

Особенности синтеза цистеинсодержащих пептидов

Е.В.Кудрявцева, М.В.Сидорова, Р.П.Евстигнеева

Российский кардиологический научно-производственный комплекс Министерства здравоохранения Российской Федерации

121552 Москва, 3-я Черепковская ул., 15-а, факс (095) 414–6786

Московская академия тонкой химической технологии им. М.В.Ломоносова

117571 Москва, просп. Вернадского, 86, факс (095) 430–7983

Рассмотрен и систематизирован материал по защитным группам тиольной функции цистеина и методам замыкания дисульфидных связей, используемых в современной пептидной химии. Описаны преимущества и недостатки защитных групп, реагентов циклизации, а также побочные реакции, возможные при их применении. Библиография — 119 ссылок.

Оглавление

I. Введение	611
II. Защитные группы тиольной функции	611
III. Методы создания дисульфидных связей	619
IV. Заключение	628

I. Введение

Среди пептидов и белков, обнаруженных в природе, соединения, содержащие цистеин, составляют особую группу. Дисульфидные мостики между парами цистеиновых остатков играют важную роль в стабилизации третичной и четвертичной структур белковых молекул, обеспечивают их фиксированную пространственную ориентацию, придавая тем самым уникальную форму, необходимую для осуществления биологических функций. В низкомолекулярных пептидах все виды нековалентных взаимодействий ослаблены, поэтому дисульфидные связи исключительно важны для стабилизации структуры молекулы и воспроизведения ее биологической активности.

В настоящее время известны многие пептиды, которые содержат один, два и более дисульфидных мостиков и принимают участие в регуляции физиологических процессов организма.^{1,2} Синтетические пептиды, в том числе и содержащие связи S—S, находят широкое применение во многих областях медицины и фармакологии.^{3,4} Поэтому методы

создания дисульфидных мостиков имеют большое практическое значение.

Современная химия пептидов располагает широким набором методов синтеза, очистки и анализа. Это позволяет получать практически любые пептиды, их аналоги и даже небольшие белки. Однако синтез пептидов, содержащих дисульфидные связи, до сих пор представляет сложную задачу из-за низких выходов как раз на стадии их замыкания. Это зачастую перечеркивает все усилия, потраченные на синтез линейных предшественников. Выяснение причин подобных неудач часто остается за рамками синтетических исследований. Обзоры, посвященные синтезу пептидов, имеющих дисульфидные мостики, немногочисленны и часто освещают лишь отдельные аспекты этой проблемы.

В настоящем обзоре обсуждаются современные подходы к синтезу цистеинсодержащих пептидов. Рассмотрены группы, используемые для защиты тиольной функции, способы их удаления и возможные побочные реакции, а также наиболее распространенные реагенты для замыкания дисульфидных связей и их особенности.

II. Защитные группы тиольной функции

В ходе синтеза пептидов сильно нуклеофильная тиольная группа цистеина должна быть обязательно блокирована. К защитным группам SH-функций цистеина предъявляются те же требования, что и к защитным группам боковых функций аминокислот: устойчивость в условиях наращивания пептидной цепи и деблокирования α -аминогрупп, сохранение конфигурации асимметрического центра в ходе синтеза. В табл. I приведены защитные группы тиольной функции, которые успешно использовались для синтеза пептидов. Выбор защитной группы определяется способом последующей циклизации. В зависимости от условий деблокирования цистеина можно получить свободные тиолы или дисульфиды. Защитные группы за счет различия их химической стабильности должны, в случае необходимости, позволять избирательно создавать две и более дисульфидные связи.

Е.В.Кудрявцева. Кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории синтеза пептидов РКНПК МЗ РФ.

Область научных интересов: синтез и изучение свойств природных пептидов и их аналогов. Телефон: (095) 414–6716

М.В.Сидорова. Кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник той же лаборатории. Телефон: (095) 414–6716.

Область научных интересов: синтез и изучение свойств природных пептидов и их аналогов.

Р.П.Евстигнеева. Член-корреспондент РАН, профессор кафедры химии и технологии тонкого органического синтеза МАТХТ. Телефон: (095) 434–8678.

Область научных интересов: синтез и изучение свойств биологически активных соединений.

Дата поступления 30 октября 1997 г.

Таблица 1. Защитные группы тиольной функции цистеина, используемые в пептидном синтезе.

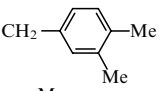
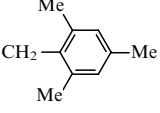
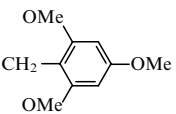
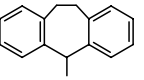
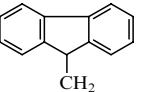
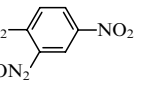
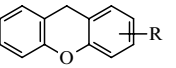
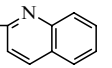
Название ^a	Формула защитной группы	Условия, в которых защитная группа устойчива ^b	Условия удаления защитной группы	Ссылки
Бензил (Bzl)	CH ₂ Ph	HF, 0°C; Tl(III); B RSCl; H ₂ /Pd; HBr/AcOH	Na/NH ₃ (ж); HF, 25°C, 30 мин	2, 6–8
Метилбензил (MeB или Mbzl)	CH ₂ C ₆ H ₄ Me- <i>p</i>	TFA; Ag(I); RSCl; B	HF/MeOPh, 0°C, 60 мин; ^c Tl(III)	6–9
3,4-Диметилбензил (Dmb)		TFA; Ag(I); B; RSCl	HF/MeOPh, 0°C, 10 мин	8
2,4,6-Триметилбензил (Tmb)		TFA, 23°C, 2 ч	HF/MeOPh, 0°C, 30 мин; TFA, Δ, 1 ч	10
4-Метоксибензил (Mob)	CH ₂ C ₆ H ₄ OMe- <i>p</i>	B; RSCl; I ₂	HF, 0°C; Hg(II); Ag(I); Tl(III); (BrC ₆ H ₄) ₃ N; TFA : CH ₂ Cl ₂ (1 : 1), 25°C ^c	6–8, 10–13
2,4,6-Триметоксибензил (Tmob)		B; Nu	30% TFA/скэвенджеры; ^d I ₂ ; Tl(III), HF	2, 7, 14, 15
<i>tert</i> -Бутил (Bu ^t)	Bu ^t	TFA; HF, 0°C; B; I ₂ ; Ag(I)	HF, 20°C; HF/скэвенджеры; ^d 0°C; Hg(II); NpsCl; Tl(III)	2, 12, 16
Дифенилметил (или бензгидрил) (Dpm)	CHPh ₂	TFA; I ₂ ^c ; Hg(II) ^c ; Ag(I) ^c	TFA/MeOPh, Δ; HF; Na/NH ₃ (ж); HBr/AcOH; (SCN) ₂ ; NpsCl	5, 17
Бис(4-метоксифенил)метил (Ddm)	CH(C ₆ H ₄ OMe- <i>p</i>) ₂	HCl/AcOH; ^c B; Tl(III)	TFA, 70°C, 2 ч; TFA/MeOPh, 10 мин; TFA : PhOH (85 : 15), 25°C, 2 ч	1, 5, 8
Трифенилметил (Trt)	CPh ₃	B; Nu	TFA/скэвенджеры; ^d Hg(II); Ag(I); I ₂ ; Tl(III); RSCl	1, 2, 5–8, 18
Трис(4-метоксифенил)-метил (TMTTr)	C(C ₆ H ₄ OMe- <i>p</i>) ₃	B; Nu	TFA (разбавл.); I ₂ (1–2 экв.), 25°C, 15–30 мин	2, 7
Пиридилдифенилметил	(Ph) ₂ C- 	B	Hg(II) pH 4; Zn/AcOH; электролитическое восстановление	19
Дибензосуберил		HCl(газ) в органических растворителях; TFA; B	HBr/AcOH; ^c HF	6
Флуоренилметил (Fm)		HF; TFA; Tl(III) или I ₂ (стабильна в течение 1 ч)	NH ₃ /MeOH; Pip	5, 20
2-(2,4-Динитрофенил)этил (Dnpe)	(CH ₂) ₂ - 	HF; I ₂ ; Tl(III); TFA; TFMSA	Pip	21
β,β-Дизетоксикарбонилэтил (Dce)	CH ₂ CH(COOEt) ₂	HBr/AcOH	1 N KOH, 20°C, 5–10 мин	1
Адамантил (Ad)		TFA ⁱ	Tl(III); 1 M TFMSA/PhSMe в TFA, 0°C	13, 22, 23
Ксантенил, R = H (Xan), R = 2-MeO (2-Moxan), R = 3-MeO (3-Moxan)		B	Разбавленные кислоты в присутствии скэвенджеров; ^d I ₂ ; Tl(III)	24
2-Хинолинилметил	H ₂ C- 	АН	FeCl ₃ /DMF/H ₂ O; FeCl ₂ /DMF/H ₂ O; CuCl ₂ /DMF/H ₂ O	25
Ферроценилметил (Fcm)	C ₅ H ₅ FeC ₅ H ₄ CH ₂	NaOH; NaOMe; I ₂ ; N ₂ H ₄ ; Pip	TFA; (SCN) ₂ ; RSCl; Hg(II); Ag(I)	26

Таблица 1 (продолжение).

Название ^a	Формула защитной группы	Условия, в которых защитная группа устойчива ^b	Условия удаления защитной группы	Ссылки
2-Ферроценилпропан-2-ил (Fc)	$C_5H_5FeC_5H_4CMe_2$	NaOH; NaOMe; I ₂ ; N ₂ H ₄ ; Pip	TFA; (SCN) ₂ ; RSCl; Hg(II); Ag(I)	26
(η ⁵ -Циклогекса-3,5-диенил)три-карбонилжелезо		NaOH/Me ₂ CO	HBFe ₄ /CHCl ₃	27
Тетрагидропиранил (Thp)		B	0.5 N AgNO ₃ , 0°C; TFA; HBr/TFA; (SCN) ₂	5, 6, 8
Изобутоксиметил (<i>i</i> -Bom)	CH ₂ OBu ^t	B	TFA; HCl/AcOH; Hg(II)	5, 6, 8
<i>n</i> -Хлорфеноксиметил	CH ₂ OC ₆ H ₄ Cl- <i>p</i>	B	TFA	5
Бензилтиометил (Btm)	CH ₂ SCH ₂ Ph	B	HF; Hg(AcO) ₂ /HCOOH (80%), 25°C, 20 мин	5, 6, 8
Фенилтиометил	CH ₂ SPh	B	HF; Hg(II)	5
Ацетамидометил (Acm)	CH ₂ NHCOMe	HF, 0°C; B; H ₂ /Pd	Ag(I); Hg(II); I ₂ ; Tl(III); AgBF ₄ ; RSCl	2, 5, 6, 8, 18, 28, 29
Триметилацетамидометил (Tasm)	CH ₂ NHCOBu ^t	HF; TFA; 1 M TFMSA; B	Hg(AcO) ₂ ; TFA/MeOPh; I ₂ (10 экв.) в AcOH; AgBF ₄	28–31
Фенилацетамидометил (Phasm)	CH ₂ NHCOCH ₂ Ph	HF; B	Hg(II); I ₂ ; Tl(III); пенициллинаминогидролаза	2, 32, 33
Бензамидометил (Bam)	CH ₂ NHCOPh	АН, B	Ag(OTf); Hg(II)	6, 18
(2-Оксо-1-пирролидино)метил (Pym)		B	Hg(II); I ₂ /MeOH	34
Ацетил (Ac)	COMe	TFA (кипение); HBr/AcOH	0.1 N NaOMe/MeOH, 25°C, 5–10 мин; N ₂ H ₄ /MeOH	1, 5, 8
Бензоил (Bz)	COPh	TFA (кипение); HBr/AcOH	0.1 N NaOMe/MeOH, 25°C; N ₂ H ₄ /MeOH; 0.2 N NaOH	1, 5, 8
Бензилоксикарбонил (Z)	COOCH ₂ Ph		0.1 N NaOMe/MeOH, 25°C; водные щелочи; NH ₃ ; Na/NH ₃ (ж); TFA/PhOH, Δ; HBr/AcOH	1, 5, 8
<i>n</i> -Метоксibenзилокси-карбонил (pMZ)	COOCH ₂ C ₆ H ₄ OMe- <i>p</i>		TFA, 20°C; 0.2 N HBr/AcOH; HCl/AcOH; 0.5 N NaOMe в DMF; Na/NH ₃ (ж)	1, 8
<i>tert</i> -Бутоксикарбонил (Boc)	COOBu ^t		АН (TFA)	8
<i>n</i> -Нитрофеноксикарбонил	COOC ₆ H ₄ NO ₂ - <i>p</i>		АН(TFA); Na/NH ₃ (ж)	5
Фенилтиокарбонил	COSPh		АН	5
Бутилтиокарбонил	COSBu		АН	5
Этилкарбамоил (Ec)	CONHEt	4.5 N HBr/AcOH; 1 N HCl; TFA, Δ	Na/NH ₃ ; 4 N NH ₃ ; NH ₃ (ж); MeOH (1 : 1); 1 N NaOH; NaOMe; N ₂ H ₄ /MeOH; Hg(II) (pH 7); Ag(I) (pH 7)	5, 6, 8
(<i>N</i> -Метоксиметил)карбамоил	CONHCH ₂ OMe	АН	Na/NH ₃ (ж); NaOMe/MeOH; водные буферы (pH 9.5), 25°C	8
[β-(<i>N</i> -Ацил- <i>N</i> -метиламино)-этил]карбамоил	CONHCH ₂ CH ₂ N(R)Me R = PhCH ₂ OCO, Bu ^t OCO		АН	6
Алкилтио (SEt, SPr ⁱ , STrt)	SR R = Et, Pr ⁱ , CPh ₃	АН; NH ₄ OH; NaOH	β-меркаптоэтанол; тиофенол (pH 7.5–9); дитиотреит; Bu ₃ P; окислительный сульфитолиз	6, 8, 35
<i>tert</i> -Бутилтио (Sbu ^t)	SBu ^t	HCl/диоксан; Pip; TFA; RSCl; B	Na/NH ₃ ; RSH; Bu ₃ P; 2-пиридинсульфенилхлорид; <i>o</i> -нитрофенилсульфенилхлорид	2, 6, 8, 17, 35–37
Метоксикарбонилтио (Scm)	SCOOMe	HF; АН	RSH; мягкие щелочные реагенты (pH 10.6)	1, 6, 8, 35, 36
(<i>N</i> -Метил- <i>N</i> -фенилкарбамоил)-тио (Snm)	SCON(Me)Ph	HF	RSH (особенно дитиотреит и 2-пиридинтиол)	2

Таблица 1 (окончание).

Название ^a	Формула защитной группы	Условия, в которых защитная группа устойчива ^b	Условия удаления защитной группы	Ссылки
3-Нитро-2-пиридилтио (Npys)		HF, 0°C (в отсутствие тиолов); TFA, 25°C; ^c HOBT/DCC	RSH или другие восстановители	2, 38–41
<i>трет</i> -Бутоксикарбонилтио (SCB)	SCOOBu ^t		В и АН	36
Бензилоксикарбонилтио (SZ)	SCOOCH ₂ Ph	TFA; мягкие основания	40% HBr/AcOH; сильные основания	36
Сульфонаты	SO ₃ Na	В	Bu ₃ P; β-меркаптолэтанол, дитиотреитол	42

^a Используются условные сокращения защитных групп, принятые в работе⁸; ^b приняты следующие обозначения: В — основания, TFA — трифторуксусная кислота, Nu — нуклеофилы, NpsCl — 2-нитрофенилсульфенилхлорид, Pip — пиперидин, TFMSA — трифторметансульфокислота, АН — кислоты, HOBT — *N*-гидроксисбензотриазол, DCC — дициклогексилкарбодиимид; ^c удаляется не полностью; ^d скэвнджеры — соединения, назначение которых заключается в нейтрализации карбокатионов, образующихся при отщеплении защитных групп; ^e устойчива недостаточно.

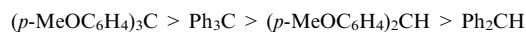
Для характеристики защитных групп тиольной функции цистеина, используемых в современной пептидной химии, Хиски^{5,6} предложил следующую классификацию, основанную на структуре полученных защищенных производных: простые тиозфиры, тиацетали, производные тиазолидинов, сложные тиозфиры и дисульфидные производные.

1. Защитные группы, образующие простые тиозфиры и родственные соединения

Защитные группы, образующие соединения такого типа (RSR') наиболее известны, многочисленны и широко используются. Классической защитной группой, образующей тиозфиры является бензильная (Bzl), предложенная Зиффердом и дю Винье (см., например,¹). Достаточно жесткие условия удаления бензильной защитной группы (Na в жидком аммиаке или HF при 25°C) накладывают определенные ограничения на ее применение. Было замечено,^{1,43} что использование HF приводит к десульфированию остатка цистеина. Применение Na/NH₃ тоже может сопровождаться десульфированием. Кроме того, в процессе снятия защиты действием Na/NH₃ иногда наблюдается разрыв пептидных связей; наибольшей лабильностью в этих условиях отличаются связи, образованные аминогруппой остатка пролина.¹ В связи с этим возникла необходимость разработки кислотолабильных защитных групп за счет введения электронодонорных заместителей в ароматическое кольцо бензильных спиртов. В настоящее время синтезировано большое количество таких защитных групп. В табл. 1 они представлены в порядке увеличения кислотолабильности. Наиболее кислотолабильной является *S*-2,4,6-триметоксибензильная защита (Tmob),^{5,7,14} которая легко удаляется 30%-ной трифторуксусной кислотой (ТФУ) в CH₂Cl₂ в присутствии фенола, тианизолла или воды (так называемых скэвнджеров, предназначенных для нейтрализации образующихся при отщеплении защитных групп карбокатионов) а также 5%-ным раствором ТФУ в CH₂Cl₂ в присутствии 3% триэтилсилана или три(изопропил)силана. Скэвнджеры необходимы для предотвращения обратного присоединения триметоксибензильной группы к группе SH.¹⁴ Отличительной особенностью метокси- и триметоксибензильной защитных групп является возможность их удаления солями тяжелых металлов Ag(I) и Hg(II), что позволяет селективно деблокировать цистеин.^{7,11,15} Механизм этой реакции аналогичен механизму отщепления тритильной и ацетидамидометильной групп и будет подробно рассмотрен далее.

S-трет-Бутильная защита является чрезвычайно кислотоустойчивой. Для ее удаления используют HF или Hg(AcO)₂ в ТФУ.^{2,12} Количественное удаление трет-бутильной группы можно осуществить при помощи сильных электрофильных реагентов, таких как 2-нитрофенилсульфенилхлорид, которые связывают два остатка цистеина через промежуточные смешанные дисульфиды² (эта реакция будет обсуждаться ниже). Однако этот реагент нельзя применять при наличии в пептидной цепи триптофана из-за возможности побочных реакций в индольном кольце.¹⁶

Следующий тип защитных групп — ди- и триарилметильные. В табл. 1 они также расположены в порядке возрастания их кислотолабильности:

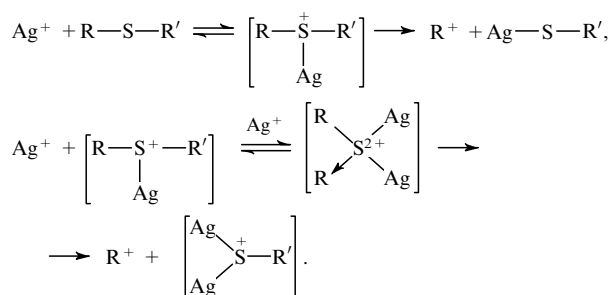


Легкость удаления этих защитных групп в мягких кислотных условиях делает их привлекательными для твердофазного пептидного синтеза с использованием *N*^α-9-флуоренилметоксикарбонильных производных аминокислот (Фмос-техника).^{4,44,45} Расщепление этих сульфидов происходит быстрее, чем их трет-бутильного и бензильного аналогов. Это обусловлено большей устойчивостью образующихся карбокатионов, которые, однако, в силу своей высокой реакционной способности инициируют обратный процесс алкилирования цистеина. Так, при использовании трифенилметильной защиты в ТФУ в течение 30 мин устанавливается равновесие между защищенным и свободным цистеином, причем в большинстве случаев степень *S*-детритилирования не превышает 60%.^{1,8} Сместить равновесие реакции вправо можно путем добавления в реакционную массу скэвнджеров (особенно серосодержащих) или воды.^{1,5,16}

По своей реакционной способности Ddm-группа занимает промежуточное положение между Trt- и Dpm-группами⁵ и значительно более кислотолабильна, чем трифенилметильная, что позволяет избирательно удалять Ddm-группу не затрагивая группы Trt.^{1,5,8} С другой стороны, устойчивость Ddm-защиты к действию солей тяжелых металлов позволяет селективно отщеплять Trt-группу, не затрагивая Ddm-защиты.

Отщепление Trt-группы можно проводить действием ионов Hg(II) или Ag(I).⁵ Механизм расщепления тиозэфиров ионами металлов сходен с механизмом реакции, катализируемым кислотой. Различие заключается в том, что при действии ионов металлов последняя стадия является необратимой и направлена в сторону образования стабильного

карбокатиона, который может образовываться двумя путями.



В ряде случаев соли серебра оказываются более эффективными, чем соли ртути, поскольку иногда образующееся ртутное производное пептида (меркаптид) расщепляется с трудом.⁵ Для разрушения меркаптидов металлов используют тиоспирты. Для этого продукт реакции обрабатывают *in situ* 20–50-кратным избытком восстанавливающего агента в подходящем буфере, например, дитиотреитом или β-меркаптоэтанолом.^{2,18} Восстановленный продукт подвергают очистке с помощью гель-фильтрации, ионообменной хроматографии или ВЭЖХ для удаления избытка восстанавливающих реагентов. Для удаления ионов Hg(II) часто используют сероводород.

Благодаря стабилизирующему действию трех электронодонорных метоксигрупп ТМТг-защита⁷ образует еще более устойчивые карбокатионы, чем Trt-защита, что и определяет ее особенности. Отличительным свойством этой защиты является чрезвычайная кислотолабильность. Ее удаляют действием разбавленных растворов ТФУ.⁷ Образующийся триметоксибензилметильный карбокатион, так же как и тритильный, склонен к обратным реакциям алкилирования, поэтому обязательным является использование скэвнджеров. Можно также отщепить Trt- и ТМТг-защиты с одновременным замыканием дисульфидных связей при помощи иода или трифторацетата таллия (см. раздел III).

S-Пиридилдифенилметильная группа не столь широко распространена в пептидном синтезе. Имеются лишь отдельные упоминания о ней.¹⁹ S-Дибензосуверильная защитная группа также используется редко. По химическим свойствам и условиям деблокирования она сходна с Ddm-группой.⁶ S-9-Флуоренилметильная (Fm) защита^{5,20} — одна из немногих, которая удаляется в щелочных условиях — обычно действием пиперидина в ДМФА. Стабильность в условиях обработки ТФУ и в безводном HF делает возможным ее применение в твердофазном синтезе, а устойчивость к воздействию Ti(III) и I₂ создает возможность ее селективного удаления в присутствии таких защитных групп, как Acm, Trt, MeB и т.п., а также селективного создания дисульфидных связей. Еще одной щелочелабильной защитной группой является 2-(2,4-динитрофенил)этильная (Dnpe).²¹ Электроноакцепторные нитрогруппы в *орто*- и *пара*-положениях делают эту защиту по своим свойствам, таким, например как стабильность в присутствии сильных кислот и отщепление щелочами через β-элиминирование, похожей на Fm-защиту. Присутствие нитрогрупп позволяет повысить растворимость Dnpe-производных в полярных растворителях. Эта группа, так же как и Fm-группа, полностью стабильна в условиях классического и твердофазного синтеза с использованием N^α-трет-бутоксикарбонильных производных аминокислот (Вос-техника),^{4,45} а также в условиях отщепления пептида от полимера действием HF или трифторметансульфокислоты.

Еще одной щелочелабильной защитной группой является S-β,β-диэтоксикарбонилэтильная (Dce).¹ Она легко отщепляется посредством реакции β-элиминирования при обработке 1 N раствором КОН.¹

Преимущества S-адамантильной (Ad) защитной группы,²² хотя она используется достаточно редко, особенно наглядно проявляются при сравнении с Mob-защитой. Адамантильная защитная группа более стабильна в ТФУ (при 0°C в течение 2.5 ч отщепляется всего на 10%). Количественное ее удаление осуществляется смесью 1 M F₃CSO₃H и PhSMe в ТФУ при 0°C в течение 60 мин или при помощи Ti(F₃CCOO)₃ в ТФУ.^{13, 22, 23}

Новыми защитами тиольной функции цистеина являются ксантенильная (Xan) и ее 2(3)-метоксипроизводные.²⁴ Эти кислотолабильные группы удаляются разбавленными кислотами в присутствии подходящих скэвнджеров. Альтернативный метод их удаления — действие I₂ или Ti(F₃CCOO)₃ — позволяет сразу получать циклические дисульфиды.²⁴

Имеется сообщение²⁵ об использовании оригинальной 2-хинолинилметильной защитной группы. Оригинальным является также и способ прямой конверсии ее производных в симметричные дисульфиды с использованием FeCl₃, FeCl₂ и CuCl₂.²⁵

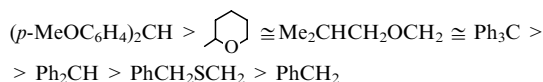
Следует упомянуть еще о двух новых защитных группах — Fc и Fcm, содержащих ферроценилметильный фрагмент.²⁶ Они достаточно стабильны в щелочных условиях, а также в присутствии восстанавливающих реагентов, таких как NaBH₄ и Zn в AcOH, хотя Fc-группа в этих условиях частично удаляется. Обе защиты быстро отщепляются электрофильными реагентами — роданом (SCN)₂, метоксикарбонилсульфенилхлоридом, ТФУ. Fc-группа отщепляется еще и муравьиной кислотой. Иод только частично разрушает Fc- и Fcm-защитные группы. Удаление обеих этих защит кислотами эффективно только при использовании скэвнджеров, таких как тиофенол, для улавливания образующегося ферроценилкарбениевого иона. Для пептидного синтеза наибольший интерес представляет Fcm-защита, которую использовали в сочетании с N^α-Вос- или N^α-Fмосзащитами. В этом случае для избирательного удаления Вос-защиты в ходе синтеза применяли *n*-толуолсульфокислоту.²⁶

Комплекс — (η⁵-циклогексадиенил)трикарбонилжелезо ([(η⁵-C₆H₇)Fe(CO)₃]⁺) — был успешно применен в качестве защитной группы тиольной функции цистеина при синтезе модельного пептида — Ac—Cys—Gly—Ala—OEt.²⁷ Благодаря высокому сродству этого комплекса к SH-группе цистеина, образование соответствующего аддукта протекает быстро и без побочных реакций. Защищенные производные имеют ярко-желтую окраску, что облегчает контроль их очистки на силикагеле.²⁷

2. Защитные группы, образующие монотиоацетали и дитиоацетали

Защитные группы, образующие монотиоацетали (S—C—O) и дитиоацетали (S—C—S), не так многочисленны и для защиты цистеина используются редко.

Защитные группы тиацетального типа — тетрагидропиранильная (Thp), изобутоксиметильная (*i*-Bom), *n*-хлорфеноксиметильная, бензилтиометильная (Btm) и фенилтиометильная — устойчивы в щелочных условиях и удаляются действием кислот. Легкость расщепления кислотами убывает в ряду: ацетали > монотиоацетали >> дитиоацетали и определяется теми же факторами, что и в случае тиоэфиров — легкостью протонирования, стабильностью образующегося катиона и возможностью необратимых реакций, смещающих равновесие в сторону продуктов расщепления.⁵ S-Монотиоацетальные производные цистеина реагируют с кислотами с такой же скоростью, как S-тритиловые тиоэфиры, а S-дитиоацетальные производные в условиях ацидолиза близки к Cys(Bzl) и Cys(Bu^t). По легкости ацидолиза защитные группы располагаются в следующий ряд:⁸



Расщепление монотиоацеталей и дитиоацеталей удобнее проводить солями Hg(II) и Ag(I).⁵ Практически для каждой защитной группы найдены условия селективного ее отщепления.⁸ Механизм расщепления моно- и дитиоацеталей под действием ионов металлов, вероятно, аналогичен механизму катализируемой ионами металлов реакции расщепления тиоэфиров. Образование связи M—S ослабляет связь C—S. Лимитирующей скоростью реакции стадией является образование катиона. Скорость расщепления зависит от его стабильности.⁵

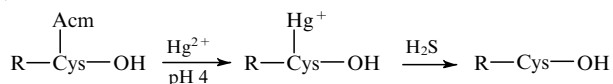


Регенерация свободных тиолов так же, как и в случае тиоэфиров, осуществляется действием большого избытка тиоспиртов или сероводорода. До сих пор окончательно не выяснено, можно ли избирательно расщеплять S-монотиоацетали в присутствии S-дитиоацеталей, дисульфидных связей и других защитных групп, чувствительных к ионам тяжелых металлов.⁵

Прямое окисление монотиоацеталей в дисульфиды под действием галогенов неприменимо к производным цистеина. Однако имеются данные^{5,6} об удалении S-Thr-группы из A-цепи синтетического инсулина путем прямой конверсии в симметричный дисульфид при помощи (SCN)₂.

3. Защитные группы, образующие производные тиазолидинов

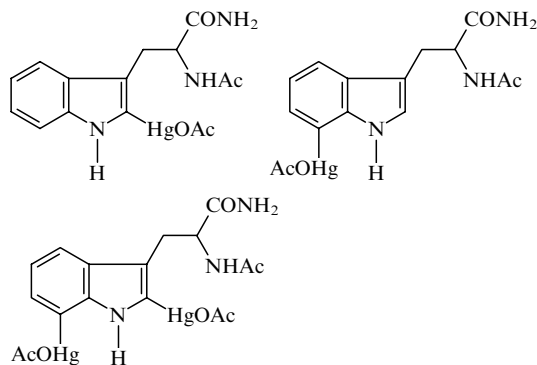
Ацетамидометильная (Асм) защитная группа, образующая производные тиазолидина нашла широкое применение при синтезе цистеинсодержащих пептидов, благодаря своей высокой стабильности в кислотных и щелочных средах, а также в условиях каталитического гидрогенолиза. Она применяется в сочетании с Boc-, Fmoc- и бензилоксикарбонильной (Z) защитами α-аминогруппы в классическом и твердофазном синтезе пептидов. Имеются, однако, единичные сообщения о частичной потере Асм-защитной группы при повторной обработке пептидных цепей HF при отщеплении их от полимера.³⁰ В условиях кислотного удаления Meb-, Mob-, Trt- и Tmob-групп Асм-защита устойчива. Специально подобранные условия снятия защиты с тиольной функции цистеина солями тяжелых металлов в соответствующих растворителях обеспечивают селективное удаление S-Асм-группы в присутствии Bzl- и Bu^t-групп. В реакции с солями Hg(II) образуется промежуточное соединение пептида с металлом. При использовании солей Hg(II) в кислых водных растворах реакция заканчивается за 1–2 ч.⁶ Возможно деблокирование и в органических растворителях, например, в ДМФА.²



R — остаток пептида.

Последующая обработка сероводородом или тиоспиртами, как и в случае удаления Trt-защиты, дает свободные тиольные группы. При использовании солей Hg(II) для снятия Асм-защиты с SH-группы цистеина в пептидах, содержащих триптофан, возможны побочные реакции.⁴⁶ Так, при обработке бис-Асм-производного соматостатина большим избытком Hg(AcO)₂ (от 5 до 20 экв. на одну

Асм-группу) в 1–10%-ной уксусной кислоте Hg(AcO)⁺ замещает водород в положениях 2 и 7, образуя моно- и бисмеркурацетаты триптофана.

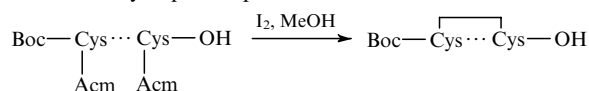


При обработке таких производных β-меркаптоэтанолом группы Hg(AcO)⁺ замещаются на HOCH₂CH₂S, давая нежелательные побочные продукты. Избежать ацетооксимеркурирования можно, уменьшив количество Hg(AcO)₂ до 1–2 экв. и применяя 50%-ную уксусную кислоту.⁴⁶

Имеются сообщения о возможности S→N- и S→O-миграции Асм-защитной группы в боковые карбоксамидные группы аспарагина и глутамин^{2,47} и гидроксильные группы серина и треонина.^{2,48,49} Миграция Асм-защиты в боковую цепь глутамин (S→N-миграция) наблюдалась при деблокировании тиольной функции цистеина действием I₂ в MeOH. Подавление этой побочной реакции осуществляют добавлением в качестве скэвенджера избытка глутамин.⁴⁷ Миграция S→O наблюдалась при деблокировании цистеина солями Ti(III) и Hg(II) в пептиде, содержащем несколько остатков серина и треонина.⁴⁸ Для эффективного подавления этого процесса в качестве скэвенджеров применяли трехатомные спирты, например, глицерин.^{2,48}

При удалении Асм-группы солями Ag(I) важную роль играет анион. Используют нитрат,⁵ трифторметансульфонат,¹⁸ трифторацетат¹⁸ и тетрафторборат²⁸ серебра. Ацетатом серебра Асм-защита не снимается. Для деблокирования цистеина трифторацетатом серебра необходимо вдвое увеличить избыток деблокирующего реагента по сравнению с использованием трифторметансульфоната серебра. Время реакции при этом также увеличивается вдвое,¹⁸ поэтому применение AgOTf предпочтительнее. Соли серебра удаляют действием большого избытка (до 50 экв.) β-меркаптоэтанолола или дитиотреита.¹⁸ Затем для очистки реакционную смесь подвергают гель-фильтрации. При использовании этого метода деблокирования такие чувствительные аминокислоты, как метионин, триптофан, тирозин остаются незатронутыми.

Привлекательным методом удаления Асм-защитной группы является прямая конверсия ди-Асм-замещенных пептидов в дисульфиды при помощи иода.



Подробности этого метода будут рассмотрены в главе III.

В настоящее время большое распространение получили защитные группы, представляющие собой производные ацетамидометильной защиты — триметилацетамидометильная (Тасм), фенилацетамидометильная (Phасм) и бензамидометильная (Вам). Бензамидометильная защита обладает такими же свойствами, что и Асм-группа.^{6,18} Она также чувствительна к AgOTf. Однако удаление Вам-группы требует большего времени, чем удаление Асм-защиты.¹⁸

В работах^{28–31} для защиты SH-функции цистеина была предложена триметилацетамидометильная группа. Оказа-

лось, что Тасм- и Асм-группы устойчивы, а Вам-защита недостаточно устойчива в условиях постсинтетического деблокирования боковых функциональных групп пептидов действием HF или NaOH. К преимуществам Тасм-защиты авторы³⁰ относят легкость ее введения и достаточно высокие выходы защищенных производных цистеина, в то время как при получении S-ацетамидометилцистеина образование побочного продукта — тиазолидин-2-карбоновой кислоты — является неизбежным.³⁰

Фенилацетамидометильная защитная группа (Phasm)^{32,33} устойчива и расщепляется в тех же условиях, что и Асм-группа. Ее отличительной особенностью является возможность отщепления ферментом пенициллинамино-гидролазой.² Таким образом, Phasm-группа является ортогональной по отношению к Асм-защите. Можно сначала ферментативно отщепить Phasm-группу, а затем удалить Асм-группу действием солей тяжелых металлов или иода.^{2,33}

Пирролидинометильная (Pum) группа устойчива к действию реагентов пептидного синтеза в широком интервале pH (от 0.5 до 13). По устойчивости к действию щелочей она превосходит Вам-группу.³⁴ Отщепление Pum-защиты с одновременным замыканием дисульфидной связи осуществляется действием I₂ в MeOH.³⁴

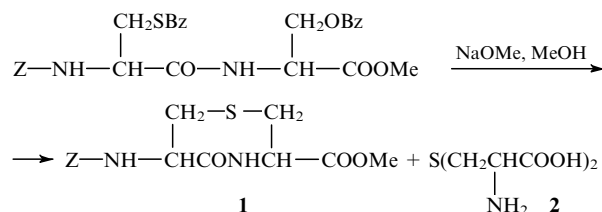
4. Защитные группы, образующие сложные эфиры тиолов и родственные соединения

К защитным группам, образующим сложные алкиловые и ариловые тиоэфиры (RCOSR'), относятся ацетильная (Ac), бензоильная (Bz), бензилоксикарбонильная (Z), *n*-метоксibenзилоксикарбонильная (pMZ), *трет*-бутоксикарбонильная (Boc), *n*-нитрофеноксикарбонильная защиты. Дитиокарбонаты (RSCOSR') образуются при использовании фенилтиокарбонильной и бутилтиокарбонильной защит; *N*-(алкил)тиокарбаматы (RNHCOSR') образуются в случае этилкарбамоильной (Ec), (*N*-метоксиметил)карбамоильной, [β-(*N*-ацил-*N*-метиламино)этил]карбамоильной защит.

Особенностью тиоэфиров (ацетильная и бензоильная защиты), тиокарбонатов (бензилоксикарбонильная, *n*-метоксibenзилоксикарбонильная, *n*-нитрофеноксикарбонильная защиты) и тиокарбаматов (*N*-этилкарбамоильная и *N*-метоксиметилкарбамоильная защиты) является их чувствительность к действию нуклеофилов и оснований. Тиокарбонаты, содержащие бензилоксикарбонильную группу и ее аналоги, а также Вос-защита расщепляются еще и в кислых средах, подобно аналогичным эфирам и уретанам, и даже немного легче.⁸ Дитиокарбонаты (фенилтиокарбонильная и бутилтиокарбонильная защиты), а также тиокарбамат ([β-(*N*-ацил-*N*-метиламино)этил]карбамоильная защита) расщепляются только кислотами. Действие щелочи на сложные эфиры тиолов может вызывать катализируемый основаниями дисульфидный обмен, приводящий к образованию смесей полимеров, параллельных и антипараллельных димеров пептидов. Возможна также побочная реакция β-элиминирования с отщеплением тиобензойной кислоты от соответствующих Cys(Bz) производных в пептидах.⁵ Протекание этой реакции определяется полярностью растворителя, поэтому при обработке цистеинсодержащих пептидов такими основаниями, как NaOMe, следует избегать добавления в реакционную смесь ДМФА.⁵ Отщепление S-ацильных групп можно проводить действием гидразина в метаноле. При этом Ac-защита быстро отщепляется в виде соответствующего ацетилгидразина без β-элиминирования.

Интересная побочная реакция наблюдалась при действии NaOMe в MeOH на защищенный пептид Z—Cys(Bz)—Ser(Bz)—OMe.¹ Остаток серина превращался в остаток α-аминоакриловой кислоты, а деблокированная

SH-группа присоединялась по двойной связи с образованием продуктов **1** и **2**:

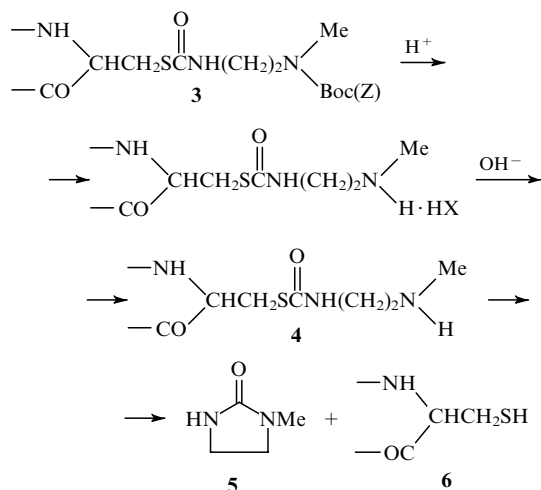


Серьезным ограничением использования ацильных защитных групп (Ac-, Bz-, Z-, pMZ-, Boc-, нитрофенилтиокарбонильной, бутилтиокарбонильной, *N*-метоксиметилкарбамоильной, Ec- и [β-(*N*-ацил-*N*-метиламино)этил]карбамоильной защит является их склонность к S→N-ацильной миграции. Такая миграция происходит в ходе наращивания пептидной цепи, как только образуется свободная аминогруппа.^{5,8} Эта побочная реакция наблюдалась как в классическом, так и в твердофазном синтезе пептидов.⁶ При использовании в твердофазном синтезе ацетильной и бензоильной защитных групп для защиты тиольной функции цистеина наблюдался почти количественный обрыв цепи за счет того, что деблокированная SH-группа после S→N-миграции реагирует с остаточными хлорметильными группами полимерного носителя.⁶ Тем не менее Ac- и Bz-группы применяются для защиты остатков цистеина в твердофазном синтезе защищенных пептидных фрагментов, предназначенных для фрагментной конденсации. Имеются данные⁵ о подавлении S→N-ацильной миграции при использовании для создания амидной связи высокореакционноспособных производных (например, смешанных ангидридов с пивалиновой кислотой). В этом случае скорость аминолитиза существенно превышает скорость S→N-миграции. Бензилоксикарбонильная (Z) группа также способна к S→N-миграции, но этот процесс происходит значительно медленнее. Поэтому образования побочных продуктов в этом случае можно избежать, используя на стадии конденсации пивалоилхлорид или дифенилхлорфосфат.⁵

n-Метоксibenзилоксикарбонильная (pMZ) защитная группа отличается более высокой стабильностью образующегося при ее расщеплении катиона и поэтому может быть удалена не только щелочами, но и кислотами. Однако ее использование ограничено из-за трудности введения (выходы около 30%) и высокой лабильности по отношению к кислотам и щелочам.⁵

N-Этилкарбамоильная (Ec) и *N*-метоксиметилкарбамоильная защитные группы устойчивы к действию кислот, легко отщепляются основными реагентами, как правило, без рацемизации и десульфирования, не склонны к S→N-миграции и поэтому представляют большой практический интерес.^{6,8} Возможность частичного отщепления Ec-группы при использовании избытка триэтиламина в процессе твердофазного синтеза с использованием Вос-техники (на стадии нейтрализации пептидполимера или при повторении конденсации) ограничивает применение этой защитной группы.

Имеется сообщение⁶ еще об одной защитной группе типа этилкарбамоильной. Это — S-[β-(*N*-алкоксикарбонил-*N*-метиламино)этил]карбамоильная защита. Для деблокирования соединения **3**, тиольная функция цистеина в котором защищена этой группой, сначала удаляют алкоксикарбонильную (Z или Boc) группу кислотами. Получившееся в результате β-(метиламино)этилкарбамоильное производное **4** циклизуется с образованием 1-метил-2-имидазолидона **5** и целевого тиолсодержащего пептида **6**.⁶



5. Защитные группы, образующие дисульфидные производные

Дисульфидные производные ($R-S-S-R'$), полученные после блокирования SH-группы, включают симметричные и несимметричные дисульфиды цистеина, *S*-сульфонаты, *S*-алкил(арил)тио-, *S*-алкоксикарбонилтиопроизводные и различные сульфамиды. В современной химии пептидов симметричные дисульфиды для синтеза используются крайне редко. Защитные группы, образующие несимметричные дисульфиды, — этилтио- (SEt), изопропилтио- (SPⁱ), трифенилметилтио- (STrt), *tert*-бутилтио- (SBu^t), метоксикарбонилтио- (Scm), (*N*-метил-*N*-фенилкарбамоил)тио- (Snm) и 3-нитро-2-пиридилтио- (Npys) — являются хорошими альтернативами рассмотренным выше защитным группам, благодаря их лабильности по отношению к алифатическим и ароматическим тиолам. Характерной особенностью некоторых из них (Scm, Snm, Npys) является способность замыкать внутри- и межмолекулярные дисульфидные связи одновременно с деблокированием цистеина в присутствии пептидных тиолов, группа SH которых выполняет роль деблокирующего реагента (подробно этот вопрос будет рассмотрен в главе III).

Очень активными соединениями являются *S*-метоксикарбонилтиопроизводные (Scm) цистеина.^{6, 35, 36} По своей реакционной способности по отношению к тиолам они превосходят *S*-сульфонаты и сравнимы с сульфенилтиоцианатами или сульфенилиодидами, являющимися промежуточными соединениями при замыкании дисульфидной связи соответствующими реагентами, которые будут рассмотрены в главе III. К достоинствам Scm-группы следует отнести стабильность защищенных производных, а также необратимость их реакции с тиолами, в отличие от сульфенилиодидов и сульфенилтиоцианатов.⁶ Устойчивость Scm-группы в кислых средах позволяет работать с ней в условиях твердофазного синтеза с использованием Вос-техники.

Расщепление дисульфидов проводят тиолами, такими как β-меркаптоэтанол или более сильным нуклеофилом, тиофенолом, в водных растворах при pH от 7.5 до 9.⁸ Реакция с тиолами основана на тиол-дисульфидном обмене. Для смещения равновесия в сторону получения желаемого продукта требуется большой избыток тиола. Деблокирование можно проводить также с использованием небольшого избытка дитиотреита, когда равновесие сдвигается за счет внутримолекулярной циклизации реагента, или с использованием 1 экв. трибутилфосфина при pH 8.⁸ Фосфины являются специфичными реагентами для цистеина и восстанавливают только дисульфидные связи, причем этот процесс протекает селективно.¹⁷ Дисульфиды могут расщепляться также окислительным сульфитолизом. Получившиеся в ре-

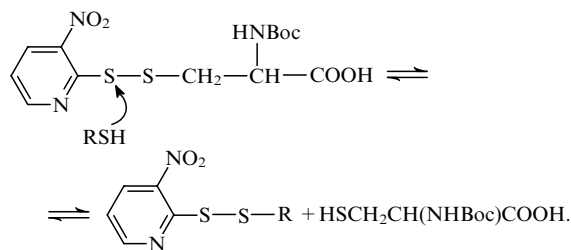
зультате *S*-сульфонаты восстанавливают тиолами или водными растворами тиокислот при небольшом нагревании.⁸

Известно, что дисульфидные производные относительно стабильны к действию кислот. Их стабильность убывает в ряду: RSSBu^t > RSSPrⁱ ~ RSSEt. Так, SBu^t-группа отщепляется при обработке сильными кислотами (жидкий HF, 1 ч, 0°C).^{2, 6} Группы SPⁱ и SEt оказались неустойчивы к действию хлористого водорода в AcOH.⁶ Практическую ценность представляет только SBu^t-группа, которую успешно применяли в твердофазном синтезе с использованием Вос- и Fmoc-техники.^{36, 37} Большинство смешанных дисульфидов (табл. 1) устойчивы к действию аммиака и щелочи, которые используются для отщепления пептидов от полимерных носителей с фенольными и фенацильными якорными группами.⁸

В работе³⁶ были предложены алкоксикарбонилтио-защитные группы: *tert*-бутоксикарбонилтио- (SCB) и бензилоксикарбонилтио- (SZ). К сожалению, SCB-производные оказались не очень устойчивыми при хранении. Например, производное цистеина — ZCys(SCB)OMe — превращалось в цистиновый аналог в течение 3 месяцев. Кроме того, высокая лабильность SCB-защиты к действию щелочей ограничивает ее применение в пептидном синтезе.³⁶ Защитная бензилоксикарбонилтиогруппа (SZ) стабильна в ТФУ. По отношению к щелочам она более устойчива, чем метоксикарбонилтиогруппа (Scm), и удаляется действием сильных щелочей, но устойчива при pH 10.6 в течение 2 ч, когда Scm-защита удаляется полностью. Таким образом, SZ-группу можно использовать для защиты SH-группы цистеина, а также для избирательного образования цистинов.³⁶

Защитная *N*-метил-*N*-фенилкарбамоилтиогруппа (Snm) устойчива к действию кислот. Это делает возможным использование ее в пептидном синтезе с применением Вос-техники. Возможность удаления этой защитной группы щелочами пока не выяснена.²

Защитные 3-нитро-2-пиридилтио- (Npys) и *N*-метил-*N*-фенилкарбамоилтиогруппы (Snm), аналогично Scm-группе, способны селективно образовывать дисульфидные связи в присутствии свободных групп SH. Тиолиз приводит к удалению этих групп и протекает по схеме^{38, 39}



Было отмечено,³⁹ что для отщепления Npys-защиты наиболее эффективны алифатические тиолы, такие как β-меркаптоэтанол или меркаптоуксусная кислота (с 10-кратным избытком тиолов по отношению к 3-нитро-2-пиридилтиопроизводным реакция протекает за 10 мин). Связь S—Npys достаточно устойчива к действию ароматических тиолов, 1-метилимидазол-2-тиола и пиридин-2-тиола. В этом случае возможно избирательное расщепление связей O—Npys и N—Npys.³⁹ Авторы работы⁴⁰ показали, что Npys-группа более стабильна в стандартных условиях синтеза пептидов с использованием Вос-техники (HF, TFA и третичные амины), чем метоксикарбонилтиогруппа (Scm). Npys-Защита тиольной функции цистеина абсолютно устойчива в растворителях и реагентах, используемых в твердофазном синтезе с применением Вос-техники: CH₂Cl₂, ДМФА, *N,N*-диметилацетамиде, *N*-метилпирролидоне, MeOH, трифторэтанол, диоксане, в смеси 40% ТФУ и CH₂Cl₂, а также при обработке HF с добавлением 10% анизола или *p*-крезола при 0°C в течение 1 ч. Таким образом, Npys-группа практи-

чески устойчива в условиях отщепления HF по методике «high». ⁴⁰ Методика «low-high» в данном случае непригодна, так как при использовании *n*-тиокрезола и диметилсульфида происходит потеря боковых Npys-групп. ⁴⁰ Данные об устойчивости Npys-защиты к действию *N*-гидроксизотриазола противоречивы. ^{40, 41} В работе ⁴¹ наблюдалось частичное отщепление (12%) Npys-группы при обработке 0.1 М раствором этого реагента в ДМФА. Поэтому для образования амидной связи (конденсации) использовали метод активированных *n*-нитрофениловых и пентафторфениловых эфиров. ^{4, 40, 50} Авторы работы ⁴¹ при синтезе нескольких пептидов успешно применили *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид с *N*-гидроксизотриазолом для присоединения Boc—Cys(Npys)—ОН. Защитная группа Npys оказалась совершенно нестабильной в условиях твердофазного синтеза с использованием Fmoc-техники, но она достаточно стабильна в условиях фотолитического отщепления пептидов от полимера. ⁴⁰

Представляет интерес сообщение ⁴² об использовании в пептидном синтезе устойчивых к действию оснований *S*-сульфонатов — Boc—Cys(SO₃Na)—ONa и Fmoc—Cys(SO₃Na)—ONa. Деблокирование цистеина может быть осуществлено трибутилфосфином, β-меркаптоэтанолом и дитиотреитом. ⁴² При отщеплении пептида от полимера при помощи системы ТФА—*n*-крезол происходит частичная потеря сульфонатов.

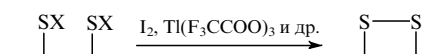
III. Методы создания дисульфидных связей

Несмотря на интенсивное развитие методологии пептидной химии, создание дисульфидной связи представляет довольно сложную задачу. Решение ее фактически состоит из решения двух проблем: 1) выбора защитной группы тиольной функции цистеина и 2) выбора способа создания дисульфидного мостика. Эти две проблемы взаимосвязаны, так как выбор защитной группы чаще всего предопределяет способ создания связи S—S. Задача усложняется при необходимости создания нескольких дисульфидных связей. Схема синтеза, получившая название «ортогональной», позволяет избирательно замыкать дисульфидные связи между определенными остатками цистеина, не затрагивая другие дисульфидные остатки или уже созданные дисульфидные мостики. При этом подбор избирательно отщепляемых защитных групп, а также способа циклизации становится чрезвычайно важным. ⁸ В любом случае процесс циклизации сложен и успех его зависит от многих факторов, таких как правильный выбор растворителя, температуры, pH реакционной среды, концентрации реагентов, типа окислителя. Методы циклизации условно разделены на три группы. ²

А. Удаление защит и создание дисульфидной связи, исходя из соответствующих SH-производных пептидов.

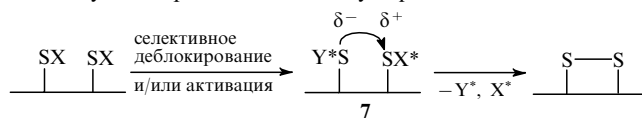


Б. Удаление защит с одновременным замыканием цикла.



В. Замыкание дисульфидной связи через тиолиз. При этом возможны два варианта. Первый: защитная группа одного из остатков цистеина (X*) способствует повышению электрофильности атома серы (активирует его). В результате облегчается разрыв связи между атомом серы и защитной группой при тиолизе. Тиолом может служить свободная SH-группа другого остатка цистеина, в этом случае X* = X = —SCOOMe (Scm), —SCON(Me)Ph (Snm), 3-нитро-2-пиридилтио- (Npys) и т.п. Второй вариант: защитные группы X = C(Ph)₃ (Trt), CH₂NHCOMe (Acsm), CMe₃ (Bu^t) и т.п. отщепляют при помощи (SCN)₂, 3-нитро-2-пиридинсульфенилхлорида, 4-NO₂-C₆H₄SO₂Cl и других реагентов с обра-

зованием активированных несимметричных дисульфидов (X* = SCN, 3-нитро-2-пиридилтио, 4-NO₂-C₆H₄SO₂), способных вступать в реакции тиол-дисульфидного обмена:



1. Создание дисульфидных связей в SH-производных пептидов

Методы группы А предполагают блокирование двух цистеиновых остатков одинаковыми защитами, которые удаляют в одинаковых условиях, очистку линейных полипептидов и окисление групп SH любым подходящим реагентом, обеспечивающим создание внутри- и межмолекулярной дисульфидной связи. Окисление свободных тиолов, как правило, проводят в очень разбавленных растворах с концентрацией пептида 10^{−4}–10^{−5} М во избежание межмолекулярной агрегации и протекания побочных реакций. ^{2, 8} Направленное замыкание SS-связей в разбавленных растворах в значительной степени зависит от структуры пептида, в частности, от природы аминокислот, разделяющих два остатка цистеина и от количества аминокислот между ними. ^{51, 52} Если количество аминокислот между двумя остатками цистеина *n* = 4–20, то в условиях высокого разбавления (10^{−3}–10^{−4} М) преимущественно образуются внутримолекулярные SS-связи. Если *n* < 3, то вследствие ограниченной гибкости цепи кроме пептидов с внутримолекулярными SS-связями образуются димеры и полимеры. ⁵¹ Для замыкания дисульфидной связи между остатками цистеина, расположенными рядом, требуются очень жесткие окислители, такие как трифторацетат таллия(III). ⁵³ Способность образовывать внутрицепочечные дисульфидные связи зависит и от структурной стабильности дисульфидной петли. Так, наличие в аминокислотной последовательности остатков ProGly, принимающих участие в образовании β-складок в белках и пептидах, облегчает окисление пептидов. Существует целый ряд пептидов (например, окситоцин), которые легко окисляются кислородом воздуха. Пептидные фрагменты белков, содержащие последовательность ProPro, между двумя остатками цистеина окисляются с трудом и могут образовывать только симметричные димеры. ⁵¹

а. Окисление кислородом воздуха

Для окисления тиольных групп цистеина с образованием дисульфидов часто используется кислород воздуха. Реакцию, как правило, проводят в слабощелочных растворах при pH 7.5–8.5 и интенсивном перемешивании или барботировании воздуха через реакционную смесь. Необходимое значение pH достигается в основном добавлением аммиака, ^{54, 55} но можно использовать и другие реагенты, например диизопропилэтиламин. ^{55, 56} В некоторых случаях циклизация протекает значительно быстрее при применении вместо аммиака диизопропилэтиламина. ⁵⁵ Окисление проводят также в 0.1 М растворе NH₄HCO₃ (pH 8.0) ⁵⁷ или в 0.1 М аммонийацетатном буфере (pH 6.8–7.0). ⁵¹ Отмечалось, что барботирование чистого кислорода вместо воздуха через 0.1 М раствор NH₄HCO₃, содержащий пептид, не ускоряет процесс циклизации. ⁵⁷ В случае пептидов, агрегирующих в водных растворах, добавляют 0.5–8.0 М раствор мочевины или 0.1–1.5 М раствор гуанидингидрохлорида. ^{2, 58, 59} Обычно окисление проводят при 5–25°C. Время проведения реакции колеблется от нескольких часов до нескольких дней. ^{54–57} Вероятнее всего, реакция протекает по свободнорадикальному механизму. Процесс циклизации обычно контролируют ВЭЖХ или реакцией на свободную SH-группу с реагентом Элмана — 5,5'-дитиобис(2-нитро-

бензойной)кислотой.⁶⁰ Выходы циклических дисульфидов при окислении таким способом обычно невелики и составляют 9–15%.^{54–56}

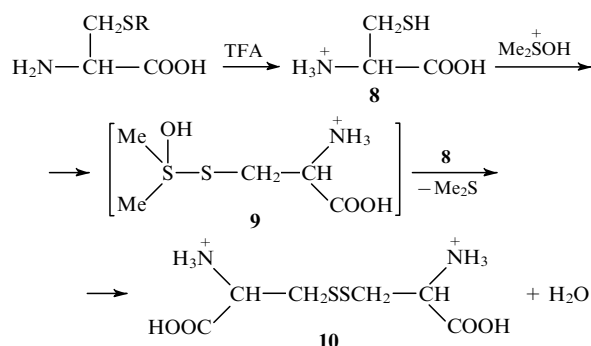
Имеется ряд примеров получения синтетических токсинов, факторов роста, ингибиторов ферментов с использованием этого метода. Длительность процесса и низкие выходы продуктов являются серьезным ограничением его применения. Однако простота выполнения делает окисление кислородом воздуха привлекательным, несмотря на появление новых более эффективных реагентов.

б. Окисление феррицианидом калия

Феррицианид калия — достаточно распространенный реагент для циклизации. В работе⁶¹ изучена кинетика окисления цистеина феррицианидом калия и предложен механизм реакции. При помощи ЭПР-спектроскопии установлено, что реакция протекает через образование промежуточного радикала $[-SCH_2C^+(NH_2)COO^-]$.⁶¹ Окисление проводят, как правило, в водных или водно-спиртовых растворах, в зависимости от растворимости пептида, при высоком разбавлении и значениях pH среды 8–10.^{60,62} В работе⁶³, например, реакцию проводили в насыщенном растворе NH_4OAc , содержащем метанол и ацетонитрил. Об окончании реакции судят по появлению исчезающей желтой окраски. Неорганические примеси удаляют ионообменной хроматографией. Этот метод дает в основном гомогенные реакционные смеси. Окисление сульфгидрильных групп проходит практически количественно.⁵⁵ С его помощью были получены окситоцин,^{2,64} аналоги вазопрессина,⁶² соматостатин,^{2,65} а также пептиды с двумя SS-мостиками — эндотелин-1,⁵⁸ пептид дегрануляции тучных клеток из пчелиного яда⁶⁶ и др.

в. Окисление диметилсульфоксидом

Впервые диметилсульфоксид (ДМСО) был предложен для окисления пептидных тиолов в 1988 г.⁶⁷ Важными преимуществами ДМСО являются: возможность работы в широком диапазоне pH (3–8), более высокие скорости реакции, чем при окислении кислородом воздуха, а также улучшение растворимости пептидов.^{2,59,67–71} Реакция катализируется либо кислотами, либо первичными или вторичными аминами. Механизм реакции окисления в кислой среде был предложен в работе⁶⁸.



R = Trt, Mbzl, Dpm.

Лимитирующей стадией процесса окисления является образование промежуточного соединения **9**, которое быстро превращается в дисульфид **10** при взаимодействии со свободным тиолом **8**. Оптимальным для использования ДМСО является pH 3–8.⁶⁹ В этом интервале pH возможно как протонирование ДМСО, так и образование тиолят-аниона и скорость реакции не зависит от pH. При pH < 3 возможно окисление метионина в соответствующий сульфоксид, а при pH > 8 ускоряются реакции дисульфидного обмена. Однако в

некоторых случаях имеются исключения. Так, для окисления пептидов с N-концевым цистеином реакцию желательно проводить при pH 6–7. Если аминокислоты цистеина ацетилированы, то ограничения pH не существует. Авторы работы⁶⁹ объясняют это тем, что слаболожительная α-аминогруппа цистеина облегчает образование нестабильного промежуточного аддукта **9**. В более кислой среде α-аминогруппа протонируется и не оказывает такого влияния.

Окисление диметилсульфоксидом проводят при его концентрации в реакционной смеси от 10 до 50%. Повышение содержания ДМСО увеличивает скорость реакции. Так, при окислении линейного предшественника фрагмента фактора роста человека с использованием 10–30%-ного ДМСО реакция проходит за 2–3 ч, а при 40–50%-ном содержании ДМСО в реакционной смеси — за 0.5 ч. Чувствительные к окислению аминокислотные остатки триптофана, тирозина, метионина при этом не модифицируются.^{69,71}

С целью одновременного отщепления кислотолабильных защитных групп цистеиновых остатков (Trt, Mbzl, Bzl) и замыкания дисульфидных связей использовали смесь, содержащую 10% ДМСО в ТФУ.^{68,70} Однако окисление продолжалось несколько часов. За это время незащищенный триптофан существенно модифицировался, а метионин окислялся в соответствующий сульфоксид. Окситоцин, не содержащий в аминокислотной последовательности триптофана и метионина, был получен из бисметоксибензильного производного цистеина при обработке 10%-ным раствором ДМСО в ТФУ в присутствии анизол в течение 12 ч при 25°C с выходом 73.5%. Кальцитонин человека (α-hCGRP) получали из бисадамантильного производного цистеина в тех же условиях в течение 1 ч (выход 17%).⁶⁸

Исследована⁷⁰ устойчивость производных окситоцина [1,6 Cys(Acm)] и [1 Cys(Acm), 6 Cys(SH)] к действию 10%-ного ДМСО в ТФУ. Первый оказался устойчивым в течение 12 ч, в то время как монозамещенное производное [1 Cys(Acm), 6 Cys(SH)] в течение 1 ч в тех же условиях превращалось в окситоцин с выходом 69% с примесью димера.

Сообщалось⁵⁹ о замыкании SS-связей под действием 10%- или 50%-ного ДМСО в 1 М HCl. Тиольные группы цистеина, защищенные Acm- или Mbzl-группами, предварительно деблокировали действием трифторметансульфоната серебра в ТФУ. В системе ДМСО–HCl осуществляются одновременно две химические реакции: конверсия Cys(Ag)-производных в цистеин и окисление остатков цистеина действием ДМСО. Таким способом были получены окситоцин, уротензин II, тахипленсин I, эндотелин-1 с выходами 72, 80, 79 и 62% соответственно в расчете на бис-Acm-производные. Побочных реакций по остаткам метионина, тирозина, триптофана не отмечалось.⁵⁹

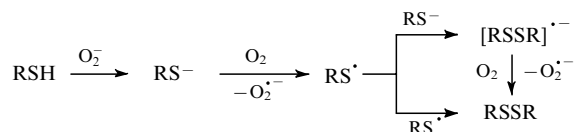
Использование ДМСО особенно эффективно в случае циклизации основных пептидов, которые не растворяются в слабощелочных растворах, необходимых для окисления кислородом или $K_3[Fe(CN)_6]$, например, в синтезе основных гидрофобных факторов роста, нерастворимых в слабощелочных водных растворах даже при добавлении 8 М мочевины.^{69,71} Преимущества этого метода были также продемонстрированы при синтезе натрийуретического пептида (pBNP) и тахипленсина I с двумя SS-связями.⁶⁷

Однако, помимо описанных выше преимуществ, этот метод имеет недостатки, связанные с трудностью удаления избытка ДМСО и образующегося в результате реакции диметилсульфида.

г. Окисление пероксидом водорода

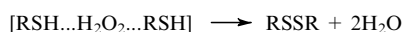
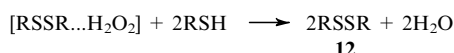
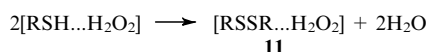
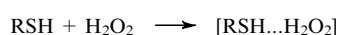
Пероксид водорода часто встречается в биологических системах и участвует в физиологических процессах окисления.⁷²

Поэтому использование этого окислительного реагента в синтезе пептидов вполне оправдано. Окисление тиолов H_2O_2 может протекать по двум направлениям: через образование либо тиолят-аниона RS^- , либо радикала $\text{RS}^\cdot$ (см.⁷³).



Проведение окисления в щелочных условиях ускоряет процесс образования тиолят-аниона, поэтому образование дисульфида в этом случае проходит с большей скоростью.⁷⁴

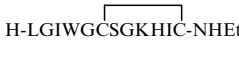
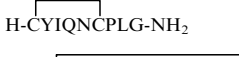
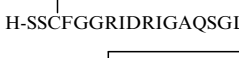
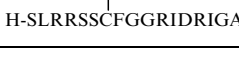
На примере окисления *N*-ацетилцистеина и глутатиона было показано,^{75,76} что процесс проходит через ряд комплексов тиола и дисульфида с H_2O_2 . При этом авторы^{75,76} подчеркивают важность наличия в реакционной системе воды, которая стабилизирует эти комплексы, создавая сольватную оболочку вокруг них.



Была изучена зависимость скорости этих реакций (в фосфатном буфере при pH 7) от соотношения концентраций $K = [\text{RSH}]/[\text{H}_2\text{O}_2]$. Образование комплекса **11** имеет место, когда $K < 2.5$, а свободного дисульфида **12** — при $K > 2.5$, т. е. когда концентрация оставшегося тиола $< 10^{-2}$ моль $\cdot$ л⁻¹.

В работах^{77,78} было проведено систематическое изучение возможности применения пероксида водорода для замыкания дисульфидных связей. В табл. 2 приведено сопоставление выходов, полученных на стадии замыкания дисульфидных связей в пептидах различной длины и структуры при помощи иода и пероксида водорода.⁷⁸ На примере синтеза ряда биологически активных пептидов, таких как антигенные

Таблица 2. Сопоставление выходов циклических пептидов при замыкании SS-мостика иодом (в AcOH или MeOH) и пероксидом водорода.

Соединение	Структура	Выходы (%)	
		I ₂	H ₂ O ₂
13		51	75–85 ^a
14		56	85–90 ^a
15		66	80–87 ^a
16		25	85–90 ^a
17		50	70–75 ^b
18		23	83
19		26	50
20		20	62

^a Приведен разброс выходов при окислении 0.1–1.5 г соответствующих бис-АсМ-производных пептидов; ^b разброс выходов при окислении 2.0–20.0 г бис-АсМ-производных окситоцина.

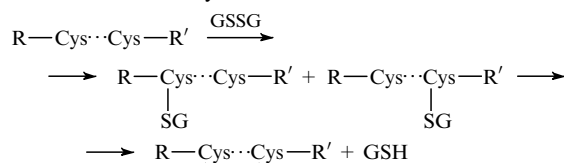
детерминанты белков ВИЧ (соединения **13–16** в табл. 2), атриальные (соединения **18–20** в табл. 2) и вазоконстрикторные пептиды[†], которые содержат чувствительные к окислению остатки триптофана, тирозина и метионина, было показано, что H_2O_2 позволяет получать целевые дисульфиды в течение 15–20 мин с высокими (60–85%) выходами без образования побочных продуктов.⁷⁸ Окисление проводили в водных растворах при pH 6.5–8. Показана также возможность использования H_2O_2 для получения препаративных (граммовых) количеств антигенных детерминант белков ВИЧ (соединения **13–16**) и окситоцина (**17**).⁷⁸

Имеются и другие сообщения об использовании H_2O_2 в синтезе окситоцина и вазопрессина.^{3,79} Пероксид водорода применяли⁸⁰ для циклизации пептидов, содержащих метионин (при pH 8–11), натрийуретического пептида человека (α -hNAP) и соматостатина в фосфатном буфере при pH 8.5 в течение 10 мин. Продукты были получены с высокой степенью чистоты и выходом, превышающим 90%.

По-видимому, применение пероксида водорода для циклизации имеет свои ограничения. Например, известно, что H_2O_2 может приводить к более глубокому окислению дисульфидов до сульфонов.⁷²

д. Окисление глутатионом

Еще одним способом замыкания SS-связей является использование буферов, имитирующих физиологические условия. Поскольку *in vivo* дисульфидные мостики образуются в восстановительных условиях, а восстановительная среда в клетках поддерживается глутатионовой системой (5 мМ восстановленного и 0.1 мМ окисленного глутатионов),⁸¹ наиболее часто для создания SS-связей используют буферные растворы, содержащие восстановленный и окисленный глутатион в соотношении 10:1.² Иногда применяют другие соотношения восстановленной и окисленной форм глутатиона, например, 1:1,⁸² 2:1⁸³ или 10:1.⁸⁴ Реакцию проводят в разбавленных растворах пептидных политиолов при pH 7.3–8.7, используя для растворения буфер 0.1–0.5 M Tris $\cdot$ HCl.^{83,84} Реакция окисления тиолов глутатионом проходит в два этапа.⁸⁵ Сначала восстановленный пептид, имеющий свободные SH-группы, взаимодействует с окисленным глутатионом (GSSG), давая смешанные дисульфиды, которые в результате внутримолекулярного тиол-дисульфидного обмена, образуют дисульфидные связи в пептидах и восстановленный глутатион.⁸⁵



Лимитирующей стадией этой реакции является взаимодействие пептида с GSSG, поэтому скорость реакции зависит от концентрации последнего. Окисление проводят при 25–35°C в течение 16–72 ч.^{82–83} Очистку продукта реакции проводят либо при помощи аффинной хроматографии,⁸² либо ВЭЖХ.^{83,84} Этим методом были получены 48-членный нейротоксин морского анемона (выход 22.8%),⁸⁴ ингибитор трипсина СМТИ III (выход 10%),⁸² а также пептиды эпидермального фактора роста человека (h-EGF)⁸³ и ω -ко-токсин.⁸⁶ Все эти пептиды содержат по три дисульфидные связи, замыкание которых проводили одновременно. Показано,^{82–86} что при использовании этого метода образуются преимущественно природные, термодинамически выгодные структуры. Однако применение смеси окисленной и восстановленной форм глутатиона, вероятно, ограничивается син-

[†] Атриальные — сосудорасширяющие, вазоконстрикторные — сосудосуживающие пептиды.

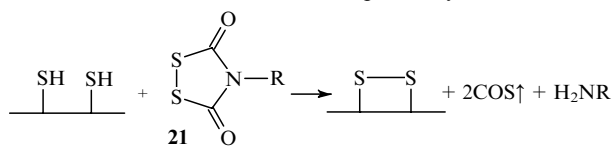
тезом достаточно больших молекул, имеющих термодинамически выгодную, физиологически активную конформацию. Вряд ли эта методика может быть широко использована для получения коротких пептидов, содержащих дисульфидные связи.

е. Использование полимеров

Оригинальный способ циклизации линейных SH-содержащих пептидов с использованием полимера EkathioxTM был предложен в работе⁸⁷. Это — смола (40–80 мкм с диаметром пор 100 Å), которая содержит 0.2–0.4 ммоль окисляющих функциональных групп на грамм. После 4 ч при 20°C окисляющий полимер удаляли фильтрацией. Эффективность полимера проверяли при получении окситоцина, выход которого составил 92%. Авторы⁸⁷ отмечали, что высокий выход и отсутствие побочных димерных продуктов обусловлены эффектом псевдоразбавления (глава III) при проведении реакции на твердой фазе.⁸⁷ Полимер EkathioxTM не модифицирует аминокислотные остатки триптофана, тирозина, метионина. Кроме того, возможно проведение окисления как в водной, так и в органической средах. Трудно оценить достоинства этого метода, так как природу функциональных групп авторы не указывают.

Еще один способ циклизации с использованием полимерных реагентов был предложен в работе⁸⁸.

N-Замещенные 2,3-дитиасукцинимиды **21** были использованы в качестве окисляющего реагента для образования внутримолекулярных дисульфидных мостиков в синтезе окситоцина и дезаминокситоцина в разных условиях.



R = CH₃, CH₂CO₂H, CH₂CO₂-(P),

где (P) — нерастворимый полимер.

В одном случае проводили реакции растворенных пептидов с дитиасукцинилацетилполимером, в другом — наоборот, пептидил-полимер реагировал с растворимым производным 2,3-дитиасукцинимидов. Скорость реакции зависит от pH реакционной среды. Исследована кинетика процесса в водных, органических и водно-органических средах. Недостатком этого метода является высокая реакционная способность производных дитиасукцинимидов, который необратимо окисляет боковые функции аминокислот.⁸⁸

ж. Другие реагенты

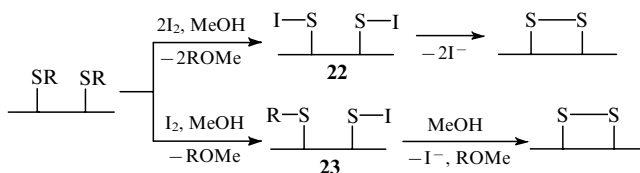
Для окисления свободных тиольных групп цистеиновых остатков использовали такие реагенты, как реактив Эллмана⁸⁹ и смесь CCl₄ с NEt₃.^{2,7} Широкого применения при окислении в растворе они не нашли, однако их использовали при циклизации на твердой фазе, поэтому подробнее эти реагенты будут рассмотрены ниже.

2. Удаление защитных групп с одновременным замыканием S—S-мостика

Одним из наиболее привлекательных методов создания дисульфидных связей является прямое превращение S-защитных пептидов в соответствующие дисульфиды. В настоящее время существует целый ряд реагентов, позволяющих осуществить подобные превращения.

а. Иод

Наиболее распространенным реагентом для создания дисульфидных связей является иод. Реакции Trt-, Acm-, Tmob-, Mob-групп и других защит тиольной функции цистеина с иодом хорошо изучены. Для объяснения превращения тиоэфира в дисульфид предложены два механизма.⁵ Один из них предполагает образование промежуточного сульфенил-йодида **22**, другой — S-алкил(арил)сульфенилйодида **23**.



R = Acm, Trt, Tmob, Mob.

До сих пор ни одному из этих механизмов не отдано предпочтение, хотя возможность протекания реакции по обоим направлениям была подтверждена результатами ряда исследований.⁵ Поскольку промежуточные сульфенил-йодиды очень реакционноспособны, успех окисления во многом зависит от аминокислотной последовательности пептида.

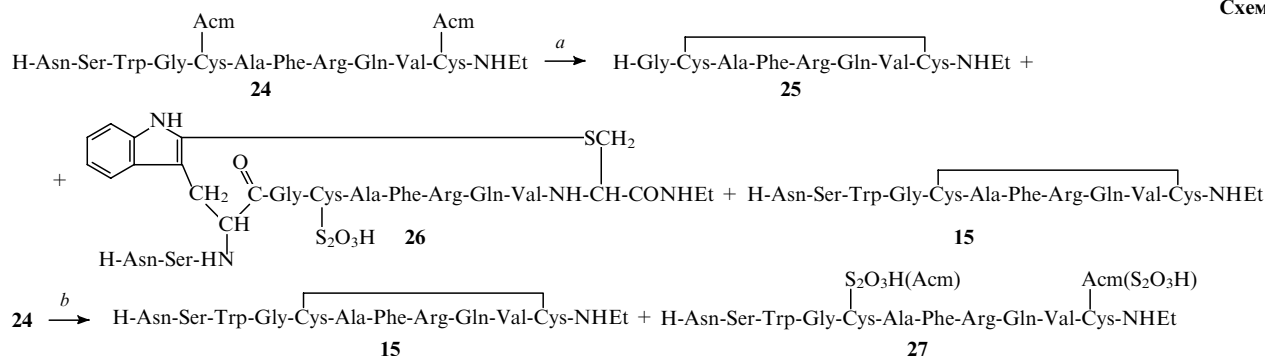
Существует несколько методик окисления защищенных пептидов иодом, в которых варьируются соотношение компонентов реакции окисления, растворитель, реагенты, применяемые для удаления избытков иода. Окисление проводят как в нейтральных растворителях, таких как MeOH или водный MeOH, трифторэтанол, диоксан, CHCl₃, ДМФА, так и в кислотах — уксусной, пропионовой, трифторуксусной или в их смесях с водой. В зависимости от типа защиты тиольной функции и растворителя, в котором проводится окисление, скорости реакции существенно различаются. Так, скорость окисления Cys(Trt) в MeOH, уксусной кислоте, диоксане и их смесях с водой в 4–500 раз выше скорости окисления Cys(Acm) в тех же растворителях. При окислении в хлороформе, дихлорметане, трифторэтаноле эта разница существенно больше. Это позволяет избирательно окислять Cys(Trt) в присутствии Cys(Acm). В ДМФА и его смесях с водой наоборот, скорость окисления Cys(Acm) в 5–10 раз выше скорости окисления Cys(Trt).²

Важную роль при окислении играет избыток иода. Имеются данные об использовании эквимольных количеств окислителя по отношению к [Cys(Acm)]₂-производному грамицидина С (реакция в метаноле завершалась за 3 ч, выход грамицидина С — 67%).⁹⁰ Использование 5–15-кратных избытков I₂ в AcOH позволяло получать циклические дисульфиды различной длины и структуры с хорошими выходами.^{66,91,92} В работах^{93,94} при применении 40- и 50-кратного избытка I₂ в AcOH выходы целевых продуктов были низкими (10%).⁹³

На примере получения циклического дисульфида **15** из бис-S-Acm-защитенного фрагмента 593–603 gr41 ВИЧ-2 **24** (схема 1) было изучено влияние на циклизацию количества иода и растворителя.^{55,78,95} При использовании 2–13-мольных избытков I₂ в AcOH выходы целевого вещества **15** не превышали 39%.^{55,78,95} Наилучший выход (66%) был получен при проведении окисления в водном метаноле с использованием 2 моль I₂ на моль пептида.^{78,95,96}

Для удаления иода используют тиосульфат натрия, аскорбиновую кислоту, цинковую пыль, экстракцию четыреххлористым углеродом.^{2,55,78,91–95} Отмечена^{55,78,95,96} модификация остатка цистеина тиосульфат-ионом при удалении избытков иода тиосульфатом натрия (соединения **26** и **27**, точное положение групп Acm и S₂O₃H в соединении **27** не определяли) (схема 1).

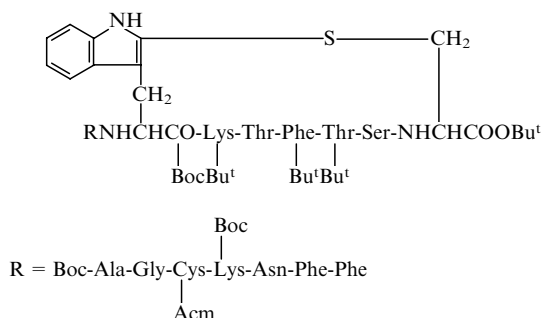
Схема 1



a) 13 моль I_2 на 1 моль пептида в AcOH ; b) 5 моль I_2 на 1 моль пептида в AcOH .

К ограничениям применения иода для замыкания дисульфидных связей следует отнести возможность протекания побочных реакций по чувствительным к окислению остаткам аминокислот: иодирование бензольного кольца тирозина,⁸ окисление метионина до соответствующего сульфоксида,⁸ разрушение индольного кольца триптофана с последующим разрывом пептидной цепи.^{8, 55, 78, 95–97} Так, образование укороченного пептида **25** (схема 1) явилось результатом окислительной деструкции триптофана в присутствии иода.^{78, 95} Поскольку эти реакции катализируются кислотами, то при проведении окисления в нейтральных органических растворителях разрыва пептидной цепи по триптофану иногда можно избежать.^{55, 95, 96, 98}

При окислении триптофансодержащих пептидов иодом возможно получение триптофан-2-тиоэфира — побочного продукта типа соединения **26**. Вероятно, одной из причин этой побочной реакции является образование промежуточных высокоактивных сульфенилиодидов. Триптофан-2-тиоэфиры были получены в различных условиях.^{42, 95, 98} Например, при синтезе соматостатина с разными защитами на остатках цистеина (в положении 3 — Ascm -группа, а в положении 14 — Trt -группа) действие иода в 10%-ном водном трифторэтаноле приводило к образованию 65% побочного продукта.⁹⁸



Авторы⁹⁸ объясняют протекание этой побочной реакции большой разницей в лабильности Ascm - и Trt -групп в трифторэтаноле.^{2, 98} При проведении окисления в смеси MeOH/DMF триптофан-2-тиоэфир не получался. Существенную роль при образовании триптофан-2-тиоэфиров играет расстояние между остатками цистеина и триптофана. При окислении иодом модельных триптофансодержащих пептидов было замечено, что если триптофан и цистеин отстоят друг от друга на один–два остатка глицина, то получаются только дисульфидные димеры. Если же их разделяют три или четыре остатка глицина, то в тех же условиях получается 40 и 70% триптофан-2-тиоэфиров соответственно.⁹⁸

В другом случае триптофан-2-тиоэфир образуется при использовании тиосульфата натрия для удаления иода в синтезе фрагмента белка gr41 ВИЧ-2 (при замене $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ на аскорбиновую кислоту это побочная реакция не проте-

кает). Блокирование тиольной функции одного из остатков цистеина тиосульфат-ионом (соединение **26**) приводит к реакции тиольной функции другого остатка цистеина по положению 2 индольного кольца триптофана.^{55, 78, 95}

Побочных реакций, затрагивающих индольное кольцо триптофана, в процессе циклизации иодом при использовании его N^{im} -формильного производного не наблюдалось.⁵⁸

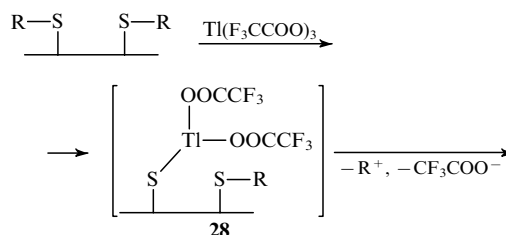
Несмотря на ограничения метода циклизации иодом, имеется множество примеров успешного его использования, в том числе и при синтезе сложных соединений с несколькими дисульфидными связями.^{54, 58, 66}

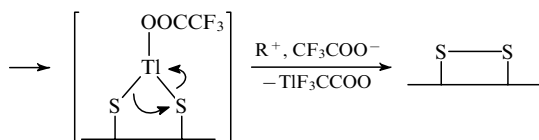
6. Иодциан и *N*-иодсукцинимид

Эти соединения также являются источниками иона I^{2+} . Механизм окисления этими реагентами аналогичен механизму окисления иодом. Отмечена хорошая растворимость ICN в водно-органических системах растворителей.⁹⁹ Возможность его применения была продемонстрирована при циклизации нескольких Cys(Ascm) -производных пептидов в водном метаноле. При сравнении окисления иодцианом и иодом отмечено, что, хотя в первом случае требовались большие избытки окислителя (от 25- до 80-кратных) и длительность реакций составляла 24–48 ч, выходы были примерно вдвое выше, чем при использовании I_2 . *N*-Иодсукцинимид применяли для синтеза окситоцина и вазопрессина на полимере,¹⁰⁰ поэтому этот реагент будет подробно рассмотрен ниже.

в. Трифторацетат таллия(III)

Новый, достаточно эффективный окислитель, $\text{Ti}(\text{F}_3\text{CCOO})_3$, предложен в 1987 г. для удаления ряда защитных групп цистеина с одновременным замыканием дисульфидной связи.^{9, 101} Трифторацетат таллия удаляет многие защитные группы тиоэфирного типа (Mob , Tmob , Bu^t , Trt , Xan , Ad , Meb) и производные тиазолидинов (Ascm , Phacm). Окисление протекает через образование высокоактивного промежуточного соединения **28** — соли пептида и таллия(III). На заключительном этапе происходит отщепление защиты от тиольной группы второго остатка цистеина и замыкание дисульфидной связи.





Окисление проводят в трифторуксусной кислоте при 0°C в течение 1–2 ч в присутствии 2 экв. анизола для связывания образующихся карбокатионов,^{9,101} или в ДМФА.^{2,7} Использование водных растворителей в этом случае исключается, поскольку в присутствии воды отмечалось образование небольших количеств цистеиновой кислоты.⁹ Так как соли таллия хорошо растворимы в эфире, их удаление не представляет трудностей.⁹

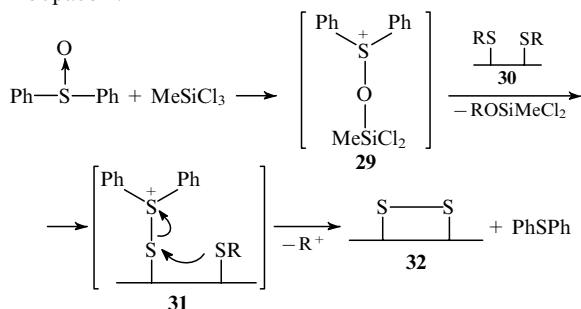
Применение $Tl(CF_3COO)_3$ дало неплохие результаты при синтезе окситоцина, уротензина II и кальцитонина человека. Выходы очищенных гель-фильтрацией продуктов составили 45, 35 и 11% соответственно.¹⁰¹ Снижение выходов в последних двух случаях объясняется наличием в аминокислотной последовательности этих пептидов остатка триптофана, который значительно модифицируется. Показано, что в этих условиях остается лишь 38% неповрежденного триптофана. Использование $Trp(Mts)$ -производного позволяет сохранить триптофан в течение 60 мин при обработке $Tl(CF_3COO)_3$ при 0°C. При окислении солями $Tl(III)$ метионин частично (на ~38%) окисляется до соответствующего сульфоксида.⁹

Этот реагент дает хорошие результаты в случае трудно-окисляемых тиолов, когда остатки цистеина расположены рядом, например, в пептидном фрагменте никотинового рецептора ацетилхолина (альфа 185–196).⁵³

При сравнительной оценке эффективности окислителей — кислорода воздуха, феррицианида калия и трифтороацетата таллия(III) — в синтезе некоторых соединений наиболее высокие выходы были получены при использовании последнего.^{17,53} Широкое применение $Tl(CF_3COO)_3$ нашел при замыкании дисульфидных связей на полимере.^{7,17,102} Высокая токсичность солей таллия накладывает ограничения на масштаб работ, которые вряд ли выйдут за рамки лабораторных.

г. Сульфоксиды в присутствии хлорсиланов

Этот метод циклизации предложен в 1991 г. независимо двумя авторами — Кисо^{103,104} и Фуджи.¹⁰⁵ Арил(алкил)сульфоксиды в присутствии хлорсиланов в трифторуксусной кислоте могут отщеплять $Acsm$, $Tasm$, Vam , Bu^t , Meb и другие защитные группы цистеина с одновременным замыканием SS-мостиков в течение 10–30 мин при 4°C. Механизм этой реакции может быть представлен следующим образом:^{103,104}



Замыкание дисульфидной связи проходит через образование сульфоний-катиона **31**, получающегося при обработке защищенного пептида **30** дифенилсульфоксидом и хлорсиланом. Далее, электрофильная атака второго замещенного атома серы в соединении **31** приводит к образованию SS-мостика и отщеплению защитной группы, аналогично реакции сульфенилиодида с S-защищенным цистеином при

окислении иодом. Природа хлорсилана, по-видимому, играет главную роль в реакционной способности промежуточного соединения **29**. Важна также способность отщепляющей защитной группы образовывать стабильные структуры, подобно иммоний-иону из $Acsm$ -группы. Эти два фактора и определяют скорость реакции.¹⁰⁴

Была изучена эффективность использования в этой реакции различных силилхлоридов ($SiCl_4$, $MeSiCl_3$, Me_3SiCl), $(Me)_4Si$ и сульфоксидов ($PhS(O)Ph$, $MeS(O)Me$, $MeS(O)Ph$).¹⁰⁴ Наиболее эффективными силилирующими реагентами оказались $SiCl_4$ и $MeSiCl_3$. Разницы в реакционной способности различных сульфоксидов замечено не было.¹⁰⁴ Система $Ph_2SO - MeSiCl_3$ или $SiCl_4$ одинаково эффективно удаляет защитные группы $Acsm$, Mob , Meb , Bzl , Bu^t .¹⁰⁵

Побочным реакциям в этих условиях подвержен триптофан. Реакция хлорирования индольного кольца является доминирующей при обработке триптофансодержащего пептида хлорсиланом.^{104,106} Добавление в реакционную среду сквенджеров (анизола и 3-метилиндола), используемых обычно для предотвращения модификации триптофана, оказалось неэффективным.¹⁰⁴ Поэтому рекомендуется использовать триптофан в виде формильного производного.^{103,104,106} Тем не менее успешное применение этого реагента было продемонстрировано на примере синтеза соматостатина с выходом 60%,^{104,106} окситоцина¹⁰⁴ с выходом 56–69%, натрийуретического пептида человека ($hBNP$)¹⁰⁴ с выходом 50%. Этот метод также использовали при региоселективном образовании дисульфидных связей в синтезах конотоксина M1 и инсулина человека.¹⁰⁷

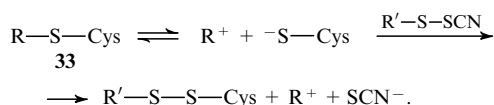
3. Замыкание дисульфидных связей через тиолиз или тиол-дисульфидный обмен

Для реализации метода В необходимо наличие двух различных по устойчивости защитных групп двух остатков цистеина. Это дает возможность селективно удалить одну из защит (Y), в то время как другая (X^*), активируя атом серы цистеина, способствует образованию дисульфидной связи. При этом промежуточное электрофильное производное ($-S-X^*$ в соединении **7**) подвергается нуклеофильной атаке сульфгидрильной группы второго остатка цистеина. Этот метод применяется для замыкания как внутри-, так и межмолекулярных SS-связей. Особенно широко он используется в случае создания несимметричных дисульфидов. Методы группы А и Б менее пригодны для этой цели. Это связано с тем, что при создании SS-связи между двумя различными пептидными цепями, одновременное окисление двух цистеиновых остатков приводит преимущественно к димерам, а несимметричные дисульфиды образуются в небольших количествах. Пептидные тиолы активируют введением электроноакцепторных заместителей, которые увеличивают способность серы к нуклеофильному замещению. Активация может осуществляться либо *in situ*, либо как отдельная стадия с выделением и характеристикой промежуточного соединения, либо путем подбора необходимых защитных групп. В последнем случае защиты (например, дисульфидного типа) должны обладать достаточной стабильностью в условиях наращивания пептидной цепи и одновременно обеспечивать создание дисульфидной связи на основе тиол-дисульфидного обмена.

а. Родан (SCN)₂

Этот реагент был предложен Хиски.^{2,6} Родан реагирует как со свободными, так и с защищенными тиолами. Получающийся в результате реакции активированный пептид ($X^* = SCN$ в соединении **7**) *in situ* реагирует с тиольной группой того же или другого пептида, образуя дисульфидную связь. Установлено, что этот реагент избирательно

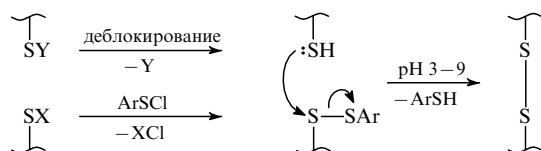
взаимодействует с Thr- и Trt-производными пептидов в присутствии Dpm- и Bzl-защит.^{5,6} Взаимодействие родана с тиоэфирами можно представить как реакцию электрофила с диссоциированной формой тиоэфира.⁵



Скорость реакции определяется степенью диссоциации соответствующего защищенного производного 33. Степень диссоциации в свою очередь зависит от стабильности образующегося при отщеплении катиона R⁺. Поэтому Trt- и Mob-производные пептидов циклизуются быстро и специфично даже в неполярных растворителях, в то время как Dpm-тиоэфиры реагируют медленно и превращаются в соответствующие дисульфиды с выходом только 60–75%.⁵ Степень диссоциации производного 33 можно повысить, используя кислотный катализ. Для расщепления Dpm- и Bu^t-эфиров требуются более сильные кислоты, чем для расщепления Trt- и Mob-производных. Если реакция с роданом протекает медленно (например, с Bzl-производными), увеличивается вероятность образования побочных гомодимерных продуктов.^{5,2} Высокая электрофильность родана в значительной степени провоцирует протекание побочных реакций.² Так как родан расщепляется аминами (в том числе свободными основаниями аргинина и гистидина), реакции с ним можно проводить только в кислой или нейтральной среде.

б. Ароматические сульфенилгалогениды

2-Нитробензолсульфенилхлорид (Nps-Cl) или 2-пиридинсульфенилхлорид (PyS-Cl) активируют свободные или защищенные остатки цистеина. В общем виде замыкание дисульфидных связей этими реагентами может быть представлено следующим образом:²



В случае межмолекулярного замыкания SS-связей, Y — защитная группа любого типа, а X — водород или защитная группа, удаляемая ароматическими сульфенилгалогенидами, например, Trt, Dpm, Bu^t, SBu^t, Acm.

Соединения Nps-Cl и PyS-Cl чрезвычайно реакционноспособны, но разлагаются в присутствии влаги. 2-Пиридинсульфенилхлорид был предложен для деблокирования цистеина, защищенного Trt-, Dpm-, Acm-, Bu^t-, SBu^t-группами и последующего получения несимметричных дисульфидов.¹⁰⁸ Реакции с ним проводят в безводной уксусной кислоте. Образующийся реакционноспособный смешанный дисульфид в результате взаимодействия со свободной SH-группой дает целевой дисульфид. Смешанный дисульфид Cys(PyS) стабилен к действию кислот. Удаление Boc-группы в производном Boc-Cys(PyS)-OH действием кислот не сопровождается отщеплением PyS-группы. Активация тиолов и образование дисульфидных связей происходят без удаления таких защитных групп, как Boc, Z, Bzl. PyS-Производные пептидов получают с количественными выходами. Их можно выделять в кристаллическом виде. Смешанные дисульфиды Cys(PyS) и их пептиды неустойчивы в щелочных растворах и быстро разлагаются, давая симметричные дисульфиды и ди(2-пиридил)дисульфид. Получение свободных SH-групп возможно под действием избытков тиолов (например, β-меркаптоэтанола).¹⁰⁸

2-Нитробензолсульфенилхлорид применяли для удаления Trt-, Dpm-, Ddm- и Acm-защитных групп.¹⁰⁹ Промежуточные смешанные дисульфиды могут быть выделены. Свободные SH-производные можно получить действием избыточных количеств тиолов (например, β-меркаптоэтанола или дитиотреита). Реакции деблокирования и образования дисульфидных связей с использованием Nps-Cl проходят значительно медленнее, чем с PyS-Cl.¹⁰⁸

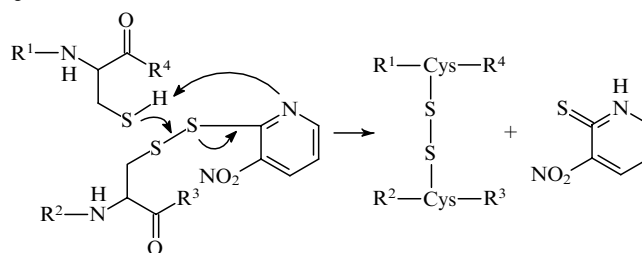
Применение ароматических сульфенилгалогенидов ограничено трудностями их получения и выделения (легко гидролизуются даже в присутствии влажного воздуха), а также склонностью триптофана к побочным реакциям в присутствии этих соединений.

Пептиды, содержащие цистеин со свободными SH-группами, могут активироваться непосредственно в растворе или на твердой фазе при помощи ди(2-пиридил)дисульфида. Высокоспецифичное превращение Cys(Snm)-производного цистеина в Cys(PyS)-производное под действием 2-меркаптопиридина в хлороформе представляет еще один способ получения стабильных S-арилсульфенильных производных.² Наконец, цистеинсодержащие пептиды могут реагировать в буферном растворе при pH 7.4 с реагентом Элмана, давая промежуточные дисульфиды. Взаимодействие последних со свободной SH-группой другого остатка цистеина, также приводит к замыканию SS-мостиков.²

в. Дисульфидные производные

Своеобразие этого метода заключается в том, что дисульфидные производные выполняют двоякую функцию. С одной стороны, их используют в качестве защитных групп тиольной функции цистеина, устойчивых в условиях многостадийного синтеза пептидов. С другой стороны, являясь сильными электроноакцепторами, они активируют тиольную группу в реакциях тиол-дисульфидного обмена и тиолиза, облегчая тем самым замыкание SS-связей. Такими защитами являются: алкоксикарбонилтио- (Scm, Sce), Snm- и Npys-группы.

С использованием пептидов, содержащих Cys(Npys)-производные, были синтезированы несимметричные дисульфиды.^{17,110}

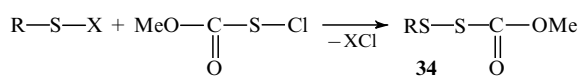


R¹, R², R³, R⁴ — аминокислоты.

Производные, содержащие Npys-защиту, применяли также и для получения производных, содержащих внутримолекулярные дисульфидные связи.² Реакция проходит в довольно широком интервале pH. Время реакции колеблется от нескольких часов при pH ~4 до 30 мин при pH 8–9. Однако при pH >9 возможно диспропорционирование дисульфидов, которое смещает реакцию в сторону образования симметричных гомодимеров. При низких значениях pH вероятность дисульфидного обмена между уже образовавшимися несимметричными цистинами и имеющимися свободными SH-группами уменьшается. Оптимальными являются значения pH 4.45–9.35. Устойчивость Npys-защитной группы в кислых средах (ТФУ при 25°C и HF при 0°C при отсутствии тиолов) позволяет использовать защищенные цистеиновые производные в условиях твердофазного синтеза в Boc-технике. Эту защиту успешно

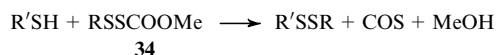
применяли для создания SS-мостиков в синтезе инсулина, его аналогов и релаксина.¹⁷

Метоксикарбонилсульфенилхлорид (Scm-Cl) может, как и ароматические сульфенилгалогениды, отщеплять такие защитные группы, как Trt, Acм, Bu^t, Ddm, Dpm, с образованием Cys(Scm)-производных:¹¹¹



X — Trt, Acм, Bu^t, Ddm, Dpm.

Соединение **34** реагирует со свободными тиолами, образуя дисульфидные связи:



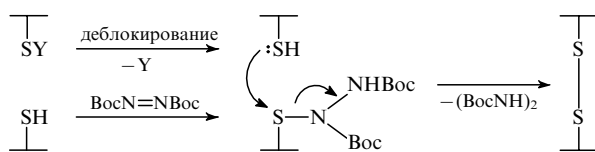
Последняя реакция катализируется мягкими основаниями, например, триэтиламин.¹¹¹ Сульфенилтиокарбонаты неустойчивы в присутствии щелочей и работа с ними должна проводиться в нейтральных или кислых средах. При этом, однако, возможна нежелательная модификация триптофана. Превращение Acм-производных в Scм-производные или реакцию свободных SH-групп с Cys(Scм) можно также проводить и на твердой фазе² с образованием как межмолекулярных, так и внутримолекулярных дисульфидных связей.

Для создания внутримолекулярных дисульфидных связей был предложен¹¹¹ этоксикарбонилсульфенилхлорид (Sce-Cl). Этот реагент аналогичен по структуре и механизму действия Scм-Cl. Образующиеся активированные производные цистеина реагируют со свободными тиольными группами, приводя к образованию внутримолекулярных дисульфидных мостиков. Оптимальные результаты получены в аммоний-ацетатном буфере при pH 7. Однако можно проводить реакцию и в слабых растворах; выходы при этом несколько ниже. Отмечается высокая скорость реакции (циклизация завершается за 10 мин), однако не удалось подобрать условия реакции, в которых выходы превышали 20–30%.¹¹¹ Применение Sce-Cl к триптофансодержащим пептидам проблематично.¹¹¹ Тем не менее этот реагент был использован при получении соматостатина, уротензина ПА¹¹¹ и ингибитора трипсина.⁵⁶

г. Бис(*трет*-бутил)азодикарбоксилат

Замыкание дисульфидной связи при помощи бис(*трет*-бутил)азодикарбоксилата происходит через тиолиз. Он не получил широкого распространения, хотя имеются упоминания о его успешном использовании в синтезе несимметричных дисульфидов.^{112, 113}

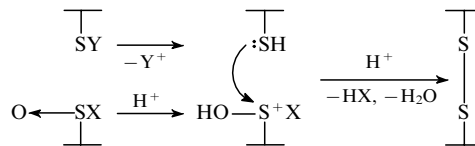
Получение активированного производного одного из пептидов проводили в ДМФА с 2–3 экв. бис(*трет*-бутил)азодикарбоксилата в токе аргона в течение 4–12 ч при 25°C.^{112, 113} Полученное соединение достаточно устойчиво и может быть выделено. Активированное производное растворяют в подходящем растворителе и добавляют второй пептид, содержащий свободную сульфгидрильную группу для образования дисульфидного гетеродимера.



BocN=N⁺Boc — бис(*трет*-бутил)азодикарбоксилат.

д. Использование сульфоксида цистеина

Этот метод применяется для замыкания как внутри-, так и межмолекулярных SS-связей. Один из остатков цистеина используют в виде сульфоксида.¹¹⁴ Реакция протекает в сильно кислой среде (ТФУ или смесь трифторметансульфокислоты и ТФУ). В этих условиях сульфоксид протонируется и образовавшееся электрофильное производное легко взаимодействует с нуклеофильным тиолом.

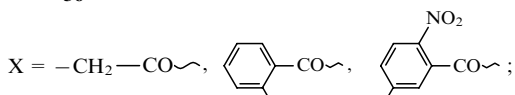
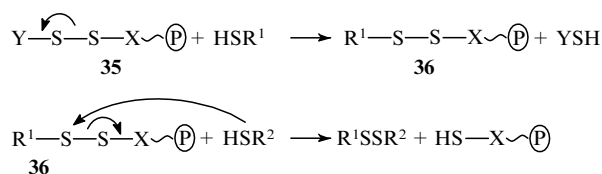


Y — Mbzl, Ad, Bu^t; X — Acм или Mob.

Использование диметилсульфида ускоряет реакцию и способствует регенерации SH-группы. Эффективность метода была продемонстрирована на примере синтеза оксигенина, который был получен из Cys(Acм)(O)- и Cys(Mbzl)-производных с выходом 86%.¹¹⁴

е. Использование дисульфидсодержащих полимеров

В работе¹¹⁵ предложен оригинальный метод получения несимметричных дисульфидов с использованием полимерных носителей, содержащих дисульфидные фрагменты в составе якорной группы. В основе этого метода лежит реакция тиол-дисульфидного обмена. На первом этапе пептидный тиол HSR¹ взаимодействует с якорной группой полимера **35** с образованием дисульфидного пептидил-полимера **36**. На втором этапе соединение **36** взаимодействует со вторым пептидом HSR², в результате чего от полимера отщепляется целевой дисульфид R¹SSR².



Y = 3-нитро-2-пиридил; (P) = (Bio-Gel P-2)–NH–(CH₂)₂–NH–;

R¹, R² — остатки полипептида.

Были подобраны оптимальная якорная группа для полимера и условия проведения реакции. При X = –CH₂–CO– реакция проходила медленно (48 ч). Если в качестве X применялись остатки бензойной или нитробензойной кислот, реакция проходила значительно быстрее, а выходы целевых гетеродимеров составляли 60–70%. Этот метод имеет свои преимущества. В частности, используемый в реакции полимер легко регенерируется, присоединение пептида к полимеру облегчает процесс очистки реакционной смеси от избыточных количеств реагентов, побочных продуктов и других примесей, удаляемых простой фильтрацией.¹¹⁵

4. Замыкание дисульфидных связей на полимерном носителе

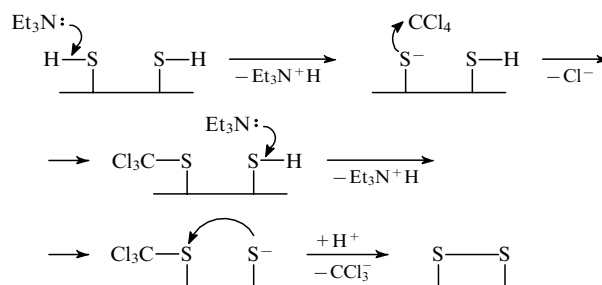
В процессе поиска более удобных способов циклизации было высказано предположение о возможности создания SS-связей непосредственно на полимерном носителе. Проведение

этого процесса на полимере имеет ряд преимуществ. Поскольку процесс окисления требует высоких разбавлений, то твердофазная система может быть идеальной в этом отношении. При набухании пептидил-полимера в соответствующем растворителе расстояние между соседними пептидными цепями увеличивается и взаимодействие между ними становится минимальным. Это явление называется псевдо-разбавлением и имитирует разбавление в растворе. Расстояние между молекулами можно увеличивать, уменьшая степень замещения полимера стартовой аминокислотой. Жесткое закрепление молекул ограничивает их конформационную подвижность, уменьшая межмолекулярные взаимодействия, что обеспечивает преимущественное протекание внутримолекулярных процессов.⁷ Проведение окисления на полимере дает возможность обойти проблему растворимости пептидов. Во многих случаях системы растворителей, состав которых продиктован условиями циклизации, не позволяют достичь полного растворения окисляемых пептидов, что с неизбежностью ведет к потерям продукта и снижению выхода. Кроме того, в твердофазном синтезе значительно облегчен процесс обработки реакционной смеси. Так, удаление избытка окислителя и побочных продуктов осуществляется простой фильтрацией. Поскольку реакция окисления часто является равновесной, возможно смещение равновесия в сторону образования целевого продукта путем повторной обработки пептидил-полимера свежей окисляющей смесью. Процесс окисления может быть автоматизирован и включен в протокол синтеза после завершения наращивания пептидной цепи. Однако, несмотря на свою внешнюю простоту, существование трехфазной системы (пептид – полимер – растворитель) вносит определенные трудности в процесс циклизации. В настоящее время нет полного понимания природы взаимодействия между пептидными цепями, связанными с полимером, и между полимером и пептидом. Тем не менее в последнее время появились примеры успешной циклизации на твердой фазе. Важное значение при окислении пептидов на полимере имеет выбор подходящего растворителя. Растворитель должен обеспечивать хорошее набухание пептидил-полимера с целью максимального увеличения доступа окислителя к пептиду. В качестве таких растворителей чаще всего используют ДМФА, CH_2Cl_2 , CCl_4 , AcOH , трифторэтанол, ТФУ, *N*-метилпирролидон.^{2, 7, 15, 89, 100, 116–119} Использование водных растворов в случае традиционных полистирольных носителей, по-видимому, исключено. Замыкание SS-связей пептида на полимере, так же как и в растворе, можно проводить как с предварительным, так и с одновременным отщеплением защитных групп сульфидрильных функций цистеина. При деблокировании цистеина солями тяжелых металлов для удаления ионов Hg(II) или Ag(I) необходимо подбирать реагенты, позволяющие переводить их в растворимые производные. С этой целью рекомендуют² использовать β -меркаптоэтанол, образующий с Hg(II) соли, растворимые в больших количествах ДМФА.

Систематическое изучение замыкания дисульфидных связей на полимерных носителях было предпринято на примере синтеза модельных пептидов и окситоцина.^{2, 89, 116} Циклизацию осуществляли на полимерных носителях с различными якорными группами с использованием разных реагентов. При синтезе применяли цистеин в виде его Cys(Fm) -, Cys(Trt) -, Cys(Acm) -⁸⁹ и Cys(Tmob) - производных.^{14, 15} Показано, что в условиях кислотного отщепления (ТФУ и HF) циклического пептида от носителей с *n*-алкоксибензильными и бензгидриламиными якорными группами дисульфидная связь достаточно устойчива.^{89, 116} Однако в условиях отщепления пептидов от носителей с фотолabileными якорными группами SS-связь претерпевает изменения, поэтому для получения удовлетворительных результатов требуется подбор специальных условий. Замыкание дисульфидных связей проводили кислородом воздуха (ДМФА, pH 7–8, 1 ч),

реагентом Элмана (0.1 М ацетат *N*-метилморфолина в ДМФА, pH 7.5, 1 ч), диэтилазокарбоксилатом (0.5 экв., ДМФА, pH 7.0, 2 ч).⁸⁹ Авторы⁸⁹ отмечали, что получение окситоцина этими методами на полимере проходило с более высокими выходами, чем при окислении в растворе.

Для окисления на полимере использовали смесь CCl_4 и NEt_3 (1 : 1) в ДМФА или *N*-метилпирролидоне.^{2, 7, 15} Предполагаемый механизм этой реакции представлен ниже.⁷



Целевой окситоцин получали с выходом $\sim 70\%$; образования побочных продуктов не наблюдали.

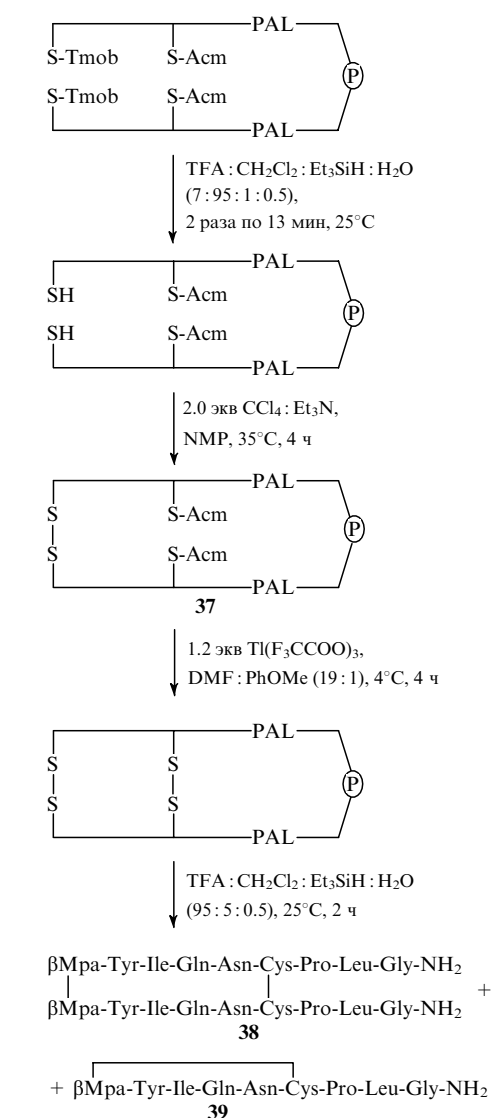
Для окисления на полимере 26-членного пептида, содержащего свободные SH-группы, использовали 1М раствор феррицианида калия в ДМФА. Через 12 ч был получен циклический дисульфид с хорошим выходом.²

При окислении на твердой фазе хорошо зарекомендовали себя методы прямого превращения цистеин-защитных пептидов в дисульфиды (I_2 , $\text{Ti}(\text{CF}_3\text{COO})_3$). Стандартные условия окисления включают обработку цистеин-защитных (Acsm -, Trt -, Tmob -защиты) пептидил-полимеров 3–10 экв. I_2 в подходящем растворителе (ТФУ, AcOH , ДМФА и др.) при 25°C в течение 1–2 ч или 1.2 экв. $\text{Ti}(\text{CF}_3\text{COO})_3$ при 0°C в течение 1–2 ч. Выходы циклических продуктов при этом составляют 60–90%.^{89, 117} При обработке пептидил-полимеров с кислотолабильными якорными группами (*n*-алкоксибензильные или трис(алкокси)бензил-амидные) растворами I_2 или $\text{Ti}(\text{F}_3\text{CCOO})_3$ в ТФА или AcOH замыкание SS-мостиков и отщепление пептида от полимерного носителя происходит одновременно. Этот прием использовали в работе¹¹⁸: кислотолабильную 2-хлор-триметилную якорную группу расщепляли смесью AcOH : трифторэтанол : CH_2Cl_2 (1 : 2 : 7). При использовании этой смеси с 10 экв. I_2 в течение 10–15 мин при 20°C получали циклические дисульфиды с выходами $\sim 60\%$. Защитные группы *трет*-бутильного типа при этом не отщеплялись.¹¹⁸

В отдельных работах^{89, 102, 116} отмечено преимущество прямого превращения Cys(Acm) - и Cys(Trt) -производных пептидов в соответствующие дисульфиды с использованием солей Ti(III) по сравнению с иодом. При обработке $\text{Ti}(\text{F}_3\text{CCOO})_3$ в смеси ТФУ : анисол (21 : 1) S-Acm - или S-Trt -производных модельного пептида $\text{Ac-Cys(Acm)-Pro-DVal-Cys(Acm)-NH}_2$ с последующим отщеплением от полимера действием HF выход циклического продукта составил 91%, а при использовании 10 экв. I_2 в водной AcOH — 52%.^{89, 116} В последнем случае снижение выхода могло быть обусловлено не природой окислителя, а использованием смеси AcOH с водой (1 : 4 по объему), которая препятствует хорошему набуханию пептидил-полимера полистирольного типа.

Циклизация на твердой фазе оказалась эффективной для получения параллельных димеров окситоцина и дезаминокситоцина.^{7, 119} Получить такие соединения в растворе не удавалось, так как в разбавленных растворах преимущественно получались мономерные продукты, а при высоких концентрациях — полимеры.¹¹⁹ Жесткое закрепление пептида на полимере позволило получить целевой димер с хорошим выходом. Синтез параллельного димера дезаминокситоцина представлен на схеме 2.

Схема 2



Ⓟ — сополимер стирола с 1% дивинилбензола, PAL — трис(алкокси)бензамидная якорная группа, NMP — *N*-метилпирролидон, βMpa — β-меркаптопропионовая кислота.

Для замыкания SS-связи между N-концевыми остатками β-меркаптопропионовой кислоты (βMpa), блокированными Tmob-защитной группой, использовали смесь CCl_4 – NEt_3 с предварительной обработкой пептид-полимера разбавленной ТФУ с соответствующими скэвенджерами. В результате получался полупродукт **37** с выходом более 90%. После замыкания второй дисульфидной связи действием $\text{Ti}(\text{F}_3\text{CCOO})_3$ и отщепления продукта реакции от полимера была получена смесь целевого параллельного димерного продукта **38** и дезаминокситоцина **39** в соотношении 3 : 1. Является ли образование последнего побочной межмолекулярной реакцией вследствие окисления $\text{Ti}(\text{F}_3\text{CCOO})_3$ или следствием дисульфидного обмена в димере, осталось невыясненным.¹¹⁹ Была опробована также схема с альтернативным сочетанием защитных групп: Cys(Tmob) и βMpa(AcM). В этом случае в первую очередь замыкали дисульфидную связь между остатками цистеина. Интересно отметить, что при таком порядке замыкания SS-связей образование промежуточного продукта с одним дисульфидным мостиком в цистеине проходило с выходом лишь 20%.

В работе¹⁰⁰ представлены оригинальные результаты по замыканию SS-связей *N*-йодсукцинимидом в смеси ДМФА : CH_2Cl_2 (1 : 1) при синтезе фрагмента (1–29) гор-

мона роста человека с одной дисульфидной связью (выход 15.6%) и 18-членного пептида апамина с двумя SS-связями (выход 11%). При этом замыкание SS-мостиков проводили не по окончании синтеза линейных пептидов, как обычно принято, а включили в протокол твердофазного синтеза автоматического пептидного синтезатора в Вос-технике. После присоединения необходимой пары остатков цистеина между ними замыкали дисульфидную связь и продолжали наращивание пептидной цепи. Для блокирования тиольных функций цистеина использовали AcM- и Mbzl-защитные группы. Применение аналогичного метода для синтеза окситоцина дало чрезвычайно низкие (~1%) выходы циклического продукта, хотя [8 Arg]вазопрессин в тех же условиях получен с выходом 41%. Вопрос о причинах низкого выхода окситоцина остается открытым. Попытка авторов¹⁰⁰ объяснить этот факт межмолекулярной агрегацией Cys(AcM)-производных окситоцина, на наш взгляд, противоречит данным работ Альберичио,^{89,116} согласно которым циклизация именно окситоцина на полимере в различных условиях протекает с достаточно высокими выходами, часто превышающими выходы при циклизации в растворе.

IV. Заключение

Рассмотренные выше методы создания дисульфидных связей, как правило, позволяют получать соединения с одной или двумя SS-связями. Однако каждый из рассмотренных методов имеет свои ограничения. Чаще всего эти ограничения касаются чувствительных к окислению аминокислот — тирозина, триптофана, метионина. Несмотря на интенсивное развитие методологии современной пептидной химии, универсального способа циклизации не существует, и практически каждый раз при создании SS-связи в новом соединении требуется отдельная работа по подбору как наиболее подходящей защитной группы тиольной функции цистеина, так и реагента для циклизации. В этой связи является актуальной дальнейшая разработка новых защитных групп тиольной функции, селективных методов деблокирования SH-групп, методов специфической активации тиольной групп, мягких реагентов для создания SS-мостиков. Решение этих задач приобретает особое значение при синтезе соединений с несколькими внутри- или межмолекулярными SS-связями. В настоящее время имеются лишь единичные примеры получения таких соединений. Синтез подобных сложных молекул является задачей ближайшего будущего. Наиболее перспективными и многообещающими представляются методы замыкания SS-связей на твердой фазе. Дальнейшее развитие и совершенствование этого подхода, возможно, позволит существенно облегчить трудоемкие и часто непредсказуемые процессы циклизации, автоматизировать их путем включения этой стадии в программу пептидного синтеза.

Литература

1. И.Фотаки. В кн. *Химия полипептидов*. (Под ред. П.Катсояниса). Мир, Москва, 1977. С. 72
2. D.Andrey, F.Albericio, N.A.Sole, M.C.Munson, M.Ferrer, G.Barany. In *Peptide Synthesis Protocols*. (Eds M.W.Pennington, B.M.Dunn). Humana Press, New Jersey, 1994. P.91
3. О.С.Папсуевич, Г.И.Чипенс, С.В.Михайлова. В кн. *Нейрогипофизарные гормоны*. Зинатне, Рига, 1986. С.6
4. *Synthetic Peptides in Biology and Medicine*. (Eds K.Alitalo, P.Partanen, A.Vaheri). Elsevier, Amsterdam, 1985
5. Р.Г.Хиски, В.Р.Пао, В.Дж.Роудс. В кн. *Защитные группы в органической химии*. (Под ред. Дж.МакОми). Мир, Москва, 1976. С.224
6. R.G.Hiskey. In *The Peptides. Vol.3*. (Eds E.Gross, J.Meienhofer). Academic Press, New York, 1981. P. 137
7. M.C.Munson. PhD Thesis, University of Minnesota, USA, 1993

8. G.Barany, R.B.Merrifield. In *The Peptides. Vol.2.* (Eds E.Gross, J.Meienhofer). Academic Press, New York, 1981. P.3
9. N.Fujii, A.Otaka, S.Funakoshi, K.Bessho, T.Watanabe, K.Akaji, H.Yajima. *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 2339 (1987)
10. M.Yoshida, M.Shimokura, Y.Fujiwara, T.Fujisaki, K.Akaji, Y.Kiso. *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 382 (1990)
11. O.A.Tamamura, W.Takada, Y.Terakawa, H.Yoshizawa, M.Masuda, T.Ibuka, T.Murakami, H.Nakashima. *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 12 (1995)
12. O.Nishimura, C.Kitada, M.Fujino. *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 1576 (1978)
13. N.Fujii, A.Otaka, S.Funakoshi, M.Nomizu, K.Akaji, H.Yajima, I.Yamamoto, K.Torizuka, K.Kitagawa, T.Akita, K.Ando, T.Kawamoto, Y.Shimonishi, T.Takao. *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 613 (1986)
14. M.C.Munson, C.Garcia-Echeverria, F.Albericio, G.Barany. *J. Org. Chem.*, **57**, 3013 (1992)
15. M.C.Munson, G.Barany. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 10203 (1993)
16. S.N.McCurdy. *Pept. Res.*, **2**, 147 (1989)
17. E.E.Bullesbach. *Kontakte (Darmstadt)*, 21 (1992)
18. N.Fujii, A.Otaka, T.Watanabe, A.Okamachi, N.Tamamura, H.Yajima, Y.Inagaki, M.Nomizu, K.Asano. *J. Chem. Soc., Chem Commun.*, 283 (1989)
19. Х.-Д.Якубке, Х.Ешкайт. *Аминокислоты, пептиды, белки*. Мир, Москва, 1985
20. C.Garcia-Echeverria, M.A.Molins, F.Albericio, M.Pons, E.Giralt. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **35**, 434 (1990)
21. M.Royo, C.Garcia-Echeverria, E.Giralt, R.Eritja, F.Albericio. *Tetrahedron Lett.*, **33**, 2391 (1992)
22. N.Fujii, A.Otaka, S.Funakoshi, H.Yajima, O.Nishimura. *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 869 (1986)
23. N.Fujii, A.Otaka, S.Funakoshi, M.Nomizu, K.Akaji, H.Yajima, K.Kitagawa, T.Akita, K.Ando, T.Kawamoto. *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 603 (1986)
24. Y.Han, J.Vagner, C.M.Gross, G.Barany. In *Proceedings of the 14th American Peptide Symposium. (Abstracts of Reports)*. Escom, Leiden, 1995. P061
25. H.Yoshizawa, A.Otaka, H.Habashita, N.Fujii. *Chem. Lett.*, 803 (1993)
26. A.S.J.Stewart, C.N.C.Drey. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1753 (1990)
27. Shanlin Fu, F.A.Carver, L.A.P.Kane-Maguire. *J. Organomet. Chem.*, **454**, C11 (1993)
28. M.Yoshida, K.Akaji, T.Tatsumi, S.Iinuma, Y.Fujiwara, T.Kimura, Y.Kiso. *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 273 (1990)
29. M.Yoshida, T.Tatsumi, Y.Fujiwara, S.Iinuma, T.Kimura, K.Akaji, Y.Kiso. *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 1551 (1990)
30. Y.Kiso, M.Yoshida, Y.Fujiwara, T.Kimura, M.Shimokura, K.Akaji. *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 673 (1990)
31. Y.Kiso, M.Yoshida, T.Kimura, Y.Fujiwara, M.Shimokura. *Tetrahedron Lett.*, **30**, 1979 (1989)
32. L.Vesnikov, L.Milev, A.Dimitrova. In *Proceeding of the 22nd European Peptide Symposium*. (Eds C.H.Schneider, A.N.Eberle). Escom, Leiden, 1992. P.421
33. M.Royo, J.Alsina, E.Giralt, U.Slomczynska, F.Albericio. In *Proceedings of the 13th American Peptide Symposium*. (Eds R.S.Hodges, J.A.Smith). Escom, Leiden, 1994. P.116
34. О.С.Папсуевич, Г.И.Ауконе, С.Я.Микста, У.О.Калей. *Журн. общ. хим.*, **52**, 460 (1982)
35. B.H.Rietman, R.F.R.Peters, G.I.Tesser. *Synth. Commun.*, **24**, 1323 (1994)
36. K.Nokihara, H.Berndt. *J. Org. Chem.*, **43**, 4893 (1978)
37. R.Eritja, J.P.Ziehler-Martin, P.A.Walker, T.D.Lee, K.Legesse, F.Albericio, B.E.Kaplan. *Tetrahedron*, **43**, 2675 (1987)
38. M.Ueki, M.Honda, Y.Kazama, T.Katoh. *Synthesis*, 21 (1994)
39. O.Rosen, S.Rubinraut, M.Fridkin. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **35**, 545 (1990)
40. F.Albericio, D.Andreu, E.Giralt, C.Navalpotro, E.Pedroso, B.Ponsati, M.Ruiz-Gayo. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **34**, 124 (1989)
41. R.Matsueda, S.Higashida, F.Albericio, D.Andreu. In *The 29th Conference on Peptide Chemistry. (Abstract of Reports)*. Osaka, 1991. P.111
42. I.Mangras, J.Gostelli, E.Rapp, R.Nyfelner. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **45**, 152 (1995)
43. E.A.Hallinan. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **38**, 601 (1991)
44. G.B.Fields, R.L.Noble. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **35**, 161 (1990)
45. B.Walker. In *Peptide Antigens*. (Ed. G.B.Wisdom). IRL Press, Oxford, 1994. P.27
46. H.Nishio, T.Kimura, S.Sakakibara. *Tetrahedron Lett.*, **35**, 1239 (1994)
47. H.Lamthank, H.Virelizier, D.Frayssinhes. *Pept. Res.*, **8**, 316 (1995)
48. H.Lamthank, C.Roumestand, C.Deprun, A. Menez. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **41**, 85 (1993)
49. L.Lepsa, I.Blahu, V.Cerna, M.Flegel. In *24th Symposium of the European Peptide Society. (Abstracts of Reports)*. Perkin Division, Edinburgh, 1996. P.126
50. M.Bodanszky. In *The Peptides. Vol.1.* (Eds E.Gross, J.Meienhofer). Academic Press, New York, 1981. P.106
51. L.Moroder, G.Hubener, S.Gohring-Romani, W.Gohring, H.-J.Musiol, E.Wunsch. *Tetrahedron*, **46**, 3305 (1990)
52. P.M.Hardy, B.Ridge, H.N.Rydon, F.O. dos S.P. Serrao. *J. Chem. Soc.*, 1722 (1971)
53. Hung Lam Thank, G. Mourier, A. Menez, P. Fromageot. In *Second Forum on Peptides. (Colloquies Inserm)*. J. Lifbey Eurotext, Montroge, 1989. P.229
54. R.G.Almquist, S.R.Kadambi, D.M.Yasuda, F.L.Weitl, W.E.Polgar, L.R.Toll. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **34**, 455 (1989)
55. E.V.Kudryavtseva, M.V.Sidorova, M.V.Ovchinnikov, Zh.D.Bespalova, V.N.Bushuev. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **49**, 52 (1997)
56. D.Le-Nguyen, D.Nalis, B.Castro. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **34**, 492 (1989)
57. Cui-Rong Wu, J. D. Wade, G. W. Tregear. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **31**, 47 (1988)
58. S.-I.Kumagaye, H.Kuroda, K.Nakajima, T.X.Watanabe, T.Kimura, T.Masaki, S.Sakakibara. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **32**, 519 (1988)
59. H.Tamamura, A.Otaka, J.Nakamura, K.Okubo, T.Koide, K.Ikeda, T.Ibuka, N.Fujii. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **45**, 312 (1995)
60. J.M.Stewart, J.D.Young. *Solid Phase Peptide Synthesis*. Pierce Chem. Company, New York, 1984
61. D.Laloo, M.K.Mahanti. *Oxyd. Commun.*, **11**, 231 (1988)
62. A.Buku, N.Yamin, D.Gazis. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **33**, 28 (1989)
63. C.Haskell-Lecevano, N.D.Shenderovich, Sh.D.Sharma, G.V.Nikiforovich, Mac E. Hadley, V. J. Hruby. *J. Med. Chem.*, **38**, 1736 (1995)
64. A.Misicka, V.J.Hruby. *Pol. J. Chem.*, **68**, 893 (1994)
65. J.Rivier, R.Kaiser, R.Galyean. *Biopolymers*, **17**, 1927 (1978)
66. A.Buku, P.Blandina, C.Birr, D.Gazis. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **33**, 86 (1989)
67. N.Fujii, A.Otaka, A.Okamachi, T.Watanabe, H.Arai, H.Tamamura, S.Funakoshi, H.Yajima. In *Proceedings of the 20th European Peptide Symposium*. (Eds G.Jung, E.Bayer). Walter de Gruyter, Berlin, 1989. P.58
68. A.Otaka, T.Koide, A.Shide, N.Fujii. *Tetrahedron Lett.*, **32**, 1223 (1991)
69. J.P.Tam, Cui-Rong Wu, Wen Liu, Jing-Wen Zhang. *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 6657 (1991)
70. T.Koide, A.Otaka, N.Fujii. *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 1030 (1993)
71. Chuan-Fa Liu, J.P.Tam. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 6584 (1994)
72. У.Шамб, Ч.Сеттерфилд, Р.Вентворс. В кн. *Перекись водорода*. (Под ред. А.И.Горбанева). Изд-во иностр. лит., Москва, 1958. С.304
73. *The Chemistry of Peroxides*. (Ed. S.Patai). Wiley, Chichester, 1983. P. 429
74. Дж.Робертс, М.Кассерио. В кн. *Основы органической химии. Т. 2.* (Под ред. А.Н.Несмеянова). Мир, Москва, 1978. С.98
75. J.Arroub, J.Berges, Z.Abedinzadeh, J.Langlet, M.Gardes-Albert. *Can. J. Chem.*, **72**, 2094 (1994)
76. Z.Abedinzadeh, J.Arroub, M.Gardes-Albert. *Can. J. Chem.*, **72**, 2102 (1994)
77. М.В.Сидорова, Е.В.Кудрявцева, М.Л.Антопольский, М.Е.Палькеева, М.В.Овчинников, Ж.Д.Беспалова. *Биоорг. химия*, **22**, 273 (1996)
78. Е.В.Кудрявцева. Дис. канд. хим. наук. МАТХТ, Москва, 1997
79. L.Kisfaludy, I.Schon. *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.*, **84**, 227 (1975)
80. Пат. 363192 Европа; *Chem. Abstr.*, **113**, 115889 (1990)

81. Г.Шульц, Р.Ширмер. *Принципы структурной организации белков*. (Под ред. Е.М.Попова). Мир, Москва, 1982. С.67
82. G.Kupryszewski, U.Ragnarsson, K.Rolka, T.Wilusz. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **27**, 245 (1986)
83. S.-Y.Shin, M.Shimizu, E.Munekata. *Chem. Lett.*, 1997 (1994)
84. M.W.Pennington, W.R.Kem, R.S.Norton, B.M.Dunn. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **36**, 335 (1990)
85. D.L.Rabenstein, P.L.Yeo. *J. Org. Chem.*, **59**, 4223 (1994)
86. M.W.Pennington, S.M.Festin, M.L.Maccacchini. In *Proceedings of the 21st European Peptide Symposium. (Abstracts of Reports)*. (Eds E.Giralt, D.Andreu). Escom, Leiden, 1991. P.164
87. B.R.Clarc, M.Pai. In *Proceedings of the 14th American Peptide Symposium. (Abstracts of Reports)*. Escom, Leiden, 1995. P090
88. Lin Chen, G.Barany. In *Proceedings of the 14th American Peptide Symposium. (Abstracts of Reports)*. Escom, Leiden, 1995. P119
89. F.Albericio, R.P.Hammer, C.Garcia-Echeverria, M.A.Molins, J.L.Chang, M.C.Munson, M.Pons, E.Giralt, G.Barany. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **37**, 402 (1991)
90. K.Satoh, H.Okuda, H.Horimoto, H.Kodama, M.Kondo. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **63**, 3467 (1990)
91. М.В.Овчинников, Ж.Д.Беспалова, А.С.Молокоедов, М.И.Титов, И.В.Ревенко, В.А.Виноградов, Н.В.Коробов, С.В.Жуковский. *Биоорг. химия*, **14**, 777 (1988)
92. S.Chaturvedi, Om P.Bahl. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **35**, 133 (1990)
93. R.Drozd, A.N.Eberle. *J. Pept. Sci.*, **1**, 58 (1995)
94. P.Fourquet, E.Bahraoui, J.C.Fontecilla-Camps. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **32**, 81 (1988)
95. Е.В.Кудрявцева, М.В.Сидорова, М.В.Овчинников, Ж.Д.Беспалова, В.Н.Бушуев, Р.П.Евстигнеева. *Биоорг. химия*, **22**, 370 (1996)
96. М.В.Сидорова, Е.В.Кудрявцева, А.С.Молокоедов, М.В.Овчинников, Ж.Д.Беспалова. *Биоорг. химия*, **21**, 675 (1995)
97. *Практическая химия белка*. (Под ред. А.Дарбре). Мир, Москва, 1989
98. P.Sieber, B.Kamber, B.Riniker, W.Rittel. *Helv. Chim. Acta*, **63**, 2358 (1980)
99. P.Bishop, J.Chmielewski. *Tetrahedron Lett.*, **33**, 6263 (1992)
100. H.Shih. *J. Org. Chem.*, **58**, 3003 (1993)
101. N.Fujii, A.Otaka, S.Funakoshi, K.Bessho, H.Yajima. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 163 (1987)
102. W.B.Edwards, C.G.Fields, C.J.Anderson, T.S.Pajean, M.J.Welch, G.B.Fields. *J. Med. Chem.*, **37**, 3749 (1994)
103. K.Akaji, T.Tatsumi, M.Yoshida, T.Kimura, Y.Fujiwara, Y.Kiso. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 167 (1991)
104. K.Akaji, T.Tatsumi, M.Yoshida, T.Kimura, Y.Fujiwara, Y.Kiso. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 4137 (1992)
105. T.Koide, A.Otaka, H.Suzuki, N.Fujii. *Synlett*, 345 (1991)
106. K.Akaji. *Yakugaku Kenkyu no Shinpo*, **11**, 25 (1995)
107. K.Akaji, K.Fujino, T.Tatsumi, Y.Kiso. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 11384 (1993)
108. J.V.Castell, A.Tun-Kyi. *Helv. Chim. Acta*, **62**, 2507 (1979)
109. A.Fontana. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 976 (1975)
110. M.S.Bernatowicz, R.Matsueda, G.R.Matsueda. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **28**, 107 (1986)
111. D.Le-Nguyen, J.Rivier. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **27**, 285 (1986)
112. S.Romani, L.Moroder, W.Gohring, R.Scharf, E.Wunsch, Y.A.Barde, H.Thoenen. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **29**, 107 (1987)
113. E.Wunsch, L.Moroder, S.Gohring-Romani, H.-J.Musiol, W.Gohring, G.Bovermann. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **32**, 368 (1988)
114. H.Yajima, N.Fujii, S.Funakoshi, T.Watanabe, E.Murayama, A.Otaka. *Tetrahedron*, **44**, 805 (1988)
115. B.Ponsati, M.Ruiz-Gayo, E.Giralt, F.Albericio, D.Andreu. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 5345 (1990)
116. C.Garcia-Echeverria, F.Albericio, M.Pons, G.Barany, E.Giralt. *Tetrahedron Lett.*, **30**, 2441 (1989)
117. Пат. 06 256 385 Япония; *Chem. Abstr.*, **122**, 56591 (1995)
118. K.Barlos, D.Gatos, S.Kutsogianni, G.Papaphotiou, C.Poulos, T.Tsegenidis. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **38**, 562 (1991)
119. M.C.Munson, M.Labl, J.Slavinova, G.Barany. *Pept. Res.*, **6**, 155 (1993)

PECULIARITIES OF SYNTHESIS OF THE CYSTEINE-CONTAINING PEPTIDES.

E.V.Kudryavtseva, M.V.Sidorova, R.P.Evstigneeva

*Russian Research and Production Cardiology Centre of Ministry of Health of Russian Federation
15a, Tretya Cherepkovskaya ul., 121552 Moscow, Russian Federation, Fax +7(095)414-6786
M.V.Lomonosov Moscow Academy of Fine Chemical Technology
86, Prosp. Vernadskogo, 117571 Moscow, Russian Federation, Fax +7(095)430-7983*

Data on the protective groups for the thiol function of cysteine and methods for closure of disulfide bonds used in the modern peptide chemistry are considered and systematised. Advantages and disadvantages of protective groups, and reagents used for cyclisation are analysed. Side reactions occurring with particular cyclisation reagents are described.

Bibliography — 119 references.

Received 30th October 1997