

УДК 547.479.6.466 : 543.544

ПОЛИМЕРНЫЕ РЕАГЕНТЫ В СИНТЕЗЕ ПЕПТИДОВ

*Андреев С. М., Самойлова Н. А., Давидович Ю. А.,
Рогожин С. В.*

Изложена сущность метода полимерных реагентов применительно к пептидному синтезу. Полимеры-активаторы классифицированы по типу активирующих группировок. Приведены способы синтеза полимеров-активаторов и полимерных реагентов. Обсуждены основные аспекты использования метода полимерных реагентов для синтеза пептидов различного строения, тенденции и перспективы развития метода.

Библиография — 201 ссылка.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	629
II. Сущность метода полимерных реагентов применительно к пептидному синтезу	630
III. Синтез полимеров-активаторов	631
IV. Полимерные активированные эфиры	640
V. Синтез пептидов с помощью полимерных реагентов	643
VI. Полимерные конденсирующие реагенты	650
VII. Заключение	651

I. ВВЕДЕНИЕ

Применение полимеров в органическом синтезе, биотехнологии в последнее время интенсивно возрастает. Этим вопросам посвящены, например, вышедшие недавно монографии [1—7]. Так, традиционным является использование полимеров в качестве различных подложек, в частности, для иммобилизации ферментов [1, 3, 7, 8], клеток микроорганизмов [1, 9—11], аффинной хроматографии белков [5, 12, 13]. Ведутся исследования по созданию полимерных лекарственных средств [1, 14—16], в частности, искусственных антигенов [17], синтетических моделей ферментов [3, 18, 19]. Широко используются полимерные катализаторы [2, 20, 21], высокомолекулярные защитные группы [2, 22].

Однако наиболее интенсивно развивающееся направление — применение полимеров в качестве химических реагентов [2, 4, 24, 25]. Основное преимущество такого подхода связано прежде всего с увеличением выходов и облегчением очистки целевых продуктов; в ряде случаев значительно повышается специфичность осуществляемых реакций. Особенно ценным оказалось применение полимеров в случае многостадийных монотонных операций, например, для синтеза полипептидов [26, 27], полинуклеотидов [28], полисахаридов [29], поликонденсационных полимеров с точно заданным числом звеньев [30]. Полимеры могут служить при этом разбавителями реагирующих группировок, имитируя условия высокого разбавления. Сведение к минимуму конкурирующих межмолекулярных¹ реакций позволяет эффективно использовать этот принцип для синтеза циклических пептидов [27, 31], макроциклических соединений [32], несимметричных кетонов и α -замещенных карбоновых кислот [33—35], циклизации по Дикману [36], для моноблокирования бифункциональных соединений [37, 38] и т. д. Направление реакции и

¹ Для таких систем используют также термин «внутриполимерные» реакции [41].

ее селективность могут существенно изменяться при переходе от обычных низкомолекулярных реагентов к полимерным [39, 40].

Практически в любой области органического синтеза полимерные реагенты находят целесообразное применение. В пептидном синтезе наметилась тенденция называть полимерными реагентами такие полимеры, которые выполняют ацилирующие функции [27, 42–46].

В настоящем обзоре обсуждаются методы синтеза полимерных реагентов, использование последних в пептидном синтезе, тенденции и перспективы развития данного подхода.

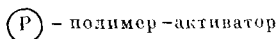
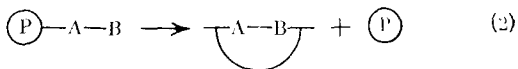
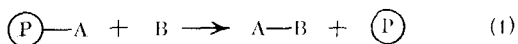
II. СУЩНОСТЬ МЕТОДА ПОЛИМЕРНЫХ РЕАГЕНТОВ ПРИМЕНИТЕЛЬНО К ПЕПТИДНОМУ СИНТЕЗУ

Среди проблем пептидной химии особое место занимает поиск новых подходов к синтезу биологически активных соединений белковой природы. «Классическая» пептидная химия, имеющая дело с реакциями в растворе, столкнулась здесь с рядом трудноразрешимых проблем, в числе которых снижение выходов с увеличением размеров синтезируемых пептидов, сложность выделения целевого продукта в гомогенном состоянии вследствие протекания побочных реакций, снижение растворимости пептидов по мере роста их цепи.

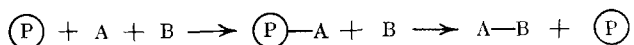
В попытках преодолеть указанные трудности появились новые идеи, связанные, главным образом, с использованием синтетических полимеров. В начале 60-х гг. Меррифилд [26, 50] предложил применять нерастворимые полимеры в качестве носителей пептидной цепи, служащих одновременно С-концевой защитной группой. При этом появилась возможность использования больших избытков активированного низкомолекулярного компонента, отделение которого наряду с побочными растворимыми продуктами легко достигается фильтрацией пептид-полимерного комплекса. Данный «твердофазный» метод синтеза завоевал широкую популярность, чему в немалой степени способствовали исследования по его механизации и автоматизации [51, 52]. Однако в процессе развития этого метода выявились и некоторые его недостатки [53, 54], связанные, главным образом, с трудностью очистки конечного продукта от накапливающихся по ходу синтеза нерастворимых побочных продуктов.

Если использовать в качестве С-концевой защитной группы растущего пептида растворимый полимер, то можно уменьшить влияние диффузионных факторов на ход реакции. Это — так называемый «жидкофазный» метод [55] синтеза пептидов. Препятствием к широкому использованию жидкофазного метода, особенно в синтезе высших пептидов, по-видимому, являются сложности с очисткой продукта реакции из-за сходства в растворимости и молекулярной массе полимера и синтезируемого пептида.

В середине 60-х гг. возникает методологически новое направление, также связанное с использованием полимеров, но уже применяемых в качестве активаторов карбоксильных групп аминокислот или пептидов [27, 56]. В общем случае ковалентный комплекс полимер-низкомолекулярный реагент, который обладает свободной энергией, необходимой для прохождения реакции, осуществляет перенос активированных группировок на молекулы партнера, находящегося в растворе (реакция (1)). Сюда можно также отнести реакции между группировками, находящимися в фазе полимера, т. е. внутримолекулярные (или внутримолномерные) взаимодействия (реакция (2)). Полимерные реагенты указанных типов называют также полимерными трансферными реагентами [42].



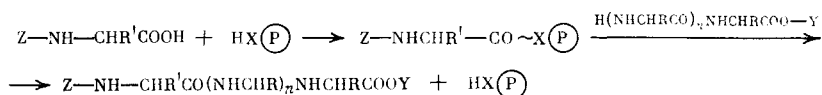
Конденсирующие полимерные реагенты [43] подчиняются вышеприведенному определению, поскольку реакция проходит через промежуточную стадию — активацию компонента А:



Обычно в пептидном синтезе компонент А представляет собой N-защищенную аминокислоту, карбоксил которой необходимо активировать перед образованием пептидной связи. Компонент В — аминокислота или пептид со свободной N-концевой аминогруппой. Полимер-активатор несет электрон-акцепторные группировки для создания положительного заряда на карбонильном углероде аминокислоты, достаточного для эффективной атаки нуклеофильным компонентом В. В классической пептидной химии для этой цели обычно используют активированные эфиры, ангидриды, имиды и т. д. [47—49]. С целью ускорения реакции аминолиза и обеспечения ее полноты, как правило, используют избыток полимерного реагента, отделяемого на последней стадии синтеза.

Физико-химические свойства полимера играют очень важную роль как в процессе синтеза, так и при выделении продукта. Можно сформулировать некоторые общие требования, предъявляемые к полимерным реагентам: 1) полимерный каркас должен быть хорошо проницаем для молекул пептидов в широком диапазоне молекулярных масс. В случае полимеров гелевого типа — обладать хорошей набухаемостью в используемых растворителях; 2) физические свойства полимерных частиц должны обеспечивать легкую фильтрацию их от растворимых продуктов, иметь хорошую механическую и осмотическую устойчивость; 3) полимерные производные аминокислот должны обладать высокой реакционной способностью и устойчивостью к рацемизации; 4) полимерные реагенты должны быть устойчивы при хранении и к сольволитическому действию растворителей; 5) полимеры не должны сорбировать растворимые компоненты; 6) желательно, чтобы полимерные компоненты были многократного действия, т. е. существовала возможность их регенерации без снижения исходной емкости, реакционной способности и изменения физико-химических параметров полимера.

Из применяемых в настоящее время полимерных реагентов для пептидного синтеза чаще всего используются полимерные активированные эфиры:



(P) — полимерный каркас; X — активирующая группировка;
Y, Z — N- и C-защитные группы; n = 0, 1, 2...

Конденсация N-защищенных аминокислот с полимером-активатором приводит к активации карбоксильной группы. Полученный полимерный реагент вводят в реакцию аминолиза с соответствующим производным аминокислоты или пептида, содержащим свободную аминогруппу. Продукт реакции выделяется в раствор. После удаления N-защитной группы полученный пептид можно снова ввести в реакцию с другой аминокислотой, активированной полимером, наращивая таким образом пептидную цепь. Важным обстоятельством при получении полимерного производного аминокислоты является отсутствие нерастворимых побочных продуктов, которые при последующем аминолизе могли бы загрязнять целевой продукт.

III. СИНТЕЗ ПОЛИМЕРОВ-AКТИВАТОРОВ

Существуют различные способы введения активирующих группировок в полимерный каркас. В одних случаях исходный полимер подвергают ряду химических превращений, в других — молекулу с готовой

функциональной группировкой присоединяют к подходящему полимеру-носителю. Функциональную группу можно также вводить путем сополимеризации соответствующих мономеров или ионного связывания «функционального» соединения с сильной ионообменной смолой.

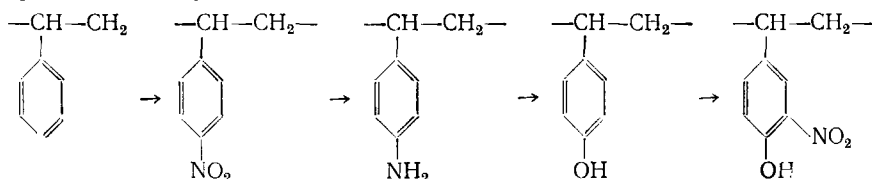
В подавляющем большинстве работ наиболее успешно для активации N-защищенных аминокислот применяли высокомолекулярные нитрофенолы и полимеры с N-окси-функцией.

В настоящее время имеется довольно обширная литература по высокомолекулярным фенолам [57, 58] различной структуры, нитрование которых может обеспечить в потенциале нужный нитрофенольный полимер-активатор. Однако в случае пептидного синтеза высокие требования, предъявляемые в отношении физико-химических свойств полимера, существенно ограничивают выбор таких полимеров. Так, например, широко известные фенол-формальдегидные смолы типа «резита», «новолака» [59], по-видимому, мало пригодны для этих целей из-за возникающих трудностей в регулировании пространственной структуры, содержания функциональных групп, физической формы полимерных частиц. Об использовании таких полимеров имеются краткие сообщения [56, 60], однако экспериментальные данные по их применению практически отсутствуют. Аморфные порошкообразные полимеры подобного типа получали поликонденсацией 4,4'-диоксидифенилсульфона с формальдегидом [61] или салициловой кислоты с анизолом и формальдегидом [62]. Ряд фенол-формальдегидных полимеров применяли также для твердофазного синтеза [31, 63—65]. Выходы пептидов при использовании такой смолы были значительно ниже по сравнению с гидроксильным полимером с полистирольным каркасом. Этот эффект авторы относили на счет стерических препятствий — метиленовые мостики располагались рядом с функциональными группами.

В одной из первых работ по использованию полимерных реагентов в пептидном синтезе [27] было предложено применять поли-4-окси-3-нитростирол, получаемый омылением сополимера *n*-ацетоксистирола с 4% дивинилбензола, с последующим нитрованием концентрированной азотной кислотой при 0° С [66]. Такой полимер был успешно использован для синтеза небольших модельных пептидов, брадикинина, люлиберина [67], но в процессе эксплуатации выявились и его недостатки — разрушение полимерных частиц во время реакции аминолиза и механических манипуляций, что могло вести к загрязнению целевых продуктов [68, 69].

В работе [70] автор предложил синтезировать поли-*o*-нитрофенол путем блочной сополимеризации *n*-метоксистирола с дивинилбензолом, с последующим удалением метильной группы трехбромистым бором и нитрованием. Эффективность ацилирования N-защищенными аминокислотами, как данного полимера, так и предыдущего [27], была примерно одинаковой (1—1,5 ммоль/г полимера).

Аналогичный полимер-активатор, используя полимераналогичные превращения, получали по схеме [56]:



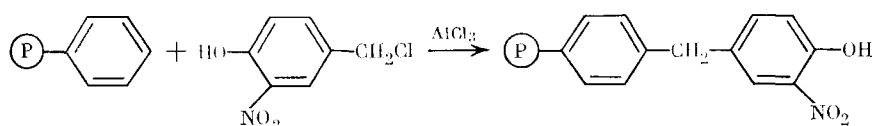
Содержание реакционноспособных оксигрупп составляло 0,05—0,5 ммоль/г полимера, в то время как их теоретическое содержание — 5—7 ммоль/г. Очевидно, что данная схема мало пригодна для синтеза активатора из-за наличия побочных процессов, приводящих к резкому снижению реакционной емкости полимера.

Фенольный нерастворимый полимер в виде сферических гранул получили в работе [71]. Авторы применили суспензионную сополимеризацию *n*-ацетоксистирола со стиролом и дивинилбензолом, а ацетатную группу отщепляли в мягких условиях гидразиолизом.

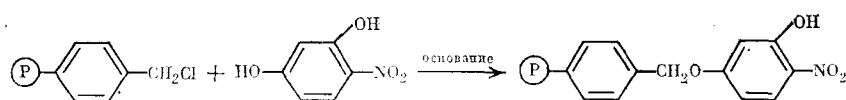
В рассмотренных случаях, за одним исключением [71], полимеры представляли собой частицы неправильной формы, что должно было затруднять их использование из-за растрескивания и механического истирания. Наличие побочных реакций в процессе получения таких полимеров, наряду со снижением содержания функциональных групп ведет и к существенным изменениям пространственной структуры, например, за счет дополнительного сшивания.

С целью устранения указанных негативных явлений было предложено [72] вводить готовую функциональную группировку в полимер-носитель с нужным комплексом физических свойств. Авторы синтезировали полимерный *o*-нитрофенол, используя в качестве носителя сферически гранулированный сополимер стирола с 2% дивинилбензола — полимер, нашедший широкое применение в твердофазном синтезе пептидов из-за хороших физико-химических параметров.

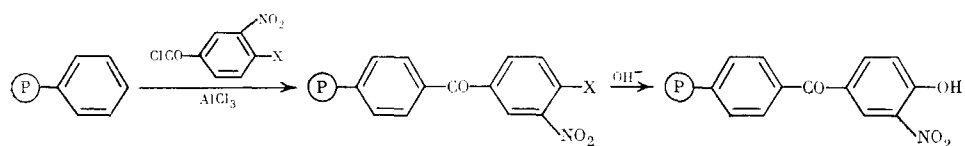
Аналогичный подход использовали другие авторы [69], модифицируя полистирольные гранулы 4-окси-3-нитробензилхлоридом по реакции Фриделя — Крафтса:



Близкий по структуре полимер-активатор получали по следующей схеме [68]:



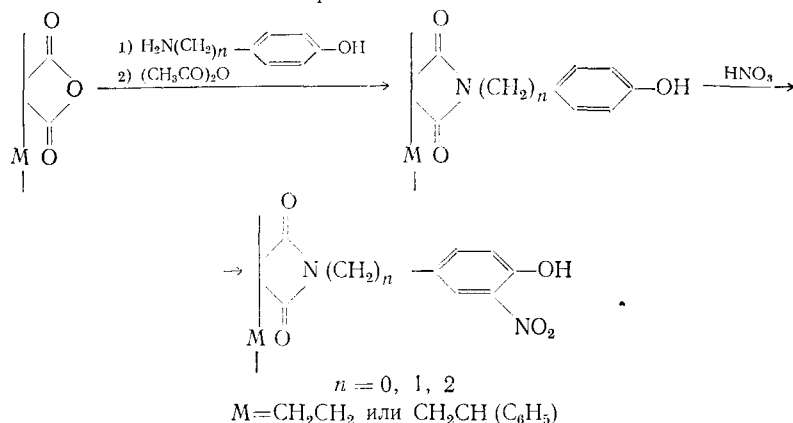
И, наконец, совсем недавно для ацил-активации в пептидном синтезе был предложен полимерный 4-окси-3-нитробензофенон [73]:



$\text{X} = \text{F}, \text{Cl}, \text{OCH}_3$

Низкомолекулярные активированные эфиры 4-окси-3-нитробензофенона оказались в 40 раз более реакционноспособными, чем соответствующие *o*-нитрофениловые эфиры.

В лаборатории авторов был синтезирован полимерный *o*-нитрофенол на основе сшитого сополимера стирола с малеиновым ангидридом [74] и этилена с малеиновым ангидридом:



Полимер-носитель представлял собой сферические гранулы, полученные

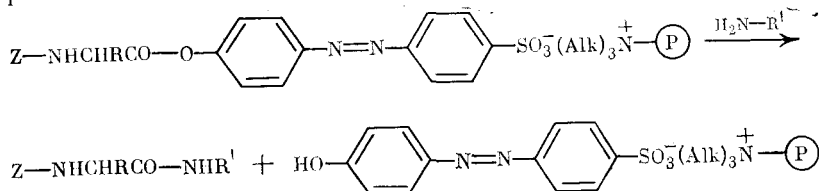
сшиванием исходных линейных сополимеров ароматическими диаминами (3—5 мол. %) в эмульсионной системе [75]. Модификация их аминокислотами с последующим нитрованием приводила к поли-3-нитро-4-оксифенилмалеидам со степенью конверсии, близкой к 100%.

Практически такой же полимер-активатор получен японскими исследователями [76], причем был синтезирован и растворимый полимерный нитрофенол. Однако способ получения сшитого полимера отличался от вышеприведенного [74]; авторы [76] проводили сополимеризацию *n*-ацетоксифенилмалеида со стиролом в присутствии дивинилбензола с последующим удалением ацетильной группы и нитрованием. Получено как полимерное моно-нитро-производное, так и динитро-производное — поли-3,5-динитро-4-оксифенилмалеимид.

Полимеры-активаторы, полученные по типу подвески готовой активирующей группировки на полимер-носитель, отличались хорошей механической прочностью и набухаемостью в органических растворителях различной полярности: в диметилформамиде, диоксане, хлористом метиле и т. п. Не исключено, что такие полимеры оказывают меньший стерический эффект на реакцию аминолиза, поскольку реакционный центр в полимерном активированном эфире удален от полимерной цепи.

Растворимый полимер-активатор с нитрофенольной функцией получали [27], исходя из сополимера *D*, *L*-лизина и *L*-тирозина [77], причем, нерастворимый в низкополярных растворителях, он хорошо растворялся в диметилформамиде, этаноле и воде при основных значениях pH. Однако этот полимер применяли лишь для циклизации линейных пептидов [27]. Известен также растворимый поли-нитрофенол, полученный на основе полиэтиленгликоля [78]; его использовали в синтезе модельных дипептидов [79].

Следует упомянуть работу [80], где реагент был представлен в виде электростатического комплекса:



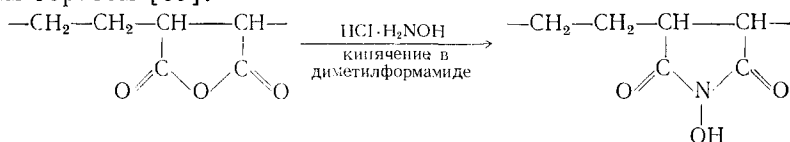
К ионообменной смоле (Дауэкс 1×2) присоединяли путем солеобразования активированный эфир N-защитной аминокислоты и 4-окси-азобензол-4-сульфокислоты [81, 82]. Аминолиз полученного таким образом нерастворимого эфира проводили в среде формамида. Относительно высокая набухаемость такого полимера в сильно полярных средах должна способствовать использованию в качестве аминокислотных свободных аминокислот и пептидов. Преимущество такого подхода состоит в том, что синтез активированного эфира проводили в растворе, поэтому его можно было очистить перед присоединением к полимеру. Недостаток реагента — наличие опасности ионного обмена и, как следствие, загрязнения продуктов аминолиза. В работе [83] для синтеза амидной связи в водной среде был предложен ацетилированный нерастворимый полистирольный ионообменник. Однако в указанных условиях ацилирование анилина протекало недостаточно эффективно — выход ацетанилида не превышал 26%.

Известны попытки использования в пептидном синтезе полимерных тиофенолов [56, 84, 85]. Из них лишь поли-*o*-нитротииофенол [85] и поли-2-меркаптопиридин [85] применили в синтезе двух дипептидов, причем, реагенты на основе полимерного меркаптопиридина более реакционно-способны (выход на конденсации — 90—98%). Поли-2-меркаптопиридин оказался также эффективным тиолитическим реагентом — в этом качестве его использовали для отщепления Nps-защитной группы на промежуточных стадиях при синтезе лейцин-энкефалина [85].

О-Ацилпроизводные N-замещенных гидроксилминов привлекли большое внимание исследователей, поскольку активированные эфиры подоб-

ного типа отличаются высокой реакционной способностью и устойчивостью к рацемизации [48]. В классическом пептидном синтезе большую популярность завоевали N-оксисукцинимидные эфиры [86], производные N-оксисбензотриазола [87], причем последний часто применяли в качестве катализатора в реакциях пептидообразования [88]. В основном, именно эти производные послужили прототипами полимерных реагентов с N-оксифункцией.

Линейный сополимер этилена и N-оксималеимида синтезирован следующим образом [89]:

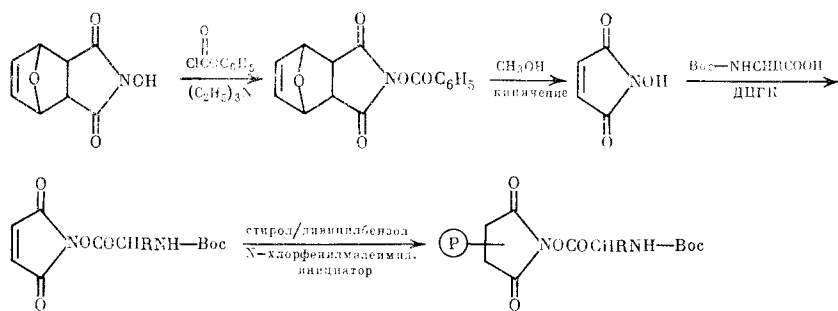


Такой полимер и его O-ацильные производные растворялись лишь в полярных растворителях — диметилформамиде, диметилсульфоксиде. Поэтому активацию аминокислот этим полимером проводили в указанных растворителях, а аминолиз полученных эфиров — в диметоксигане или этилацетате, в которых полимер не растворялся. Несмотря на хорошие результаты, полученные при синтезе низкомолекулярных пептидов, применение его ограничено, поскольку многие пептиды растворяются только в тех же растворителях, что и данный полимер. По-видимому, по этой причине авторы в дальнейшем для синтеза высших пептидов (от гексадо окта-) использовали сильнооспигнутый полимер, который получали путем облучения вышеупомянутого поли-N-оксисукцинимидов электронами высокой энергии [89]. Содержание активных оксигрупп падало при этом до 2%, т. е. полимер практически «работал» в поверхностном слое.

В отличие от предыдущих авторов [89], японские исследователи предложили иной метод введения N-оксигрупп в полимер, обрабатывая сополимер стирола с малеиновым ангидридом в пиридине в более мягких условиях — при комнатной температуре [90—94]. Полимер получался в виде бесцветного порошка с содержанием N-оксигрупп, близким к теоретическому [90]. Его использовали для ацетилирования и бензоилирования некоторых аминов, причем в гомогенной системе; для пептидного синтеза его не применяли.

Предполагалось, что для получения сшитых сферически гранулированных поли-N-оксисукцинимидов можно использовать O-замещенные малеимиды, если вводить их в эмульсионную сополимеризацию со стиролом и дивинилбензолом [91]. Однако сферические гранулы в указанных условиях получить не удалось. Интересно, что находившиеся в составе полимерной цепи звенья малеамовой кислоты (аминокислоты), легко превращались в пятичленный имидный цикл дегидроконденсацией при обработке водной соляной кислотой [90, 91], в то время, как для низкомолекулярных аналогов требовались обезвоживающие агенты или нагревание.

Оригинальный метод синтеза полимерного реагента приведен в работе [94]:



Вос — *трет*-бутилоксикарбонил

ДЦГК — дициклогексилкарбодимид

По мысли авторов этот путь гарантировал большую чистоту полимерных активированных эфиров. Введение же хлорфенилмалеимида в полимерную цепь приводило к меньшим изменениям набухаемости полимера при смене растворителя и во время аминолиза.

Сополимеризация бензилоксималеимида (или ацетоксималеимида) со стиролом и 0,6% дивинилбензола с последующим кислотным отщеплением О-защитной группы приводила к полимеру с содержанием N-оксигрупп 3—3,5 ммоль/г [93].

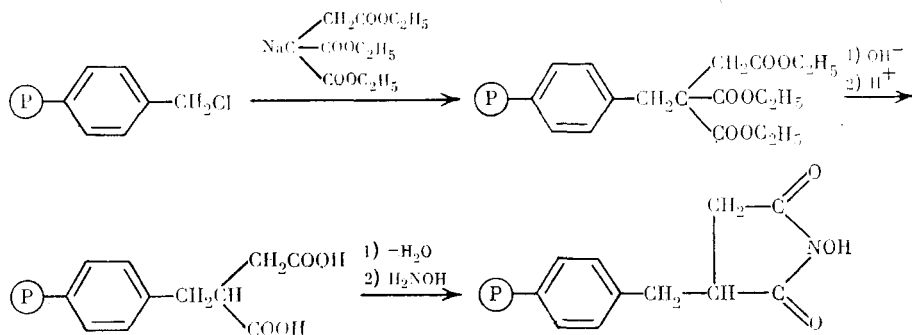
Однако очевидно, что схемы синтеза полимерных N-оксисукцинимидов, предусматривающие применение О-замещенных малеимидов, довольно громоздки, требуют больших затрат времени; синтез исходных мономеров не на всех стадиях протекает с высоким выходом. Кроме того, в случае полимеризации оптически активных мономеров не исключена возможность рацемизации, поскольку процесс проводится при повышенной температуре (в работе [94] авторы использовали только простые алифатические аминокислоты).

Более простой и быстрый способ получения поли-N-оксисукцинимидов — сополимеризация малеинового ангидрида с винильным мономером (обычно — стиролом) в присутствии дивинилбензола с последующей модификацией ангидридных групп. В работе [95] описано введение N-оксигрупп обработкой ангидридного полимера солянокислым гидроксиламином в кипящем диметилформамиде, степень превращения при этом составляла 88%. Такие полимеры хорошо набухали в растворителях с высокой диэлектрической проницаемостью.

Полимер с аналогичной функцией получали обработкой растворимого сополимера этилена и малеинового ангидрида смесью гидроксиламина с полиамином, как сшивающим агентом (гидразин, спермин, спермидин), в водно-пиридиновой среде. Полимер отличался хорошей проницаемостью для крупных молекул, на что указывали высокие выходы в реакциях пептидообразования и количественное ацилирование концевых аминогрупп инсулина [96].

Все рассмотренные полимеры-активаторы N-оксисукцинимидного типа представляли собой по внешнему виду аморфные порошки. Многократное использование таких полимеров затруднено, так как полимерные частицы неправильной формы быстро измельчаются, что ухудшает их фильтруемость в набухшем состоянии [96]. Неудивительно поэтому, что каждому полимеру посвящена лишь одна публикация.

В обзорной статье [43] приведена схема синтеза полимера-активатора, где ряду химических превращений подвергают сшитый хлорметилированный полистирол в виде сферических гранул:

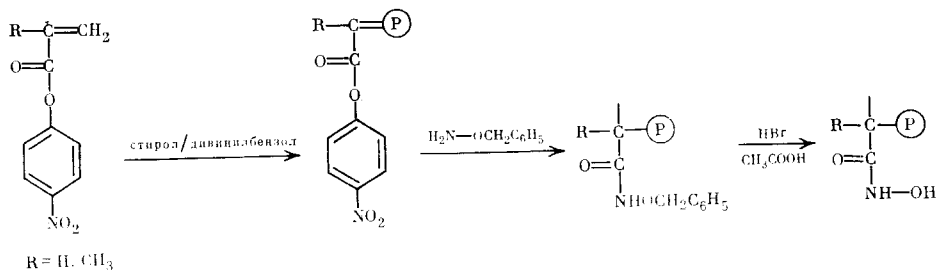


Сшитые сополимеры малеинового ангидрида в виде гранул правильной сферической формы получены советскими авторами [75, 97—100], путем сшивания исходных сополимеров ароматическими диаминами с жесткой вытянутой структурой молекулы (бензидин, диаминодифенилоксид и т. п.) в растворе диметилформамида, диспергированном в полисилоксановой жидкости. Введение N-оксигрупп осуществлялось обработкой ангидридного полимера хлоргидратом гидроксиламина в пиридине; содержание их в конечных полимерах составляло около 4 ммоль

на г полимера. Гранулы всех полученных поли-N-оксисукцинимидов хорошо набухали в полярных органических растворителях, а полимеры, в состав которых входили остатки N-винилпирролидона [97—100], кроме того — и в водной среде. Частицы полимерных N-оксисукцинимидов обладали хорошей механической прочностью и осмотической устойчивостью, хорошо фильтровались в набухшем состоянии. Ацилирование оксигрупп полимеров проходило почти количественно [97—102]. Каркас таких полимеров — макросетчатый изопористый [103], как показано [104], полимеры с такой структурой имеют хорошую проницаемость для крупных молекул.

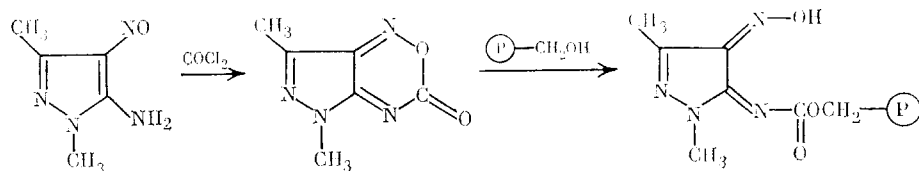
Как можно видеть, имеется достаточно широкий выбор методов синтеза полимерных N-оксисукцинимидов. Очевидно, что наиболее простыми и дешевыми вариантами являются те, которые исходят из сополимеров малеинового ангидрида. Следует учесть, что такие сополимеры содержат строго чередующиеся звенья [105, 106], и подбором соответствующих сомономеров можно существенно менять некоторые их свойства, например, гидрофильность/гидрофобность [98, 100], микроокружение реакционного центра [94].

В работе [93] сделана попытка использовать для активации полимерные производные гидроксамовой кислоты:



В случае полимера, содержащего остатки акриловой кислоты, указанные превращения проходили с более высоким выходом, чем в случае сополимера метакриловой кислоты. Попытка сополимеризации метакрилоилгидроксамовой кислоты со стиролом успеха не имела [93]. Аминолиз О-ацилпроизводных полученного полимера ($R = H$) некоторыми алифатическими аминокислотами и аминами приводил к довольно низким выходам амидов, что можно отнести за счет низкой реакционной способности такого полимерного реагента [107] и стерических препятствий.

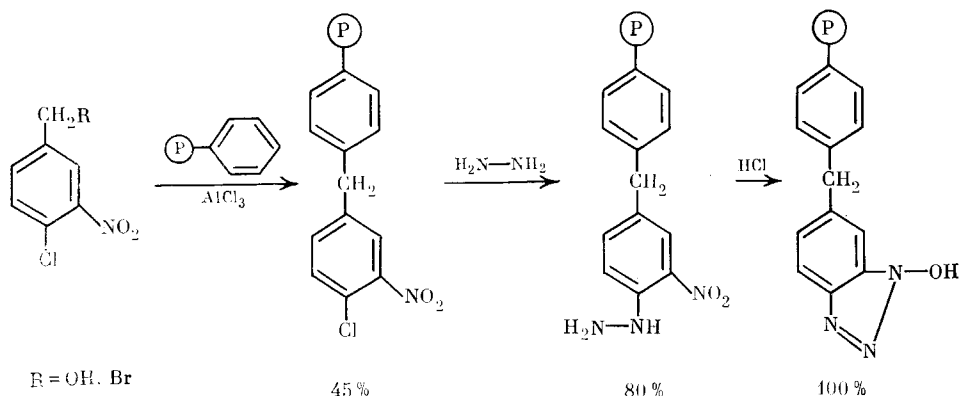
Авторы работы [108] предложили применять в качестве активатора полимерное производное 4-нитрозо-5-аминопиразола:



Ранее было показано, что низкомолекулярные активированные эфиры на основе оксима 5-аминопиразолона обладают очень высокой ацилирующей способностью при практическом отсутствии рацемизации [109]. Интересная особенность такого оксима состоит в том, что, благодаря наличию сопряженных двойных связей он окрашен в зеленый цвет, в то время, как его О-ацильная форма — в красный, в результате чего можно визуально контролировать прохождение аминолиза. Нагрузка N-защищенных аминокислот на полимер (конденсация с помощью дициклогексилкарбодиимида) составляла 0,25—1 ммоль/г. Некоторые трудности вызвало введение в полимер аминокислот с объемистым боковым радикалом.

Из известных в настоящее время активированных эфиров ацилпроизводные N-оксипиразола являются одними из самых мощных аци-

лирующих агентов [88], причем само N-оксипроизводное эффективно ускоряет реакции аминолита других активированных эфиров [88], часто используется в комбинации с дициклогексилкарбодимидом для конденсации пептидных фрагментов с целью снижения рацемизации. Нерастворимый полиоксипбензотриазол получен по схеме [110]:

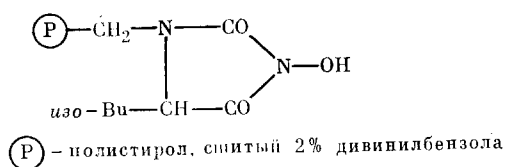


В качестве носителя использовался макропористый сферически гранулированный сополимер стирола с 2% дивинилбензола (ХЕ-305), который алкилировали по реакции Фриделя — Крафта хлорнитробензильным производным. Лучшие результаты получались при использовании замещенного бензильного спирта ($\text{R} = \text{OH}$). Дальнейшая обработка полученного производного гидразином в кипящем метилцеллозольве с последующей дегидратацией кипящей концентрированной HCl , давала полимер-замещенный N-оксипбензотриазол (до 1,4 [111] ммоль/г). Полимер хорошо набухал в диметилформамиде, хлористом метиле, реакции с ним проходили весьма быстро. Эту подложку авторы [111] называют почти идеальной для метода полимерных реагентов в пептидном синтезе.

Показано [73], что реакционная способность полимерных производных N-оксипбензотриазола выше соответствующих производных *o*-нитрофенола в 100 раз, а для низкомолекулярных аналогов она выше в 8000 раз. Такое отличие связывают с низкой скоростью массопередачи внутри полимерных пор [73].

В случае использования растворимой полимерной формы N-оксипбензотриазола [78, 79] не было замечено влияния полимерной активирующей группы на скорость реакции аминолита. Однако в работе [79] констатируется, что такие растворимые полиоксипэтилен-связанные реагенты полезны лишь в синтезе пептидов, обладающих хорошей растворимостью (только в этом случае достаточно полно отделяется полимер от пептида по окончании реакции — осаждением, перекристаллизацией или ультрафильтрацией).

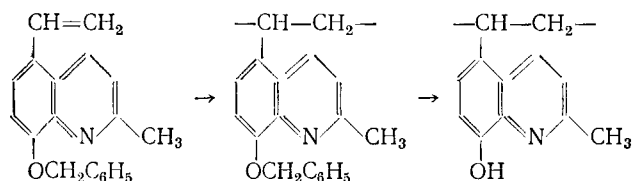
Разработка новых полимеров-активаторов на основе замещенных гидроксиламинов, по-видимому, имеет определенные перспективы. Например показано [112, 113], что сложные эфиры некоторых *N,N*-диацилзамещенных гидроксиламинов и ряда оксимов с электроакцепторными заместителями обладают высокой активностью в реакциях аминолита. Есть также краткое сообщение [114] об использовании для пептидного синтеза полимера, содержащего группировки 3-оксигидантоина:



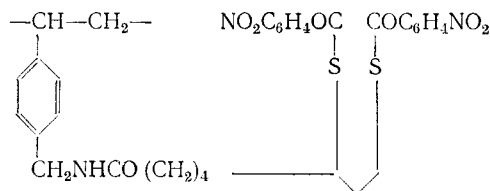
Этот полимер применяли либо для активации Z-Gly в синтезе пептида

Z-Gly-Ala-OC₂H₅, либо в качестве добавки при получении этого же пептида дициклогексилкарбодимидным методом. Во втором случае выход и оптическая чистота продукта были выше.

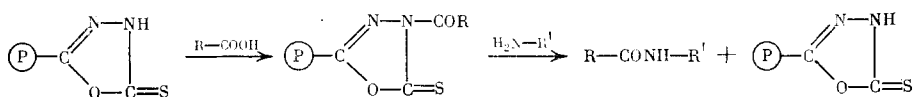
В литературе описаны и другие типы полимеров-активаторов. Например, приведен синтез полимерного аналога 8-оксихинальдина [115], использованного ранее для пептидного синтеза в растворе [116]. Его получали сополимеризацией 8-бензилоксн-5-винилхинальдина с 20 мол. % дивинилбензола и последующим дебензилированием концентрированной HCl:



Полимер был опробирован на синтезе простого дипептида. Ограниченное число данных не позволяет судить о его достоинствах, но, по-видимому, он не имеет никаких преимуществ по сравнению с рассмотренными выше. Однако данный случай (помимо полимерного оксибензотриазола) — пример полимерного реагента, где в реакции аминолиза использован эффект внутримолекулярного катализа. В дальнейшем появились еще два сообщения [117, 118], в которых описан синтез полимерных реагентов, работающих по тому же принципу. Это полимерное производное липоевой кислоты [117] (коэнзима ацилтрансфераз) и 1,3,4-оксадиазолин-5-тиона [118]. Что касается первого производного [117], то его использовали для активации только *n*-нитробензойной кислоты, причем получили не моно-, а бис-ацилированную форму:



Примеров пептидного синтеза не приводится. Полимерные 1,3,4-оксадиазолин-5-тионы (сшитые и растворимые модификации полимеров):



применяли для ацил-активации N-защищенных аминокислот (Ala, Phe, Leu), выход составлял 25—100%; полученные полимерные реагенты вводили в реакцию лишь с этиловым эфиром глицина (выход дипептидов — 72—97%).

Для синтеза амидной связи в водной среде предложено использовать полимерный реагент на основе полнакриламида, несущего тиольную функцию [119]. Ацетилирование такого полимера протекало достаточно эффективно; содержание ацетильных групп достигало 2,2 ммоль/г полимера. Данные по применению полученного политиоэфира в водной среде обсуждены в гл. V.

В качестве ацилирующих реагентов пытались также использовать полимерный вариант смешанных ангидридов [68, 83]. Для ацилирования некоторых простых аминокислот и пептидов применяли ангидрид N-защищенной аминокислоты и сульфированного полистирола [68, 83]. Аналогичный реагент предложен [120] для этерификации спиртов; ангидрид бензойной кислоты и карбоксилатного полимера — для ацилирования ароматических аминов [121, 122]. Проблематичность использования таких реагентов заключается в том, что нуклеофильная атака не

всегда идет селективно — по пужному карбонилу, ее направление в значительной мере зависит от стерических препятствий. На степень рацемизации при использовании этого метода сильно влияют различные факторы [123].

IV. ПОЛИМЕРНЫЕ АКТИВИРОВАННЫЕ ЭФИРЫ

В общем случае скорость аминолиза зависит от концентрации реагирующих компонентов. Поскольку реакция протекает внутри полимерного зерна эффективная концентрация карбоксильного компонента (N-защищенная аминокислота) в полимерном эфире должна определяться содержанием этого компонента в сухом полимере, набухасмостью полимерного эфира и доступностью реакционных центров для аминокомпонента. Количество растворителя должно быть достаточным для полного набухания полимерных частиц и суспендирования их в растворе аминокомпонента. Поскольку набухасмость — постоянный параметр для данного полимера и растворителя, для повышения скорости реакции необходимо стремиться к максимально возможному содержанию активированных аминокислот в полимере. Следует отметить, что в случае растворимых полимеров созданию высокой концентрации карбоксильного компонента препятствует нарастание вязкости полимерного раствора.

Эффект применения полимерных реагентов для пептидного синтеза в значительной мере зависит от выходов и простоты введения аминокислотных производных в полимер. Например, в некоторых работах для конденсации с полимером использовались значительные избытки (до девятикратных [72]) дорогостоящих аминокислотных производных, если же учесть, что при аминолизе также используют избытки карбоксильного компонента, то полезное использование производного аминокислоты составляет при этом лишь несколько процентов.

Степень ацилирования полимера-активатора N-защищенными аминокислотами определяется многими факторами — методом этерификации, природой активирующих групп и их стерическим окружением, однородностью полимерной сетки, структурой аминокислоты. Для оценки эффективности методов синтеза полимерных эфиров, очевидно, следует использовать не содержание аминокислотных остатков в полимере, а выходы и степень использования вводимого в полимер карбоксильного компонента. Следует учесть, что в большинстве случаев полимер можно регенерировать, в то время, как выделение аминокислотных производных, не вошедших в реакцию с полимером, весьма затруднительно. Для такой оценки необходимо знать содержание функциональных групп в полимере-активаторе. В некоторых случаях авторы ограничиваются элементарным анализом, что не позволяет судить о содержании реакционноспособных, или доступных для ацилирования групп. Протекание побочных реакций во время синтеза полимера-активатора, и даже небольшие изменения в архитектуре полимерного каркаса могут тем не менее существенно влиять на эффективность этерификации.

Важным условием для синтеза полимерных эфиров любого типа является высокая исходная концентрация реагирующих компонентов в растворителях, вызывающих хорошее набухание полимера. В этом плане хорошо зарекомендовали себя диметилформамид, хлористый метилен и их смеси [69, 101, 124].

В качестве конденсирующего агента в реакции активации большинство исследователей использовало дициклогексилкарбодимид. В случае полимерных фенолов этот метод оказался наиболее удачным.

Конденсация через *n*-нитрофенилэфирный или азидный [60] методы давала худшие результаты и практически не применялась. Мало перспективным с точки зрения рацемизации представляется также ацилирование полимеров по Шоттен — Бауману [62, 73].

Есть данные об использовании симметричных ангидридов N-ациламиннокислот [73, 78]; однако лучшие результаты (выход 81—100%) в этом случае получали, применяя растворимый полимер-активатор [78] и

сравнительно большие избытки (двух-четырёхкратные) симметричных ангидридов.

Следует подчеркнуть, что в случае полимерных фенолов, получаемых присоединением активирующей группировки к полимеру-носителю, получали более высокую степень ацилирования в отличие от полимеров, где фенольное ядро входит в состав полимерной цепи; она приближалась к 100% [69, 72]. Удаление функциональной группы от полимерной цепи очевидно благоприятствует более полной конденсации.

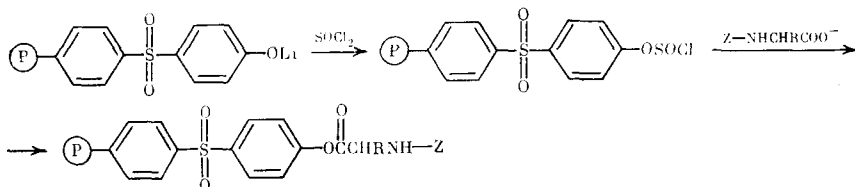
В работе [69] приведены данные по кинетике конденсации бензилоксикарбонил- и *трет*-бутилоксикарбонилфенилаланина с 4-окси-3-нитробензилполистиролом (сшитым) в диметилформамиде и хлористом метиле. Показано, что в случае второго производного скорость реакции была несколько выше. Растворитель не оказывал большого влияния, некоторое различие наблюдалось лишь в начальных скоростях; по истечении 5 ч степень ацилирования для обоих аминокислотных производных становилась одинаковой и достигала максимума. Там же отмечалось [69], что этерификация N-защищенного пролина при использовании дициклогексилкарбодимида протекала плохо, гораздо лучшие результаты давал метод смешанных ангидридов.

Для ацилирования полимеров с N-оксифункцией также преимущественно использовался дициклогексилкарбодимид; обычно конденсация протекала с хорошим выходом. К недостатку дициклогексилкарбодимидного метода следует отнести трудности, связанные с отмывкой полимерного эфира от выделившейся в процессе реакции дициклогексимочевины. Описан случай [43], где даже после многократных промывок полимера различными растворителями полностью удалить ее из полимера не удавалось. Применять дициклогексилкарбодимид для введения в полимер N-защищенных аспарагина и глутамина, по-видимому, нецелесообразно ввиду возможного образования нитрильных производных [125, 126], которые могут включаться в полимер. Описана также побочная реакция дициклогексилкарбодимида с N-оксисукцинимидом [127], которая может протекать и в полимере.

Получение полимерных эфиров аминокислот через смешанные ангидриды имеет некоторые преимущества, поскольку образующиеся побочные продукты хорошо растворимы в органических растворителях. Этот метод применяли для ацилирования полифенолов [60, 61], поли(5-винил-8-хиальдина) [115], а также N-оксисукцинимидных полимеров [89, 102, 126].

Показано [128, 129], что высокие выходы низкомолекулярных N-оксисукцинимидных эфиров ациламинокислот при практическом отсутствии рацемизации получались, если в качестве основания в реакции образования смешанного ангидрида применять N-метилморфолин. Эта методика была успешно использована [126] и для синтеза полимерных N-оксисукцинимидных эфиров, причем в качестве растворителя применяли диметилформамид и тетрагидрофуран, а ацилирование полимера смешанным ангидридом вели при 40—50°. Весь процесс синтеза занимал около 1 ч, выходы составляли 70—90%.

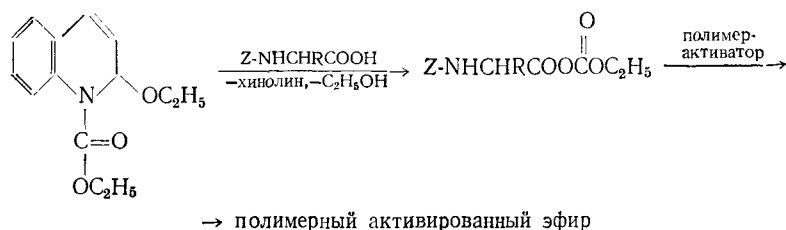
Для конденсации N-защищенной аминокислоты с полимером фенолформальдегидной структуры предварительно активировали последний SOCl_2 или COCl_2 [61]:



где Z — N-защитная группа, R — боковой радикал аминокислоты. Для данного полимера выход на ацилировании при использовании этого метода был практически таким же, как при использовании карбодимидно-

го и метода смешанных ангидридов (содержание аминокислоты в полимере составляло 0,9—1,1 ммоль/г).

К смешанным ангидридам можно также отнести метод, основанный на применении N-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолина [130]:



Хотя этот реагент применяли исключительно для образования амидной связи и, в частности, в твердофазном синтезе [131], авторы опробовали его в синтезе полимерных N-оксисукцинимидных эфиров [126]. Оказалось, что реакция идет довольно медленно (в диметилформамиде или тетрагидрофуране), и выходы не превышают 40—50%.

Применение трансэтерифицирующих агентов является одним из наиболее эффективных методов синтеза активированных эфиров [132]. Метод включает ацилирование соответствующего оксикомпонента (N-оксисукцинимид, производные фенола) ангидридом сильной органической кислоты (трифторуксусной, трихлоруксусной) с последующей переэтерификацией полученного эфира N-защитной аминокислотой в присутствии основания в апротонном растворителе. Несмотря на возможность протекания побочных процессов [133] при переацилировании N-трифторацетоксисукцинимидов N-ациламинокислотой в присутствии третичного амина, эта методика довольно успешно использовалась и для синтеза полимерных N-оксисукцинимидных эфиров [126]. Следует отметить, что весьма высокие выходы наблюдались в случае конденсации ацилпептидов таким методом, правда, при наличии оптически лабильной C-концевой аминокислоты возможна рацемизация [126].

К настоящему времени получены полимерные активированные эфиры различного типа практически всех природных аминокислот. В качестве N^α-защитных групп использовали бензилоксикарбонильную и трет-бутилоксикарбонильную [60, 89, 101], пнтрофенилсульфенильную [102, 124], трифторацетильную [126] и др.

Наиболее простым методом определения содержания активированной аминокислоты в полимерном эфире является весовой, который достаточно точен, если нагрузка на полимер по аминокислоте велика (>0,5 ммоль на г). В ряде работ [90, 91, 93, 101] емкость определяли по выходу циклогексиламидных производных, получаемых в результате взаимодействия ацилированного полимера с избытком циклогексиламина. В альтернативном варианте [69, 73] полимерный эфир обрабатывали раствором бензиламина в толуоле, и не вступивший в реакцию избыток бензиламина оттитровывали 0,1 N HClO₄ в уксусной кислоте, используя в качестве индикатора метилвиолет. Аминокислотный анализ после исчерпывающего гидролиза навески полимерного эфира смесью 12 N HCl и CH₃COOH (1:1) использовали в работах [69, 124]. В одной из них [124] определяли спектрофотометрически бензилоксикарбонильную группу (при 257 нм) после щелочного гидролиза полимерного нитрофенилового эфира N-защитной аминокислоты. В некоторых случаях можно использовать элементный анализ, например, если ацильный остаток содержит серу (Nps-группу, метионин, цистеин) [102, 124]. Все указанные методы дают примерно одинаковые результаты, следует также учесть, что на практике не требуется высокая точность в определении емкости полимерного реагента, поскольку в реакции аминолиза, как правило, он используется в избытке. В дополнение можно упомянуть, что в работах [134, 135] рассмотрены методы неводного титрования активированных эфиров, по-видимому, возможно их приложение и к соответствующим полимерным производным.

V. СИНТЕЗ ПЕПТИДОВ С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРНЫХ РЕАГЕНТОВ

Аминолиз полимерного эфира, приводящий к образованию пептидной связи, протекает в гетерогенной системе: сольватированный полимер — растворитель. Скорость процесса должна зависеть от многих факторов: природы активированного эфира, скорости диффузии аминокомпонента в полимере, доступности реагирующих групп полимера, емкости полимерного реагента и коэффициента распределения аминокомпонента между растворителем и набухшим полимером, изменения набухаемости полимера по ходу реакции. Кинетические закономерности реакции могут существенно меняться в зависимости от размера аминокомпонента, поскольку может меняться лимитирующая стадия процесса, в одном случае это химическая стадия, в другом — диффузия. Для уменьшения вклада диффузионных факторов реакцию обычно проводят в растворителях, вызывающих хорошее набухание полимера (растягивающих его полимерную сетку), либо применяют слабонабухающие носители, но имеющие развитую поверхность и большой диаметр пор [110]. Во всех случаях необходимым условием для успешного аминолиза является сольватация реакционных центров полимера. По мере прохождения реакции и постепенного дезацилирования полимерного реагента характер взаимодействия растворителя с полимером может меняться. Как правило, это выражается в уменьшении гидрофобности полимера и изменении набухаемости. Например, в случае N-оксисукцинимидных гидрофобных полимеров по мере потекания аминолиза наблюдалось некоторое снижение [75, 101] набухаемости (в диметилформамиде, хлористом метиле) или ее возрастание (в воде) [97, 98] — для гидрофильных поли-N-оксисукцинимидных реагентов. Величина такого изменения должна зависеть от соотношения компонентов реакции и емкости полимерного реагента. В свою очередь этот эффект должен влиять на проницаемость и коэффициент распределения.

Исследование кинетики твердофазного синтеза [136, 137] и аминолиза полимерных эфиров [138] показало, что ход таких реакций существенно отличается от реакций в растворе. Обычно с увеличением глубины протекания реакции наблюдается резкое снижение ее скорости. Например, изучение скорости аминолиза полимерных N-оксисукцинимидных эфиров Nps-аминокислот [138] показало, что константа скорости, рассчитанная по первому порядку, в начале и в конце реакции отличалась на 1—3 порядка. Причина такого различия, по-видимому, заключается в том, что реагирующие группы, фиксированные в разных компартментах полимерной частицы, находятся в неравноценных условиях из-за различного микроокружения («клоны» реакционных центров). Это приводит к различным скоростям диффузии аминокомпонента к реакционным центрам («микрогетерогенность»). Дополнительное влияние на диффузию может оказывать изменяющаяся в ходе реакции набухаемость полимерного реагента.

Зависимость изменения скорости реакции от полярности растворителя не обязательно должна коррелировать с аналогичной зависимостью для реакций в растворе, поскольку изменение набухаемости может оказывать большее влияние на скорость, нежели химические причины. Так, Кемп [139] нашел, что реакционная способность N-оксисукцинимидных эфиров в растворе уменьшается в ряду: толуол—хлористый метил—диметилформамид. В случае твердофазного синтеза для системы N-оксисукцинимидный эфир — аминоацил-полимер (сшитый полистирол) порядок был такой же [137]. Но в случае аминолиза полимерных N-оксисукцинимидных эфиров [138] зависимость была обратной: в диметилформамиде скорость реакции была максимальной; в этом же растворителе была и наибольшей степень набухания полимера-активатора [75, 137].

Очевидно, что в препаративном аспекте применение избытка полимерного эфира должно приводить не только к большей полноте реакции, но значительно улучшать и ее кинетические показатели, поскольку в этом случае в реакцию вступают наиболее доступные клоны активированных группировок полимерного эфира, а объемные изменения полиме-

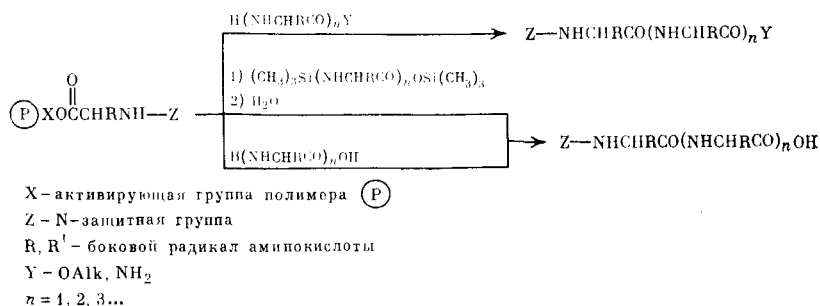
ра невелики. В работе [69] приведена графическая зависимость степени ацилирования метилового эфира лейцина от времени растворимым *n*-нитрофениловым и полимерным нитрофениловым эфиром карбобензоксифенилаланина в среде хлороформа при двукратном избытке карбоксильного компонента. В условиях одинаковых исходных концентраций кривые практически совпадали друг с другом, степень конверсии достигала 100%.

Сравнительную оценку реакционной способности полимерных реагентов сделать непросто ввиду отсутствия четких критериев. Что касается выхода, то он во многих случаях почти количественный. «Прямое» кинетическое сравнение двух полимерных реагентов приведено в работе [110], где сравнивалась степень ацилирования эфира аланина во времени полимерными эфирами *трет*-бутилоксикарбонилаланина; в качестве полимеров-активаторов использовались нерастворимые 4-окси-3-нитробензилполистирол [69] и *N*-оксibenзотриазолилполистирол [110]. В случае первого полимера скорость реакции была заметно меньше. Соотношение полупериодов реакций для этих полимеров составляло 20:1, а время 100% превращения — 1С и 0,2 ч соответственно.

С увеличением длины синтезируемого пептида роль диффузионного фактора возрастает, вследствие чего скорость ацилирования и выходы могут существенно понижаться. Размер пептидов, синтезированных до настоящего времени с помощью полимерных реагентов, не превышал 10 аминокислотных остатков в цепи. В этих пределах не наблюдалось явного замедления реакций или снижения выходов по мере наращивания пептидной цепи. Гораздо большую роль играли природа *N*-концевой аминокислоты [110] и характер активирующей группировки [96], а не размер аминокомпонента. Так, в работе [140] показано, что достаточно успешно можно сочетать метод полимерных реагентов с жидкофазным методом синтеза пептидов. В частности, реакция конденсации полиоксибензотриазольного эфира *трет*-бутилоксикарбонилаланина (взяв трехкратный избыток) с высокомолекулярным компонентом *H*-Val-O-POE (POE — полиоксиэтилен *M*-6000) за время порядка 2 ч прошла практически количественно; выход в аналогичной реакции, но с эфиром на основе полинитрофенола составил 30% за сутки.

С помощью поли-*N*-оксисукцинимидного реагента также проведено ацилирование высокомолекулярных аминокомпонентов — инсулина и *поли-ε*-бензилоксикарбонил-*L*-лизина (*M* = 10 000) [96]. Анализ продуктов реакции показал, что свободные аминогруппы блокировались практически нацело. Правда, в реакции использовали значительные молярные избытки (50—100-кратные) полимерного эфира *трет*-бутилоксикарбонилаланина и, поэтому, не исключено, что реакция шла, в основном, в поверхностном слое полимерных частиц.

Большинство известных полимерных реагентов хорошо набухают лишь в органических растворителях, поэтому в качестве аминокомпонентов чаще всего использовали растворимые в этих средах эфиры или амиды аминокислот и пептидов.



Растворимость промежуточных пептидных фрагментов зависит не только от их молекулярного веса, но и от характера боковых функциональных групп, их блокировки [54]. При использовании полимерных реагентов

набор совместимых защитных групп и тактика построения пептидной цепи по существу такие же, что и в классическом пептидном синтезе. Однако проблема растворимости растущего аминокомпонента в данном методе стоит особенно остро из-за гетерогенности реакционной системы. Повышения его растворимости можно достичь либо сведением к минимуму боковых защит, что должно повысить его гидрофильность [54, 140, 141], либо применять специальные защитные группы, увеличивающие сродство пептида к органическим растворителям, как низкомолекулярные [142], так и высокомолекулярные [140].

Применение свободных аминокислот и пептидов в качестве нуклеофильных компонентов в сочетании с органическими растворителями ограничено их низкой растворимостью. Однако показано [143, 144], что для некоторых пептидов, если их суспендировать в растворе активированного эфира в диметилсульфоксиде, реакция может идти с заметной скоростью и высоким выходом (в ходе реакции равновесие смещается в сторону растворимых продуктов реакции). Указанная методика использовалась для синтеза пептидов с помощью полимерных макросетчатых N-оксисукцинимидных эфиров [101], таким образом были получены модельные тетра- и пентапептид, а также целый ряд диастереомерных дипептидов [145]. Присутствие четвертичных аммониевых оснований существенно повышало скорость реакции [143, 145]. Следует заметить, что активированные эфиры не совсем стабильны в полярных органических растворителях [144, 146], а поскольку в данном случае скорость аминолиза все же сравнительно низкая и зависит от растворимости пептида, метод может оказаться непригодным для синтеза сложных пептидов.

Имеется ряд работ [101, 147—149], где в реакциях с полимерными N-оксисукцинимидными эфирами применяли триметилсилильные (TMS) производные аминокислот и пептидов. Такие производные обладают высокой растворимостью в апротоновых растворителях, в то же время они — гидролитически неустойчивы. Деблокирование TMS-производных протекает практически мгновенно при обработке водой или спиртом [150], поэтому TMS-группа удобна как временная защита для OH^- , COOH^- и, в некоторых случаях, для SH-функций [148, 151]. В настоящее время имеется достаточно большой выбор силилирующих агентов [152, 153], разработаны мягкие методы введения TMS-группы в аминокислоты и пептиды [148]. Заметим, что обычно силилируется и аминогруппа (хотя не всегда [153]), при этом нуклеофильность ее может значительно понижаться — однако выделяющийся в процессе реакции дезацилированный оксикомпонент десилилирует ее. Поэтому, в случае трифункциональных аминокислот, входящих в состав пептидной цепи, для боковых NH_2 - и SH-групп требуется устойчивая защита. Для прохождения реакции обязательно тотальное силилирование всех функциональных групп, достаточно, чтобы аминокомпонент переходил в раствор. Если к суспензии нерастворимого пептида или аминокислоты и активированного эфира добавлять ненуклеофильный силилирующий реагент, равновесие будет смещаться в нужную сторону — аминокомпонент будет переходить в растворимую реакционноспособную форму. Обычно используют силилирующие агенты — TMS-амиды [153, 155]. Нужно однако учесть, что некоторые TMS-амиды сами могут взаимодействовать с активированными эфирами [156], т. е. инициировать в системе конкурентные реакции. Этого можно избежать, если отдельно силилировать аминокомпонент, а затем, после удаления избытка TMS-агента, вводить его в аминолиз.

Проведение аминолиза в водных и водно-органических средах имеет определенные преимущества. Во-первых, отпадает необходимость в блокировке слабо нуклеофильных функциональных групп аминокомпонента, во-вторых, в ряде случаев решается проблема растворимости пептидов, так как с ростом цепи они, как правило, теряют способность растворяться в органических растворителях. В-третьих, водная среда, физиологические значения pH обладают наименьшим денатурирующим воздействием на биологически активные соединения. В последнее время в этом направлении ведутся интенсивные исследования. Это касается при-

менения ферментов для образования пептидной связи, введения и удаления защитных групп, химических методов синтеза пептидной связи. Перечисленным вопросам посвящен недавно вышедший обзор [157].

Известны три типа гидрофильных полимерных реагентов, в той или иной степени пригодных для образования пептидной связи в водных средах: ацилированные полимерная сульфокислота [83] и полимерный тиол [119, 158], а также поли-N-оксисукцинимидные реагенты [97—100].

Смешанный ангидрид полимерного сульфокатионита и уксусной кислоты [83] использовали в реакции с анилином в водной среде pH 3,5—5,5; низкий выход ацетанилида (он не превышал 26%) объясняли гидролитической потерей ацилирующего агента и низкой концентрацией анилина в фазе полимера (3% от концентрации во внешнем растворе).

В случае применения ацетилированного полимерного тиола [119, 158] в реакции аминолита аминов и аминокислот наилучшие результаты (выход до 95%) были получены при pH 10—12, наименьший выход аминов — при pH 7,5. Такая зависимость являлась следствием катализа аминолита ионами OH^- , отмечалось также положительное влияние на ход реакции имидазола, ионов H_2BO_3^- и Ag^+ . Лучшие выходы получали также при использовании стерически незатрудненных аминов, взятых в избытке (2 эквивалента).

В отличие от рассмотренных полимерных реагентов [83, 119, 158], которые фактически применялись лишь как ацетилирующие реагенты — для введения N-ацетильной группы, — гидрофильные поли-N-оксисукцинимидные реагенты нашли практическое использование в синтезе тафтсина [98, 99], фрагмента 26—33 холецистокинина [98, 99], диастереомерных дипептидов [97]. Поли-N-оксисукцинимидные эфиры N-аминаминокислот обладали высокой реакционной емкостью (до 1,8 ммоль/г), хорошо набухали в водных средах [99]. Был произведен расчет констант скоростей конкурирующих реакций аминолита и гидролиза в гетерогенной системе поли-N-оксисукцинимидный реагент — аминокомпонент — водная среда при различных pH для двух реакций пептидообразования [159, 160]. Изменение во времени рассчитанных констант скоростей подтверждает идею клонального распределения реакционных центров [138]. На основе полученных кинетических данных выявлены оптимальные условия проведения аминолита, в частности, оптимум pH при прочих равных условиях находился в области pK аминокислотной группы аминокомпонента.

При использовании гидрофильных поли-N-оксисукцинимидных реагентов для анализа оптической чистоты аминокислот [97] полимерный эфир N-защитной L-аминокислоты вводили в реакцию с анализируемой аминокислотой, взятой в свободном виде; аминолит проводили при pH 8,5—9,0 (выход 55—98%). Удаление N-защитной (трет-бутилоксикарбонильной) группы с полученных дипептидов осуществляли также в водной среде *in situ*. Рацемизации и стереоселективности при использовании данного метода не наблюдали.

Биологически активные пептиды — тафтсин и фрагмент 26—33 холецистокинина [98, 99] синтезировали в водной среде при pH 8—9, как правило, в режиме pH-статирования (аргинин использовали в свободном виде, оксигруппы тирозина и треонина не защищали); фрагмент 26—33 холецистокинина — для контроля метода получали в среде органического растворителя (диметилформамид). Выходы на конденсации при использовании, как водной, так и органической сред, составляли 60—86%.

Отмечалось [98, 99], что в случае применения полимерных реагентов для пептидного синтеза в водной среде, возможны затруднения с очисткой продуктов аминолита от примеси гидролизованых карбоксильных компонентов.

Все рассмотренные выше варианты проведения аминолита не устраняют необходимости в защите помимо α -аминогруппы также и боковой функции трифункциональной аминокислоты при получении полимерного активированного эфира. Однако в этом случае для ее блокировки можно применять защиты, удаляемые одновременно с N $^\alpha$ -защитной группой.

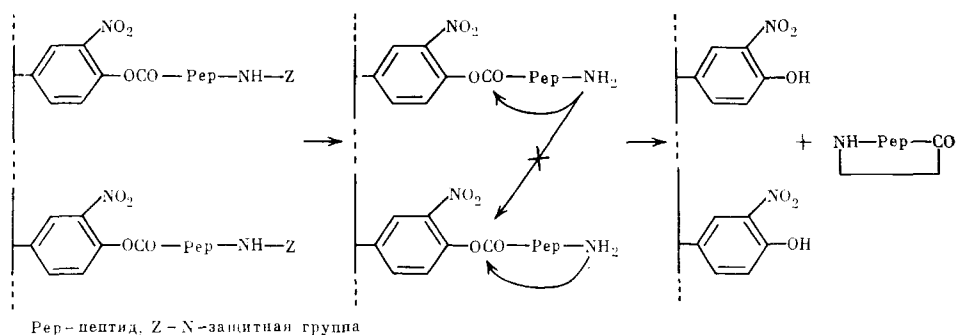
например, *О-трет-Ву*-группу в сочетании с *N^α-Вос*-группой. Такая тактика была использована при синтезе пентагастрина [149].

Качественный контроль за прохождением аминолиза, как в классическом пептидном синтезе, так и в методе полимерных реагентов, обычно осуществляют с помощью тонкослойной хроматографии, прослеживая исчезновение аминокомпонента. При использовании полимерных эфиров, содержащих в ацильной части хромофорную группу, возможна непосредственная количественная оценка степени протекания реакции путем спектрофотометрирования раствора. Таким образом изучали кинетику аминолиза полимерных нерастворимых эфиров *Nps*-аминокислот ($\lambda=380$ нм) [138] и взаимодействие полимерных эфиров *Вос-Ala* с *p*-нитробензиловым эфиром аланина ($\lambda=280$ нм) [110]. В работе [159] при исследовании кинетики аминолиза за увеличением концентрации синтезируемого пептида следили, исследуя пробы надосадочного раствора с помощью жидкостной хроматографии после удаления *N*-защитной группы. Титриметрическое определение непрореагировавшего амина с помощью HClO_4 в диоксане применяли в работе [69].

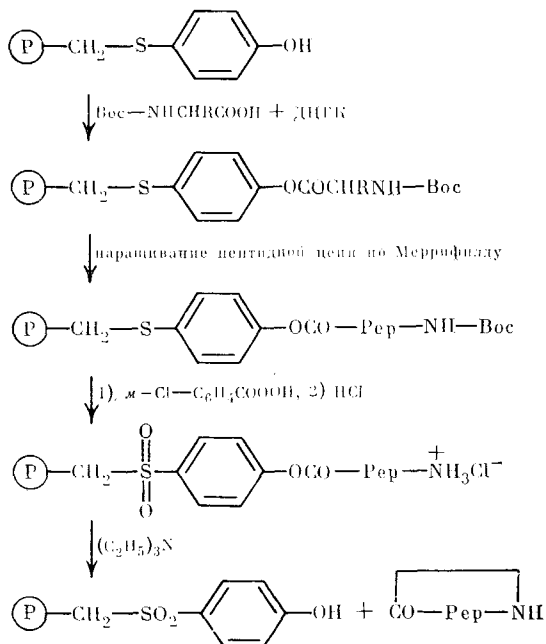
В практическом аспекте метод полимерных реагентов пока еще не нашел широкого применения для решения конкретных синтетических задач. Пептиды, синтезированные этим путем, служили, за некоторыми исключениями, лишь тестами для оценки полезности того или иного полимера-активатора и для отработки методологии. Как правило, все пептидные производные получали ступенчатым наращиванием пептидной цепи с *С*-конца. Помимо многочисленных модельных пептидов были получены некоторые природные биологически активные соединения и их фрагменты. Один из первых известных пептидных гормонов — брадикинин *Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg* — был синтезирован с помощью нитрофенольного полимера [124] с общим выходом 39% (65,3% — считая на защищенный ионапептид) и обладал полной биологической активностью. Хорошие результаты были получены при синтезе пентадекапептидов с применением нерастворимых *N*-оксисукцинимидных полимеров [89, 96, 101], 4-оксн-3-нитробензилполистирола [69, 161] и полимерного *N*-оксибензотриазола [67, 84, 110, 111]. Таким образом синтезированы фрагменты окситоцина и пентагастрин [162, 163], тиролиберин [110], субстраты для свиной эластазы [164], пентапептидный фрагмент карбоксипептидазы *A* быка [96], тафтин и его аналоги [98, 165], люлиберин [67, 166], фрагменты АСТН [161], *С*-концевая половина α -тимозина [111], фрагмент 26—33 холецистокинина [98], лейцин-энкефалин [84]. Удобным оказалось применение полимерных *N*-оксисукцинимидных эфиров *трет*-бутилоксикарбонил-*L*-аминокислот для синтеза диастереомерных дипептидов, используемых в энантиомерном анализе аминокислот [97, 145, 147, 167]. Возможность многократного использования полимерного реагента, легкость стандартизации всех механических операций, а также простота их выполнения являются существенными достоинствами в рутинном анализе. Полимерные активированные эфиры использовались также для ацилирования биогенных и синтетических аминов. Высокие выходы и легкость очистки получаемых амидов позволили успешно применить их в синтезе физиологически активных аминокислотных производных β -фенилэтиламина [168], пенициллинов и цефалоспоринов [166], аминоксил- и пептидилнуклеотидов [169], ациламинофосфоновой кислоты [170].

Циклические пептиды обычно получают путем внутримолекулярной конденсации линейных пептидов, причем для подавления конкурирующих межмолекулярных взаимодействий реакцию проводят в условиях высокого разбавления [47]. Но, как правило, даже в этих условиях образуется заметное количество побочных олигомерных продуктов. Для решения этой проблемы было предложено закреплять пептидные цепи на нерастворимом носителе, после чего проводить внутримолекулярный аминолиз [27]. Полимер в этом случае являлся разбавителем пептидных цепей, так что мономолекулярная реакция должна была стать доминирующим процессом. Возможны два варианта применения полимеров для

этой цели. В первом варианте присоединение пептидной цепи к полимеру осуществляли через боковую функциональную группу [171]. В другом — для циклизации применяли полимер-активатор:



Первая стадия включала в себя получение полимерного активированного эфира N-защитного пептида. Для этой цели применяли исключительно нитрофенольные полимеры [27, 84], а в качестве конденсирующего агента — дициклогексилкарбодимид. Выходы на этой стадии были довольно низкие. Однако следует учесть, что для сведения к минимуму побочных реакций, содержание ацильных остатков в полимере не должно быть высоким. На последующих стадиях N-защитную группу отщепляли в кислотных условиях и депротонировали аминогруппу органическим основанием, после чего полимер выдерживали требуемое время в набухшем состоянии [27]. Таким путем получали ряд простых циклических ди-, три- и тетрапептидов с выходами 60—80% [60]. В работе [31] для получения циклических пептидов вначале синтезировали твердофазным методом линейный пептид, затем активировали сложноэфирную связь в пептидил-полимере, после чего проводили циклизацию вышеуказанным образом [27] (выходы 40—60%):



где Вос-*трет*-бутилоксикарбонил, ДЦГК — дициклогексилкарбодимид, R — боковой радикал аминокислоты, Pep — пептид.

Принцип «селективной активации»² был использован в ряде других

² В иностранной литературе дают разные названия этому принципу: «Safety-catch principle» [176], «a posteriori activation» [177].

работ, как для синтеза циклических пептидов, так и для линейных [172—175]. Применение окислителей для лабильзации пептидил-полимерной связи ограничивает выбор пептидов для синтеза, поскольку в этом случае они не должны содержать легко окисляющиеся аминокислоты (метионин, цистеин, триптофан).

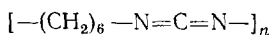
Идея, что пептидные цепи и реагирующие группировки в полимере полностью изолированы друг от друга в пространстве и взаимодействие их весьма ограничено, в ряде работ подверглась критике [43, 176]. Многие факты указывали на то, что даже в случае полимеров с относительно высокой степенью сшивки внутреннюю подвижность полимерных сегментов нельзя исключить [177].

Вопрос о влиянии метода конденсации и природы полимера-активатора на степень рацемизации синтезируемого пептида практически не затрагивался в литературе [178]. Следует различать рацемизацию, происходящую во время активации карбоксильного компонента полимером-активатором и рацемизацию при аминоллизе активированного эфира [139, 179]. Методы образования пептидной связи в этом отношении принято оценивать путем синтеза и анализа (жидкостная хроматография, [73]) «тестового пептида», где в качестве карбоксильного компонента используют легко рацемизирующиеся ацил-аминокислоты [180]. В работе [178] оценили степень рацемизации при синтезе модельного пептида Z-Gly-L-Ala-L-Leu-OBzl (тест Ицумия [181]) методом полимерных реагентов, в качестве которых использовали полимерные эфиры на основе 4-окси-3-нитрополистирола [27, 124] и полимерного N-оксисукцинимиды [89]. Авторы сравнивали ее с рацемизацией, происходящей в случае применения обычных низкомолекулярных конденсирующих агентов. Полимерные эфиры Z-Gly-L-Ala получали с помощью дициклогексилкарбодимиды, реакцию аминоллиза вели в диметоксиметане. Диастереомерный анализ деблокированного трипептида показал, что содержание *D*-изомера в случае N-оксисукцинимидного полимера составило 6,4% и нитрофенольного — 37,4%. При использовании же дициклогексилкарбодимиды и дициклогексилкарбодимиды с N-оксисукцинимидом, как конденсирующих агентов для образования пептидной связи в растворе, количество *D*-изомера составило 24,6 и 2,8% соответственно. Полученные данные в отношении полимеров носят интегральный характер, дифференцированная оценка влияния различных факторов на рацемизацию из данных экспериментов затруднена. Поэтому вышеуказанные данные [178] имеют ценность только в практическом аспекте. Очевидно, например, что N-оксисукцинимидный полимер предпочтительнее нитрофенольного с точки зрения рацемизации. В случае применения полимер-активированных аминокислот с защитными группами уретанового типа вероятность рацемизации, за некоторыми исключениями [182], минимальна. По этой причине в большинстве работ, где использовались такие производные, рацемизацию во время синтеза, либо не оценивали, либо сравнивали синтезированные пептиды с оптически чистыми аутентичными образцами. Обычно рацемизация не наблюдалась. Это обстоятельство позволило использовать N-оксисукцинимидные полимерные реагенты для энантиомерного анализа аминокислот [97, 145, 147, 168].

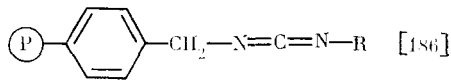
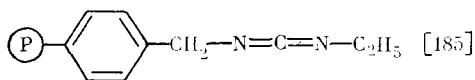
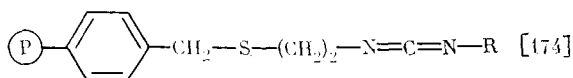
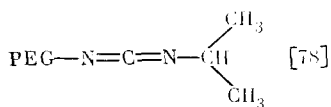
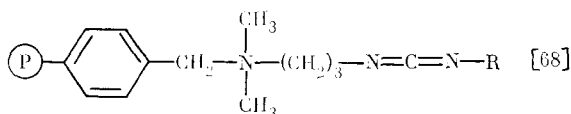
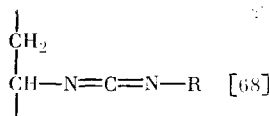
Заслуживает внимания попытка использования оптически активного полимерного 3-оксигидантона для асимметрически селективного пептидного синтеза [114]. В этой работе осуществили два варианта синтеза дипептида Z-Gly-Ala-OC₂H₅, исходя из DL-Ala-OC₂H₅, в первом варианте предварительно получали соответствующий активированный эфир Z-Gly дициклогексилкарбодимидным методом, во втором — использовали полимер в качестве добавки при конденсации тем же методом. В первом случае в полученном дипептиде содержалось 54,6% *L*-аминокислоты, во втором — 72,6%. Такой эффект объясняли взаимодействием *D*-изомера с 3-оксигидантоиновой группой в полимере, которое приводило к возрастанию количества *L*-изомера в фазе раствора.

VI. ПОЛИМЕРНЫЕ КОНДЕНСИРУЮЩИЕ РЕАГЕНТЫ

Применение дегидратирующих агентов позволяет значительно упростить рабочие процедуры, связанные с процессом образования пептидной связи. Чаще всего для этой цели используют карбодиимиды [183]. Полимерный реагент с указанной функцией известен сравнительно давно [184]:



Позднее появился еще ряд сшитых [68, 174, 185, 186] и растворимых [78] полимерных карбодиимидов следующего строения:



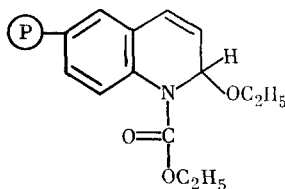
PEG - полиэтиленгликоль, R = алкил

Обычно для их синтеза полимер, содержащий первичные аминогруппы, обрабатывали соответствующим изоцианатом, и полученную полимер-связанную мочевицу подвергали дегидратации. В качестве носителя использовали, как правило, сшитые полистиролы.

Преимущество, достигаемое при использовании таких полимеров, по идее должно заключаться в более полной активации карбоксильного компонента, если конденсирующий агент берется в избытке, причем этот агент и продукты его превращения легко отделить от пептида, находящегося в растворе.

Практика классического пептидного синтеза, а также исследования по кинетике и механизму пептидной конденсации с помощью дициклогексилкарбодиимида показали, что такие реакции протекают по сложным механизмам [187, 188]. При этом часто наблюдается побочная реакция образования N-ацилмочевины, ведущая к потере карбоксильного компонента. Эта побочная реакция происходила и в случае полимерного аналога [186], что делало невозможным его полную регенерацию. Образование симметричных ангидридов [188] также может затруднить очистку конечного продукта.

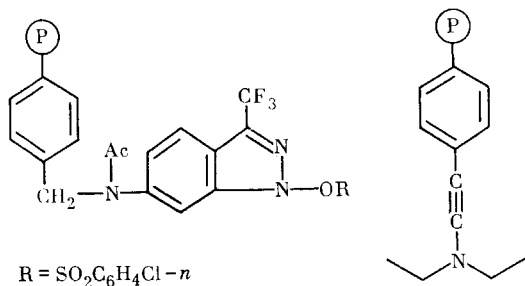
Конденсирующий агент на основе поливинилхинолина [189, 190] активирует селективно карбоксильный компонент, превращая его в смешанный ангидрид этоксиугольной кислоты:



Аналогичный низкомолекулярный реагент, N-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолин, применяли ранее в классическом и твердофазном методах синтеза [130, 131].

Исходя из хлорметилированного полистирола, были получены еще два типа полимерных конденсирующих агентов — полимер-связанные

индазол [191] и инамин [192]:



Сведений о пептидном синтезе с помощью полимерных конденсирующих реагентов имеется мало, в указанных работах приведен синтез лишь нескольких ди-, трипептидов. Тесты на рацемизацию [189, 190] показали, что она находится на уровне низкомолекулярных аналогов. Преимущества таких реагентов более отчетливо вырисовываются при использовании их в других областях органического синтеза, например, для окисления спиртов [193], получения симметричных ангидридов [186], сложных эфиров, в том числе и активированных [184].

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По существу, при использовании любых подходов к пептидному синтезу для полноты прохождения реакции берут избыток одного из реагирующих компонентов. Метод полимерных реагентов обладает тем преимуществом, что позволяет упростить очистку продукта реакции — избыток полимерного реагента и дезацилированного полимера-активатора может быть легко отделен от низкомолекулярных компонентов реакции. Кроме того, большинство известных полимеров-активаторов могут использоваться многократно, они легко регенерируются. Включение активирующего компонента в полимер делает, в частности, его нелетучим, устраняет его токсичность, неприятный запах. Учет специфики микроокружения реакционных групп, возможность моделирования условий высокого разбавления за счет их разбавления позволяет решать ряд задач, трудноразрешимых при помощи других методов пептидного синтеза.

В практике использования любого метода всегда весьма заманчивой кажется перспектива его автоматизации. В отношении метода полимерных реагентов наиболее часто прогнозировался колоночный вариант автоматизации пептидного синтеза [194]. В этом случае каждая стадия образования пептидной связи требует отдельной колонки с полимер-активированным карбоксильным компонентом.

Основное назначение колонки — получать на выходе чистый продукт с количественным выходом. Однако исследования, проведенные в лаборатории авторов [195], показали, что двух-четырёхкратные избытки поли-N-оксисукцинимидных реагентов по отношению к аминокомпоненту и низкие скорости элюции не приводили к желаемому результату: продукт требовал дополнительной очистки. Это связано, по-видимому, с недостаточно высокой скоростью реакции и с отсутствием фракционирования в случае сравнительно низких и близких молекулярных масс растворимых компонентов реакционной смеси. Более значительные избытки полимерного реагента в тривиальных реакциях аминолиза нецелесообразны. Кроме того, автоматизированный метод должен включать еще стадии концентрирования растворов и N-деблокирования, которые довольно сложно автоматизировать. Хотя, например, известны попытки использования полимеров для удаления ряда N-защитных групп: Nps [85], Boc [196], Epos [197, 198]. Приведенные соображения, по-видимому, осложняют автоматизацию метода полимерных реагентов; работ на эту тему в литературе практически не появляется. Осложняющим обстоятельством является также то, что пока не налажен промышлен-

ный выпуск полимерных реагентов, хотя это, как правило, довольно стабильные соединения, удобные в хранении и транспортировке.

Границы применимости метода полимерных реагентов по отношению к синтезу высокомолекулярных пептидов до настоящего времени не определены. Однако, видимо, наиболее целесообразно получать этим методом сравнительно небольшие пептиды, содержащие 15—20 остатков аминокислот (во избежание осложнений диффузионного характера) с последующим сочетанием полученных фрагментов в растворе, при использовании, либо химических, либо ферментативных методов.

За время подготовки обзора к публикации появилась работа Патчорника с соавт., в которой изложены подходы к методологии пептидного синтеза с использованием «посредника» (Mediator Methodology) в двухполимерной системе [199], обзор тех же авторов по полимерным трансферным реагентам [200], а также предложены полимерные активированные эфиры на основе высокомолекулярного 1-окси-2-пирролидона [201].

ЛИТЕРАТУРА

1. Коршак В. В., Штильман М. И. Полимеры в процессах иммобилизации и модификации природных соединений. М.: Наука, 1984.
2. Реакции на полимерных подложках в органическом синтезе/Под ред. Ходжа П., Шеррингтона М.: Мир, 1983.
3. Иммобилизованные ферменты, т. 1, 2/Под ред. Березина И. В., Антонова В. К., Мартиника К. М.: Изд-во МГУ, 1976.
4. Mathur N. K., Narang S. K., Williams R. E. Polymers as Aid in Organic Chemistry. N. Y.: Acad. Press, 1980.
5. Туркова Я. Аффинная хроматография. М.: Мир, 1980.
6. Мясоедова Г. В., Саввин С. Б. Хелатообразующие сорбенты. М.: Наука, 1984.
7. Enzyme Engineering, v. 6/Ed. by Chibata I., Fukui S., Wingard L. B. N. Y.: Plenum Publ. Corp., 1982.
8. Введение в прикладную энзимологию/Под ред. Березина И. В., Мартиника К. М.: Изд-во МГУ, 1982.
9. Суровцев В. И. Успехи биол. химии, 1975, т. 80, с. 370.
10. Егоров Н. С., Ландау Н. С., Борман Е. А., Котова И. Б. Прикладная биохимия и микробиол., 1984, т. 20, с. 579.
11. Yoshii F., Kaetsu I. Appl. Biochem. Biotechnol., 1983, v. 8, p. 115.
12. Биоспецифическая аффинная сорбция и ее применение в иммунологии/Под ред. Стригиной В. А. Уфа: Изд-во Башк. филиала АН СССР, 1978.
13. Иммуносорбенты в очистке белков/Под ред. Руослахти Э. М.: Медицина, 1979.
14. Васильев А. Е. В кн.: Химия и технология медико-биологических полимеров, т. 18. М.: Изд-во ВИНТИ, 1981, с. 3.
15. Wingard L. B. Fed. Proc., 1983, v. 42, p. 271.
16. Kopecek J., Ulbrich K. Progr. Polym. Sci., 1983, v. 9, p. 1.
17. Петров Р. В., Хаитов Р. М., Атауллаханов Р. И. Иммуногенетика и искусственные антигены. М.: Медицина, 1983.
18. Iwao T. Tetrahedron, 1984, v. 40, p. 269.
19. Belikov V. M., Latov V. K., Fastovskaya M. I. J. Mol. Catalysis, 1980, p. 443.
20. James A. Polymer Preprints, 1983, v. 24, № 2, p. 348.
21. Ямсков И. А., Тихонов В. Е., Даванков В. А., Вельц Л. А., Ваучский Ю. П. Высокмолек. соединения, 1980, т. 22А, № 1, с. 71.
22. Frechet J. M. J. Tetrahedron, 1981, v. 37, p. 663.
23. Hojo M. J. Synthetic Org. Chem. Japan, 1984, v. 42, p. 635.
24. Akelan A., Cherrington D. C. Chem. Rev., 1981, v. 81, p. 557.
25. Hodge P. Chem. Brit., 1978, v. 14, № 5, p. 237.
26. Merrifield R. B. Adv. Enzymol., 1969, v. 32, p. 121.
27. Fridkin M., Patchornik A., Katchalski E. J. Amer. Chem. Soc., 1965, v. 87, p. 4646.
28. Zhdanov R. I., Zhanodarova S. M. Synthesis, 1975, p. 222.
29. Guthrie R. D., Jenkins A. D., Stehlicek J. J. Amer. Soc., C, 1971, p. 2690.
30. Rothe M., Dunkel W. J. Polym. Sci., B, Polym. Lett., 1967, v. 5, p. 589.
31. Flanigan E., Marshall G. R. Tetrahedron Letters, 1970, p. 2403.
32. Harrison I. T., Harrison S. J. Amer. Chem. Soc., 1967, v. 89, p. 5723.
33. Kraus M. A., Patchornik A. Ibid., 1971, v. 93, p. 7325.
34. Patchornik A., Kraus M. A. Ibid., 1970, v. 92, p. 7587.
35. Kraus M. A., Patchornik A. Israel. J. Chem., 1971, v. 9, p. 269.
36. Crowley J. I., Rapoport H. J. Amer. Chem. Soc., 1970, v. 92, p. 6363.
37. Leznoff C. C., Wong J. Y. Canad. J. Chem., 1973, v. 51, p. 3756.
38. Leznoff C. C., Wong J. Y. Ibid., 1972, v. 50, p. 2892.
39. Yaroslavsky C., Patchornik A., Katchalski E. Tetrahedron Letters, 1970, p. 3629.
40. Schultenberg H., Klump G., Kaczmar U., Turner R., Schulz R. C. Polymer Preprint Amer. Chem. Soc., 1970, v. 13, p. 866.
41. Overberger C. G., Sammes K. N. Angew. Chem. Int. Ed., 1974, v. 13, p. 99.
42. Patchornik A., Kraus M. A. Pure Appl. Chem., 1975, v. 43, p. 503.

43. Патчорник А., Фридкин М., Качальский Э. В кн.: Химия полипептидов/Под ред. Катсянниса П. М.: Мир, 1977, с. 347.
44. Kraus M. A., Patchornik A. Macromol. Reviews, 1980, № 15, p. 55.
45. Perspectives in Peptide Chemistry/Ed by Eberle H., Geiger R., Wieland T. Basel: S. Karger, 1981, p. 118.
46. Боданский М. В кн.: Пептиды/Под ред. Гросс Э., Майнхофер И. М.: Мир, 1983, с. 135.
47. Шредер Э., Любке К. Пептиды т. 1 М.: Мир, 1967.
48. Synthese von Peptiden. Hrsg. von Wunsch E. Stuttgart: Thieme-Verlag, 1974, B. 1—2.
49. См. ссылку [46], с. 135.
50. Merrifield R. B. J. Amer. Chem. Soc., 1963, v. 85, p. 2149.
51. Merrifield R. B., Stewart J. M., Jernberg N. Anal. Chem., 1966, v. 38, p. 1905.
52. Hruby V. J., Barstow L. E., Linhart T. Ibid., 1972, v. 44, p. 343.
53. См. [43], с. 429.
54. Wunsch E. Angew. Chem. Int., Ed., 1971, v. 10, p. 786.
55. Bayer E., Mutter M. Nature, 1972, v. 237, p. 512.
56. Склярлов Л. Ю., Горбунов В. И., Шукина Л. А. Журн. общей химии, 1966, т. 36, с. 2220.
57. Кассиди Г. Дж., Кун К. А. Окислительно-восстановительные полимеры. Л.: Химия, 1967.
58. Артамонов А. А. Вопросы химии и химической технологии, 1974, вып. 32, с. 58.
59. Коршак В. В. Методы высокомолекулярной органической химии, т. 1, М.: Изд-во АН СССР, 1953.
60. Fridkin M., Patchornik A., Katchalski E. Amer. Chem. Soc. Polym. Prepr. 1968, v. 9, № 1, p. 221.
61. Wieland T., Birr C. Angew. Chem. Int. Ed., 1966, v. 5, p. 310.
62. Sahni M. K., Sharma I. K., Narang C. K., Mathur M. K. Synth. Commun., 1977, v. 7, p. 57.
63. Losse G., Madlung C., Lorenz P. Chem. Ber., 1968, B. 101, S. 1257.
64. Inukai N., Nakano K., Murakami M. Bull. Chem. Soc. Japan, 1968, v. 41, p. 182.
65. Losse G., Neubert K. Tetrahedron Letters, 1970, p. 1267.
66. Packham D. I. J. Chem. Soc., 1964, p. 2617.
67. Fridkin M., Hazum E., Kalir R., Rotman M., Koch Y. J. Solid-Phase Biochem., 1977, v. 2, p. 175.
68. Fridkin M., Patchornik A., Katchalski E. In: Peptides 1969, North-Holland, Amsterdam, p. 164.
69. Kalir R., Fridkin M., Patchornik A. Eur. J. Biochem., 1974, v. 42, p. 151.
70. Williams R. E. J. Polym. Sci. A-1, 1972, v. 10, p. 2123.
71. Arshady R., Kenner G. W., Ledwith A. Ibid., 1974, v. 12, p. 2017.
72. Pansé G. P., Laufer D. A. Tetrahedron Letters, 1970, p. 4181.
73. Cohen B. J., Karoly-Hafeli H., Patchornik A. J. Org. Chem., 1984, v. 49, p. 922.
74. Рогожин С. В., Давидович Ю. А., Андреев С. М., Мрачковская Т. А. Биоорганическая химия, 1978, т. 4, с. 599.
75. Рогожин С. В., Давидович Ю. А., Андреев С. М., Юртанов А. И. Докл. АН СССР, 1973, т. 211, с. 1356.
76. Teramoto T., Narita M., Okawara M. J. Polym. Sci.: Polym. Chem. Ed., 1977, v. 15, p. 1369.
77. Sela M., Fuchs S., Arnon R. Biochem. J., 1962, v. 85, p. 223.
78. Mutter M. Tetrahedron Letters, 1978, p. 2839.
79. Mutter M. Ibid., 1978, p. 2843.
80. Wieland T., Birr C. Chimia, 1967, v. 21, p. 581.
81. Losse G., Barth A. Z. Naturforsch., 1964, B. 19b, S. 264.
82. Barth A. Lieb. Ann. Chem., 1965, B. 683, S. 216.
83. Laird R. M., Spence M. J. J. Appl. Chem. Biotechnol., 1977, v. 27, № 4, p. 214.
84. Patchornik A., Fridkin M., Katchalski E. In: Peptides 1967, Amsterdam: North-Holland Publ., 1969, p. 91.
85. Stern M., Warshawsky A., Fridkin M. Int. J. Pept. Protein Res., 1981, v. 17, p. 531.
86. Anderson G. W., Zimmerman J. E., Gallahan F. M. J. Amer. Chem. Soc., 1964, v. 86, p. 1839.
87. König W., Geiger R. Chem. Ber., 1970, B. 103, S. 788.
88. König W., Geiger R. In: Chemistry and Biology of Peptides/Ed. by Meinhofer J. Michigan: Publ. Inc. Ann Arbor, 1972, p. 343.
89. Laufer D. A., Chapman T. M., Marlborough D. I., Vaidya V. M., Blout E. R. J. Amer. Chem. Soc., 1968, v. 90, p. 2626.
90. Akiyama M., Narita M., Okawara M. J. Polym. Sci., A-1, 1969, v. 7, p. 1299.
91. Akiyama M., Yanagisawa Y., Okawara M. Ibid., 1969, v. 7, p. 1905.
92. Narita M., Teramoto T., Okawara M. Bull. Chem. Soc. Japan, 1971, v. 44, p. 1084.
93. Narita M., Teramoto T., Okawara M. Ibid., 1972, v. 45, p. 3149.
94. Akiyama M., Shimizu K., Narita M. Tetrahedron Letters, 1976, p. 1015.
95. Чернышев В. П., Лозинский В. И., Филиппович Е. И., Евстигнеева Р. П. А. с. СССР 342865 (1970). Опубликовано в Б. И., 1972, № 20, с. 73.
96. Fridkin M., Patchornik A., Katchalski E. Biochemistry, 1972, v. 11, p. 466.
97. Самойлова Н. А., Андреев С. М., Цырякин В. А., Давидович Ю. А., Рогожин С. В. Биоорганическая химия, 1978, т. 4, с. 725.

98. Самойлова Н. А., Андреев С. М., Галкин О. М., Давидович Ю. А., Рогожин С. В. Там же, 1981, т. 7, с. 1627.
99. Самойлова Н. А., Андреев С. М., Галкин О. М., Давидович Ю. А., Рогожин С. В. IV Всесоюзн. конф. «Методы получения и анализа биохимических препаратов». Тез. докл. Рига, 1982, с. 45.
100. Самойлова Н. А., Давидович Ю. А., Рогожин С. В. А. с. СССР 1118636 (1982). Опубликовано в Б. И., 1984, № 38, с. 67.
101. Рогожин С. В., Давидович Ю. А., Андреев С. М., Юртанов А. И. Докл. АН СССР, 1973, т. 212, с. 108.
102. Davidovich Yu. A., Gut V. Collect. Czechoslov. Chem. Commun., 1976, v. 41, p. 1805.
103. Davankov V. A., Tsyurupa M. P., Rogozhin S. V. Angew. Chem. Macromol., 1976, B. 53, S. 19.
104. Tsyurupa M. P., Davankov V. A., Rogozhin S. V. J. Polym. Sci.: Symposium, 1974, № 43, p. 189.
105. Спиринов Ю. Л., Яцимирская Т. С. Высокомолек. соединения, 1976, т. 18, с. 755.
106. Николаев А. Ф., Бондаренко В. М., Шакалова Н. К. Там же, 1973, т. 15Б, с. 737.
107. Hoffman E., Faiferman I. J. Org. Chem., 1964, v. 29, p. 748.
108. Guarneri M., Ferroni R., Giori P., Benassi C. A. См. [88], p. 213.
109. Guarneri M., Giori P., Banassi C. A. Tetrahedron Letters, 1971, p. 665.
110. Kalir R., Warshawsky A., Fridkin M., Patchornik A. Europ. J. Biochem., 1975, v. 59, p. 55.
111. Mokotoff M., Patchornik A. Int. J. Peptide Protein Res., 1983, v. 21, p. 145.
112. Neunhoeffer O., Gottschlich R. Lieb. Ann. Chem., 1970, B. 736, S. 100.
113. Veronese A. G., Cavicchioni G., Giori P., Quaglio M. P., Guarneri M. Gazzeta Chim. Ital., 1976, v. 106, p. 179.
114. Teramoto T., Kurosaki T. Amer. Chem. Soc. Polym. Prep., 1979, v. 20, p. 830.
115. Manecke G., Haake E. Naturwiss., 1968, B. 55, S. 343.
116. Jakubke H. D., Voigt A. Chem. Ber., 1966, B. 99, S. 2419.
117. Nambu Y., Endo T., Okawara M. J. Polym. Sci.: Polym. Chem. Ed., 1980, v. 18, p. 2793.
118. Fukuda H., Endo T., Suyama M. Ibid., 1978, v. 16, p. 457.
119. Gosselet M., Seville B., Buvet E. Europ. Polym. J., 1979, v. 15, p. 1079.
120. And T. L., Harwood J. J. Makromol. Sci. Chem., 1973, v. A-7, p. 1079.
121. Shambhu M. B., Digenis G. A. Tetrahedron Letters, 1973, p. 1627.
122. Shambhu M. B., Digenis G. A. Chem. Commun., 1974, p. 619.
123. Anderson G., Zimmerman I., Callahan F. J. Amer. Chem. Soc., 1966, v. 88, p. 1338.
124. Fridkin M., Patchornik A., Katchalski E. Ibid., 1968, v. 90, p. 2953.
125. [47], с. 158.
126. Рогожин С. В., Давидович Ю. А., Самойлова Н. А., Миронова Н. В., Юртанов А. И., Андреев С. М. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1975, с. 428.
127. Gross H., Bilk L. Tetrahedron, 1968, v. 24, p. 6935.
128. Anderson G. W., Callahan F. M., Zimmerman J. E. J. Amer. Chem. Soc., 1967, v. 89, p. 178.
129. Anderson G. W. Synthesis, 1975, p. 456.
130. Belleau B., Malek G. J. Amer. Chem. Soc., 1968, v. 90, p. 1651.
131. Sipos F., Gaston D. W. Synthesis, 1971, p. 321.
132. Sakakibara S., Inukai N. Bull. Chem. Soc. Japan, 1965, v. 38, p. 1979.
133. Андреев С. М., Павлова Л. А., Давидович Ю. А., Рогожин С. В. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1980, с. 1078.
134. Wilchek M., Fridkin M., Patchornik A. Analyt. Chem., 1970, v. 42, p. 275.
135. Patchornik A., Ehrlich-Rogozinski S., Fridkin M. In: Peptides 1974/Ed. by Wolman Y. N. Y.: John Wiley, 1975, p. 257.
136. Gut V. Collect. Czechoslov. Chem. Commun., 1975, v. 40, p. 129.
137. Rudinger J. См. [135], p. 211.
138. Gut V., Davidovich Yu. A. Collect. Czechoslov. Chem. Commun., 1976, v. 41, p. 780.
139. Kemp D. S. In: Peptides 1971/Ed. by Nesvadba H. Amsterdam: North-Holland Publ., 1973, p. 1.
140. Heusel G., Bovermann G., Gohring W., Jung G. Angew. Chem. Int. Ed., 1977, v. 16, p. 642.
141. Hirschmann R. In: Peptides 1968. Amsterdam: North-Holland Publ., 1968, p. 139.
142. Weygand F., Steglich W., Bjarnasson J., Akhtar R., Khan N. M. Tetrahedron Letters, 1966, p. 3483.
143. Kemp D. S., Wang S.-W., Rebek J., Mollan R. C., Banquer C., Sabramanyan G. Tetrahedron, 1974, v. 30, p. 3955.
144. Kemp D. S., Bernstein Z. W., McNeil G. N. J. Org. Chem., 1974, v. 39, p. 2831.
145. Andreev S. M., Tsiryapkin V. A., Samoilova N. A., Mironova N. V., Davidovich Yu. A., Rogozhin S. V. Synthesis, 1977, № 5, p. 303.
146. Bodanszky M., Klausner Y. S., Bodanszky A. J. Org. Chem., 1975, v. 40, p. 1507.
147. Андреев С. М., Цыряпкин В. А., Давидович Ю. А., Самойлова Н. А., Рогожин С. В. Биоорг. химия, 1976, т. 2, с. 725.
148. Рогожин С. В., Давидович Ю. А., Андреев С. М., Миронова Н. В., Юртанов А. И. Изв. АН СССР, Сер. хим., 1974, с. 1868.
149. Рогожин С. В., Давидович Ю. А., Андреев С. М., Юртанов А. И., Миронова Н. В. IV Международ. симп. по химии кремнеорганических соединений. М., 1975. Тез. докл. с. 46.
150. Ruhlmann K. J. Prakt. Chem., 1959, B. 4, S. 86.

151. Schnabel E., Oberdorf A. См. [141], p. 261.
152. Pierce A. E. Silylation of Organic Compounds. Rockford: Pierce Chemical Comp., v. 3, 1968.
153. Kricheldorf H. Lieb. Ann. Chem., 1972, B. 763, S. 17.
154. Birkofer L., Muller F. См. [141], p. 151.
155. Klebe J. F., Finkbeiner H., White D. M. J. Amer. Chem. Soc., 1966, v. 88, p. 3390.
156. Kricheldorf H. R., Stengele E., Regel W. Lieb. Ann. Chem., 1975, S. 1379.
157. Самойлова Н. А., Давидович Ю. А., Рогожин С. В. Биоорган. химия, 1984, т. 10, с. 725.
158. Gosselet M., Seville B. J. Chem. Technol. Biotechnol., 1981, v. 31, № 6, p. 341.
159. Самойлова Н. А., Давидович Ю. А., Рогожин С. В. Биоорган. химия, 1983, т. 9, с. 358.
160. Самойлова Н. А., Цыряпкин В. А., Давидович Ю. А., Рогожин С. В. IV Всесоюз. симп. «Химия белков и пептидов». Рига, 1983. Тез. докл., с. 228.
161. Stern M., Kalir R., Patchornik A., Warshawsky A., Fridkin M. J. Solid-Phase Biochemistry, 1977, v. 2, p. 131.
162. Рогожин С. В., Давидович Ю. А., Андреев С. М., Самойлова Н. А., Миронова Н. В., Юртанов А. Н. III Всесоюз. симп. «Химия белков и пептидов». Киев, 1974. Тез. докл., с. 127.
163. Rogozhin S. V., Davidovich Yu. A., Andreev S. M. USSR-FRG Symp. on Chemistry of Peptides and Proteins. Dushanbe, 1976, Abstracts, p. 32.
164. Atlas D., Kalir R., Patchornik A. FEBS Letters, 1975, v. 58, № 1, p. 179.
165. Fridkin M., Stabinsky Y., Zakuth V., Spirer Z. Biochim. Biophys. Acta, 1977, v. 496, p. 203.
166. Fridkin M., Kalir R., Patchornik A. In: Peptides: Chemistry, Structure and Biology/Ed. by Walter R. Ann Arbor Sci., Publ., 1975, p. 395.
167. Цыряпкин В. А., Андреев С. М., Давидович Ю. А., Самойлова Н. А., Беликов В. М., Рогожин С. В. Докл. АН СССР, 1975, т. 223, с. 1156.
168. Давидович Ю. А., Бутаева В. Н., Рогожин С. В. Изв. АН СССР, Сер. хим., 1975, с. 2291.
169. Самойлова Н. А., Давидович Ю. А., Рогожин С. В. Там же, 1981, с. 1614.
170. Белов Ю. П., Даванков В. А., Цыряпкин В. А., Рогожин С. В. Там же, 1975, с. 1619.
171. Скляр Л. Ю., Шапкова М. Журн. общей химии, 1969, т. 39, с. 2778.
172. Bondi E., Fridkin M., Patchornik A. Israel J. Chem., 1968, v. 6, p. 22.
173. Marshall D. L., Liener I. E. J. Org. Chem., 1970, v. 35, p. 867.
174. Wieland Th., Birr Ch., Flekstein P. Lieb. Ann. Chem., 1972, B. 756, S. 14.
175. Kenner G. W., McDermott J. R., Sheppard R. C. Chem. Commun., 1971, p. 636.
176. Wieland Th. In: Peptides 1969/Ed. by Scoffone E. Amsterdam: North-Holland. Publ., 1971, p. 164.
177. Crowley J. I., Rapoport H. Acc. Chem. Res., 1976, v. 9, p. 135.
178. Lauren D. R., Williams R. E. Tetrahedron Letters, 1972, p. 2665.
179. Шукина Л. А. В кн.: Современные проблемы химии пептидов и белков. М.: Наука, 1969, с. 43.
180. См. [48], v. 2, p. 426.
181. Izumiya M., Muraoko M., Aoyagi H. Bull. Chem. Soc. Japan, 1971, v. 44, p. 3391.
182. Williams M., Young G. J. Chem. Soc., 1964, p. 3701.
183. Klausner Y. S., Bodansky M. Synthesis, 1972, p. 453.
184. Wolman J., Kivity S., Frankel M. Chem. Commun., 1967, p. 629.
185. Ito H., Takamutsu N., Ichikizaki I. Chem. Letters, 1975, p. 577.
186. Weinshenker N. M., Shen C. M. Tetrahedron Letters, 1972, p. 3281.
187. DeTar D. R., Silverstein R. J. Amer. Chem. Soc., 1966, v. 88, p. 1013.
188. Rebek J. См. [135], p. 27.
189. Brown J., Williams R. E. Canad. J. Chem., 1971, v. 49, p. 3765.
190. Williams R. E., Brown J., Lauren D. R. Amer. Chem. Soc. Polym. Preprints, 1972, v. 13, p. 823.
191. Kusuo H., Atsuko M., Nobuo C. Pept. Chem., 1981, (Publ 1982), v. 19, p. 712.
192. Moore J. A., Kennedy J. J. Macromol. Sci. Chem., 1979, v. 13A, p. 461.
193. Weinshenker N. M., Shen C. M. Tetrahedron Letters, 1972, p. 3285.
194. Patchornik A. Amer. Chem. Soc. Polym. Preprints, 1976, v. 17, p. 213.
195. Андреев С. М. Дис. на соискание уч. ст. канд. хим. наук, М.: ИХЭОС, 1978.
196. Gray C. J., Khoujah A. M. Tetrahedron Letters, 1969, p. 2647.
197. Arshady R., Atherton F., Sheppard R. C. Ibid., 1979, p. 1521.
198. Carpino L. A., Williams J. R., Lopusinski A. Chem. Commun., 1978, p. 450.
199. Shai Y., Jacobson K. A., Patchornik A. J. Amer. Chem. Soc., 1985, v. 107, p. 4249.
200. Patchornik A., Nov E., Jacobson K. A., Shai Y. ACS Symp. Ser., 1986, v. 308, p. 231.
201. Akiyama M., Shimizu K., Aiba S., Katoh H. Bull. Chem. Soc., Japan, 1985, v. 58, p. 1421.

Институт элементоорганических соединений
им. А. Н. Несмеева
АН СССР, Москва