



УДК 547.964.4:542.952.6:547.715

**СИНТЕТИЧЕСКИЕ ПОЛИАМИНОКИСЛОТЫ И ПОЛИПЕПТИДЫ.  
N-КАРБОКСИАНГИДРИДНЫЙ МЕТОД**© 1996 г. А. С. Карнуп<sup>#</sup>, В. Н. Уверский, В. Н. Медведкин

Институт белка РАН, 142292, Пущино Московской обл.

Поступила в редакцию 29.08.95 г. После доработки 25.01.96 г.

Рассмотрены методы синтеза высокомолекулярных полиаминокислот и полипептидов. Основное внимание уделено методу синтеза с использованием N-карбоксиангидридов аминокислот. Обсуждаются вопросы механизмов реакции их поликонденсации и сополиконденсации, стереоселективности, а также распределения аминокислотных остатков в полипептидной цепи. Рассмотрены методические детали синтеза N-карбоксиангидридов аминокислот (мономеров) и их поликонденсации.

*Ключевые слова:* N-карбоксиангидриды (NCA), полиаминокислоты, NCA-полимеризация/поликонденсация.

Считается, что природные полипептиды исходно появились как случайные сополимеры аминокислот [1–3]. Возникшая в ходе эволюционного развития зависимость синтеза полипептидов от матрицы (РНК, ДНК) дала возможность редактирования первичной структуры полипептидов, поэтому природные белки и олигопептиды обладают уникальной последовательностью аминокислотных остатков в цепи. Поскольку весьма вероятно, что существующие природные белки представляют собой случайные сополимеры аминокислот, отредактированные до их нынешнего состояния в ходе естественного отбора [1, 2, 4], для понимания общих физико-химических принципов самоорганизации макромолекул природных полипептидов представляется важным изучение искусственных модельных полипептидов со случайными последовательностями аминокислотных остатков. Существуют два принципиально разных подхода к получению таких модельных полипептидов: 1) создание матриц (ДНК) со случайным распределением кодонов для последующего биосинтеза полипептидов [5]; 2) химический синтез случайных сополимеров аминокислот. Оба подхода имеют свои преимущества и недостатки, рассмотрение которых, однако, выходит за рамки данной обзорной работы. Обзор посвящен основным способам химического синтеза различных гомо- и гетерополиаминокислот (полипептидов); основное внимание уделено их синтезу на основе N-карбоксиангидридов соответствующих аминокислот.

Авторы также рекомендуют читателю четыре хороших обзора по данному предмету [6–9]. В предлагаемом обзоре основной упор сделан на практические аспекты синтеза.

Первый синтетический полипептид высокой молекулярной массы – poly[Glu(OBzl)]\* – статистический клубок в хороших растворителях (в которых взаимодействие полимерных сегментов с молекулами растворителя сильнее, чем с другими полимерными сегментами [10]) и спиральный стержень в плохих растворителях (для которых верно обратное [10]) – особенно активно изучался в 50-е годы многими лабораториями в Англии, США и Израиле. Очень скоро работа была расширена до изучения poly(Glu), когда после удаления защитных групп полипептид становился растворимым в водных буферных растворах подобно многим белкам [11]. Затем было синтезировано множество гомополипептидов самых разных аминокислот, сополимеров аминокислот, а также сшитых (crosslinked) полипептидов, которые изучали как в защищенном, так и в свободном от защитных групп виде [6]. Основным методом синтеза была полимеризация N-карбоксиангидридов аминокислот. Фокс [6] развил метод термической сополимеризации  $\alpha$ -аминокислот. Масса значительных открытий в области биофизической химии полипептидов ( $\alpha$ -,  $\beta$ -структуры полипептидов в растворах и твердом состоянии, конформационные рН-индуцируемые переходы  $\alpha$ -спираль  $\rightarrow$  статистический клубок и т.д.) была сделана в 70–80-е годы [6, 12–14]. Работы, посвященные синтезу и изучению структурных и других свойств полиаминокислот (в основном с регулярной

Используемые сокращения: NCA – N-карбоксиангидрид; ТЕРР – тетраэтилпирофосфит.

<sup>#</sup> Автор для переписки (e-mail: karnup@sun.ipr.serpukhov.su).

\* Здесь и далее приводятся аминокислоты L-конфигурации, кроме специально оговоренных случаев.

первичной структурой), проводились и в России [15–22].

Помимо обширных структурных исследований синтетических гомо- и гетерополипептидов на основе природных и неприродных аминокислот проводились работы по изучению их хроматографического поведения, ферментативной активности, иммунологических и терапевтических свойств, энзиматической деградации [6] и т.д. Однако и по сей день многое относительно структуры, свойств и даже синтеза полипептидов, моделирующих белки, остается неясным.

Напомним для ясности, что для обозначения различных типов полимеров, состоящих из аминокислотных остатков, общеприняты следующие термины [23]:

*пептид* – короткая цепь из аминокислотных остатков, расположенных в ней в определенной последовательности;

*полипептид* – более длинная цепь, характеризующаяся определенными аминокислотной последовательностью и длиной. Хотя не существует строго определенной границы между пептидом и полипептидом, она находится где-то в районе 50 остатков;

*полиаминокислота* – полимер (обычно синтетический), состоящий из одного или нескольких типов аминокислотных остатков, не обязательно обладающий строго определенными аминокислотной последовательностью и длиной;

*белок* – природный полипептид, обладающий уникальной трехмерной структурой в физиологических условиях.

### 1. Методы получения полиаминокислот

Достаточно подробное описание методов образования пептидной связи приводится в работе [24]. В основном существующие методы образования пептидной связи приемлемо работают в синтезах сравнительно коротких пептидов или при фрагментной конденсации. Однако далеко не все из них удовлетворяют основным требованиям, предъявляемым к синтезу высокомолекулярных полиаминокислот: высокой степени полимеризации, высокому выходу продукта, отсутствию рацемизации, легкости выделения продуктов реакции, а также удобству и экономичности синтеза. Для синтеза высокомолекулярных полиаминокислот наиболее разработаны метод с использованием N-карбоксиянгидридов аминокислот [6, 9, 12–14, 24, 25] и тиотиазолидоновый метод [25]. Последний не подходит для синтеза оптически гомогенных (состоящих из аминокислотных остатков только одной конфигурации) полиаминокислот из-за очень высокой рацемизации в процессе синтеза.

Метод активированных эфиров аминокислот также находит применение для получения круп-

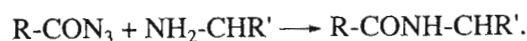
ных пептидов [15, 18, 21, 22, 24], но менее удачно используется в синтезе полиаминокислот и полипептидов высокой молекулярной массы из-за значительных трудностей, обусловленных главным образом циклизацией растущих полимерных цепей и понижением скорости бимолекулярной реакции конденсации с увеличением длины растущей цепи.

В литературе описаны примеры синтеза высокомолекулярных полиаминокислот регулярного строения. Так, в работе [26] были получены полипептиды, состоящие из блоков разной длины, содержащих остатки Lys, Ala, Arg, Leu и Orn. Эти блоки получали обычными методами ступенчатого наращивания цепи в растворе. Поликонденсацию этих “мономерных” блоков проводили методом активированных сукцинимидных или пентафторфениловых эфиров. Средние молекулярные массы полученных полимеров блочного строения после диализа составляли 6–9 кДа (70–100 остатков).

Авторы работы [27] также синтезировали блочные полимеры [(Leu)<sub>3</sub>-(Pro)<sub>2</sub>-Gly]<sub>n</sub> (n = 2, 4, 6, 8 и 10) с хорошими выходами, используя DCC и HOBT как конденсирующие реагенты. Полученные полимеры эффективно очищали методом ВЭЖХ (на стирол-дивинилбензолном сополимере). Авторы работы [28] получили в 1963 г. блочные полиаминокислоты (использовались блоки с известной последовательностью) длиной около 75 остатков самоконденсацией пептидных n-нитрофениловых эфиров. Реакцию проводили в концентрированном растворе реагентов в DMF при комнатной температуре.

В России В.А. Шибнев с соавторами синтезировали ряд полиаминокислот регулярного строения, состоящих из повторяющихся пептидных блоков, содержащих остатки Lys, Pro, Нур, Ala, Orn и Gly, методами активированных эфиров (n-нитрофениловых и 2,4,6-трихлорфениловых) [15, 18, 21, 22] и с использованием тетраэтилпирофосфита (ТЕРР-поликонденсация) [16–19]. Эти же авторы в работе [18] дают сравнительную оценку эффективности этих двух методов синтеза: если метод пептидных активированных эфиров позволяет получать полиаминокислоты с молекулярными массами 3–8 кДа, то ТЕРР-поликонденсация приводит к полиаминокислотам с молекулярными массами около 12–20 кДа. ТЕРР-поликонденсацией также был получен целый ряд полиаминокислот регулярного строения, содержащих остатки Туг и Glu в разных соотношениях, с молекулярными массами от 16 до 54 кДа [19].

В работе [29] был развит метод синтеза полиаминокислот и полипептидов на основе азидной конденсации Курциуса:



Этим методом были получены poly(Gly) (0°C, водный раствор),  $\bar{M}_w \sim 135$  кДа, а также poly(Gly-Phe) (в DMF),  $\bar{M}_w \sim 30$  кДа, с выходом полимера 90%. Стоит отметить, что азидный метод наименее опасен в плане рацемизации и был использован при конденсации пептидных фрагментов во многих известных работах [30–32].

Бесспорно, однако, что метод NCA-полимеризации позволяет достигать очень высоких степеней полимеризации и выходов полипептидов и является одним из самых эффективных.

## 2. Синтез полиаминокислот с использованием N-карбоксиянгидридов аминокислот

Привлекательность метода синтеза пептидов и полипептидов с использованием NCA аминокислот заключена в его простоте: и защита, и активация присоединяемой аминокислоты достигаются в один прием. В то время как во многих других методах пептидного синтеза вместе с новообразованным пептидом в смеси остается большое количество реагентов и побочных продуктов реакции, от которых не всегда просто избавиться, единственный побочный продукт в NCA-методе – углекислый газ, который легко удаляется. Необходимо лишь контролировать pH реакционной смеси. Следующее преимущество состоит в том, что NCA-метод практически свободен от рацемизации [33] и в случае использования оптически чистых NCA аминокислот приводит к оптически чистым пептидам (полиаминокислотам). Однако в основном направлении пептидного синтеза – синтезе пептидов с заданной последовательностью – этот метод не получил широкого распространения из-за высокой способности NCA к самополимеризации и, как следствие, заниженного выхода продукта с нужной последовательностью.

Классический ныне твердофазный вариант пептидного синтеза может давать выходы продукта нужной последовательности до 99% на каждом шаге, в то время как метод NCA – только ~90% или ниже. Простейшее вычисление показывает, что, даже если NCA-метод на каждом шаге конденсации постоянно давал бы выход 90.0%, 50-членный полипептид был бы получен с выходом лишь около 0.5%. Таким образом, ступенчатый синтез, например, рибонуклеазы ( $M \sim 13600$  Да) практически неосуществим при использовании только NCA-стратегии. Однако в классическом ступенчатом пептидном синтезе (в растворе и на твердой фазе) NCA аминокислот находят применение в виде N-защищенных производных (например, группировками уретанового типа) [34–42]. Использование конденсаций таких производных NCA, чередуемых на отдельных стадиях синтеза с присоединением аминокислот с помощью конден-

сирующих реагентов, позволяет получать сравнительно крупные пептиды (до 15 остатков) [43]. NCA-метод в полуавтоматическом синтезе пептидов с применением центрифугирования и инжекторных систем предлагался как альтернатива меррифилдовскому твердофазному пептидному синтезу [44]. Сообщалось даже о полностью автоматическом пептидном синтезаторе, приспособленном к NCA-конденсациям [45]. Одно из главных достоинств NCA-конденсаций заключается в возможности получения с их помощью больших количеств ди-, три-, тетра-, пента- и гексапептидов с минимальной затратой реагентов и времени (при оптимизированном и налаженном процессе). Такие компании, как Merck и Pfizer, успешно используют этот подход.

NCA-метод оказывается полезным там, где требуются полимеры большой молекулярной массы, состоящие из аминокислот или их производных, в которых последовательность мономерных единиц не играет значительной роли. Он используется при гомо- и сополимеризации аминокислот (см. ниже), получении блок-сополимеров аминокислот [46] и полиаминокислотных цепей, ковалентно связанных с различными подложками и полимерами [47, 48] и т.п. Так, в работах [49, 50] описываются высокомолекулярные гомо- и сополимеры, а также блок-сополимеры, состоящие из гликозилированных аминокислотных остатков, синтезированные из соответствующих NCA гликозилированных  $\alpha$ -аминокислот.

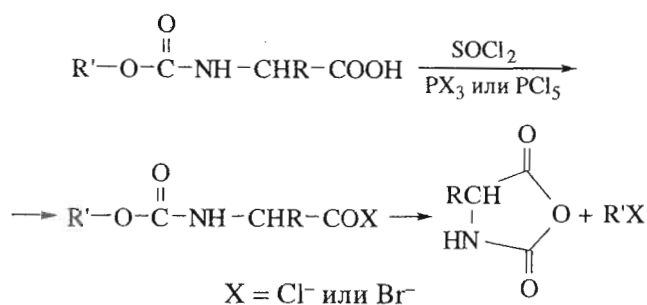
### 2.1. Приготовление N-карбоксиянгидридов (3-алкилоксазолидин-2,5-дионов) аминокислот

В достаточно подробных обзорах по этой теме [8, 9], а также в книге Гринштейна и Виница [25] можно найти множество методик и подробный свод физико-химических, а также литературных данных по синтезу NCA аминокислот.

Выход пептида, синтезированного конденсацией NCA, не может быть высоким, если чистота исходных реагентов недостаточна высока. Это утверждение, верное для любой реакции, особенно важно для реакций с NCA.

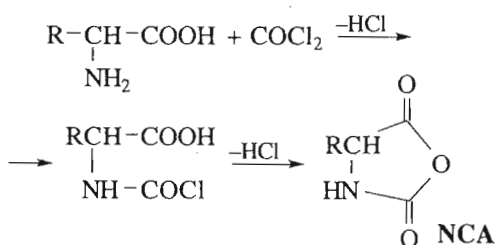
Для получения NCA принято считать классическими методы Лейкса (Leuchs), Фукса–Фартинга (Fuchs–Farthing), метод с использованием трихлорметилхлороформиата (дифосгена), метод с использованием  $\text{SOCl}_2$  (или тионилхлорида,  $\text{SOCl}_2$ ) и солей N-карбоксияминокислот (например, динатриевых) и некоторые другие [9, 25]. Сообщалось также о синтезе NCA Glu(OBzl) с использованием трифосгена [51].

Получение NCA по Лейксу [25, 52] протекает по схеме



Здесь исходные карбаматы обычно приготавливают N-ацилированием свободных аминокислот.

Метод Фукса-Фартинга [53] позволяет получать NCA из соответствующей свободной аминокислоты. Он описывается общей схемой



С процедурной точки зрения этот метод самый простой и наиболее экономичный из вышеупомянутых. Фосген – распространенный реагент химической промышленности, а свободные аминокислоты всегда дешевле их защищенных производных. Общая процедура выглядит так: фосген (газообразный или растворенный [54]) добавляется к суспензии аминокислоты в апротонном растворителе (см. ниже) при интенсивном перемешивании до ее полного растворения, означающего, что реакция близка к завершению. Процесс фосгенирования может длиться от 30 мин до 5–6 ч, в зависимости от аминокислоты, выбранного растворителя и температуры. Затем избыток фосгена удаляют пропускаям азота через реакционный раствор. Раствор концентрируют в вакууме и приливают порциями к смеси низкокипящих углеводородов (петролейный эфир, гексан и т.д.), вызывая тем самым кристаллизацию. Выпавший NCA быстро отфильтровывают, промывают гексаном или другим низкокипящим предельным углеводородом и сушат в вакууме над фосфорным ангидридом и KOH. Чтобы получить чистый NCA, перекристаллизацию необходимо повторить много раз. Хотя эта процедура выглядит на первый взгляд простой, без определенного навыка получить чистый NCA с хорошим выходом бывает иногда нелегко.

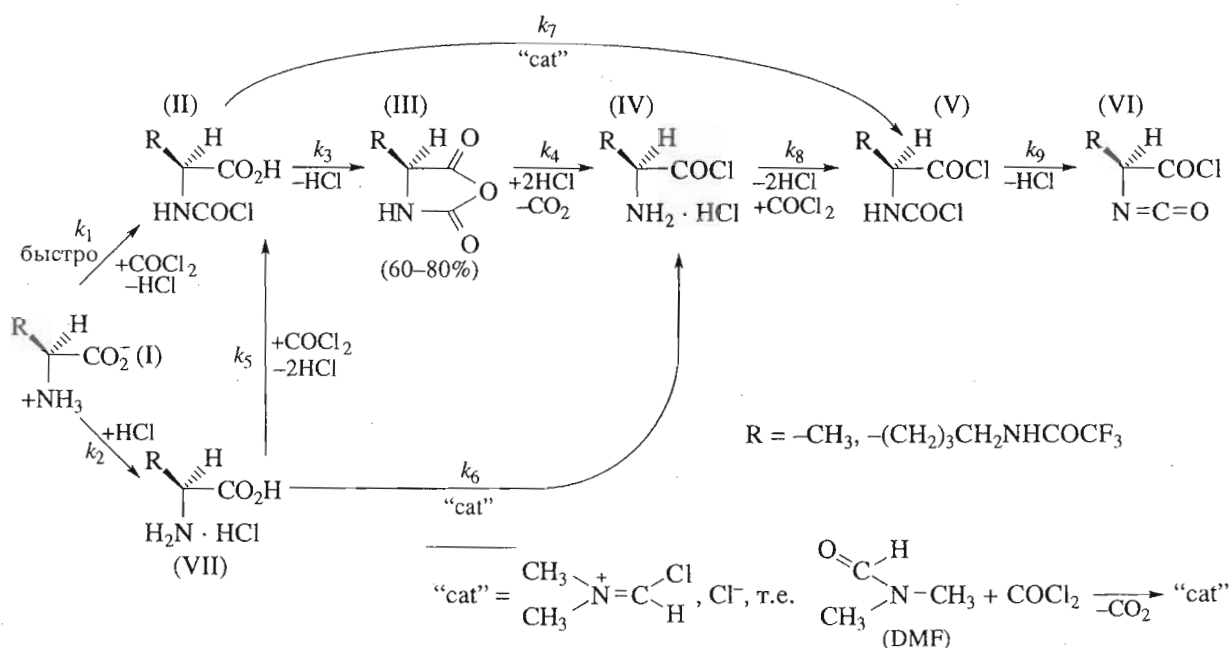
Весь синтез и последующие операции с NCA должны проводиться в условиях абсолютного от-

сутствия воды, аминов, спиртов и других агентов, приводящих к раскрытию цикла NCA.

В случае отсутствия у экспериментатора готового сжиженного фосгена его можно получать, используя реакцию четыреххлористого углерода с формальдегидом в присутствии хлористого алюминия [55] или с SO<sub>3</sub> при нагревании [56]. Полученный таким способом фосген требует тщательной очистки. На пути фосгена из реактора ставят ловушку с концентрированной серной кислотой и несколько ловушек с хлопковым маслом для поглощения примесей хлороводорода, CCl<sub>4</sub> и пиросульфурилхлорида (SO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)O [54, 57]. Авторы работы [54] готовили 4 М растворы SOCl<sub>2</sub> в бензоле, определяя количество фосгена взвешиванием колбы с бензолом до фосгенирования и после него. Используя такой раствор SOCl<sub>2</sub>, они синтезировали ряд NCA с выходом около 90%.

Для приготовления NCA с высоким выходом очень важно правильно выбрать растворитель, учитывая такие его свойства, как растворяющая способность, инертность, стоимость, безопасность, простота удаления. Для простых аминокислот с гидрофобными боковыми цепями применимы такие растворители, как бензол (лучше толуол), хлорированные углеводороды, ацетонитрил и этилацетат. Эти растворители, однако, не годятся для более простых аминокислот (Gly, Ala) и полифункциональных аминокислот с полярными боковыми цепями или защитными группами. Для них лучше всего использовать диоксан или тетрагидрофуран. Тетрагидрофуран – один из лучших растворителей для данного синтеза. Он может подойти для многих аминокислот [54]; его легко удалять и регенерировать (после обработки щелочью). Тем не менее и у него есть недостатки. HCl, выделяющийся при синтезе NCA, реагирует с тетрагидрофураном с образованием тетраметилхлоргидрина [58]. Поскольку NCA являются потенциальными электрофилами и, как известно, способны реагировать со спиртами, это открывает путь для побочной реакции, приводящей к раскрытию цикла NCA. Использование низких температур и малых концентраций аминокислоты снижает побочную реакцию образования тетраметилхлоргидрина и его реакцию с NCA.

Чистоте растворителя стоит уделить особое внимание. Исключительно малые количества определенных примесей могут каталитически сместить кинетическое равновесие в системе. Например, следовые количества DMF, присутствующие в реакционной смеси Ala/COCl<sub>2</sub>/THF (схема 1), могут привести к образованию хлорангидрида N-хлоркарбонилаланина (V) и затем изоцианата (VI) [59] как главного побочного продукта. Подобное загрязнение растворителя может быть причиной низкого выхода NCA (III). Использование THF, не содержащего примесей DMF, при



**Схема 1.** Реакции, протекающие при образовании NCA аминокислоты. Реакции (II) → (V),  $k_7$ , и (VII) → (IV),  $k_6$ , протекают в присутствии DMF (взято с изменениями из [59]).

температуре не выше 30°C позволяет значительно замедлить эти побочные реакции.

NCA, приготовляемые по методу Фукса–Фартинга, всегда содержат HCl, от которого очень трудно избавиться и который мешает реакциям полимеризации и конденсации (например, нейтрализуя амины, используемые в качестве инициаторов полимеризации, и т.д.). Количество его может достигать 3% массы кристаллического NCA [9]. Многочисленные последовательные перекристаллизации практически полностью удаляют HCl, но обычно при этом теряется значительное количество NCA.

Еще одна побочная реакция с HCl отражена в схеме 1 (III → IV,  $k_4$ ). Эта реакция не зависит от типа используемого растворителя. Здесь происходит HCl-индуцируемое раскрытие цикла NCA с образованием соответствующего гидрохлорида хлорангидрида аминокислоты. Последующая реакция с фосгеном (IV → V,  $k_8$ ) и элиминирование HCl (V → VI,  $k_9$ ) ведут опять же к изоцианату хлорангидрида аминокислоты (VI) (как в DMF-катализируемых реакциях). Реакция с образованием этого изоцианата относительно нечувствительна к вариациям температуры и очень чувствительна к концентрации HCl. Если газообразный HCl пропускать вместе с фосгеном через суспензию лейцина в THF, выход изоцианата достигает 76% [60]. Это неудивительно, так как анализ механизма реакции (III → IV,  $k_4$ ) показывает, что образование гидрохлорида хлорангидрида аминокислоты должно быть реакцией 1-го порядка по отноше-

нию к NCA и 2-го порядка по отношению к HCl. Найдено, что гидрохлорид 2-аминоацетилхлорида может быть приготовлен количественно из глицинового NCA и HCl в эфире (см. [9] и приведенные там ссылки).

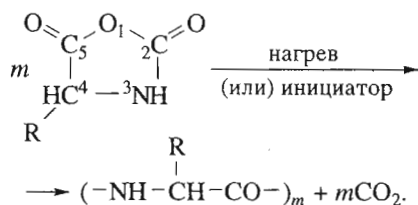
Для снижения эффекта этой HCl-индуцируемой побочной реакции при получении NCA применяют триэфиры фосфористой кислоты (триэтилфосфит, три-*o*-толилфосфит и т.п.) как добавки к растворителю в количестве около 1% стартовой аминокислоты [9]. Хорошим способом удаления HCl-содержащих примесей должно быть также применение активированного угля и окиси алюминия [61]. В работе [62] после удаления фосгена авторы фильтровали несколько раз через целит (Celite) раствор NCA лейцина в этилацетате.

В книге [9] представлен обзор по синтезу NCA всех аминокислот с функциональной боковой цепью, а также дегидроаминокислот. Описание аппаратуры для синтеза NCA можно увидеть, например, в работе [63].

## 2.2. Полимеризация N-карбоксиянгидридов аминокислот

Полимеризация NCA может быть инициирована аминами, алкоксидами, гидроксил-анионами, различными солями, а также нагреванием. Детальный обзор по анализу механизмов NCA-полимеризации можно найти в работе [7].

При определенных условиях можно получить высокомолекулярные полипептиды по следующей схеме:



Можно считать, что  $\text{CO}_2$  здесь – единственный побочный продукт. С помощью NCA [ $^{14}\text{C}$ ]глицина было продемонстрировано, что  $\text{CO}_2$  выделяется только из 2-карбонила NCA-цикла [64]. Несмотря на кажущуюся простоту этой реакции, до сих пор не описан общий механизм полимеризации для всех NCA аминокислот или для всех типов инициаторов. Полимеризация NCA очень чувствительна к целому ряду химических и физических факторов, включая растворимость полимера и конформацию растущей полимерной цепи. Тенденция полипептидов подвергаться межмолекулярной агрегации еще больше затрудняет выяснение механизмов процесса полимеризации. Таким образом, большинство сведений, полученных на сегодняшний день о механизме полимеризации в какой-либо системе *мономер-растворитель-инициатор*, следует экстраполировать к другой подобной системе с большой осторожностью.

Рассматривая амины как инициаторы NCA-полимеризации, мы ограничимся обсуждением лишь первичных и третичных аминов. Механизм инициирования вторичными аминами аналогичен механизму инициирования либо первичными, либо третичными аминами в зависимости от стерического характера заместителя при атоме азота: стерически затрудненные вторичные амины (с большим заместителем при азоте) иницируют полимеризацию подобно третичным аминам, а вторичные амины с маленьким заместителем (например, метильной группой) – подобно первичным. При полимеризации, иницируемой как первичными, так и третичными аминами, нет принципиальной разницы между механизмами *инициирования* и *роста* цепи. Однако, как мы увидим далее, в системе, где NCA-полимеризация была иницирована третичным амином, с течением времени количество свободных аминогрупп будет увеличиваться, т.е. в систему будет добавляться первичный амин, что повлечет за собой параллельную реализацию двух механизмов роста полипептидных цепей.

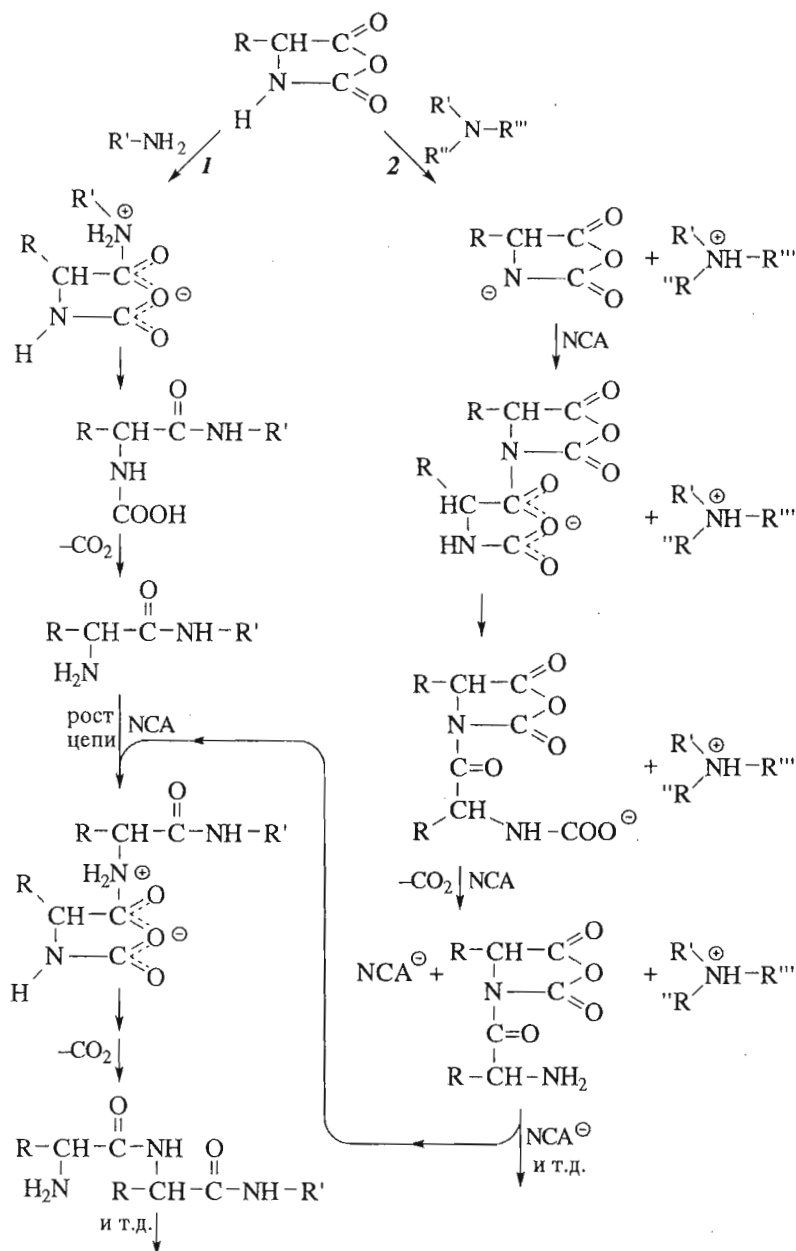
**Полимеризация, иницируемая первичными аминами.** В присутствии первичных аминов полимеризация NCA протекает по так называемому механизму нормального типа, или “нормальному механизму” (схема 2, 1) [7]. Реакция представляет собой много раз повторяющуюся нуклеофильную атаку 5-карбонила NCA аминогруппой пер-

вичного амина с последующим раскрытием NCA-цикла и выделением  $\text{CO}_2$ . Нормальный механизм полимеризации приводит к полипептидам с узким распределением по молекулярным массам. В реакции, протекающей по такому механизму, каждая молекула инициатора начинает собой одну пептидную цепь; в этом случае средняя степень полимеризации определяется начальным отношением концентрации мономера к концентрации инициатора  $[\text{NCA}]_0/[\text{I}]_0$ . Эксперименты с радиоактивно мечеными инициаторами изопропиламиноном, диизопропиламиноном и метилдиизопропиламиноном [65, 66] показали, что при иницировании изопропиламиноном весь первичный амин включается в полимер, при иницировании диизопропиламиноном только 3–11% вторичного амина включается в полимер, а при иницировании метилдиизопропиламиноном включения третичного амина в полипептид не происходит.

Чаще всего нормальный механизм полимеризации осуществляется при иницировании первичными алифатическими аминами в *полярных* растворителях (DMF, нитробензол, *o*-нитроанизол). При этом реакция подчиняется первому порядку. Однако для полимеризации, например, N-карбоксиянгидрида Glu(OBzl) в присутствии *n*-гексил-амина замена полярного растворителя на *неполярный* (диоксан, THF, бензол) приводит к изменению характера кинетики полимеризации. В этом случае кинетическая функция представляет собой сложную кривую, по крайней мере два участка которой линейны (псевдопервый порядок) [7, 67], причем на втором участке скорость полимеризации примерно в 5 раз выше, чем на первом.

Излом кривой происходит при конверсии мономера, равной 20–40%, когда степень полимеризации достигает значений 6–12. Авторы работы [67] объясняют этот излом возможностью формирования  $\alpha$ -спиральной структуры, так как длина цепи  $\text{poly}[\text{Glu}(\text{OBzl})]$  в 6–12 остатков достаточна для образования  $\alpha$ -спирали [68]. В соответствии с этой моделью N-концевая аминогруппа пептида становится более доступной для мономера, что резко ускоряет реакцию полимеризации.

Авторы работ [69–71] проводили аналогичные эксперименты по полимеризации NCA лейцина и фенилаланина (диоксан, DMF, первичные или вторичные амины), из которых они заключили, что для этих случаев, равно как и для полимеризации N-карбоксиянгидрида Glu(OBzl), в районе излома скорее всего происходит конформационный переход  $\beta$ -структура  $\rightarrow$   $\alpha$ -спираль. И действительно, было показано, что при обычно используемых концентрациях мономера 2–4% полипептидные цепи имеют склонность к межмолекулярной агрегации в неполярных растворителях (диоксан, THF) и что в самом начале реакции растущие олигомеры образуют  $\beta$ -структуры [67]. Авторы работ [72, 73] предположили, что



**Схема 2.** Два альтернативных (и, видимо, сосуществующих) механизма иницирования и роста цепи при полимеризации NCA: 1 – механизм нормального типа; 2 – механизм активированного мономера. При иницировании третичными аминами образование в результате реакции роста цепи N-концевых свободных аминогрупп делает возможным параллельную реализацию обоих механизмов (взято из [77]).

переход клубок  $\rightarrow$   $\alpha$ -спираль не может целиком обусловить изменение кинетического поведения системы. В качестве альтернативного объяснения ими было предложено образование полимерных агрегатов при критических значениях концентрации и длины цепи. В этом случае за счет сорбции NCA на полимерных частицах возникает высокая локальная концентрация мономера (NCA) вблизи центра полимеризации, что ведет к наблюдаемому ускорению реакции полимеризации (эффект цепи).

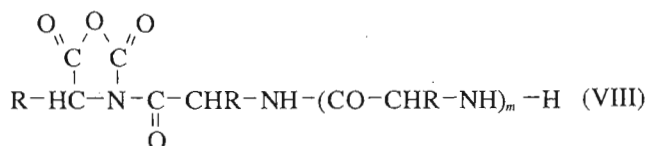
Так или иначе, радиоактивные первичные амины (инициаторы) полностью включаются в полимер вне зависимости от полярности растворителя, подвергая нуклеофильной атаке 5-карбонил NCA-кольца. Таким образом, чтобы получить полипептид с узким молекулярно-массовым распределением и степенью полимеризации, близкой к желаемой, следует использовать в качестве инициаторов первичные амины; полипептид должен быть хорошо растворим в реакционной среде и отношение  $[NCA]_0/[I]_0$  никогда не должно

превышать 100. При больших значениях соотношения  $[NCA]_0/[I]_0$  полимеризация идет слишком медленно и случайные примеси могут приводить к заметным побочным реакциям, работая как инициаторы. Но при  $[NCA]_0/[I]_0 \leq 100$  высоких степеней полимеризации ( $\overline{DP} \geq 100$ ) достигнуть обычно не удается.

**Иницирование третичными аминами.** Для синтеза высокомолекулярных полипептидов ( $\overline{DP} \geq 100$ ) в качестве инициаторов NCA-полимеризации часто используют третичные амины (апротонные инициаторы). В этом случае инициатор (точнее, катализатор) не включается в полимер, что было показано с помощью радиоактивно меченных третичных аминов. Вместо третичных аминов используют также еноляты, алкоксиды, гидроксиды щелочных металлов, т.е. сильные основания. В таких реакциях степень полимеризации гораздо выше значений, определяемых из соотношения мономер/инициатор. В неполярных растворителях (диоксан, THF, бензол) катализ — характерная черта полимеризации.

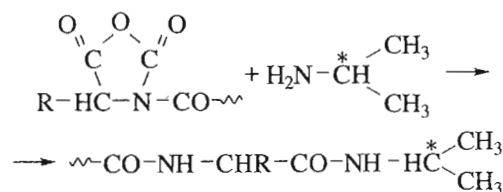
Для объяснения экспериментальных результатов, полученных для NCA-полимеризации, иницированной третичными аминами, авторы работы [74] предложили механизм активированного мономера, в соответствии с которым при иницировании полимеризации происходит отрыв протона от молекулы NCA-мономера с образованием активированного NCA (аниона). NCA-анион атакует 5-карбонил другой молекулы NCA-мономера или циклического конца растущей полимерной цепи (схема 2, 2).

В соответствии с этим механизмом цепь растет путем нуклеофильной атаки активированным мономером циклического конца (концевого N-карбоксиянгидрида) бифункционального интермедиата (см. ниже) с образованием карбамат-аниона, который в свою очередь отрывает протон от другой молекулы NCA, и т.д. При этом третичный амин работает скорее как катализатор, чем как инициатор, оставаясь все время в растворе. Этот механизм роста был доказан путем использования N-замещенного N-карбоксиянгидрида — NCA саркозина. NCA саркозина не может полимеризоваться с третичными аминами [75]. Это же касается NCA пролина. Существование циклического конца бифункционального интермедиата



было прямо показано для полимеризации N-карбоксиянгидрида Glu(OBzl) в DMF [76]. Избыток  $^{14}\text{C}$ -меченого первичного амина, добавленного в

ходе полимеризации, ведет к разрушению C-концевого карбоксиянгидрида:



При этом радиоактивная метка включается в полимер. Было также замечено, что при концентрировании реакционной смеси существенно возрастают молекулярные массы получаемых полиаминокислот (вследствие межцепочечной конденсации).

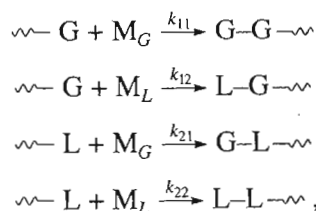
В случае вторичных аминов оба механизма иницирования и роста цепи (нормального типа и активированного мономера) (схема 2) могут сосуществовать друг с другом [76, 77].

Вероятнее всего, на ранних стадиях полимеризации, иницированная третичными аминами, идет в основном по механизму активированного мономера, а на поздних — по механизму нормального типа, когда в качестве первичного амина выступает свободная N-концевая аминогруппа растущей полимерной цепи [70] (схема 2). Полимеризация NCA в водных буферных растворах описана в работах [7, 74].

### 2.2.1. Состав полипептидов и распределение остатков по длине цепи при NCA-сополимеризации

Поскольку в каждой системе NCA-сополимеризации двух или более разных аминокислот при каких-либо данных условиях реакции реакционные способности мономеров разные, следует ожидать, что растущая полипептидная цепь будет обогащена мономером с наивысшей реакционной способностью на ранних стадиях полимеризации. По мере исчерпания высокорекционноспособного мономера макромолекула будет постепенно обогащаться другими мономерами с реакционными способностями ниже, чем у первого, в порядке убывания их значений. Другими словами, случайность сополимера зависит от условий проведения синтеза.

Кинетические исследования двухкомпонентной сополимеризации различных NCA показали, что это действительно так [78–81]. Например, для поликонденсации N-карбоксиянгидридов Glu(OBzl) и Leu в диоксане кинетическая схема выглядит следующим образом:





где G – концевой остаток Glu(OBzl), L – концевой остаток Leu,  $M_G$  и  $M_L$  – соответствующие мономеры. Реакционные способности N-карбоксихидридов Glu(OBzl) и лейцина для такой системы будут выражены как  $r_G = k_{11}/k_{12}$ ,  $r_L = k_{22}/k_{21}$  соответственно. Показано [80], что для упомянутой системы  $r_G = 1.57$ ,  $r_L = 0.67$  (по методам Файнемана–Росса и Келена–Тюдоса [82, 83]). В целом, если реакционные способности  $r_1$  и  $r_2$  каких-либо двух мономеров близки по значениям, разброс макромолекул в реакционной смеси по составу будет уже, чем в случае, когда разница значений  $r_1$  и  $r_2$  велика. Например, для сополиконденсации N-карбоксихидридов Glu(OBzl) и валина в диоксане  $r_G : r_V = 2.7 : 0.3$ , а в смеси бензол–дихлорметан (1 : 1) – 2.6 : 0.6; в последнем случае наблюдаемое распределение полипептидных цепей по их составу было гораздо уже [79].

Различие же реакционных способностей мономеров, видимо, зависит от многих факторов, в том числе и от растворителя. Суммируя литературные данные, можно сказать, что наиболее равномерное (насколько это возможно) распределение аминокислотных остатков в полипептидной цепи получается при сополимеризации NCA в бензоле или смеси бензол–дихлорметан (1 : 1). Сколько-нибудь заметного влияния инициатора на аминокислотный состав сополимеров до сих пор не наблюдалось.

Авторы работы [80] предположили, что реакционная способность NCA L-аминокислот повышается с повышением способности соответствующей аминокислоты участвовать в образовании  $\alpha$ -спирали. В их работе проводилась двухкомпонентная сополимеризация NCA Tyr(Ac) с NCA аланина, валина и глицина в диоксане при 25°C в присутствии *n*-бутиламина. Авторы представили свои результаты следующим образом:

реакционная способность NCA:

$$r_{Ala}(2.65) > r_{Val}(0.57) > r_{Gly}(0.28);$$

способность образования  $\alpha$ -спирали (по Chou–Fasman [84]):

$$Ala(1.42) > Val(1.06) > Tyr(0.69) > Gly(0.57).$$

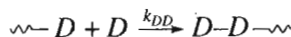
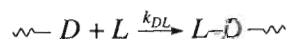
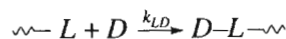
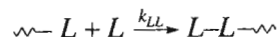
При сравнении этих характеристик видно, что реакционная способность NCA убывает от Ala к Gly; в том же порядке убывает и способность аминокислот участвовать в образовании  $\alpha$ -спирали. Однако по поводу влияния вторичной структуры растущего полипептида на полимеризацию NCA (на скорость, состав полипептида, стереоселективность) в литературе наблюдается множество противоречий. Интересные исследования в этой области с использованием ЯМР-спектроскопии проведены в работах [85, 86].

### 2.2.2. Стереоселективность при сополимеризации NCA аминокислот

Во всех работах по выяснению причин и механизмов стереоселективности NCA-полимеризации последняя представлялась как сополимеризация NCA D- и L-аминокислот (D- и L-NCA). Как правило, это были NCA D- и L-изомеров какой-нибудь одной аминокислоты. Используя кинетический подход к этой проблеме, авторы работ [73, 87] пришли к заключению о значительной роли эффекта цепи в механизме стереорегуляции полимеризации. Эффект цепи упрощенно представляет собой сорбцию мономерных NCA на растущих полимерных частицах. За счет сорбции повышается локальная концентрация мономера вблизи активного центра (конца) растущей цепи, что ведет к ускорению реакции полимеризации. Однако рацемические смеси NCA полимеризуются медленнее, чем оптически чистые NCA.

Авторы работы [73], интерпретируя свои кинетические данные по сополимеризации N-карбоксихидридов D- и L- $\gamma$ -бензилглутамата, заключили, что сорбция D-NCA на L-полипептиде (полипептиде, состоящем из остатков L-конфигурации) должна быть сильнее, чем D-NCA на D-полипептиде, и наоборот. Этим они объяснили тот факт, что скорость полимеризации рацемической смеси D- и L-NCA (1 : 1) существенно ниже скоростей полимеризации либо чистого L-NCA, либо чистого D-NCA [69, 71] (рисунок), т.е. мономер противоположной оптической конфигурации, сорбируясь на полипептиде, уменьшает локальную концентрацию своего мономера, что ведет к замедлению реакции. Авторы считают полимеризацию очень стереоселективной, т.е. константы скоростей присоединения D-NCA к “L-концу” и L-NCA к “D-концу” цепи очень низкими по сравнению с константами скоростей соответствующих L-L- и D-D-конденсаций.

Авторы работ [69, 70], рассматривая возможные варианты полимеризации

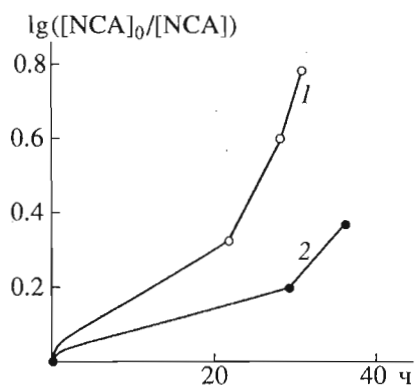


и исходя из предположения, что  $k_{LD} = k_{DL} = 0$ , получили уравнение для общей скорости роста цепи в виде

$$V_p = k_{LL}[P_L^*][L] + k_{DD}[P_D^*][D],$$

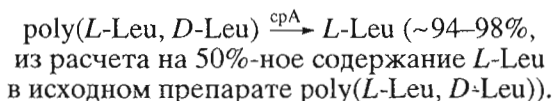
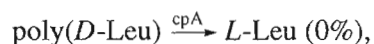
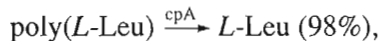
где  $[P_L^*]$  и  $[P_D^*]$  – концентрации активных цепей с L- и D-мономерной единицей на конце,  $[M]$  – общая концентрация NCA,  $[L]$  и  $[D]$  – концентрации NCA L- и D-аминокислот. Приняв  $[L] = [D] = 1/2 [M]$ , а  $[P_L^*] + [P_D^*] = [P^*]$ , они получили

$$V = \frac{k}{2}[P^*][M], \text{ где } k_{LL} = k_{DD} = k.$$



Кинетика полимеризации NCA *L*- или *D*-аминокислот (1) и 50%-ной рацемической смеси NCA (2) (взято из [71]).

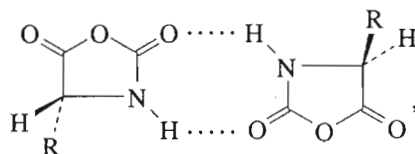
Иными словами, скорость полимеризации 50%-ной рацемической смеси *L*- и *D*-NCA должна быть в 2 раза ниже скорости полимеризации оптически чистых NCA. Найденное ими отношение  $k_{LL}/k_{D+L}$  или  $k_{DD}/k_{D+L}$  (где  $k_{D+L}$  – кажущаяся константа скорости полимеризации 50%-ной рацемической смеси *L*- и *D*-NCA) было равно 2 вне зависимости от инициатора (бензиламин, метилбензиламин) (рисунок). Из этого авторы заключают, что при такой сополимеризации образуется смесь изотактических *L*- и *D*-полипептидов. При этом они опираются на любопытные данные [73, 88] – протеолитическую деградацию poly(*L*-Leu, *D*-Leu), полученного полимеризацией 50%-ной рацемической смеси NCA *L*- и *D*-лейцина, с помощью карбоксипептидазы А (срА):



С другой стороны, авторы работы [89], используя <sup>15</sup>N-ЯМР-спектроскопию и препараты poly(*L*-Leu, *D*-Leu) и poly[*L*-Glu(OMe), *D*-Glu(OMe)], полученные ими методом NCA-полимеризации рацемических смесей, утверждают, что при любых условиях полимеризации (инициатор, растворитель, нуклеофильные добавки, температура) рацемической смеси NCA *D*- и *L*-аминокислот получаются блок-сополимеры, состоящие из *L*- и *D*-изотактических блоков. По данным этих авторов, длина как *L*-, так и *D*-стереоблоков не превышает 4 мономерных единиц. Правда, при увеличении начальной концентрации одного из оптически активных мономеров длина стереоблоков увеличивается и, например, при соотношении  $[D\text{-NCA}]/[L\text{-NCA}] = 1/12$  составляет около 16 мономерных единиц. Свои выводы авторы подкрепляют экспериментами по растворимости изо- и синдиотактических полипептидов, в том числе и своих

препаратов poly(*L*-Leu, *D*-Leu) и poly[*L*-Glu(OMe), *D*-Glu(OMe)], в муравьиной кислоте, *m*-крезоле, DMSO и DMF.

Дискутируя с Эль-Саббах и Элиасом [69–71], Крихелдорф и Хал [89] указывают на возможность образования стабильных ассоциатов (димеров) энантиомерных NCA,



объясняя тем самым замедление скорости полимеризации в рацемических смесях NCA аминокислот.

Такие стабильные ассоциаты могут снижать активность NCA в реакции роста цепи.

Подытоживая, можно с некоторой степенью уверенности заключить, что, несмотря на противоречия в литературе, использование даже оптически не абсолютно чистых NCA (чистота зависит от способа их получения) не должно заметно сказываться на стереорегулярности полученного на их основе полипептида.

### 3. Заключение

Синтетические высокомолекулярные полипептиды на протяжении уже нескольких десятков лет служат хорошими моделями для решения ряда задач в биофизике, физике белка, биоорганической химии и других областях науки, а также используются в прикладных целях. Один из самых эффективных методов получения таких полипептидов – поликонденсация аминокислотных N-карбоксиангидридов. Хотя явление NCA-поликонденсации известно относительно давно и ее активно использовали в 60-е годы для синтеза полиаминокислот, как ни странно, многое в этой области до сих пор остается не вполне ясным. Например, если вопросы о механизмах инициирования и роста полипептидной цепи, а также распределения по ней аминокислотных остатков в ходе NCA-поликонденсации можно считать относительно решенными, то вопрос о стереоселективности реакции NCA-поликонденсации решен не до конца.

В завершение нашего историко-методического обзора еще раз отметим, что метод поликонденсации NCA аминокислот гарантирует: 1) получение полипептидов практически любой желаемой степени полимеризации – от очень низкой (несколько остатков) до очень высокой (1000 и выше), в зависимости от выбранных инициатора и системы растворителей; 2) отсутствие в реакционной смеси побочных продуктов. Метод NCA-поликонденсации удобен для синтеза высокомолекулярных полиаминокислот, случайных сополимеров аминокислот и иногда полипептидов, состоящих из повторяющихся коротких (2–3 остатка) пептидных блоков. Однако этот метод неудобен для

синтеза полипептидов с уникальной аминокислотной последовательностью.

Основной и часто очень значительной трудностью в применении метода NCA-поликонденсации является синтез исходных N-карбоксиянгидридов. В связи с этим наш обзор полезен, в частности, тем, что позволяет читателю проследить весь путь синтеза полиаминокислоты (полипептида), начиная с синтеза фосгена и исходных NCA.

Работа получила частичную финансовую поддержку от Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 93-04-6635). Авторы благодарны проф. Ю.В. Митину за чтение рукописи, обсуждение некоторых ее разделов и ценные замечания при написании этой статьи, а также канд. хим. наук И.А. Прудченко за критические замечания.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ptitsyn O.B. // *Conformation in Biology* / Eds R. Srinivasan, R. Sarma. N.Y.: Adenine Press, 1983. P. 49–58.
2. Птицын О.Б. Белок как отредактированный статистический сополимер. Доклад на юбилейной сессии совета НЦБИ АН СССР. Пуцзино: НЦБИ АН СССР, 1983.
3. Galzitskaya O., Finkelstein A. // *Protein Eng.* 1995. V. 8. P. 883–892.
4. Lehninger A.L., Nelson D.L., Cox M.M. *Principles of Biochemistry*. 2nd Ed. N.Y.: Worth Publ., 1993. P. 76, 887–889.
5. Davidson A.R., Lumb K.R., Sauer R.T. // *Nature Struct. Biol.* 1995. V. 2. P. 856–864.
6. *Polyamino Acids, Polypeptides, and Proteins* / Ed. M. Stahmann. Madison: Univ. Wisconsin Press, 1962.
7. Goodman M., Peggion E. // *Pure Appl. Chem.* 1981. V. 53. P. 699–714.
8. Kricheldorf H.  *$\alpha$ -Amino-Acid-N-Carboxy Anhydride and Related Heterocycles*. B.: Springer-Verlag, 1987. P. 3–58.
9. Blacklock T., Hirschmann R., Veber D. // *The Peptides. Analysis, Synthesis, Biology*. V. 9 / Eds S. Udenfriend, J. Meienhofer. N.Y.: Acad. Press, 1993. P. 39–102.
10. Тэнфорд Ч. Физическая химия полимеров.: Пер. с англ. М.: Химия, 1965. С. 191.
11. Yang J.T. // *Nature*. 1985. V. 313. P. 164.
12. Bychkova V., Gudkov A.T., Miller W., Mitin Yu., Ptitsyn O., Shprungin I. // *Biopolymers*. 1975. V. 14. P. 1739–1753.
13. Бычкова В.Е. Конформационные переходы в сополимерах L-Glu с гидрофобными аминокислотами. Дис. ... канд. физ.-мат. наук. Пуцзино: Институт белка АН СССР, 1975.
14. Anufrieva E., Bychkova V., Krakovyak M., Pautov V., Ptitsyn O. // *FEBS Lett.* 1975. V. 55. P. 46–59.
15. Шибнев В.А., Марьяш Л.И., Порошин К.Т. // Докл. АН СССР. Сер. хим. 1972. Т. 207. С. 625–627.
16. Шибнев В.А., Лазарева А.В., Финогенова М.П. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1969. С. 392–397.
17. Шибнев В.А., Лазарева А.В. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1969. С. 398–405.
18. Шибнев В.А., Лисовенко А.В., Чуваева Т.П., Порошин К.Т. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1968. С. 2564–2571.
19. Шибнев В.А., Исмоилов М., Халиков Ш.Х., Лакизова И.Ю. // *Химия природ. соединений*. 1979. С. 687–699.
20. Шибнев В.А., Марьяш Л.И., Мейтус Э.Е. // *Химия природ. соединений*. 1978. С. 131–133.
21. Марьяш Л.И., Шибнев В.А. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1973. С. 435.
22. Марьяш Л.И., Шибнев В.А. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1972. С. 1858.
23. Creighton T.E. *Proteins: Structure and Molecular Properties*. 2nd Ed. N.Y.: W.H. Freeman and Co., 1993. P. 4, 43.
24. Пептиды. Основные методы образования пептидных связей / Ред. Э. Гросс, И. Майенхофер: Пер. с англ. М.: Мир, 1983.
25. Гринштейн Дж., Виниц М. *Химия аминокислот и пептидов*: Пер. с англ. М.: Мир, 1965.
26. Pirkova J., Churkina S., Gut V., Fric I., Blaha K. // *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1988. V. 53. P. 145–156.
27. Sato H., Tanaka Y. // *Macromol. Chem.* 1984. V. 185. P. 1069–1078.
28. De Tar D., Honsberg W., Honsberg V., Wieland A., Gouge M., Bach H., Tahara A., Briniger W., Rogers F. // *J. Am. Chem. Soc.* 1963. V. 85. P. 2973–2976.
29. Bailey W., Capozza R. // *Polym. Prepr.* 1968. V. 9. P. 1261–1265.
30. Brundish D., Wade R. // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*. 1976. P. 2186–2189.
31. Gabriel T., Jimenez M., Felix A., Michalewsky J., Meienhofer J. // *Int. J. Pept. Protein Res.* 1977. V. 9. P. 127–136.
32. Romovacek H., Drabarek S., Kawasaki K., Dowd S., Obermeier R., Hofmann K. // *Int. J. Pept. Protein Res.* 1974. V. 6. P. 435–445.
33. Denkwalter R., Schwam H., Strachan R., Beesley T., Veber D., Schoenewaldt E., Barkemeyer H., Paleveda W., Jr., Jacob T., Hirschmann R. // *J. Am. Chem. Soc.* 1966. V. 88. P. 3163–3164.
34. Halstrom J., Kovacs K. // *Acta Chem. Scand.* 1986. V. B40(6). P. 462–465.
35. Mobasheri S., Johnston M. // *J. Org. Chem.* 1985. V. 50. P. 2200–2202.
36. Spencer J., Antonenko V.V., Delaet N.G., Goodman M. // *Int. J. Pept. Protein Res.* 1992. V. 40. P. 282–293.
37. Fehrentz J.-A. // *Tetrahedron Lett.* 1994. V. 35. P. 1557–1560.
38. Bruckner H., Lupke M. // *HPLC 93. 17th Int. Sympos. on Column Liquid Chromatography. Book of Abstracts*. 1993. V. 2. P. 222.
39. Fuller W., Cohen M., Schabankarech M., Blair R., Miller T., Goodman M., Naider F. // *Peptides 1990* / Eds E. Giralt, A. Andreu. Leiden: ESCOM Sci. Publishers B.V., 1991. V. 45–46.
40. Loffet A., Zhang H., Sennyey G. // *Peptides 1992* / Eds C. Schneider, A. Eberle. Leiden: ESCOM Sci. Publishers B.V., 1993. P. 27–28.
41. Fuller W., Cohen M., Schabankarech M., Blair R., Goodman M., Naider F. // *J. Am. Chem. Soc.* 1990. V. 112. P. 7414–7416.
42. Johanson C., Blomberg L., Hlebowicz E., Nicklasson H., Nilsson B., Andersson L. // *Peptides 1994* / Ed. H.L.S. Maia. Leiden: ESCOM Sci. Publishers B.V., 1995. P. 34–35.
43. Rawer S., Koch M., Pipkorn R. // *Peptides 1994* / Ed. H.L.S. Maia. Leiden: ESCOM Sci. Publishers B.V., 1995. P. 301–302.

44. Loffet A. // *Reactive Polymers* (Elsevier). 1994. V. 22. P. 165–170.
45. Pratzel H., Pfaender P. // Ger. Patent Application 1974. p 25 16 G 75 12 263. 7 (8.4.1974). GP.
46. Douy A., Gallot B. // *Macromol. Chem.* 1986. V. 187. P. 465–483.
47. Moussebois C., Heremans J., Osinski P., Rennerts W. // *J. Org. Chem.* 1976. V. 41. P. 1340–1343.
48. Daly W., Lee S. // *J. Macromol. Sci., Chem.* 1988. V. A25(5–7). P. 705–727.
49. Biondi L., Filira F., Gobbo M., Polese A., Scolaro B., Rocchi R. // *Peptides 1994* / Ed. H.L.S. Maia. Leiden: ESCOM Sci. Publishers B.V., 1995. P. 723–724.
50. Aoi K., Tsutsumiuchi K., Okada M. // *Macromolecules.* 1994. V. 27. P. 875.
51. Wilder R., Mobasher S. // *J. Org. Chem.* 1992. V. 57. P. 2755–2756.
52. Leuchs H. // *Ber.* 1906. V. 39. P. 857.
53. Farthing A. // *J. Chem. Soc.* 1950. P. 3213–3217.
54. Fuller W.D., Verlander M.S., Goodman M. // *Biopolymers.* 1976. V. 15. P. 1869–1871.
55. Гершкович А., Кибурев В. Синтез пептидов. Реагенты и методы. Киев: Наук. думка, 1987. С. 99.
56. Карякин Ю.В., Ангелов И.И. Чистые химические вещества. М.: Химия, 1974. С. 368.
57. Farlow M. // *Org. Synth.* 1963. Coll. V. 4. Note 8. P. 523–524.
58. Starr D., Hixon R. // *Organic Syntheses* / Ed. A.H. Blatt. N.Y.: Wiley, 1943. Coll. V. 2. P. 571–572.
59. Blacklock T.J., Shuman R.F., Butcher J.W., Shearin W.E., Jr., Budavari J., Grenda V.J. // *J. Org. Chem.* 1988. V. 53. P. 836–844.
60. Iwakura Y., Uno K., Kang S. // *J. Org. Chem.* 1965. V. 30. P. 1158–1161.
61. Fujimoto Y. // U.S. Patent 1974. № 3936469.
62. Fasman G., Lindblow C., Bodenheimer E. // *Biochemistry.* 1964. V. 3. P. 155–166.
63. Ebert Chr., Ebert G., Kroker V. // *Progr. Colloid & Polymer. Sci.* 1976. V. 60. P. 183–193.
64. Hegns K., Brockmann J. // *Z. Naturforsch.* 1954. V. 96. P. 21–26.
65. Terbojevich M., Pizzio G., Peggion E., Cozani A., Scofone E. // *J. Am. Chem. Soc.* 1967. V. 89. P. 2733–2736.
66. Peggion E., Terbojevich M., Cozani A., Colombini C. // *J. Am. Chem. Soc.* 1966. V. 88. P. 3630–3632.
67. Idelson M., Blout E. // *J. Am. Chem. Soc.* 1957. V. 79. P. 3948–3955.
68. Goodman M., Schmitt E. // *J. Am. Chem. Soc.* 1959. V. 81. P. 5507–5508.
69. El-Sabbah M., Elias H.-G. // *Macromol. Chem.* 1981. V. 182. P. 1617–1628.
70. El-Sabbah M., Elias H.-G. // *Macromol. Chem.* 1981. V. 182. P. 1629–1640.
71. El-Sabbah M., Elias H.-G. // *J. Macromol. Sci., Chem.* V. A16(2). 1981. P. 579–586.
72. Williams F., Brown R. // *Biopolymers.* 1973. V. 12. P. 647–654.
73. Williams F., Eshaque M., Brown R. // *Biopolymers.* 1971. V. 10. P. 753–765.
74. Bamford C., Block H. // *Polyamino-Acids, Polypeptides and Proteins* / Ed. M. Stahmann. Madison: Univ. Wisconsin Press, 1962. P. 65–80.
75. Bamford C., Block H., Pugh A. // *J. Chem. Soc.* 1961. P. 2057–2063.
76. Kricheldorf H. // *Macromol. Chem.* 1977. V. 178. P. 1959–1970.
77. Hashimoto Y., Imanishi Y., Higashimura T. // *Biopolymers.* 1978. V. 17. P. 2561–2572.
78. Sederel W., Deshmane S., Hayashi T., Anderson J. // *Biopolymers.* 1978. V. 17. P. 2835–2849.
79. Deshmane S., Hayashi T., Sederel W., Anderson J. // *Biopolymers.* 1978. V. 17. P. 2850–2864.
80. Atreyi M., Rao M., Kumar S. // *Biopolymers.* 1983. V. 22. P. 747–753.
81. Kumar A. // *Indian J. Chem.* 1987. V. 26B. P. 1062–1064.
82. Fineman M., Ross S. // *J. Polym. Sci.* 1950. V. 5. P. 259–265.
83. Kelen T., Tudos F. // *J. Macromol. Sci., Chem.* 1975. V. 9. P. 1–27.
84. Chou P.Y., Fasman G.D. // *Adv. Enzymol.* 1978. V. 47. P. 145–148.
85. Kricheldorf H., Muller D., Hull W. // *Int. J. Biol. Macromol.* 1986. V. 8. P. 20–26.
86. Kricheldorf H.R. // *Macromol. Chem.* 1983. V. 184. P. 1407–1421.
87. Imanishi Y. // *Pure Appl. Chem.* 1981. V. 53. P. 715–727.
88. Semen J., Elias H. // *Macromol. Chem.* 1978. V. 179. P. 463.
89. Kricheldorf H., Hull W. // *Biopolymers.* 1982. V. 21. P. 1635–1655.

## Synthetic Polyamino Acids and Polypeptides. Preparation by the *N*-Carboxyanhydride Method

A. S. Karnup, V. N. Uverskii, and V. N. Medvedkin

*Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142292 Russia*

**Abstract**—Methods of synthesis of high-molecular polyamino acids and polypeptides were considered, with the method based on *N*-carboxyanhydrides of amino acids being described in detail. Mechanisms of the *N*-carboxyanhydrides polycondensation and copolycondensation, stereoselectivity, and distribution of amino acid residues along a peptide chain, as well as some details of experimental procedures of their synthesis and polycondensation were described.

**Key words:** *N*-carboxyanhydrides, polyamino acids, NCA-polymerization/polycondensation.