

## 4.11. Пептиды и белки

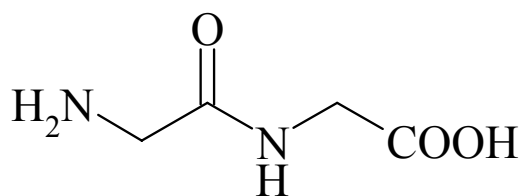
*Гомодетные* пептиды – это пептиды и белки, состоящие из остатков  $\alpha$ -аминокислот, соединенных между собой *амидными* связями  $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$ .

*Гетеродетные* пептиды – это пептиды, в которых наряду с амидной имеются и другие виды связей ( $-\text{S}-$ ;  $-\text{S}-\text{S}-$ ;  $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ ) между остатками  $\alpha$ -аминокислот .

### Номенклатура пептидов и белков

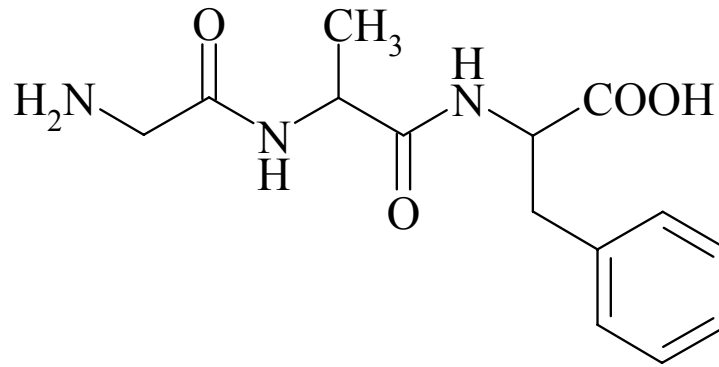
Пептиды можно классифицировать по числу аминокислотных остатков, называют их как производные той аминокислоты, которая заканчивает полипептидную цепь – это **С-концевая** аминокислота. Кислота,  $\alpha$ -аминогруппа которой находится первой в полипептидной цепи, называется **Н-концевой** аминокислотой.

Примеры:



дипептид глицилглицин (H-Gly-Gly-OH)

С- и N-концевые аминокислоты – остатки глицина.

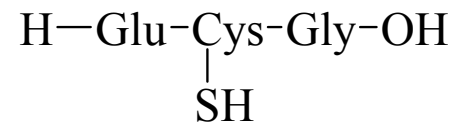


Трипептид глицилаланилфенилаланин (Н–Gly–Ala–Phe–ОН)

С-концевая аминокислота – остаток фенилаланина,

Н-концевая аминокислота – остаток глицина.

По числу α-аминокислотных остатков, участвующих в построении пептида, различают **олигопептиды** (ди-, три-, тетра- и т. д. до *дека*пептида) и **полипептиды**. Пептиды встречаются в живых организмах как продукты распада белков, например, трипептид глутатион:



Некоторые пептиды (окситоцин, вазопрессин, инсулин) имеют громадное биологическое значение, являются важными гормонами.



вазопрессин

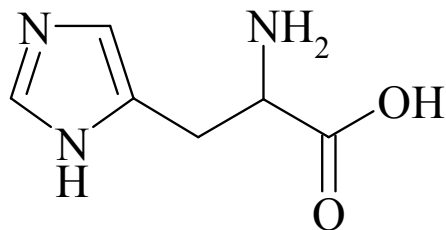
Вазопрессин вырабатывается гипофизом и стимулирует сокращение кровеносных сосудов.

Инсулин – биологически важный пептид, который построен из двух цепей, состоящих из 21 и 30  $\alpha$ -аминокислотных остатков, которые связаны между собой дисульфидными мостиками. Вырабатывается поджелудочной железой и снижает содержание сахара в крови.

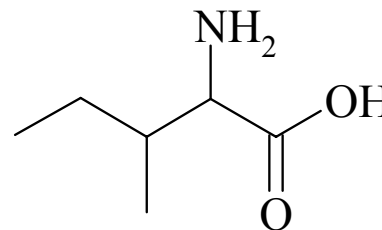
## 4.12. Структура белков

Белки, или протеины (protos [греч.] – первый) – важнейший класс биологически активных веществ. Без белков невозможно представить себе жизнь. Они чрезвычайно разнообразны по структуре и выполняют многочисленные биологические функции.

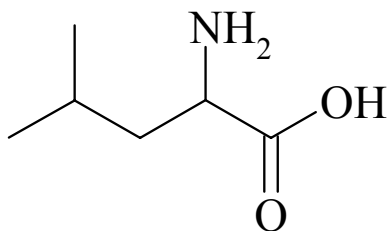
Существуют многие миллиарды химически индивидуальных белков. Молекулярная масса белков – от 5–10 тысяч до 1 млн. и более. Белки важная составная часть пищи человека и животных. Человеку необходимо в день 70 г белка. Существуют так называемые незаменимые аминокислоты, входящие в состав белков, они не синтезируются в организме и должны поступать с пищей. Это такие аминокислоты, как:



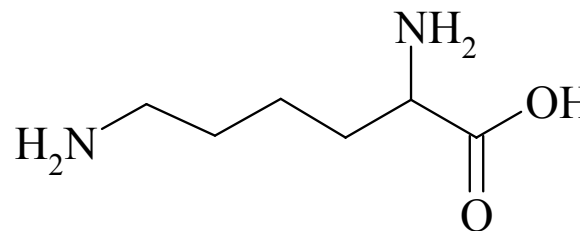
гистидин



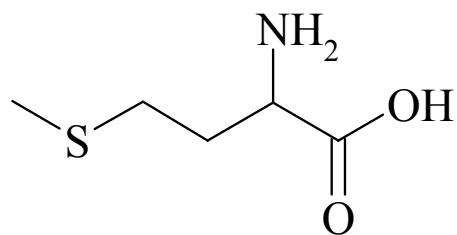
изолейцин



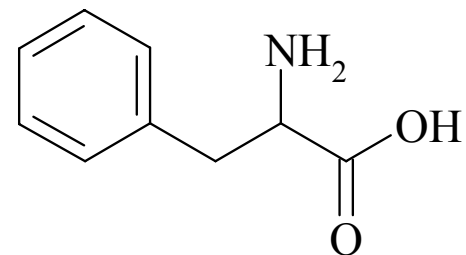
лейцин



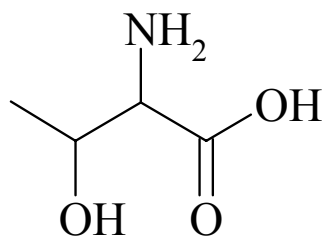
лизин



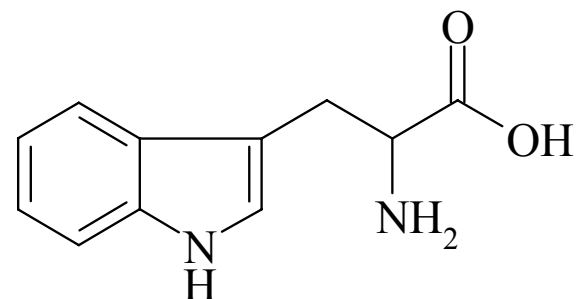
метионин



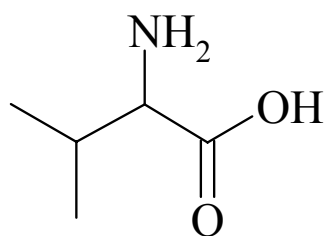
фенилаланин



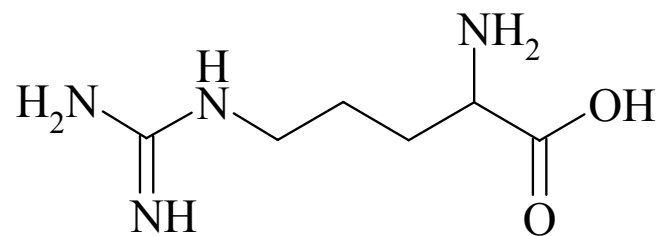
треонин



триптофан



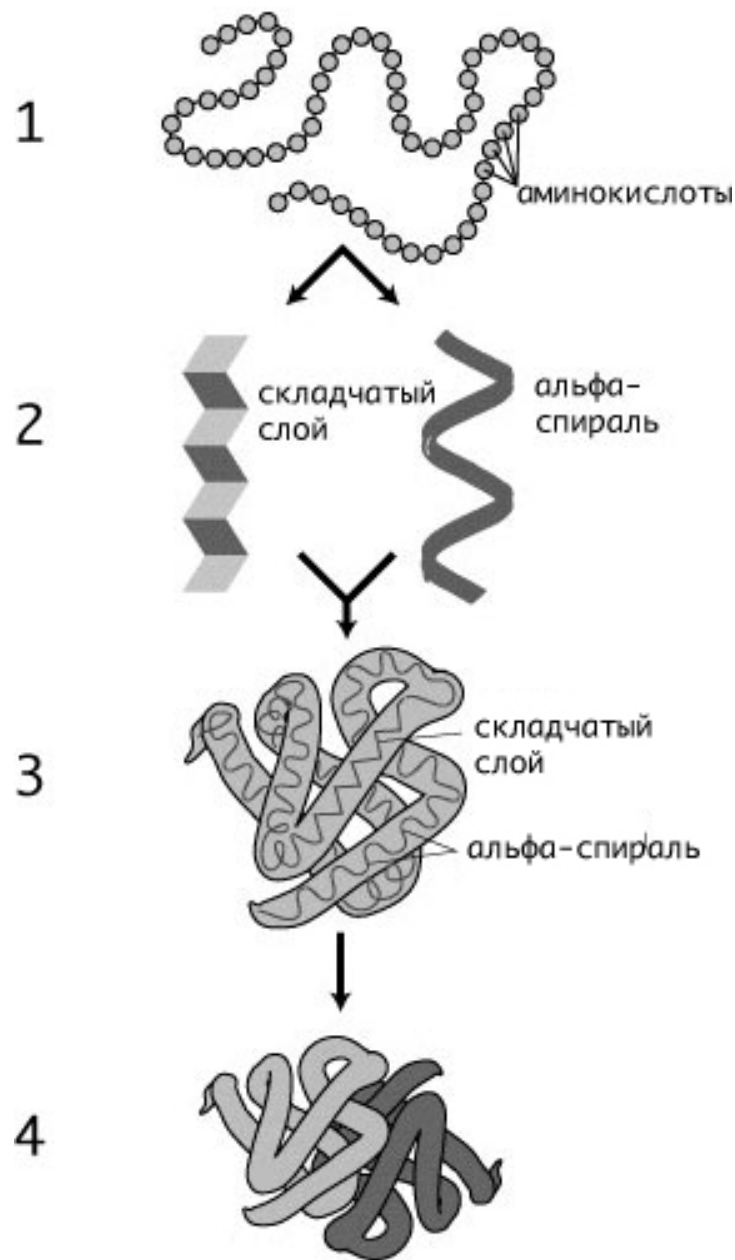
валин



аргинин

Структуру пептидов и белков можно рассматривать на нескольких уровнях:

- 1) первичная структура;
- 2) вторичная, структура;
- 3) третичная структура;
- 4) четвертичная структура.

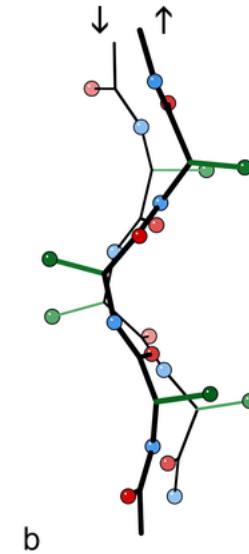
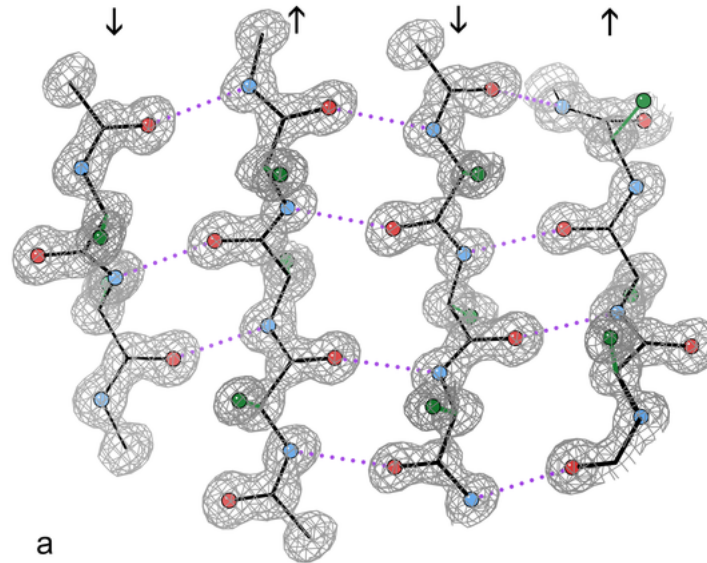
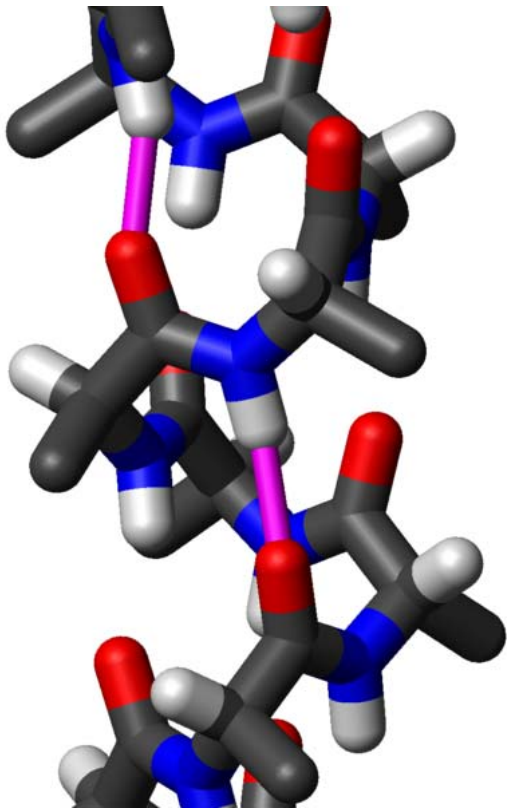


**Первичная структура** – это последовательность  $\alpha$ -аминокислотных остатков в полипептидных цепях.

**Вторичная структура** белков – это возможность формирования конформаций в пространстве регулярной структуры полипептидной цепи ( $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -складчатые слои, смотреть на следующем слайде).

**Третичная структура** белков. Полипептидная цепь, содержащая участки вторичной структуры, укладывается в пространстве в компактную систему, в которой элементы вторичной структуры взаимодействуют между собой и с участками неупорядоченной структуры, образуя глобулу (глобулярные белки) или вытянутое волокно (фибриллярные белки).

**Четвертичная структура** белков. Во многих белках существуют субъединицы, образующие трехмерные ассоциаты или еще более сложные ансамбли. Термин «четвертичная структура» был предложен в 1958 г. Дж. Берналом. Характерной особенностью белков с четвертичной структурой является их способность к самосборке, например, гемоглобин легко собирается из смеси  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей и гема.



### $\alpha$ -Спирали и $\beta$ -складчатые слои в структурах белков

Конфигурационные особенности белков, устойчивость их пространственной структуры и природу взаимодействий можно лучше понять, изучая процессы *денатурации* и *ренатурации* белков.

**Денатурация** – это такое изменение конформации белковой молекулы, которое происходит при резком изменении внешних условий и сопровождается изменением физико-химических свойств белка и полной потерей биологической активности. В основном, белки денатурируют при 50–60 °С, иногда при 100 °С. Иногда денатурацию вызывает изменение рН среды, детергенты. Важной является проблема обратимости денатурации–ренатурации белков, т. е. восстановление конформаций и биологической активности. Впервые полную ренатурацию белка удалось осуществить в 1961 г. на примере рибонуклеазы К. Anfinsenу.

## 4.13. Определение аминокислотной последовательности пептидов и белков

Прежде чем определять аминокислотную последовательность белка, необходимо установить его аминокислотный состав. Наиболее широко применяемый количественный метод аминокислотного анализа белкового гидролизата основан на использовании ионообменной хроматографии.

Затем необходимо определить, содержит ли белок одну субъединицу (полипептидную цепь) или состоит из нескольких субъединиц. Если обнаружено несколько субъединиц, следует установить, идентичны ли их аминокислотные последовательности и связаны ли они межцепочечными дисульфидными мостиками.

Общий подход к определению аминокислотной последовательности включает следующие стадии:

- 1) осуществление частичного гидролиза белка ферментами или химическими реагентами;
- 2) выделение полученных пептидов;
- 3) определение аминокислотных последовательностей этих небольших фрагментов.

Для определения полной аминокислотной последовательности белка должны быть использованы по крайней мере два различных типа частичного гидролиза с тем, чтобы установить структуру белка методом перекрывающихся пептидов.

Очень часто используется метод “пептидных карт”. Этот метод заключается в том, что смесь пептидов наносится в виде полоски на лист хроматографической бумаги или на пластинку с тонким слоем целлюлозы и подвергается двумерной хроматографии или двумерному электрофорезу. После “проявления” пептидной карты образуется набор пятен с определенным взаимным расположением, характерный для данного белка.



Вторым наиболее часто используемым методом разделения пептидов является ионообменная хроматография на катионитах Dowex («дауэкс»). Элюируются пептиды из колонки с помощью пиридин-ацетатного буфера с определенным (подобранным) значением рН и определенной концентрацией.

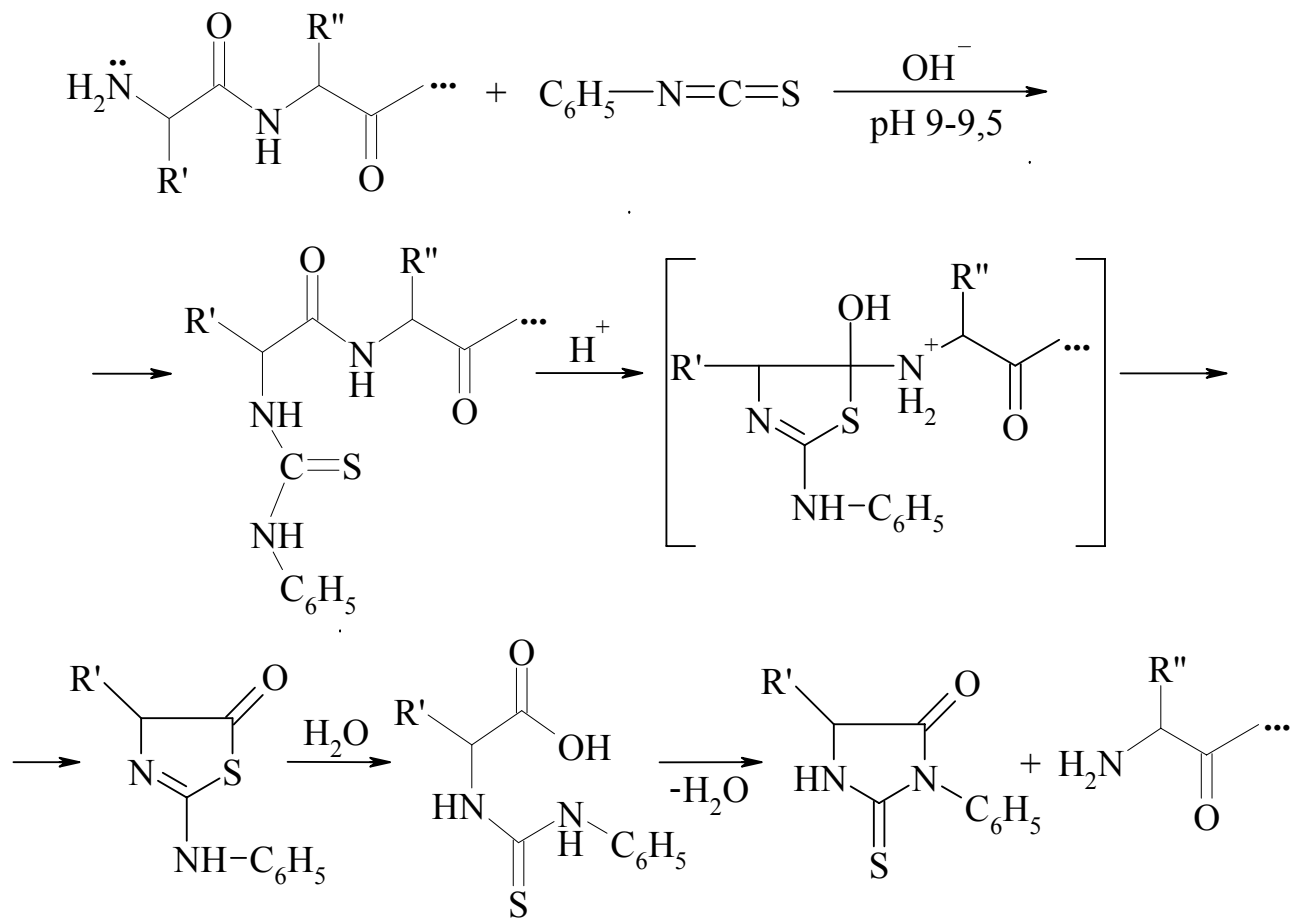
Более сложная задача – разделить смеси “длинных” пептидов (более 20 аминокислотных остатков). Такие пептиды в водных растворах “слипаются”, образуя высокомолекулярные агрегаты. Для предотвращения агрегации в растворы добавляются детергенты. В качестве основных методов разделения “длинных” пептидов используется гель-фильтрация (фракционирование пептидов по молекулярной массе на специальных биогелях), ионообменная хроматография на ионообменных целлюлозах, противоточное распределение (фенол–вода, бутанол–вода), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) на носителях с обращенными фазами (силикагель с ковалентно присоединенными  $C_8$  или  $C_{18}$  углеводородными радикалами).

Для установления аминокислотной последовательности пептидов и белков используется совокупность химических, ферментативных и физико-химических методов.

# Метод Эдмана (метод ступенчатой деструкции, 1950 г.)

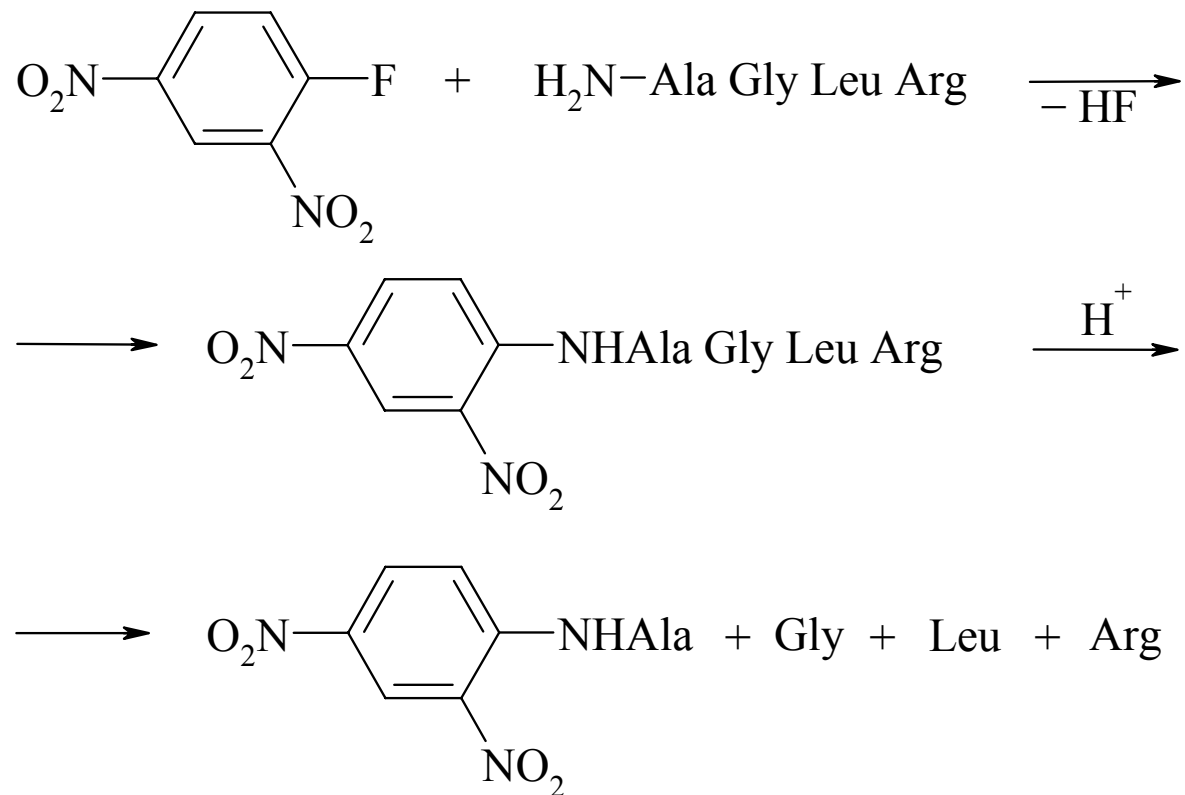
К аминогруппе N-концевой  $\alpha$ -аминокислоты присоединяют фенилизотиоцианат (ФИТЦ), каждый цикл деградации включает в себя 3 стадии:

- 1) образование фенилтиокарбамоилпептида (ФТК);
- 2) отщепление N-концевого остатка аминокислоты в виде тиазолинона;
- 3) изомеризация тиазолинона в фенилтиогидантоин (ФТГ) и идентификация его.



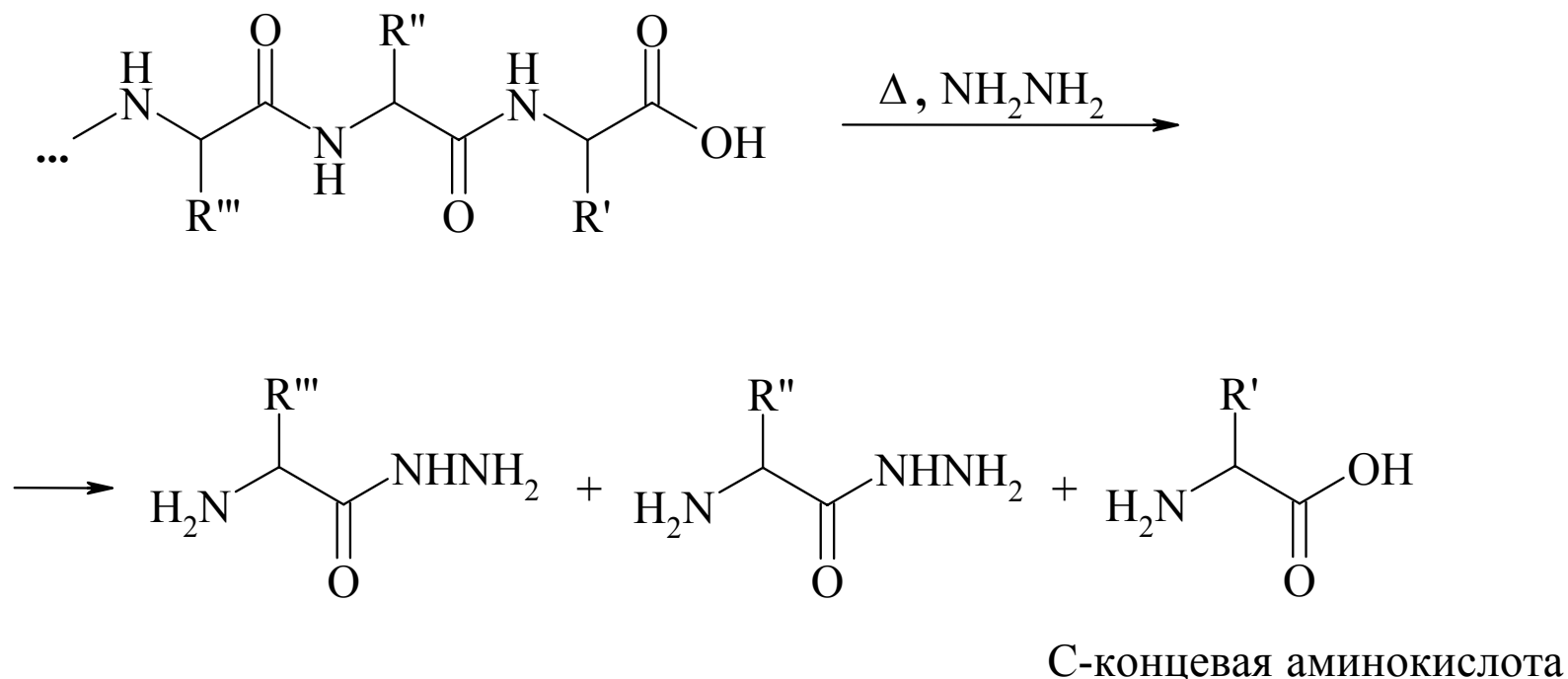
## Метод Сенджера (взаимодействие пептида с 2,4-динитрофторбензолом, 1945 г.)

При реакции  $\alpha$ -аминогруппы пептида или белка с 2,4-динитрофторбензолом получается динитрофенильное производное (ДНФ), желтого цвета. Это производное гидролизуется в кислой среде, пептидные связи разрываются и образуется ДНФ-производное N-концевой аминокислоты, которое затем экстрагируется эфиром и идентифицируется методом тонкослойной хроматографии.



## Метод Акабори (метод гидразинолиза пептидов, 1952 г.)

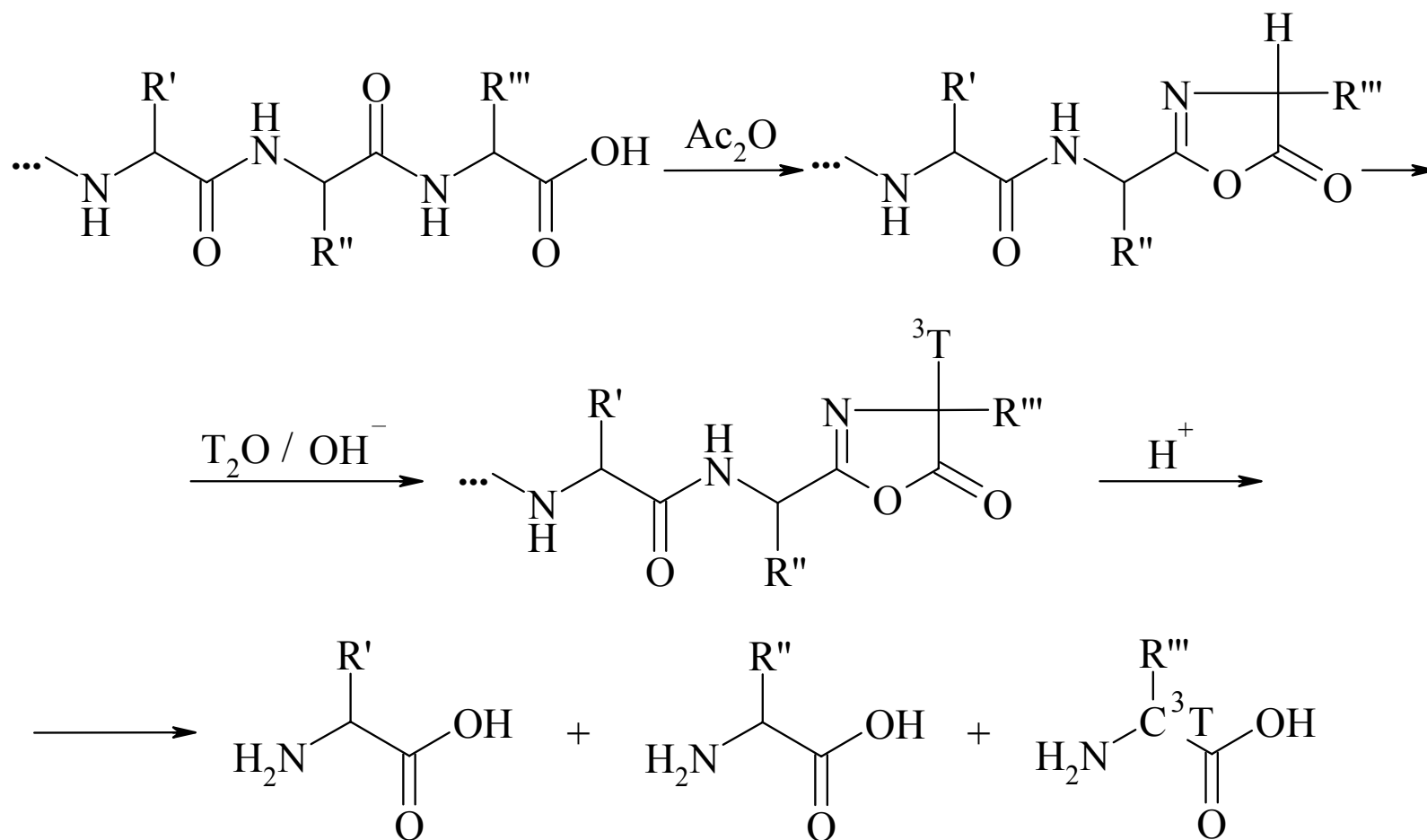
Пептид или белок нагреваются при 100–120 °С с безводным гидразином. Пептидные связи разрываются с образованием гидразидов аминокислот, а С-концевая кислота освобождается, ее можно выделить из смеси и идентифицировать.



Метод имеет ограничения, т. к. ряд аминокислот разрушается, а ряд гидразидов очень лабилен и превращается в аминокислоты.

# Метод Матсуо (оксазалоновый метод, метод тритиевой метки)

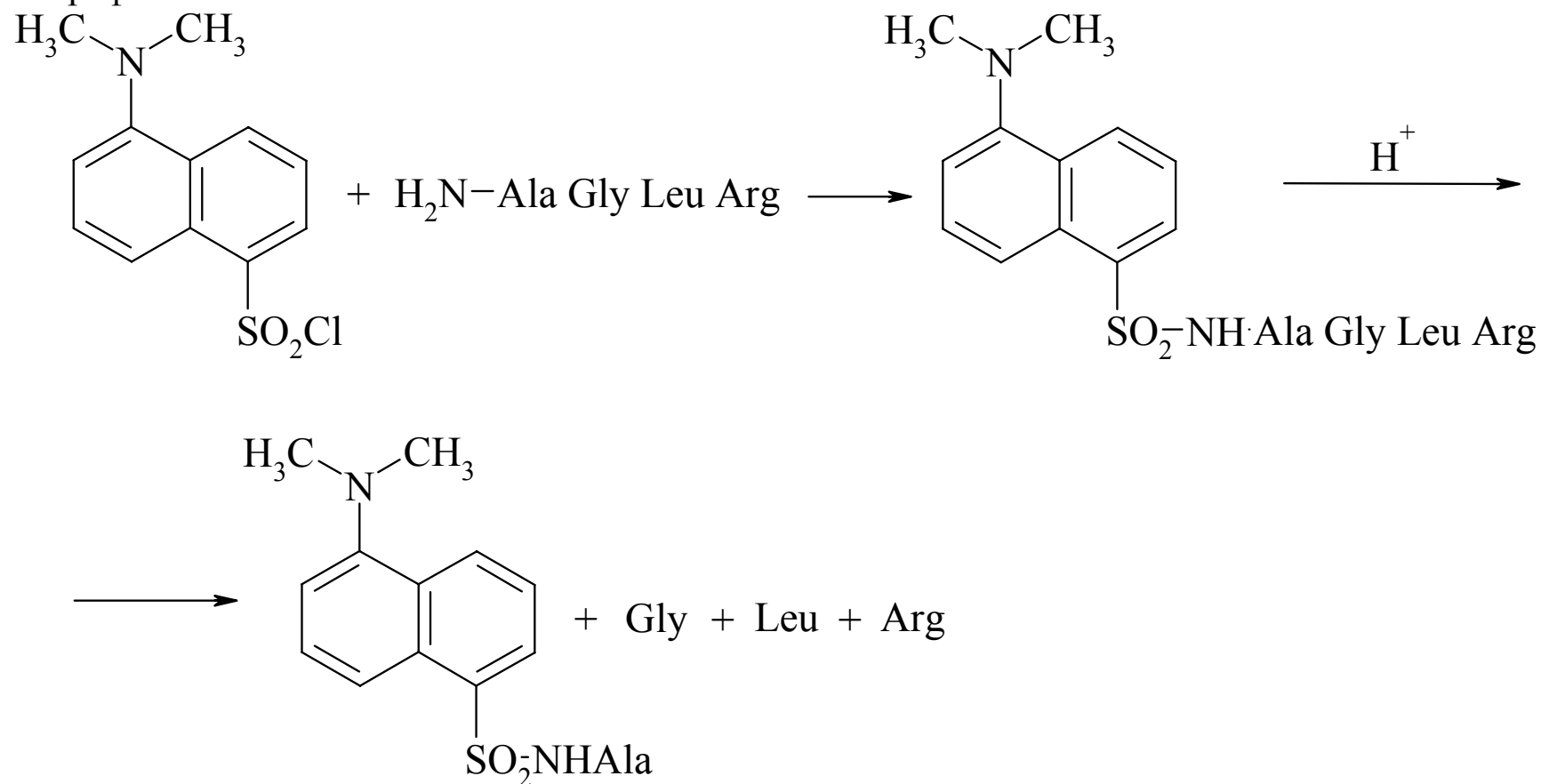
C-концевая аминокислота под действием уксусного ангидрида циклизуется с образованием оксазалонона. В условиях дальнейшего щелочного гидролиза увеличивается подвижность атомов водорода в положении 4 оксазалонового кольца, они могут легко замещаться на тритий, а после кислотного гидролиза можно получить радиоактивно меченную C-концевую аминокислоту, идентифицируется она хроматографически и измерением радиоактивности.



меченая C-аминокислота

## Метод Грея и Хартли (дансильный метод, 1963 г.)

Реакция дансилхлорида с непротонированной  $\alpha$ -аминогруппой пептида или белка с образованием дансилпептида (ДНС-пептида). После гидролиза в кислой среде освобождается N-концевая аминокислота, содержащая дансильный остаток. Идентификация ДНС-аминокислот УФ-спектроскопией, микротонкослойной хроматографией, сейчас – высокоэффективной жидкостной хроматографией.



Среди модификаций метода широкое применение нашел метод, сочетающий последовательную деградацию пептида по Эдману с анализом N-концевых аминокислотных остатков в виде их дансильных производных. По этому методу перед каждым циклом деградации отбирается определенная аликвотная часть пептида для анализа N-концевой аминокислоты. Достоинства метода – более высокая чувствительность при определении ДНС-аминокислот.

## 4.14. Пептидный синтез

Различают следующие типы пептидного синтеза:

1. Классический пептидный синтез в растворе (ступенчатый – последовательное присоединение аминокислот от С-конца к N-концу цепи и блочный – построение цепи из уже синтезированных фрагментов).
2. Синтез пептидов на полимерном носителе (растущая полипептидная цепь присоединена ковалентно к растворимому или нерастворимому полимеру, а затем отделяется от полимера. Может быть твердофазный и жидкофазный синтез).
3. Синтез гомо- и гетерополиаминокислот из повторяющихся остатков одной-двух аминокислот.
4. Ферментативный пептидный синтез.
5. Полусинтез пептидов (отщепление в молекуле природного пептида или белка небольшого фрагмента, а затем введение новой аминокислотной последовательности).
6. Синтез циклических пептидов.
7. Синтез гетеродетных пептидов (с участием не только амидных связей, но и сложноэфирных, дисульфидных и др.).

Пептиды заданного строения не удастся получить прямой конденсацией  $\alpha$ -аминокислот, т. к. даже при реакции двух  $\alpha$ -аминокислот получается четыре различных дипептида. Поэтому аминогруппу одной  $\alpha$ -аминокислоты и карбоксильную группу другой  $\alpha$ -аминокислоты необходимо блокировать **защитными группами**. Кроме того, требуется **активация карбоксильной группы**, которая будет образовывать пептидную связь, т. к. карбоновые кислоты дают с аминами только соли. Необходимо также исключить рацемизацию.

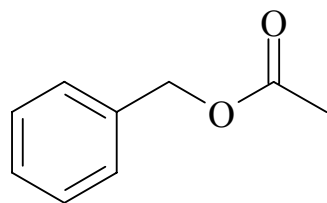
В пептидном синтезе существуют два типа защитных групп – постоянные и временные.

Постоянные – это группировки для защиты боковых функциональных групп, они удаляются на заключительном этапе синтеза пептида.

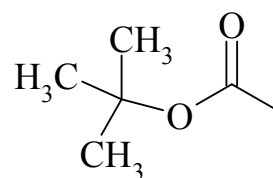
Временные – это защитные группы для N-концевой  $\alpha$ -аминогруппы и C-концевого карбоксила, они снимаются перед каждой стадией удлинения цепи или конденсации фрагментов.

Защитные группы должны полностью блокировать соответствующую группировку от участия в химических реакциях, должны быть устойчивыми при удалении других защитных групп, не должны вызывать побочных реакций и рацемизации, защищенные производные должны быть устойчивыми к идентификации, не должны создавать затруднений при растворимости и выделении пептидов.

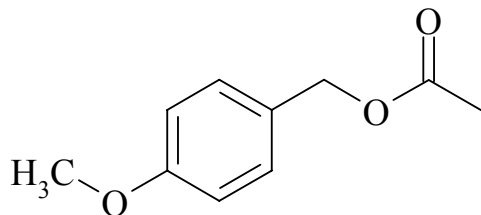
Существует целый ряд защитных группировок для концевой  $\alpha$ -аминогруппы. Все они условно могут быть подразделены на три типа – ацильные, алкильные (арильные) и уретановые. Первые два типа используются сравнительно редко, что связано с трудностью их введения, удаления и легкостью процессов рацемизации. Защитные группы уретанового типа легко вводятся с помощью хлоридов, азидов, карбонатов, легко удаляются каталитическим гидрогенолизом, ацидолизом или мягким щелочным гидролизом. Это такие защитные группы как:



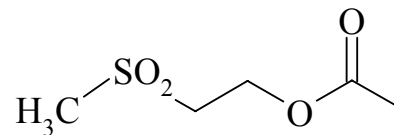
бензилоксикарбонильная



*tert*-бутилоксикарбонильная



*p*-метоксибензилоксикарбонильная

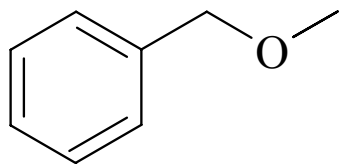


метилсульфонилэтилоксикарбонильная

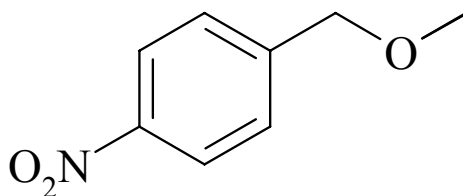


Для защиты карбоксильной функции широко используются различные сложноэфирные группировки, чаще всего бензиловые и *трет*-бутиловые эфиры, реже метиловые и этиловые. Иногда для блокирования карбоксилатов применяют солеобразование.

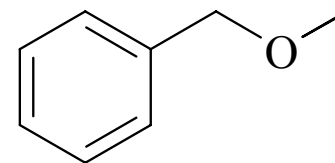
Наиболее часто для защиты карбоксильных групп применяются:



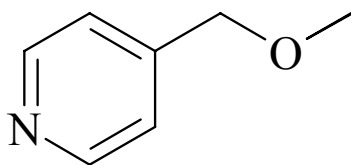
бензиловый эфир



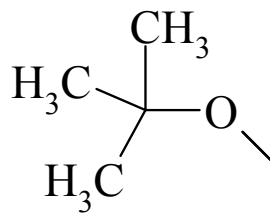
4-нитробензиловый эфир



фениловый

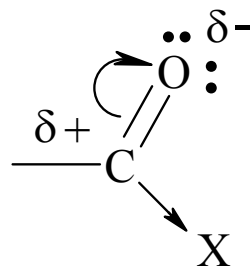


4-пиколиловый



*трет*-бутиловый

Активация карбоксильной группы, вступающей в образование пептидной связи, сводится к увеличению электрофильности карбонильного углерода, обеспечивая высокую скорость и полноту синтеза пептида:

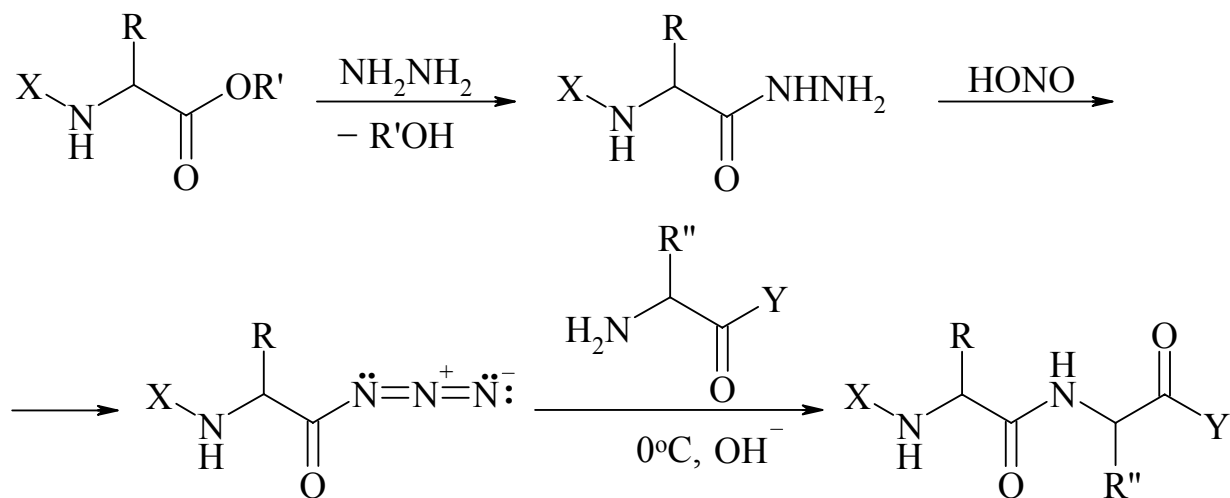


Очень важна природа группы X.

До 1950 года, в качестве активирующей группы X использовали азид ( $X=N_3$ ) или хлорангидрид ( $X=Cl$ ) соответствующей кислоты. С начала пятидесятых годов в синтетическую пептидную химию было введено большое количество новых активирующих групп, которые привели к тому, что хлорангидридный метод практически вышел из употребления. Наиболее широко изученными методами активации карбоксильной группы являются методы: смешанных ангидридов ( $X= -OOCR, -OOCOR$ ), активированных эфиров ( $X = -OCH_2CN, -OC_6H_5, -SC_6H_5, -OC_6H_4NO_2$  и т. д.), взаимодействие с дициклогексилкарбодиимидом.

# Азидный метод Курциуса

Эфир N-защитной аминокислоты или пептида подвергается гидразинолизу в течении 12–48 часов при комнатной температуре, а затем образовавшийся гидразид обрабатывается водным раствором нитрита натрия в кислой среде при  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , при этом гидразид переводится в азид, который легко вступает в реакцию с метиловым, этиловым или бензиловым эфиром аминокислоты или пептида:

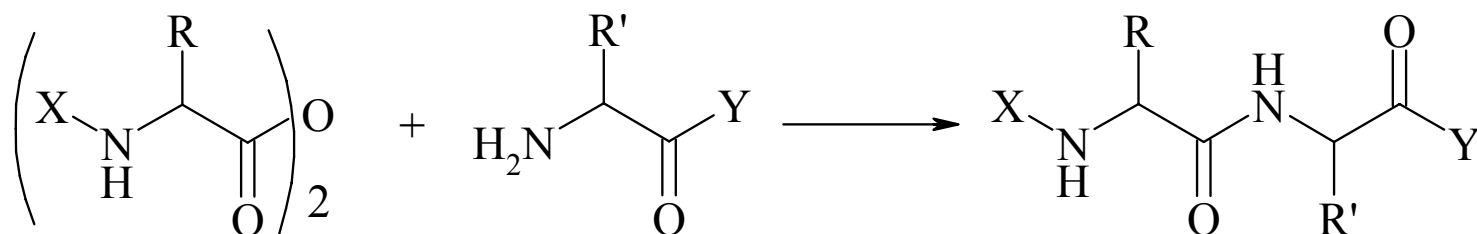
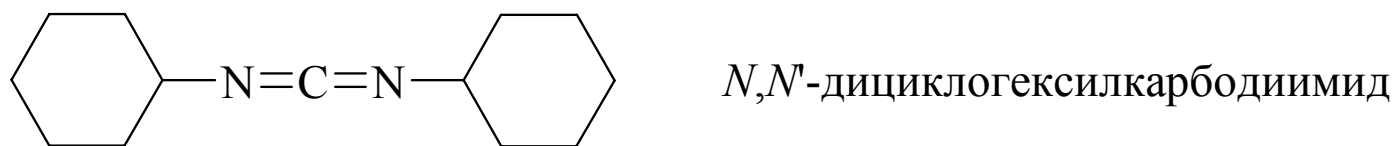


азид N-защитной аминокислоты

Где X и Y – NH<sub>2</sub>-защитные и COOH-защитные группы.

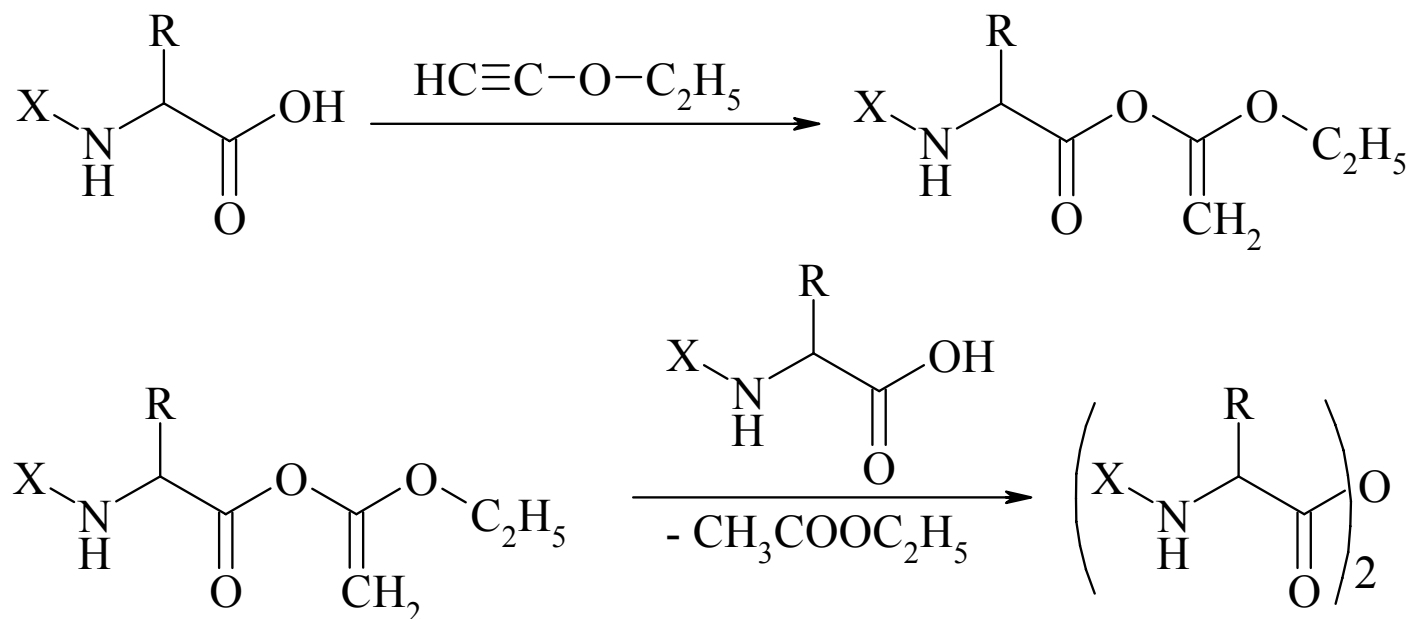
# Метод ангидридов

N-Защищенная аминокислота обрабатывается дициклогексилкарбодиимидом (ДЦК, DCC), образующиеся ангидриды вводят в реакцию с аминокислотой или пептидом:



Где X и Y – NH<sub>2</sub>-защитные и COOH-защитные группировки.

Ангидриды ациламино кислот также можно получить если в качестве конденсирующего агента использовать этоксиацетилен.

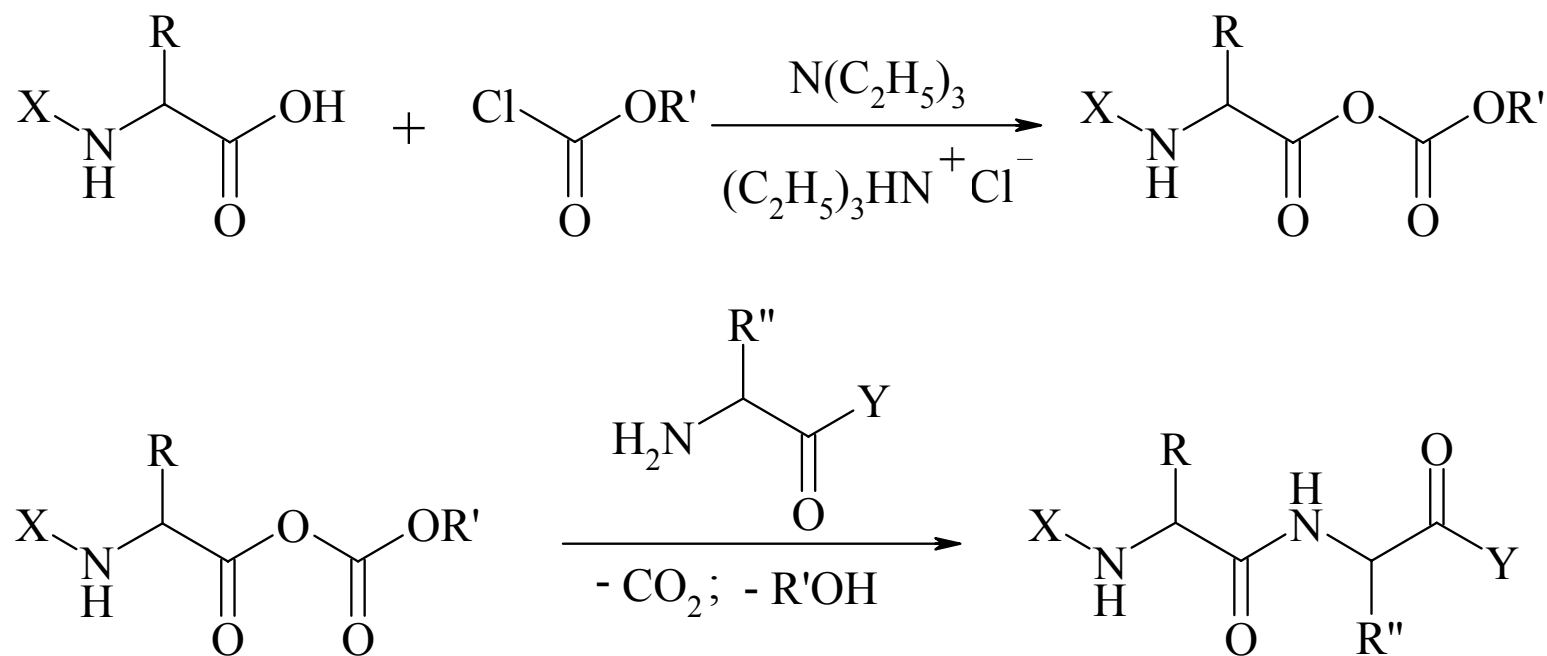


Недостатком метода симметричных ангидридов является то, что в синтезируемый пептид включается только половина исходной аминокислоты. В настоящее время метод симметричных ангидридов находит применение в твердофазном методе синтеза пептидов.

# Метод смешанных ангидридов

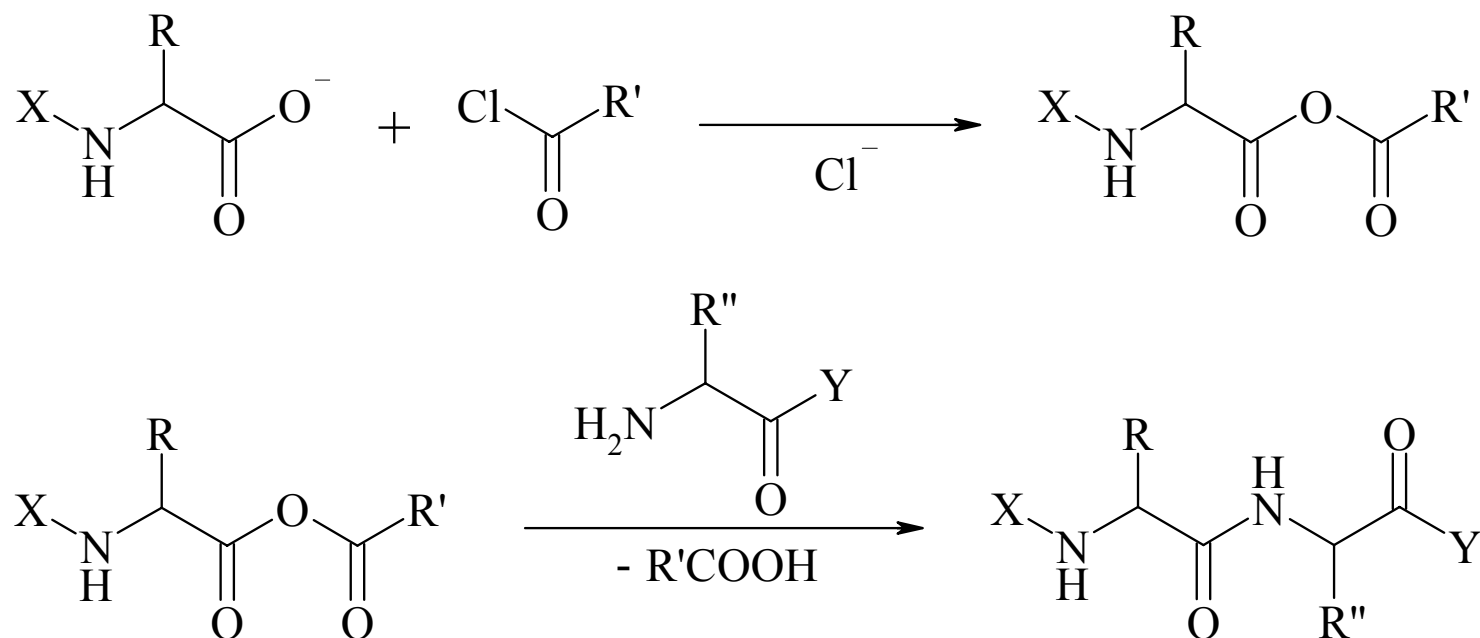
Часто используется **метод смешанных ангидридов** ациламино кислот с карбоновыми кислотами или с алкилугольной кислотой. Метод смешанных ангидридов с алкилугольной кислотой, один из распространенных методов создания пептидной связи, основан на использовании смешанных ангидридов ациламино кислот с моноэфирами угольной кислоты.

При обработке ацилированной аминокислоты или пептида одним эквивалентом эфира хлоругольной кислоты в присутствии основания, образуется соответствующий смешанный ангидрид.



Обычно используют этиловые, изопропиловые, *втор-* и *трет-*бутиловые эфиры хлоругольной кислоты.

При взаимодействии солей N-защищенных аминокислот с хлорангидами карбоновых кислот в инертном растворителе образуются соответствующие смешанные ангидриды, ацилирующие аминокомпонент.



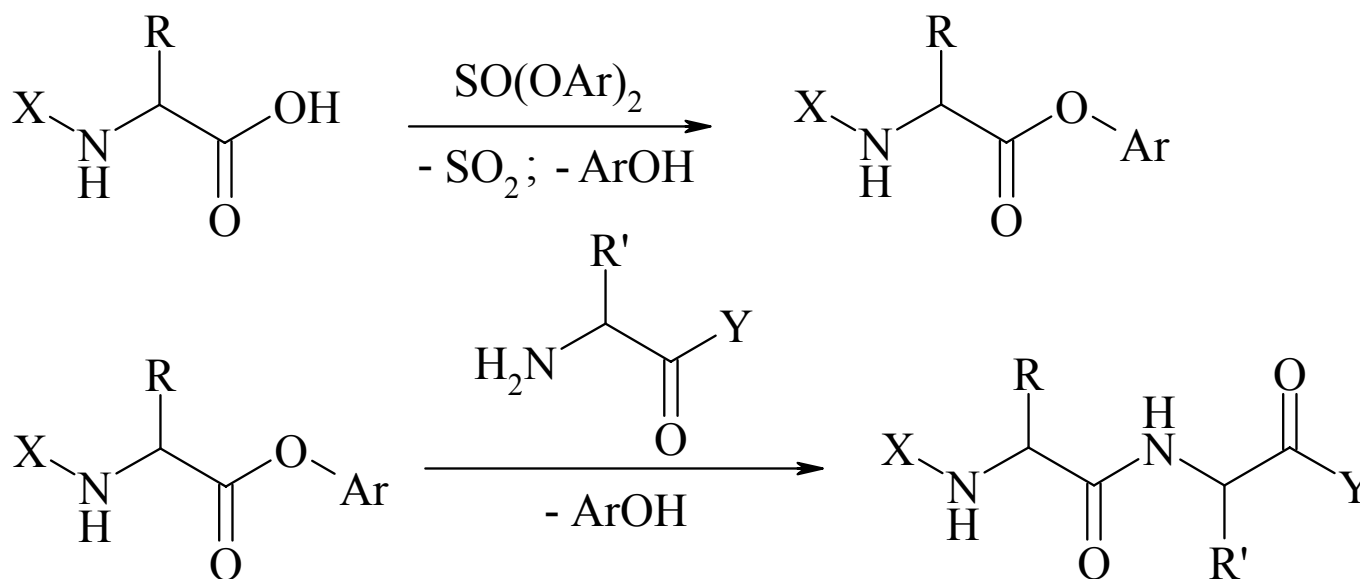
Основными побочными процессами при использовании смешанных ангидридов карбоновых кислот, являются реакция диспропорционирования с образованием симметричных ангидридов и атака аминокомпонента по карбонильному атому углерода карбоновой кислоты.

# Метод активированных эфиров

Некоторые сложные эфиры карбоновых кислот вследствие наличия в спиртовой компоненте сложноэфирной группы электроотрицательного заместителя могут обладать достаточно высокой реакционной способностью как ацилирующие агенты. Сложные эфиры молекулы которых содержат цианметильную ( $-\text{CH}_2\text{CN}$ ), карбоэтоксиметильную ( $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ ) или метоксиметильную ( $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ) группы, а также ароматические сложные эфиры, имеющие *o*-нитрофенильный, *n*-нитрофенильный или *n*-карбометоксифенильный или какой-либо другой подобный заместитель, легко подвергаются аминолизу. Особенно легко вступают в такие реакции производные фенола и тиофенола содержащие в *n*- и *o*-положениях электроотрицательные группы. Большое распространение получили также активированные эфиры на основе N-гидроксисукцинимида и N-гидоксибензотриазола.

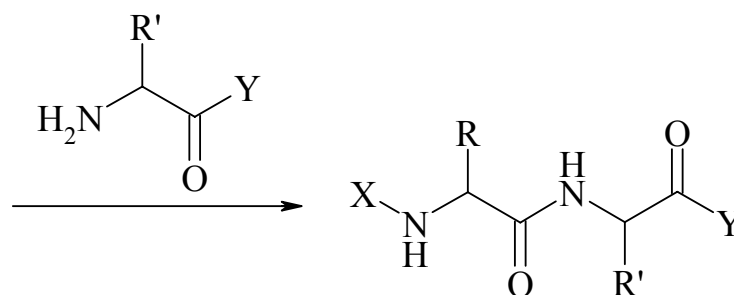
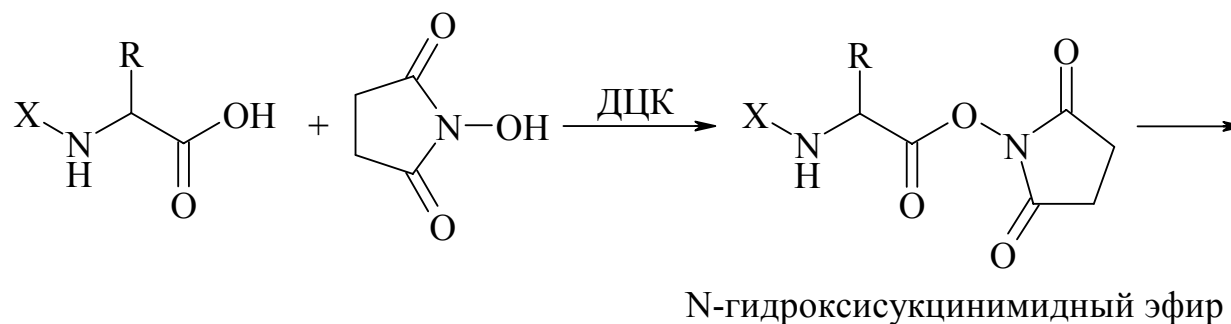
Соответствующие реакционноспособные эфиры могут быть получены действием спиртов, фенолов или тиофенолов на галогенангидриды ациламино кислот или при действии на смешанные ангидриды ациламино кислот с алкилугольной кислотой.

Другой путь синтеза активированных эфиров заключается в действии диарилсульфита ( $\text{SO}(\text{OAr})_2$ ) или триарилфосфита ( $\text{P}(\text{OAr})_3$ ) на N-защищенную аминокислоту.

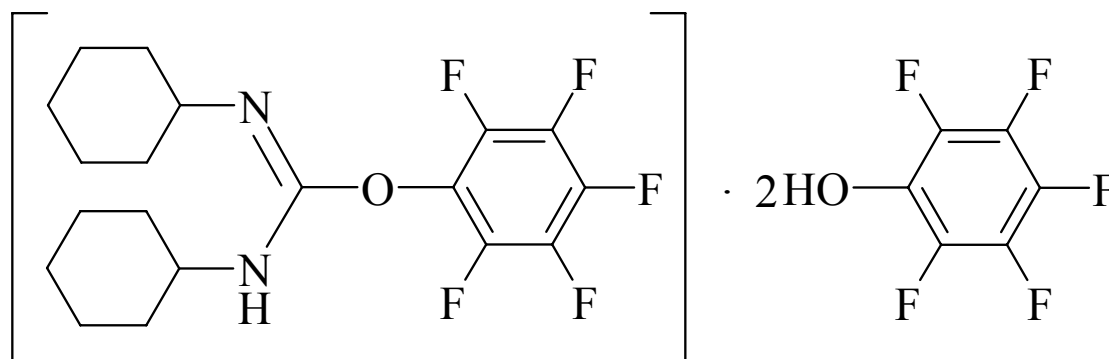




Разновидностью метода является конденсация с помощью *N,N'*-дициклогексилкарбодиимида в присутствии 4-нитрофенола, *N*-гидроксисукцинимиды или *N*-гидроксисукцинимиды или *N*-гидроксисукцинимиды или *N*-гидроксисукцинимиды или *N*-гидроксисукцинимиды.



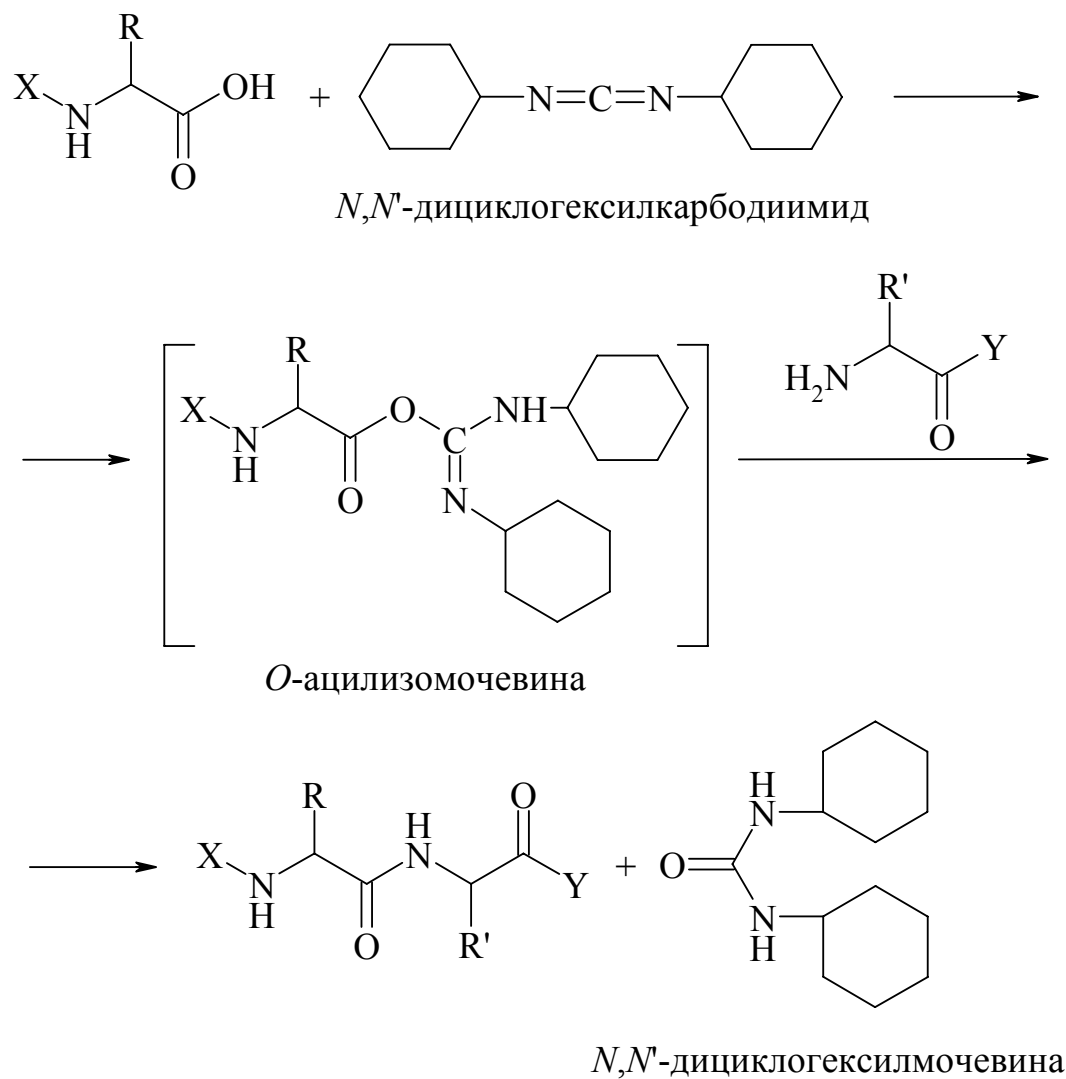
Часто в методе активированных эфиров используется “F-комплекс”, состоящий из трех молекул пентафторфенола и одной молекулы дициклогексилкарбодиимида.



При синтезе пептидов прибавляют “F-комплекс” к смеси карбонильного и аминок компонента в эквимольных количествах, иногда небольшой избыток.

# Карбодимидный метод

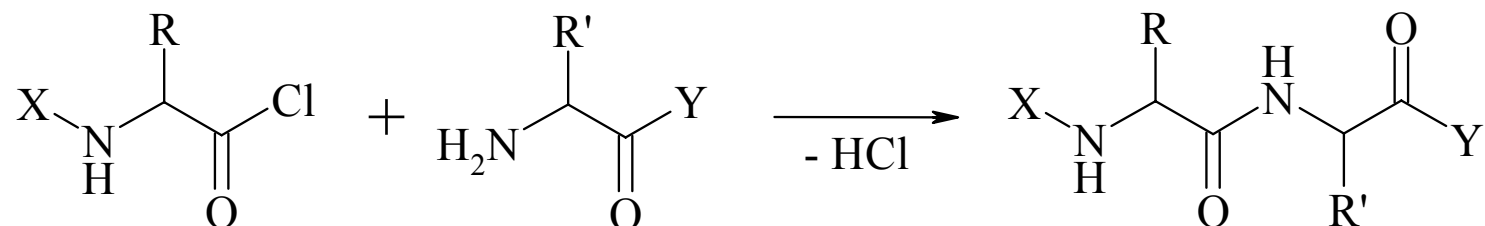
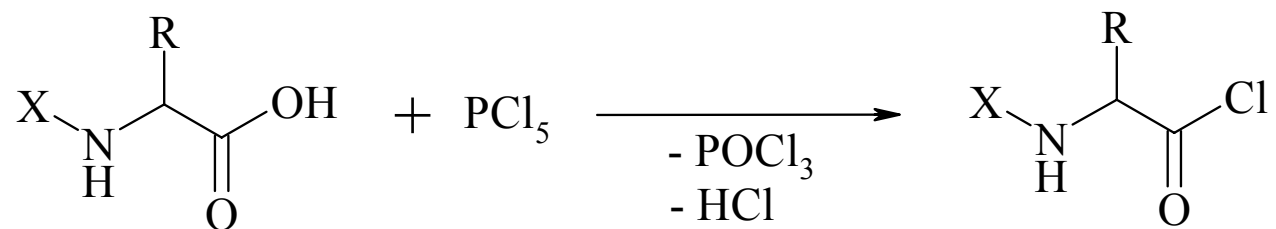
Производное пептида может быть легко получено действием  $N,N'$ -дизамещенного карбодимида на ациламинокислоту или ацилпептид и эфир аминокислоты или пептида. Взаимодействие обычно проводят при комнатной температуре в инертном растворителе. Реакция сопровождается образованием  $N,N'$ -дизамещенной мочевины, которая обычно выделяется в виде нерастворимого осадка.



Особое преимущество применения  $N,N'$ -дициклогексилкарбодиимида заключается в удобстве работы с ним, поскольку хорошие результаты получаются при действии этого реагента на раствор аминного и карбоксильного компонентов при комнатной температуре как в отсутствие, так и при наличии в реакционной смеси воды. Кроме того, при использовании этого реагента нет необходимости защищать гидроксильные группы гидроксиаминокислот.

## Хлорангидридный метод

Хлорангидриды получают при действии на ациламино кислоту пентахлорида фосфора, треххлористого фосфора или хлористого тионила в инертном растворителе. Взаимодействие полученного хлорангидрида с аминокислотой может проводиться как в инертном растворителе, так и в водной среде, в присутствии подходящего основания для связывания выделяющегося хлороводорода.



Этот метод, сыгравший важную роль на заре синтеза пептидов, в настоящее время применяется редко, т.к. возможно образование побочных продуктов и значительная рацемизация.