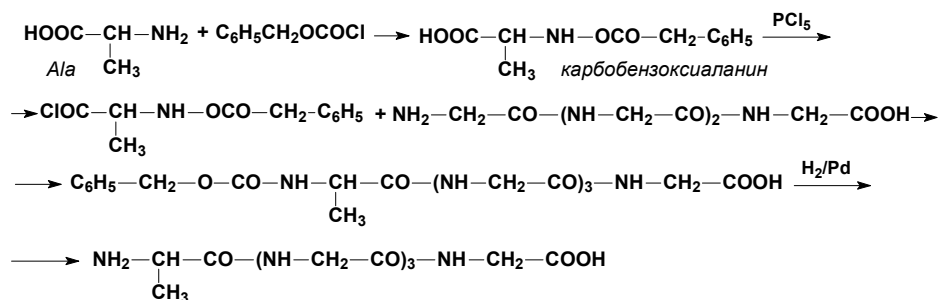




Схема 2



Это направление развивалось под руководством М.М. Ботвиник и С.М. Аваевой, которые полагают, что «...изучение наряду с амидообразной других возможных форм связи в белке и системах белков имеет существенное значение для разрешения вопроса о строении и функциональных особенностях белков» [4]. Обнаружение в природе соединений с O-пептидной связью и выделение нового антибиотика – азасерина также способствовало интенсивному изучению N,O-пептидов β-оксиаминокислот.

М.М. Ботвиник и С.М. Аваевой были разработаны методы синтеза N,O-пептидов серина [5] с помощью реакции галоидангидридов ацилированных аминокислот и оксазолонов с серином и его производными по схеме 3.

Изучая полученные соединения, авторы установили, что O-пептиды серина легко расщепляются протеолитическими ферментами, панкреатином и трипсином по эфирной связи, образованной аминокислотой и β-оксиаминокислотой. Этот факт явился новым существенным подтверждением гипотезы об эфирных связях в белках. Авторы обнаружили также интересную особенность O-пептидов β-оксиаминокислот легко изомеризоваться в

N-пептиды. Способность аминокислотного остатка к миграции с азота на кислород была показана ими на примере этаноламина [6] по схеме 4.

В 1956 г. под руководством М.М. Ботвиник впервые были синтезированы N,O-пептиды треонина с помощью метода смешанных ангидридов по Вогану и Осато [7], а также N-ацил-O-пептиды аллотреонина [8]. На примере этих соединений была изучена возможность ферментативного гидролиза O-пептидной связи в пептидах треонина.

В конце 1940-х–начале 1950-х годов поискам новых путей синтеза пептидов стало способствовать открытие большого количества физиологически активных веществ (главным образом, антибиотиков) пептидной природы. В Московском университете это направление исследований развивалось А.Б. Силаевым, Е.А. Морозовой и др. в лаборатории белковых веществ (а с 1950 г. в лаборатории химии антибиотиков при кафедре органической химии химического факультета МГУ)<sup>2</sup>. Оно включало в себя разработку как биосинтетических, так и чисто синтетических методов получения полипептидных антибиотиков, в частности грамицидина “С”, полимиксинов, неотеломицинов и их модифицированных аналогов.

В 1958–1959 гг. в рамках изучения структуры и биологических свойств циклических полипептидных антибиотиков Е.А. Морозовой с сотрудниками был осуществлен синтез ряда пептидов, в том числе циклического строения. Особый интерес для этих исследователей представляло использование метода цианметиловых эфиров для получения циклопептидов. В работе Е.А. Морозовой и С.М. Женодаровой были получены цианметиловые эфиры некоторых карбобензокси-производных аминокислот, дипептидов и трипептидов, а также

Схема 3

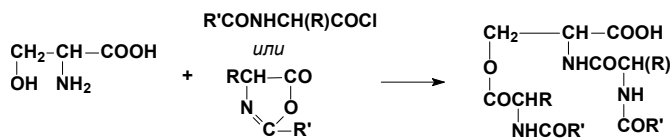
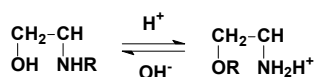


Схема 4



<sup>2</sup> Этой лабораторией руководил Н.Д. Зелинский, а одним из его заместителей был А.Б. Силаев. В 1953 г. после переезда Университета в здание на Ленинских горах, на биолого-почвенном факультете МГУ (при активном участии академика В.Н. Шапошникова) была создана межкафедральная лаборатория антибиотиков, которую возглавил профессор А.Б. Силаев. В конце 1970-х годов лаборатория антибиотиков вошла в состав кафедры микробиологии, а в 1993 г. была переименована в лабораторию биологически активных веществ.

изучена их применимость в синтезе пептидов и их устойчивость в условиях удаления защитной группы. Аналогичные пептиды были получены этими же авторами с помощью метода Буассона через смешанные ангидриды [9].

В другой работе С.М. Женодаровой и Е.А. Морозовой [10] был получен гексапептид глицил-лейцил-глицил-глицил-лейцил-глицин и проведена его циклизация двумя методами. Для циклизации впервые применили конденсирующий агент: этоксиацетилен. Авторы показали, что в разбавленном метанольном растворе гексапептида глицил-лейцил-глицил-глицил-лейцил-глицина в присутствии избытка этоксиацетилена идет образование вещества, изучение свойств которого позволяет приписать ему структуру циклогексапептида. Данный циклогексапептид был также получен по методу Виланда. Свойства веществ, полученных разными методами, оказались идентичными.

Впоследствии С.М. Женодарова и Е.А. Морозова с успехом применили этоксиацетилен для циклизации других пептидов. Авторы также показали, что циклический гексапептид симметричного строения может быть получен как циклизацией линейного гексапептида, так и конденсацией трипептидов [11].

В 1960-е и 1970-е годы исследования в области химии природных соединений в МГУ интенсифицировались, чему немало способствовало образование на химическом факультете в 1965 г. кафедры химии природных соединений. В работах этого периода широко использовались как традиционные методы, так и относительно новый (разработан в 1950-е годы) карбодиимидный метод, а также твердофазные методы синтеза пептидов<sup>3</sup>.

Так, в работах, проводимых под руководством А.Б. Силаева по установлению строения антибиотика полимиксина М, карбодиимидным методом был получен лейцил-треонин и другие дипептиды, образованные аминокислотами, входящими в состав этого антибиотика [12].

В других работах для изучения влияния аминокислотного состава на свойства полимиксинов авторами был предпринят синтез его аналогов, в которых диаминамасляную кислоту заменяли на лизин. Так, в 1967–1968 гг. Е.А. Морозова с со-

трудниками синтезировала ряд фрагментов (ди-, три- и модифицированные пента- и гексапептиды) лизиновых аналогов полимиксинов, а также гептапептид защищенного лизинового аналога циклопептидной части полимиксинов D и B [13–17]. В последнем случае получение пептидов осуществляли твердофазным методом, используя в качестве конденсирующего агента дициклогексилкарбодиимид [15, 16].

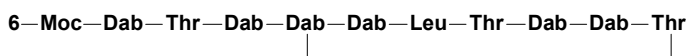
В лаборатории химии антибиотиков А.Б. Силаев с сотрудниками проводили также исследования, посвященные изучению химической природы отечественного полипептидного антибиотика А-128, состоящего из двух компонентов А-128-П (пролиновой) и А-128-ОП (оксипролиновой). Установив структуру этого антибиотика [18], они осуществили синтез четырех пептидов дегидротриптофана, так как в состав неотеломицина А-128-П наряду с другими десятью аминокислотами входит один остаток дегидротриптофана [19].

В 1960-е годы на химическом факультете МГУ Н.А. Поддубной с сотрудниками был проведен ряд работ по синтезу аналогов полипептидной части антибиотика альбомуцина (она представляет собой цикло-трисерил-три-δ-N-оксиорнитил).

Для подхода к разрешению вопросов относительно роли порядка чередования аминокислотных остатков и их конфигурации в циклопептидной части альбомуцина под руководством Н.А. Поддубной был осуществлен синтез ряда цикло-триорнитил-трисерил пептидов с различной конфигурацией серина (орнитин использовался вместо N-оксиорнитила как более доступная в пептидном синтезе аминокислота) [20, 21]. В этих работах было показано, что азидный метод является наиболее рациональным для циклизации гексапептидов, так как в этом случае не наблюдалось рацемизации, вещества получались с хорошими выходами, а побочные вещества легко удалялись при очистке. Используя азиды для циклизации Н.А. Поддубная и Л.В. Базаитова с сотрудниками сочетанием карбодиимидного, азидного и метода смешанных ангидридов получили аналоги полипептидной части альбомуцина [20, 21], что явилось важным вкладом в химию антибиотиков такого типа.

В 1963 и 1964 гг. произошло важное событие в химии пептидов и белков – был завершен первый синтез белка – инсулина – с помощью «классических» методов органической химии. На

#### С х е м а 5



<sup>3</sup> Твердофазный метод синтеза пептидов был открыт в 1962 г. Р. Мерифилдом.

химическом факультете МГУ в конце 1960-х – начале 1970-х годов на кафедре ХПС, а затем в Институте экспериментальной эндокринологии и химии гормонов под руководством выпускника МГУ Ю.П. Швачкина осуществлялся твердофазный синтез фрагментов инсулина.

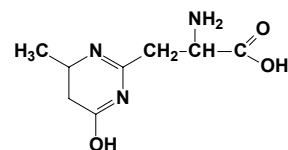
С целью отработки методов препаративного получения фрагментов инсулина и их аналогов был проведен синтез фрагмента A<sub>13-16</sub> (Н-L-Leu-L-Tyr-L-Gln-L-Leu-OH) [22], а также гидразида соответствующего защищенного пептида (BOC-L-Leu-L-Tyr(Bzl)-L-Gln-L-Leu-NHNH<sub>2</sub>) [23]. Синтез осуществляли твердофазным методом Меррифилда, причем в качестве полимерного носителя был использован хлорметилированный сополимер стирола с дивинилбензолом (1%). Этот же фрагмент был синтезирован авторами классическими методами в растворе с использованием метода смешанных ангидридов и активированных эфиров [24].

Впоследствии под руководством Ю.П. Швачкина, Г.А. Коршуновой<sup>4</sup> были также синтезированы нонапептиды, представляющие собой частично защищенный фрагмент A<sub>17-21</sub> инсулина и его структурные аналоги [25]. Отметим, что результаты указанных работ использовались для создания схем полного синтеза инсулина в нашей стране, осуществленного впоследствии в Институте экспериментальной эндокринологии и химии гормонов.

В 1960-е годы в лаборатории химии белка, а впоследствии на кафедре химии природных соединений большое внимание уделялось изучению не только гормонов и антибиотиков, но и других биологически важных веществ. Поскольку в процессах жизнедеятельности ведущая роль принадлежит нуклеиновым кислотам и белкам, все большее значение стали приобретать исследования тех взаимосвязей и взаимопревращений, которые могут объединять нуклеиновые кислоты и белки.

В 1962 г. в связи с изучением потенциальных антиметаболитов нуклеиново-белкового обмена Ю.П. Швачкин и Л.А. Сырцова предприняли попытку получения пептидов, содержащих остаток неприродной аминокислоты β-(4-окси-6-метилпиримидил-2)-аланина (схема 6). Авторы показали, что при получении таких пептидов, в которых эта аминокислота является N-концевой, аминогруппа может быть легко защищена карбобензоксилированием, а активация карбоксила в образующемся при этом N-карбобензокси-β-(4-окси-6-метилпиримидил-2)-аланине может достигаться за счет образования смешанного ангидри-

Схема 6



да (взаимодействием с хлоругольным эфиром). Смешанный ангидрид без выделения может быть далее введен в реакцию с эфирами аминокислот или пептидов. Применяя этот метод, авторы осуществили синтез этилового эфира N-карбобензокси-β-(4-окси-6-метилпиримидил-2)-аланилглицина, бензилового эфира N-карбобензотси-β-(4-окси-6-метилпиримидил-2)-аланил-D,L-фенилаланина и метилового эфира N-карбобензокси-β-(4-окси-6-метилпиримидил-2)-аланил-D,L-фенилаланилглицина [26].

Интерес к изучению взаимосвязей между нуклеиновыми кислотами и белками способствовал все более интенсивному развитию на химическом факультете исследований в области органической химии нуклеотидопептидов – соединений, содержащих пептидный и нуклеотидный фрагменты. Благодаря этим работам были созданы методы синтеза ключевых фрагментов клеточных структур – аминокислотных (пептидных) производных моно- и олигонуклеотидов, а также нуклеотидопептидов. Эти исследования в 1960-е годы развивались под руководством М.А. Прокофьева и З.А. Шабаровой. В качестве одного из примеров подобных исследований приведем работу [27], в которой впервые был осуществлен синтез аденилил-(5'→N)-трипептида (рис. 1). Создание нуклеотидопептидной связи осуществлялось путем фосфорилирования метилового эфира фенилаланилвалилглицина «активным» производным адениловой кислоты – P<sup>1</sup>-аденозин-5'-P<sup>2</sup>-дифенилпирофосфатом. Аналогичным образом был синтезирован аденилил-(5'→N)-фенилаланилглицин [28] (схема 7).

Отметим, что хотя в большинстве подобных работ использовались классические подходы к созданию пептидных фрагментов, использование этих подходов оказалось очень полезным при разработке новых методов синтеза нуклеотидопептидов. Так, например, М.А. Прокофьевым и З.А. Шабаровой впервые были получены нуклеотидопептиды с использованием твердофазного метода Меррифилда на полимерном носителе [29].

<sup>4</sup> В настоящее время под руководством Г.А. Коршуновой на кафедре химии природных соединений ведутся исследования по синтезу аналогов энкефалинов, эндорфинов и других биологически активных пептидов.

Схема 7

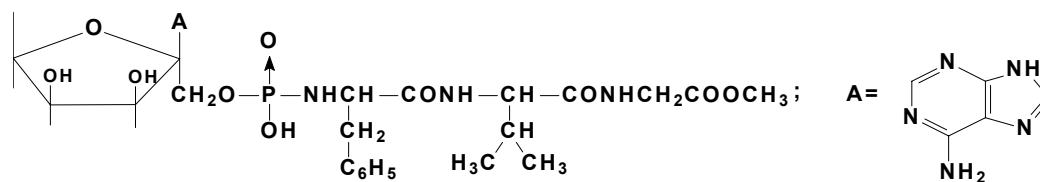
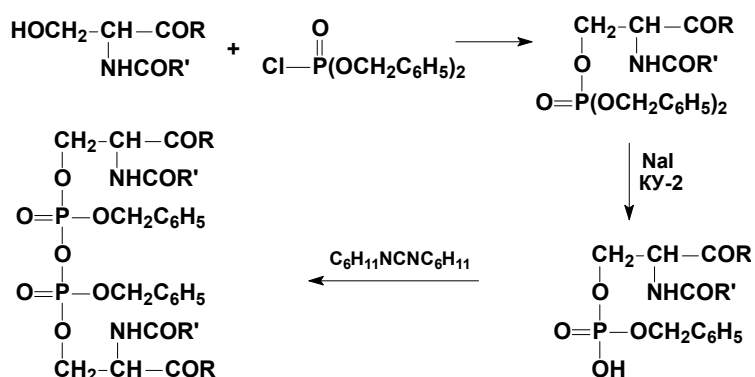


Схема 8



В 1960-е годы все большее внимание исследователей привлекали вопросы строения фосфопротеидов, в частности выяснение характера связи фосфорной кислоты с белком. Основываясь на предположении о существовании в белках пирофосфатных связей, М.М. Ботвиник и С.М. Аваева с сотрудниками получили два соединения, которые являлись представителями нового класса дисерилпирофосфатов:  $\text{P}^1\text{P}^2$ -ди(бензиловый эфир N-карбобензоксисерил)- $\text{P}^1\text{P}^2$ -добензилпирофосфат и  $\text{P}^1\text{P}^2$ -ди(метиламид N-бензоилсерил)- $\text{P}^1\text{P}^2$ -добензилпирофосфат. Синтез проводили согласно схеме 8 [30]. В последующих работах тех же авторов были изучены свойства полученных соединений [31].

Новым направлением работ по синтезу пептидов, появившимся в Московском университете в конце 1970-х–начале 1980-х годов, стал ферментативный синтез этих соединений<sup>5</sup>. Теоретические аспекты этого метода были разработаны сотрудниками кафедры химической энзимологии А.В. Левашовым, К. Мартинекком, Н.Л. Клячко под руководством И.В. Березина [32]. Как препаративный этот метод стал использоваться благодаря работам В.М. Степанова, возглавившего в 1970 г.

лабораторию синтеза пептидов на кафедре химии природных соединений.

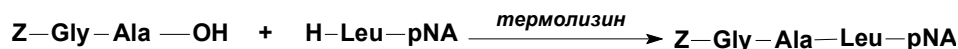
Под руководством В.М. Степанова в лаборатории ВНИИ генетики в тесном контакте с сотрудниками МГУ был проведен ряд работ по использованию ферментов для синтеза пептидов. Так, в 1977 г. была выполнена работа по получению серии хромогенных субстратов субтилизина, позволяющих следить за ходом ферментативного гидролиза спектрофотометрически [33]. В качестве таких субстратов были синтезированы *para*-нитроанилиды N-карбобензоксипроизводных глицил-глицил-лейцина, аланил-аланил-лейцина, глицил-глицил-фенилаланина, аланил-аланил-фенилаланина, глицил-лейцина и аланил-лейцина с помощью конденсации соответствующих карбобензоксидипептидов с *para*-нитроанилидами лейцина и фенилаланина методом смешанных ангидридов и карбодиимидным методом (схема 9).

Аналогичные субстраты были получены при конденсации защищенного дипептида и *para*-нитроанилида аминокислоты с помощью термолизина (схема 10) [34].

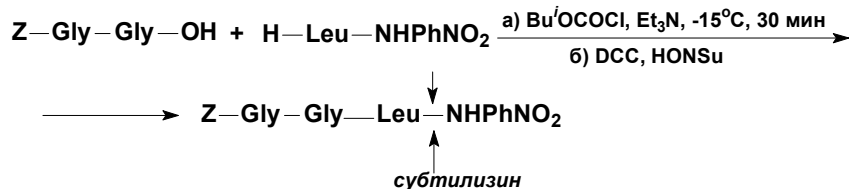
Важное препаративное значение имеет работа, сделанная сотрудниками МГУ [35], в которой

<sup>5</sup> Хотя еще в 1937 г. М. Бергман, а также Дж. Фрутон и Х. Френкель-Конрат показали, что ферменты папаин и химотрипсин катализируют образование пептидной связи между ациламинокислотами и амидами аминокислот, только в конце 70-х годов этот метод стали использовать во всем мире как препаративный способ получения пептидов.

## С х е м а 9



## С х е м а 10



синтезированы *para*-нитроанилиды пироглутамил-трипептидов общей формулы Glp-A-B-C-pNA (где А, В – остатки аланина или глицина, С – остаток лейцина или фенилаланина, Glp – пироглутаминовая кислота). Данные пептиды были получены с использованием карбодиимидного метода и метода активированных эфиров. Glp-Ala-Ala-Leu-pNA получен также ферментативно с помощью термолизина. Синтезированные субстраты в качестве защитной группы содержали вместо гидрофобной бензилоксикарбонильной группировки гидрофильный остаток пироглутаминовой кислоты. Такие субстраты обладают значительно более высокой растворимостью в воде по сравнению с их бензилоксикарбонильными аналогами, что позволяет определять истинные значения удельной активности фермента без добавления органических растворителей. Эти субстраты широко использовались при изучении сериновых протеиназ.

Метод ферментативного синтеза пептидов с успехом был применен и в других работах для получения хромогенных специфических субстратов

сериновых протеиназ и термолизина [36–38]. В 1980-е годы при изучении ферментов различных классов все шире стали применяться флуоресцентные субстраты, особенно полезные для исследований аспартильных протеиназ. Ряд таких субстратов, например антранилоилтетрапептиды общей формулы Abz-Ala-Ala-Phe-Phe-B<sup>6</sup> [79], был синтезирован в лаборатории пептидного синтеза химического факультета МГУ И.Ю. Филипповой<sup>7</sup> под руководством В.М. Степанова [39]. Синтез проводили комбинацией химического и ферментативного методов (эти работы были продолжены и в последующие годы).

Подводя итог, подчеркнем, что в 1940–1980-е годы на химическом факультете МГУ проводились интенсивные исследования, посвященные разработке новых и усовершенствованию известных методов синтеза пептидов. Новые методы и модификации известных методов синтеза пептидов, предложенные сотрудниками Московского государственного университета, явились важным вкладом в химию этих соединений.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Плехан М.И., Гаврилов Н.И. // ЖОХ. 1948. **18**. С. 1843.
2. Гаврилов Н.И., Зелинский Н.Д. // Вестн. Моск. ун-та. 1947. № 7. С. 3.
3. Плехан М.И. // ЖОХ. 1952. **22**. С. 1633.
4. Ботвиник М.М., Аваева С.М. // ДАН СССР. 1952. **84**. С. 951.
5. Ботвиник М.М., Аваева С.М., Мистрюков Э.А. // ЖОХ. 1953. **23**. С. 971.
6. Ботвиник М.М., Аваева С.М., Мистрюков Э.А. // ДАН СССР. 1952. **82**. С. 727.
7. Ботвиник М.М., Аваева С.М., Носкова Н.Б. // ЖОХ. 1956. **26**. С. 2325.

<sup>6</sup> Сокращения: В = -pNA, -Ded, -Nba; Abz – 2-аминобензойная (антраниловая) кислота, pNA – *para*-нитроанилин, Ded – 2,4-динитрофенилэтилендиамин, Nba – 4-нитробензиламин.

<sup>7</sup> В настоящее время И.Ю. Филиппова возглавляет направление, связанное с ферментативным синтезом пептидов на кафедре химии природных соединений.

8. Ботвиник М.М., Аваева С.М. // ЖОХ. 1956. **26**. С. 2329.
9. Морозова Е.А., Женодарова С.М. // ЖОХ. 1958. **28**. С. 1661.
10. Морозова Е.А., Женодарова С.М. // ДАН СССР. 1959. **125**. С. 93.
11. Женодарова С.М., Морозова Е.А. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 1960. С. 31.
12. Силаев А.Б., Степанов В.М., Козлов Л.В. // ЖОХ. 1961. **31**. С. 2716.
13. Морозова Е.А., Оксенойт Е.С., Боровикова В.П. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 1967. № 3. С. 115.
14. Морозова Е.А., Оксенойт Е.С., Горбачева Е.Н. // ЖОХ. 1968. **38**. С. 2647.
15. Зеваиль М.А., Морозова Е.А. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 1971. **12**. С. 246.
16. Морозова Е.А., Зеваиль М.А. // ХПС. 1970. № 3. С. 359.
17. Морозова Е.А., Оксенойт Е.С., Грава И.А. // ЖОХ. 1967. **37**. С. 1764.
18. Силаев А.Б., Катруха Г.С., Трифонова Ж.П., Ли Р.И., Мелентьева Т.Н. // ХПС. 1971. № 1. С. 130.
19. Бахра М., Катруха Г.С., Силаев А.Б. // ХПС. 1972. № 2. С. 280.
20. Поддубная Н.А., Ахмед М. Эль Нагар. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 1967. № 5. С. 152.
21. Поддубная Н.А., Базаитова Л.В. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 1969. № 5. С. 120.
22. Мишин Г.П., Александрова Л.А., Швачкин Ю.П. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 1972. **13**. С. 612.
23. Коршунова Г.А., Мишин Г.П., Вольпина О.М., Швачкин Ю.П. // ХПС. 1973. № 2. С. 263.
24. Воскова Н.А., Швачкин Ю.П. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 1972. **13**. С. 732.
25. Коршунова Г.А., Мишин Г.П., Семилетов Ю.А., Воскова Н.А., Швачкин Ю.П. // ХПС. 1971. № 6. С. 799.
26. Швачкин Ю.П., Сырцова Л.А. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 1962. № 5. С. 85.
27. Рябова Т.С., Шабарова З.А., Прокофьев М.А. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 1965. № 3. С. 89.
28. Савельев Е.П., Юодка Б.А., Шабарова З.А., Прокофьев М.А. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 1967. № 5. С. 128.
29. Смирнов В.Д., Хангулов Г.А., Шабарова З.А., Прокофьев М.А. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 1969. № 5. С. 118.
30. Аваева С.М., Ботвиник М.М., Сыромятникова И.Ф. // ЖОХ. 1963. **33**. С. 709.
31. Аваева С.М., Ботвиник М.М., Сыромятникова И.Ф., Григорович В.И. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 1965. № 3. С. 78.
32. Martinek K., Semenov A., Berezin I. // Biochim. Biophys. Acta. 1981. **658**. С. 76.
33. Люблинская Л.А., Якушева Л.Д., Степанов В.М. // Биоорг. химия. 1977. **3**. С. 273.
34. Воюшина Т.Л., Люблинская Л.А., Тимохина Е.А., Степанов В.М. // Биоорг. химия. 1987. **13**. С. 615.
35. Люблинская Л.А., Хайду И., Баландина Г.Н., Филиппова И.Ю., Маркарян А.Н., Лысогорская Е.Н., Оксенойт Е.С., Степанов В.М. // Биоорг. химия. 1987. **13**. С. 748.
36. Люблинская Л.А., Воюшина Т.Л., Степанов В.М. // Биоорг. химия. 1982. **8**. С. 1620.
37. Воюшина Т.А., Люблинская Л.А., Степанов В.М. // Биоорг. химия. 1985. **11**. С. 738.
38. Люблинская Л.А., Бойцова С.Е., Степанов В.М. // Биоорг. химия. 1986. **12**. С. 1301.
39. Филиппова И.Ю., Лысогорская Е.Н., Оксенойт Е.С., Комаров Ю.Е., Степанов В.М. // Биоорг. химия. 1986. **12**. С. 1172.

Поступила в редакцию 09.06.05

## THE HISTORY OF INVESTIGATIONS ON PEPTIDE SYNTHESIS AT THE CHEMISTRY DEPARTMENT OF MOSCOW STATE UNIVERSITY

*(On the Occasion of 40th Jubilee of the Natural Compounds Chemistry Division, Department of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University)*

O.N. Zefirova, E.S. Afonina, G.N. Balandina

*(Division of Physical Chemistry, Division of Chemistry of Natural Compounds)*

The data concerning investigations in the field of peptide synthesis at the chemistry department of M.V. Lomonosov Moscow State University since the end of 1940-es till the middle of 1980-es are systematized.