>. Можно ожидать, что пентафторфениловые эфиры найдут широкое применение в пептидной химии. Были предложены активированные эфиры на основе фенола, содержащего сульфамидную группу<sup>75</sup>:



Эти эфиры были синтезированы с помощью хлорокиси фосфора в пиридине. Их активность, как показали измерения скорости аминолиза, равна активности *пара*-нитрофениловых эфиров. Выходы пептидов составляли 65—90%; образующийся при реакции *n*-ацетилсульфамидофенол легко отмывается водным раствором бикарбоната натрия. Добавление уксусной кислоты в реакционную смесь оказывает некоторое катализическое действие.

К классу активированных эфиров можно отнести также продукты взаимодействия реагента *K* Вудварда с ациламинокислотами<sup>76</sup>.



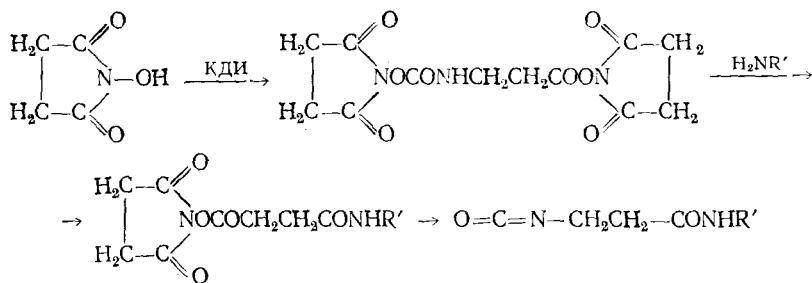
Получающиеся замещенные виниловые эфиры N-защищенных аминокислот являются стабильными кристаллическими веществами и обладают значительной ацилирующей активностью. Например, при взаимодействии активированного эфира карбобензоксиглицина с бензиламином был получен амид с выходом 98%<sup>76</sup>.

### III. АКТИВАЦИЯ КАРБОКСИЛЬНОЙ ГРУППЫ N-АЦИЛАМИНОКИСЛОТ В ПРИСУТСТВИИ АМИНОКОМПОНЕНТА

Методы активирования карбоксильной группы в присутствии аминокомпонента имеют несомненное преимущество, так как весь процесс упрощается и уменьшается вероятность протекания других, побочных реакций. И хотя существуют значительные трудности в подборе реагентов, селективно взаимодействующих с карбоксилом, усилия в этом направлении не безуспешны. Самым ярким примером в этой области, сыгравшим определяющую роль в развитии пептидной химии, являются различные карбодиимида и прежде всего дициклогексилкарбодиимид. В настоящее время работы в этом направлении продолжают успешно развиваться, в ряде случаев получены очень интересные результаты.

Особое внимание за последние пять лет уделялось модификации карбодиимидного синтеза путем применения различных добавок, которые способствовали бы уменьшению рацемизации и исключению побочных реакций. Такой интерес к модификации карбодиимидного синтеза был вызван сообщениями о благоприятном влиянии добавки N-оксисукцинида при синтезе пептидов с помощью дициклогексилкарбодиимида<sup>77, 78</sup>. Было показано, что добавление одного эквивалента (и более) N-оксисукцинида не только препятствует образованию N-ацилмочевины, но и почти полностью исключает рацемизацию. Некоторое время спустя обнаружилось, что наряду с положительным влиянием при добавлении N-оксисукцинида может иметь место нежелательный побочный процесс<sup>79, 80</sup>.

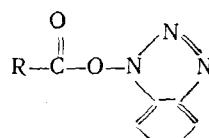
При взаимодействии N-оксисукцинида с карбодиимидом образуется N-оксисукцинидный эфир сукцинидооксикарбонил-β-аланина, который может легко реагировать с аминокомпонентом и претерпевать другие изменения:



Этот побочный процесс особенно опасен, когда карбоксильный компонент обладает слабой реакционной способностью вследствие стericических затруднений (например, валин, изолейцин)<sup>80</sup> и в некоторых случаях добавка N-оксисукцинида не исключает рацемизацию (до 46% для Z—Pro—Val—Pro—OBu-t, например)<sup>81</sup>.

Все это стимулировало поиски более эффективных добавок к карбодиимиду для уменьшения рацемизации и исключения побочных реакций. Было испытано большое количество гидроксилсодержащих соединений и установлено, что многие из них действуют аналогично N-окси-

сукцинимиду<sup>82</sup>. Особенно ценными оказались окситриазолы и окситриазины, хотя эффект добавки зависит также от строения пептида и природы растворителя. Наиболее удобным является 1-оксибензотриазол. Эффект слабо зависит от строения замещенных оксибензотриазолов, поэтому целесообразно применять незамещенный 1-оксибензотриазол<sup>84</sup>. Предполагается, что промежуточным продуктом реакции является 1-ацилоксибензотриазол

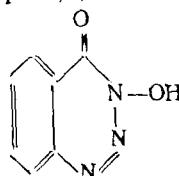


который затем реагирует с аминокомпонентом, давая пептид. Некоторые 1-ацилоксибензотриазолы были выделены и охарактеризованы.

К сожалению, 1-оксибензотриазол тоже не всегда исключает рацемизацию. Так, при синтезе Z—Pro—Val—Pro—OBu-*t* найдено, что рацемический продукт составляет 9%<sup>83</sup>. Однако в большинстве случаев рацемизации не наблюдалось и, что тоже важно, выходы пептидов с добавкой 1-оксибензотриазола выше, чем в случае N-оксисукцинида.

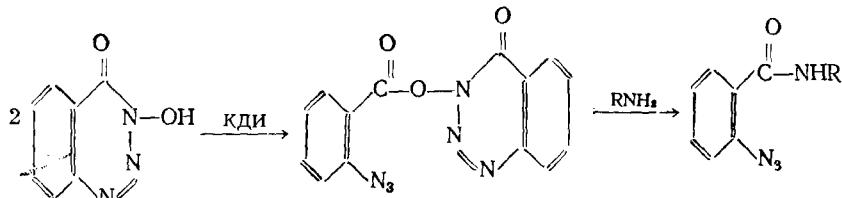
Добавление 1-оксибензотриазола к карбодиииду позволяет присоединять без рацемизации Boc—His(Bzl)—OH<sup>84</sup>. Конденсация с помощью только карбодииимида в этом случае сопровождается заметной рацемизацией.

Дальнейшие поиски привели к еще более эффективному соединению — 3-окси-4-оксо-3,4-дигидро-1,2,3-бензотриазину<sup>82</sup>:



Добавки его к карбодиииду позволили получить оптически чистые пептиды даже в тех случаях, когда ни 1-оксибензотриазол, ни тем более N-оксисукцинид, не могли полностью исключить рацемизацию. Так, при синтезе Tfa—Pro—Val—Pro—OBu-*t* без какой-либо добавки к карбодиииду рацемизация составила 38%, с добавкой 1 моля N-оксисукцинида — 17%, с добавкой 1 моля 1-оксибензотриазола — 3,4%; добавка же 1 моля 3-окси-4-оксо-3,4-дигидро-1,2,3-бензотриазина уменьшила степень рацемизации до величины, меньшей 1%<sup>82</sup>.

Однако, выход пептидов в случае 3-окси-4-оксо-3,4-дигидро-1,2,3-бензотриазина меньше, чем в случае 1-оксибензотриазола, хотя и выше, чем в случае N-оксисукцинида. Снижение выхода является результатом побочной реакции с участием карбодииимида<sup>84</sup>:

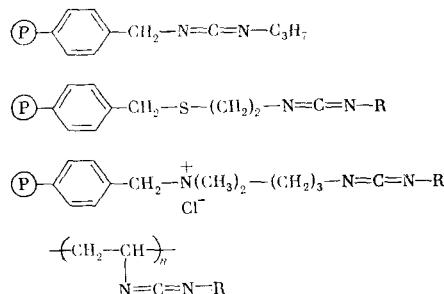


Интересно, что такая побочная реакция протекает в том случае, если в реакционной смеси присутствуют все компоненты сразу. Если же син-

тез вести вначале без аминокомпонента (форактивация), а спустя некоторое время добавить его, то побочная реакция не наблюдается, и пептиды получаются с очень высоким выходом. К сожалению, такая форактивация не всегда гарантирует отсутствие рацемизации<sup>82</sup>.

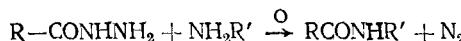
Применение добавок к карбодииimidу в последнее время пользуется большой популярностью. Карбодииimidный синтез с добавками N-окси-сукциниимида и 1-оксибензотриазола успешно конкурирует с азидным сочетанием; его применение позволило провести ряд сложных пептидных синтезов (глюкагон<sup>83</sup>, тирокальцитонин<sup>86</sup>, секретин<sup>87</sup>).

Что касается самого карбодииimidного синтеза, то интерес представляют полимерные модификации карбодииимда. В частности, был получен полимерный карбодииимид —  $[-(\text{CH}_2)_6-\text{N}=\text{C}=\text{N}-]_n-$ <sup>88, 89</sup>, с применением избытка которого были синтезированы некоторые простые дипептиды с высоким выходом: Z—Gly—Gly—OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> (92%), Pht—Gly—Glu(OBzl)<sub>2</sub> (89%), Z—Cys(SZ)—Gly—OBzl (93%). Однако примеров синтеза более сложных пептидов не сообщалось. Были также синтезированы другие полимерные карбодииимида<sup>90</sup>:

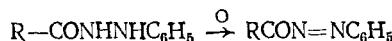


Однако с их помощью были синтезированы лишь некоторые несложные пептиды.

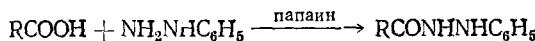
В 1961 г. Вольман и сотр. предложили метод синтеза пептидов, связанный с окислением гидразидов ациламинокислот<sup>91, 92</sup>:



Позже, в 1968 г., было найдено, что фенилгидразиды ациламинокислот можно окислением превратить в фенилазоациламинокислоты, представляющие собой довольно устойчивые кристаллические соединения<sup>93</sup>:



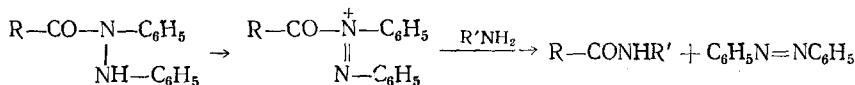
Фенилгидразиды ациламинокислот были синтезированы из ациламинокислот и фенилгидразина под действием папаина:



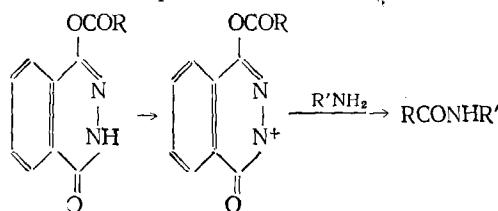
Этот оригинальный способ получения гидразидов дает довольно высокие выходы продукта и является достаточно общим. Окисление гидразидов проводилось N-бромсукциниидом и тетраacetатом свинца с выходом 70—83%. Фенилазоациламинокислоты и пептиды очень легко реагируют с аминогруппой. Так, при взаимодействии Z—Gly—Phe—N=NC<sub>6</sub>H<sub>5</sub> с H—Gly—Phe—NNHC<sub>6</sub>H<sub>5</sub> через 8 минут превращение прошло на 90%. Степень рацемизации при синтезе трипептида Z—Gly—Phe—Gly—OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> колебалась от 0 до 4,5% в зависимости от условий синтеза.

Лучший результат был получен при использовании перегнанного этилового эфира глицина в качестве аминокомпонента.

Для подобного же синтеза пептидов можно использовать 1,2-дифенилгидразиды ациламинокислот, которые при окислении N-бромсукцинимидом или 1-хлорбензотриазолом дают азониевые соли, легко реагирующие с аминокомпонентом с образованием пептидов<sup>69</sup>:



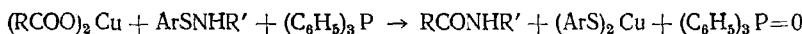
Выходы пептидов составляют 70—80%. Аналогичный результат был получен с помощью 4-ацилоксифталазона<sup>69</sup>:



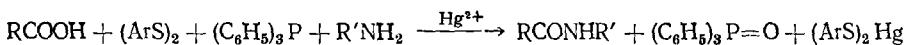
И в первом, и во втором случае выходы пептидов оказались недостаточно велики. Попытки применить эти соединения для циклизации в растворе и на полимерном носителе к успеху не привели.

Особый интерес представляет серия работ, посвященных применению соединений трехвалентного фосфора — фосфинов и фосфитов — для синтеза пептидов. При их применении имеют место своеобразные окислительно-восстановительные реакции, в ходе которых происходит активирование карбоксильной группы ациламинокислот.

При взаимодействии карбоновой кислоты, арилсульфениламида и трифенилфосфина образуется амид карбоновой кислоты<sup>94, 95</sup>. Для связывания выделяющегося тиофенола используют ионы тяжелых металлов ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  и др.).



Вместо арилсульфениламида можно использовать диарилсульфид и амин<sup>96</sup>:

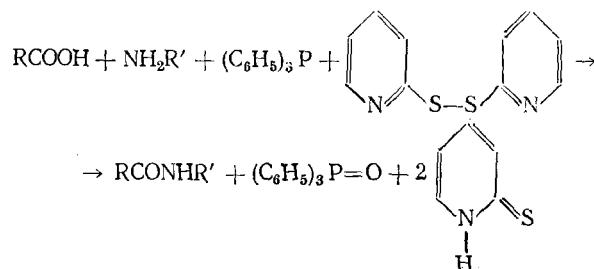


Этим методом был синтезирован, например, Z—Phe—Gly— $\text{OC}_2\text{H}_5$  с выходом 96%<sup>94</sup>.

К сожалению, при синтезе ряда других пептидов встретились трудности при выделении их из реакционной смеси. Оказалось, что трудно отделить пептиды от трифенилфосфиноксида, поэтому пришлось во всех случаях применять хроматографическое разделение на силикагеле, что сильно усложнило процедуру<sup>97</sup>. Изучение рацемизации при синтезе Bz—Leu—Gly— $\text{OC}_2\text{H}_5$  показало, что рацемический пептид образуется в заметных количествах (3—8%)<sup>79, 80</sup>. Вместо ионов тяжелых металлов для связывания тиофенола были использованы некоторые ненасыщенные соединения, например, 2,3-дигидропиран и винилбутиловый эфир<sup>98</sup>. Выход пептидов при этом составил 90—97%. Для облегчения процедуры очистки и увеличения выхода пептидов были предложены водорасторимые реагенты  $[(\text{CH}_3)_2\text{NC}_6\text{H}_4]_3\text{P}$  и  $[\bar{I}(\text{CH}_3)_3\overset{+}{\text{N}}\text{C}_6\text{H}_4\text{S}]_2$ <sup>99</sup>. Это позволило при синтезе пептидов применить избыток реагентов, которые затем

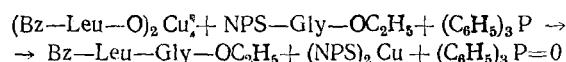
легко удалялись при промывке пептидов водой. С применением водорастворимых реагентов были синтезированы различные дипептиды, содержащие практически все природные аминокислоты. Выход пептидов при этом составил 70—98%<sup>99</sup>.

Удобным соединением для окислительно-восстановительной конденсации оказался дипиридил-2,2'-дисульфид<sup>98, 100</sup>. Образующийся в реакции с трифенилfosфином 2-меркаптопиридин изомеризуется в стабильную тионовую форму и не вызывает нежелательных превращений.



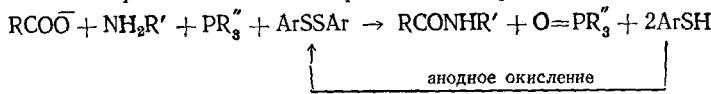
С применением дипиридил-2,2'-дисульфида были синтезированы различные дипептиды с выходом 82—93%. Необходимо отметить, что гидроксилсодержащие аминокислоты (серин, треонин, тирозин) не требуют защиты гидроксильных групп, выходы пептидов высокие ( $\text{Z-Ser-Gly-OC}_2\text{H}_5$  — 84%,  $\text{Z-Thr-Gly-OC}_2\text{H}_5$  — 83% и  $\text{Z-Tyr-Gly-OC}_2\text{H}_5$  — 93%). При синтезе пептидов из  $\text{Z-Gln-OH}$  и  $\text{Z-Asn-OH}$  не наблюдалось дегидратации амидных групп, и выходы пептидов составили 85—86%. Синтез октапептида  $\text{Z-Ala-Gly-Leu-Gly-Gly-Leu-Gly-NHNHBoc}$  был осуществлен с выходом 70%. Использование дипиридил-2,2'-дисульфида позволило успешно применить этот метод для твердофазного синтеза<sup>98, 101</sup>.

Было изучено влияние различных добавок на степень рацемизации при синтезе  $\text{Bz-Leu-Gly-OC}_2\text{H}_5$  окислительно-восстановительной конденсацией<sup>102</sup>:



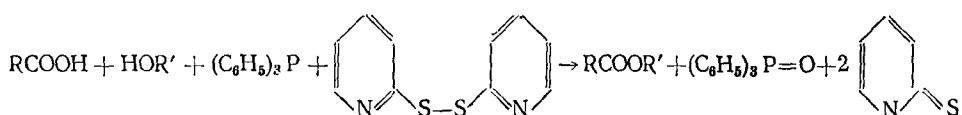
В качестве добавок использовались фенол, *пара*-нитрофенол, 2,4-динитрофенол, 2,4,6-тринитрофенол, а также N-оксисукцинимид и триметилуксусная кислота.

Было найдено, что содержание *L*-изомера возрастает от 57 до 80% по мере уменьшения р<sub>K</sub> добавок от 9,89 до 0,38. Однако N-оксисукцинимид выпадает из этой закономерности при р<sub>K</sub> 9,4 содержание *L*-изомера составляет 84%. Исследование зависимости степени рацемизации от природы растворителя и структуры производных ртути (добавляемых для связывания тиофенола) показало, что никакой четкой закономерности не существует и что степень рацемизации остается значительной (5—63%)<sup>103</sup>. Таким образом, метод окислительно-восстановительной конденсации можно применять лишь для ступенчатого наращивания пептидной цепи. Необычным вариантом окислительно-восстановительной конденсации является метод синтеза пептидов с использованием анодного окисления для регенерации диарилдисульфидов<sup>104</sup>. Образующийся в результате реакции тиофенол окисляется в диарилдисульфид, который таким образом снова возвращается в реакцию.



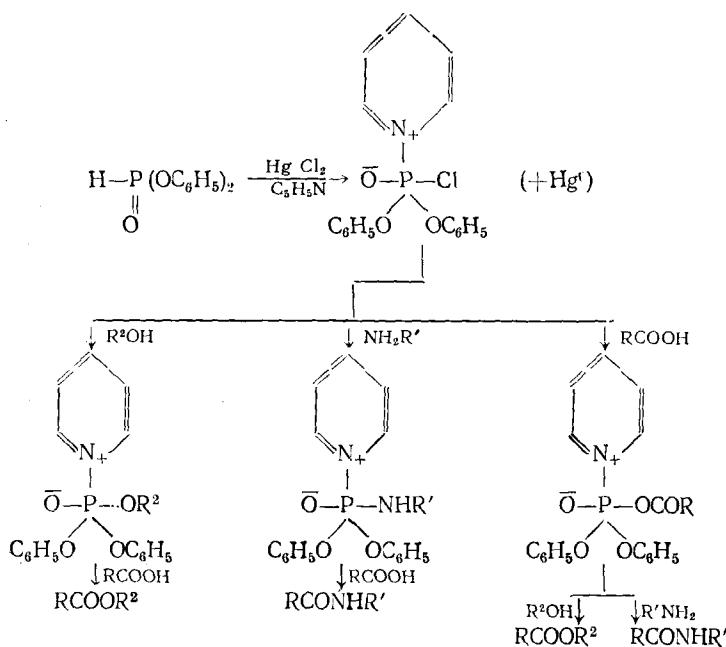
Такой процесс позволяет вводить в реакцию диарилдисульфид в количестве, которое значительно меньше стехиометрического, и уменьшать тем самым вероятность образования побочных продуктов.

Интересно применение окислительно-восстановительной реакции для синтеза различных активированных эфиров<sup>105</sup>:



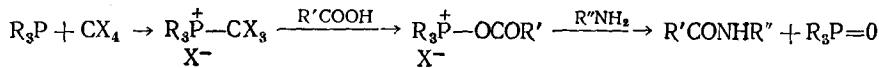
Таким способом были синтезированы пентахлорфениловые, сукцинимидные и 8-оксихинолиновые эфиры с выходом 60—86%. Этот метод позволяет легко синтезировать активированные эфиры аспарагина, глутамина и нитроаргинина.

Другим примером окислительно-восстановительной реакции, приводящей к активации карбоксильной группы, является реакция дифенилфосфита с солями двухвалентной ртути в пиридине<sup>106</sup>. Применяя эту реакцию, можно синтезировать как амиды, так и эфиры кислот. Реакция во всех случаях проводится в пиридине либо при 45°, либо при кипении и протекает по следующей схеме:

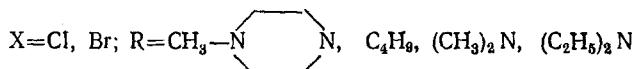


Реакция применялась для синтеза Z—Gly—Gly—OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> и Z—Gly—Gly—OH, которые были получены с выходом 94% и 50% соответственно.

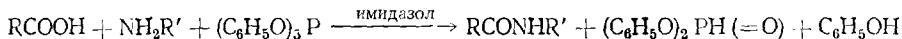
Интересным примером использования соединений трехвалентного фосфора для синтеза пептидов является метод, основанный на взаимодействии фосфинов и амидов фосфористой кислоты с четыреххлористым или четырехбромистым углеродом<sup>107, 108</sup>:



где

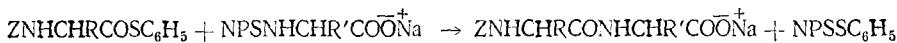


Реакцию проводят при пониженной температуре ( $-20-0^\circ$ ); выход пептидов 60—85%. Изучение рацемизации на примере синтеза Bz-Leu-Gly-OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> показало, что рацемического продукта получается обычно 2—8%, и лишь в случае трифенилfosфина рацемизация была гораздо сильнее (88%). Это свидетельствует о том, что активирование карбоксильной группы проходит не через стадию образования хлорангидридов, хотя известно, что при взаимодействии карбоновой кислоты, четыреххлористого углерода и фосфинов легко образуется хлорангидрид кислоты<sup>109</sup>. По-видимому, в том случае, когда присутствует одновременно и карбоксильный и аминный компонент, активированным соединением является ацилоксифосфониевый ион<sup>107, 110</sup>. Для синтеза пептидов было предложено использовать трифенилfosфит в присутствии имидазола<sup>111</sup>. Реакция протекает по схеме:

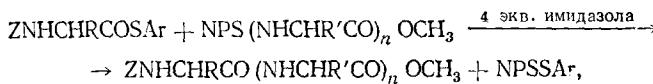


С помощью трифенилfosфита были синтезированы с высоким выходом различные пептиды; метод был успешно применен при синтезе биологически активных пептидов (фрагменты гастрин, кортикотропина и др.)<sup>112</sup>. Столь же эффективным оказался дифенилfosфит, который в присутствии пиридина позволяет синтезировать пептиды с выходом 65—90%<sup>113, 114</sup>. Аналогичный эффект был получен также при использовании диарилсульфитов вместо fosфитов<sup>115</sup>.

Интересным является использование *ортого*-нитрофенилсульфенильных производных аминокислот для синтеза пептидов. Было найдено, что арилтиоэфиры ациламинокислот и пептидов могут реагировать с солями *ортого*-нитрофенилсульфениламинокислот с образованием пептидов<sup>116</sup>:

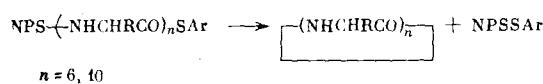


Реакция требует довольно жестких условий: водно-метанольный раствор реагентов выдерживали при  $70^\circ$  в течение 6 часов. Выход пептидов при этом составлял 56—76%. Попытки применить для этой реакции эфиры *ортого*-нитрофенилсульфениламинокислот вместо солей успехом не увенчались. Более удачным в этом отношении был метод с использованием имидазола<sup>117</sup>, что позволило снизить температуру реакции до  $45^\circ$  и значительно сократить время реакции (до 10—45 минут):



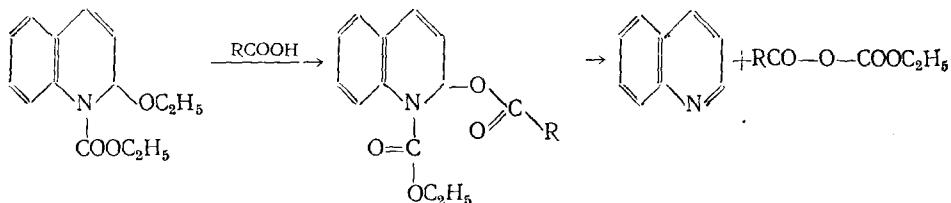
где Ar=C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>; n=1—3

Выход пептидов около 90%, степень рацемизации (тест Андерсона) оказалась равной 4% для *пара*-нитрофенилтиоэфира. Метод удобен в том отношении, что не требует предварительного удаления защитной группы с аминного конца пептида. Он был испробован также для циклизации некоторых гекса- и декапептидов и показал неплохие результаты.



Таким способом был синтезирован антаманид с выходом 30%<sup>118</sup>. Следует отметить, что эта реакция протекает в пиридине или в тетрагидрофуране, тогда как в диметилформамиде преобладают нежелательные побочные процессы. Такое ограничение суживает область применения указанной реакции.

Очень интересным развитием метода смешанных ангидридов явилась серия работ по применению производных 1,2-дигидрохинолина для синтеза пептидов<sup>119–122</sup>. N-Этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолин, легко получаемый из этилхлорформиата и хинолина, представляет собой довольно стабильное соединение, не реагирующее с аминами; однако при взаимодействии с карбоновыми кислотами легко образуются смешанные ангидриды:

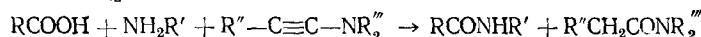


Поскольку реакция проводится в присутствии амина, смешанный ангидрид сразу же реагирует с ним, образуя амид (пептид). С применением N-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолина были синтезированы различные пептиды с выходами, превышающими 90%. Рацемизация определялась при синтезе этилового эфира бензоиллейцилглицина (тест Янга), очень чувствительного пептида; однако рацемический продукт не был обнаружен. При исследовании рацемизации другим, более точным методом<sup>120</sup> была обнаружена лишь минимальная рацемизация (~0,2%). Такое своеобразное поведение смешанного ангидрида объясняется тем, что по мере возникновения он сразу реагирует с аминокомпонентом, так что время его жизни очень мало и побочные процессы не проходят.

Описана полимерная модификация N-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолина<sup>121</sup>. Полимер был получен сополимеризацией 6-изопропенилхинолина со стиролом и затем превращен в активный реагент реакцией с этилхлорформиатом и этанолом. Полимерный реагент позволяет легко и быстро синтезировать пептиды с выходом 84–92%. После реакции полимер вновь может быть превращен в активный реагент.

Для применения в обычном твердофазном синтезе пептидов (метод Меррифилда) рекомендован N-изобутилоксикарбонил-2-изобутилокси-1,2-дигидрохинолин<sup>122</sup>. Этот реагент столь же эффективен, как и N-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолин. С его помощью были получены некоторые пептиды, содержащие серин, треонин, аспарагин с выходом 80–95%. В качестве примера использования его в твердофазном синтезе приведен синтез октапептида из Z(OCH<sub>3</sub>)—Asp(Bzl)—Phe—Cys(Bzl)—Leu—Glu(Bzl)—Pro—OH и H—Gly—Ala—O-полимера (четырехкратный избыток). Синтез проводили в течение 48 часов; выход близок к количественному. Для определения рацемизации использовали дипептид Ac—Ile—Gly—OCH<sub>3</sub><sup>123</sup>, степень рацемизации оказалась равной 4,1%. При синтезе трипептида Z—Gly—Ala—Leu—OBzl с помощью N-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолина степень рацемизации составила всего лишь 0,2%<sup>120</sup>.

Для ступенчатого синтеза пептидов предложено использовать инамины R—C≡C—NR<sub>2</sub><sup>124, 125</sup>:

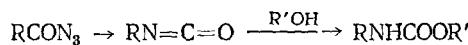


Реакцию ведут при 40° в тетрагидрофуране, выходы некоторых дипептидов составляют 83—99%. Однако попытки синтезировать Z—Leu—Phe—Val—OCH<sub>3</sub> привели к плохому выходу трипептида (25%), причем степень рацемизации высокая и в зависимости от температуры реакции она колеблется от 17 до 27%. По-видимому, инамины в синтезе пептидов нужно применять с осторожностью. Гораздо эффективнее было их применение для получения симметричных ангидридов, используемых далее для синтеза пептидов<sup>124</sup>.

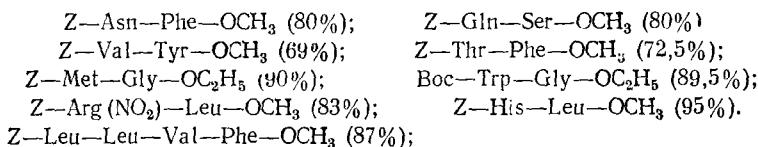
Очень интересным реагентом для синтеза пептидов оказался дифенилfosфорилазид<sup>127</sup>, легко получаемый из дифенилfosфорилхлорида и азida натрия в ацетоне. Он представляет собой стабильную, невзрывоопасную жидкость, которую можно перегонять при пониженном давлении. При действии его на раствор, содержащий карбоксильный и аминный компонент, при 0° легко и с большим выходом получаются пептиды.



Предполагается, что промежуточным соединением является азид карбоновой кислоты RCON<sub>3</sub>. Это подтверждается тем, что при нагревании карбоновой кислоты, дифенилfosфорилазида и спиртов получаются соответствующие уретаны:



Дифенилfosфорилазид является универсальным реагентом, позволяющим синтезировать пептиды, содержащие практически любые аминокислоты с высоким выходом. С его помощью были синтезированы следующие пептиды (в скобках указан выход):

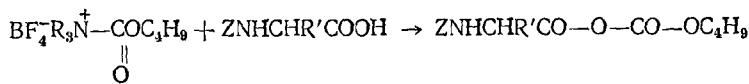


Рацемизация не была замечена при синтезе тетрапептида Z—Leu—Leu—Val—Phe—OCH<sub>3</sub>, однако тест Янга показал степень рацемизации около 5%.

#### IV. ДРУГИЕ МЕТОДЫ АКТИВИРОВАНИЯ КАРБОКСИЛЬНОЙ ГРУППЫ

Большое значение в синтезе пептидов имеют смешанные ангидриды, получаемые на основе эфиров хлоругольных кислот. Несмотря на то, что метод смешанных ангидридов был разработан в начале пятидесятых годов, интерес к нему не ослабевает до сих пор; довольно часто появляются новые работы, в которых предлагаются новые варианты метода.

Представляет интерес новый способ получения смешанных ангидридов, основанный на применении стабильных солей N-алкоксикарбонил-N,N,N-триалкиламмония<sup>128</sup>. Некоторые соли этого типа являются довольно стабильными веществами и могут быть использованы для образования смешанных ангидридов N-ациламинокислот, например:



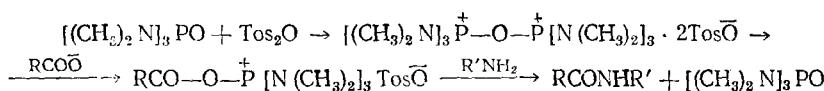
Таким способом были синтезированы некоторые ди- и трипептиды с выходом 70—97%.

Другим примером нового способа синтеза смешанных ангидридов является использование производных дигидрохинолина, которые рассматривались в III разделе<sup>119–122</sup>.

Среди методических разработок, посвященных применению смешанных ангидридов, следует выделить метод, основанный на применении большого избытка смешанного ангидрида<sup>123</sup>. Такой подход позволяет синтезировать пептиды с выходом, близким к количественному, и проводить процесс без выделения и очистки промежуточных пептидов. Метод был успешно применен для синтеза фрагмента гормона роста<sup>128</sup>, секретина<sup>129</sup> и других пептидов.

Несмотря на то, что смешанные ангидриды с некоторыми карбоноыми и алкилугольными кислотами давно вошли в пептидную химию и завоевали всеобщее признание благодаря своей высокой реакционноспособности и простоте получения, до сих пор не прекращаются поиски новых видов смешанных ангидридов. Необходимость таких поисков вызвана, вероятно, нестабильностью смешанных ангидридов и побочными реакциями в ряде случаев. Правда, новых видов смешанных ангидридов не так много и они вряд ли могут конкурировать с общепризнанными смешанными ангидридами.

Одним из таких вновь предложенных смешанных ангидридов является соединение, получаемое при взаимодействии ангидрида *пара*-толуолсульфокислоты с гексаметилтриамидом фосфорной кислоты<sup>131</sup>:



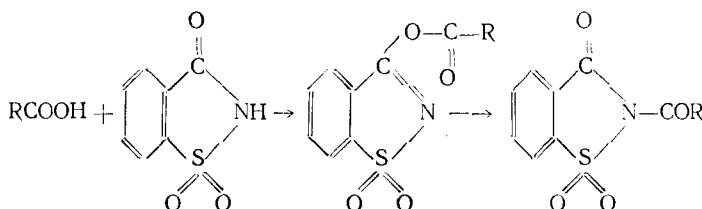
Образующийся тозилат ацилокси-*трист*- (диметиламино) фосфония довольно устойчив в растворе и быстро реагирует с аминокомпонентом, образуя пептиды с высоким выходом для большинства аминокислот (81–96%). Алифатические гидроксилсодержащие аминокислоты (серин, треонин) нельзя использовать в этой реакции без защиты гидроксильной группы. Гистидин также дает неудовлетворительные результаты. Очень интересным фактом является отсутствие рацемизации (меньше 1%), что, по-видимому, объясняется невозможностью образования оксазолонового цикла из-за стерических препятствий, вызываемых диметиламиногруппами. В то же время присутствие в растворе ионов хлора или брома может способствовать появлению рацемического продукта, что отмечалось раньше<sup>132</sup>.

Отсутствие рацемизации позволило применить этот метод для соединения крупных пептидных фрагментов. С выходом 84% был получен гексапептид Z—Ile—Gly—Val—Gly—Ala—Pro—NH<sub>2</sub> (удлиненная черта означает место соединения фрагментов), с выходом 86% получен октапептид Z—Gly—Leu—Leu—Gly—Gly—Phe—Ala—Gly—OCH<sub>3</sub>, и с выходом 81% — октапептид Z—Thr(*трет*-But)—Ala—Ile—Gly—Val—Gly—Ala—Pro—NH<sub>2</sub>. Реакцию проводят в гексаметилтриамиде фосфорной кислоты, который является хорошим растворителем для различных пептидов. Не столь эффективными оказались смешанные ангидриды на основе борной кислоты<sup>133</sup>, например:



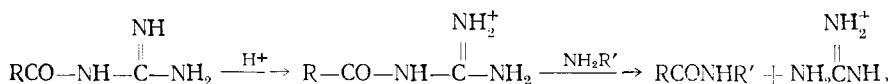
Выдерживая натриевую соль бензоилфенилаланина с хлордиметоксибораном 18 часов при комнатной температуре и вводя затем в смесь свежеперегнанный этиловый эфир глицина, получили пептид Bz—L—Phe—Gly—OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> с выходом 31%. Аналогичная реакция при 55° привела

к образованию рацемата. Смешанный ангидрид — ацилоксидиметоксиборан — претерпевает ряд превращений, например, образует триацилоксииборан  $(RCOO)_3B$ , симметричный ангидрид  $RCOOCOR$  и другие продукты. Все это обуславливает низкие выходы пептидов<sup>134</sup>. Оригинальным использованием сахарина является применение его для синтеза смешанных ангидридов с ациламинокислотами<sup>135</sup>:



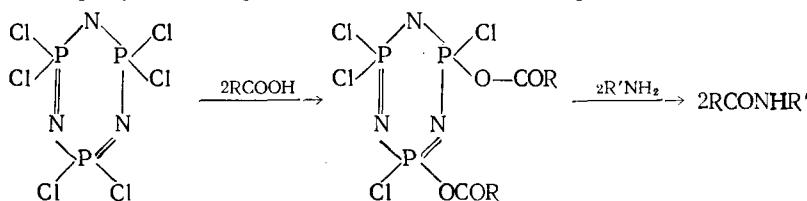
Смешанные ангидриды получают с помощью карбодиимида или хлористого тионила с выходом 74—95 %. Они представляют собой легко кристаллизующиеся, высокоплавкие соединения, отличающиеся значительной стабильностью при хранении. Вместе с тем они обладают высокой реакционноспособностью, легко реагируют при 0° с аминокомпонентами, образуя пептиды с выходом 86—95 %. Их можно использовать для синтеза пептидов в водной среде, используя растворы аминокислот и пептидов в водном растворе бикарбоната калия. Выходы пептидов при этом составляют 63—95 %. Выделяющийся при реакции сахарин легко отмыается водой.

Представляет интерес применение для синтеза пептидов ацилгуанидина<sup>136</sup>. Ацилгуанидины получают с хорошим выходом при реакции метиловых эфиров ациламинокислот со свободным гуанидином. Ацилгуанидины представляют собой кристаллические соединения с довольно высокой температурой плавления (150—190°), растворимые в полярных растворителях. Они довольно хорошо реагируют с аминами, образуя амиды (пептиды); при этом предполагается протонирование гуанидина.

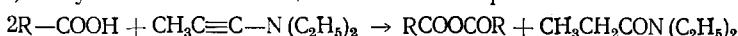


Реакцию проводят в водной или в водноорганической среде при комнатной температуре при pH 8. Выходы дипептидов составляют 68—90 %.

Сравнительно невысокие выходы пептидов и полная рацемизация отмечены при использовании эфиров полифосфорной кислоты  $(C_2H_5O_3P)_n$ <sup>137</sup>. Синтез пептидов проводился при кипении раствора ( $CHCl_3$ ,  $CH_3CN$ ), выходы пептидов не превышали 75 %, причем были синтезированы пептиды сравнительно простых аминокислот: глицина, аланина, фенилаланина и лейцина. Метод вряд ли может найти применение для синтеза даже небольших пептидов из-за слишком жестких условий конденсации. Описано применение для синтеза пептидов гексахлороциклотрифосфатриазена, который может реагировать с двумя молекулами ациламинокислоты, образуя своеобразный смешанный ангидрид<sup>138</sup>:



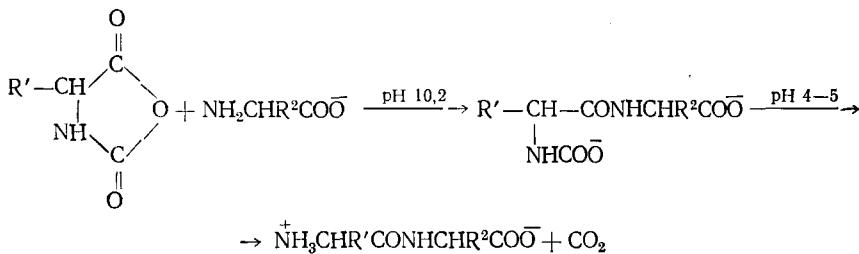
Очень эффективными оказались симметричные ангидриды Вос-аминокислот, получаемые с помощью инаминов при  $0^\circ$ <sup>126</sup>:



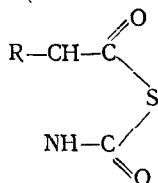
либо с помощью фосгена при  $-40^\circ$ <sup>136, 137</sup>. Реакция симметричных ангидридов с аминокомпонентом заканчивается за 10—30 минут. Все это позволяет одно пептидное сочетание проводить каждые 2—3 часа с выходом более 90% на каждой стадии. Избыток ангидрида (используют полуторацратный избыток) и Вос-аминокислота, образовавшаяся при реакции, могут легко регенерироваться после промывки раствором бикарбоната натрия. Используя симметричные ангидриды, удалось быстро и с хорошим выходом синтезировать нонапептид Вос—Leu—Phe—Phe—Leu—Val—Pro—Pro—Phe—Phe—OBzl без выделения и идентификации промежуточных продуктов<sup>126</sup>.

Симметричные ангидриды трет-бутилоксикарбониламинокислот оказались удобными реагентами для синтеза пептидов на полимерном носителе<sup>141</sup>. Применение ангидридов обеспечивает высокий выход на каждой стадии. Преимуществом такого синтеза является также то, что возможна сравнительно простая регенерация избытка ангидрида. С использованием симметричных ангидридов был синтезирован линейный декапептид, соответствующий антаманиду, с выходом 96%.

Очень продуктивным оказалось применение для синтеза пептидов внутренних ангидридов — N-карбоксиангидридов, легко получаемых из аминокислот действием фосгена<sup>142</sup>. До недавнего времени N-карбоксиангидриды использовались в основном для получения полипептидов и статистических сополипептидов. Оказалось, что в строго контролируемых условиях N-карбоксиангидриды можно использовать для ступенчатого синтеза пептидов в водной среде<sup>142—145</sup>:



Для эффективного синтеза необходимо поддерживать значение pH в узких пределах, так как при  $\text{pH} < 10$  карбамат дипептида уже теряет  $\text{CO}_2$  и образующийся дипептид может реагировать с N-карбоксиангидридом, давая побочный продукт. С другой стороны при  $\text{pH} > 10.5$  имеют место гидролиз N-карбоксиангидрида и другие побочные реакции. При строгом поддержании pH 10.2—10.5 синтез пептидов протекает с очень большой скоростью. Важно, что из всех аминокислот лишь лизин и цистein нуждаются в защите боковых групп. С помощью N-карбоксиангидридов C-концевой тетрапептид гастролина H—Trp—Met—Asp—Phe—NH<sub>2</sub> был синтезирован в течение одного часа. Для некоторых аминокислот (например, гистидина и глицина) целесообразно использовать тиоаналоги N-карбоксиангидридов (тиазолидиндоны-2,5)<sup>146, 147</sup>:



В этом случае пептидный синтез можно вести при меньших рН. Метод N-карбоксиангидридов выгодно применять для синтеза пептидных фрагментов, состоящих из 4—8 аминокислотных остатков. Этот метод был успешно применен для синтеза фрагментов рибонуклеазы<sup>148</sup>.

Неудобством этого метода является низкая стабильность N-карбоксиангидридов, их нельзя синтезировать впрок и долго хранить. Кроме того, встречаются серьезные трудности при синтезе некоторых N-карбоксиангидридов и их тиоаналогов. В последнее время предприняты усилия с целью преодоления отмеченных трудностей. Оказалось, что N-карбоксиангидриды, несущие заместитель при азоте, гораздо стабильнее незамещенных N-карбоксиангидридов; они не полимеризуются и в то же время легко реагируют с аминокомпонентами, образуя N-защищенные пептиды.

В качестве защитной группы были использованы: NPS<sup>149, 150</sup>, бензил, 2,4-диметоксибензил, 2,4,6-триметоксибензил, бензгидрил, 4,4-диметоксибензгидрил и 9-ксантенил<sup>151</sup>. Защищенные N-карбоксиангидриды синтезировали либо из незащищенных N-карбоксиангидридов<sup>149</sup>, либо из защищенных аминокислот и фосгена<sup>151</sup>. С помощью защищенных N-карбоксиангидридов были синтезированы некоторые небольшие пептиды как в растворе, так и на нерастворимом полимерном носителе, выход пептидов в отдельных случаях был очень высокий<sup>150</sup>.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Д. Гринштейн, М. Винци, Химия аминокислот и пептидов, «Мир», М., 1965.
2. Э. Шредер, К. Любке, Пептиды, «Мир», М., 1967.
3. G. W. Anderson, I. E. Zimmermann, F. M. Callahan, J. Am. Chem. Soc., 85, 3039 (1963).
4. G. W. Anderson, I. E. Zimmermann, F. M. Callahan, Там же, 86, 1839 (1964).
5. M. Bodanszky, Acta Chim. Acad. Sci. Hung., 10, 335 (1956).
6. J. Pless, R. A. Boissonnas, Helv. Chim. Acta, 46, 1609 (1963).
7. G. W. Anderson, F. M. Callahan, I. E. Zimmermann, J. Am. Chem. Soc., 89, 178 (1967).
8. Яп. патент 7200416, (1972); C. A., 76, 127429 (1972).
9. S. Sakakibara, N. Inukai, Bull. Chem. Soc. Japan, 38, 1979 (1965).
10. B. O. Handford, I. H. Jones, G. T. Young, T. F. N. Johnson, J. Chem. Soc., 1965, 6814.
11. F. Weygand, W. König, E. Nintz, D. Hoffmann, P. Huber, N. M. Khan, W. Print, Z. Naturforsch., 21B, 325 (1966).
12. I. H. Jones, G. T. Young, J. Chem. Soc. (C), 1968, 53.
13. R. Camble, R. Purkayastha, G. T. Young, Там же, (C), 1968, 1219.
14. I. H. Jones, B. Liberek, G. T. Young, Там же, (C), 1967, 2371.
15. G. Losse, A. Barth, K. Schatz, Ann. Chem., 677, 185 (1964).
16. G. Losse, K. H. Hoffmann, G. Hetzer, Там же, 684, 236 (1965).
17. M. Fujihira, O. Nishimura, Chem. Pharm. Bull., 17, 1937 (1969).
18. П. Я. Романовский, В. Э. Муйжниекс, Г. И. Чипенс, Ж. общай химии, 41, 2110 (1971).
19. M. Guarneri, P. Giori, C. A. Banassi, Tetrahedron Letters, 1971, 665.
20. F. Weygand, A. Prox, L. Schmidhammer, W. König, Angew. Chem., 75, 282 (1963).
21. N. Izumiya, M. Muraoka, J. Am. Chem. Soc., 91, 2391 (1969).
22. T. R. Govindachari, K. Nagarajau, S. Rajappa, A. S. Akerkar, V. S. Iyer, Tetrahedron, 22, 3367 (1966).
23. E. Taschner, B. Rzeszotarska, L. Lubiewska, Chem. Ind., 1967, 402.
24. L. Lubiewska-Nakonieczna, B. Rzeszotarska, E. Taschner, Ann. Chem., 741, 157 (1970).
25. H. Jeschkeit, Z. Chem., 9, 266 (1969).
26. F. Weygand, W. Steglich, N. Chyttil, Z. Naturforsch., 236, 1391 (1968).
27. L. A. Paquette, J. Am. Chem. Soc., 87, 5186 (1965).
28. C. Taylor, F. Kienzle, A. McKillop, J. Org. Chem., 35, 1672 (1970).
29. H. Jeschkeit, Z. Chem., 8, 20 (1968).
30. G. H. L. Nefkens, G. I. Tesser, J. Am. Chem. Soc., 83, 1263 (1961).
31. О. А. Кауров, В. Ф. Мартынов, В. Б. Морозов, Ж. общай химии, 40, 908 (1970).
32. D. A. Laufer, T. M. Chapman, D. I. Marlborough, V. M. Vaida, E. A. Blout, J. Am. Chem. Soc., 90, 2696 (1968).
33. M. Fradkin, A. Patchornik, E. Katchalski, Biochemistry, 11, 466 (1972).
34. С. В. Рогожин, Ю. А. Давидович, С. М. Андреев, А. И. Юртанов, ДАН СССР, 211, 1356 (1973).

35. H. D. Jakubke, *Z. Naturforsch.*, **20B**, 273 (1965).
36. H. D. Jakubke, A. Voigt, *Chem. Ber.*, **99**, 2419 (1966).
37. F. Weygand, A. Prox, W. König, Там же, **99**, 1451 (1966).
38. H. D. Jakubke, A. Voigt, Там же, **99**, 2944 (1966).
39. H. D. Jakubke, A. Voigt, S. Burkhardt, Там же, **100**, 2367 (1967).
40. G. Manecke, E. Haake, *Naturwiss.*, **55**, 343 (1968).
41. J. S. Morley, A. S. Datta, *J. Chem. Soc. (C)*, **1971**, 2896.
42. G. T. Young, K. Lloyd, Там же, *(C)*, **1971**, 2890.
43. E. Taschner, B. Rzeszotarska, *Ann. Chem.*, **690**, 177 (1965).
44. W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.*, **103**, 788 (1970).
45. I. H. Jones, G. T. Young, *J. Chem. Soc. (C)*, **1968**, 436.
46. Y. Trudelle, *Chem. Commun.*, **1971**, 639.
47. I. H. Jones, R. D. Cowell, *J. Chem. Soc. (D)*, **1971**, 1009.
48. R. D. Cowell, I. H. Jones, Там же, *(C)*, **1971**, 1082.
49. R. D. Cowell, I. H. Jones, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1972**, 2237.
50. R. Fairweather, I. H. Jones, Там же, **1972**, 2475.
51. D. S. Kemp, S. W. Chien, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 2745 (1967).
52. D. S. Kemp, S. W. Wang, R. C. Mollan, S. Z. Hsia, P. N. Confalone, *Tetrahedron*, **30**, 3677 (1974).
53. M. Bodanszky, M. Kondo, L. C. Yang, G. F. Sigler, *J. Org. Chem.*, **39**, 444 (1974).
54. M. Bodanszky, F. M. Linn, K. W. Funk, M. Kondo, L. C. Yang, A. Bodanszky, *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 2234 (1974).
55. M. Bodanszky, K. W. Funk, M. L. Fink, *J. Org. Chem.*, **38**, 3565 (1973).
56. M. Bodanszky, K. W. Funk, Там же, **38**, 1296 (1973).
57. M. Fridkin, A. Patchornik, E. Katchalski, *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 3164 (1966).
58. Y. Wolman, S. Kivity, M. Frankel, *Chem. Commun.*, **1967**, 629.
59. M. Fridkin, A. Patchornik, E. Katchalski, *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 2953 (1968).
60. G. T. Pause, D. A. Laufer, *Tetrahedron Letters*, **1970**, 4181.
61. M. Fridkin, A. Patchornik, E. Katchalsky, *Peptides 1969*, North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 1971, p. 164.
62. T. Wieland, Ch. Birr, *Angew. Chem.*, **78**, 303 (1966).
63. B. Kalir, M. Fridkin, A. Patchornik, *Eur. J. Biochem.*, **42**, 151 (1974).
64. M. Fridkin, A. Patchornik, E. Katchalski, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 4646 (1965).
65. B. J. Johnson, P. M. Jakobs, *Chem. Commun.*, **1968**, 73.
66. B. J. Johnson, E. G. Trask, *J. Org. Chem.*, **33**, 4521 (1968).
67. B. J. Johnson, Там же, **34**, 1178 (1969).
68. B. J. Johnson, T. A. Ruettinger, Там же, **35**, 255 (1970).
69. T. Wieland, I. Lewalter, C. Birr, *Ann. Chem.*, **740**, 32 (1970).
70. Ю. В. Митин, Л. Б. Надеждина, *Ж. орг. химии*, **4**, 1181 (1968).
71. Ю. В. Митин, Л. Б. Надеждина, *ЖОХ*, **38**, 2627 (1968).
72. L. Kisfaludy, I. E. Roberts, R. H. Johnson, G. L. Mayers, Y. Kovacz, *J. Org. Chem.*, **35**, 3563 (1970).
73. L. Kisfaludy, M. Löw, O. Nycki, T. Szirtes, I. Schön, Lieb. Ann. Chem., **1973**, 1421.
74. L. Kisfaludy, I. Schön, T. Szirtes, O. Nycki, M. Löw, *Tetrahedron Letters*, **1974**, 1785.
75. G. Kupryczewski, F. Musaleński, *Roczn. Chem.*, **44**, 2341 (1970).
76. R. B. Woodward, D. G. Woodman, *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 1371 (1968).
77. F. Weygand, D. Hoffmann, E. Wünsch, *Z. Naturforsch.*, **21b**, 426, 1966.
78. E. Wünsch, F. Drees, *Chem. Ber.*, **99**, 110 (1966).
79. H. Gross, L. Bilk, *Tetrahedron*, **24**, 6935 (1968).
80. P. Sieber, P. Iselin, *Helv. Chim. Acta*, **51**, 622 (1968).
81. E. Keiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Anal. Biochem.*, **34**, 595 (1970).
82. W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.*, **103**, 2024 (1970).
83. G. C. Windridge, E. C. Jorgensen, *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 6318 (1971).
84. W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.*, **103**, 2023 (1970).
85. E. Wünsch, G. Wendlberger, Там же, **101**, 3659 (1968).
86. B. Riniker, M. Brugger, B. Kamber, P. Sieber, W. Rittel, *Helv. Chim. Acta*, **52**, 1058 (1969).
87. E. Wünsch, G. Wendlberger, *Chem. Ber.*, **105**, 2508 (1972).
88. Y. Wolman, S. Kivity, M. Frankel, *Chem. Commun.*, **1967**, 629.
89. N. M. Weinsheuer, C. M. Sheen, *Tetrahedron Letters*, **1972**, 3281.
90. M. Fridkin, A. Patchornik, E. Katchalski, *Peptides 1969*, North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 1971, p. 166.
91. Y. Wolman, P. M. Gallop, A. Patchornik, *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 1263 (1961).
92. Y. Wolman, P. M. Gallop, A. Patchornik, A. Berger, Там же, **84**, 1889 (1962).
93. H. B. Milne, C. F. Most, *J. Org. Chem.*, **33**, 169 (1968).
94. T. Mukaiyama, M. Ueki, H. Maruyama, R. Matsueda, *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 4490 (1968).
95. Ю. В. Митин, Г. П. Власов, *Ж. общ. химии*, **41**, 427 (1971).
96. Ю. В. Митин, Г. П. Власов, *ДАН СССР*, **179**, 353 (1968).

97. T. Mukaiyama, R. Matsueda, H. Maruyama, M. Ueki, J. Am. Chem. Soc., **91**, 1554 (1969).
98. T. Mukaiyama, R. Matsueda, H. Maruyama, Bull. Chem. Soc. Japan, **43**, 1271 (1970).
99. Г. И. Шелых, Г. П. Власов, Ю. В. Митин, Ж. общ. химии, **43**, 369 (1973).
100. T. Mukaiyama, R. Matsueda, M. Suzuki, Tetrahedron Letters, 1970, 1901.
101. R. Matsueda, H. Maruyama, E. Kitazawa, H. Takahagi, T. Mukaiyama, Bull. Chem. Soc. Japan, **46**, 3240 (1973).
102. M. Ueki, H. Maruyama, T. Mukaiyama, Там же, **44**, 1108 (1971).
103. R. Matsueda, H. Maruyama, M. Ueki, T. Mukaiyama, Там же, **44**, 1373 (1971).
104. Ю. В. Митин, Н. П. Запевалова, Ж. общ. химии, **44**, 2074 (1974).
105. T. Mukaiyama, K. Goto, R. Matsueda, M. Ueki, Tetrahedron Letters, **1970**, 5293.
106. N. Yamazaki, F. Higashi, Там же, **1972**, 415, 5047.
107. S. Yamada, Y. Takeuchi, Там же, **1971**, 3595.
108. B. Castro, G. R. Dormoy, Там же, **1972**, 4747.
109. I. B. Lee, J. Am. Chem. Soc., **88**, 3440 (1966).
110. R. Appel, G. Bäumer, W. Strüver, Chem. Ber., **108**, 2680 (1975).
111. Yu. V. Mitin, O. V. Glinskaya, Tetrahedron Letters, **1969**, 5267.
112. Yu. V. Mitin, A. T. Gudkov, N. P. Zapevalova, E. E. Maximov, Proc. XII Europ. Peptide Symp., Amsterdam, 1973, p. 57.
113. N. Yamazaki, F. Higashi, Tetrahedron Letters, **1972**, 5047.
114. N. Yamazaki, F. Higashi, Tetrahedron, **30**, 1323 (1974).
115. N. Yamazaki, F. Higashi, M. Niwano, Там же, **30**, 1319 (1974).
116. I. Savrda, D. H. Vejrat, Tetrahedron Letters, **1968**, 6253.
117. H. Faulstich, Chimia, **23**, 150 (1969).
118. H. Faulstich, H. Trischmann, T. Wieland, Tetrahedron Letters, **1969**, 4131.
119. D. Belleau, G. Malek, J. Am. Chem. Soc., **90**, 1651 (1968).
120. N. Izumiya, M. Muraoka, H. Aoyagi, Bull. Chem. Soc. Japan, **44**, 3391 (1971).
121. I. Brown, R. E. Williams, Canad. J. Chem., **49**, 3765 (1971).
122. Y. Kiso, H. Yajima, Chem. Commun., **1972**, 942.
123. M. Bodanszky, L. E. Coukin, Там же, **1967**, 773.
124. R. Buyle, H. G. Viche, Angew. Chem., **76**, 572 (1964).
125. F. Weygand, W. König, R. Buyle, H. G. Viche, Chem. Ber., **98**, 3632 (1965).
126. F. Weygand, P. Huber, K. Weiss, Z. Naturwiss., **22B**, 1084 (1967).
127. T. Shioiri, K. Ninomiya, S. Yamada, J. Am. Chem. Soc., **94**, 6203 (1972).
128. I. V. Paukstelis, M. G. Kim, J. Org. Chem., **39**, 1499 (1974).
129. A. Van Zon, H. C. Beyerman, Helv. Chim. Acta, **56**, 1730 (1973).
130. H. C. Beyerman, E. W. B. de Leer, G. Floor, Rec. Trav. chim. Pays-Bas, **92**, 481 (1973).
131. G. Gawne, G. W. Kenner, R. C. Sheppard, J. Am. Chem. Soc., **91**, 5669 (1969).
132. M. W. Williams, G. T. Young, J. Chem. Soc., **1964**, 3701.
133. A. Pelter, T. E. Levitt, P. Nelson, Tetrahedron, **26**, 1539 (1970).
134. A. Pelter, T. E. Levitt, Там же, **26**, 1545 (1970).
135. F. Micheel, M. Lorenz, Ann. Chem., **698**, 242 (1966).
136. E. Hoffmann, D. Diller, Canad. J. Chem., **43**, 3103 (1965).
137. Y. Kanacka, M. Machida, O. Yonemitsu, Y. Ban, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), **13**, 1065 (1965).
138. J. Martínez, F. Winternitz, Bull. Soc. chim. France, **1972**, 4707.
139. T. Wieland, F. Flor, C. Birr, Ann. Chem., **1973**, 1595.
140. F. Flor, C. Birr, T. Wieland, Там же, **1973**, 1601.
141. T. Wieland, Ch. Birr, F. Flor, Angew. Chem., Internat. Edit., **10**, 336 (1971).
142. R. G. Denkewalter, H. Schwam, R. G. Strachan, T. E. Beesley, D. F. Veber, E. F. Schoenewaldt, H. Barkemeyer, W. I. Paleveda, T. A. Jacob, R. Hirschmann, J. Am. Chem. Soc., **88**, 3163 (1966).
143. D. F. Veber, R. Hirschmann, R. G. Denkewalter, J. Org. Chem., **34**, 7531 (1969).
144. G. I. Tesser, A. W. J. Pleumakers, W. Bassic, I. C. Balwert-Geers, Rec. trav. chim., **92**, 1210 (1973).
145. R. Hirschmann, R. G. Strachan, H. Schwam, E. F. Schoenewaldt, H. Joshua, H. Barkemeyer, D. F. Veber, W. I. Paleveda, T. A. Jacob, T. E. Beesley, R. G. Denkewalter, J. Org. Chem., **32**, 3415 (1967).
146. R. S. Dewey, S. F. Schoenewaldt, H. Joshua, W. I. Paleveda, H. Schwam, H. Barkemeyer, B. H. Arison, D. F. Veber, R. G. Denkewalter, R. Hirschmann, J. Am. Chem. Soc., **90**, 3254 (1968).
147. R. Hirschmann, Peptides 1968, North-Holland Publ. Co., Amsterdam, 1968, p. 139.
148. R. G. Denkewalter, D. F. Veber, F. W. Holley, R. Hirschmann, J. Am. Chem. Soc., **91**, 502 (1969).
149. H. R. Kriekeldorf, Angew. Chem., Internat. Edit., **12**, 73 (1973).
150. R. Katai, M. Oya, Chem. Letters, **1974**, 1529.
151. J. Haelstrom, K. Kovács, Peptides 1972, North-Holland Publ. Co., Amsterdam, 1973, p. 173.