

**Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Казанский (Приволжский) федеральный университет»**

На правах рукописи

ЛАРИОНОВ РАДИК АНАТОЛЬЕВИЧ

**ТЕРМИЧЕСКИЕ И СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СВОЙСТВА
ОЛИГОПЕПТИДОВ: Gly-Gly, Ile-Ala, Ala-Ile, Leu-Val, Leu-Phe,
Phe-Leu, Leu-Leu-Leu**

1.4.4. ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук, доцент
Зиганшин Марат Ахмедович

Казань – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	9
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	17
1.1 Олигопептиды	17
1.2 Линейные олигопептиды	18
1.2.1 Биологические свойства линейных олигопептидов	18
1.2.2 Термические и теплофизические свойства олигопептидов	19
1.3 Циклические дипептиды	22
1.3.1 Свойства циклических дипептидов	22
1.4 Методы получения циклических дипептидов	25
1.4.1 Биологические методы	26
1.4.2 Синтез в растворе	27
1.4.2.1 Циклизация дипептидного эфира	27
1.4.2.2 Конденсация аминокислот	28
1.4.2.3 Циклизация Аза-Виттига	29
1.4.2.4 Реакция Дильса-Альдера	30
1.4.3 Циклизация под действием микроволнового излучения	30
1.4.4 Циклизация на поверхности твёрдой фазы	32
1.4.5 Твердофазная циклизация линейных дипептидов при нагревании	34
1.5 Механизм циклизации дипептидов	35
1.6 Применение наноструктур и кристаллов олигопептидов	37
1.7 Молекулярная самосборка и самоорганизация	42
1.7.1 Межмолекулярные взаимодействия, реализующиеся при самосборке олигопептидов	42

1.7.2 Термодинамический и кинетический контроль процесса самоассоциации олигопептидов	44
1.7.3 Факторы, влияющие на самоассоциацию олигопептидов	45
1.7.3.1 Влияние температуры на самоорганизацию олигопептидов.....	46
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	52
2.1 Объекты исследования	52
2.2 Совмещённый ТГ/ДСК/МС анализ	53
2.3 Приготовление клатратов трипептида лейцил-лейцил-лейцин	54
2.4 Дифференциальная сканирующая калориметрия.....	54
2.5 ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопия.....	54
2.6 Инфракрасная (ИК) спектроскопия с Фурье-преобразованием.....	55
2.7 Газовая хроматография (ГХ) с масс-спектрометрией (МС).....	55
2.8 Масс-спектрометрия с электроспреем	56
2.9 MALDI TOF масс-спектрометрия	56
2.10 Спектроскопия кругового дихроизма	57
2.11 Хирально-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).....	57
2.11 Методология изучения топохимических реакций с участием дипептидов	57
2.11.1 Изоконверсионные методы	60
2.11.2 Дифференциальные изоконверсионные методы	63
2.11.3 Интегральные изоконверсионные методы	64
2.11.4 Модельные методы	65
2.11.5 Кинетический анализ циклизации дипептидов.....	67
2.12 Метод рентгеновской порошковой дифрактометрии.....	67

2.13 Статический метод парофазного газохроматографического анализа	68
2.14 Атомно-силовая микроскопия	68
2.15 Нингидриновый тест.....	69
2.16 Люминесцентная микроскопия.....	69
2.17 Люминесцентная спектроскопия.....	70
ГЛАВА 3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	71
3.1 Термический анализ дипептидов.....	71
3.2 Спектроскопия ЯМР	77
3.3 ИК-спектроскопия.....	82
3.4 Результаты масс-спектрометрического исследования	88
3.5 Результаты спектроскопии кругового дихроизма	92
3.6 Результаты нингидринового теста	93
3.7 Зависимость температуры начала циклизации от размера боковых заместителей дипептидов	93
3.8 Результаты кинетического анализа циклизации дипептидов.....	96
3.9 Результаты порошковой рентгеновской дифрактометрии	105
3.10 Результаты самосборки линейных и циклических дипептидов согласно данным атомно-силовой микроскопии	106
3.11 Результаты люминесцентной микроскопии	111
3.12 Результаты люминесцентной спектроскопии	112
3.13 Термический анализ клатратов трилейцина.....	112
3.14 Сорбционные свойства LLL.....	114
3.15 Методика применения трипептида LLL для количественной оценки содержания бензола в смесях.....	117

4.4. Результаты рентгеновской порошковой дифрактометрии трипептида и его клатратов	120
Заключение	126
Список литературы	128
ПРИЛОЖЕНИЕ	146

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

ДКП – 2,5-дикетопиперазин

Tyr-Asp – _L-тирозил-_L-аспарагиновая кислота

Tyr-Pro – _L-тирозил-_L-пролин

Tyr-Leu – _L-тирозил-_L-лейцин

Phe-Leu – _L-фенилаланил-_L-лейцин

Trp-Leu – _L-триптофан-_L-лейцин

Leu-Phe – _L-лейцил-_L-фенилаланин

Leu-Trp – _L-лейцил-_L-триптофан G – глицин

Phe-Phe – _L-фенилаланил-_L-фенилаланин, дифенилаланин

Phe-Val – _L-фенилаланил-_L-валин

Ile-Ala – _L-изолейцил-_L-аланин

Ala-Ile – _L-аланил-_L-изолейцин

Ala-Val – _L-аланил-_L-валин

Val-Ala – _L-валил-_L-аланин

Ile-Val – _L-изолейцил-_L-валин

Val-Ile – _L-валил-_L-изолейцин

Leu-Leu – _L-лейцил-_L-лейцин

Leu-Val – _L-лейцил-_L-валин

2G, **Gly-Gly** – глицил-глицин

3G – глицил-глицил-глицин

4G – глицил-глицил-глицил-глицин

5G – глицил-глицил-глицил-глицил-глицин

Phe-Phe-Phe – _L-фенилаланил-_L-фенилаланил-_L-фенилаланин

Leu-Leu-Leu, LLL – _L-лейцил-_L-лейцил-_L-лейцин

цикло(Ala-Leu) – цикло(_L-аланил-_L-лейцил)

цикло(_L-Pro-_D-Ile) – цикло(_L-пролил-_D-изолейцил)

цикло(_L-Pro-_L-Phe) – цикло(_L-пролил-_L-фенилаланил)

цикло(Pro-Tyr) – цикло(_L-пролил-_L-тирозил)

цикло(Val-Pro) – цикло(_L-валил-_L-пролил)

цикло(Pro-Leu) – цикло(L-пролил-L-лейцил)

цикло(Gly-Val) – цикло(глицил-L-валил)

цикло(Gly-D-Val) – цикло(глицил-D-валил)

цикло(Gly-Leu) – цикло(глицил-L-лейцил)

цикло(Gly-Ile) – цикло(глицил-L-изолейцил)

цикло(Phe-Cys) – цикло(L-фенилаланил-L-цистеил)

цикло(Tyr-Cys) – цикло(L-тирозил-L-цистеил)

цикло(His-Pro) – цикло(L-гистидил-L-пролил)

цикло(Leu-Leu) – цикло(L-лейцил-L-лейцил)

цикло(L-Pro-L-Met) – цикло(L-пролил-L-метионил)

цикло(D-Pro-L-Phe) – цикло(D-пролил-L-фенилаланил)

цикло(D-Pro-L-Leu) – цикло(D-пролил-L-лейцил)

цикло(L-Pro-L-Tyr) – цикло(L-пролил-L-тирозил)

цикло(L-Pro-D-Tyr) – цикло(L-пролил-D-тирозил)

цикло(D-Pro-L-Tyr) – цикло(D-пролил-L-тирозил)

цикло(Phe-Phe) – цикло(L-фенилаланил-L-фенилаланил)

цикло(Gly-Gly) – цикло(глицил-глицил)

цикло(Ile-Ala) – цикло(L-изолейцил-L-аланил)

цикло(Ala-Ile) – цикло(L-аланил-L-изолейцил)

цикло(Leu-Phe) – цикло(L-лейцил-L-фенилаланил)

цикло(Phe-Leu) – цикло(L-фенилаланил-L-лейцил)

цикло(Leu-Val) – цикло(L-лейцил-L-валил)

ТГФ – тетрагидрофуран

ДМСО – диметилсульфоксид

ГФИП – гексафторизопропанол

НТ – нанотрубки

НП – нанопроволоки

НС-наносферы

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

НП – нанопроволоки

СЭМ –сканирующая электронная микроскопия

MALDI-TOF – времяпролетная масс-спектрометрия с матрично ассоциированной лазерной десорбцией/ионизацией

ТГ – термогравиметрия

ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия

МС – масс-спектрометрия

ИК – инфракрасная

ГХ – газовая хроматография

ESI-MS – масс-спектрометрия с электроспреем

КД – круговой дихроизм

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Изучение термических и супрамолекулярных свойств короткоцепных олигопептидов является актуальным направлением современной физической химии, в рамках которого решаются задачи по получению новых наноматериалов для электроники, оптики, биомедицины и других областей практического применения. Линейные и циклические олигопептиды, способные к самосборке с образованием высокоорганизованных структур, рассматриваются в качестве привлекательных строительных блоков для получения биосовместимых наноструктур, таких как наностержни, нановолокна, нанотрубки, наносферы и т.д. При самосборке из растворов линейные дипептиды также могут формировать кристаллы, содержащие наноразмерные поры, и способные разделять газовые смеси, селективно связывать и хранить летучие соединения. Некоторые из таких кристаллов, как было показано совсем недавно, могут проявлять необычные супрамолекулярные свойства, обнаруживаемые с помощью методов термического анализа. Тем не менее, на сегодняшний день эти свойства остаются практически неизученными.

Термическая обработка порошков или пленок линейных олигопептидов является одним из популярных методов формирования наноструктур на их основе, однако при этом необходимо учитывать возможность протекания твердофазных реакций, приводящих к образованию других соединений, например, циклических дипептидов, обладающих иными свойствами. Поэтому для корректного применения такого способа получения наноструктур необходима информация о температурах начала циклизации используемых дипептидов. С другой стороны, реакция циклизации дипептидов в твердой фазе соответствует принципам зеленой химии и представляет собой экономически выгодный и простой способ получения циклических дипептидов, являющихся перспективным классом низкомолекулярных лекарственных препаратов. Такие молекулы проявляют

антибактериальную, противораковую и нейропротекторную активности. Подобно линейным аналогам циклические олигопептиды способны к самосборке с формированием упорядоченных структур, но при этом обладают большей протеолитической и термической стабильностью. Внутримолекулярная циклизация линейных дипептидов в твёрдой фазе является хорошей альтернативной существующим методам получения циклических дипептидов: синтез в растворе и на поверхности полимерной подложки, выделение из микроорганизмов, поскольку позволяет получать целевой продукт в одну стадию и без образования побочных продуктов.

Таким образом, изучение термических свойств кристаллов и пленок линейных олигопептидов, с одной стороны, позволит выявить их ранее неизвестные супрамолекулярные свойства, а с другой, разработать методы твердофазного синтеза для получения биологически активных циклических дипептидов.

Степень разработанности

Твердофазный метод синтеза циклических дипептидов, несмотря на перспективность, на сегодняшний день остается малоизученным. В литературе имеются примеры циклизации аминокислот в твёрдой фазе с образованием циклических дипептидов и большого числа побочных продуктов, затрудняющих выделение целевых молекул. Известен способ получения цикло(глицил-глицила) путем термической обработки олигопептидов на основе глицина, при этом фиксируется термическая деструкция дипептида, а выход конечного продукта не превышает 60%. При изучении твердофазной циклизации фенилаланил-фенилаланина и лейцил-лейцина были определены значения кинетических параметров этих реакций и показано, что лучшей кинетической моделью для этих процессов является уравнение, соответствующее реакции с автокатализом. Показано, что соответствующий циклический дипептид является единственным продуктом реакции. При исследовании твердофазной циклизации аланил-фенилаланина с помощью расчётных методов было сделано предположение, что в качестве

катализатора таких реакций может выступать выделяющаяся в ходе реакции вода. Вместе с тем, исследователи указывают на то, что твердофазная циклизация дипептидов представляет собой сложный процесс, требующий дополнительного исследования. До сих пор остаются открытыми ряд вопросов. Нет информации о влиянии структуры дипептида на кинетические параметры таких реакций, отсутствуют какие-либо подходы для предсказания этих параметров. Нет прямых экспериментальных подтверждений предположения о возможном каталитическом действии выделяющейся в ходе реакции воды. Отсутствует информация об энантичистоте образовавшихся в ходе реакции циклических дипептидов и неизвестно зависит ли она от строения исходного дипептида. Сложности изучения твердофазных реакций с участием дипептидов обусловлены тем, что такие реакции могут сопровождаться рядом побочных процессов, таких как: термическая деструкция реагента, сублимация реагента или продукта, испарение воды. Эти процессы затрудняют определение кинетических параметров и установление механизма реакции циклизации. Следует также учитывать тот факт, что твердофазная реакция протекает в условиях ограничений кристаллической решётки, в которой молекулы дипептидов находятся в цвиттер-ионной форме.

При изучении термических свойств олигопептидов, в том числе для определения температурных интервалов стабильности и получения циклических продуктов, а также при изучении термических свойств клатратов олигопептидов с органическими соединениями, было установлено, что некоторые кристаллы олигопептидов демонстрируют необычные супрамолекулярные свойства: «память» о ранее связанном «госте», «антицеолитные» свойства, проявляющиеся в виде увеличения сорбционной емкости кристаллов олигопептида с увеличением размера молекулы сорбата. Вместе с тем, следует отметить, что систематических исследований супрамолекулярных свойств олигопептидов к настоящему времени не проводилось, вопрос об их природе остается открытым.

Работа выполнена на кафедре физической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, в рамках гранта Министерства науки и высшего образования РФ №14.Y26.31.0019, программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030», субсидии, предоставленной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности, №FZSM-2023-0020 и при финансовой поддержке Российского научного фонда – грант №24-23-00473.

Цель и задачи работы: цель настоящей работы состояла в разработке подходов к получению циклических дипептидов из их линейных аналогов в твердой фазе и изучение супрамолекулярных свойств линейных и циклических олигопептидов. Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Определение кинетических параметров реакций циклизации ряда дипептидов в твердой фазе.
2. Выявление взаимосвязи между химическим строением дипептида и кинетическими параметрами процесса циклизации.
3. Выяснение особенностей самосборки линейных и циклических дипептидов в зависимости от структуры их молекул.
4. Установление особенностей термических свойств соединений включения олигопептида с органическими «гостями» в зависимости от структуры «гостя».

Научная новизна исследования заключается в следующем:

В ходе проведенного исследования были впервые изучены термические свойства ряда олигопептидов. Установлены интервалы их термической стабильности и температуры начала реакций циклизации в твердой фазе. Обнаружена взаимосвязь между размерами боковых заместителей аминокислотных остатков, входящих в состав дипептида, и температурой

начала твердофазной циклизации. Методами изоконверсионной кинетики впервые определены кинетические параметры реакции циклизации и кинетические модели, описывающие эти процессы. Обнаружена общая зависимость энергии активации реакции циклизации дипептидов в твердой фазе от строения их молекул.

Впервые выдвинуто предположение о том, что лимитирующей стадией циклизации дипептидов в твердой фазе является переход от цвиттер-ионной к молекулярной форме.

Методом атомно-силовой микроскопии продемонстрировано различие в способности к самосборке между линейными и циклическими дипептидами, визуализировано влияние термической обработки на морфологию плёнок дипептидов лейцил-фенилаланин и фенилаланил-лейцин. Впервые продемонстрированы люминесцентные свойства наноструктур на основе *цикло*(фенилаланил-лейцила).

Обнаружена способность кристаллов лейцил-лейцил-лейцина к «запоминанию» ранее связанного бензола. «Память» трипептида проявляется в виде последовательных тепловых эффектов на ДСК кривой. Продemonстрирована возможность количественной оценки содержания бензола в его смесях с тетрахлорметаном.

Теоретическая и практическая значимость работы заключается в разработке способа получения циклических дипептидов, путем циклизации линейных дипептидов в твёрдой фазе при нагревании. Кинетический анализ изученных реакций позволил установить, что такие процессы хорошо описываются уравнениями автокаталитических реакций. Определенные кинетические параметры, а также детали механизма циклизации дипептидов в твердой фазе будут полезны для масштабирования реакций этого типа.

Выявленные в настоящей работе особенности самосборки линейных и циклических дипептидов могут быть использованы для создания новых материалов на их основе, в том числе с нелинейными оптическими свойствами.

Обнаруженная способность трипептида на основе лейцина к «запоминанию» ранее связанного бензола может быть использована для количественной оценки содержания этого соединения в смесях с другими органическими соединениями.

Положения, выносимые на защиту:

Способ синтеза циклических дипептидов в твердой фазе.

Кинетические параметры и модели, описывающие реакции циклизации линейных дипептидов в твердой фазе.

Зависимость температуры начала твердофазной реакции от строения молекул дипептидов.

Представление о лимитирующей стадии твердофазной реакции циклизации дипептидов.

Самоорганизация линейных и циклических дипептидов из разных растворителей.

Люминесцентные свойства циклического дипептида цикло(фенилаланил-лейцил).

Способность кристаллов лейцил-лейцил-лейцина к «запоминанию» ранее связанного бензола.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы были представлены на 9 конференциях и семинарах: на IX научной международной конференции молодых ученых «Инновации в химии: достижения и перспективы – 2018» (Москва, 2018 г.), на III Международной школе-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2018 г.), на 2-ом и 3-ем международном семинаре «International Seminar on Advanced Calorimetry» (Казань, 2018 и 2019 г.), на 2-ой и 3-ей школе-конференции для молодых ученых «Супрамолекулярные стратегии в химии, биологии и медицине: фундаментальные проблемы и перспективы» (Казань, 2020 и 2021 г.), на международном молодежном научном форуме «Ломоносов-2020» (Москва, 2020 г.), на XXIII международной конференции «International

Conference on Chemical Thermodynamics in Russia» (Казань, 2022 г.), на 4-ом международном семинаре «Современные нанотехнологии – IWMN 2022» (Екатеринбург, 2022 г.).

Публикации. Результаты диссертационной работы изложены в 6 статьях, опубликованных в рецензируемых международных и российских изданиях, рекомендованных ВАК РФ, входящих в библиографические базы данных Web of Science и Scopus, а также в 9 тезисах докладов на конференциях российского и международного уровня. Статьи по теме диссертационной работы написаны в соавторстве с д.х.н., профессором Зиганшиным М.А., осуществлявшим руководство исследованием, к.х.н. Зиганшиной С.А. и м.н.с. Морозовой А.С., принимавшими участие в обсуждении результатов атомно-силовой микроскопии, д.х.н. профессором Горбачуком В.В., принимавшим участие в обсуждении результатов и написании статей, к.ф.-м.н., доцентом Климовицким А.Е., принимавшим участие в обсуждении результатов ИК-спектроскопии, к.х.н., доцентом Герасимовым А.В., принимавшим участие в обсуждении данных термического анализа, к.х.н., доцентом Мухаметзяновым Т.А., принимавшим участие в обсуждении результатов спектроскопии кругового дихроизма, к.х.н. Бабаевой О.Б., принимавшей участие в обсуждении результатов масс-спектрометрических методов исследования, инженером-проектировщиком Хаяровым Х.Р., принимавшем участие в обсуждении данных спектроскопии ЯМР, студентами Миргазиевой Э.Р., Ахметшиным Ш.Р. и Перовым И.А., выполнявших под руководством автора научно-исследовательскую работу.

Объем и структура работы

Представленная работа состоит из следующих разделов: введения, трёх глав, заключения, списка сокращений, списка использованных источников, содержащего 153 источника. Работа представлена на 146 страницах и включает 12 таблиц и 75 рисунков.

В первой главе представлен литературный обзор, обобщающий имеющуюся информацию о свойствах линейных и циклических дипептидов.

Большое внимание уделено современным способам получения циклических дипептидов, рассмотрены преимущества и недостатки существующих методов. Критически проанализированы современные представления о возможных механизмах реакции циклизации линейных дипептидов. Описаны основные типы межмолекулярных взаимодействий, обеспечивающих самосборку олигопептидов, проанализированы влияющие на неё факторы. Рассмотрено практическое применение наноструктур и кристаллов на их основе. Во второй главе описаны материалы и методы исследования, применявшиеся в настоящей работе. Третья глава посвящена анализу полученных экспериментальных данных. В ней обсуждаются результаты термического анализа, анализируется зависимость температуры начала реакции циклизации от размеров боковых заместителей аминокислотных остатков в составе дипептида. Детально обсуждаются данные, полученные спектроскопическими и масс-спектрометрическими методами. Обсуждаются кинетические параметры реакций циклизации дипептидов в твердой фазе, рассчитанные в рамках подходов неизотермической кинетики, а также представление о лимитирующей стадии этих реакций. Анализируются особенности самосборки линейных и циклических дипептидов. Обсуждается природа эффекта «памяти» лейцил-лейцил-лейцина по отношению к бензолу.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Олигопептиды

Пептиды — это класс веществ, молекулы которых построены из двух и более остатков аминокислот, соединённых в цепь пептидными (амидными) связями $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$. Для обозначения пептидов с небольшим числом аминокислотных остатков в литературе применяется термин олигопептиды. Приставка «олиго», означающая *несколько*, используется для обозначения соединений с количеством повторяющихся звеньев, промежуточным между мономерами и высокомолекулярными соединениями. Количество звеньев точно не определено и, как правило, варьируется от 3 до 12 [1]. Вместе с тем, следует отметить, что пептиды, состоящие из двух аминокислотных остатков, в литературе также часто называют олигопептидами [2]. Это название будет использовано и в настоящей работе. Молекулы олигопептидов способны проявлять гидрофобные, гидрофильные, амфифильные, катионные или анионные свойства в зависимости от природы боковых заместителей в остатках α -аминокислот входящих в их состав, рис.1, [3].

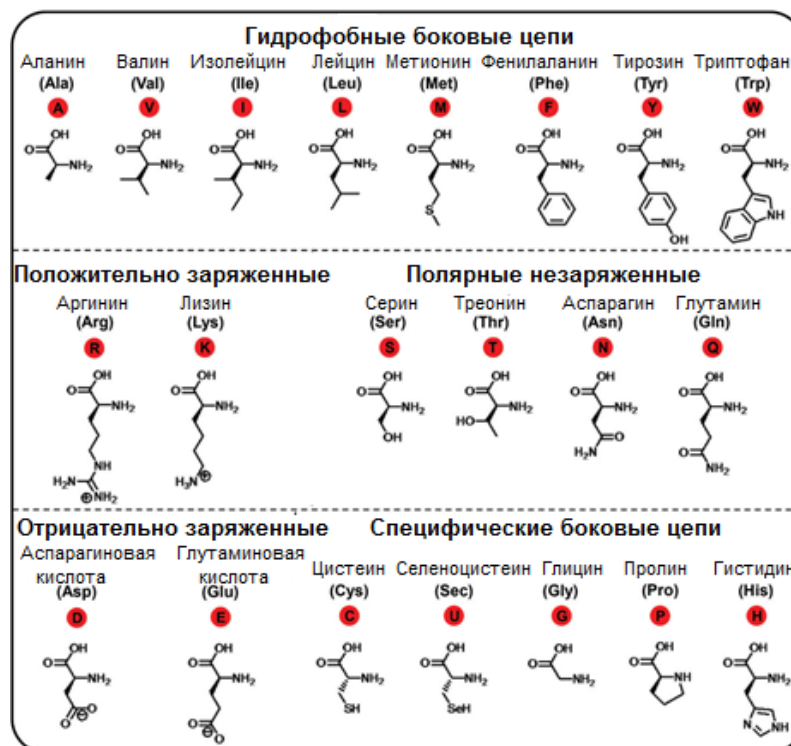


Рисунок 1 – Молекулярные структуры протеиногенных аминокислот сгруппированные согласно их свойствам, [3].

1.2 Линейные олигопептиды

Линейные олигопептиды представляют собой неразветвлённую цепь, состоящую из аминокислотных остатков. Подобно аминокислотам, в газообразном состоянии линейные олигопептиды находятся в молекулярной форме, а в растворах и в твёрдой фазе преобладающей является цвиттер-ионная форма [4-6]. В этой форме аммонийная ($-\text{NH}_3^+$) группа выступает в качестве сильного протодонора, а карбоксилатная ($-\text{COO}^-$) группа является сильным протоакцептором.

1.2.1 Биологические свойства линейных олигопептидов

Молекулы олигопептидов благодаря их малому размеру несложны в проектировании и синтезе, также существует возможность их дальнейшей химической модификации. Эти молекулы являются биосовместимыми, демонстрируют молекулярную селективность и специфическое взаимодействие с различными типами биологических систем [7].

В работе [8] было показано, что протеиногенный дипептид **Tyr-Asp** улучшает устойчивость растений к окислительному стрессу, напрямую влияя на метаболизм глюкозы. В соответствии с метаболическими данными, добавка **Tyr-Asp** улучшила показатели роста как Арабидопсиса, так и проростков табака, подвергшихся окислительному стрессу.

С помощью опытов на мышах Танака М. (Tanaka M.) и его коллеги впервые продемонстрировали, что пероральное введение **Tyr-Pro** (100 мг/кг, два раза в день) мышам в течение 16 дней значительно восстанавливает нарушение памяти у мышей, индуцированное β -амилоидом [9]. Таким образом, дипептид **Tyr-Pro** может использоваться как потенциальный лекарственный препарат против болезни Альцгеймера. При исследованиях на подопытных мышах Мидзусигэ Т. (Mizushige T.) с соавторами обнаружил, что дипептид **Tyr-Leu** обладает мощным антидепрессантным эффектом, сравнимым с действием современных антидепрессантов имипрамина и флувоксамина [10]. Ранее данный исследователь с коллегами обнаружил, что **Phe-Leu** и **Trp-Leu** проявляют высокую анксиолитическую активность, при

этом дипептиды с обратной последовательностью **Leu-Phe** и **Leu-Trp** были неактивными, что позволяет предположить, что последовательность ароматическая аминокислота-лейцин является критической для анксиолитической активности [11].

1.2.2 Термические и теплофизические свойства олигопептидов

Олигопептиды и структуры на их основе зачастую получают или применяют при повышенных температурах, поэтому изучение термических свойств олигопептидов является важной задачей. В работе [12] было установлено, что с увеличением числа аминокислотных остатков в молекуле олигопептидов в ряду 2G, 3G, 4G, 5G (G – глицин) их термическая стабильность увеличивается, рис. 2, таблица 1.

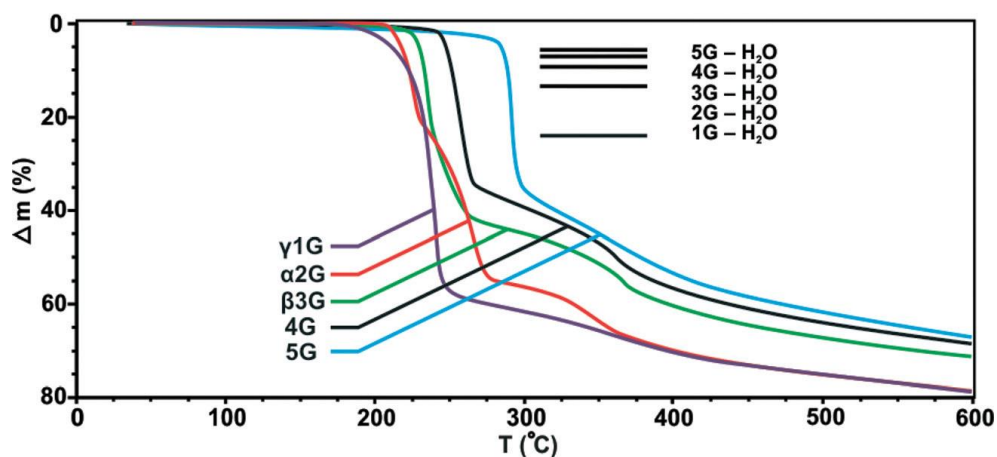


Рисунок 2 – Результаты термического анализа олигопептидов на основе глицина в атмосфере азота. Скорость нагрева 5 К/мин, [12].

Таблица 1 – Температуры начала потери массы в гомологическом ряду глицинов согласно данным термогравиметрического анализа, [12].

Скорость нагрева	γ 1G	α 2G	β 3G	4G	5G
5 К/мин	221	216	231	250	289
20 К/мин	244	226	237	262	292

По мнению авторов это связано со стабилизирующим действием окружения в твердой фазе. Для протекания реакции разложения молекула олигопептида должна приобрести определенную степень свободы. Каждый

дополнительный остаток добавляет две дополнительные водородные связи, а также дополнительные ван-дер-ваальсовы взаимодействия, ограничивающие молекулярное движение. Другим возможным фактором является стабильность самой молекулы, поскольку исследованные олигопептиды в кристалле находятся в цвиттер-ионной форме. Лучшее разделение зарядов в случае более длинных олигоглицинов может снизить плотность заряда и дополнительно стабилизировать цвиттер-ионную форму. Также стоит отметить, что пути разложения олигопептидов на основе глицина различны. Вместе с тем, одним из основных продуктов разложения этих олигопептидов является *цикло*(Gly-Gly). В случае глицина (1G) циклизация не может протекать в одну стадию, поэтому на термогравиметрической кривой наблюдается более пологое начало, связанное с периодом индукции, в течение которого происходит ориентации двух молекул глицина для протекания бимолекулярной реакции.

Изучение термических свойств дипептидов **Phe-Phe** [13] и **Leu-Leu** [14], рис. 3, позволило установить, что в результате их нагревания после ухода сорбционной воды имеет место химическая реакция при температурах 147°C и 177°C. Единственными продуктами данной реакции являются вода и соответствующий циклический дипептид.

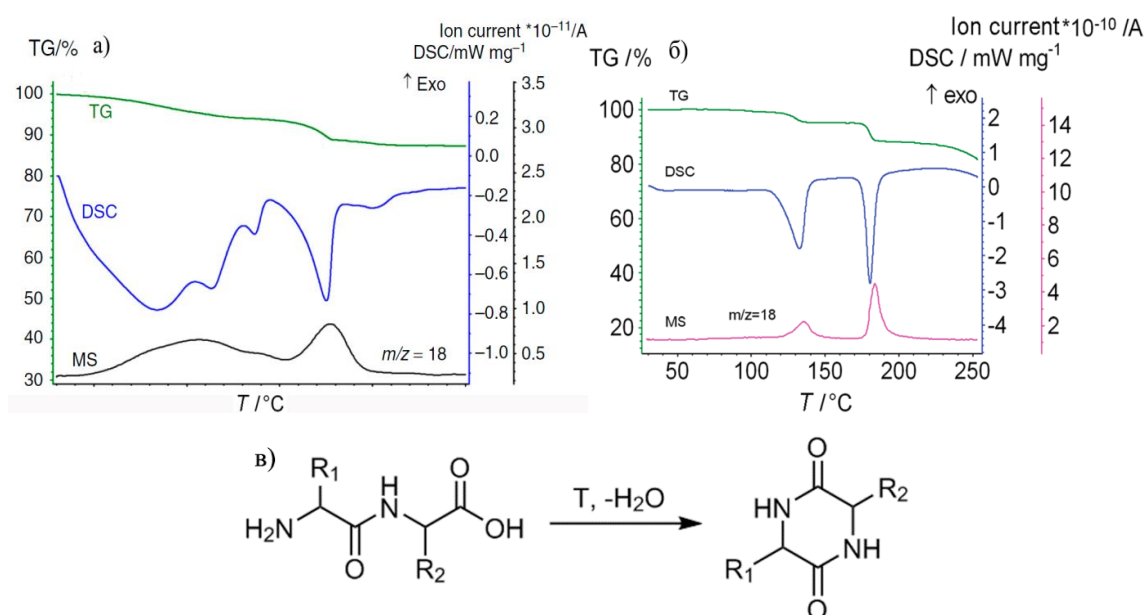


Рисунок 3 – Данные ТГ/ДСК/МС анализа для дипептидов а) **Phe-Phe** и б) **Leu-Leu**, в) схема реакции, [13,14].

В исследованиях [15,16] были изучены термодинамические аспекты плавления (температура стеклообразного перехода, температура плавления, энтальпия и энтропия плавления, разность теплоемкостей жидкой и твердой фаз) для ряда олигопептидов. Прямое определение этих параметров с помощью классических калориметров для этого типа соединений часто невозможно из-за разложения или внутримолекулярной циклизации при медленном нагревании. В связи с этим был использован метод сверхбыстрой сканирующей калориметрии. Полученные результаты были использованы для предсказания растворимости олигопептидов в воде и представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Теплофизические свойства различных олигопептидов, полученные методом сверхбыстрой калориметрии, [16]

Олигопептид	M (г/моль)	T_0^G (K)	T_0^{SL} (K)	Δh_0^{SL} (кДж/моль)	Δs_0^{SL} (кДж/моль*K)	$\Delta c_{p0}^{SL}(T_0^G)$ (Дж/моль*K)	$\Delta c_{p0}^{SL}(T_0^{SL})$ (Дж/моль*K)
Gly-Gly	132,119	387	593	40	0,066	85	51
Gly-Ala	146,146	396	551	41	0,073	91	55
Ala-Gly	146,146	396	611	52	0,085	82	57
Ala-Ala	160,173	399	606	45	0,074	84	62
Gly-Ser	162,145	374	530	49	0,091	93	67
Ser-Gly	162,145	380	553	62	0,097	108	61
Ala-Ser	176,172	400	556	43	0,076	86	48
Ser-Ala	176,172	378	609	73	0,114	114	55
Gly-Pro	172,180	373	541	21	0,038	45	36
Pro-Gly	172,180	362	592	47	0,064	59	37
Ala-Pro	186,211	327	544	35	0,064	80	57
Pro-Ala	186,211		624	38	0,061		
Gly-Gly-Gly	189,170	401	594	54	0,09	98	57
Gly-Gly-Ala	203,200	402	592	70	0,118	98	66
Gly-Ala-Gly	203,200	412	623	61	0,097	109	78
Ala-Gly-Ala	217,225	408	557	58	0,104	126	98
Ala-Ala-Ala	231,252	424	606	72	0,118	189	124
Leu-Gly-Gly	245,279	388	530	74	0,138	181	111
Gly-Leu-Gly	245,279	407	545	60	0,109	152	139
Gly-Gly-Leu	245,279	411	521	55	0,102	204	160
Pro-Gly-Gly	229,236	381	530	45	0,083	139	81
Gly-Ala-Leu	259,305	413	578	77	0,132	173	112

Тем не менее, следует отметить, что, несмотря на достаточно большой экспериментальный материал, авторы не обсуждают влияние структуры дипептидов на их термические свойства.

1.3 Циклические дипептиды

Как было указано выше, изучение термических свойств линейных дипептидов продемонстрировало, что в результате их нагрева выше критической температуры возможно образование циклических дипептидов, производных 2,5-дикетопиперазинов [17]. Эти соединения так же вызывают большой интерес у исследователей благодаря своим свойствам [18,19].

1.3.1 Свойства циклических дипептидов

Циклические дипептиды обладают исключительной структурной жесткостью, стабильностью к действию ферментов и биологической активностью. Эти соединения способны к самосборке с образованием упорядоченных структур [18,19].

Исследовательской группой из Китая был выделен *цикло(Ala-Leu)* из растения *Moslae Herba*. Было установлено, что данное соединение способно ингибировать репликацию вируса гриппа *A* и агрегацию тромбоцитов и может быть использовано в качестве препарата для лечения воспаления легких, вызванного этим вирусом [20].

Согласно результатам исследования из работы [21] *цикло(L-Pro-D-Ile)* и *цикло(L-Pro-L-Phe)*, выделенные из кишечной палочки (*Escherichia coli*), проявляют антимикробную активность против патогенной для сельскохозяйственных культур бактерии *Ralstonia solanacearum*. Дипептиды *цикло(Pro-Tyr)* и *цикло(Pro-Phe)*, выделенные из актиномицета (*Streptomyces griseorubens*), обладают антибактериальной активностью в отношении бактерий *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella aerogenes* и *Proteus vulgaris*. Соединения *цикло(Val-Pro)*, *цикло(Pro-Leu)*, *цикло(Pro-Tyr)* и *цикло(Pro-Phe)* обладают способностью ингибировать инвазию и миграцию клеток A549 (клеток рака легких) и могут быть использованы в качестве новых противораковых лекарственных средств [22].

В работе [23] было установлено, что *цикло*(**Gly-Val**), *цикло*(**Gly-D-Val**), *цикло*(**Gly-Leu**), *цикло*(**Gly-Ile**), *цикло*(**Phe-Cys**) и *цикло*(**Tyr-Cys**) способны подавлять рост раковых клеток в клеточных линиях HT-29 (рак толстой кишки), HeLa (рак шейки матки) и MCF-7 (рак груди). Среди изученных дипептидов, наибольшей противораковой активностью обладает *цикло*(**Tyr-Cys**). Дипептид *цикло*(**Pro-Tyr**) способен индуцировать апоптоз раковых клеток в клеточной линии HepG2 (рак печени) и может быть использован как потенциальный терапевтический агент для лечения гепатоцеллюлярной карциномы [24]. В исследовании [25] было продемонстрировано, что противораковой активностью также обладают производные циклических дипептидов, например, 3(R),6(S)-бис-(4-гидроксифенил)-пиперазин-2,5-дион оказывает высокое цитотоксическое действие на линию клеток AGS (рак желудка).

Циклические дипептиды и их производные обладают нейрозащитными свойствами. В работе [26] сообщается, что 2,5-дикетопиперазины, структурно подобные тиреотропин-рилизинг-гормону, предотвращают или снижают как некротическую, так и апоптотическую гибель клеток в различных моделях *in vitro* и в результате способны значительно улучшить когнитивные и моторные результаты и уменьшить объемы повреждений после черепно-мозговой травмы. В результате исследования авторы этой работы сделали вывод, что остаток пролина в структуре циклических дипептидов вносит значительный вклад в общее нейрозащитное действие, а также в ноотропные и когнитивные свойства этого класса ДКП. С другой стороны, ДКП, содержащие ненасыщенные боковые группы, обладают способностью улучшать соматосенсорную и моторную функции, а также проявляют значительную антиоксидантную активность. В более поздней работе [27] Хасан Туркез (Hasan Turkez) и его коллеги протестировали стереоизомеры *цикло*(**His-Pro**) на дифференцированной линии клеток нейробластомы человека (SH-SY5Y) и обнаружили, что эти соединения препятствуют гибели клеток, вызванной

амилоидным белком А 1-42, и могут быть использованы как новые многообещающие терапевтические средства против болезни Альцгеймера.

Дикетопиперазины проявляют противогрибковые свойства, так, например, в ходе скрининга морских грибов, продуцирующих противогрибковые соединения против *Pyricularia oryzae* (гриб вызывающий пирикулярриоз риса), было установлено, что высокую активность проявляет метаболит морского гриба М-3 [28]. Активным соединением в данном метаболите является дикетопиперазин, представленный на рис. 4.

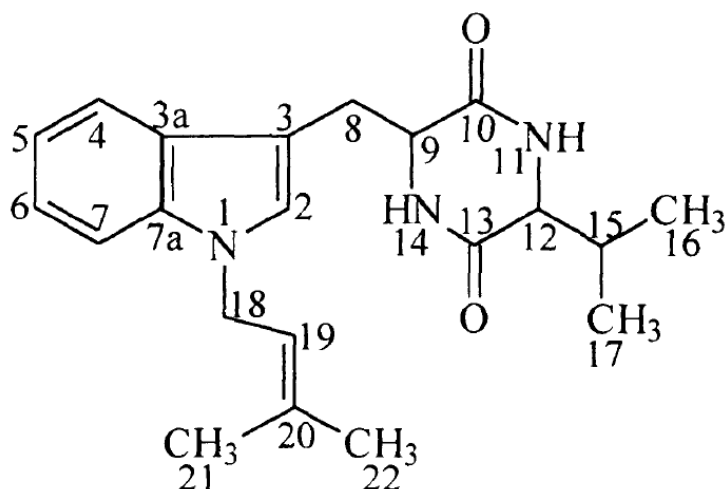


Рисунок 4 – Химическая структура производного дикетопиперазина выделенного из метаболита М-3, [28].

В работе [29] из бульонной культуры эндофита виноградной лозы *Alternaria alternata* были экстрагированы три циклических дипептида: *цикло*(_L-фенилаланин-транс-4-гидрокси-_L-пролин), *цикло*(_L-лейцин-транс-4-гидрокси-_L-пролин), *цикло*(_L-аланин-транс-4-гидрокси-_L-пролин), – для изучения их активности против *Plasmopara viticola*, оомицета, паразитирующего на листьях винограда. Циклические дипептиды, используемые в различных концентрациях (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} и 10^{-6} М) как по отдельности, так и в смесях, продемонстрировали высокую эффективность в подавлении спорообразования *P. viticola* при применении через 2 или 24 ч после инокуляции патогена. Более того, ультраструктурный анализ, проведенный на тканях листьев виноградной лозы, показал, что ДКП, используемые по

отдельности и в смеси, в вышеуказанных концентрациях не вызывали повреждения тканей листьев. Наиболее эффективные доступные в настоящее время фунгициды против ложной мучнистой росы (возбудитель *P. Viticola*), разрешенные органическими стандартами, основаны на гидроксиде меди и сульфате меди. Однако медные фунгициды не уничтожают существующие инфекции и не действуют системно; кроме того, они легко смываются дождем [30]. ДКП были активны в отношении возбудителя даже после начала заражения, когда гриб уже проник и находился внутри тканей листа.

Молекулы дикетопиперазинов способны выступать в качестве катализаторов. В работе [31] было обнаружено, что добавление каталитического количества *цикло(Leu-Leu)* при асимметричном эпоксицировании транс-халкона с образованием эпосихалкона в трёхфазной системе (вода/гексан/нерастворимый циклический дипептид на границе раздела жидкостей) приводит к энантиомерному избытку в размере 70%. Циклический дипептид действует как катализатор, инициирует супрамолекулярную структуру на водно-органической границе раздела, необходимую для эффективных превращений.

Помимо вышеперечисленных свойств циклические дипептиды обладают противодиабетическими свойствами [32] и способны переносить биологически активные молекулы через гематоэнцефалический барьер [33,34]. Эти молекулы были обнаружены в обжаренных зернах кофе, где они, как предполагается, ответственны за горький вкус [35]. Циклические дипептиды, образующиеся при выдержке вина, влияют на его вкусовые характеристики [36]. Некоторые ДКП могут действовать как сигнальные молекулы, участвующие в координации действий бактерий [19,37], или как феромоны во внутривидовой коммуникации рептилий [38].

1.4 Методы получения циклических дипептидов

Циклические дипептиды обладают рядом интересных свойств с точки зрения их применения в технологиях и медицине, поэтому разработка новых экономически выгодных способов их синтеза на сегодняшний день является

актуальной задачей. Ниже будут рассмотрены основные методы получения данных соединений.

1.4.1 Биологические методы

Дикетопиперазины синтезируются целым рядом организмов в качестве вторичных метаболитов. Вторичные метаболиты представляют собой низкомолекулярные соединения, напрямую не участвующие в жизнедеятельности или размножении организма, но обеспечивающие ему конкурентное преимущество [39]. Значительное количество циклических дипептидов было выделено из различных грибов. Например, из гриба *Rosellinia necatrix* были выделены три циклических дипептида: *цикло*(L-**Pro**-L-**Leu**), *цикло*(L-**Pro**-L-**Val**) и *цикло*(L-**Pro**-L-**Phe**), [40], а в качестве источника *цикло*(L-**Pro**-L-**Tyr**) может выступать *Leptographium qinlingensis* [41]. Помимо уже известных дикетопиперазинов из грибов выделяют новые, ранее неизвестные их производные. В работе [42] были выделены три новых дикетопиперазина, рис. 5, вместе с восемью ранее известными соединениями из культуры глубоководного осадочного гриба *Dichotomomyces cejpai* FS110.

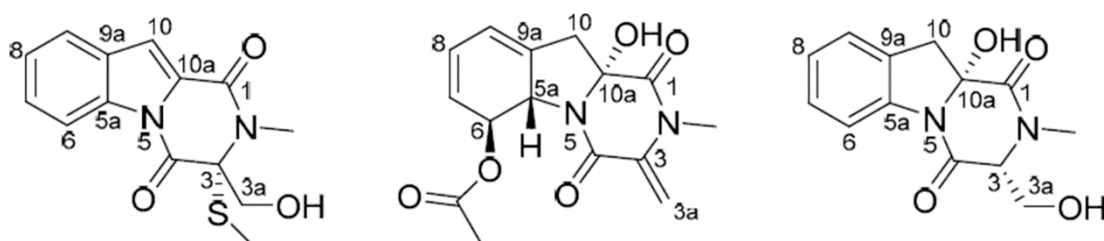


Рисунок 5 – Структуры ранее неизвестных дикетопиперазинов, выделенных из *Dichotomomyces cejpai* FS110, [42].

Помимо грибов циклические дипептиды могут быть выделены из бактерий. Из экстракта *Bacillus* sp. были выделены *цикло*(D-**Pro**-L-**Leu**), *цикло*(L-**Pro**-L-**Met**), *цикло*(D-**Pro**-L-**Phe**), *цикло*(L-**Pro**-L-**Phe**), *цикло*(L-**Pro**-L-**Tyr**), *цикло*(L-**Pro**-D-**Tyr**), *цикло*(L-**Pro**-L-**Leu**) и *цикло*(D-**Pro**-L-**Tyr**), [43,44]. Подобно грибам, из бактерий также выделяют ранее неизвестные

дикетопиперазины, например, из *Streptomyces* sp. были получены пять новых производных этих соединений [45].

Биологический метод имеет ряд недостатков: необходимо культивировать организмы, продуцирующие ДКП, а последующая экстракция и хроматографическое разделение компонентов, позволяет получить целевой продукт с малым выходом. Кроме того, бактерии способны продуцировать как L-, так и D-изомерные циклические дипептиды, что ещё более усложняет процесс разделения.

1.4.2 Синтез в растворе

В настоящее время наиболее используемым методом получения циклических дипептидов является их синтез в растворе. Существует ряд синтетических стратегий, которые будут рассмотрены ниже.

1.4.2.1 Циклизация дипептидного эфира

Дипептиды с аминогруппой на одном конце и сложноэфирной группой на другом, могут спонтанно циклизироваться с образованием ДКП в различном диапазоне pH [46]. Однако, необходим тщательный подбор условий реакции для ограничения рацемизации. Формирование самого дипептида из большого хирального пула коммерчески доступных α -аминокислот с использованием любого из большого количества связывающих реагентов представляет собой простой процесс. Следовательно, образование ДКП по этому пути является наиболее часто используемой процедурой для создания этой циклической системы. Обычно для этого способа используется α -аминокислота с защитной группой на азоте 1 и сложный эфир α -аминокислоты 2, рис. 6. Продукт их реакции 3 при снятии защитной группы дает сложный эфир дипептида 4, который затем может циклизироваться *in situ* с образованием желаемой молекулы 5. Для этого амидная связь должна принять *цис*-ориентацию. Если это затруднено вследствие стерических или электронных факторов, то скорость циклизации может быть низкой. В этих условиях для форсирования образования кольца часто используют нагревание в кислой среде [47]. Также

можно использовать щелочные условия [48] для ускорения циклизации, но этот метод может привести к рацемизации.

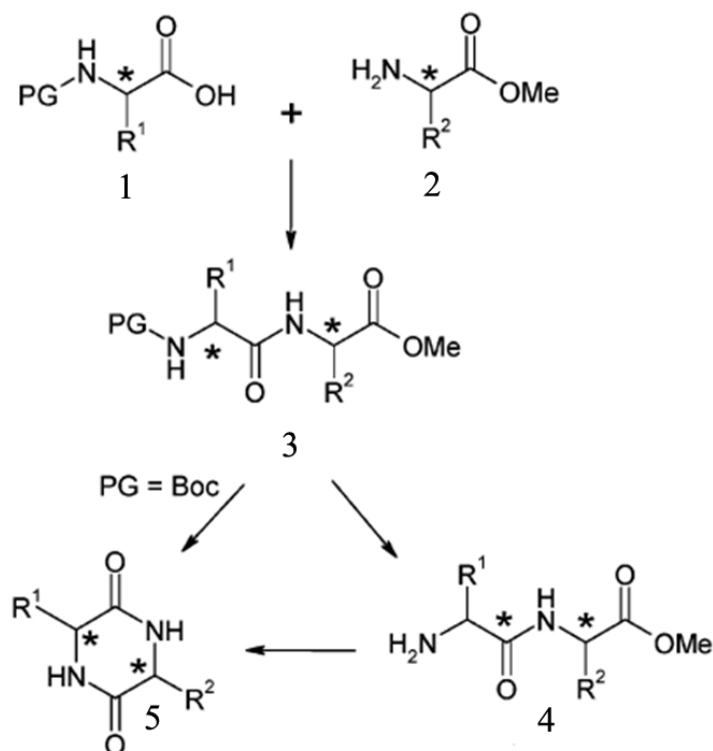


Рисунок 6 – Схема циклизации дипептидного эфира, [46].

Циклизацию сложных эфиров дипептидов можно проводить при нагревании, обычно путем кипячения с обратным холодильником в высококипящих растворителях, таких как толуол или ксилол, в течение 24 часов [49].

1.4.2.2 Конденсация аминокислот

Прямая конденсация двух аминокислот 6 с образованием ДКП 7, рис. 7, зачастую приводит к низкому выходу продукта [50]. Наиболее распространенным улучшением этого метода является активация первой аминокислоты реакцией с фосгеном с последующей реакцией со второй аминокислотой. В настоящее время разработаны одnoreакторные методы получения ДКП с использованием этого методом [51]. Другой подход заключается в проведении реакции на границе раздела газ-твердая фаза, газообразные аминокислоты конденсируются на поверхности кремнезема. Для

этого требуются специальные условия, и, хотя данный метод казался многообещающим, оказалось, что и там имеет место рацемизация [52].

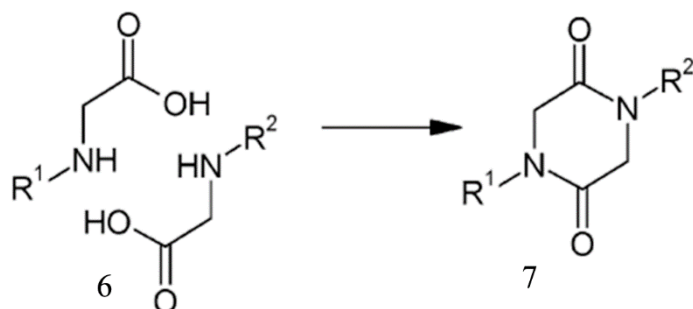


Рисунок 7 – Конденсация аминокислот, [46].

1.4.2.3 Циклизация Аза-Виттига

Внутримолекулярная реакция аза-Виттига с последующим гидролизом полученного иминоэфира была использована для образования кольца ДКП, рис. 8. Азид 10, полученный из аминокислоты 8 ацилированием хлорацетилхлоридом с последующим замещением азидом натрия, использовали для образования *in situ* иминофосфорана 11. Он циклизовался с карбонильной группой С-2 сложного эфира с получением иминоэфира 12, что в присутствии следов воды в тетрагидрофуне (ТГФ) дает хорошие выходы 2,5-дикетопиперазинов 13 ($R = \text{бензил и арил}$) [53].

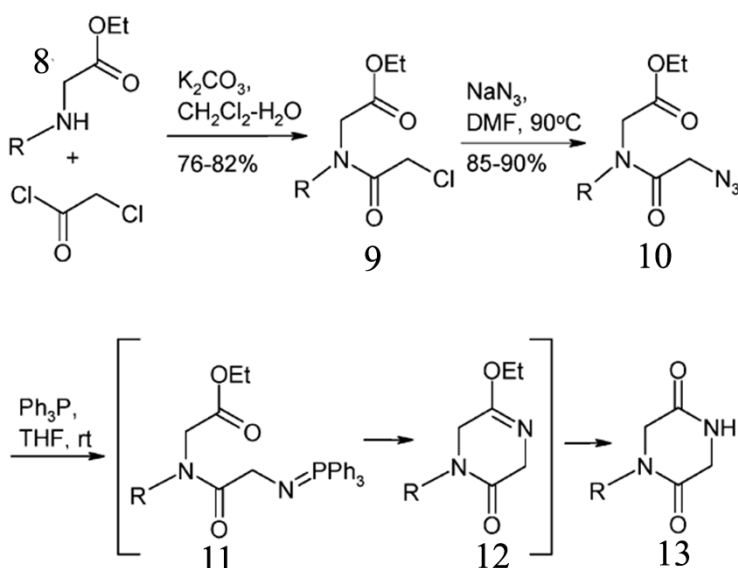


Рисунок 8 – Циклизация Аза-Виттига, [46].

1.4.2.4 Реакция Дильса-Альдера

ДКП могут быть синтезированы при помощи реакции Дильса-Альдера. Данный подход позволяет получить очень сложные структуры с конденсированными кольцами. Шерадский (Sheradsky) и Силкоф (Silcoff) [54] использовали стереоспецифическую внутримолекулярную реакцию Дильса-Альдера с участием соединения 14 с образованием ДКП 15, рис. 9.

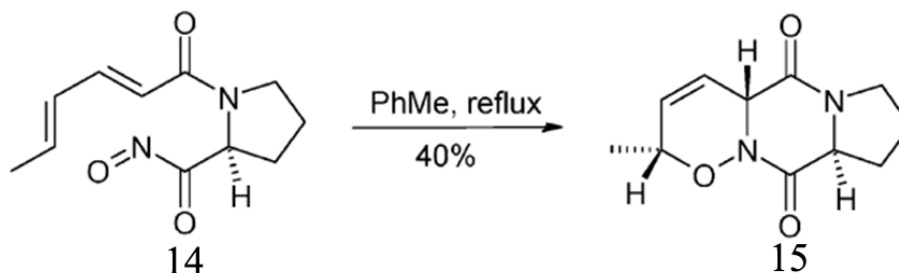


Рисунок 9 – Циклизация через реакцию Дильса-Альдера, [46].

Общими недостатками «классических» методов синтеза циклических дипептидов в растворе являются многостадийные трудоемкие реакции, применение растворителей, необходимость очистки конечного продукта и возможная рацемизация. В связи с этим были разработаны альтернативные методики получения данных соединений.

1.4.3 Циклизация под действием микроволнового излучения

Данный метод позволяет получать циклические дипептиды без их эпитеризации [55]. В результате поиска оптимальных условий синтеза: растворитель, время реакции, температура, – было установлено, что нагрев под действием микроволнового излучения в течение 10 минут с использованием воды в качестве растворителя является наиболее эффективным методом циклизации, обеспечивающим выходы от 63 до 97%. Схема синтеза представлена на рис. 10. Следует отметить тот факт, что хотя исследователи и приводят значения выхода конечного продукта, достигающего 97%, это относится лишь к конечной стадии циклизации, обозначенной буквой «с» на рис. 10. Реальный выход при пересчёте на исходный реагент окажется ниже,

так как выходы продукта на стадиях присоединения «а» и снятия *Boc*-защитной группы составляют 84-94% и 80-94% соответственно.

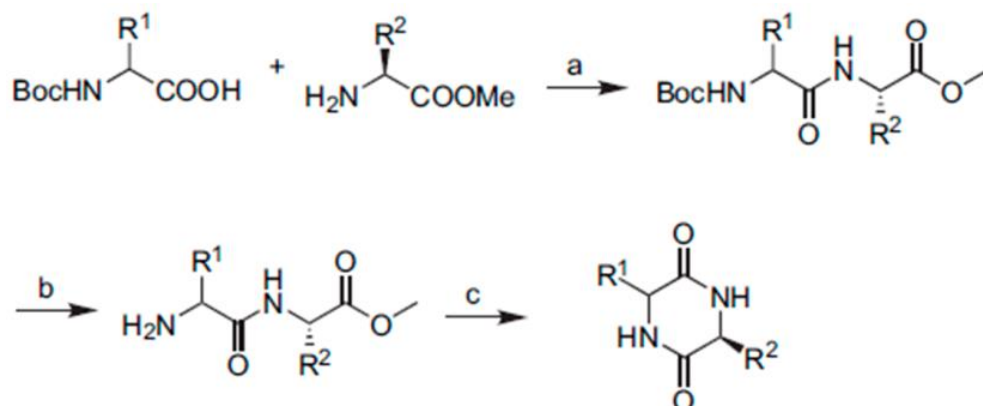


Рисунок 10 – Схема получения циклических дипептидов при помощи микроволнового излучения в воде. а) реакция присоединения *Boc*-защищённой аминокислоты к сложному эфиру другой аминокислоты, б) снятие защитной группы, с) циклизация, [55].

В литературе имеется ряд примеров, где для ускорения процесса синтеза исследователи напрямую облучали микроволновым излучением дипептидные эфиры с *Boc*-защитной группой на атоме азота, что приводило к снятию данной группы с последующей циклизацией. При помощи данного метода в водном растворе были получены тризамещенные [56], а также полизамещенные производные ДКП в отсутствии растворителя [57].

Недостатками описанного метода, как правило, являются сложный процесс синтеза, протекающий более чем в одну стадию, необходимость применения защитных групп и выделения циклического дипептида из растворителя. Следует отметить, что в недавнем исследовании [58] большинство этих недостатков были преодолены. На примере циклизации дипептидов **Phe-Phe** и **Phe-Val** под действием микроволнового излучения в воде было продемонстрировано, что возможно на их основе получать ДКП без применения защитных групп. Также следует отметить, что в отличие от вышеописанных работ в данном случае были использованы линейные дипептиды, а не их сложноэфирные производные. Выход конечного продукта

составил 90 и 95 процентов для **Phe-Phe** и **Phe-Val** соответственно. Единственными недостатками в данном случае являются необходимость растворения линейных дипептидов в воде под действием ультразвука и выделение конечного продукта из воды.

1.4.4 Циклизация на поверхности твёрдой фазы

О синтезе циклических дипептидов на поверхности твёрдой фазы сообщалось еще в 1965 году [59]. Существует три основных подхода в рамках данной методики: (I) получение прекурсора линейного дипептида на линкере, его циклизация и последующее отщепление продукта от смолы, (II) отщепление ациклического прекурсора от смолы с последующей циклизацией в фазе раствора и (III) циклизация, индуцированная отщеплением линейного прекурсора дипептида в одну стадию:

I) Циклизация на смоле, где сначала образуется дикетопиперазиновое кольцо, а затем происходит отщепление от поверхности твёрдой фазы проиллюстрировано на рис. 11, [60]. Исходный бициклический β -лактам 17 был присоединен к смоле Ванга с получением соединения 18. В результате раскрытия ацилированного продукта 18 аминокэфирами было получено вещество 19, которое при снятии защиты и циклизации основанием дало ДКП 20. В дальнейшем продукт 20 был алкилирован и отщеплен от смолы при помощи кислоты с получением бициклического производного 2,5-дикетопиперазина 21.

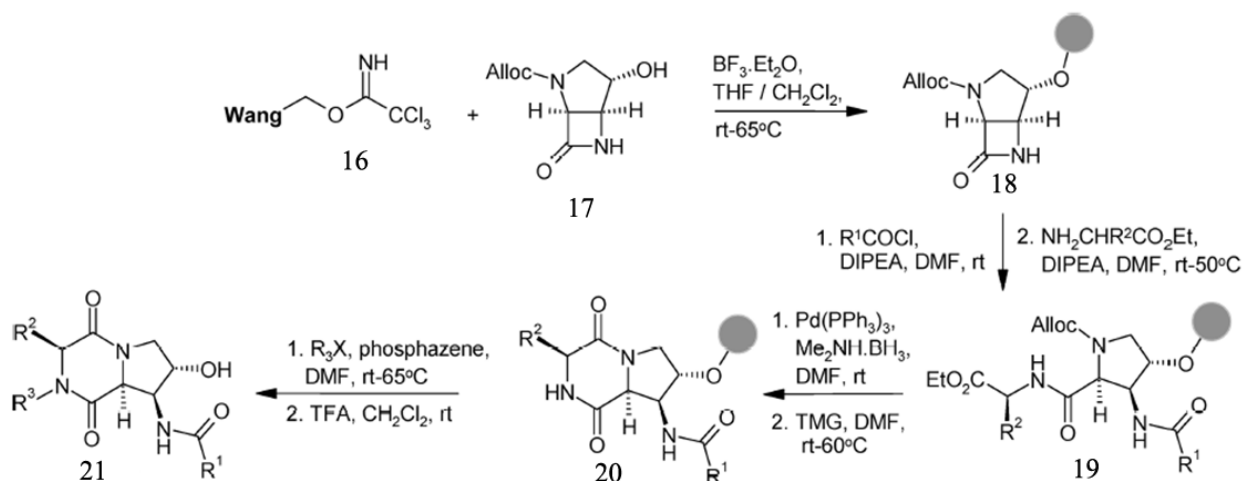


Рисунок 11 – Схема циклизации с последующим отщеплением от смолы, [46].

II) Отщепление от смолы с последующей циклизацией в фазе раствора линейного прекурсора дипептида показано на рис. 12. Реакция связанного со смолой вещества 22 дает дипептидное производное 23. Обработка основанием приводит к образованию промежуточного соединения 24, отщепляющегося от твердой подложки. Затем под действием метоксида натрия происходит образование вещества 25, из которого в кислых условиях был получен ДКП 26. Средний выход составляет 83%, [61].

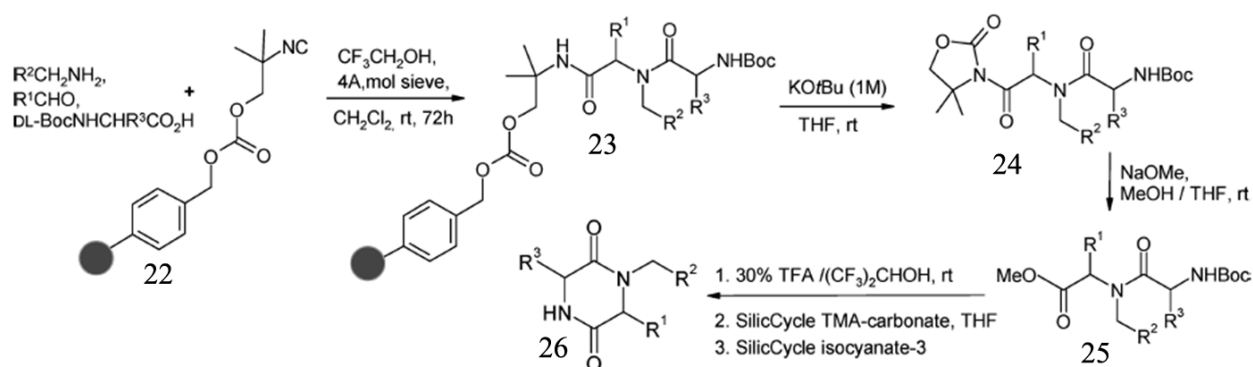


Рисунок 12 – Схема получения циклических дипептидов при помощи отщепления от смолы с последующей циклизацией в растворе, [46].

III) Индуцированная отщеплением циклизация линейных дипептидов, рис. 13, является одной из наиболее распространенных стратегий твердофазного синтеза ДКП.

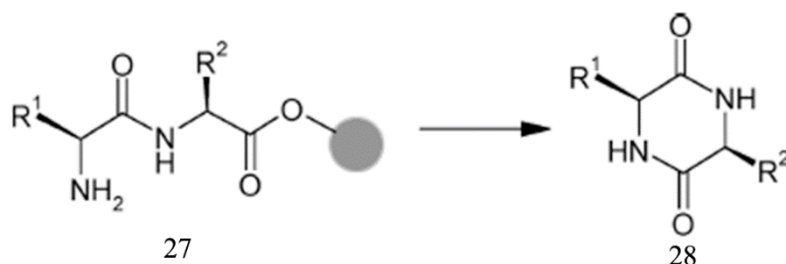


Рисунок 13 – Схема циклизации дипептида, индуцированная отщеплением от поверхности подложки, [46].

Этот метод был использован в комбинации с классическим и микроволновым нагревом в работе [62]. Было установлено, что независимо от используемой в качестве подложки смолы и растворителя, за исключением воды, классический

нагрев позволяет получать конечный продукт с высоким выходом. Однако сам процесс оказался очень длительным от 35 до 60 часов. В то время как применение микроволнового излучения позволяло получать ДКП с выходом 79-87% за 30 минут при использовании подложки из PEGA-Ser и воды в качестве растворителя.

К недостаткам данного метода синтеза циклических дипептидов можно отнести необходимость применения подложки из различных смол, реагентов, индуцирующих отщепление от твердой фазы, а также проблемы с масштабированием данного процесса. В связи с тем, что реакция проходит либо на поверхности твердой фазы, либо с реагентами, которые находились на поверхности, существуют ограничения масштабирования реакции, связанные с размерами подложки.

1.4.5 Твердофазная циклизация линейных дипептидов при нагревании

В главе, посвященной термическим свойствам дипептидов, было упомянуто о том, что нагревание линейных дипептидов в твердой фазе может привести к их внутримолекулярной циклизации с образованием ДКП и воды в качестве единственных продуктов реакции. Данный подход позволяет получать циклические дипептиды с выходами близкими к 100 % в одну стадию, не требует растворителей и очистки конечного продукта [13,14]. Несмотря на всю привлекательность данного метода, к настоящему времени имеется лишь несколько публикаций, посвященных данной теме. Сложность изучения данных реакций связана с тем, что одновременно с циклизацией могут происходить процессы испарения воды [13], термической деструкции [12] или сублимации [15]. К тому же, в отличие от синтеза в растворах, данный процесс представляет собой топохимическую реакцию, что также затрудняет его исследование. Более подробно методология изучения топохимических реакций рассматривается в Главе 2.

Вместе с тем следует отметить что механизм циклизации дипептидов в твердой фазе до сих пор остается неизученным, что с одной стороны затрудняет масштабирование этих реакций, а с другой создание

прогностических моделей, предсказывающих наиболее оптимальные условия протекания таких реакций. В литературе имеется лишь ограниченное число работ в которых рассматриваются наиболее вероятные пути протекания реакций с образованием циклических дипептидов в газовой фазе.

1.5 Механизм циклизации дипептидов

Одна из первых попыток теоретического описания механизма циклизации дипептидов при помощи расчётных методов была предпринята китайскими исследователями в работе [63].

Были исследованы некаталитический, пиперидин-катализируемый и водно-катализируемый ступенчатые механизмы для дипептида с гидроксильной группой, замещенной на метиламиногруппу. Авторами было высказано предположение, что вода может выступать в качестве катализатора, действуя как переносчик протонов. При этом авторы утверждают, что циклизация возможна только для дипептидов с замещенной амидной группой.

В работе [64] с использованием теории функционала плотности была исследована реакция циклизации аминокислот с образованием циклических дипептидов. Авторы предложили три возможных механизма этого процесса, рис. 14-16.

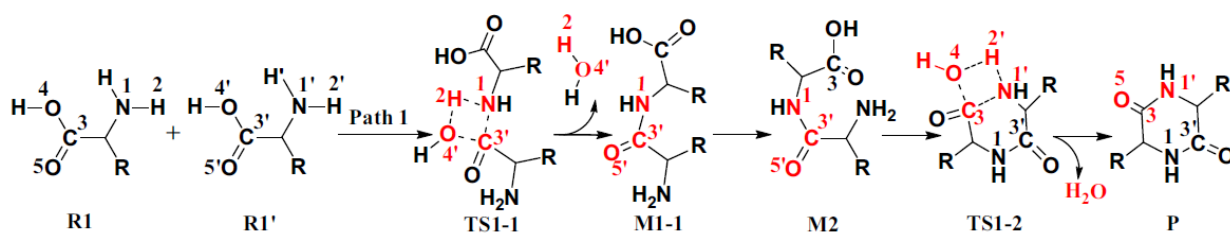


Рисунок 14 – Первый механизм реакции циклизации аминокислот, [64].

Согласно первому механизму, циклизация дипептида происходит с образованием четырехчленного цикла в переходном состоянии, рис. 14, с последующим отщеплением молекулы воды, образованной за счёт разрыва N-H связи и отрыва гидроксильной группы.

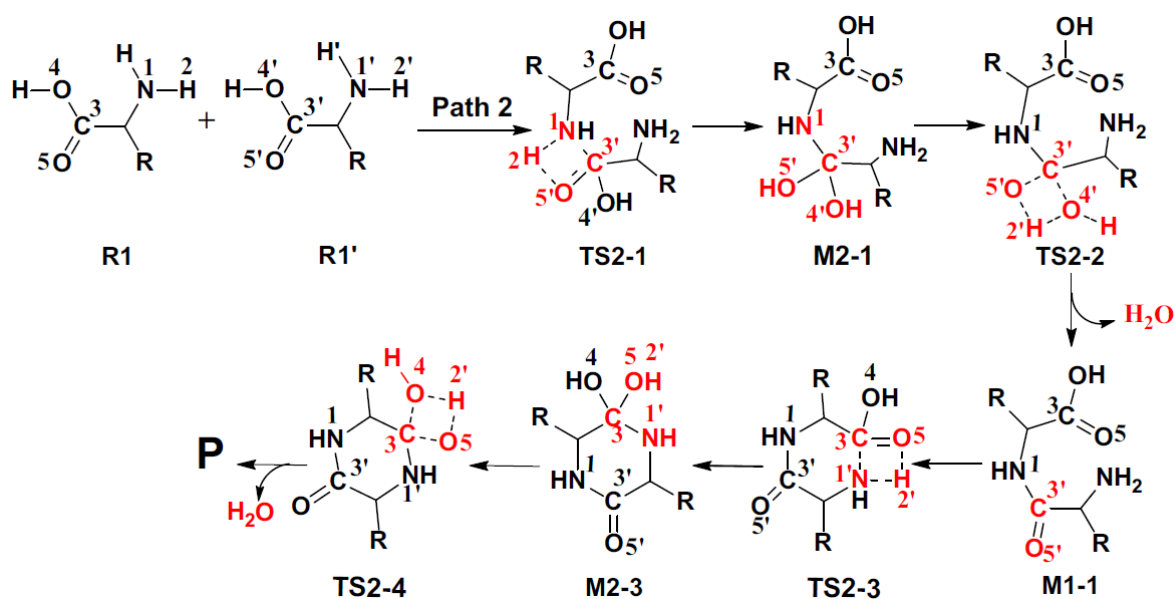


Рисунок 15 – Второй механизм реакции циклизации аминокислот, [64].

Второй механизм циклизации также протекает с образованием четырехчленного цикла в переходном состоянии, но с участием карбонильного кислорода, рис. 15. В результате дальнейшего разрыва N-H связи протон присоединяется к карбонильному кислороду с формированием гидроксильной группы, затем из двух гидроксильных групп в геминальном положении образуется молекула воды, после ухода которой получается конечный продукт.

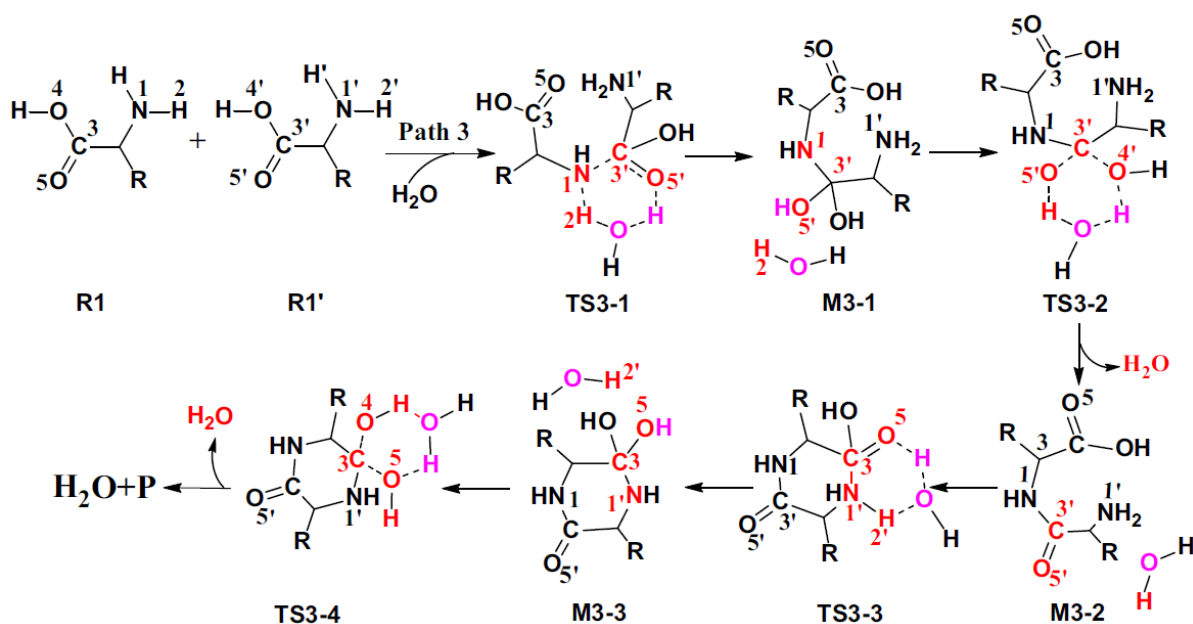


Рисунок 16 – третий механизм реакции циклизации аминокислот, [64].

Третий предложенный механизм протекает с образованием шестичленного цикла с участием молекулы воды в переходном состоянии, рис. 16. Согласно схеме, сначала молекула воды участвует в переносе протона от аминогруппы к карбонильному кислороду, затем принимает участие в формировании шестичленного цикла с гидроксильными группами в геминальном положении. Последующий отрыв молекулы воды приводит к образованию конечного продукта.

В качестве наиболее вероятного механизма циклизации при комнатной температуре авторы рассматривают третий, поскольку, согласно расчетам, участие в реакции воды приводит к снижению величины энергетических барьеров. К подобному выводу пришли исследователи в более поздней работе [65].

Проведенное квантово-химическое исследование реакции циклизации [64] позволило авторам высказать предположение, что в ряду алифатических дипептидов на основе глицина, аланина, валина и лейцина с увеличением размера боковой группы происходит увеличение энергетического барьера лимитирующей стадии циклизации.

Таким образом, в настоящее время в литературе имеется лишь небольшое число работ, посвящённых изучению реакции образования циклических дипептидов с использованием только расчетных методов. Следует отметить общие недостатки этих исследований: отсутствуют какие-либо экспериментальные подтверждения предлагаемых авторами механизмов, во всех случаях рассматриваются реакции с участием молекул реагентов, находящихся в газовой фазе в молекулярной форме. Это существенно ограничивает применимость результатов этих работ для описания реакции циклизации дипептидов в кристаллической фазе, где преобладающей является цвиттер-ионная форма. К настоящему времени таких исследований не проводилось и для подобных реакций не существует общей теории.

1.6 Применение наноструктур и кристаллов олигопептидов

Наряду с молекулярной формой олигопептидов широкое применение получили материалы на их основе, рис. 17, которые могут быть получены в результате их самоассоциации [66]. Микро- и наноструктуры на основе олигопептидов являются биосовместимыми и могут быть использованы при разработке ультраконденсаторов, супергидрофобных поверхностей, светоизлучающих и пьезоэлектрических элементов, сверхчувствительных сенсоров, темплатов для неорганических наноструктур. Такие материалы находят своё применение в биомедицинских целях, для адресной доставки лекарств и в регенеративной медицине [66].



Рисунок 17 – Различные применения наноструктур на основе дифенилаланина, [66].

В литературе также имеется большое количество примеров применения наноструктур на основе циклических аналогов дипептидов [67]. Они могут быть использованы в качестве оптических волноводов, высокопрочных биоматериалов, микрофлюидных устройств [67], наногенераторов [68] и т.д.

Помимо наноструктур активно применяются кристаллы олигопептидов. В зависимости от аминокислотных остатков, в составе олигопептида, могут быть сформированы слоистые структуры с двумерной или трехмерной сеткой водородных связей, или кристаллы, состоящие из гидрофильных либо гидрофобных нанокolonн [69]. Типы структур, образуемые рядом гидрофобных дипептидов, представлены на рис. 18.

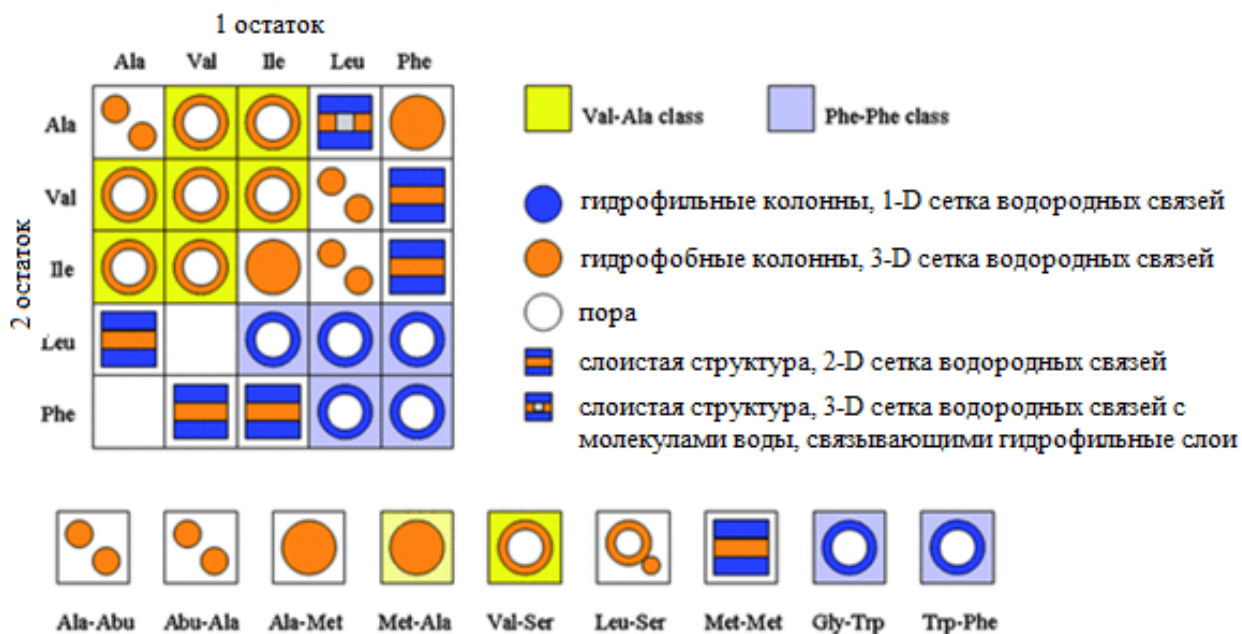


Рисунок 18 – Структуры формируемые различными дипептидами, [69].

Подобные структуры способны эффективно связывать органические молекулы [70,14] и разделять газовые смеси [71,72,73]. Например, в исследовании [74] было продемонстрировано, что кристаллы дипептидов могут быть использованы для хранения летучих лекарственных препаратов, применяемых в анестезии. Как было установлено, дипептид **Ile-Ala** не подходит для этого, так как каналы в его кристаллах слишком малы для эффективного связывания изученных веществ, в то время как его структурный аналог **Ala-Ile** способен эффективно связывать изученные соединения. Изотермы адсорбции паров лекарственных препаратов, полученные исследователями приведены на рис. 19.

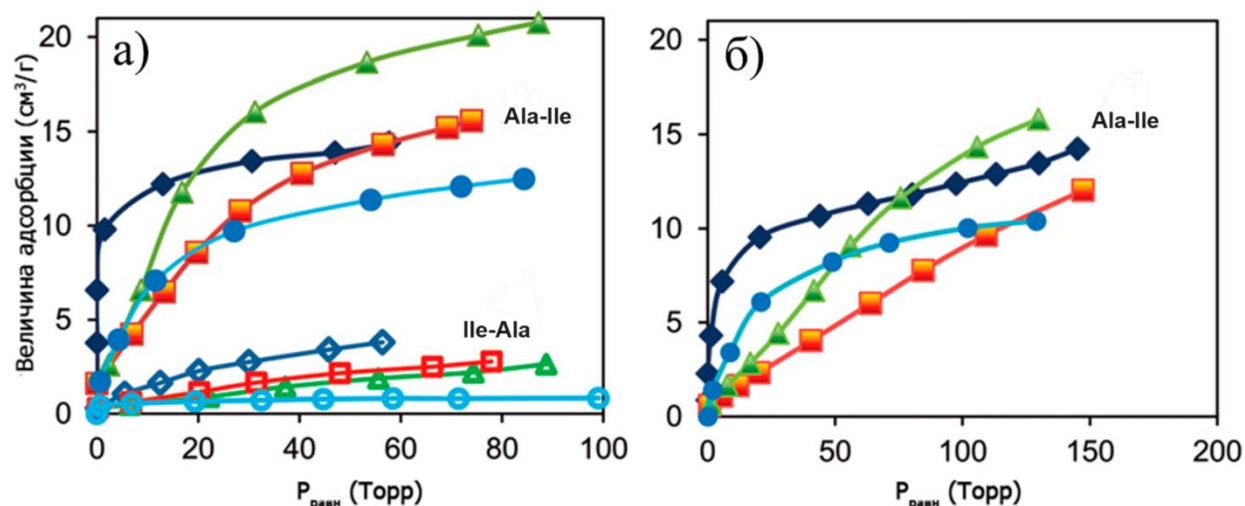


Рисунок 19 – Изотермы адсорбции анестетиков: а) в **Ala-Ile** и **Ile-Ala** при 273 К и б) в **Ala-Ile** при 298 К. Энфлуран (синий ромб), изофлуран (оранжевый квадрат), галотан (зеленый треугольник) и десфлуран (светло-голубой круг). Для **Ile-Ala** фигуры не закрашены, [74].

Пористые кристаллы **Ile-Ala** с малым диаметром каналов могут быть использованы в качестве мембран для опреснения морской воды [75], рис. 20. Было обнаружено, что кристаллы **Ile-Ala** способны задерживать до 90% соли.

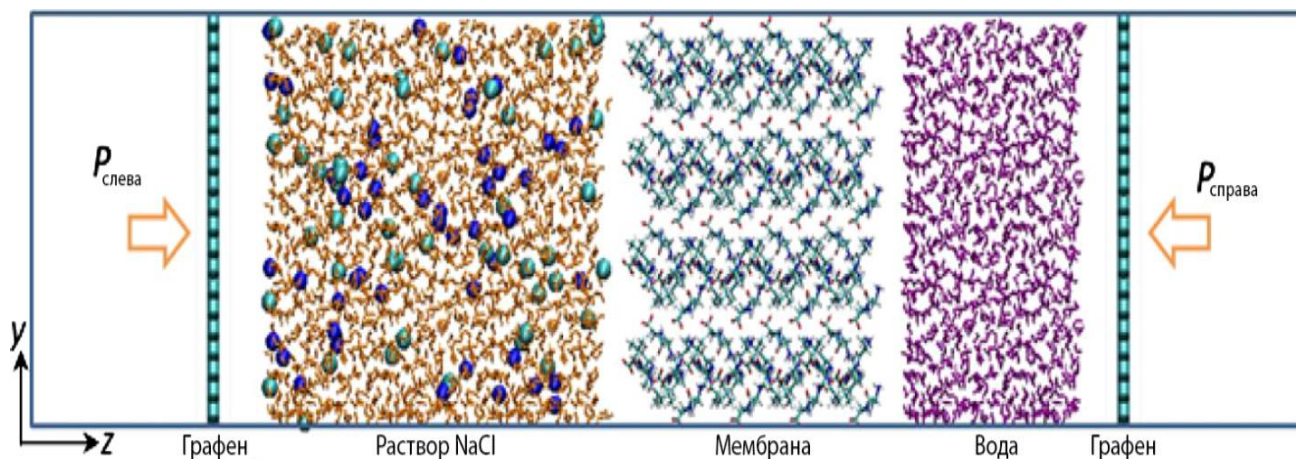


Рисунок 20 – Система опреснения воды с использованием мембраны на основе **Ile-Ala**. Водный раствор 0,5 М NaCl и чистая вода находятся в левой и правой камерах мембраны соответственно. Два слоя графена в двух камерах находятся под давлением $P_{\text{слева}}$ и $P_{\text{справа}}$. Цветом показаны атомы: С - голубой, Н - белый, N - синий, О - красный, Na - синий, Cl - голубой; молекулы воды в левой и правой камерах: оранжевые и фиолетовые, [75].

В исследовании [71] было продемонстрировано, что кристаллы **Ala-Val**, **Val-Ala**, **Ile-Val** и **Val-Ile** могут быть использованы для хранения газов, таких как метан, углекислый газ и водород. Более того, **Ile-Val** демонстрирует значительную селективность по отношению к углекислому газу даже при атмосферном давлении, следовательно, этот кристаллический порошок может найти применение в очистке метана от углекислого газа, рис. 21.

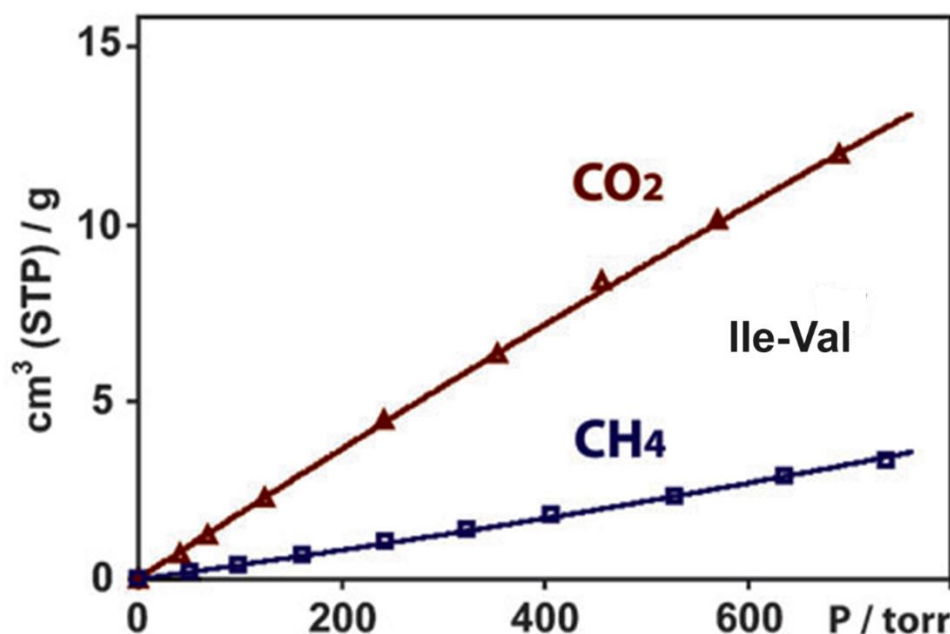


Рисунок 21 – Изотерма адсорбции диоксида углерода и метана на порошке дипептида **Ile-Val**, [71].

Необычные антицеолитные свойства **Leu-Leu**, проявляющиеся в виде увеличения сорбционного объема дипептидной фазы с увеличением размера молекулы сорбата, были обнаружены в работе [14]. Особое поведение дипептида авторы объясняют изменением упаковки его кристаллов, вызванное связыванием органических молекул с размером (молекулярная рефракция) более 18–20 см³/моль, способных образовывать водородные связи с дипептидом.

Вместе с тем, следует отметить, что, хотя в литературе и имеются примеры особенного поведения кристаллов олигопептидов при связывании паров и газов, тем не менее эта область остается малоизученной.

1.7 Молекулярная самосборка и самоорганизация

Молекулы олигопептидов способны формировать упорядоченные структуры в результате самосборки или самоорганизации [76]. Понятия молекулярной самосборки и самоорганизации весьма близки и представляют собой самопроизвольные и обратимые процессы упорядочивания молекул в надмолекулярные структуры за счет внутри- и/или межмолекулярных нековалентных взаимодействий [77-79]. Тем не менее, с точки зрения термодинамики между этими понятиями существует ключевое различие. Самосборка протекает в закрытой системе и приводит к уменьшению свободной энергии системы. В результате самосборки формируются термодинамически равновесные структуры. Самоорганизация, напротив, происходит в неравновесных диссипативных системах.

1.7.1 Межмолекулярные взаимодействия, реализующиеся при самосборке олигопептидов

Самосборка олигопептидов в различные наноструктуры происходит в результате специфических и неспецифических нековалентных взаимодействий, таких как электростатические, вандерваальсовы и гидрофобные силы, π - π стэкинг и водородные связи [77].

Водородная связь является важной движущей силой структурной организации в биологических системах. Энергия водородных связей, как правило, составляет 10-40 кДж/моль на одну связь при 298 К [80]. Олигопептиды в своей структуре содержат аминные, амидные и карбоксильные группы, способные образовывать водородные связи. Надмолекулярные структуры из олигопептидов могут быть сформированы как в результате образования водородных связей между их молекулами, так и вследствие взаимодействия олигопептидов с другими соединениями, в частности, с молекулами растворителя. Благодаря селективности и направленности водородных связей возможна самосборка олигопептидов с образованием одномерных, двумерных и трехмерных наноструктур.

В случае наличия у молекул олигопептидов заряда, между ними возможны электростатические взаимодействия, которые могут способствовать их агрегации [81]. Электростатические силы, основанные на кулоновском взаимодействии между противоположными зарядами, приводят к образованию ионных пар. Энергия данных взаимодействий составляет 50-300 кДж/моль [82].

Если в молекуле олигопептида имеются ароматические боковые группы, значительный вклад в самосборку может вносить π - π стэкинг. Данный вид взаимодействия может вызывать направленный рост наноструктур, а также обеспечивать им устойчивость в воде из-за плохой растворимости молекул, с ароматическими группами. π - π Стэкинг рассматривается как движущая сила самосборки в органических растворителях, таких как толуол. Это объясняется тем, что эффекты растворителя могут сделать π - π стэкинг доминирующим взаимодействием, что было показано в работе [83].

Причиной возникновения сил Ван-дер-Ваальса является флуктуация распределения электронной плотности у двух близко расположенных молекул. Их можно рассматривать как тип мгновенного электростатического взаимодействия с энергией связи порядка 5 кДж/моль [80]. Силы Ван-дер-Ваальса, проявляющиеся как взаимодействие между алифатическими хвостами в пептидных амфифилах, обеспечивают важный вклад в различные нековалентные взаимодействия и повсеместны в реальных системах.

Гидрофобные силы могут проявляться лишь при наличии растворителя – воды. Гидрофобные взаимодействия хорошо известны как одна из движущих сил в системах, содержащих поверхностно-активные вещества. При введении амфифильных молекул в воду гидрофобные части этих молекул агрегируют, минимизируя их площадь соприкосновения с водой, при этом гидрофильные части остаются в контакте с водой. Было обнаружено, что при чистых гидрофобных взаимодействиях пептиды предпочитают ассоциироваться в мицеллы, а не в одномерные нановолокна [84].

Рассмотренные выше взаимодействия по отдельности являются относительно слабыми, но в суммарном действии обеспечивают синергический эффект и могут управлять самосборкой молекулярных строительных блоков с образованием высокоупорядоченных стабильных структур [85].

1.7.2 Термодинамический и кинетический контроль процесса самоассоциации олигопептидов

Термодинамическая устойчивость наноструктур сформированных олигопептидами определяется сочетанием ранее рассмотренных нековалентных взаимодействий. Так как данные взаимодействия относительно слабы, имеется возможность управления самосборкой, варьируя различные кинетические параметры, включая pH, температуру, противоионы, концентрацию и соотношение растворителей. При выбранных кинетических параметрах собранные структуры могут находиться в метастабильных состояниях. Без вмешательства кинетических параметров эти метастабильные структуры, в конце концов, перейдут в термодинамически благоприятное состояние, рис. 22 [86].

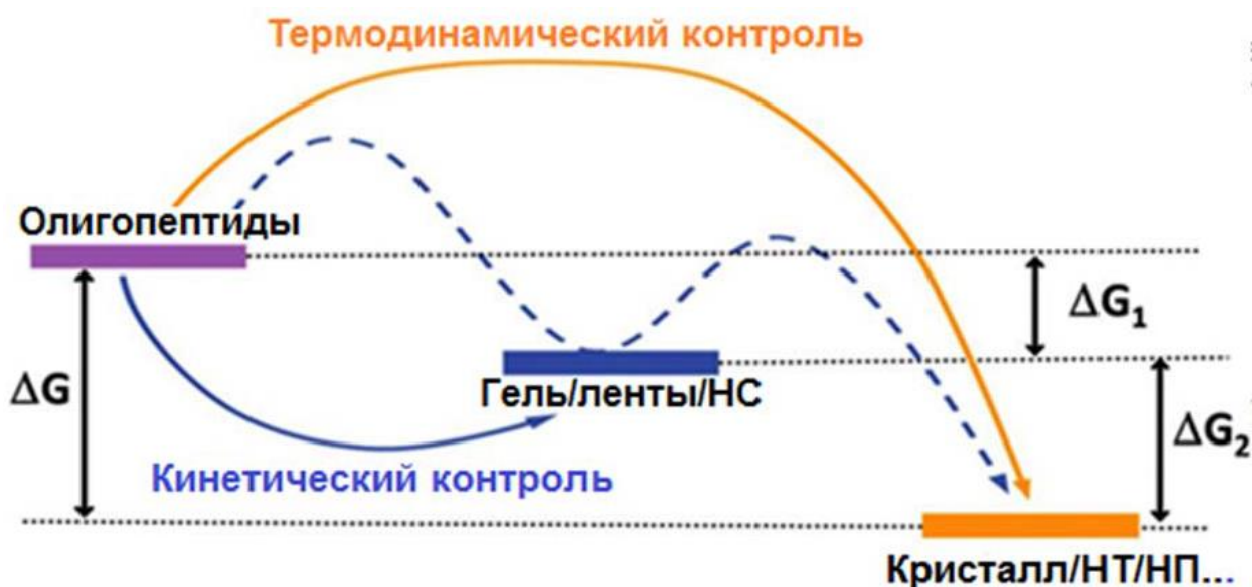


Рисунок 22 – Схематичное изображение результатов самосборки олигопептидов под термодинамическим и кинетическим контролем, [86].

Согласно схеме на рис. 22, в случае термодинамического контроля образующиеся структуры: кристаллы, нанотрубки (НТ) и нанопроволоки (НП), соответствуют минимуму свободной энергии. Если процесс самоорганизации находится под кинетическим контролем (например, в результате изменения рН, температуры), структура может быть «зафиксирована» в метастабильном состоянии, в виде гелей (волокон), наносфер (НС) и нанолент. Возможен переход данных метастабильных структур в термодинамически выгодное состояние.

1.7.3 Факторы, влияющие на самоассоциацию олигопептидов

Олигопептиды, способные к самосборке и самоорганизации, являются привлекательными строительными блоками, на основе которых могут быть получены различные микро- и наноструктуры: нанопроволоки, нанофибриллы, нанотрубки, нановезикулы, упорядоченные молекулярные цепи, гибридные материалы, рис. 23, и прочие структуры [85,87].

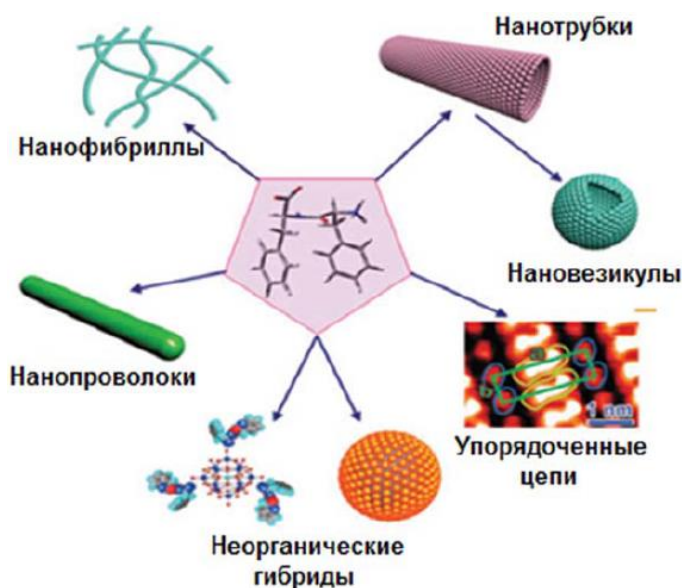


Рисунок 23 – Схематичное изображение наноструктур, которые могут быть получены из дифенилаланина, [85].

Результат самоассоциации олигопептидов зависит от ряда факторов: последовательность [88] и количество [89,90] аминокислотных остатков в составе олигопептида, концентрация олигопептида в растворе, тип и

соотношение растворителей [88,91,92], термическое воздействие [93, 94], вид подложки, на поверхности которой происходит самоорганизация [95], следовые количества второго растворителя [96] и т.д. Тонкий подбор этих факторов позволяет управлять самоорганизацией дипептидов для получения различных микро- и наноструктур со специфическими свойствами.

1.7.3.1 Влияние температуры на самоорганизацию олигопептидов

Температура является одним из параметров, определяющих результат самоорганизации олигопептидов. Повышение температуры может увеличить скорость агрегации молекул олигопептидов [97], инициировать образование микро- и наноструктур на их основе, рис. 24, [104], а также изменять уже существующие структуры [98].

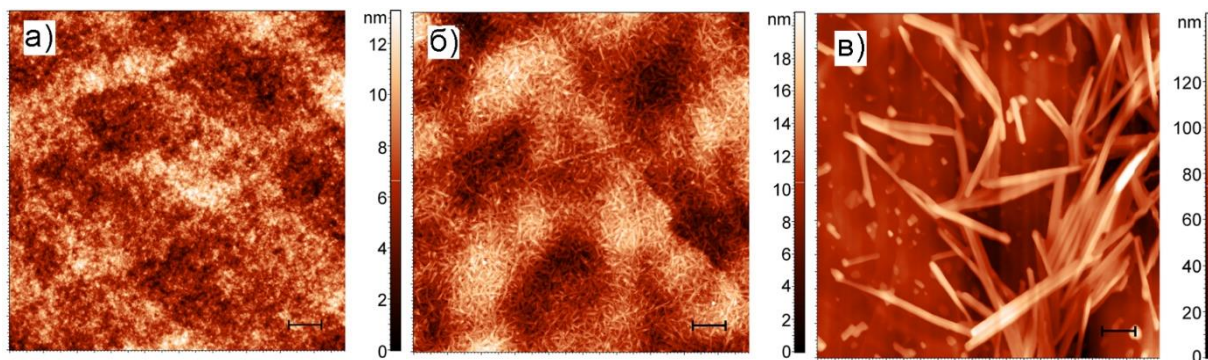


Рисунок 24 – АСМ изображения поверхности а) исходной пленки **Leu-Leu** б) пленки после нагрева до 145 °С, в) пленки **Leu-Leu** после нагрева до 200 °С.

Масштабная линейка = 1 мкм, [104].

При изучении влияния термической обработки на наноструктуры образованные рядом олигопептидов была обнаружена возможность их реорганизации [98]. В результате нагрева нанотрубок из **Phe-Phe** и **Leu-Leu**, а также наносфер из **Phe-Phe-Phe** образуются волокнистые структуры, рис. 25. На основе данных MALDI-TOF масс-спектрометрии (МС), в случае дипептидов реорганизацию наноструктур авторы связывают с термически индуцированной реакцией циклизации в твёрдой фазе, в то время как трипептид испытывает полиморфный переход.

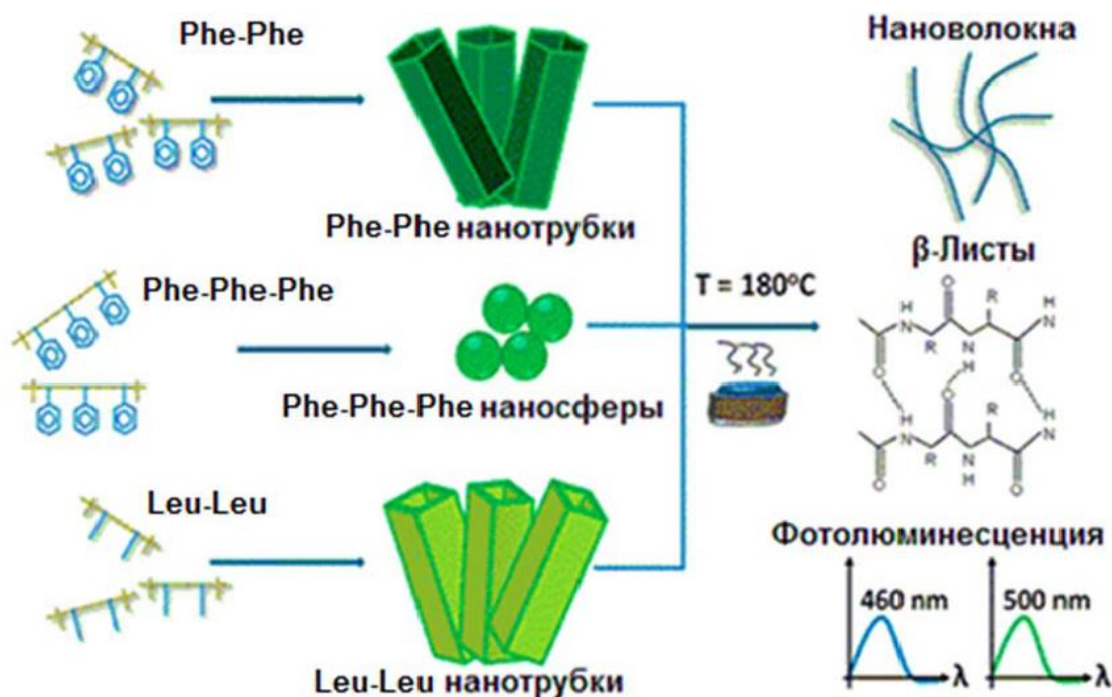


Рисунок 25 – Схема образования наноструктур из олигопептидов, а также их реорганизация при повышенных температурах, [98].

При физическом осаждении из паровой фазы олигопептиды также подвергаются термическому воздействию. Газит (Gazit) и Розенман (Rosenman) впервые получили однородно-плотные массивы вертикально ориентированных НТ **Phe-Phe** на подложке с помощью этого подхода, рис. 26а, [99]. Было установлено, что данные структуры, состоят из *цикло*(**Phe-Phe**), а не из исходного линейного **Phe-Phe**. Времяпролетная спектроскопия вторичных ионов и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) показали, что линейный пептид **Phe-Phe** подвергается циклизации во время процесса осаждения из паровой фазы. В их более поздних работах также была предложена возможная модель физического осаждения **Phe-Phe** [100]. Этот процесс можно разделить на три основных этапа, рис. 26б, (I) сублимация молекул **Phe-Phe** при температуре менее 190 °С. (II) Удаление молекул воды в процессе циклизации и сублимация некоторых оставшихся молекул **Phe-Phe** при температуре от 190°C до 250°C. (III) Сублимация молекул *цикло*(**Phe-Phe**) при температуре от 250°C до 300°C.

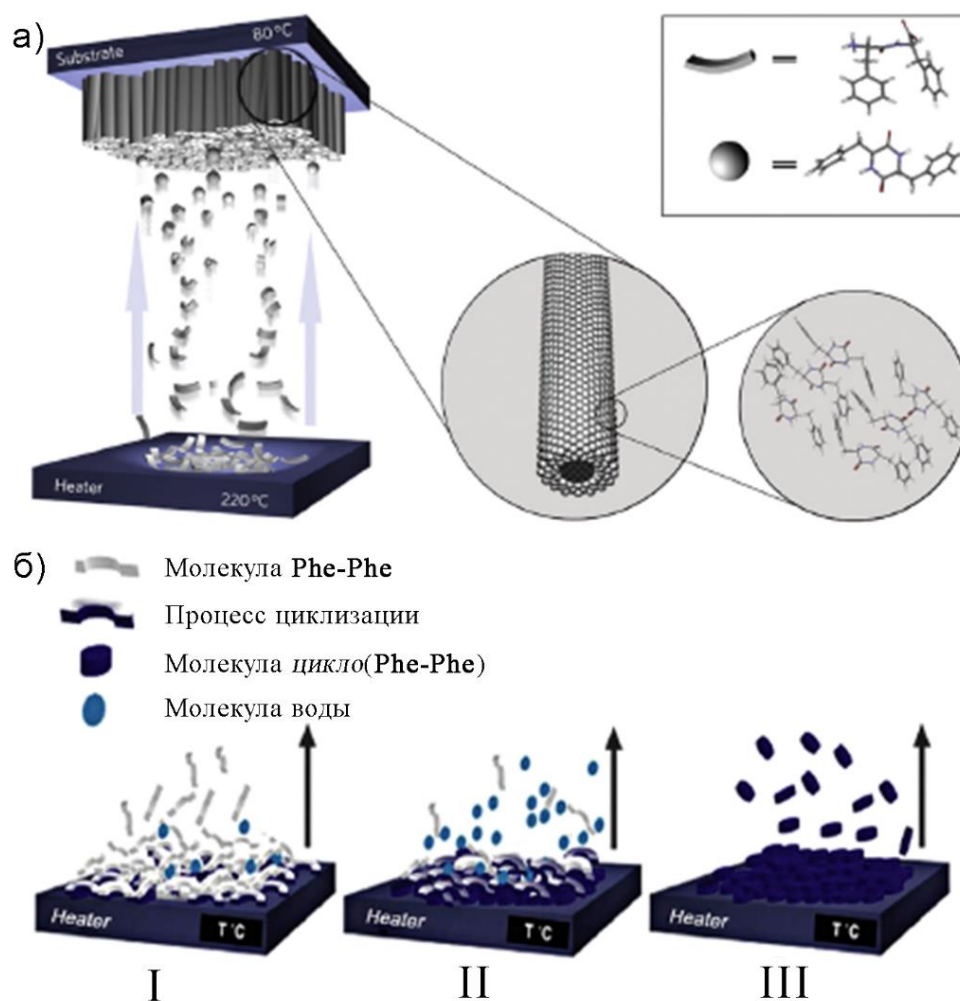


Рисунок 26 – а) Схематическое изображение вертикально выровненных нанотрубок полученных с использованием метода осаждения из паровой фазы, [99], б) Предлагаемый механизм осаждения **Phe-Phe** из паровой фазы, [100].

В литературе имеются примеры применения термического воздействия одновременно с влиянием других факторов. Например, Паркер (Parker) и его коллеги обнаружили, что в результате старения аморфной пленки **Phe-Phe** при температуре 150°C в атмосфере паров анилина, на поверхности кремниевой подложки сформировались ориентированные по вертикали нанопроволоки (НП), рис. 27 а,в, [101].

Было установлено, что температура, используемая для старения, влияет на результаты самосборки дипептида. При 50°C аморфная пленка превратилась в вертикально ориентированные толстые наностержни, а не в НП

в той же атмосфере паров анилина. Кроме того, результат самосборки может быть модифицирован используемым для насыщения растворителем. Когда для старения пленки использовали водяной пар при 25°C, пленка аморфного пептида превратилась в НТ, рис. 27б, [102].

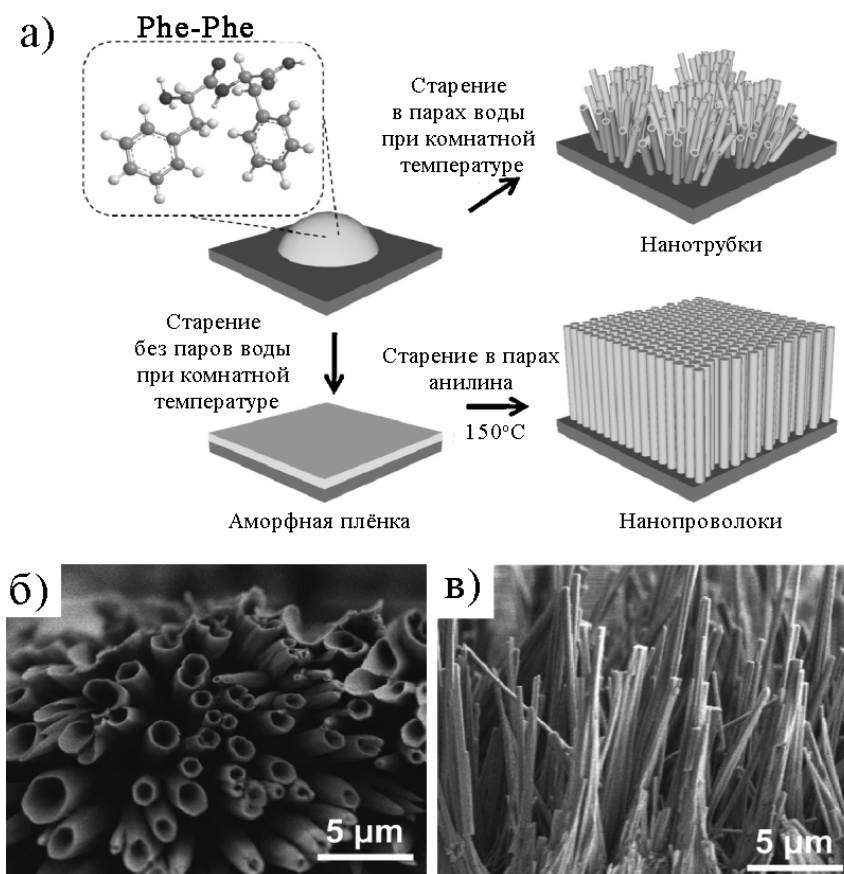


Рисунок 27 – а) Схематическая иллюстрация влияния паров на аморфную плёнку **Phe-Phe**. Нанотрубки были сформированы путем воздействия паров воды. Нанопроволоки (НП) были получены под действием паров анилина. б) изображения НТ полученные методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ); в) СЭМ изображение НП, [102].

Образование нанопроволок в результате старения аморфной плёнки **Phe-Phe** в парах анилина при 150°C Рю (Ryu) и его коллеги связывают с фазовым переходом. Стоит отметить тот факт, что при нагревании данного дипептида выше 147°C протекает реакция его циклизации, следовательно, образуемые структуры состоят из молекул *цикло*(**Phe-Phe**). Согласно масс-спектрам, полученным авторами при помощи метода MALDI-TOF, в случае

исходной плёнки наиболее интенсивный пик соответствует протонированной форме исходного соединения, рис. 28а, [101]. После термической обработки в парах анилина наиболее интенсивный пик, по мнению авторов, соответствует исходной молекуле без -ОН группы, рис. 28б. Более вероятно, что это пик протонированной формы циклического дипептида, образовавшегося в результате твердофазной реакции циклизации при нагревании исходного **Phe-Phe**.

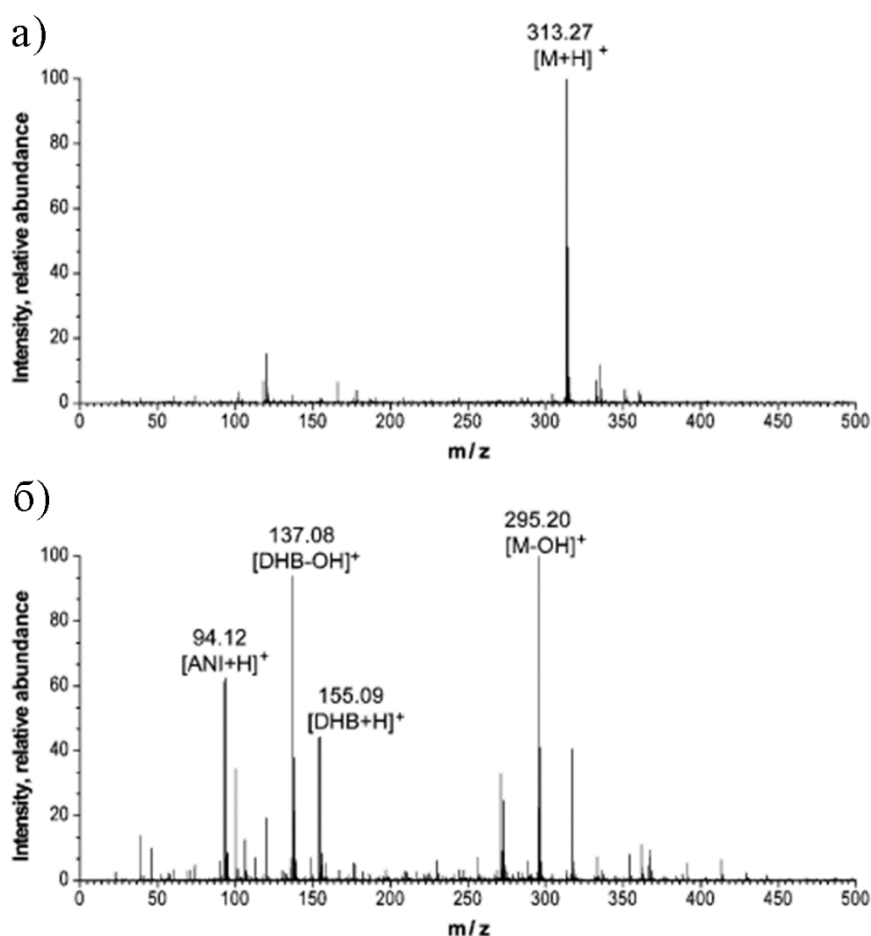


Рисунок 28 – Масс-спектры, полученные методом MALDI-TOF для а) исходной плёнки, б) плёнки после термической обработки, [101].

При изучении устойчивости НТ и НП, полученных при 25°C и 150°C в парах воды и анилина соответственно, к воздействию ферментов, Рю (Ryu) с коллегами обнаружил, что НП не подвергаются ферментативному протеолизу в отличие от НТ [102]. Также НП оказались устойчивы к различным рН среды и растворителям. Данный факт авторы связали с различной конформацией

молекул входящих в состав данных структур. Однако более логичным является озвученное выше предположение о циклизации **Phe-Phe** при нагреве до 150°C. Таким образом, НТ состоят из линейного дипептида, а НП из циклического, поскольку известно, что циклические дипептиды обладают большей протеолитической стабильностью [37].

Таким образом, формирование наноструктур на основе дипептидов в результате термической обработки может быть связано как с полиморфным переходом исходных молекул, так и с внутримолекулярной химической реакцией циклизации. В результате реакции образуются иные химические соединения с другими физическими и химическими свойствами. Это ещё раз подчёркивает актуальность изучения термических свойств дипептидов с целью определения критических температур, выше которых процессы самоорганизации исходных молекул переходят в химическую реакцию.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Объекты исследования

В качестве объектов настоящего исследования были использованы олигопептиды глицил-глицин (**Gly-Gly**), *L*-изолейцил-*L*-аланин (**Ile-Ala**), *L*-аланил-*L*-изолейцин (**Ala-Ile**), *L*-лейцил-*L*-валин (**Leu-Val**), *L*-лейцил-*L*-фенилаланин (**Leu-Phe**), *L*-фенилаланил-*L*-лейцин (**Phe-Leu**) и *L*-лейцил-*L*-лейцил-*L*-лейцин (**Leu-Leu-Leu, LLL**), рис. 29.

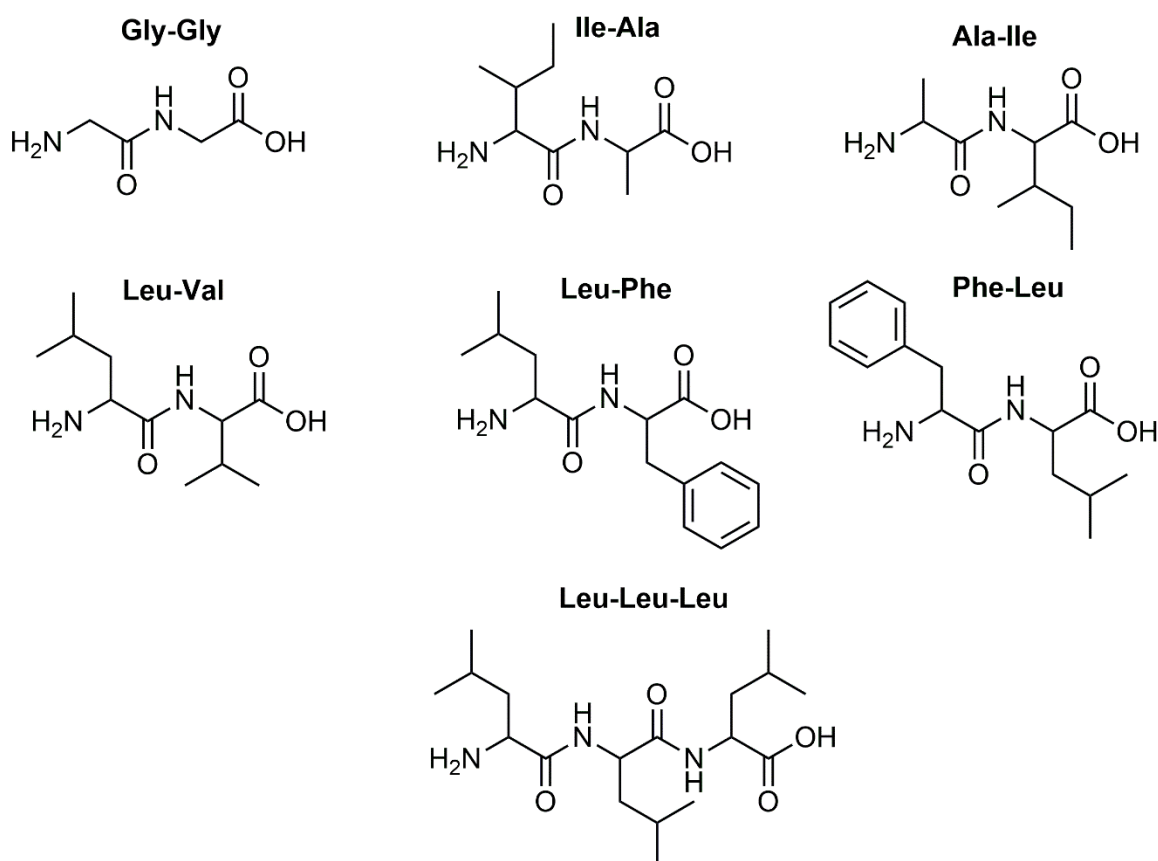


Рисунок 29 – Структурные формулы олигопептидов в молекулярной форме.

Олигопептиды (Bachem, Chem-Impex) использовались без предварительной очистки. Был использован *цикло*(**Gly-Gly**) (Acros Organics Lot#: A0295611). Содержание основного вещества в органическом соединении, по результатам газохроматографического анализа, было не менее 99,5%. Органические растворители (ООО «ЭКРОСХИМ» Россия),

использованные для получения клатратов, содержали не более 0,5% примесей и соответствовали степени чистоты «Для ГХ анализа».

2.2 Совмещённый ТГ/ДСК/МС анализ

Совмещённый метод термогравиметрии (ТГ) и дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) с масс-спектрометрическим (МС) анализом выделяющегося газа проводили с использованием термоанализатора STA 449 C Jupiter (Netzsch) в сочетании с квадрупольным масс-спектрометром QMS 403C Aeolos (Netzsch). Анализ проводился в алюминиевом тигле (40 мкл) с крышкой, имеющей три отверстия диаметром по 0,5 мм, при постоянной скорости нагрева 10 К/мин в динамической атмосфере аргона при скорости потока 75 мл/мин в диапазоне температур 30-300°C для дипептидов и 30-200°C для трипептида и его клатратов, а также при скоростях нагрева 2, 5, 10, 15 К/мин в диапазоне температур 30-300°C (**Gly-Gly**), 30-240°C (**Ile-Ala**), 30-180°C (**Leu-Phe**) и 30-200°C (**Phe-Leu**). Для дипептидов **Ala-Ile** и **Leu-Val** были использованы скорости нагрева 5, 10, 15, 20, 25 К/мин и 0,5, 1, 2, 5 К/мин, температурные интервалы 30-270°C и 30-250°C. Дипептиды **Leu-Val**, **Leu-Phe** и **Phe-Leu** были предварительно осушены, термический анализ проводили в диапазоне температур 30-250°C, 30-180°C и 30-200°C соответственно. Для осушки **Leu-Val**, **Leu-Phe** и **Phe-Leu** были нагреты со скоростью 1,5 К/мин до температуры 110°C и выдержаны при этой температуре в течение 15 (**Leu-Val** и **Leu-Phe**) и 30 (**Phe-Leu**) минут. Температура линии передающей газы, выделившиеся из образцов при нагревании в масс-спектрометр, составляла 250°C. Температуру начала реакции определяли по ТГ кривой, полученной при скорости нагрева 10 К/мин. Все расчеты потери массы, температуры и энтальпии были выполнены с использованием программного обеспечения Netzsch Proteus Thermal Analysis 5.2.1. Перед каждым измерением снималась базовая линия в тех же экспериментальных условиях. STA 449 C Jupiter был откалиброван в соответствии с рекомендациями производителя с использованием шести веществ (KNO₃, CsCl, Sn, Bi, In, Zn). Каждое значение (температура и площадь пика) определялась трижды. Используя среднее

значение, были построены калибровочные кривые. Погрешности определения температуры и энтальпии, составили 0,1 К и 3% соответственно.

2.3 Приготовление клатратов трипептида лейцил-лейцил-лейцин

Трипептид **LLL** предварительно осушался при 150°C в вакууме при остаточном давлении не более 1 кПа в течение 4 часов. Предварительная осушка необходима для удаления гидратной воды. Образцы олигопептида массой около 10 мг помещались в стеклянные ампулы объемом 15 мл и насыщались парами органических соединений в течение 72 часов при 25°C в герметично закрытых стальных патронах. Органические растворители дозировались в небольшие отдельные ампулы, помещенные внутрь стеклянной емкости с навеской олигопептида. Таким образом, органические «гости» взаимодействовали с порошком рецептора исключительно из газовой фазы. Растворитель дозировался в достаточном количестве для получения его насыщенного пара ($P/P_0 = 1$) в системе.

2.4 Дифференциальная сканирующая калориметрия

ДСК эксперименты проводили с использованием дифференциального сканирующего калориметра DSC204 F1 Phoenix (Netzsch, Германия). Навеску образца массой 4 мг помещали в стандартный алюминиевый тигель объемом 40 мкл, закрывающийся крышкой с диаметром отверстия 0,07 мм. Эксперименты проводились в атмосфере аргона 150 мл/мин при скорости нагрева 10 К/мин в интервале температур от 30°C до 300°C. ДСК калибровали в соответствии с рекомендациями производителя путем измерения шести стандартных соединений (Hg, In, Sn, Bi, Zn и CsCl). Каждое значение (температура и площадь пика) определялась трижды. Используя среднее значение, были построены калибровочные кривые. Погрешности определения температуры и энтальпии, составили 0,1 К и 1% соответственно.

2.5 ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопия

ЯМР спектры регистрировали на спектрометре Bruker Avance III 400. ^1H ЯМР (400 МГц, диметилсульфоксид (ДМСО)- d_6 (метанол- d_4 для **Leu-Val**), 25°C). ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ ЯМР (100,6 МГц, ДМСО- d_6 (метанол- d_4 для **Leu-Val**), 25°C).

Использовали растворы циклических дипептидов концентрацией 6 мг/мл (*цикло*(**Gly-Gly**)), 16,8 мг/мл (*цикло*(**Ile-Ala**)), 3 мг/мл (*цикло*(**Ala-Ile**)), 3 мг/мл (*цикло*(**Leu-Val**)), 5,6 мг/мл (*цикло*(**Leu-Phe**)) и 5 мг/мл (*цикло*(**Phe-Leu**)).

Для определения состава клатрата **LLL** с бензолом, полученного насыщением кристаллов парами «гостя» с термодинамической активностью $P/P_0=1$, был использован метод ^1H ЯМР-спектроскопии. ЯМР-спектр был получен с помощью ЯМР-спектрометра Avance III 400-MHz (Bruker). Образец **LLL** массой 4,9 мг, насыщенный парами бензола, был растворен в 0,4 мл метанола- d_4 . Затем к полученному раствору было добавлено 5 мкл ацетона в качестве стандарта. Содержание бензола в образце было определено по интегральной величине пиков, один из которых соответствовал бензолу (7.33 ppm), а другой – ацетону (2.16 ppm).

2.6 Инфракрасная (ИК) спектроскопия с Фурье-преобразованием

ИК-спектры порошков дипептидов были получены при помощи спектрометра Bruker Vertex 70 FTIR с однократным отражением, с приставкой ATR с кристаллом германия (MIRacle, PIKE Technologies) с разрешением 2 см^{-1} на сухом воздухе. Все данные были собраны при 25°C . В случае дипептидов **Leu-Phe** и **Phe-Leu** также были получены ИК-спектры аморфной и кристаллической плёнок. Аморфная пленка дипептидов была получена из раствора в гексафторизопропанолe (ГФИП) с концентрацией 2 мг/мл путём нанесения 30-40 доз раствора по 10 мкл на поверхность стекла (CaF_2) при температуре 58°C . Для получения кристаллов дипептидов их аморфные пленки выдерживались в парах воды с термодинамической активностью $P/P_0=1$ в течение 3 часов. После обработки плёнки покрывались сверху вторым стеклом и снимались на просвет. Также были получены ИК-спектры плёнок **Leu-Phe** и **Phe-Leu** при различных температурах. Нагрев производился при помощи печи непосредственно в ИК спектрометре с выдерживанием в течение нескольких минут при заданной температуре для термостабилизации.

2.7 Газовая хроматография (ГХ) с масс-спектрометрией (МС)

В работе была использована система ГХ-МС, состоящая из газового хроматографа Chromatec-Crystal 5000 (Россия) с капиллярной колонкой 30 м, 0,25 мм, и масс-спектрометрического детектора ISQ (Thermo Fisher Scientific). Данные собирались в диапазоне массовых чисел m/z 0-600 при следующих условиях: газ-носитель – гелий (скорость подачи 1 мл/мин), порт инъекции нагревался до 310°C, температурные программы: от 100°C до 150°C при 12°C/мин, от 150°C до 300°C при 3°C/мин, электронная ионизация с энергией 70 эВ. Использовали растворы *цикло(Ile-Ala)* и *цикло(Ala-Ile)* в метаноле с концентрациями 3,5 мг/мл и 1 мг/мл соответственно, *цикло(Leu-Phe)* и *цикло(Phe-Leu)* в ГФИП с концентрацией 2 мг/мл.

2.8 Масс-спектрометрия с электроспреем

Масс-спектрометрия (ESI-MS) с электроспреем осуществлялась на масс-спектрометре с ионной ловушкой AmazonX (Bruker Daltonik GmbH, Германия) в положительном режиме в диапазоне масс от 70 до 2700. Напряжение на капилляре составляло -3500 В; использовали газ-осушитель азот (250°C) с расходом 10 л/мин. В качестве подвижной фазы использовали 0,1% раствор муравьиной кислоты со скоростью потока 0,4 мл/мин (для *цикло(Leu-Phe)* и *цикло(Phe-Leu)*) и раствор метанол/вода (70:30) со скоростью потока 0,2 мл/мин (*цикло(Ile-Ala)*) (хроматограф Agilent 1260, США). Прибор калибровали настроечной смесью (Agilent G2431A, США). Для управления прибором и сбора данных использовали программу TrapControl 7.0 (Bruker Daltonik GmbH, Германия). Обработку данных проводили с помощью программы DataAnalysis 4.0 SP4 (Bruker Daltonik GmbH, Германия). Образец (20 мкл) вводили в масс-спектрометр через инжектор Rheodyne 7725 (Rheodyne, США).

2.9 MALDI TOF масс-спектрометрия

Масс-спектры МАЛДИ регистрировали на масс-спектрометре Ultraflex III TOF/TOF (Bruker Daltonik GmbH, Германия), работающем в линейном режиме с регистрацией положительно или отрицательно заряженных ионов. Использовался Nd:YAG-лазер ($\lambda = 355$ нм, частота повторения 100 Гц). Масс-

спектр получали при ускоряющем напряжении 20 кВ и времени задержки вывода ионов 30 нс. Результирующий масс-спектр формировался за счет многократного лазерного облучения кристалла (50 выстрелов). Использовалась металлическая мишень MTP AnchorChip™. На мишень последовательно наносили порции (0,5 мкл) 1%-го раствора матрицы в ацетонитриле и 0,1%-ного раствора образца в ДМСО и упаривали. В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксibenзойную кислоту (ДГБ). Полиэтиленгликоль использовали для калибровки весов устройства. Данные получены с помощью программы FlexControl (Bruker Daltonik GmbH, Германия) и обработаны с помощью программы FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonik GmbH, Германия).

2.10 Спектроскопия кругового дихроизма

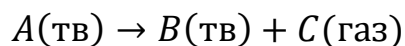
Спектры кругового дихроизма (КД) были получены с помощью спектрометра Jasco J-1500 CD (Jasco, Япония) при 298 К для растворов *цикло(Leu-Phe)* (0,007 мг/мл), *цикло(Phe-Leu)* (0,007 мг/мл) в ГФИП. Спектры КД регистрировали при комнатной температуре в дальнем УФ-диапазоне между 190 и 250 нм. Для каждого образца было получено не менее трех спектров со скоростью сканирования 50 нм/мин, шириной полосы 2 нм и шагом 1 нм.

2.11 Хирально-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

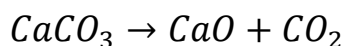
Продукты нагревания **Leu-Phe** и **Phe-Leu** были проанализированы методом хирально-фазовой ВЭЖХ на колонке Chiralcel OD-H (5 мкм; 4,6 × 250 мм; Daicel Chemical Industries, Франция) в изократических условиях с использованием смеси растворителей метанол/вода 80:20 (по объему) при скорости потока 0,2 мл/мин. Детектирование осуществляли с помощью диодно-матричного детектора Shimadzu SPD-M20A (Shimadzu, Киото, Япония).

2.11 Методология изучения топохимических реакций с участием дипептидов

Топохимические реакции – это реакции, которые происходят на поверхности раздела двух твердых фаз: исходного вещества и продукта [83]. Например, к топахимическим реакциям относят реакции разложения твердых веществ:



В качестве примера подобной реакции можно привести обжиг извести:



Для топахимических реакций классическое определение скорости реакции не подходит, так как процесс происходит не в объеме, а на поверхности раздела фаз. В связи с этим скорость реакции v принимается как изменение степени конверсии α в единицу времени t :

$$v = \frac{d\alpha}{dt} \quad (1)$$

Степень конверсии является величиной характеризующей прогресс реакции. $\alpha=0$ до начала реакции и $\alpha=1$, когда процесс завершился. Саму величину α можно выразить, к примеру, через массы веществ:

$$\alpha = \frac{m_0 - m}{m_0 - m_k} \quad (2)$$

где m_0 и m_k начальные и конечные массы соответственно.

Обобщенные кривые характерные для разложения твердых веществ приведены на рис. 30. Сплошная кривая представляет собой зависимость степени конверсии от времени. На данной кривой присутствуют следующие сегменты: 1 – как правило, связан с десорбцией газа на поверхности образца; 2 – период индукции; 3 – участок ускорения до точки перегиба; 4 – замедление реакции. Пунктирная линия демонстрирует зависимость скорости конверсии от времени. В некоторых случаях часть сегментов на данной кривой может отсутствовать.

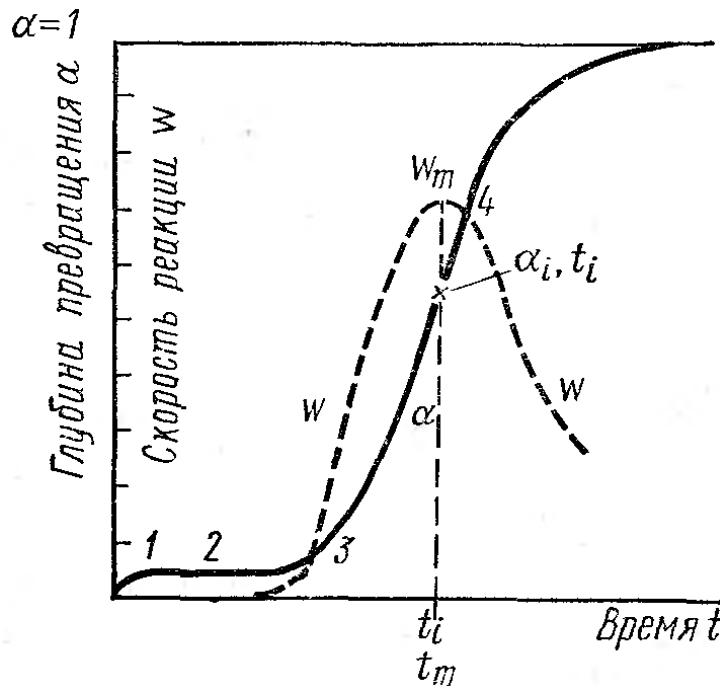


Рисунок 30 – Обобщенные кинетические кривые топомимических реакций.

Сплошная кривая – зависимость степени превращения от времени,
пунктирная кривая – зависимость скорости реакции от времени, [103].

При топомимических реакциях превращение начинается в начальных центрах реакции (зародышах ядер), которые представляют собой различные дефекты кристалла и обладают повышенной свободной энергией. Схема распространения реакции в твердом теле представлена на рис. 31.



Рисунок 31 – Развитие и слияние сферических ядер продукта при топомимической реакции, [103].

Вокруг начальных центров реакции начинается рост сферических ядер. С ростом ядер поверхность раздела между исходным веществом и продуктом

реакции увеличивается, что приводит к ускорению реакции. В момент слияния ядер скорость достигает своего максимума, затем происходит замедление. Однако, в случае если удельные объемы исходного вещества и продукта реакции сильно отличаются, процесс может усложниться в связи с растрескиванием кристалла.

Также существует модель линейных разветвленных цепей, согласно которой реакция начинается на поверхности и из различных точек происходит рост нитей продукта. В местах разрыва кристаллической упаковки нить разветвляется и образует объемное ядро реакции.

Кинетика топохимических реакций зависит от ряда причин, которые не всегда возможно учесть, поэтому методы классического кинетического анализа не подходят для исследования подобных реакций. При изучении подобных процессов успешно применяются методы изоконверсионной кинетики [13,104].

2.11.1 Изоконверсионные методы

Скорость многих термически индуцированных процессов может быть представлена в виде:

$$\frac{d\alpha}{dt} = k(T)f(\alpha) \quad (3)$$

где t – время, T – температура, α – степень конверсии, $f(\alpha)$ – модель реакции и $k(T)$ – константа скорости. Последнюю величину обычно выражают через уравнение Аррениуса:

$$k(T) = A \exp\left(-\frac{E}{RT}\right) \quad (4)$$

где A – предэкспоненциальный множитель, E – энергия активации и R – универсальная газовая константа. Подставляя уравнение 4 в 3, получаем:

$$\frac{d\alpha}{dt} = A \exp\left(-\frac{E}{RT}\right) f(\alpha) \quad (5)$$

Все изоконверсионные методы берут свое начало в изоконверсионном принципе, согласно которому скорость реакции при постоянной степени

превращения зависит только от температуры [105]. Это легко показать, взяв производную от логарифма скорости реакции (уравнение 3) при $\alpha = \text{const}$:

$$\left[\frac{\partial \ln \left(\frac{d\alpha}{dt} \right)}{\partial T^{-1}} \right]_{\alpha} = \left[\frac{\partial \ln k(T)}{\partial T^{-1}} \right]_{\alpha} + \left[\frac{\partial \ln f(\alpha)}{\partial T^{-1}} \right]_{\alpha} \quad (6)$$

где нижний индекс α указывает изоконверсионные значения, т.е. значения, относящиеся к данной степени конверсии. Поскольку при $\alpha = \text{const}$, $f(\alpha)$ также постоянна, то второй член в правой части уравнения 6 равен нулю. Таким образом:

$$\left[\frac{\partial \ln \left(\frac{d\alpha}{dt} \right)}{\partial T^{-1}} \right]_{\alpha} = -\frac{E_{\alpha}}{R} \quad (7)$$

Из данного уравнения следует, что температурная зависимость изоконверсионной скорости может быть использована для оценки изоконверсионных значений энергии активации E_{α} без использования или определения какой-либо конкретной формы модели реакции. По этой причине изоконверсионные методы часто называют «безмодельными». Однако, не следует воспринимать этот термин буквально. Хотя методы не требуют определения модели реакции, они предполагают, что зависимость скорости реакции от степени конверсии подчиняется некоторой модели $f(\alpha)$.

Для получения температурной зависимости скорости изоконверсии необходимо провести серию опытов с различными температурными программами. Обычно это серия из 3–5 измерений с разной скоростью нагрева или серия измерений при разных постоянных температурах. Рекомендуется определять значения E_{α} в широком диапазоне $\alpha = 0,05$ – $0,95$ с шагом не более $0,05$. Зависимость E_{α} от α важна для обнаружения и обработки многоступенчатой кинетики. Значительное изменение E_{α} в зависимости от α свидетельствует о том, что процесс является кинетически сложным, т. е. к нему нельзя применить одностадийное уравнение скорости для описания кинетики такого процесса на всем диапазоне экспериментальных конверсий и

температур. Следует обратить внимание, что в случае многостадийного процесса также возможно применение изоконверсионного принципа, хотя последний соблюдается строго для одностадийного процесса. Этот принцип продолжает работать в качестве разумного приближения, поскольку изоконверсионные методы описывают кинетику процесса с помощью нескольких одностадийных кинетических уравнений, каждое из которых связано с определенной степенью конверсии и узким диапазоном температур, связанным с этой конверсией, рис. 32. На самом деле, зависимости E_α , оцененные изоконверсионным методом, позволяют проводить осмысленный механистический и кинетический анализ, а также надежные кинетические прогнозы [106,107].

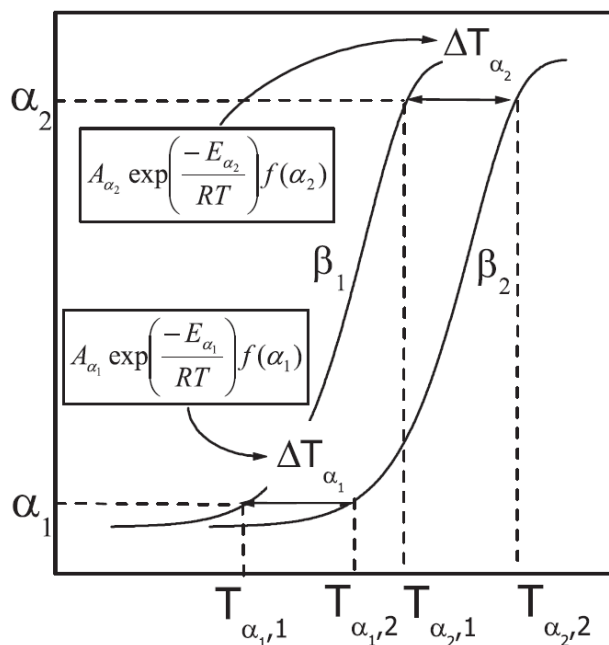


Рисунок 32 – Каждое одностадийное уравнение скорости связано с одним значением α и связанной с ним узкой температурной областью ΔT , [105].

Изоконверсионный принцип лежит в основе большого числа изоконверсионных вычислительных методов. Обычно их можно разделить на две категории: дифференциальные и интегральные. Некоторые из наиболее популярных методов из этих двух категорий обсуждаются в следующих двух разделах.

2.11.2 Дифференциальные изоконверсионные методы

Наиболее распространенным дифференциальным изоконверсионным методом является метод Фридмана [108]. Метод основан на следующем уравнении:

$$\ln \left(\frac{d\alpha}{dt} \right)_{\alpha,i} = \ln[f(\alpha)A_{\alpha}] - \frac{E_{\alpha}}{RT_{\alpha,i}} \quad (8)$$

Уравнение 8 можно легко получить, применив изоконверсионный принцип к уравнению 5. При каждом заданном α по наклону графика зависимости $\ln(d\alpha/dt)_{\alpha,i}$ от $1/T_{\alpha,i}$ определяется значение E_{α} . Индекс i введен для обозначения различных температурных программ. $T_{\alpha,i}$ – температура, при которой достигается степень конверсии α по i -й температурной программе. Для изотермических программ i определяет индивидуальную температуру. Для линейных неизотермических программ i определяет индивидуальную скорость нагрева. В последнем случае уравнение 8 часто используется в следующем виде:

$$\ln \left[\beta_i \left(\frac{d\alpha}{dt} \right)_{\alpha,i} \right] = \ln[f(\alpha)A_{\alpha}] - \frac{E_{\alpha}}{RT_{\alpha,i}} \quad (9)$$

В полученном уравнении 9 полагается, что $T_{\alpha,i}$ линейно изменяется во времени в соответствии со скоростью нагрева β_i .

Поскольку дифференциальные изоконверсионные методы не используют никаких приближений, они потенциально более точны, чем интегральные методы, рассматриваемые в следующем разделе. Однако практическое использование дифференциальных методов неизбежно связано с определенными неточностями. Во-первых, когда методы применяются к дифференциальным данным, таким как ДСК и ДТА, могут быть внесены значительные неточности в значения скорости из-за сложности определения базовой линии [109]. Неточности возникают и тогда, когда теплота реакции обнаруживает заметную зависимость от скорости нагрева [110]. Применение дифференциальных методов к интегральным данным (например, ТГА) требует использования численного дифференцирования, которое вносит неточность

(шум) в данные скорости, а также может внести неточность при сглаживании зашумленных данных. Имея в виду эти недостатки, дифференциальные методы не всегда являются более точными, чем интегральные методы.

2.11.3 Интегральные изоконверсионные методы

Интегральные изоконверсионные методы возникли в результате применения изоконверсионного принципа к интегралу от уравнения 5.

$$g(\alpha) \equiv \int_0^\alpha \frac{d\alpha}{f(\alpha)} = A \int_0^t \exp\left(-\frac{E}{RT}\right) dt \quad (10)$$

Интеграл в уравнении 10 не имеет аналитического решения для произвольной температурной программы. Однако аналитическое решение можно получить для изотермической температурной программы:

$$g(\alpha) = A \exp\left(\frac{-E}{RT}\right) t \quad (11)$$

Перестановка с последующим применением изоконверсионного принципа приводит к уравнению 12:

$$\ln t_{\alpha,i} = \ln \left[\frac{g(\alpha)}{A_\alpha} \right] + \frac{E_\alpha}{RT_i} \quad (12)$$

где $t_{\alpha,i}$ – время достижения заданной степени превращения при различных температурах T_i . Это уравнение интегрального изоконверсионного метода для изотермических условий. Значение E_α определяется по наклону графика $\ln t_{\alpha,i}$ в зависимости от $1/T_i$.

Для обычно используемой программы с постоянной скоростью нагрева уравнение 10 превращается в уравнение 13:

$$g(\alpha) = \frac{A}{\beta} \int_0^T \exp\left(\frac{-E}{RT}\right) dT \quad (13)$$

Данное уравнение не имеет аналитического решения. По этой причине существует ряд интегральных изоконверсионных методов, которые различаются аппроксимацией температурного интеграла в уравнении 13. Многие из этих приближений приводят к линейным уравнениям общего вида [109]:

$$\ln\left(\frac{\beta_i}{T_{\alpha,i}^B}\right) = Const - C\left(\frac{E_\alpha}{RT_\alpha}\right) \quad (14)$$

где B и C — параметры, определяемые типом приближения температурного интеграла. Например, очень грубое приближение Дойла [111] дает $B = 0$ и $C = 1,052$, так что уравнение 14 принимает форму, известную также как уравнение Озавы [112] и/или Флинна и Уолла [113]:

$$\ln(\beta_i) = Const - 1.052\left(\frac{E_\alpha}{RT_\alpha}\right) \quad (15)$$

Грубое приближение температурного интеграла приводит к неточным значениям E_α . Более точное приближение Мюррея и Уайта приводит к $B = 2$ и $C = 1$, в результате которого образуется другое популярное уравнение, которое часто называют уравнением Киссинджера–Акахиры–Суноза [114]:

$$\ln\left(\frac{\beta_i}{T_{\alpha,i}^2}\right) = Const - \frac{E_\alpha}{RT_\alpha} \quad (16)$$

По сравнению с методом Озавы–Флинна–Уолла метод Киссинджера–Акахиры–Сунозы предлагает значительное улучшение точности в определении значений E_α . Как показал Старинк [109], несколько более точные оценки E_α достигаются при установке $B = 1,92$ и $C = 1,0008$, так что уравнение 14 превращается в:

$$\ln\left(\frac{\beta_i}{T_{\alpha,i}^{1.92}}\right) = Const - 1.0008\left(\frac{E_\alpha}{RT_\alpha}\right) \quad (17)$$

Поскольку вышеупомянутые уравнения 14–17 одинаково легко решить с помощью линейного регрессионного анализа, рекомендуется использовать более точные уравнения, такие как 16 и 17. Не рекомендуется использовать более одной формы уравнения 14. Одновременное использование двух и более таких уравнений выявляет лишь тривиальную разницу в значениях E_α , вычисленных методами разной точности. Поскольку такое сравнение не дает кинетической информации, практику одновременного использования уравнений 14–17 следует исключить в пользу использования только одного более точного уравнения.

2.11.4 Модельные методы

Модельные методы позволяют получить кинетические параметры, связанные с конкретной моделью реакции, которая, как предполагается, представляет зависимость скорости реакции от степени конверсии. Интегральная и дифференциальная формы модели реакции используются в уравнениях 4 и 10 для данных о скорости и степени конверсии соответственно. Некоторые распространенные кинетические модели перечислены в таблице 3.

Таблица 3 – Некоторые кинетические модели, используемые в твердофазной кинетике, [105].

Реакционная модель	Код	$f(\alpha)$
Реакция первого порядка	F1	c
Реакция второго порядка	F2	c^2
Реакция n-го порядка	Fn	c^n
Двумерная фазовая граница	R2	$2c^{1/2}$
Трехмерная фазовая граница	R3	$3c^{2/3}$
Одномерная диффузия	D1	$0,5/p$
Двумерная диффузия	D2	$-1/\ln(c)$
Трехмерная диффузия	D3	$1,5c^{2/3}/(1 - c^{1/3})$
Уравнение Праута-Томпкинса	B1	cp
Расширенное уравнение Праута-Томпкинса	Bna	$c^n \times p^a$
Уравнение первого порядка с автокатализом по продукту X	C1-X	$c \times (1 + Kcat \times X)$
Уравнение n-го порядка с автокатализом по продукту X	Cn-X	$c^n \times (1 + Kcat \times X)$

Существует множество способов подбора модели. Все они предполагают минимизацию разницы между экспериментально измеренными и расчетными данными по скорости реакции. Данные могут быть изотермическими, с постоянной скоростью нагрева или их смесью. Минимизация может быть достигнута с использованием методов линейной или нелинейной регрессии. Ключевое различие между линейными и нелинейными методами заключается в том, что для линейных методов не требуется начальная оценка A и E , в то время как для нелинейных методов она требуется. Следовательно, даже несмотря на то, что нелинейные методы во многих отношениях превосходят

линейные, они значительно выигрывают от первоначальных оценок, обеспечиваемых линейными методами.

Очень важно понимать, что методы подбора модели существенно различаются по своей надежности. В частности, известно, что подбор модели на основе одной скорости нагрева ненадежен [115]. С другой стороны, кинетическое исследование ICTAC [116] показало, что методы подбора моделей могут быть такими же надежными, как и изоконверсионные методы без моделей, если модели подбираются одновременно ко множеству наборов данных, полученных при разных температурных программах. В отличие от изоконверсионных методов, модельные методы позволяют идентифицировать модели многостадийных реакций, подходящие для описания сложной кинетики.

2.11.5 Кинетический анализ циклизации дипептидов

Согласно рекомендациям Международной конфедерации термического анализа и калориметрии (ICTAC), необходимо использовать, по крайней мере, два разных кинетических вычислительных метода [105,117]. В настоящей работе использовались «безмодельные» методы для кинетических вычислений: Friedman [108], Ozawa-Flynn-Wall [112] и Kissinger-Akahira-Sunose [118].

Тот же набор экспериментальных данных был использован далее для поиска топахимического уравнения методом линейной регрессии, как описано в [13]. Данные для кинетического анализа были получены из результатов ТГ, измеренных при разных скоростях нагрева. Расчеты проводились с использованием пакетов программ NETZSCH Thermokinetics 3.1 и NETZSCH Kinetics Neo 2.1.2.2.

2.12 Метод рентгеновской порошковой дифрактометрии

Метод рентгеновской порошковой дифрактометрии был использован для изучения кристаллической упаковки дипептидов **Leu-Phe** и **Phe-Leu** до и после удаления гидратной воды, а также для изучения упаковки трилейцина и его клатратов с органическими соединениями. Исследования проводились на

дифрактометре MiniFlex 600 (Rigaku, Япония), оснащенном высокоскоростным D/teX детектором. Измерения проводили с использованием $\text{Cu K}\alpha$ излучения (40 кВ, 15 мА, 0,15418 нм). Дифрактограммы были получены при комнатной температуре в диапазоне углов 2θ от 3 до 60 с шагом 0,02 и времени экспозиции в каждой точке 0,24 сек без вращения. Для проведения эксперимента образец порошка (2-3 мг) наносился тонким слоем на стеклянный держатель и разравнивался шпателем.

2.13 Статический метод парофазного газохроматографического анализа

В эксперименте определялась величина, пропорциональная относительному давлению паров P/P_0 (термодинамическая активность) «гостей», где P - парциальное давление паров «гостя», а P_0 – давление его насыщенного пара. Величина сорбции A (количество моль «гостя» /1 моль трипептида) рассчитывалась как разница между количеством вещества «гостя», присутствовавшего в газовой фазе до насыщения им кристаллов трипептида, и после. Погрешность определения состава продуктов насыщения не превышала 5%. Давление насыщенного пара P_0 изученных сорбатов было взято из литературы [119].

2.14 Атомно-силовая микроскопия

Морфология поверхности тонких пленок олигопептидов исследовалась методом атомно-силовой микроскопии на атомно-силовом микроскопе Titanium (НТ-МДТ, Россия), с использованием револьверного картриджа CNG (НТ-МДТ, Россия) или кремниевых кнтилеверов NSG-10 (НТ-МДТ, Россия) с резонансными частотами 120 – 350 кГц.

Для АСМ экспериментов были получены растворы дипептидов **Gly-Gly**, **Phe-Ala**, **Leu-Val**, **Leu-Phe**, **Phe-Leu** и их циклических аналогов в ГФИП и растворы **Phe-Ala**, **Ala-Phe**, **Leu-Val** и их циклических аналогов в метаноле. Из полученных растворов готовили пленки дипептидов диаметром от 3 до 5 мм на поверхности пластин высокоориентированного пиролитического графита (ВОПГ) (1×1 см). Для этого от 2 до 5 мкл раствора на подложке высушивали при 25°C. Поверхность ВОПГ была очищена непосредственно перед

использованием. Все АСМ изображения были получены при 25°C. Плёнки дипептидов **Leu-Phe** и **Phe-Leu** были нагреты на нагревательном столике непосредственно в приборе АСМ до 110°C и выдержаны при данной температуре 15 минут, затем охлаждены до 25°C с последующей регистрацией АСМ изображения. Далее проводился нагрев плёнок до 150°C с изотермическим выдерживанием в течение 5 минут, охлаждение до 25°C и последующее АСМ исследование морфологии поверхности того же участка пленки. Плёнки трипептида **Leu-Leu-Leu** также были приготовлены на поверхности ВОПГ путем нанесения раствора олигопептида в метаноле с концентрацией 1 мг/мл с последующим высушиванием в токе теплого воздуха 45°C. После получения АСМ изображения исходной пленки ее выдерживали в контакте с парами бензола или тетрахлорметана в течение 48 часов при 25°C. Термодинамическая активность органических соединений в системе $P/P_0=1$. После осушки пленки при 25°C получали АСМ изображение того же участка.

2.15 Нингидриновый тест

Нингидрин может быть использован для качественного анализа продуктов реакции на содержание в них первичных аминов [120]. При наличии первичных аминов раствор нингидрина окрашивается в фиолетовый цвет. Для проведения нингидринового теста дипептиды **Phe-Ala** и *цикло*(**Phe-Ala**) растворяли в метаноле. Концентрация полученных растворов составляла 0,1%. К каждому раствору дипептидов добавляли одинаковый объем 0,1% раствора нингидрина в метаноле. Полученные растворы кипятили при 65°C в течение 10 минут и следили за изменением окраски раствора.

2.16 Люминесцентная микроскопия

Для визуализации люминесцентных свойств линейных и циклических дипептидов был использован метод люминесцентной микроскопии. Для проведения исследования были получены растворы дипептидов **Leu-Phe** и **Phe-Leu** в метаноле с концентрацией 1 мг/мл. Растворы были нанесены на предметные стекла, после удаления растворителя были получены изображения образовавшихся структур. Использовали излучение с длиной

возбуждающей волны 400 нм и с применением светофильтра, пропускающего излучение при 460 нм, на выходе. Далее предметные стекла с пленками линейных дипептидов помещались в сушильный шкаф и нагревались выше температуры реакции. Полученные продукты после термической обработки были также охарактеризованы методом люминесцентной микроскопии.

2.17 Люминесцентная спектроскопия

Спектр люминесценции порошка циклического дипептида был получен с использованием спектрофлуориметра HORIBA Fluorolog QM-75-22-C четвертого поколения, с двумя каналами регистрации люминесценции. Каждый канал регистрации и канал возбуждения оснащены двойными монохроматорами с фокусным расстоянием 380мм. В канале регистрации люминесценции установлена пара решёток 1200 шт/мм с блеском 500 нм и ФЭУ Hamamatsu R13456-11 с термоэлектрическим охлаждением до -70°C. В канале возбуждения установлен двойной монохроматор с турелями, укомплектованными набором решёток 600, 1200 и 1800 шт/мм. В качестве источника возбуждения используется ксеноновая лампа 75 Вт.

Для получения спектра люминесценции порошок помещался между двух стеклянных пластин толщиной 0,17 мм. Освещение и сбор люминесценции производились под углом 45° к нормали. Измерения проводились при комнатной температуре.

ГЛАВА 3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

3.1 Термический анализ дипептидов

Результаты термического анализа порошков линейных дипептидов **Gly-Gly**, **Ile-Ala**, **Ala-Ile**, **Leu-Val**, **Leu-Phe** и **Phe-Leu**, полученные методом совмещенного термоанализа, продемонстрированы на рис. 33.

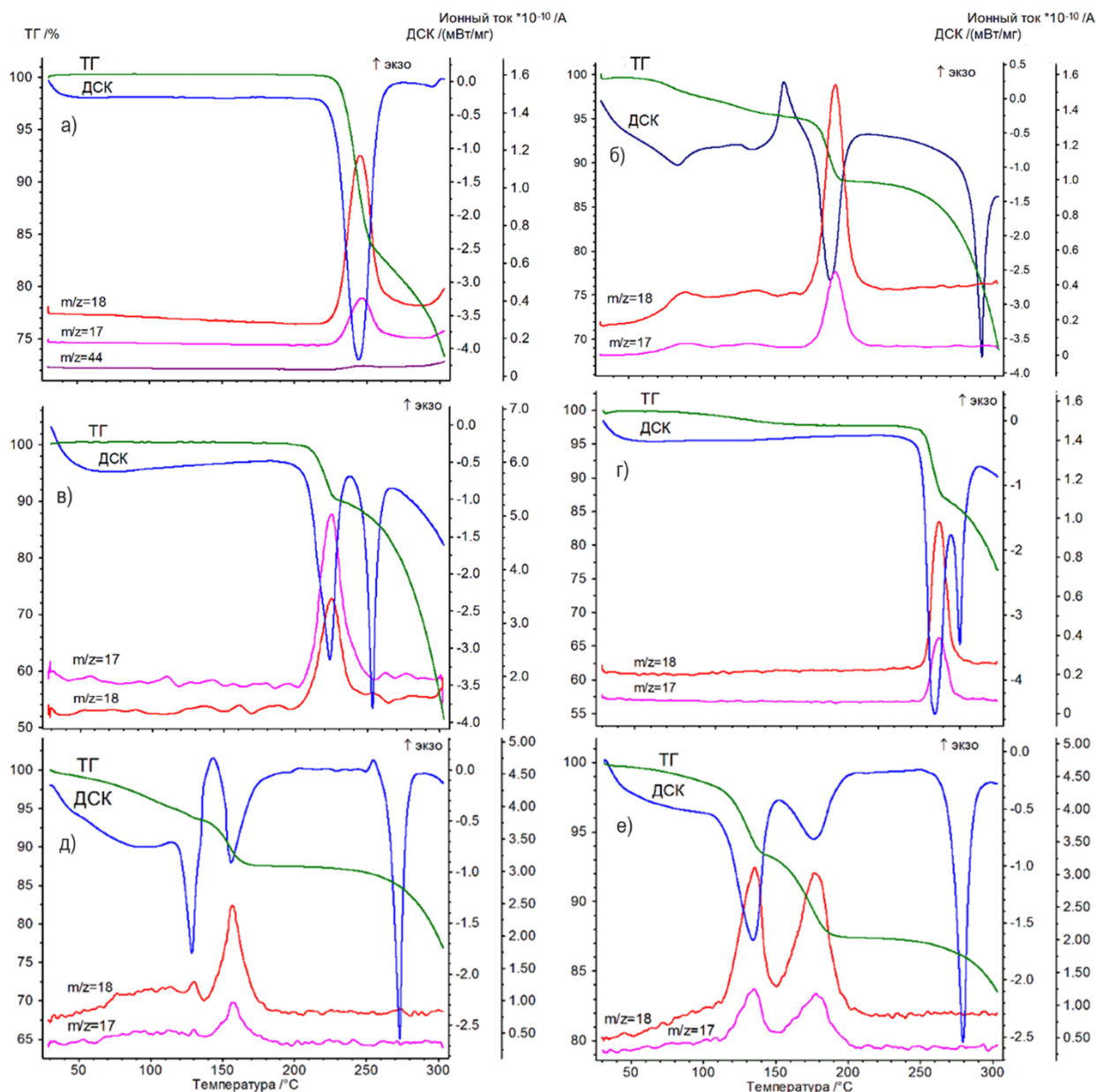


Рисунок 33 – Результаты термического анализа дипептидов а) **Gly-Gly**, б) **Leu-Val**, в) **Ile-Ala**, г) **Ala-Ile** д) **Leu-Phe** и е) **Phe-Leu**. Скорость нагрева 10 К/мин, атмосфера – аргон, ионные термограммы $m/z=17$ и $m/z=18$ соответствуют воде.

Было установлено, что дипептиды **Gly-Gly** и **Ile-Ala** не содержат сорбционной воды и стабильны до температур 228°C [121] и 206°C [122] соответственно, рис.33а,в. В интервале температур 228-266°C на ионных термограммах **Gly-Gly** наблюдаются сигналы H₂O (m/z=17,18) и CO₂ (m/z=44), а образец теряет массу $\Delta m = 18,3\%$. Согласно исследованию [12] такая потеря массы связана с реакцией циклизации линейного дипептида и его частичной термической деструкцией. Расчётная потеря массы образца, связанная с циклизацией **Gly-Gly**, составляет 13,6%. Выше температуры 228°C на ДСК кривой наблюдается эндотермический пик, который соответствует циклизации и частичной деструкции линейного дипептида. Величина теплового эффекта составляет 462 Дж/г, что хорошо согласуется с ранее определенным значением 482 Дж/г [12]. При нагревании **Gly-Gly** выше 266°C на термогравиметрической кривой наблюдается следующая ступень потери массы, связанная с сублимацией продуктов реакции [12]. Нагрев до 300°C приводит к обугливанию образца, в результате чего он чернеет, рис. 34а. Нагрев **Ile-Ala** выше 206°C приводит к потере массы $\Delta m = 9,7\%$, которая согласно МС кривым (m/z=17,18) связана с уходом воды. Данный процесс может соответствовать химической реакции, например циклизации дипептида [13]. Значение эндотермического эффекта на ДСК кривой составляет 213 Дж/г, рис. 30в. Дальнейший нагрев порошка **Ile-Ala** приводит к появлению второго эндотермического пика на кривой ДСК с началом при 248°C и энтальпией $\Delta H=119$ Дж/г, рис. 33в, по-видимому, связанного с процессом плавления. Соответствующая вторая ступень потери массы на кривой ТГ обусловлена испарением образца. Термическое разложение образца в этом интервале температур не происходит, так как по данным масс-спектрометрии в выделяющихся газах отсутствуют вода и CO₂, а образец не меняет свой цвет после плавления, рис. 34б,в.



Рисунок 34 – Фотография порошка а) **Gly-Gly** после нагрева до 300°C, б) исходный порошок **Phe-Ala** и в) порошок **Phe-Ala** после нагрева до 250°C.

Следует отметить, что коммерчески доступный лиофилизированный порошок *цикло*(**Gly-Gly**) термически стабилен до 295°C, рис. 35, что может быть связано с формированием межмолекулярных водородных связей в результате самоорганизации дипептида в растворе, используемом для лиофильной сушки.

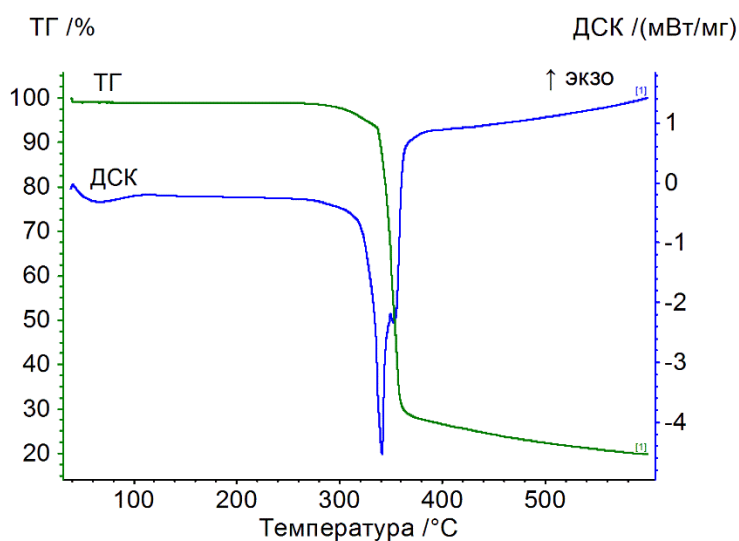


Рисунок 35 – Результаты ТГ/ДСК анализа лиофилизированного образца *цикло*(**Gly-Gly**). Скорость нагрева 10 К/мин.

Было установлено, что на термогравиметрических кривых дипептидов **Ala-Phe**, **Leu-Val**, **Leu-Phe** и **Phe-Leu** присутствует три ступени потери массы, рис. 33б,г,д,е. При температурах ниже 150°C (**Ala-Phe**) [123], 163°C (**Leu-Val**),

134°C (**Leu-Phe**) и 145°C (**Phe-Leu**) имеет место потеря массы образца, обусловленная уходом адсорбционной воды с изменением массы образца $\Delta m=2\%$ (**Ala-Ile**), $\Delta m=4,58\%$ (**Leu-Val**), $\Delta m=6,33\%$ (**Leu-Phe**), $\Delta m=6,49\%$ (**Phe-Leu**).

Наличие сорбционной воды в дипептида **Ala-Ile** в отличие от **Ile-Ala** хорошо согласуется с литературными данными, согласно которым кристаллы **Ile-Ala** не содержат сорбционную воду в отличие от кристаллов **Ala-Ile** [69,124]. Такое различие в сорбционных свойствах этих дипептидов может быть обусловлено тем, что диаметр каналов в кристаллах **Ile-Ala** не превышает 3,7 Å, поэтому молекулы воды не способны эффективно проникать в них, в то время как диаметр пор **Ala-Ile** может достигать 4,7 Å [69].

Дальнейший нагрев порошков дипептидов приводит ко второй ступени потери массы с $\Delta m=10,7\%$ (**Ala-Ile**), $\Delta m=7,2\%$ (**Leu-Val**), $\Delta m=6,06\%$ (**Leu-Phe**), $\Delta m=5,88\%$ (**Phe-Leu**), которая соответствует уходу воды в количестве 1,2 моль (**Ala-Ile**), 0,97 моль (**Leu-Val**), 1 моль (**Leu-Phe**), 0,97 моль (**Phe-Leu**) на моль сухого дипептида. Присутствие в уходящих газах только паров воды подтверждается данными масс-спектрометрии ($m/z = 17, 18$), рис. 33 б,г,д,е. Эти процессы могут быть классифицированы как реакция циклизации, в результате которой образуется амидная связь [13]. Температура начала процесса, определённая по ТГ кривой, при скорости нагрева 10 К/мин в случае **Ala-Ile** составляет 228°C. Поскольку в случае дипептидов **Leu-Val**, **Leu-Phe** и **Phe-Leu** процесс десорбции воды накладывается на процесс твердофазной циклизации для них была разработана методика получения осушенных образцов непосредственно в измерительном приборе, которая обсуждается ниже. Дальнейший нагрев выше 250°C дипептидов **Ala-Ile**, **Leu-Val**, **Leu-Phe** и **Phe-Leu** приводит к следующей ступени потери массы, а на ДСК кривой наблюдаются эндотермические пики, связанные с плавлением/испарением образовавшихся продуктов реакции.

Для объяснения обнаруженного превышения теоретически рассчитанного количества воды (1 моль H_2O на 1 моль дипептида), образующейся в ходе реакции в случае **Ala-Ile**, было проведено дополнительное изучение теплофизических свойств циклического продукта реакции.

Плавление циклических дипептидов *цикло(Ala-Ile)* и *цикло(Ile-Ala)* изучили методом сканирующей дифференциальной калориметрии. Было установлено, что температуры начала плавления *цикло(Ala-Ile)* и *цикло(Ile-Ala)* одинаковы и составляют 224°C , с энтальпиями плавления 109 и 131 Дж/г, соответственно. Одинаковые температуры начала плавления свидетельствуют об образовании одинаковых продуктов в ходе твердофазной реакции циклизации дипептидов **Ala-Ile** и **Ile-Ala**. Следует отметить тот факт, что температура начала плавления циклического дипептида *цикло(Ala-Ile)* на 4°C меньше температуры начала твердофазной циклизации линейного **Ala-Ile**. Такое различие в температурах плавления и циклизации может быть причиной частичного испарения *цикло(Ala-Ile)* в процессе реакции, и, как следствие, большей потери массы образца, наблюдаемой на термогравиметрической кривой, рис. 33г. Частичная потеря массы образцов при их плавлении является причиной различия (невоспроизводимости) в энтальпиях плавления, рис. 36.

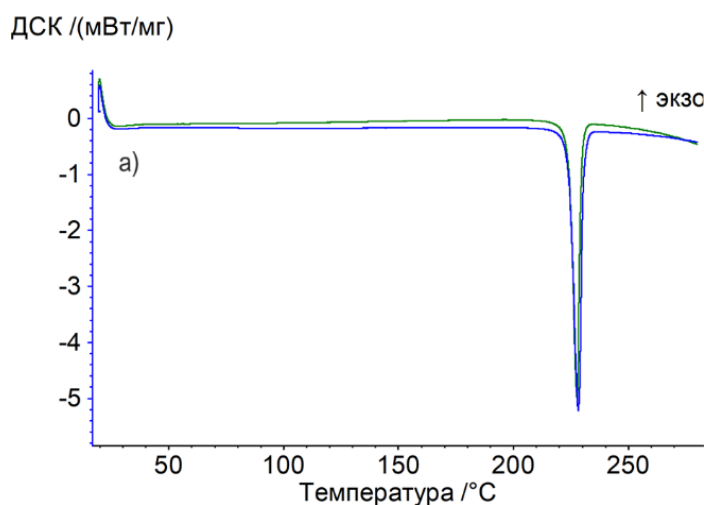


Рисунок 36 – ДСК кривые продуктов нагревания **Ala-Ile** (зелёная кривая) и **Ile-Ala** (синяя кривая), скорость нагрева 10 К/мин.

Термические свойства полученных циклических дипептидов *цикло*(**Leu-Phe**) и *цикло*(**Phe-Leu**) также были дополнительно исследованы с помощью ДСК, рис. 37. Было установлено, что в случае *цикло*(**Leu-Phe**) на кривой ДСК присутствует экзотермический эффект с началом при 240,4°C. Температуры начала плавления и энтальпии полученных ДКП составили 264,7°C и 151 Дж/г, 268,2°C и 162 Дж/г для *цикло*(**Leu-Phe**) и *цикло*(**Phe-Leu**) соответственно. Наблюдаемое различие термических свойств продуктов реакции может быть связано с рацемизацией дипептидов при циклизации [125].

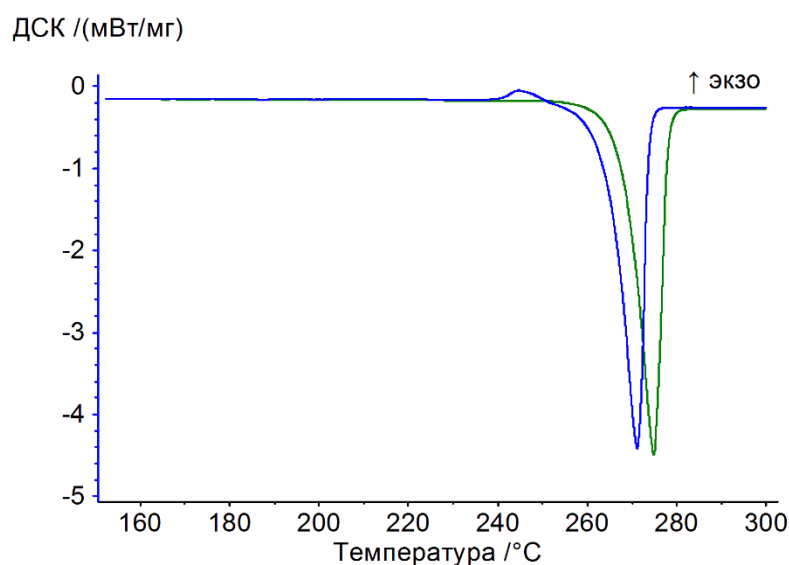


Рисунок 37 – ДСК кривые *цикло*(**Leu-Phe**) (синяя линия) и *цикло*(**Phe-Leu**) (зелёная линия).

Для точного определения температуры начала циклизации **Leu-Val**, **Leu-Phe** и **Phe-Leu** и дальнейшего проведения кинетического анализа была разработана методика получения осушенных линейных дипептидов. Для этого исследуемые образцы нагревались до 110°C со скоростью 1,5 К/мин и выдерживались при этой температуре 15 (**Leu-Val** и **Leu-Phe**) и 30 (**Phe-Leu**) мин. После охлаждения в инертной атмосфере до 25°C высушенные дипептиды снова нагревали. Полученные ТГ кривые свидетельствуют об отсутствии связанной воды, рис. 38. Использование высушенных дипептидов позволило определить точные температуры начала реакции для скорости

нагрева 10 К/мин: 180°C (**Leu-Val**) [126], 134°C (**Leu-Phe**) и 152°C (**Phe-Leu**) [127].

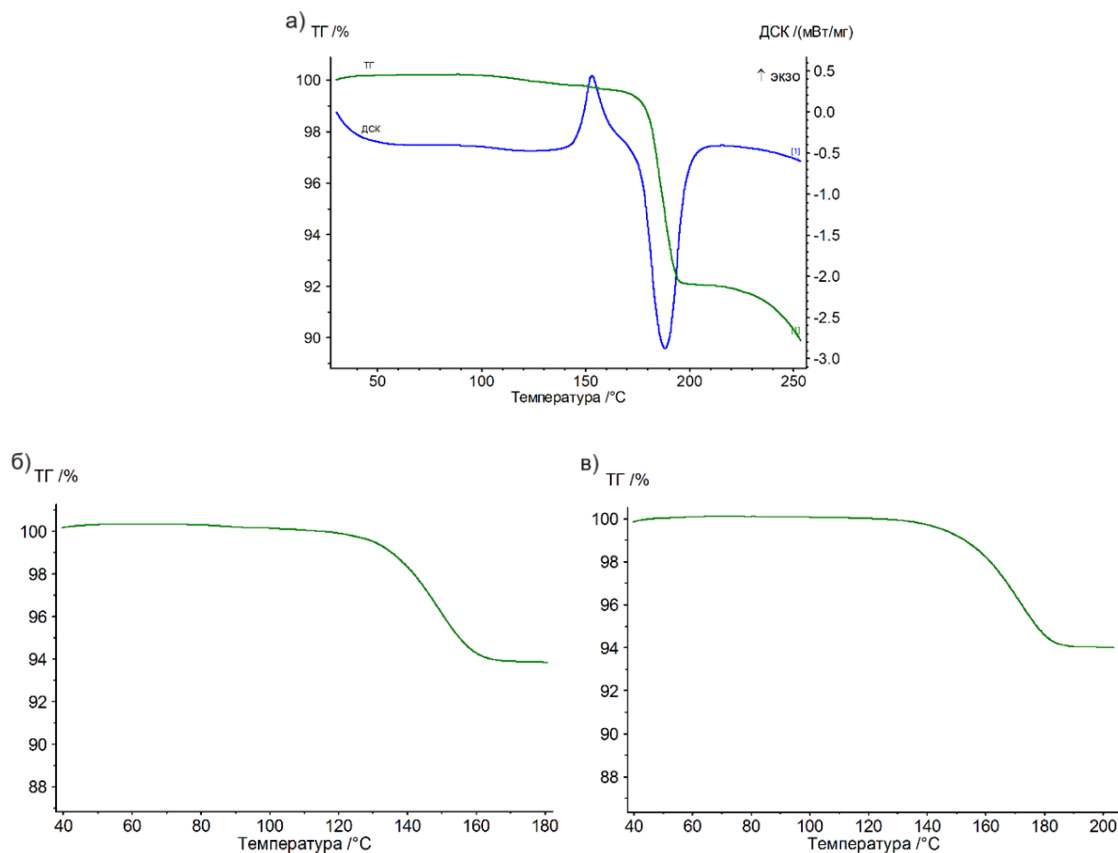


Рисунок 38 – ТГ кривые осушенных дипептидов а) **Leu-Val**, б) **Leu-Phe** и в) **Phe-Leu**. Скорость нагрева 10 К/мин.

3.2 Спектроскопия ЯМР

Для установления химической структуры продуктов, образовавшихся в результате нагревания дипептидов **Gly-Gly**, **Ile-Ala**, **Ala-Ile**, **Leu-Val**, **Leu-Phe** и **Phe-Leu** выше температуры начала реакции, использовалась ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопия, рис. 39,40,41.

Полученные ЯМР спектры продукта нагревания порошка **Gly-Gly** до 300°C и коммерчески доступного *цикло*(**Gly-Gly**) приведены на рис. 36. Было установлено, что спектры изученных дипептидов идентичны. Значения химических сдвигов: ^1H $\delta = 3.70$ (с, 4H), $\delta = 8.02$ (с, 2H); ^{13}C $\delta = 44.4, 166.3$. Полученные данные подтверждают образование *цикло*(**Gly-Gly**) в ходе реакции. Выход циклического дипептида согласно литературным данным [12]

составляет 60%. Отсутствие других пиков в спектре нагретого образца свидетельствует о нерастворимости побочных продуктов реакции в используемом растворителе.

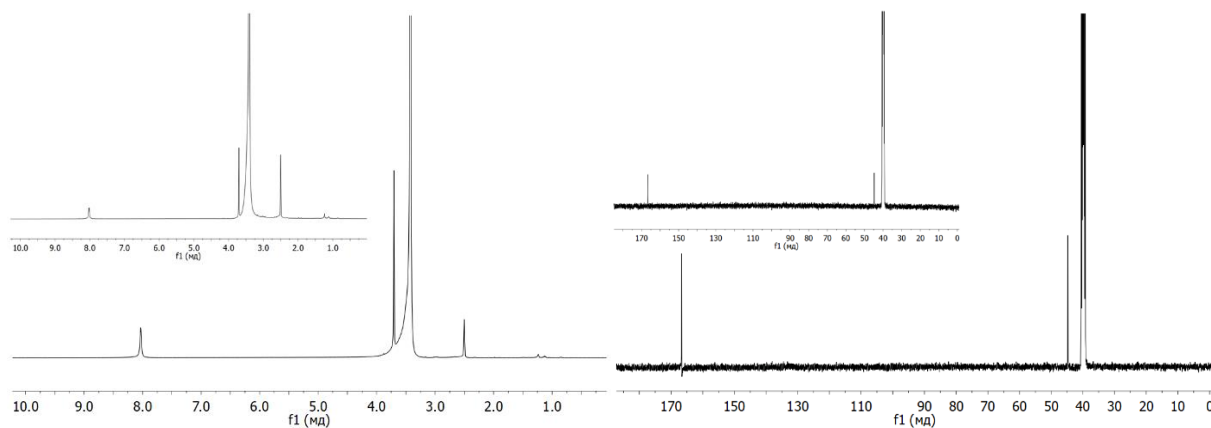


Рисунок 39 – ЯМР спектры *цикло*(Gly-Gly). Слева: ^1H (400 МГц, $\text{DMSO-}d_6$), справа: ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ (100,6 МГц, $\text{DMSO-}d_6$). На вставках приведены соответствующие ЯМР спектры коммерчески доступного *цикло*(Gly-Gly), полученные в тех же условиях.

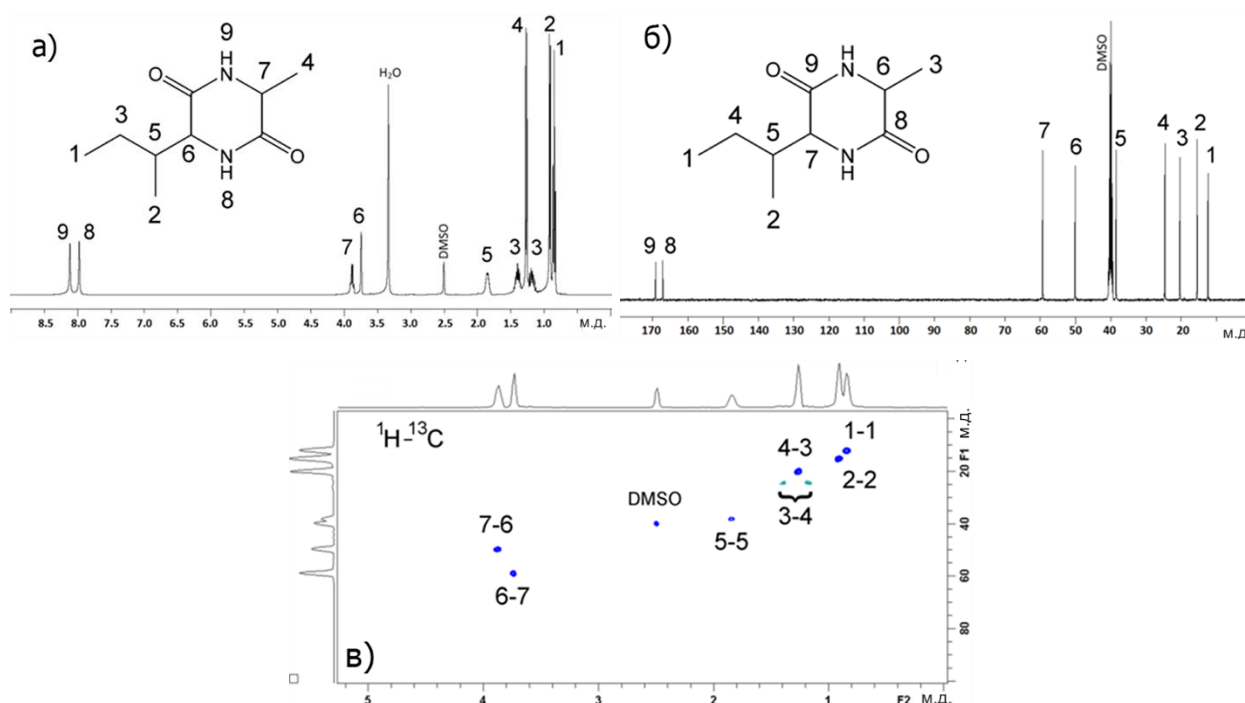


Рисунок 40 – ЯМР спектры *цикло*(Ple-Ala) а) ^1H (400 МГц, $\text{DMSO-}d_6$) и б) ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ (100,6 МГц, $\text{DMSO-}d_6$), в) $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ HSQC-спектр (400 / 100,6 МГц, $\text{DMSO-}d_6$), числа соответствуют смещениям на а) и б) спектрах.

Значения химических сдвигов, полученные для **Ile-Ala** нагретого до 230°C, рис. 37, ^1H ($\delta = 0,85$ (т, $^3J = 7,4$ Гц, 3H), $0,91$ (д, $^3J = 7,0$ Гц, 3H), $1,12-1,24$ (м, 1H), $1,26$ (д, $^3J = 7,0$ Гц, 3H), $1,35-1,45$ (м, 1H), $1,80-1,90$ (м, 1H), $3,75$ (с, 1H), $3,86-3,91$ (кв, $^3J = 7,0$ Гц, 1H), $7,98$ (с, 1H), $8,12$ (с, 1H)) и ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ ($\delta = 12,4$; $15,5$; $20,3$; $24,6$; $38,4$; $50,1$; $59,2$; $167,1$; $169,0$) хорошо согласуются с ЯМР данными для *цикло(Ile-Ala)* [128].

Полученные значения химических сдвигов, определённые для продукта нагревания **Ala-Ile** находятся в хорошем соответствии с продуктом нагревания **Ile-Ala**: ^1H ($\delta = 0,84$ (т, $^3J = 7,5$ Гц, 3H), $0,91$ (д, $^3J = 7,0$ Гц, 3H), $1,11-1,23$ (м, 1H), $1,26$ (д, $^3J = 7,0$ Гц, 3H), $1,34-1,44$ (м, 1H), $1,81-1,87$ (м, 1H), $3,74$ (с, 1H), $3,85-3,90$ (кв, $^3J = 7,0$ Гц, 1H)), $8,00$ (с, 1H), $8,14$ (с, 1H)) и ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ $\delta = 12,4$, $15,5$, $20,4$, $24,6$, $38,4$, $50,1$, $59,2$, $167,1$, $169,1$, рис. 41 [128]. Полученные данные свидетельствуют об образовании идентичного продукта при циклизации **Ala-Ile** и **Ile-Ala**.

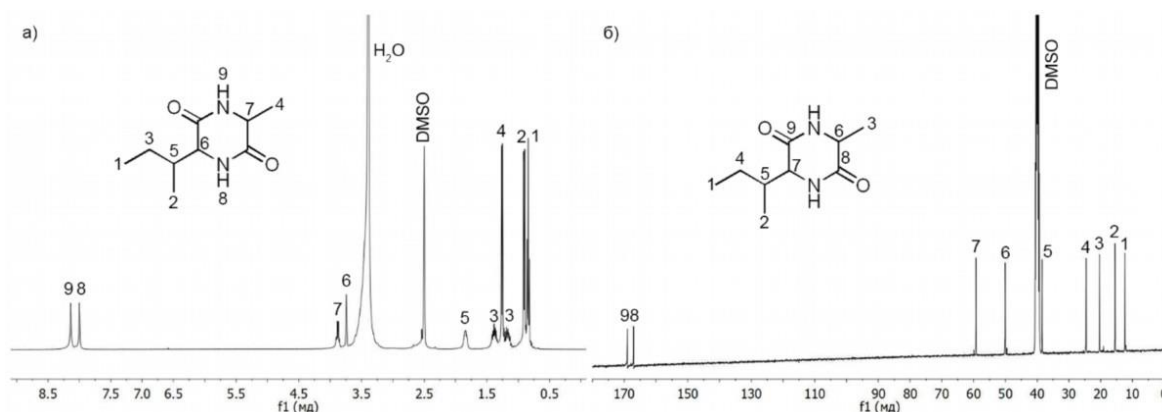


Рисунок 41 – а) ^1H ЯМР спектр *цикло(Ala-Ile)* (400 МГц, ДМСО- d_6), б) ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ ЯМР спектр *цикло(Ala-Ile)* (100,6 МГц, ДМСО- d_6).

Результаты анализа продукта циклизации дипептида **Leu-Val** методом ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопии приведены на рис. 42. Полученные значения химических сдвигов ^1H ($\delta = 0,97$ (м, 9H), $1,05$ (д, $^3J = 7,0$ Гц, 3H), $1,61$ (м, 1H), $1,75$ (м, 1H), $1,86$ (м, 1H), $2,23$ (м, 1H), $3,78$ (д, $^3J = 4,1$ Гц, 1H), $3,95$ (дд, $^3J = 4,3$, $9,1$ Гц, 1H)) и ^{13}C ($\delta = 169,6$, $61,5$, $171,3$, $54,3$, 46 , $25,3$, $23,6$, $21,8$, $33,7$, $19,3$, $17,8$)

хорошо согласуются с предложенной циклической структурой *цикло*(**Leu-Val**) и литературными данными [129].

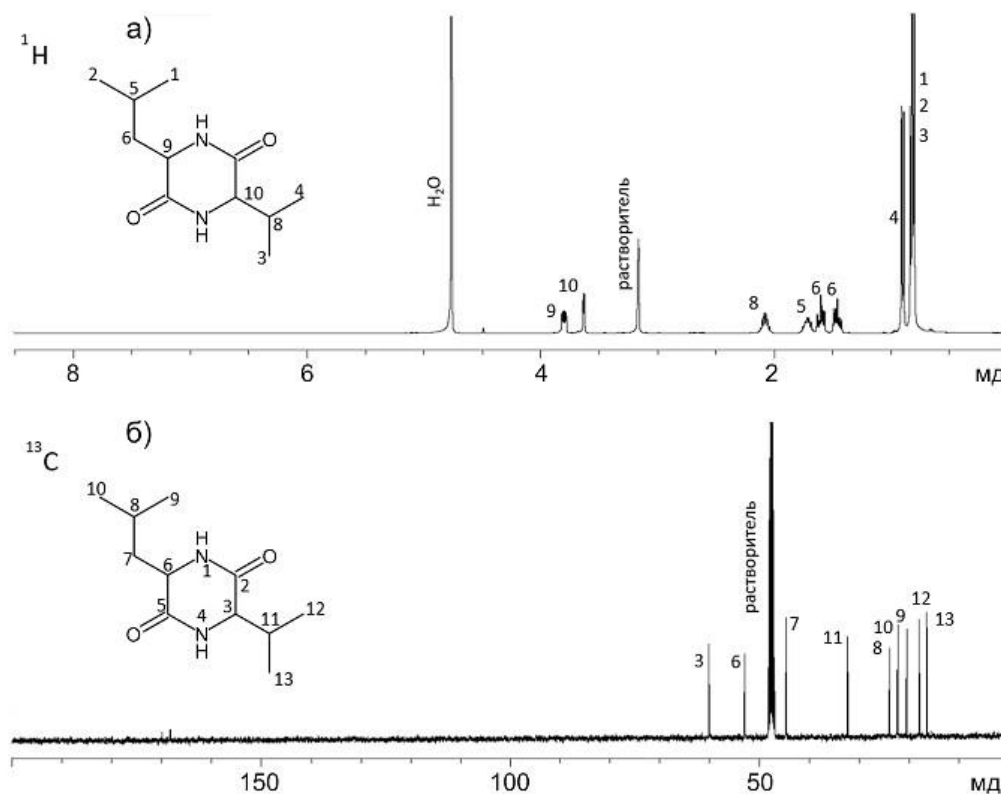


Рисунок 42 – ЯМР спектры *цикло*(**Leu-Val**): а) ^1H (400 МГц, метанол- d_4) и б) ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ (100,6 МГц, метанол- d_4).

Значения химических сдвигов для дипептидов **Leu-Phe** и **Phe-Leu**, нагретых до 180°C и 200°C соответственно: ^1H (δ = 0,03-0,10 (м, 1H), 0,58-0,63 (дд, 3J = 6,6, 13,8 Гц, 6H), 0,70-0,76 (м, 1H), 1,35-1,45 (м, 1H), 2,80-2,84 (дд, 4,9, 13,4 Гц, 1H), 3,11-3,15 (дд, 3J = 3,7, 13,4 Гц, 1H), 3,44-3,47 (м, 1H), 4,16 (с, 1H), 7,12-7,29 (м, 5H), 8,09 (с, 1H), 8,13 (с, 1H)), рис. 38а,б, и ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ (δ = 21,8; 23,3; 38,9; 44,1; 55,9; 127,2; 128,6; 130,9; 136,5; 166,6; 167,9), рис. 43в,г, хорошо согласуются с циклической структурой продукта реакции [130].

Спектры, полученные для *цикло*(**Leu-Phe**) и *цикло*(**Phe-Leu**), практически идентичны. Но в области 7,06-7,35 и 8,00-8,22 ppm в случае *цикло*(**Leu-Phe**), рис. 43д,е, наблюдается расщепление пиков, в отличие от *цикло*(**Phe-Leu**), рис. 43ж,з. Наблюдаемый эффект может быть связан с частичной эпимеризацией **Leu-Phe** при его твердофазной циклизации [131].

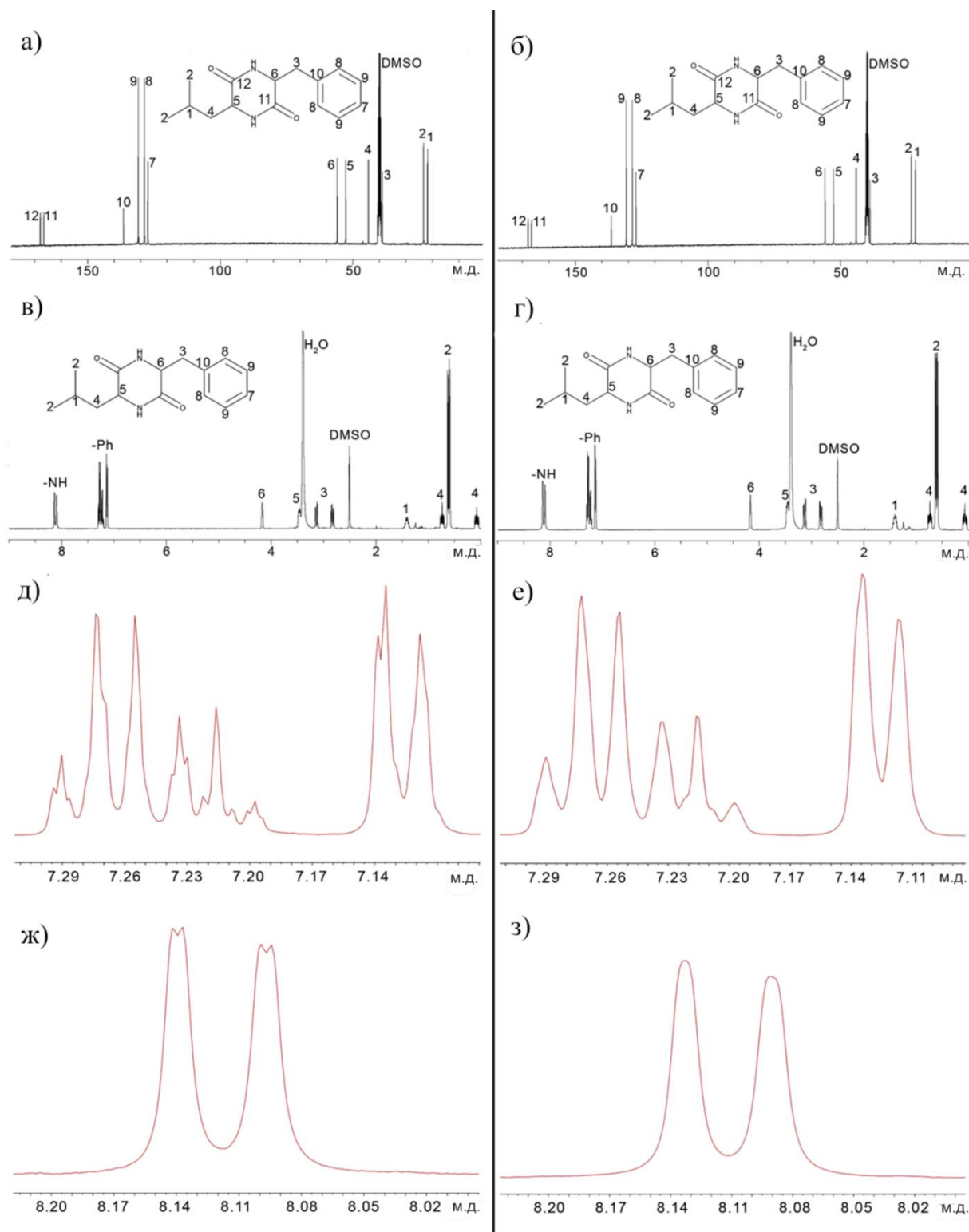


Рисунок 43 – $^{13}\text{C} \{^1\text{H}\}$ ЯМР спектры а) *цикло(Leu-Phe)* и б) *цикло(Phe-Leu)*, ^1H ЯМР спектры в) *цикло(Leu-Phe)* и г) *цикло(Phe-Leu)*, часть спектра в области 7.06-7.35 для д) *цикло(Leu-Phe)* е) *цикло(Phe-Leu)*, часть спектра в области 8.00-8.22 для ж) *цикло(Leu-Phe)* и з) *цикло(Phe-Leu)*.

3.3 ИК-спектроскопия

Согласно данным ИК-спектроскопии, таблица 4, спектры исходных порошков дипептидов содержат полосы соответствующие колебаниям связей в $-\text{COO}^-$ [132], $-\text{NH}_3^+$ [133] и $>\text{NH}$ группах, а также полосы Амид I и Амид II, рис 39.

Таблица 4 – Полосы поглощения исходных порошков дипептидов.

Дипептид	Полоса поглощения, см^{-1}				
	$-\text{COO}^-$	$-\text{NH}_3^+$	Амид I	Амид II	$>\text{NH}$
Ile-Ala	1660	1523	1629	1583	3234
Ala-Ile	1667	1550	1623	1580	3190
Leu-Val	1656-1671	1544	1628	1561-1577	3290
Leu-Phe	1678	1526	1624	1563	3289
Phe-Leu	1676	1523	1611	1554	3282

Результаты ИК-спектроскопии для порошков дипептидов, нагретых выше температуры реакции (**Ile-Ala** 225°C, **Ala-Ile** 237°C, **Leu-Val** 200°C, **Leu-Phe** 180°C, **Phe-Leu** 200°C), представлены в таблице 5 и на рис. 44.

Таблица 5 – Полосы поглощения порошков дипептидов нагретых выше температуры реакции.

Дипептид	Полоса поглощения, см^{-1}				
	C=O	Вырожденные	плоскостные	внеплоскостные	$>\text{NH}$
		колебания алкильных групп	колебания NH-группы в цикле	колебания NH- группы	
<i>цикло</i> (Ile-Ala)	1661	1447	1481	849	3188
<i>цикло</i> (Ala-Ile)	1667	1445	1481	853	3190
<i>цикло</i> (Leu-Val)	1663	1450	1481	846	3190
<i>цикло</i> (Leu-Phe)	1664	1461	1481	839	3190
<i>цикло</i> (Phe-Leu)	1664	1461	1481	839	3192

Было установлено, что в результате нагрева исходных порошков дипептидов происходит смещение полосы NH-группы к 3190 см^{-1} , которая характерна для циклических лактамов, близких по структуре к циклическим дипептидам. Также появляется интенсивная полоса вблизи 1660 см^{-1} , характерная для хинонов [133], содержащих две C=O группы в цикле.

Относительно интенсивный пик вблизи 1450 см^{-1} в спектрах продуктов нагревания соответствует вырожденным колебаниям алкильных групп.

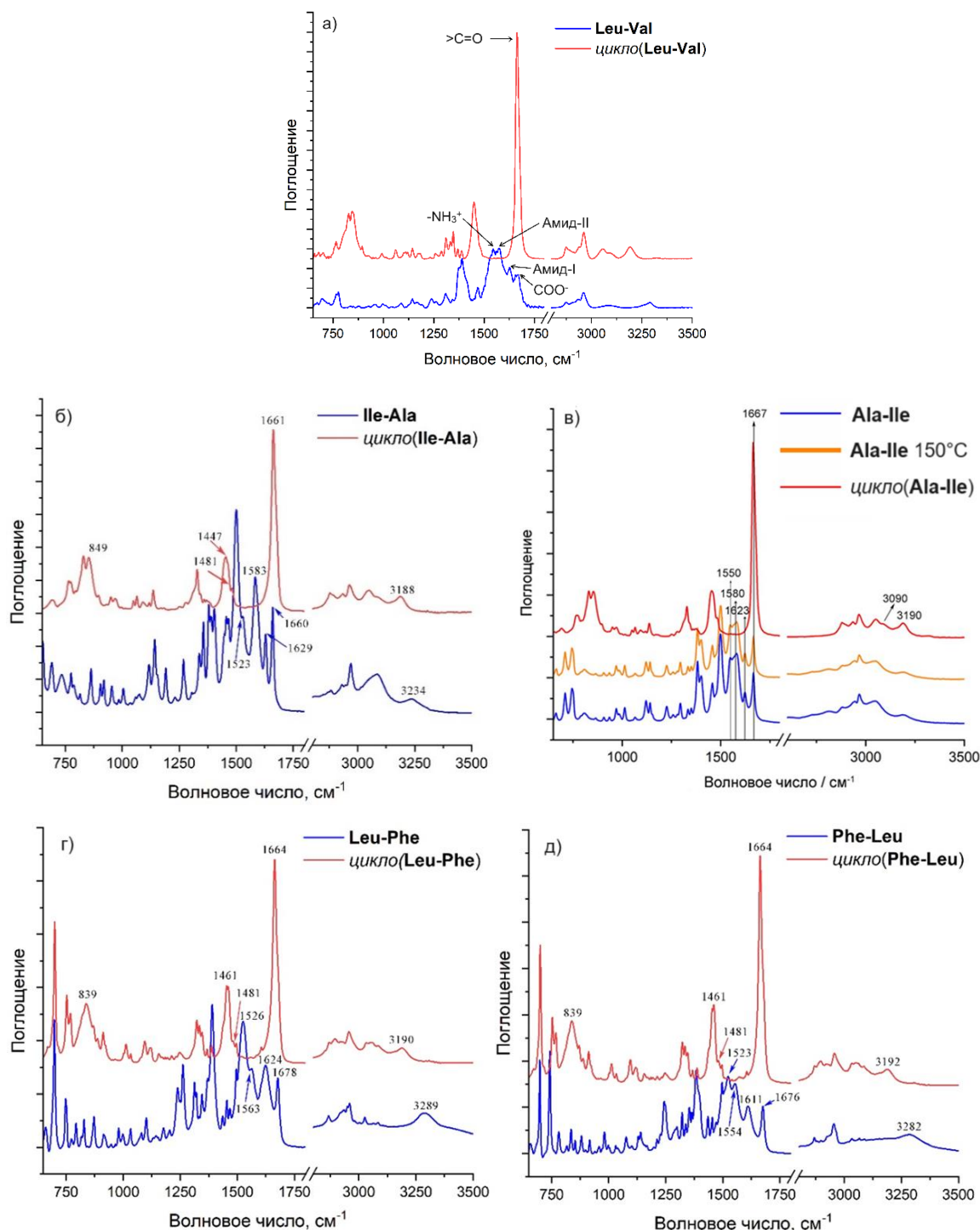


Рисунок 44 – ИК-спектры исходных порошков дипептидов и порошков, нагретых выше температуры реакции циклизации.

Небольшой пик при 1481 см^{-1} может быть связан с плоскостными колебаниями NH -групп в цикле [134]. Полоса вблизи 850 см^{-1} в спектре

нагретого образца – внеплоскостные колебания NH-группы [135]. Следует отметить, что ИК-спектры продуктов нагревания **Leu-Phe** и **Phe-Leu** практически идентичны, что свидетельствует об образовании одного и того же продукта. Спектры продуктов нагревания **Ile-Ala** и **Ala-Ile** близки, а незначительные различия в них могут быть связаны с тем, что циклический продукт **Ala-Ile** получается в виде охлажденного расплава, так как одновременно с циклизацией происходит процесс плавления, рис. 33в,г, 36.

Было изучено влияние состояния пленок дипептидов **Leu-Phe** и **Phe-Leu** на процесс циклизации, рис. 45. Для этого были приготовлены аморфные пленки и пленки с кристаллами. Аморфные пленки **Leu-Phe** и **Phe-Leu** были получены из раствора в ГФИП методом горячей сушки [136,137]. Для получения кристаллических структур аморфные пленки насыщали в течение 3 часов (**Leu-Phe**) и в течение 24 часов (**Phe-Leu**) парами воды с термодинамической активностью $P/P_0=1$. Состояние пленок характеризовали методом порошковой рентгеновской дифрактометрии, результаты приведены в приложении 1,2. На дифрактограммах аморфных пленок дипептидов наблюдается характерное гало. После взаимодействия аморфных пленок с парами воды в их фазе образовывались кристаллические структуры. Данные ИК-спектроскопии были получены для исходных аморфных и кристаллических пленок, рис. 45а, 45б, для пленок обоих типов после нагрева до 75 (только **Phe-Leu**), 100, 110 и 120 °С, рис. 45в, 45г, и после нагрева до 140 °С (**Leu-Phe**) и 150 °С (**Phe-Leu**), рис. 45д, 45е.

Спектры, полученные для аморфной (ам) и кристаллической (кр) пленок, рис. 45а, 45б, содержат пики $3329_{\text{ам}}$ и $3298_{\text{кр}}$ см⁻¹ для **Leu-Phe**, а также $3327_{\text{ам}}$ и $3281_{\text{кр}}$ см⁻¹ для **Phe-Leu**, соответствующие валентным колебаниям группы NH [133]. Различия, наблюдаемые для аморфных и кристаллических пленок, могут быть связаны с цвиттер-ионной формой дипептида в кристалле.

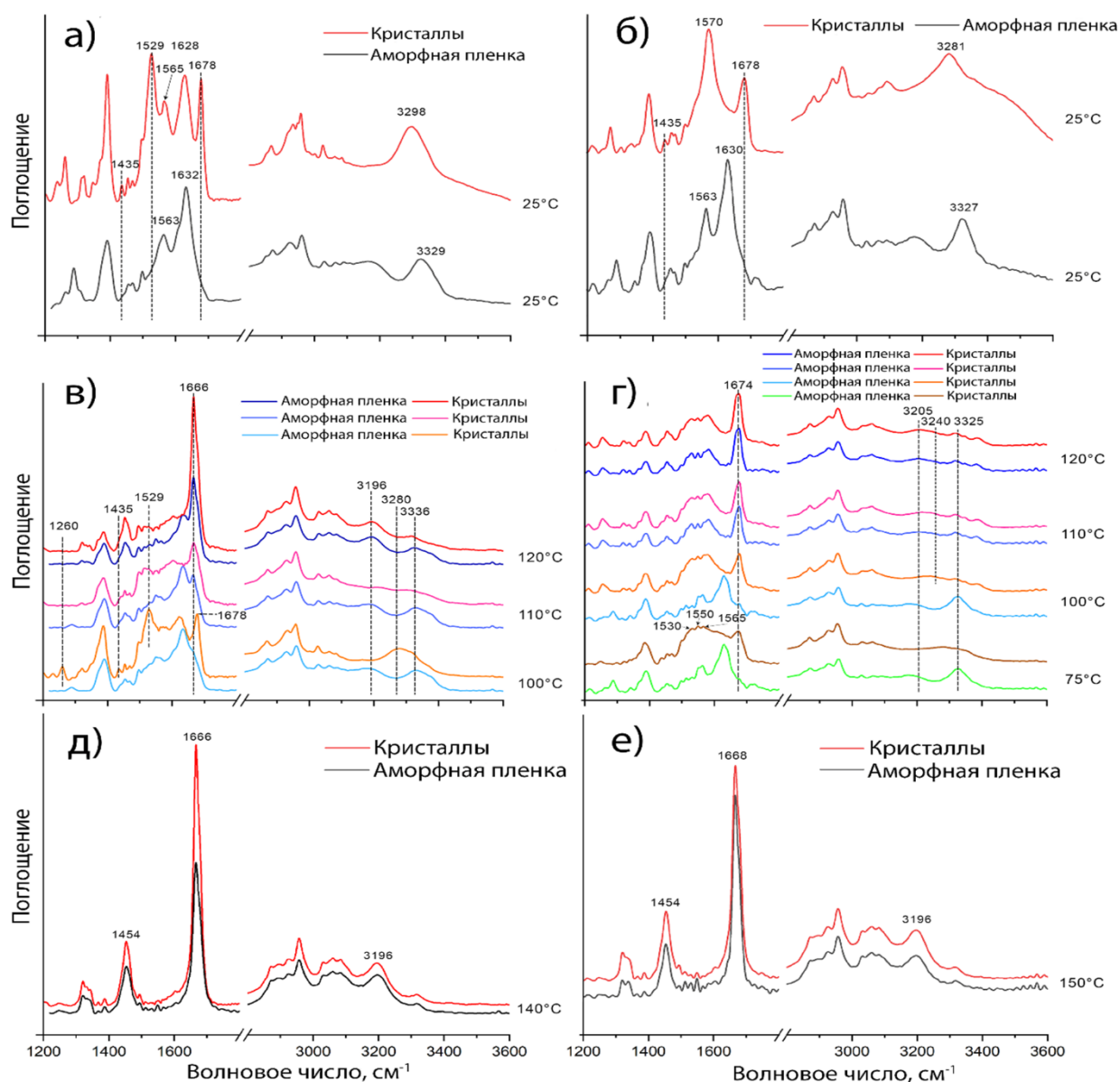


Рисунок 45 – ИК-спектры аморфных и кристаллических пленок дипептидов при 25 °С (а) **Leu-Phe** и (б) **Phe-Leu**; после нагревания до 75 (только **Phe-Leu**), 100, 110 и 120 °С (в) **Leu-Phe** и (г) **Phe-Leu**; после нагревания до 140 °С (д) **Leu-Phe** и до 150 °С (е) **Phe-Leu**.

В спектрах аморфной и кристаллической пленок **Leu-Phe** присутствуют пики, соответствующие полосам поглощения Амид I $1632_{\text{ам}}$ и $1628_{\text{кр}}$ см^{-1} , и Амид II: $1563_{\text{ам}}$ и $1565_{\text{кр}}$ см^{-1} соответственно. В спектре аморфной пленки **Phe-Leu** присутствуют пики, соответствующие полосам поглощения Амид I $1630_{\text{ам}}$ и Амид II $1563_{\text{ам}}$. В то время как в спектре кристаллической пленки **Phe-Leu** присутствует одна интенсивная и широкая полоса при 1570 см^{-1} , которая,

вероятно, включает полосы поглощения Амид I, Амид II и группы NH_3^+ . Такая форма сигнала может быть обусловлена наложением полос поглощения воды, пары которой использовались для кристаллизации аморфной пленки.

В спектрах аморфных пленок дипептидов **Leu-Phe** и **Phe-Leu** отсутствуют полосы 1678-1679 и 1435-1440 см^{-1} , которые, вероятно, связаны с колебаниями группы COO^- [138], а также полоса 1529 см^{-1} , связанная с колебаниями группы NH_3^+ [133]. Таким образом, можно предположить, что аморфная пленка состоит из дипептида в молекулярной форме, а кристаллы содержат дипептид в цвиттер-ионной форме. Ранее аналогичный вывод был сделан с помощью рамановской спектроскопии для дипептида **Gly-Gly** в аморфном и кристаллическом состояниях [136].

Для удаления сорбционной воды использовали нагревание кристаллической пленки **Phe-Leu** до 75 °C. В результате этого нагрева в ИК-спектре появились пики при 1565_{кр} (Амид I), 1550_{кр} (Амид II) и 1530_{кр} см^{-1} (NH_3^+), рис. 45г. При нагревании аморфной пленки **Phe-Leu** до 75 °C наблюдался лишь небольшой сдвиг полос в спектре, рис. 40г. Нагрев пленок от 100 до 120 °C приводит к уменьшению интенсивности полос в спектре **Leu-Phe** при 3336_{ам} и 3280_{кр} см^{-1} , а также в спектре **Phe-Leu** при 3325_{ам} и 3240_{кр} см^{-1} , соответствующих валентным колебаниям группы NH. А в спектрах нагретых пленок появляются полосы при 3196 (**Leu-Phe**) и 3205 (**Phe-Leu**) см^{-1} , характерные для циклических лактамов [133]. Нагревание аморфных пленок до 110°C приводит к появлению полос при 1666_{ам} (**Leu-Phe**) и 1674_{ам} (**Phe-Leu**) см^{-1} , а для кристаллической пленки **Leu-Phe** полоса при 1678_{кр} смещается до 1666_{кр} см^{-1} . Эти полосы характерны для хинонов [133], содержащих в цикле две группы C=O, что указывает на начало процесса циклизации. В случае кристаллической пленки **Phe-Leu** полоса при 1674 см^{-1} не меняется до 120 °C, поскольку температура циклизации **Phe-Leu** выше, чем у **Leu-Phe**, рис. 38. Для **Leu-Phe** в кристаллической пленке в результате нагрева снижается интенсивность полос, соответствующих колебаниям группы NH_3^+ 1529_{кр} и 1260_{кр} см^{-1} и группы COO^- 1435_{кр} см^{-1} . На основании этих данных можно

предположить, что дипептид переходит из цвиттер-ионной формы в нейтральную. Нагревание пленок **Leu-Phe** до 120 °С приводит к исчезновению полос Амида I и Амида II в спектре кристаллической пленки, тогда как полоса Амида I остается в спектре аморфной пленки. По-видимому, это связано с тем, что нейтральная форма дипептида, образующаяся в кристаллической пленке, сразу превращается в циклический продукт. Таким образом, переход дипептида из заряженной формы в нейтральную является лимитирующей стадией реакции циклизации в случае кристаллов.

Нагревание пленок **Leu-Phe** до 140 °С и пленок **Phe-Leu** до 150 °С, рис. 45д, 45е, приводит к завершению реакции циклизации и образованию идентичных продуктов, полученных из аморфных и кристаллических пленок. В спектрах резко возрастает интенсивность пика при 1454 см⁻¹, связанного с вырождением колебаний СН-групп в цикле [134]. Аналогичный эффект циклической структуры проявляется в увеличении интенсивности пика при 1666 (**Leu-Phe**) и 1668 (**Phe-Leu**) см⁻¹, а также при 3196 см⁻¹ [133].

Высказанное в настоящей работе предположение о том, что лимитирующей стадией реакции циклизации дипептидов в твердой фазе является переход из цвиттер-ионной формы в молекулярную позволяет уточнить роль воды как катализатора таких реакций, предположение о которой было высказано в работах [63-65]. В начальный момент реакции, когда в системе отсутствуют свободные молекулы воды, возможно протекание реакции для малой части молекул дипептидов, находящихся в молекулярной форме в твердой фазе, рис. 46а, с формированием циклического продукта, рис. 46б, и молекулы воды рис. 46в. Появление свободных молекул воды, по-видимому, переключает механизм реакции на другой путь представленный на рис. 46г. При этом согласно представлениям авторов роль молекул воды, как катализаторов заключается в переносе протона от аминогруппы к карбонильному кислороду в составе карбоксильной группы. Мы полагаем, что молекулы воды также обеспечивают перенос протона от аммонийной группы

к карбоксилат аниону, что соответствует переходу от цвиттер-ионной формы, содержащей NH_3^+ и COO^- , к молекулярной, рис. 46д.

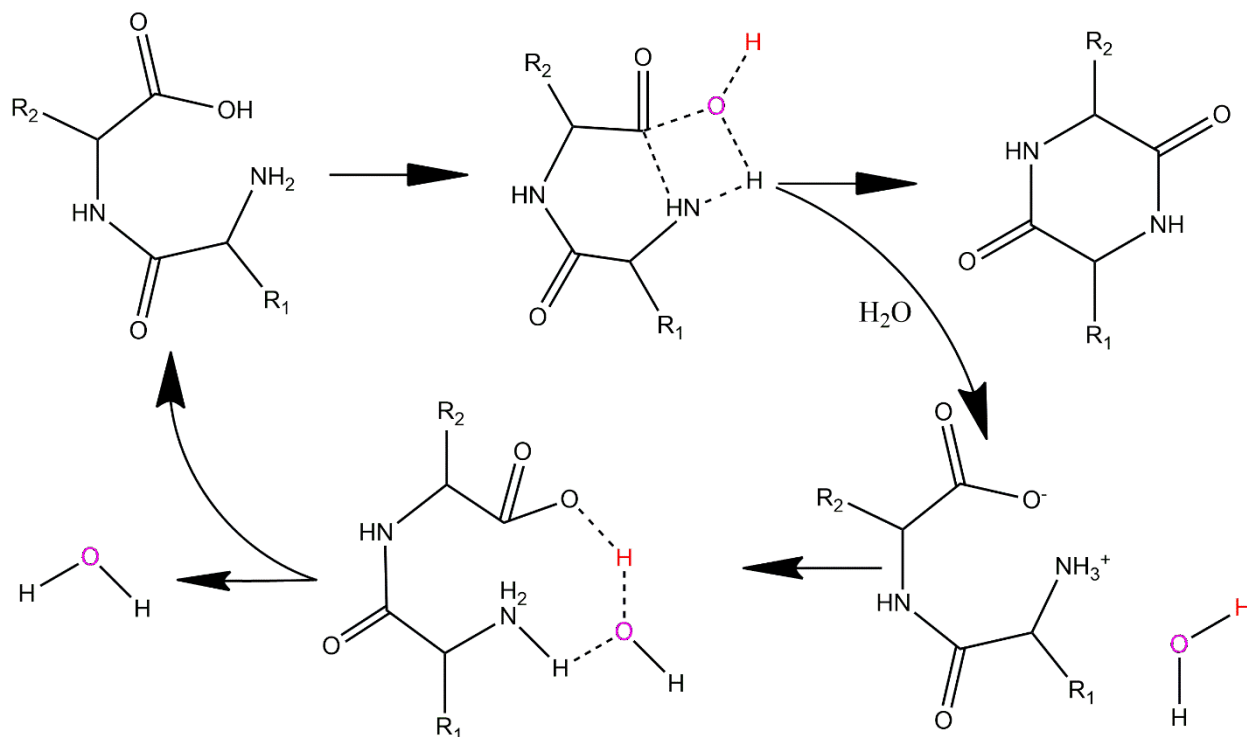


Рисунок 46 – Предполагаемый механизм циклизации линейных дипептидов.

3.4 Результаты масс-спектрометрического исследования

Согласно данным ГХ-МС в результате нагрева порошков дипептидов выше температуры реакции: **Ile-Ala** 225°C, **Ala-Ile** 237 °C, **Leu-Phe** 180°C, **Phe-Leu** 200°C, – образуется один компонент, рис. 41а,в,д,ж. Масс-спектры продуктов реакции, рис. 47б,г,е,з, хорошо согласуется с данными масс-спектрометрии для (3*S*,6*S*)-3-бутил-6-метилпиперазин-2,5-диона, являющегося изомером *цикло*(**Ile-Ala**)) [139], в случае **Ile-Ala** и **Ala-Ile**, и с данными для 3-бензил-6-изобутил-2,5-пиперазиндиона [139] (*цикло*(**Leu-Phe**)) в случае **Leu-Phe** и **Phe-Leu**.

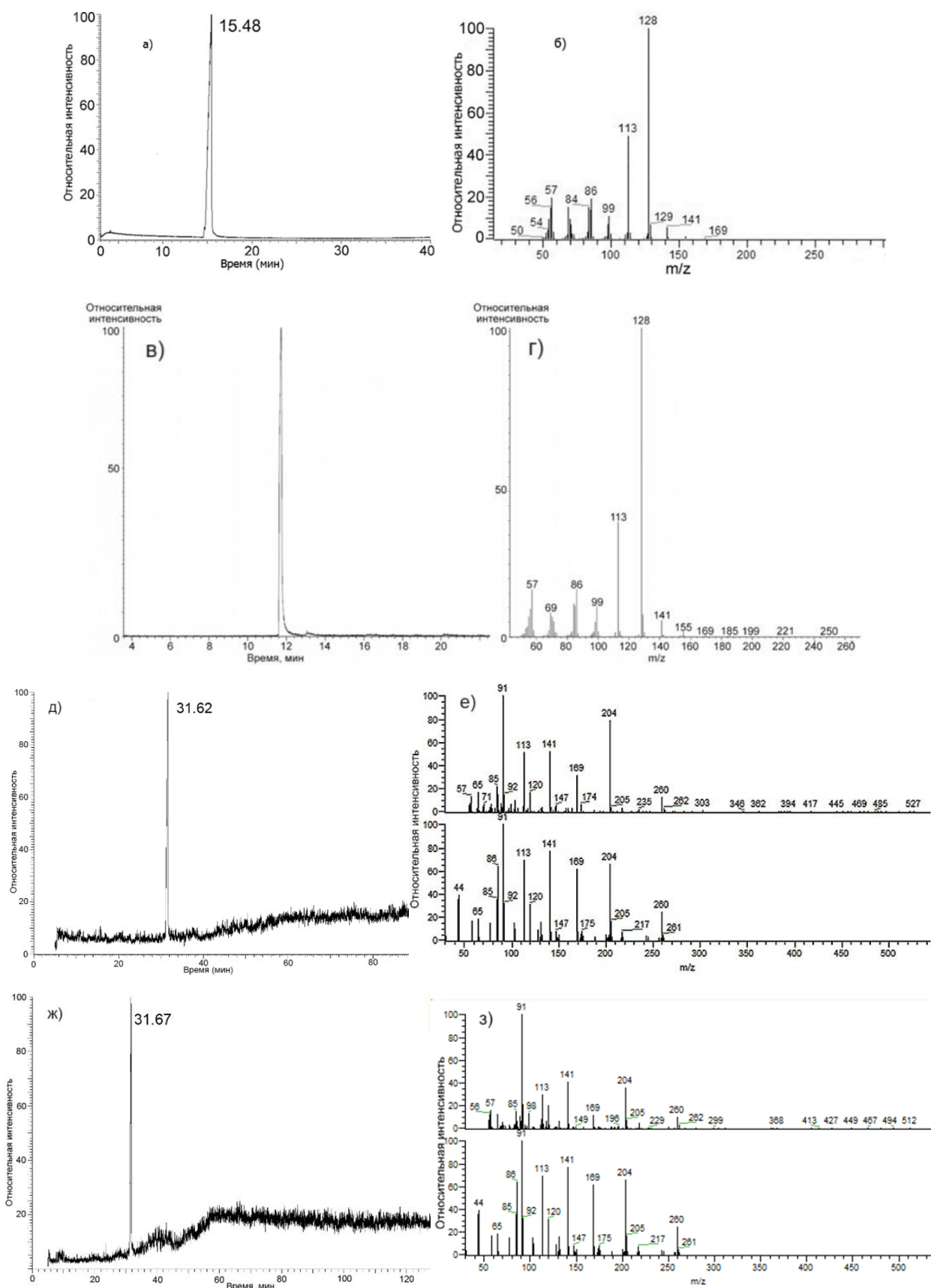


Рисунок 47 – Данные ГХ для продукта нагревания: а) **Pe-Ala**, в) **Ala-Pe** д) **Leu-Phe**, ж) **Phe-Leu**. Данные МС для продукта нагревания: б) **Pe-Ala**, г) **Ala-Pe** е) **Leu-Phe**, з) **Phe-Leu**.

Согласно данным электроспрей-ионизационной масс-спектрометрии, рис. 48, для продуктов нагревания изученных дипептидов наблюдаются сигналы $m/z = 185,2$ $[M+H]^+$ и $m/z = 369,2$ $[2M+H]^+$ (**Ile-Ala**), $m/z = 261,1$ $[M+H]^+$ и $m/z = 521,3$ $[2M+H]^+$ (**Leu-Phe** и **Phe-Leu**). Похожие результаты были получены для продуктов нагрева **Leu-Phe** и **Phe-Leu** с помощью времяпролетной МАЛДИ масс-спектрометрии: $m/z = 261,1$ $[M+H]$ and $283,1$ $[M+Na]$, рис. 49а,б. Следует отметить, что в полученных спектрах не наблюдаются сигналы тетрамеров с $m/z = 521$ и 543 . МАЛДИ масс-спектр также был получен для продукта нагревания **Leu-Val**, рис. 49в. В масс-спектре присутствуют сигналы $m/z = 213$, 235 и 251 , соответствующие протонированной и катионизированным формам *цикло*(**Leu-Val**).

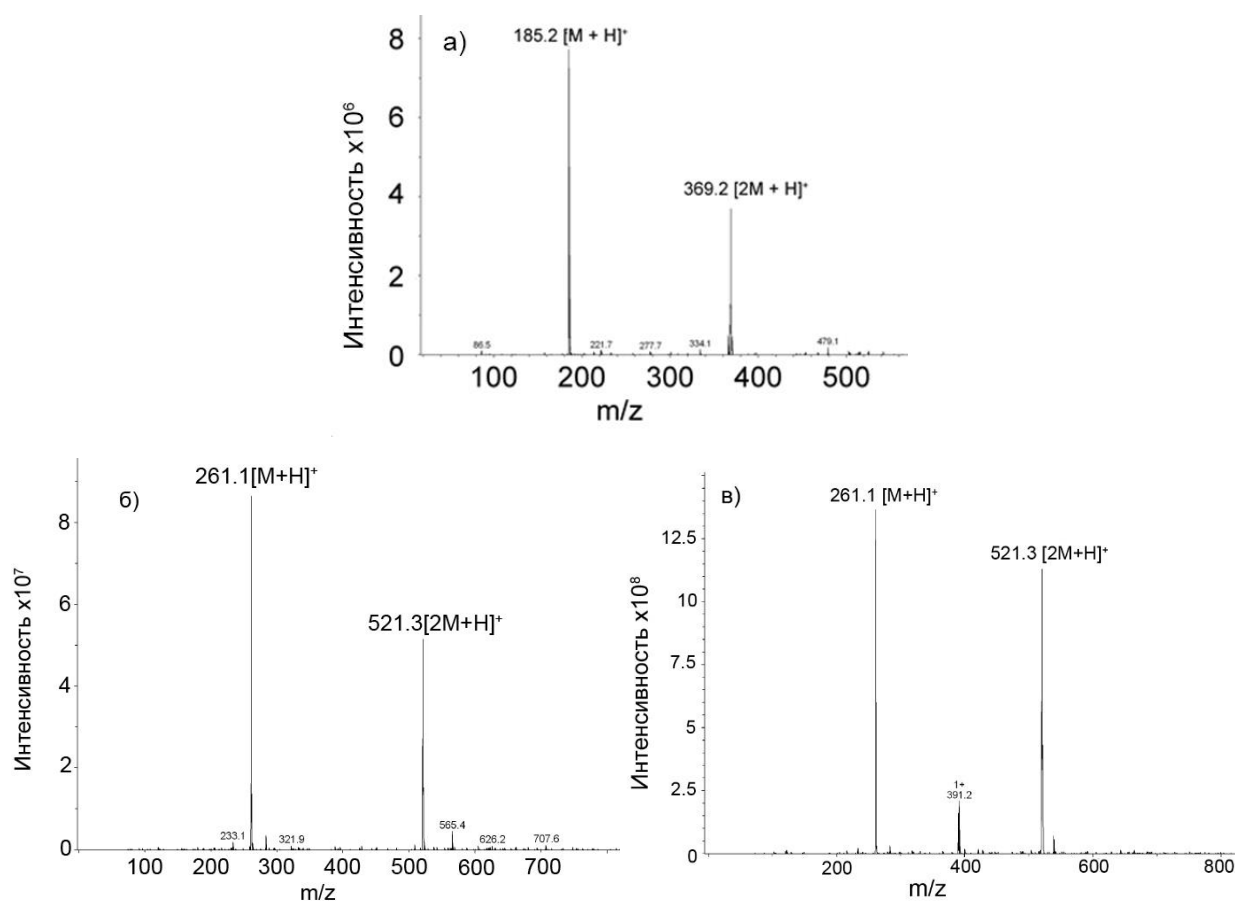


Рисунок 48 – Результаты электроспрей-ионизационной масс-спектрометрии для продуктов нагревания дипептидов: а) **Ile-Ala**, б) **Leu-Phe**, в) **Phe-Leu**.

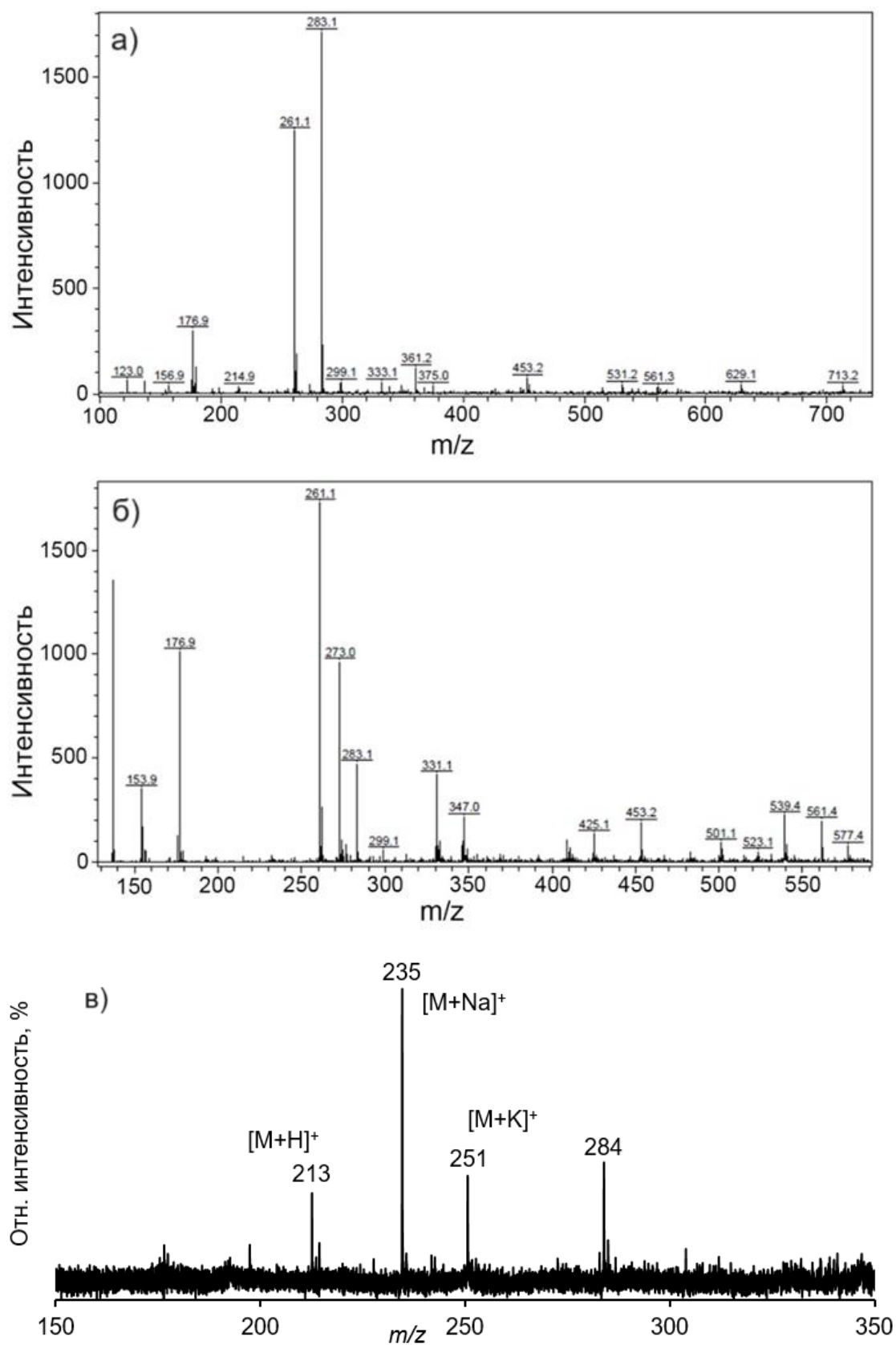


Рисунок 49 – Результаты MALDI TOF масс-спектрометрии: а) *цикло*(**Leu-Phe**), б) *цикло*(**Phe-Leu**), в) *цикло*(**Leu-Val**).

Для *цикло*(**Leu-Phe**) и *цикло*(**Phe-Leu**) были получены хроматограммы с использованием метода хирально-фазовой ВЭЖХ, приложение 3. Полученные данные подтверждают частичную эпимеризацию *цикло*(**Leu-Phe**), тогда как циклизация **Phe-Leu** привела к образованию единственного энантиоочистого продукта. Таким образом, для дипептидов **Leu-Phe** и **Phe-Leu** впервые было установлено, что оптическая чистота продукта циклизации зависит от порядка следования аминокислотных остатков в линейных молекулах дипептидов.

3.5 Результаты спектроскопии кругового дихроизма

Продукты циклизации **Leu-Phe** и **Phe-Leu** были дополнительно охарактеризованы методом кругового дихроизма, для доказательства наличия рацемизации/эпимеризации в процессе твердофазной реакции циклизации **Leu-Phe**. Спектры кругового дихроизма, полученные для растворов *цикло*(**Leu-Phe**) и *цикло*(**Phe-Leu**) в ГФИП с одинаковой концентрацией, приведены на рис. 50. Было установлено, что в спектре *цикло*(**Leu-Phe**) присутствует широкий минимум при 210 нм и максимум при 193 нм, для спектра *цикло*(**Phe-Leu**) значения составили 213 нм и 194 нм. Такое различие в спектрах продуктов циклизации хорошо согласуется с ранее высказанным предположением о частичной рацемизации в случае *цикло*(**Leu-Phe**).

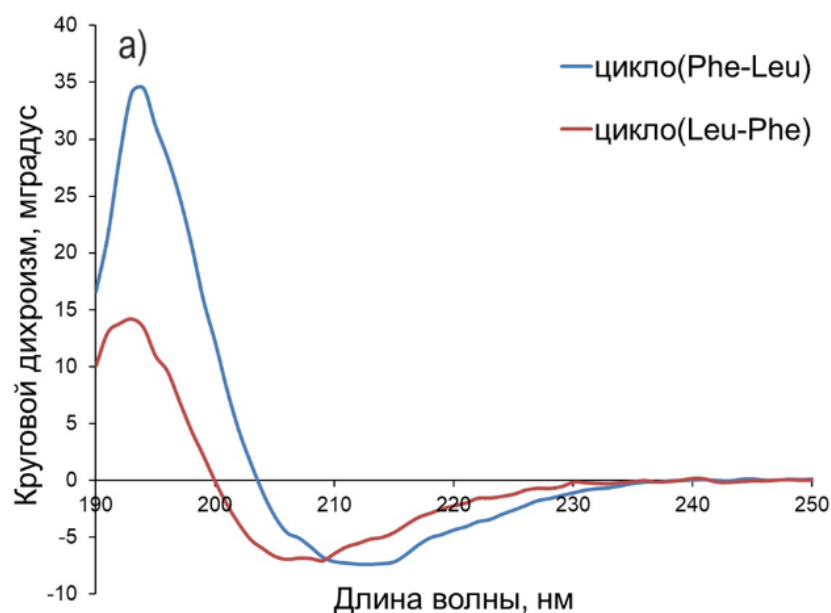


Рисунок 50 – КД спектры продуктов нагревания **Leu-Phe** и **Phe-Leu** выше температуры реакции.

3.6 Результаты нингидринового теста

В качестве дополнительного теста, подтверждающего образование циклической структуры, был использован нингидриновый тест на примере дипептида **Ile-Ala** и продукта его нагревания до 225°C, рис. 51. Было установлено, что раствор исходного дипептида окрашивается в фиолетовый цвет, что свидетельствует о наличии первичных аминов, в то время как раствор продукта реакции не меняет окраски, что является ещё одним подтверждением формирования циклической структуры.

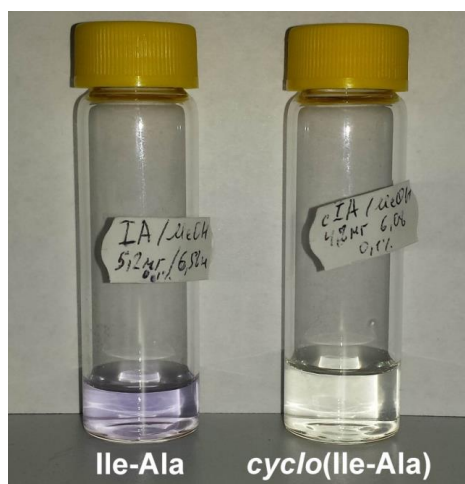


Рисунок 51 – Результаты нингидринового теста для **Ile-Ala** и продукта его нагревания до 225°C.

Таким образом, данные, полученные с использованием спектроскопических (ИК, ЯМР), ряда масс-спектрометрических и химических методов подтверждают циклизацию дипептидов, с образованием соответствующих циклических аналогов, представляющих собой производные 2,5-дикетопиперазинов.

3.7 Зависимость температуры начала циклизации от размера боковых заместителей дипептидов

Для установления связи между температурой начала реакции и размером заместителей в качестве параметра, характеризующего размер боковых групп, была использована величина молекулярной рефракции (MR_D). Ранее было показано, что MR_D является хорошим параметром, характеризующим размер

молекулы «гостя», при поиске соотношений типа «структура-свойство» для соединений включения [14,70].

Молекулярные рефракции боковых заместителей дипептидов R_1 и R_2 были рассчитаны по аддитивной схеме:

$$MR_D^R = \sum_i \delta_i \quad (18)$$

где δ_i – рефракция атома или группы, входящих в состав соответствующего заместителя.

Структура заместителей R_1 и R_2 , рис. 52, их молекулярная рефракция MR_D^{R1} и MR_D^{R2} , суммарная молекулярная рефракция двух заместителей ΣMR_D^R и температуры начала твердофазной циклизации T_{onset} приведены в таблице 6. Корреляция между температурами начала и рассчитанными значениями ΣMR_D^R показана на рис. 53.

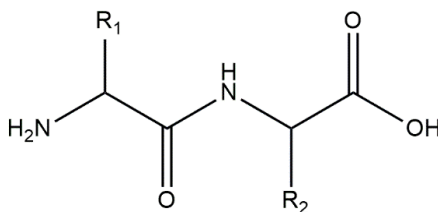


Рисунок 52 – Общая формула дипептидов.

Таблица 6 – Структура и молекулярная рефракция заместителей в различных дипептидах и температуры начала циклизации дипептидов в твердой фазе.

Дипептид	R_1	R_2	MR_D^{R1} , см ³ /мо ль	MR_D^{R2} , см ³ /моль	ΣMR_D^R , см ³ /моль	T_{onset} , °C
Gly-Gly	H–	H–	1,1	1,1	2,2	228
Ile-Ala	втор-С ₄ H ₉ –	CH ₃ –	19,572	5,718	25,29	206
Ala-Ile	CH ₃ –	втор-С ₄ H ₉ –	5,718	19,572	25,29	228
Leu-Val	изо-С ₄ H ₉ –	изо-С ₃ H ₇ –	19,572	14,954	34,526	180
Leu-Leu	изо-С ₄ H ₉ –	изо-С ₄ H ₉ –	19,572	19,572	39,144	177 [104]
Leu-Phe	изо-С ₄ H ₉ –	С ₆ H ₅ CH ₂ –	19,572	29,825	49,397	134
Phe-Leu	С ₆ H ₅ CH ₂ –	изо-С ₄ H ₉ –	29,825	19,572	49,397	152
Phe-Phe	С ₆ H ₅ CH ₂ –	С ₆ H ₅ CH ₂ –	29,825	29,825	59,65	147 [13]

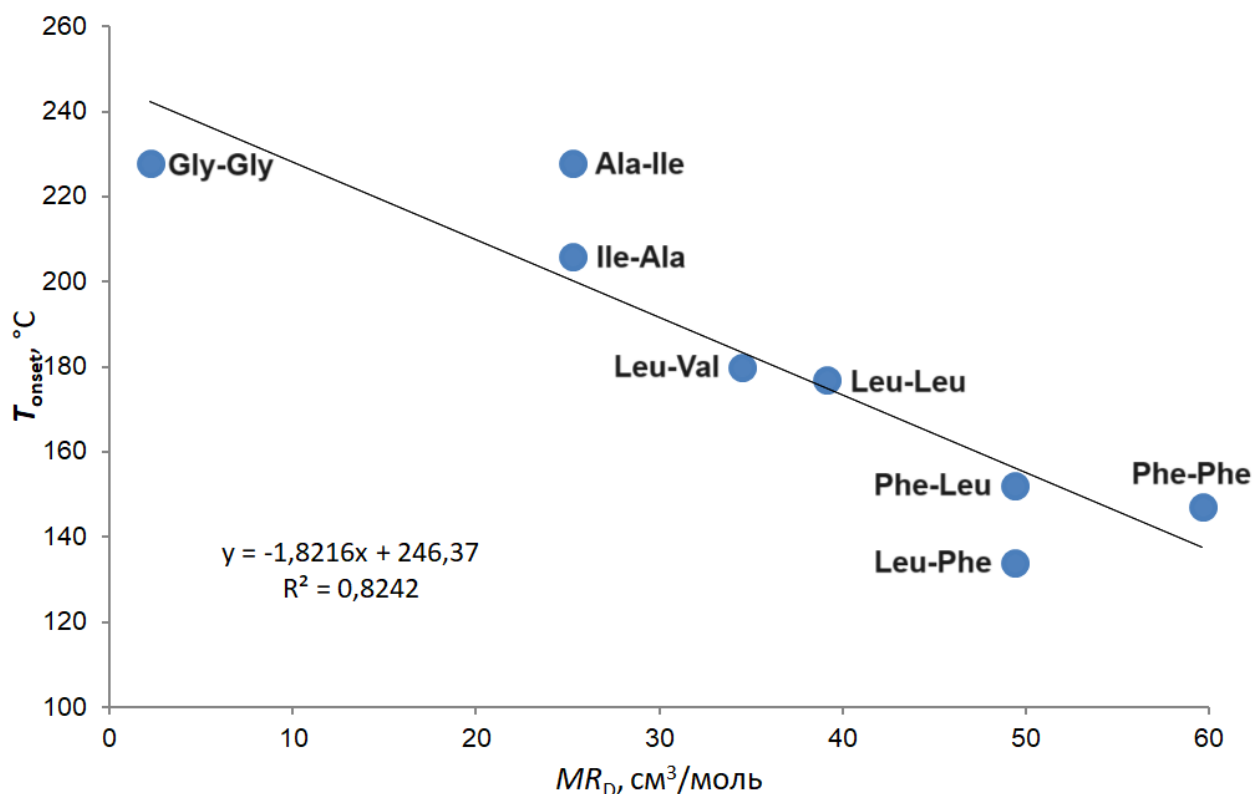


Рисунок 53 – Корреляция между температурами начала циклизации дипептидов и молекулярной рефракцией заместителей в их молекулах.

Согласно полученному соотношению температуру начала циклизации дипептидов в твердом состоянии можно приблизительно оценить по уравнению (19):

$$T_{onset} = a \sum MR_D^R + b \quad (19)$$

где $a = -1,8216$, $b = 246,37$.

Отклонение температуры начала циклизации **Leu-Phe** может быть связано с эимеризацией продукта реакции в процессе твердофазной циклизации. Также следует отметить тот факт, что размер пор в кристаллах дипептидов **Phe-Leu** и **Ala-Ile** больше, чем у **Leu-Phe** и **Ile-Ala** соответственно [69]. Стенки пор большего размера могут выступать в качестве своеобразных радиаторов охлаждения при нагревании, что может быть причиной увеличения температуры начала реакции в случае **Phe-Leu** и **Ala-Ile**.

3.8 Результаты кинетического анализа циклизации дипептидов

Кинетический анализ твердофазной циклизации дипептидов **Gly-Gly** и **Ile-Ala** проводился для первой ступени потери массы, рис. 33а,в, для **Ala-Ile** для второй ступени, рис. 33г, для **Leu-Val**, **Leu-Phe** и **Phe-Leu** – для первой ступени потери массы, но для предварительно осушенных образцов, рис. 33б,д,е,38. Данные для кинетического анализа были получены из кривых ТГ, измеренных при различных скоростях нагрева: 2, 5, 10 и 15 К/мин для всех изученных дипептидов, кроме **Ala-Ile** (5, 10, 15, 20, 25 К/мин) и **Leu-Val** (0,5, 1, 2, 5 К/мин). Температурные интервалы, в которых проводился расчёт кинетических параметров с соответствующими скоростями нагрева, приведены в таблицах 7-9 и на рис. 54.

Таблица 7 – Температурные интервалы на ТГ кривых, использовавшиеся для расчёта кинетических параметров реакции циклизации дипептидов в твердой фазе.

Дипептид	Скорость нагрева, К/мин			
	2	5	10	15
Температурный интервал, °С				
Gly-Gly	193-245	206-256	210-266	217-269
Ile-Ala	188-215	194-224	199-230	202-235
Leu-Phe	101-167	100-175	109-178	113-181
Phe-Leu	83-195	80-201	94-203	100-204

Таблица 8 – Температурные интервалы на ТГ кривых, использовавшиеся для расчёта кинетических параметров реакции циклизации **Ala-Ile** в твердой фазе.

Дипептид	Скорость нагрева, К/мин				
	5	10	15	20	25
Температурный интервал, °С					
Ala-Ile	216-233	220-242	226-246	230-251	232-251

Таблица 9 – Температурные интервалы на ТГ кривых, использовавшиеся для расчёта кинетических параметров реакции циклизации **Leu-Val** в твердой фазе.

Дипептид	Скорость нагрева, К/мин			
	0,5	1	2	5
Температурный интервал, °С				
Leu-Val	153-177	161-181	164-184	168-191

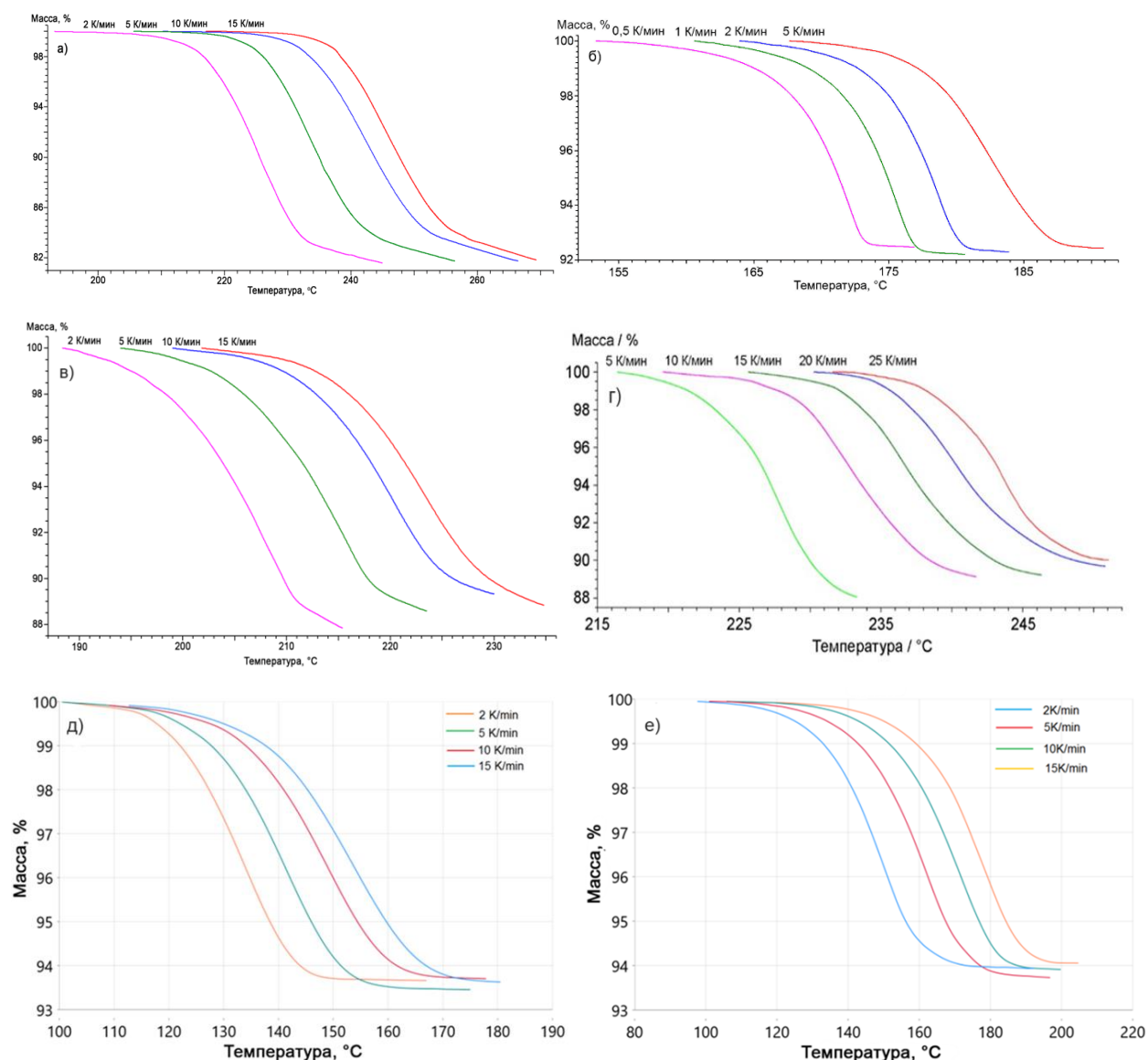


Рисунок 54 – Исследуемые участки ТГ-кривых а) **Gly-Gly**, б) **Leu-Val**, в) **Ile-Ala**, г) **Ala-Ile**, д) **Leu-Phe** и е) **Phe-Leu** для различных скоростей нагрева.

На рис. 55 представлена зависимость логарифма скорости конверсии от обратной температуры, полученная с использованием метода Фридмана.

Данные зависимости были получены при дифференцировании данных термогравиметрии по времени с построением их в зависимости от обратной температуры. Большой наклон экспериментальных кривых по сравнению с линиями изо-конверсии в начале реакции указывает на автокаталитический характер процесса.

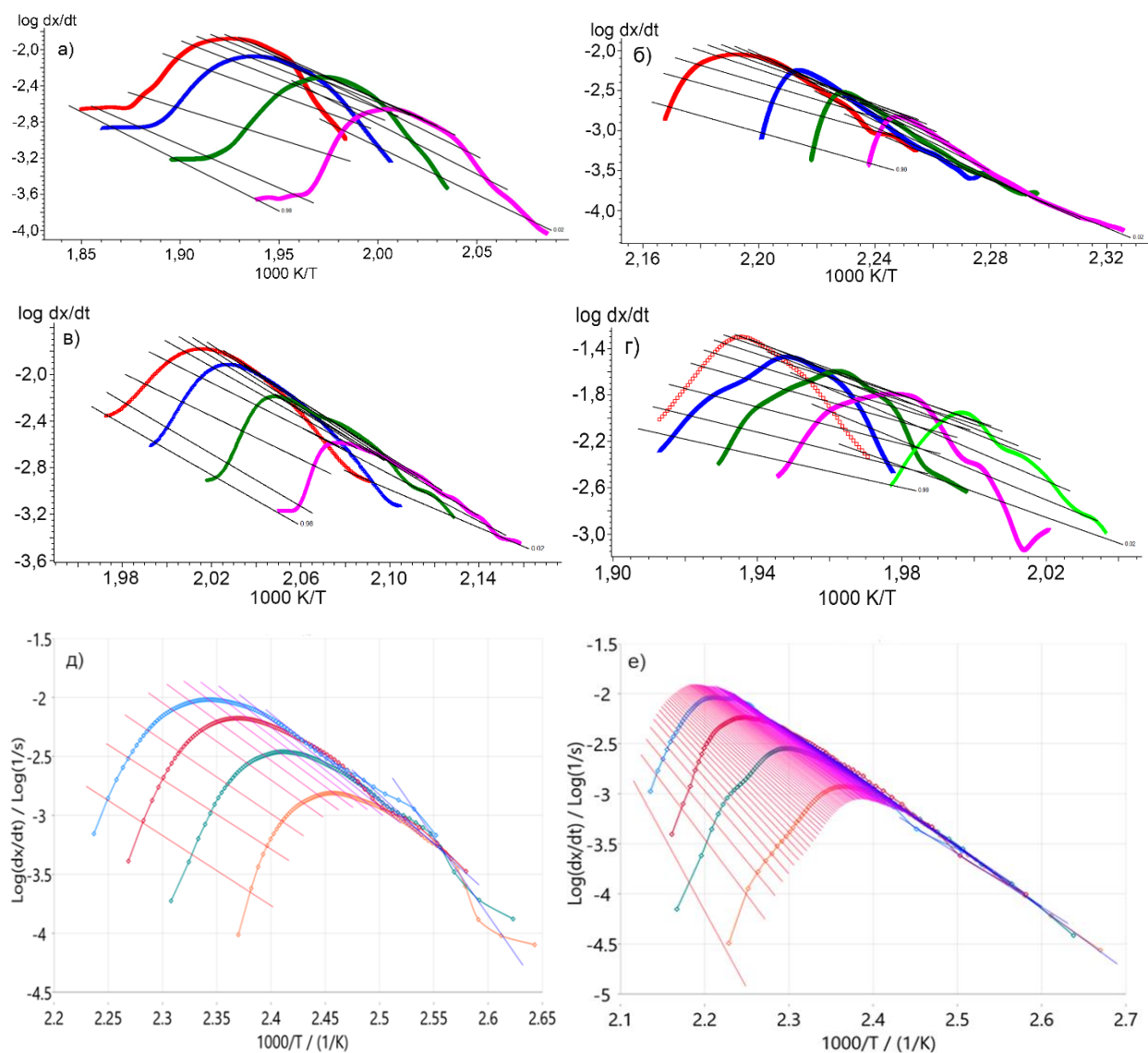


Рисунок 55 – Зависимость логарифма скорости конверсии от обратной температуры, полученная при помощи метода Фридмана для а) **Gly-Gly**, б) **Leu-Val**, в) **Ile-Ala**, г) **Ala-Ile**, д) **Leu-Phe** и е) **Phe-Leu**.

Зависимости энергии активации и логарифма предэкспоненциального множителя от степени конверсии, полученные при помощи метода Фридмана, приведены на рис. 56.

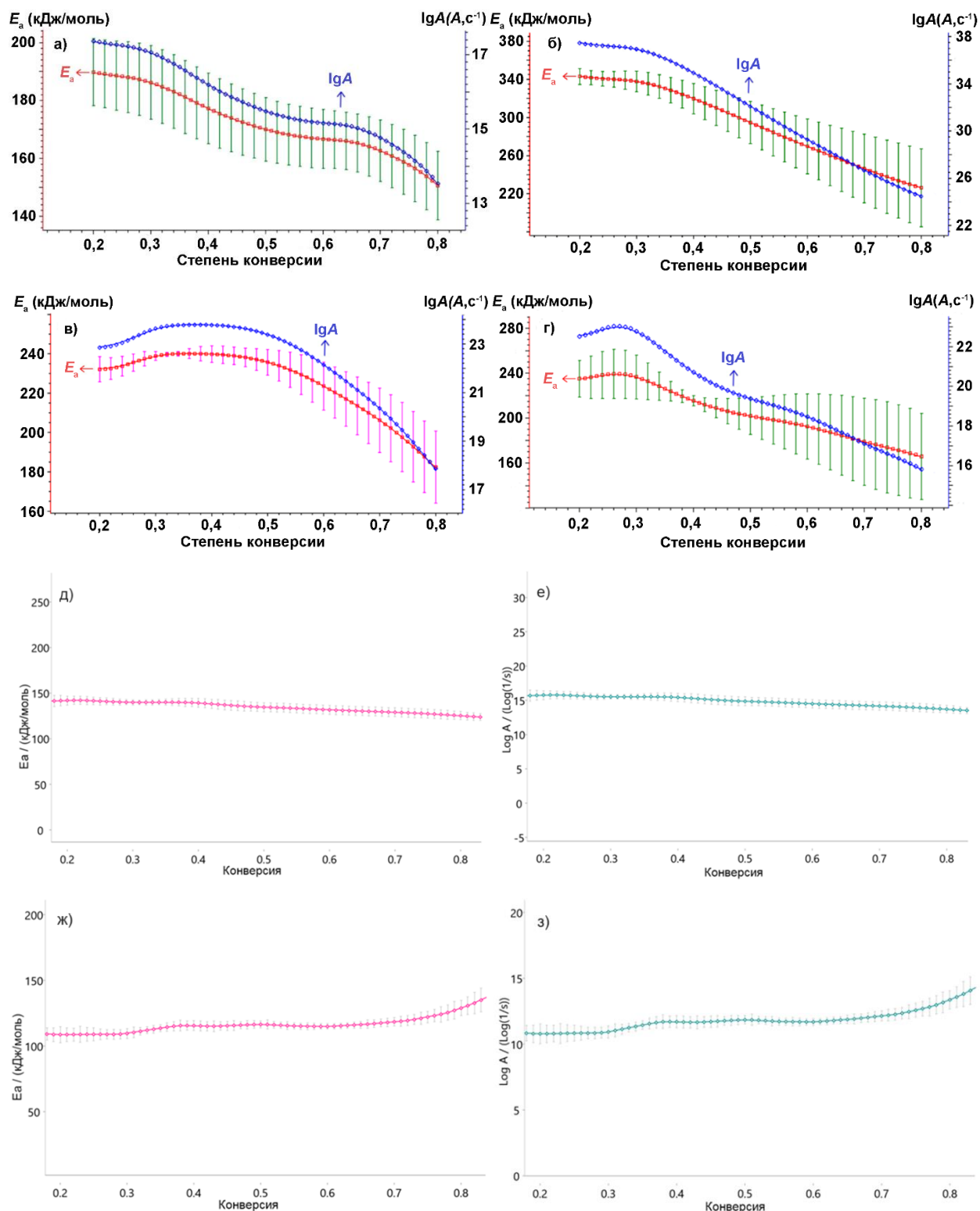


Рисунок 56 – Зависимость энергии активации E_a и логарифма константы Аррениуса от степени превращения α полученная при помощи метода Фридмана а) Gly-Gly, б) Leu-Val, в) Ile-Ala, г) Ala-Ile, д,е) Leu-Phe, ж,з) Phe-Leu. Вертикальные линии показывают ошибки расчета.

Полученные значения кинетических параметров, в диапазоне степеней конверсии 0,2-0,8: энергии активации и логарифма предэкспоненциального множителя представлены в таблице 10.

Результаты кинетического анализа дипептидов **Gly-Gly**, **Leu-Val**, **Ile-Ala** и **Ala-Ile** методом Озавы-Флинна-Уолла (ОФУ) приведены на рис. 57. Определённые значения энергии активации и логарифма предэкспоненциального множителя при степенях конверсии 0,2-0,8 приведены в таблице 10.

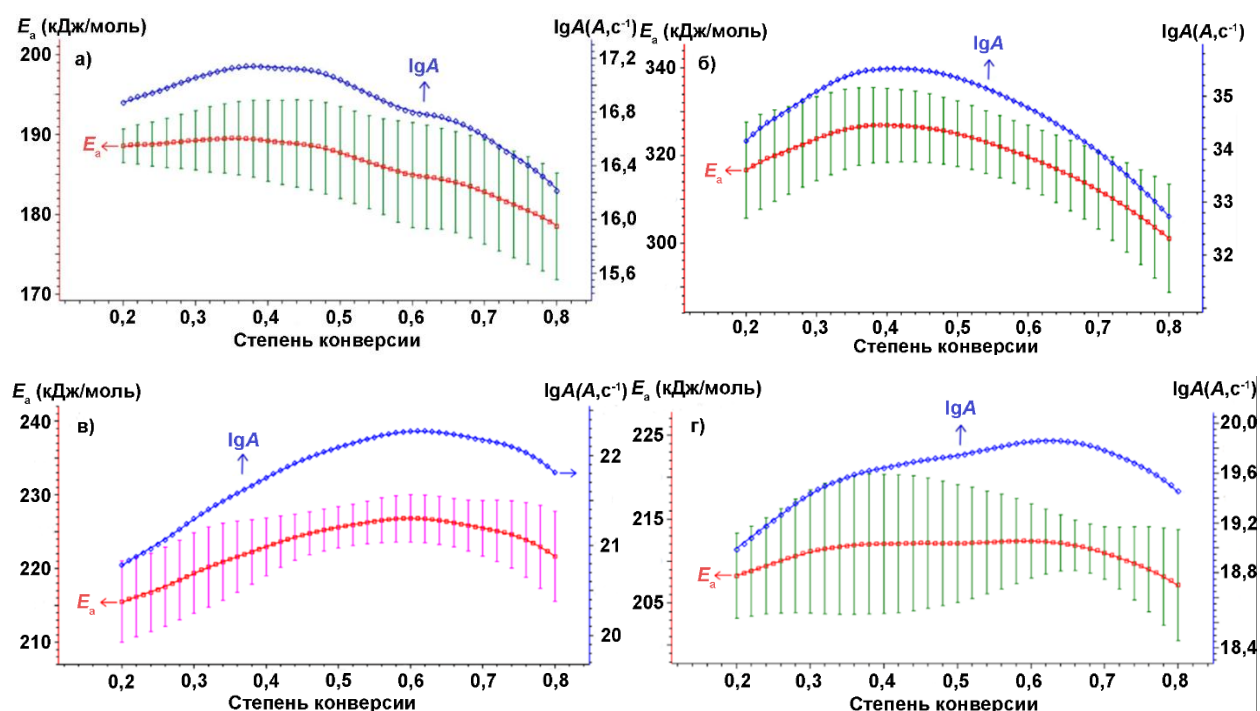


Рисунок 57 – Зависимость энергии активации E_a и логарифма константы Аррениуса от степени превращения α полученная при помощи метода Озавы-Флинна-Уолла для а) **Gly-Gly**, б) **Leu-Val**, в) **Ile-Ala** и г) **Ala-Ile**.

Вертикальные линии показывают ошибки расчета.

Результаты кинетического анализа реакции циклизации дипептидов **Leu-Phe** и **Phe-Leu**, полученные методом Киссинджера-Акахиры-Сунозы приведены на рис. 58. Определённые значения энергии активации и логарифма предэкспоненциального множителя при степенях конверсии 0,2-0,8 приведены в таблице 10.

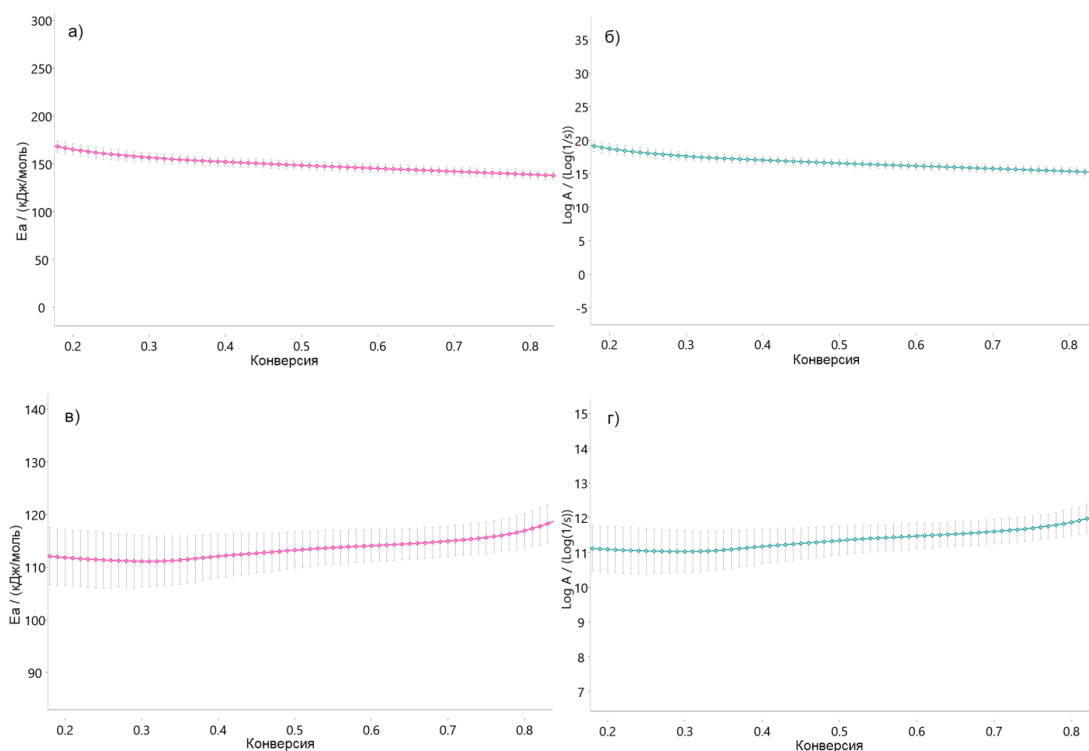


Рисунок 58 – Зависимость энергии активации E_a а) **Leu-Phe**, в) **Phe-Leu**) и логарифма константы Аррениуса б) **Leu-Phe**, г) **Phe-Leu**) от степени превращения α полученная при помощи метода Киссинджера-Акахиры-Сунозы. Вертикальные линии показывают ошибки расчета.

Таблица 10 – Значения кинетических параметров, определённые безмодельными методами.

Дипептид	Метод Фридмана		Методы Озавы-Флинна-Уолла и *Киссинджера-Акахиры-Сунозы	
	E_a , кДж/ моль	$\lg A$, A / c^{-1}	E_a , кДж/ моль	$\lg A$, A / c^{-1}
Gly-Gly	172±12	15,7	186±5	16,8
Ile-Ala	223±9	22,0	223±5	21,8
Ala-Ile	204±23	19,5	210±6	19,8
Leu-Val	291±23	31,7	318±9	34,5
Leu-Phe	135±5	14,9	*147±5	*16,4
Phe-Leu	118±4	12,0	*114±4	*11,4

Для поиска кинетических моделей, описывающих процессы циклизации изученных дипептидов, был использован метод множественной линейной регрессии. Проведенный анализ позволил установить, что в соответствии с F -

критерием лучшим топохимическим уравнением для описания циклизации изученных дипептидов является уравнение CnB, которое используется для описания реакции n-го порядка с автокатализом:

$$f(\alpha) = (1 - \alpha)^n(1 + k_{cat}\alpha) \quad (20)$$

где α – степень конверсии, n – порядок реакции, k_{cat} – автокаталитический множитель.

Для **Gly-Gly** было найдено, что процесс его циклизации хорошо описывается уравнением Bna (расширенное уравнение Праута-Томпкинса):

$$f(\alpha) = (1 - \alpha)^n \alpha^m \quad (21)$$

где α – степень конверсии, n – порядок реакции по реагенту, m – порядок реакции по продукту.

Кинетические параметры, рассчитанные с использованием данных моделей для дипептидов, изученных в настоящей работе и литературе, а также статистические параметры качества применения моделей, приведены в таблице 11. Корреляция экспериментальных точек ТГ кривых и теоретических кривых, рассчитанных по уравнениям CnB и Bna, показана на рис. 59.

Таблица 11 – Кинетические параметры реакции циклизации дипептидов согласно модельным методам.

Объект	Уравнение $A \rightarrow B$	E_a , кДж/ моль	Log A	Порядок реакции	k_{cat}	Коэф. Корреляц.
Gly-Gly	Bna	185	17,4	1,49	0,62	0,999
Ile-Ala	CnB	218	21,0	1,07	0,68	0,999
Ala-Ile	CnB	217	20,0	1,2	1,35	0,998
Leu-Val	CnB	313	33,7	0,71	0,71	0,999
Leu-Leu [104]	CnB	434	48,0	1,46	-	0,999
Leu-Phe	CnB	147	16,4	1,32	0,01	0,996
Phe-Leu	CnB	111	11,0	1,18	0,26	0,999
Phe-Phe [13]	CnB	148	15,4	0,46	-	0,998

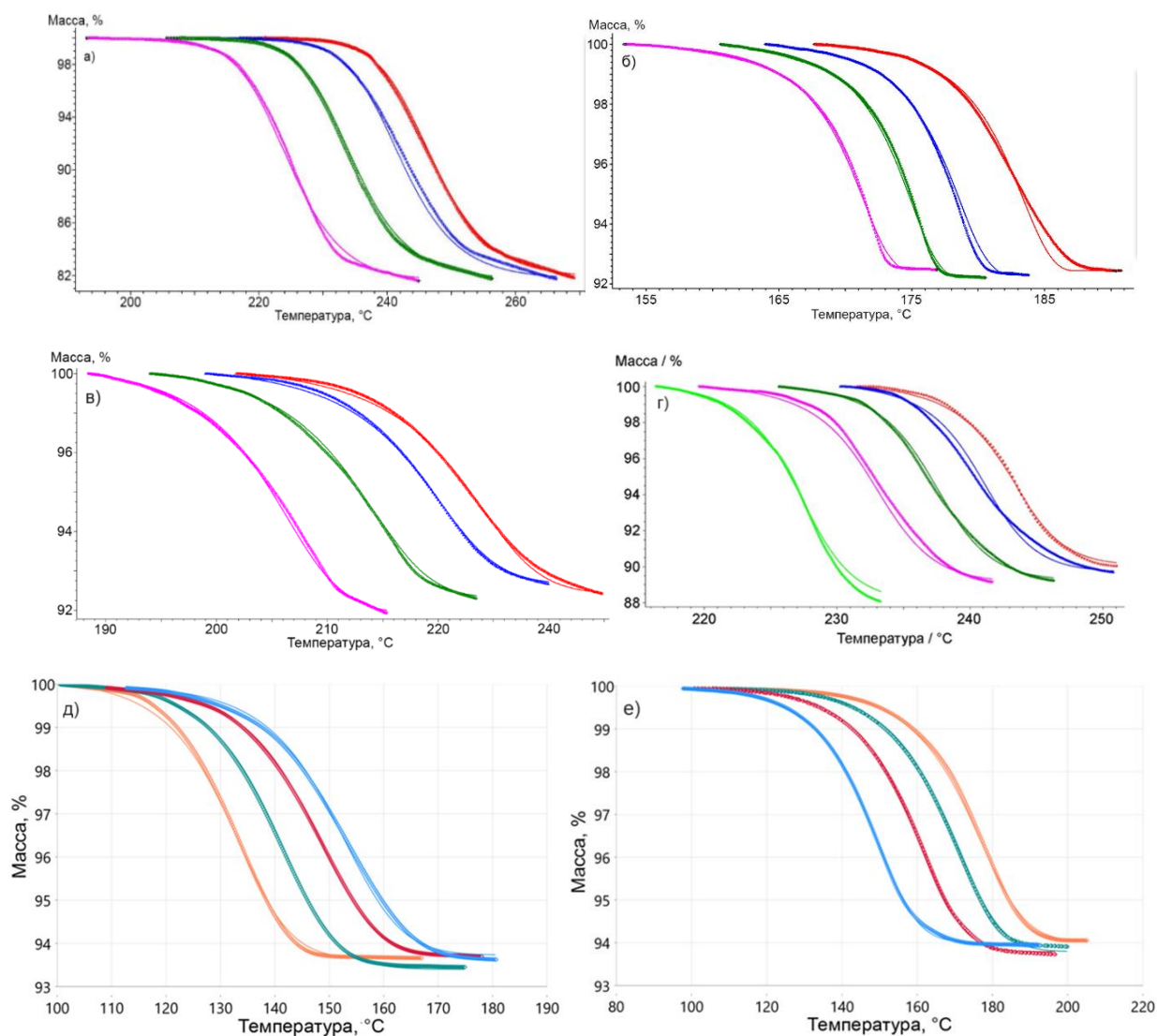


Рисунок 59 – Корреляция экспериментальных точек ТГ кривых а) **Gly-Gly**, б) **Leu-Val**, в) **Ile-Ala**, г) **Ala-Ile**, д) **Leu-Phe**, е) **Phe-Leu** и теоретических кривых, рассчитанных по уравнению CnB (Bna в случае **Gly-Gly**).

Результаты кинетического анализа, полученные с использованием безмодельных и модельных методов, хорошо согласуются друг с другом и могут быть использованы для описания кинетики процессов циклизации дипептидов и дальнейшей оптимизации твердофазного синтеза их циклических аналогов.

Проведенный анализ зависимости энергии активации реакции циклизации в твердой фазе дипептидов от их строения позволил установить, что с увеличением размеров алифатических боковых заместителей

аминокислотных остатков в составе дипептидов в ряду **Gly-Gly**, **Ile-Ala**, **Ala-Ile**, **Leu-Val**, **Leu-Leu** в общем случае происходит увеличение энергии активации их циклизации, рис. 60.

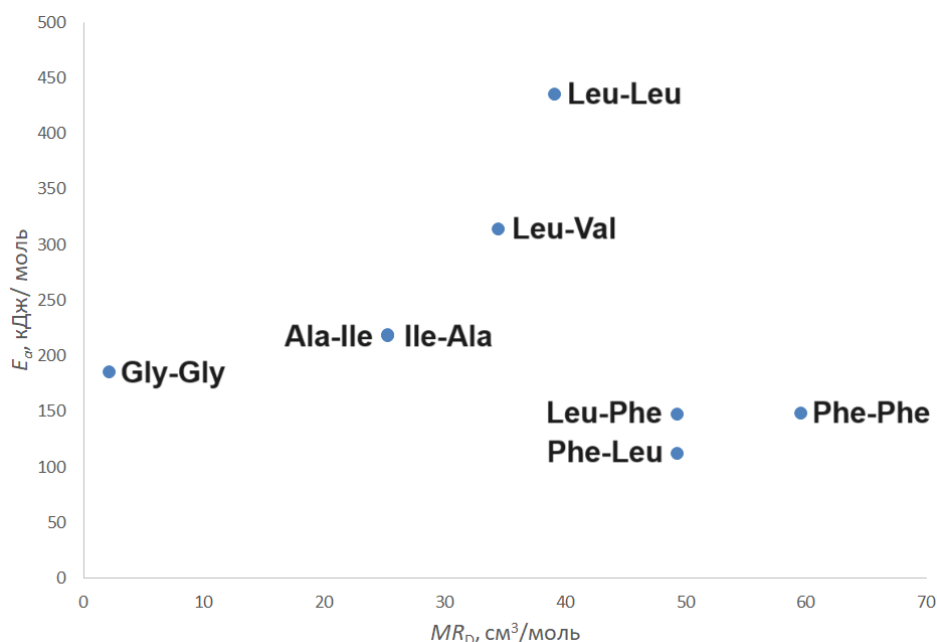


Рисунок 60 – Зависимость энергии активации циклизации дипептидов и величины молекулярной рефракции заместителей в их молекулах.

Замена одной алифатической аминокислоты на ароматический остаток в дипептиде на примере **Leu-Phe** и **Phe-Leu**, приводит к резкому снижению энергии активации реакции, рис. 60. При этом замена второй алифатической аминокислоты на ароматическую практически не оказывает влияния на энергию активации твердофазной реакции циклизации, как видно для ряда дипептидов **Leu-Phe**, **Phe-Leu** и **Phe-Phe**.

Следует также отметить, что кинетические параметры зависят от последовательности аминокислотных остатков в дипептидах **Leu-Phe** и **Phe-Leu**, в то время как для **Ile-Ala** и **Ala-Ile** определённые значения оказались практически одинаковыми. Разница в энергии активации циклизации **Leu-Phe** и **Phe-Leu** может быть обусловлена несколькими причинами, в том числе разницей в энергии исходных состояний. В обоих случаях наблюдаемый переход от цвиттер-ионной формы к молекулярной приводит к увеличению

энергии системы [136]. Но энергетические уровни молекулярных форм **Phe-Leu** и **Leu-Phe** различны из-за особенностей их кристаллической структуры. По данным рентгеноструктурного анализа, молекула **Phe-Leu** в цвиттер-ионной форме может образовывать до 13 межмолекулярных связей в кристалле, в то время как цвиттер-ион **Leu-Phe** в кристалле образует до 9 межмолекулярных связей [6]. Для инициирования реакции циклизации необходим разрыв таких межмолекулярных контактов и увеличение подвижности реагирующих молекул. Можно предположить, что в случае дипептида **Phe-Leu** в систему необходимо сообщить больше энергии. Этот эффект должен проявиться в виде повышения температуры начала реакции, рис. 38б,в. Соответственно, энергетический уровень исходного состояния дипептида **Phe-Leu** выше, чем энергетический уровень молекулы **Leu-Phe**. Если предположить, что переходные состояния этих реакций близки по энергии, то энергия активации реакции циклизации **Phe-Leu** должна быть ниже, что и наблюдается экспериментально, таблица 11. В настоящей работе была предпринята попытка охарактеризовать состояние твердой фазы дипептидов перед началом реакции после удаления сорбционной воды. Для этого были получены порошковые дифрактограммы исходных и осушенных дипептидов **Leu-Phe** и **Phe-Leu**, рис. 61.

3.9 Результаты порошковой рентгеновской дифрактометрии

Согласно результатам рентгеновской порошковой дифрактометрии дипептиды **Leu-Phe** и **Phe-Leu** образуют кристаллы с различной кристаллической упаковкой, рис. 61а,б. В результате удаления сорбционной воды на дифрактограмме дипептида **Phe-Leu** уменьшается число рефлексов и появляется уширенное гало, рис. 61г, что свидетельствует об его аморфизации. Таким образом, можно предположить, что общая энергия фазы **Phe-Leu** становится больше по сравнению с энергией фазы **Leu-Phe**, сохранившей большую кристалличность, рис. 61в. В результате этого, при условии близости по энергии переходных состояний, энергия активации реакции циклизации **Phe-Leu** уменьшается, рис. 62.

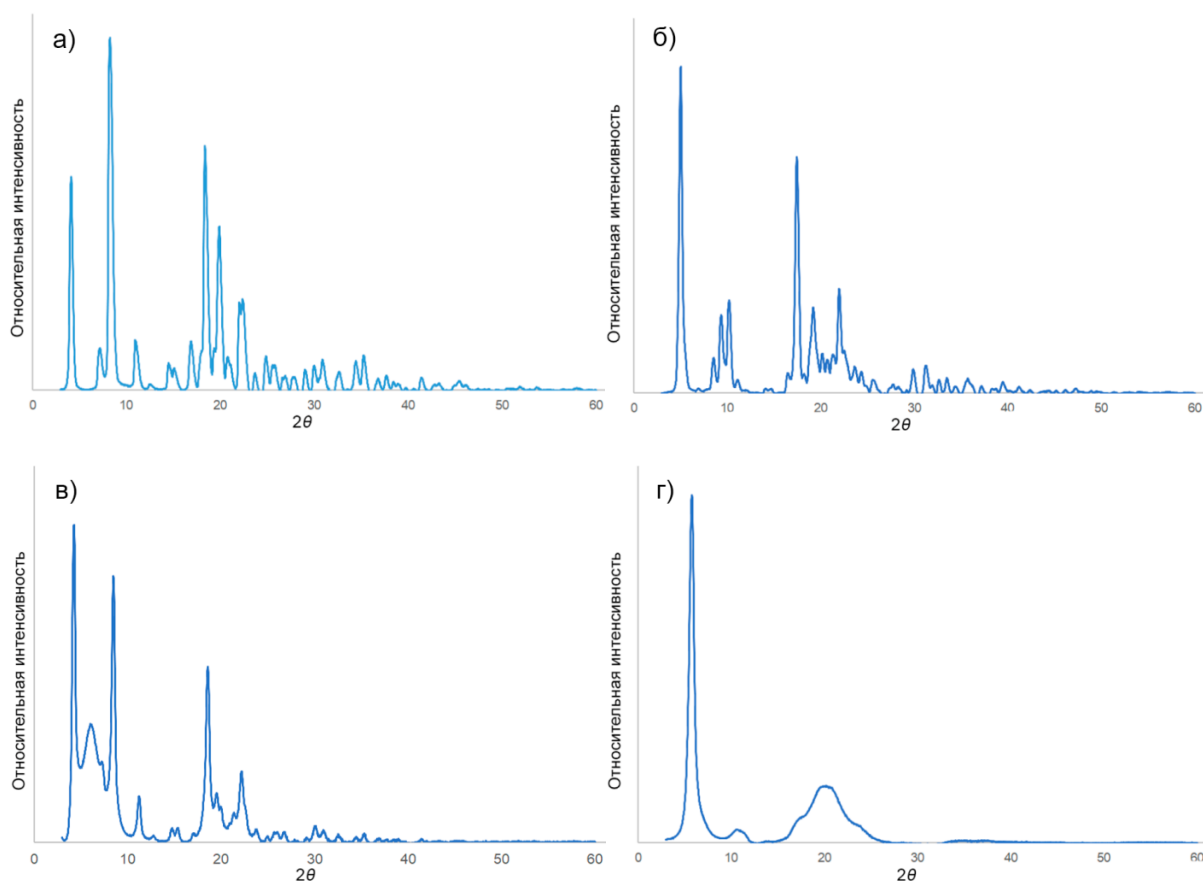


Рисунок 61 – Порошковые дифрактограммы исходных дипептидов а) **Leu-Phe**, б) **Phe-Leu** и после осушки: в) **Leu-Phe**, г) **Phe-Leu**.

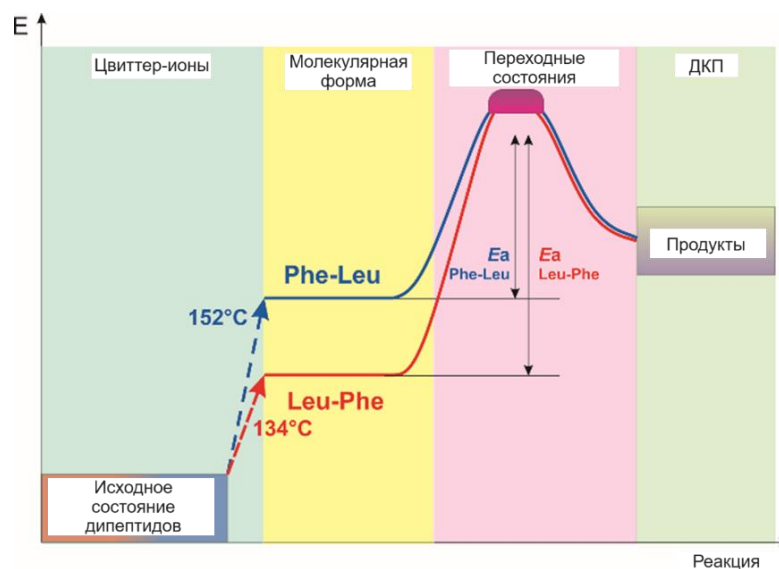


Рисунок 62 – Схематическое изображение разницы в энергии активации между реакциями циклизации **Leu-Phe** и **Phe-Leu**.

3.10 Результаты самосборки линейных и циклических дипептидов согласно данным атомно-силовой микроскопии

Линейные и циклические дипептиды в настоящее время активно используются для получения разнообразных по форме и типу наноструктур, поэтому в настоящей работе было проведено исследование результатов самосборки дипептидов **Gly-Gly**, **Leu-Val**, **Ile-Ala**, **Ala-Ile**, **Leu-Phe** и **Phe-Leu** и их циклических аналогов. Результаты самосборки дипептидов из растворов в ГФИП на поверхности подложки из высокоориентированного пиролитического графита (ВОПГ) были исследованы методом АСМ, рис. 63.

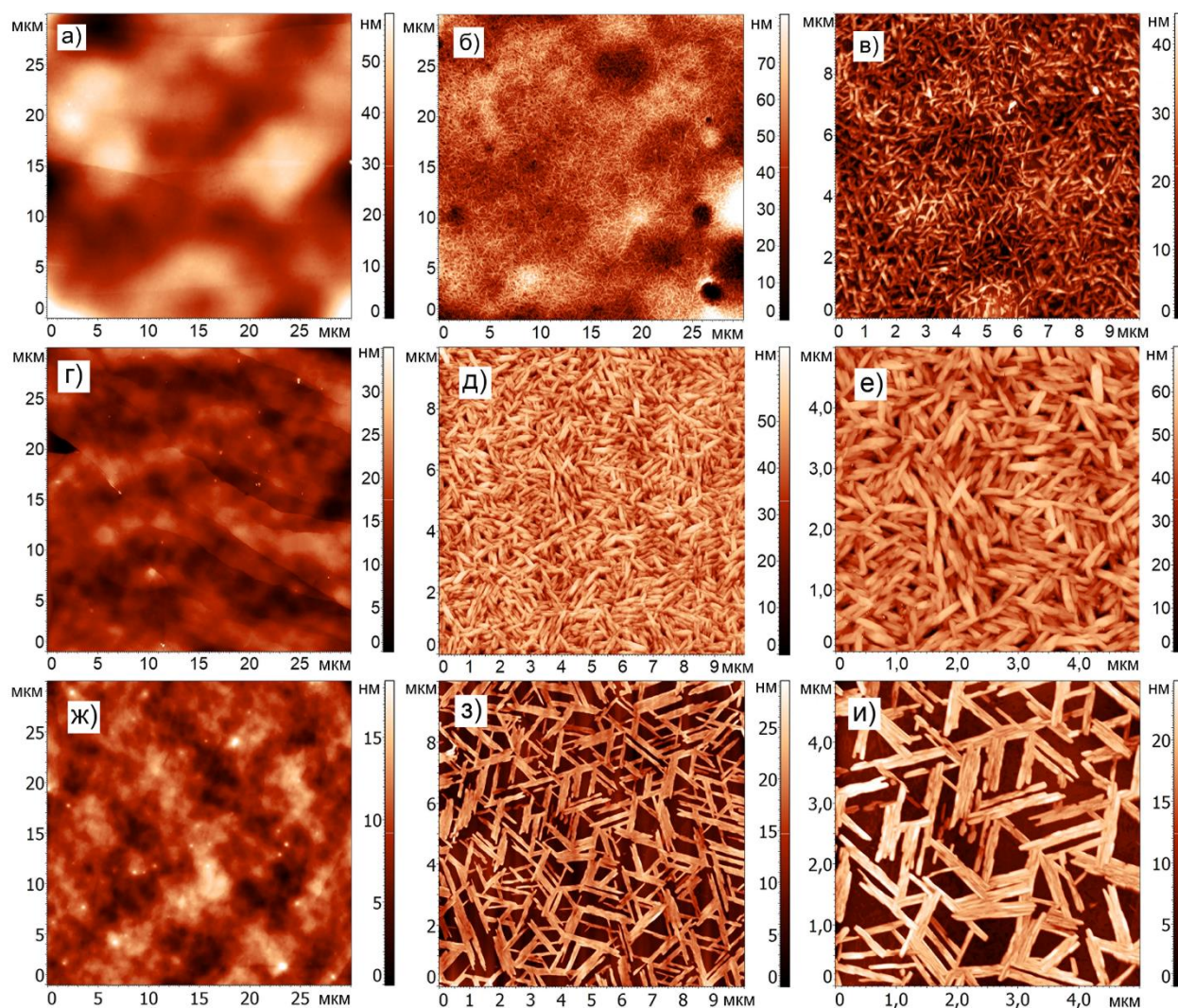
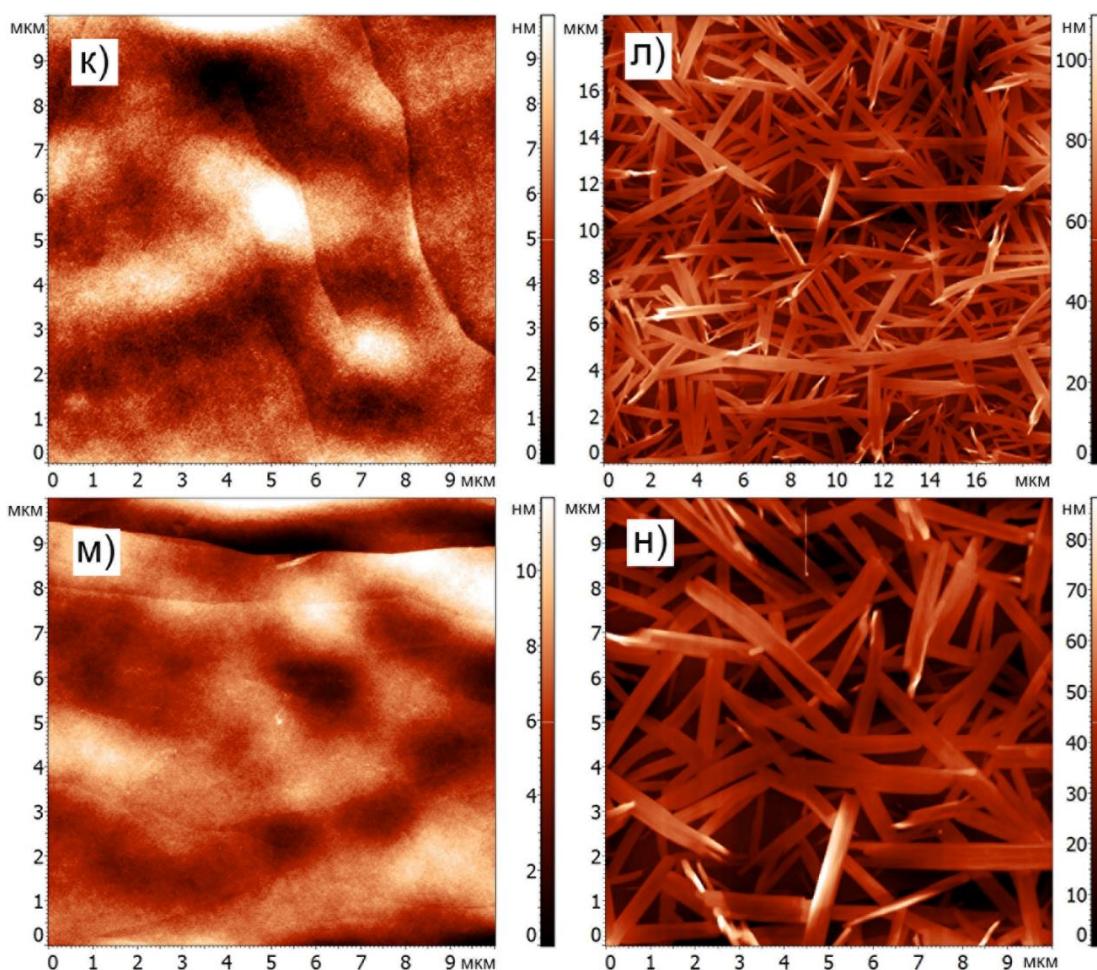


Рисунок 63 – АСМ изображения пленок а) **Gly-Gly**, б,в) *цикло*(**Gly-Gly**), г) **Leu-Val**, д,е) *цикло*(**Leu-Val**), ж) **Ile-Ala**, з,и) *цикло*(**Ile-Ala**), к) **Leu-Phe**, л) *цикло*(**Leu-Phe**), м) **Phe-Leu**, н) *цикло*(**Phe-Leu**) из растворов дипептидов в ГФИП на поверхности ВОПГ. Концентрация дипептидов 1 мг/мл.

Продолжение рисунка номер 63.



Было установлено, что в результате испарения растворителя из растворов линейных дипептидов образуется гладкая аморфная плёнка, рис. 63а,г,ж,к,м. Подобные результаты были получены ранее при изучении самосборки **Gly-Gly** из смеси растворителей вода/метанол на поверхности ВОПГ [137]. В результате самосборки циклических дипептидов в тех же условиях формируются пластинчатые структуры длиной 200 нм – 10 мкм и шириной 90 нм – 1 мкм, рис. 63б,в,д,е,з,и,л,м. Образование подобных структур весьма характерно для циклических дипептидов при их самосборке [104]. Считается, что основной движущей силой данного процесса является образование водородных связей между молекулами ДКП. При этом каждая молекула ДКП может участвовать в образовании до четырех связей [104].

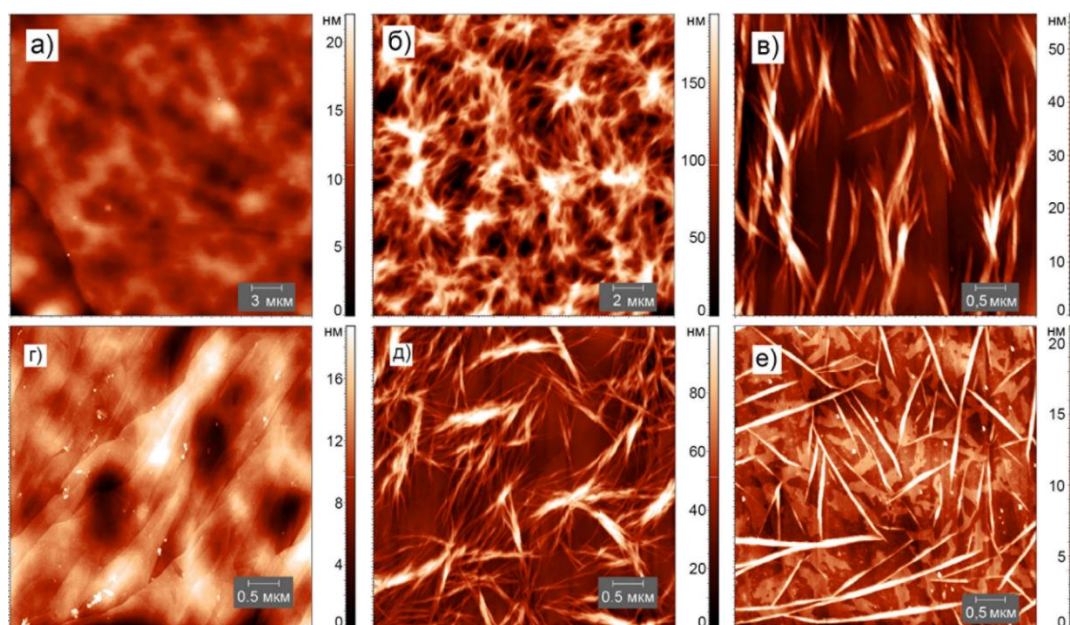


Рисунок 64 – АСМ изображения поверхности пленок на поверхности ВОПГ
 а) **Ile-Ala**, б), в) *цикло(Ile-Ala)*, г) **Ala-Ile**, д) *цикло(Ala-Ile)*, е) *цикло(Leu-Val)*
 из раствора в метаноле. Концентрация дипептидов 1 мг/мл.

Было установлено, что циклические дипептиды являются более чувствительными к условиям самосборки. В результате замены растворителя с ГФИП на метанол **Ile-Ala** (концентрация 1 мг/мл) формирует аморфную плёнку рис. 64а, как и в случае ГФИП, рис. 63ж. Аморфная пленка также образовывалась при нанесении **Ala-Ile** из раствора в метаноле, рис. 64г. В тех же условиях *цикло(Ile-Ala)* и *цикло(Ala-Ile)* формируют волокнистые переплетенные структуры на поверхности ВОПГ с длиной 500-700 нм, рис. 64б,в,д. При использовании метанола в качестве растворителя в результате самосборки *цикло(Leu-Val)* были получены отдельные волокна длиной от 600 нм до 3 мкм и более, рис. 64е.

Метод атомно-силовой микроскопии был использован для визуализации влияния нагрева на морфологию поверхности пленок дипептидов. Для этого были получены АСМ изображения пленок **Phe-Leu** и **Leu-Phe** из раствора в гексафторизопропанол до и после нагревания, рис. 65. Аморфные и относительно гладкие пленки дипептида образуются на поверхности ВОПГ после удаления растворителя, рис. 65а,г. Среднеквадратическая

шероховатость R_q поверхности пленки **Phe-Leu** для скана 5×5 мкм составила 1,4 нм. Наблюдается незначительная самосборка с образованием ворсистой структуры на поверхности пленки **Leu-Phe**, рис. 65г. Среднеквадратическая шероховатость R_q поверхности **Leu-Phe** для скана 5×5 мкм составляет 1,0 нм.

После нагрева образца до 110°C и выдерживании при этой температуре в течение 15 минут с целью удаления сорбционной воды морфология исходных пленок изменилась. Гладкая аморфная пленка **Phe-Leu** разрушается, появляются заметные впадины высотой от 1 до 5 нм, рис. 65б. В случае пленки **Leu-Phe** исходная ворсистая структура исчезает, и пленка становится более гладкой, рис. 65д. Разброс по высоте уменьшается от 5 нм для исходной пленки, рис. 65г, до 4 нм после нагревания, рис. 65д. R_q поверхности **Leu-Phe** равно 0,6 нм.

Нагрев пленки **Phe-Leu** до 150°C приводит к появлению на поверхности множества волокнистых структур, соединенных в агломераты длиной от 1,5 до 3 мкм, рис. 65в. Также были обнаружены плоские пластины шириной 40 нм, толщиной 1–2 нм и длиной 150–400 нм, рис. 65в. Пластины расположены преимущественно под углом 60° .

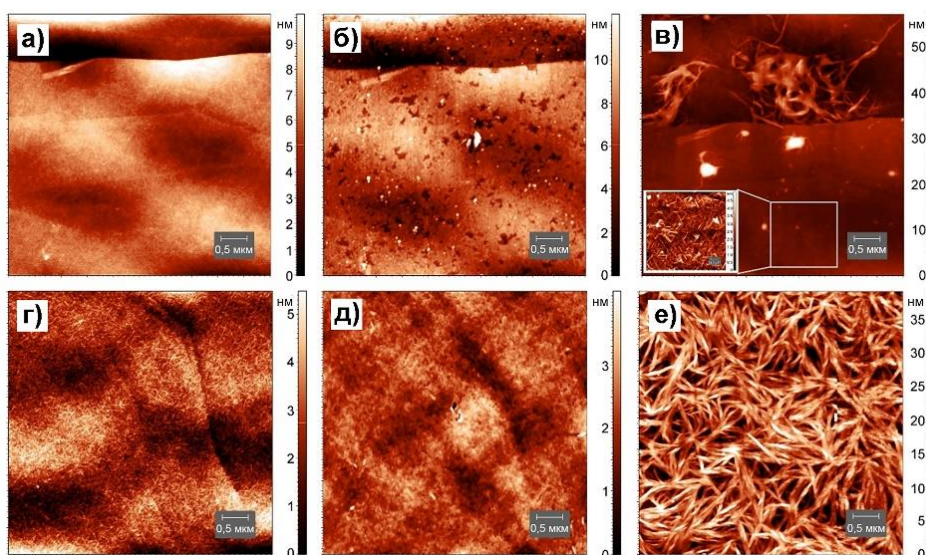


Рисунок 65 – АСМ изображения пленок, нанесенных на ВОПГ, до нагрева (а) **Phe-Leu**, (г) **Leu-Phe**; после нагрева до 110°C (б) **Phe-Leu**, (д) **Leu-Phe**; после нагрева до 150°C (в) **Phe-Leu**, (е) **Leu-Phe**. На вставке показано увеличенное АСМ изображение выделенной области на (в).

В результате нагрева пленки **Leu-Phe** до 150°C на ее поверхности формируются волокна длиной 300–1000 нм и толщиной 40–80 нм, рис. 65е, при этом отсутствуют плоские пластины, характерные для циклических дипептидов [104]. Вероятно, это связано с эимеризацией продукта реакции при циклизации дипептида **Leu-Phe**.

Для оценки возможности практического применения дипептидов **Leu-Phe**, **Phe-Leu** и их циклического аналога были изучены их оптические свойства.

3.11 Результаты люминесцентной микроскопии

Согласно изображениям, полученным методом люминесцентной микроскопии, было установлено, что структуры на основе линейных дипептидов не обладают люминесцентными свойствами, в отличие от структур на основе их циклических аналогов, рис. 66. Для дальнейшего изучения оптических свойств циклического дипептида был использован метод люминесцентной спектроскопии.

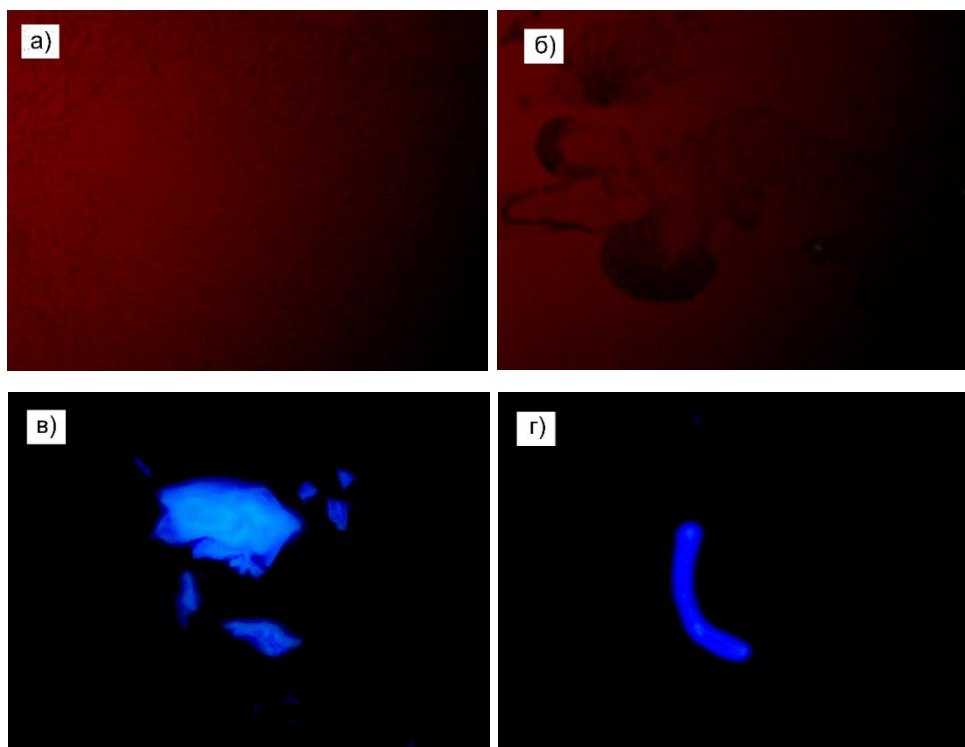


Рисунок 66 – Изображения полученные методом люминесцентной микроскопии структур на основе а) **Leu-Phe**, б) **Phe-Leu**, в) продукта нагревания **Leu-Phe** и г) продукта нагревания **Phe-Leu**.

3.12 Результаты люминесцентной спектроскопии

Спектры возбуждения и излучения, полученные для порошка *цикло*(**Phe-Leu**) приведены на рис. 67. Согласно полученным данным, максимум возбуждения приходится на 383 нм, максимум излучения – 455 нм. Таким образом, полученный в настоящей работе дипептид обладает люминесцентными свойствами, с максимум излучения в видимой области спектра, что открывает возможности его применения в биомедицинских исследованиях и при создании светоизлучающих устройств. Величина Стоксова сдвига (разница длин волн максимумов спектров поглощения и флуоресценции) составила 72 нм.

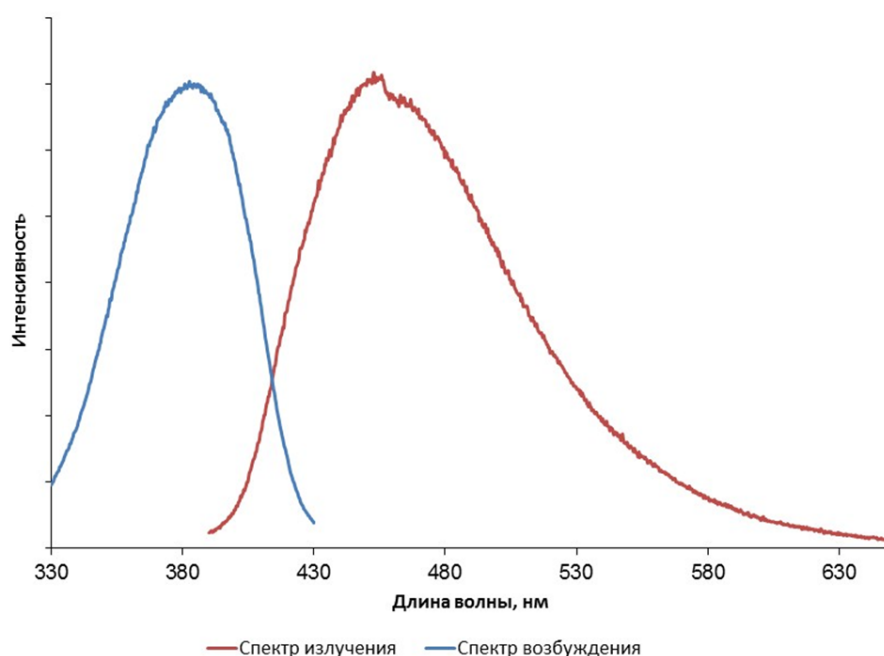


Рисунок 67 – Спектр люминесценции порошка *цикло*(**Phe-Leu**).

3.13 Термический анализ клатратов трилейцина

Дальнейшим развитием исследований в области термических свойств олигопептидов стало изучение свойств трипептида **LLL**, рис. 68а. Следует отметить, что ранее для **Leu-Leu** была описана реакция циклизации в твердой фазе [104]. В настоящей работе было установлено, что в отличие от изученных дипептидов при нагревании трипептида реакция циклизации не происходит, а трипептид в результате нагрева выше 200°C разлагается. Об этом

свидетельствует масс-спектрометрический сигнал на результатах совмещенного термического анализа и соответствующий углекислому газу, рис. 68а. Согласно ДСК кривой при 183°C происходит плавление образца, а до температуры 163°C наблюдается ступень потери массы, связанная с уходом гидратной воды с $\Delta m = 3,5\%$. Эти результаты хорошо согласуются с данными из литературы [140, 141].

Вместе с тем, следует отметить, что для дипептида **Leu-Leu** ранее были обнаружены необычные сорбционные свойства по отношению к ряду алифатических спиртов [14]. Поэтому в настоящей работе была предпринята попытка обнаружить специфические сорбционные свойства у трипептида содержащего остатки той же аминокислоты.

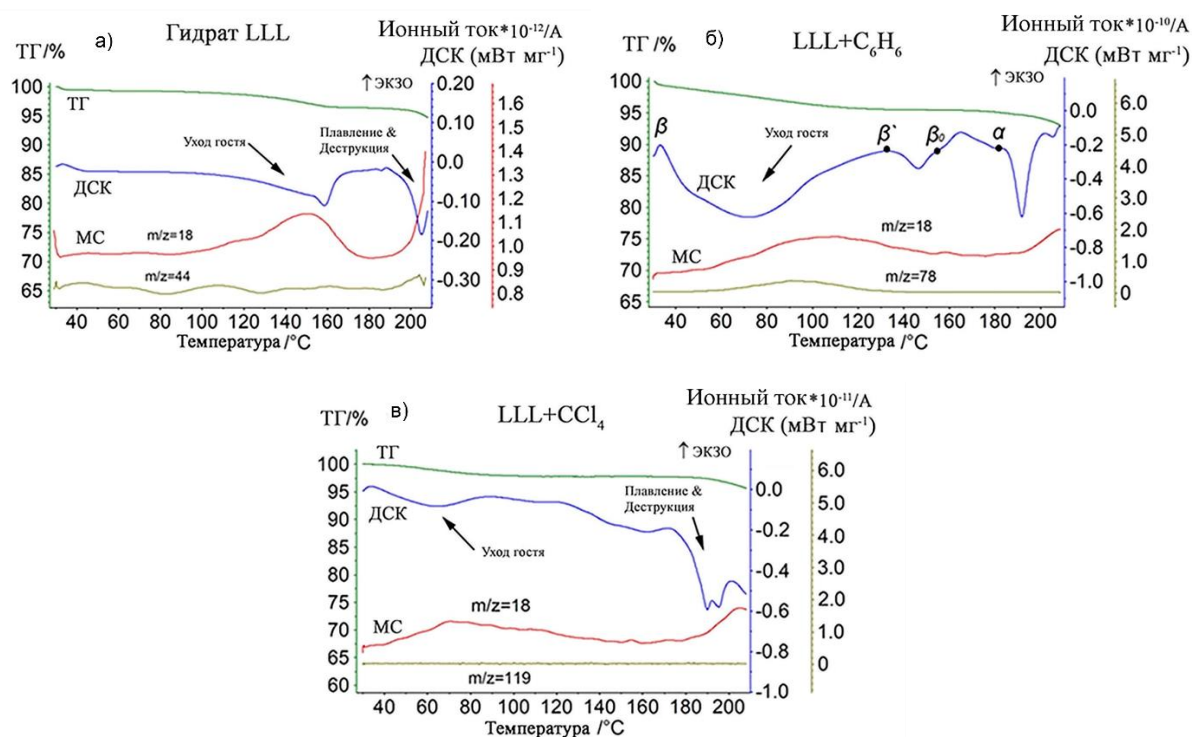


Рисунок 68 – Термический анализ (а) исходного порошка **LLL** и продуктов насыщения осушенного трипептида парами (б) бензола и (в) тетрахлорметана.

С этой целью порошок трипептида **LLL** был насыщен парами органических соединений с термодинамической активностью $P/P_0 = 1$. Было установлено, что трипептид, насыщенный парами бензола и тетрахлорметана,

формирует нестабильные клатраты, рис 68б,в. При нагревании от 30 до 130°C клатрат трилейцина с бензолом теряет 4,6% массы, а на масс-спектрометрических кривых наблюдаются сигналы, соответствующие воде ($m/z=18$) и бензолу ($m/z=78$), рис. 68б [142]. Следует отметить, что кривая ДСК, полученная в настоящей работе, отличается от полученной ранее в литературе [140]. Это различие связано с разными методиками приготовления клатратов: в ранней работе [140] парами «гостей» насыщались гидратированные кристаллы трилейцина, в то время как в настоящей работе кристаллы были предварительно осушены, а насыщение трипептида органическими соединениями происходило одновременно со связыванием паров воды из воздуха. Различие во влиянии воды при предварительной гидратации рецептора и при одновременном связывании паров воды и «гостя» ранее было обнаружено для циклодекстрина [143].

В интервале температур 30-120°C клатрат **LLL** с тетрахлорметаном теряет 2,2% массы, рис. 68в. Отсутствие масс-спектрометрического сигнала с $m/z=119$, соответствующего тетрахлорметану, свидетельствует о том, что убыль массы образца связана с уходом воды. Можно предположить, что CCl_4 уходит из клатрата в процессе уравнивания термовесов в потоке аргона до начала термического анализа.

Если при связывании паров CCl_4 трипептид связывает воду в количестве 2,2%, то можно предположить, что такое же количество воды связывается и в процессе взаимодействия с парами бензола. В таком случае количество бензола в клатрате можно оценить по разнице между потерями массы Δm клатрата трилейцина с C_6H_6 и клатрата с CCl_4 . Полученное значение 2,4% в пересчете на величину сорбции A составляет 0,11 моль бензола на моль олигопептида.

3.14 Сорбционные свойства **LLL**

Сорбционные свойства **LLL** в порошкообразном состоянии были изучены методом статического парофазного газохроматографического

анализа. Полученные изотермы сорбции паров бензола и тетрахлорметана приведены на рис. 69.

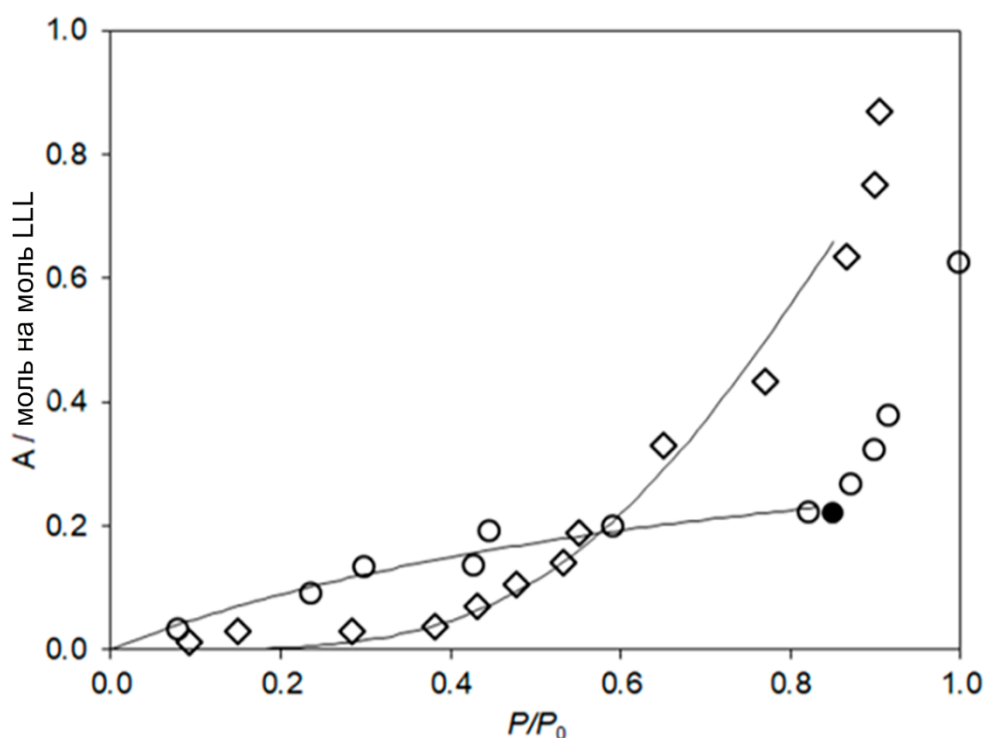


Рис. 69 – Изотермы сорбции ($\circ$) бензола и ($\diamond$) тетрахлорметана на осушенном образце **LLL** при 25°C. Черный кружок соответствует величине сорбции паров бензола на тонкой пленке **LLL**, определенной с помощью QCM-сенсоров (при термодинамической активности «гостя» $P/P_0=0,85$ и $t = 25^\circ\text{C}$) из работы [144].

Полученные изотермы сорбции представляют собой зависимости количества связавшегося «гостя» A (моль «гостя» на 1 моль **LLL**) от его термодинамической активности P/P_0 . Резкий подъем на изотермах, наблюдаемый при активностях $P/P_0 > 0,88$, связан с конденсацией паров органических соединений и образованием жидкой фазы [145].

Форма полученных изотерм сорбции двух «гостей» отличается друг от друга. Связывание паров бензола начинается при более низких значениях термодинамической активности «гостя», а на изотерме отсутствует порог по связыванию. Образование насыщенного клатрата трипептида с бензолом

происходит при термодинамической активности «гостя» $P/P_0=0,82$. Сорбционная емкость **LLL** по отношению к бензолу, определенная в настоящей работе, хорошо согласуется с данными сенсорного анализа, согласно которым 1 моль **LLL** связывает $0,22 \pm 0,02$ моль бензола при его активности $P/P_0=0,85$ и температуре 25°C [144], рис. 69. Изотерма сорбции паров тетрахлорметана имеет вогнутую форму, заметное связывание «гостя» начинается при его термодинамических активностях $P/P_0>0,4$. В отличие от изотермы сорбции паров бензола на изотерме сорбции паров тетрахлорметана отсутствует четко определяемый участок насыщения, соответствующий образованию клатратов **LLL** с CCl_4 . Этот факт указывает на возможное частичное растворение кристаллов **LLL** в тетрахлорметане [146].

Для независимой оценки состава клатрата **LLL** с бензолом, полученного насыщением его порошка парами бензола с $P/P_0=1$, также был использован метод ^1H ЯМР-спектроскопии. Результаты представлены на рис. 70.

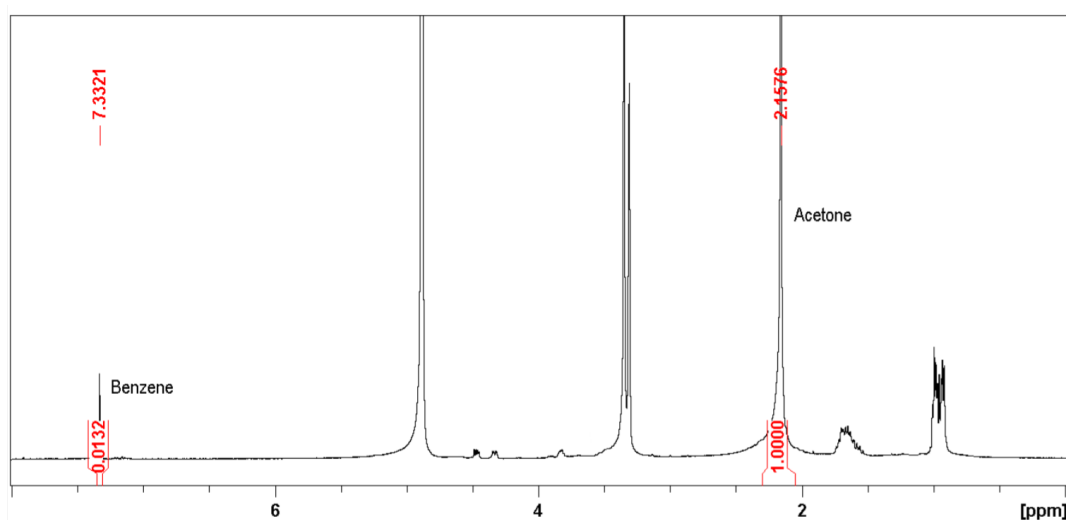


Рисунок 70 – ^1H ЯМР спектр раствора **LLL**, насыщенного парами бензола с термодинамической активностью $P/P_0=1$ при 298K, растворитель метанол- d_4 .

В качестве стандарта был использован ацетон в количестве 68,1 мкмоль. Отношение интенсивности пиков, соответствующих сигналу бензола и ацетона, составило 0,0135. Рассчитанное содержание бензола *A* в его клатрате

с трипептидом равно 0,07 моль бензола на 1 моль **LLL**. Поскольку часть связанного трипептидом бензола способна переходить в паровую фазу ЯМР ампулы, то можно утверждать, что рассчитанное содержание бензола по данным ^1H ЯМР хорошо согласуется с данными термического анализа.

3.15 Методика применения трипептида LLL для количественной оценки содержания бензола в смесях

Особенностью клатрата **LLL** с бензолом являются тепловые эффекты, наблюдаемые на кривой ДСК, рис. 68б. При его нагревании на кривой ДСК присутствуют эндо- и экзо-эффекты, температура начала которых выше, чем температура ухода бензола из клатрата. Подобные эффекты, наблюдаемые в твердой фазе рецептора выше температуры ухода «гостя», являются следствием изменения упаковки рецептора [147, 148]. Полиморфные переходы, наблюдаемые в фазе **LLL**, были охарактеризованы методом рентгеновской порошковой дифрактометрии и будут детально проанализированы далее.

Данные термического анализа также позволяют охарактеризовать фазовые переходы в веществе трипептида при нагревании. Согласно полученным данным, рис. 68б, продукт насыщения трипептида парами бензола, представляет собой клатрат, упаковка которого обозначена на рис. 68б как β -фаза. При нагревании образца до температуры 130°C бензол полностью уходит из фазы олигопептида и образуется первая полиморфная модификация **LLL** – β' -фаза. При температуре 138°C происходит следующий полиморфный переход с образованием метастабильной β_0 -фазы с неплотной упаковкой. Данному переходу соответствует эндотермический пик на кривой ДСК. Дальнейший нагрев образца до 158°C приводит к коллапсу метастабильной β_0 -фазы с образованием термодинамически стабильной α -фазы с плотной упаковкой. Этот процесс проявляется на кривой ДСК в виде экзотермического пика. Образование промежуточных метастабильных полиморфных модификаций после ухода ранее связанного «гостя» характерно для супрамолекулярных рецепторов – каликсаренов [149-151]. Способность

трипептида к образованию полиморфных модификаций после ухода бензола может быть использована для решения практических задач по определению этого «гостя» в смесях с другими органическими соединениями, не запоминаемых **LLL**. Был проведен анализ влияния состава смеси бензола (запоминаемый «гость») с тетрахлорметаном (незапоминаемый «гость»), использованной для насыщения порошка **LLL**, на величину наблюдаемых тепловых эффектов.

С этой целью были приготовлены 7 образцов клатратов **LLL**, полученные насыщением осушенного порошка трипептида парами чистого бензола и парами смеси бензола и тетрахлорметана с мольным содержанием бензола 80, 70, 60, 40 и 20 процентов. На рис. 71 приведены результаты термического анализа клатратов **LLL**, полученных насыщением парами бензола и его смесями с тетрахлорметаном. Форма термогравиметрических кривых, полученных для изученных образцов, совпадает с формой ТГ кривой, приведенной на рис. 68б, поэтому они не обсуждаются в работе.

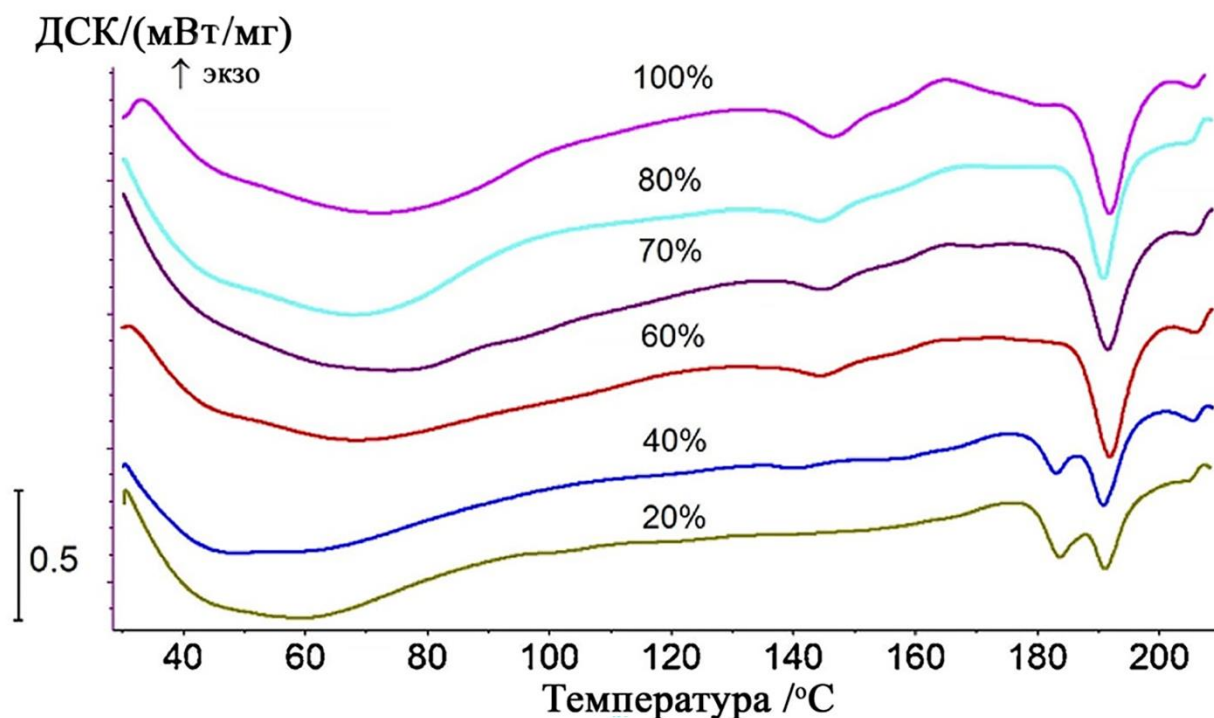


Рисунок 71 – ДСК кривые клатратов **LLL**, полученных насыщением трипептида парами бензола и бинарной смеси C_6H_6/CCl_4 с различным соотношением компонентов.

На кривых ДСК, соответствующих продуктам насыщения **LLL** парами смесей с содержанием бензола 100-60 мол. %, наблюдаются эндо- и экзотермические эффекты при температурах 138°C и 158°C соответственно. Уменьшение содержания бензола в смеси, использованной для насыщения трипептида, ведет к уменьшению величины энтальпий обоих тепловых эффектов. При уменьшении содержания бензола в смеси до 20 мол.% оба эффекта исчезают. Величины эндо- и экзо-эффектов (ΔH_{endo} , ΔH_{exo}) а также температуры начала обоих процессов (T_{endo} , T_{exo}) приведены в таблице 12.

Таблица 12 – Параметры тепловых эффектов, наблюдаемых при нагревании продуктов насыщения **LLL** парами чистого бензола и его смесями с тетрахлорметаном, после ухода связанных «гостей» из клатратов.

Бензол, мол. %	ΔH_{exo} , Дж/г	ΔH_{endo} , Дж/г	T_{exo} , °C	T_{endo} , °C
100	6,5	-6,7	138,2	158,7
80	4,5	-3,0	138,5	158,3
70	3,6	-1,6	138,0	158,2
60	3,3	-1,1	138,1	157,6
40	0,5	0	135,2	-
20	0	0	-	-

При анализе полученных данных была обнаружена линейная зависимость между величинами тепловых эффектов и содержанием бензола в смеси, которой насыщали трипептид. С увеличением содержания бензола в смеси как эндо-, так и экзо-эффект увеличиваются по модулю. На рис. 72 представлены графики зависимости величин энтальпий эндо- и экзо-эффектов от содержания бензола в смеси.

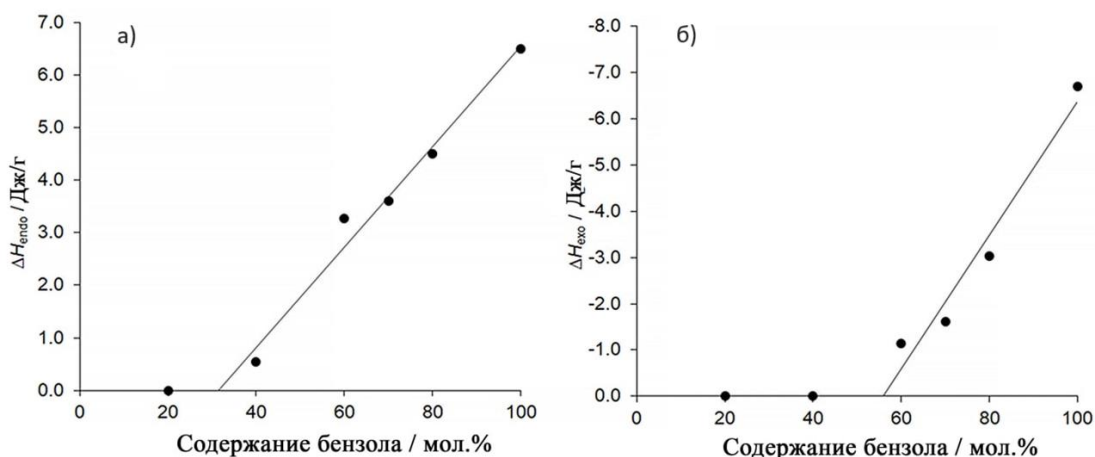


Рисунок 72 – Графики зависимости величин а) эндо-эффекта (ΔH_{endo}) и б) экзо-эффекта (ΔH_{exo}) от содержания бензола в смеси.

Для эндо-эффекта линейная зависимость проявляется в большем диапазоне содержания бензола. В каждом из проведенных экспериментов тепловые эффекты начинались при одной и той же температуре $T_{\text{exo}} = 158 \pm 1^\circ\text{C}$ и $T_{\text{endo}} = 138 \pm 1^\circ\text{C}$, они не зависят от состава смеси, используемой для насыщения. При содержании бензола меньше 40 мол. % исчезает экзо-эффект, а величина эндо-эффекта становится слишком мала для ее точного определения.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности применения трипептида **LLL** для качественного и количественного определения бензола в смеси с тетрахлорметаном. Кроме того, использование смесей с различным содержанием компонентов позволяет управлять полиморфизмом трипептида **LLL**, аналогично тому, как это было ранее предложено для каликсарена [152].

4.4. Результаты рентгеновской порошковой дифрактометрии трипептида и его клатратов

Для того что бы ответить на вопрос, что является причиной, по которой кристаллы **LLL** способны «запоминать» ранее связанный бензол, был использован метод рентгеновской порошковой дифрактометрии. Были проанализированы образцы исходного гидратированного порошка **LLL**, осушенного порошка **LLL** (α -фаза), продукты насыщения α -фазы парами

воды, бензола, тетрахлорметана и их смесями с различным соотношением компонентов, а также образцы **LLL**, насыщенные парами бензола и нагретые до 130°C (β' -фаза) и 146°C (β_0 -фаза). Результаты анализа представлены на рис. 73.

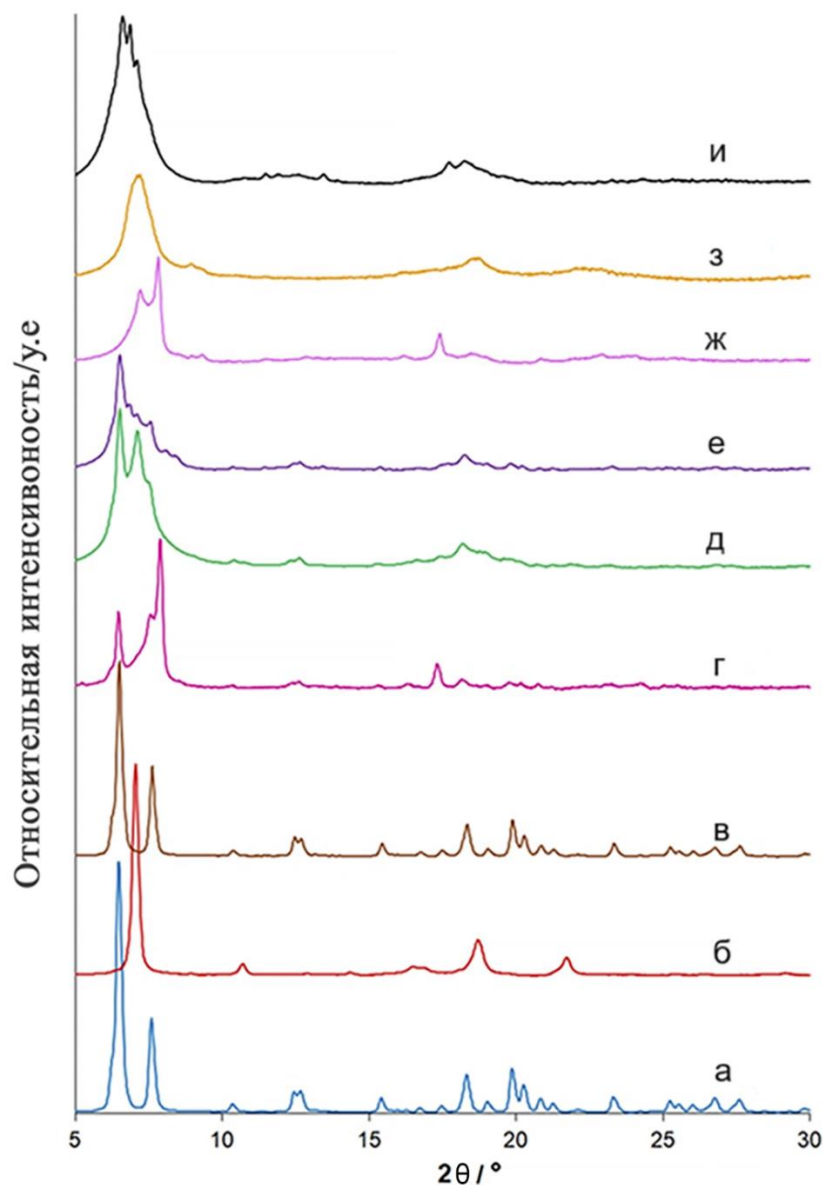


Рисунок 73 – Порошковые дифрактограммы, полученные при комнатной температуре, (а) гидратированного порошка **LLL**, (б) осушенного порошка **LLL** (α -фаза), продуктов насыщения α -фазы парами (в) воды, (г) бензола (в присутствии паров воды), порошка **LLL**, насыщенного парами бензола после нагрева до (д) 130°C (β' -фаза) и (е) 146°C (β_0 -фаза), а также дифрактограммы продуктов насыщения α -фазы парами смесей (ж) 80:20 $C_6H_6:CCl_4$, (з) 40:60 $C_6H_6:CCl_4$ и (и) CCl_4 (в присутствии паров воды).

Упаковка кристаллов **LLL** зависит от присутствия в фазе трипептида воды и внешнего термического воздействия. Упаковка гидратированного порошка **LLL**, рис. 73а, отличается от упаковки α -фазы, полученной нагреванием гидратированного порошка до 150°C , рис. 73б. На дифрактограмме осушенного порошка наблюдается появление узкого пика при $2\theta = 7,0^{\circ}$, а два пика при $6,5^{\circ}$ и $7,5^{\circ}$, являющихся характеристическими для гидрата **LLL**, исчезают. Помимо этого, изменяется число, расположение и интенсивность пиков в интервале $2\theta=10-28^{\circ}$. Насыщение осушенного порошка **LLL** парами воды ведет к восстановлению исходной упаковки кристаллов, рис. 73в. При взаимодействии осушенного порошка **LLL** с парами бензола (в присутствии паров воды из атмосферы), образуется новая фаза с характеристическими пиками при 2θ равном $7,9^{\circ}$ и $17,4^{\circ}$, рис. 73г. При этом, на дифрактограмме клатрата **LLL** с бензолом наблюдаются также и пики, характерные для гидрата **LLL**, рис. 73а. Этот факт хорошо согласуется с данными термического анализа, согласно которым, при нагревании клатрата **LLL** с C_6H_6 помимо ухода бензола также наблюдается и уход воды, рис. 68б. Можно предположить, что бензол и вода связываются кристаллами **LLL** одновременно. Подобный эффект увеличения сорбционной емкости по отношению к гидрофобным соединениям в присутствии паров воды ранее был обнаружен для белков, которые являются полипептидами [153].

При нагревании клатрата **LLL** с C_6H_6 до 130°C бензол и вода уходят из твердой фазы, рис. 68б, и образуется новая полиморфная модификация β' -фаза, рис. 73д. Дальнейший нагрев до 146°C ведет к полиморфному переходу с образованием метастабильной β_0 -фазы, рис. 73е, который сопровождается эндотермическим эффектом на кривой ДСК, рис. 68б. Следует отметить, что кратковременный нагрев β_0 -фазы до 146°C не приводит к коллапсу пористой упаковки, а образование α -фазы происходит в результате продолжительного нагрева при 150°C . На дифрактограммах нагретых образцов присутствуют пики, характерные для гидрата **LLL**, рис. 73а.

Дифрактограмма продукта насыщения **LLL** парами смеси бензола и тетрахлорметана с мольным соотношением 4:1, рис. 73ж, является практически идентичной той, которая соответствует продукту насыщения **LLL** парами чистого бензола, рис. 73г, за исключением нового широкого пика при $7,1^\circ$. Увеличение содержания тетрахлорметана в смеси, используемой для насыщения, до 60 мольных процентов приводит к появлению двух новых широких пиков при 2θ равном $7,0^\circ$ и $18,5^\circ$, рис. 73з. Такая же дифрактограмма наблюдается для продукта насыщения **LLL** парами чистого тетрахлорметана, рис. 73и. При этом схожесть расположения узких пиков у осушенного порошка **LLL**, рис. 73б, и широких пиков у продукта насыщения кристаллов **LLL** парами тетрахлорметана, рис. 73и, может быть связана с переходом кристаллов **LLL** в аморфное состояние после взаимодействия с парами тетрахлорметана.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой чувствительности кристаллов **LLL** по отношению к составу смесей, используемых для насыщения. Увеличение содержания тетрахлорметана в смеси с бензолом приводит к стиранию «памяти рецептора» по отношению к бензолу. Этот эффект проявляется в виде уменьшения величины энтальпий процессов полиморфных переходов, рис. 72.

Для более детального изучения влияния паров органических соединений на упаковку **LLL** в твердой фазе был использован метод атомно-силовой микроскопии. На рисунках 74 и 75 представлены АСМ изображения кристаллов **LLL** до и после взаимодействия с парами бензола и тетрахлорметана.

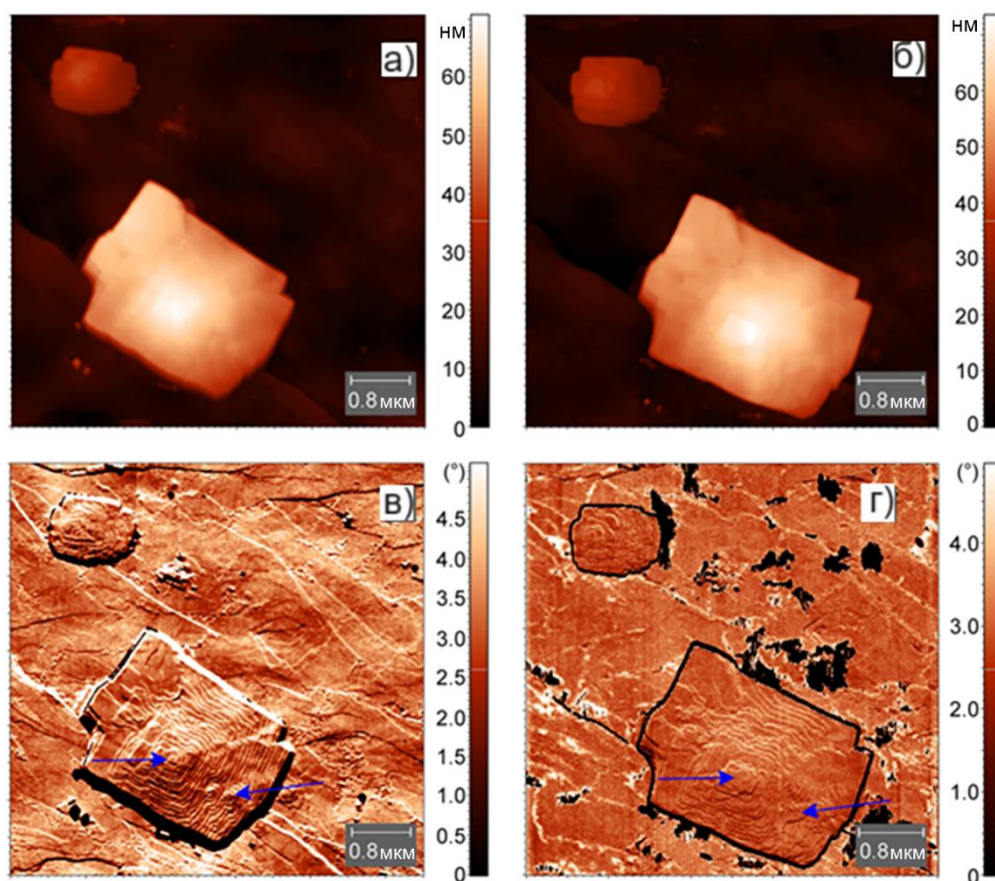


Рисунок 74 – АСМ изображения, полученные до (а, в) и после (б, г) взаимодействия кристалла **LLL** с парами бензола. Изображения (а) и (б) получены в режиме топографии, (в) и (г) – в режиме фазового контраста.

Стрелки указывают на изменения в микроструктуре кристалла.

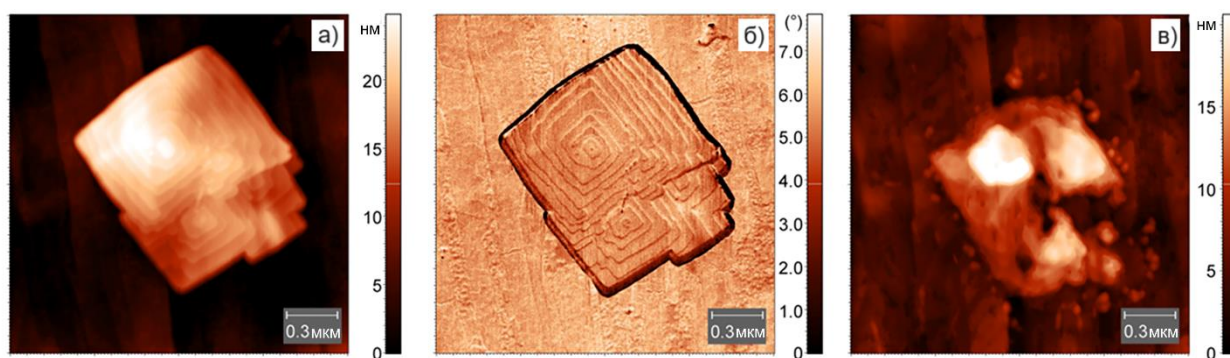


Рисунок 75 – АСМ изображения, полученные до (а, б) и после (в) взаимодействия кристалла **LLL** с парами тетрахлорметана. Изображения (а) и (в) получены в режиме топографии, (б) – в режиме фазового контраста.

Взаимодействие кристалла **LLL** с парами бензола не приводит к существенному изменению его формы, рис. 74а,б. На микроуровне кристаллографические ступени на гранях кристалла деформируются и сливаются друг с другом, рис. 74в,г. При этом аморфная пленка трипептида частично разрушаются и в ней появляются разрывы, рис. 74в,г.

Взаимодействие кристалла **LLL** с тетрахлорметаном приводит к его разрушению, рис. 75. Вокруг остатков кристалла формируются сферические объекты диаметром 40-70 нм, образованные молекулами трипептида, ранее входившими в состав фазы кристалла. Результаты АСМ хорошо согласуются с данными рентгеновской порошковой дифрактометрии, согласно которым продукт взаимодействия порошка **LLL** с парами бензола имеет кристаллическую структуру, но с иной упаковкой, отличающейся от упаковки гидрата **LLL**, рис. 73г, 74. Взаимодействие же **LLL** с парами тетрахлорметана приводит к аморфизации образца, рис. 73ж, 75. Полученные результаты свидетельствуют о возможности управления морфологией тонкой пленки **LLL** посредством обработки ее парами органических соединений.

Наблюдаемое влияние паров органических соединений на упаковку **LLL** в твердой фазе могут быть следствием лучшей растворимости **LLL** в тетрахлорметане, по сравнению с бензолом. В молекуле трипептида присутствуют три объемных алкильных заместителя. $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$ -фрагменты этих заместителей формируют грани кристаллов трипептида [154] и могут непосредственно взаимодействовать с парами органических растворителей, конденсирующихся на поверхностях кристаллов. В пользу этого предположения свидетельствует более отрицательная энтальпия растворения алканов в тетрахлорметане, по сравнению с бензолом [155], а также тот факт, что коэффициент активности октана в тетрахлорметане при бесконечном разбавлении меньше, чем в растворе с бензолом [156].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Впервые изучены реакции циклизации дипептидов глицил-глицин, изолейцил-аланин, аланил-изолейцин, лейцил-валин, лейцил-фенилаланин и фенилаланил-лейцин в твердой фазе при нагревании. Определены температуры начала реакций: 228°C для Gly-Gly, 206°C для Ile-Ala, 228°C для Ala-Ile, 180°C для Leu-Val, 134°C для Leu-Phe и 152°C для Phe-Leu. В рамках подходов изоконверсионной кинетики впервые рассчитаны кинетические параметры этих реакций и установлено, что изученные реакции хорошо описываются автокаталитическими моделями. Значения энергии активации реакции и логарифма константы Аррениуса составили 185 кДж/моль и 17,4 для Gly-Gly, 218 кДж/моль и 21,0 для Ile-Ala, 217 кДж/моль и 20,0 для Ala-Ile, 313 кДж/моль и 33,7 для Leu-Val, 147 кДж/моль и 16,4 для Leu-Phe, 111 кДж/моль и 11,0 для Phe-Leu.
2. Впервые установлено, что с увеличением размера боковых заместителей аминокислотных остатков в изученных дипептидах в общем происходит снижение температуры начала их циклизации в твердой фазе. В ряду алифатических дипептидов Gly-Gly, Ile-Ala, Ala-Ile, Leu-Val, Leu-Leu с увеличением размера боковых заместителей происходит увеличение энергии активации реакции циклизации. Замена остатка алифатической аминокислоты в дипептиде на ароматическую приводит к значительному снижению энергии активации твердофазной циклизации.
3. Высказано предположение о том, что при циклизации дипептидов в кристаллической фазе лимитирующей стадией является переход молекулы из цвиттер-ионной формы в молекулярную форму.
4. Показано, что изученные линейные дипептиды в результате самосборки из различных растворителей формируют гладкую аморфную пленку, в тех же условиях циклические дипептиды в зависимости от типа используемого растворителя способны образовывать микро- и нанопластинки или фибриллярные структуры. При этом микроstructures на основе циклического

фенилаланил-лейцина проявляют люминесцентными свойствами в отличие от его линейных аналогов.

5. Установлено, что лейцил-лейцил-лейцин способен «запоминать» связанный бензол. «Память» олигопептида проявляется в виде тепловых эффектов на кривой ДСК в области температур после ухода связанного «гостя». Обнаружено, что величина тепловых эффектов зависит от содержания бензола в используемой для насыщения смеси органических соединений.

Перспективы дальнейшей разработки темы.

Установленные в настоящей работе соотношения между структурой дипептида и температурой начала его циклизации, определенные значения кинетических параметров этого процесса позволят продвинуться в разработке экономически выгодных методов получения производных 2,5-дикетопиперазинов, обладающих практически значимыми свойствами, с выходами близкими к 100 процентам.

Обнаруженные в настоящей работе особенности самосборки циклических дипептидов могут быть использованы для получения на их основе упорядоченных структур, обладающих люминесцентными свойствами, которые могут быть использованы для производства светоизлучающих устройств.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). Online version (2019-) created by S. J. Chalk. ISBN 0-9678550-9-8. <https://doi.org/10.1351/goldbook>.
2. Yuan, C. Multiscale simulations for understanding of evolution and mechanism of hierarchical peptide self-assembly / C. Yuan, S. Li, Q. Zou, Y. Ren, X. Yan // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2017. – V. 19. – P. 23614-23631.
3. Avinash, M.B. Nanoarchitectonics of biomolecular assemblies for functional applications / M.B. Avinash, T. Govindaraju // *Nanoscale*. – 2014. – V.6. – P.13348-13369.
4. Kim, J.Y. Effect of microsolvating water on the stability of zwitterionic vs. canonical diglycine / J.Y. Kim, G.Y. Won, S. Lee // *Bull Korean Chem. Soc.* – 2014. – V.35. – P.798-804.
5. Koyambo-Konzap, S.J. Solvent effects on the structures and vibrational features of zwitterionic dipeptides: L-diglycine and L-dialanine / S.J. Koyambo-Konzap, A. Minguirbara, M. Nsangou // *J. Mol. Model.* – 2015. – V.21. – P.1-12.
6. Gorbitz, C.H. Nanotube Formation by Hydrophobic Dipeptides / C.H. Gorbitz // *Chem. Eur. J.* – 2001. – V.7, N.23. – P.5153-5159.
7. Gupta, S. Ultrashort peptide self-assembly: Front-runners to transport drug and gene cargos / S. Gupta, I. Singh, A.K. Sharma, P. Kumar // *Front. Bioeng. Biotechnol.* – 2020. – V.8. – Article 504.
8. Moreno, J.C. Tyr-asp inhibition of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase affects plant redox metabolism / J.C. Moreno, B.E. Rojas, R. Vicente, M. Gorka, T. Matz, M. Chodasiewicz, J.S. Peralta-Ariza, Y. Zhang, S. Alseekh, D. Childs, M. Luzarowski, Z. Nikoloski, R. Zarivach, D. Walther, M.D. Hartman, C.M. Figueroa, A.A. Iglesias, A.R. Fernie, A. Skirycz // *EMBO J.* – 2021. – V.40. – Article e106800.
9. Tanaka, M. Brain-transportable soy dipeptide, tyr-pro, attenuates amyloid β peptide₂₅₋₃₅-induced memory impairment in mice / M. Tanaka, H. Kiyohara, A.

- Yoshino, A. Nakano, F. Takata, S. Dohgu, Y. Kataoka, T. Matsui // NPJ Sci. Food. – 2020. – V.4. – Article 7.
10. Mizushige, T. Dipeptide tyrosyl-leucine exhibits antidepressant-like activity in mice / T. Mizushige, T. Uchida, K. Ohinata // Sci Rep – 2020. – V.10. – Article 2257.
 11. Mizushige, T. Aromatic amino acid-leucine dipeptides exhibit anxiolytic-like activity in young mice / T. Mizushige, N. Kanegawa, A. Yamada, A. Ota, R. Kanamoto, K. Ohinata // Neurosci. Lett. – 2013. – V.543. – P.126-129.
 12. Smith, A.J. Glycine homopeptides: the effect of the chain length on the crystal structure and solid-state reactivity / A.J. Smith, F.I. Ali, D.V. Soldatov // CrystEngComm. – 2014. – V. 16. – P. 7196-7208.
 13. Ziganshin, M.A. Thermally induced diphenylalanine cyclization in solid phase / M.A. Ziganshin, A.V. Gerasimov, S.A. Ziganshina, N.S. Gubina, G.R. Abdullina, A.E. Klimovitskii, V.V. Gorbachuk, A.A. Bukharaev // J. Therm. Anal. Calorim. – 2016. – V.125. – P.905-912.
 14. Ziganshin, M.A. Non-zeolitic properties of the dipeptide L-leucyl-L-leucine as a result of the specific nanostructures formation / M.A. Ziganshin, A.S. Safiullina, S.A. Ziganshina, A.V. Gerasimov, V.V. Gorbachuk // Phys. Chem. Chem. Phys. – 2017. – V.19. – P.13788–13797.
 15. Do, H.T. Melting properties of peptides and their solubility in water. Part 1: dipeptides based on glycine or alanine / H.T. Do, Y.Z. Chua, J. Habicht, M. Klinksiek, M. Hallerman, D. Zaitsau, C. Schick, C. Held // RSC Adv. – 2019. – V.9. – P. 32722-32734.
 16. Do, H.T. Melting properties of peptides and their solubility in water. Part 2: Di- and tripeptides based on glycine, alanine, leucine, proline, and serine / H.T. Do, Y.Z. Chua, J. Habicht, M. Klinksiek, S. Volpert, M. Hallerman, M. Thome, D. Pabsch, D. Zaitsau, C. Schick, C. Held // Ind. Eng. Chem. Res. – 2021. – V. 60. – P. 4693-4704.
 17. Якубке, Х.-Д. Аминокислоты Пептиды Белки / Х.-Д. Якубке, Х. Ешкайт. – Москва: Мир, 1985. – 339 с.

18. Manchineella, S. Molecular self-assembly of cyclic dipeptide derivatives and their applications / S. Manchineella, T. Govindaraju // *ChemPlusChem*. – 2017. – V.82. – P.88-106.
19. Zhao, K. Cyclic dipeptides: Biological activities and self-assembled materials / K. Zhao, R. Xing, X. Yan // *Pept. Sci.* – 2021. – V.113. – Article 24202.
20. Zhang, H.-H. Protective effects of diketopiperazines from *moslae herba* against influenza A virus-induced pulmonary inflammation via inhibition of viral replication and platelets aggregation / H.-H. Zhang, W.-Y. Yu, L. Li, F. Wu, Q. Chen, Y. Yang, C.-H. Yu // *J Ethnopharmacol.* – 2018. – V.215. – P.156-166.
21. Song, S. Identification of cyclic dipeptides from *escherichia coli* as new antimicrobial agents against *ralstonia solanacearum* / S. Song, S. Fu, X. Sun, P. Li, J. Wu, T. Dong, F. He, Y. Deng // *Molecules*. – 2018. – V.23. – Article 214.
22. Yang, W. Bioactive secondary metabolites from marine *streptomyces griseorubens* f8: Isolation, identification and biological activity assay / W. Yang, G. Liang, Y. Sun, Z. Gong // *J. Mar. Sci. Eng.* – 2021. – V.9. – Article 978.
23. van der Merwe, E. The synthesis and anticancer activity of selected diketopiperazines / E. van der Merwe, D. Huang, D. Peterson, G. Kilian, P.J. Milne, M. Van de Venter, C. Frost // *Peptides*. – 2008. – V.29. – P.1305-1311.
24. Karanam, G. Reactive oxygen species generation and mitochondrial dysfunction for the initiation of apoptotic cell death in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells by a cyclic dipeptide cyclo(-pro-tyr) / G. Karanam, M.K. Arumugam // *Mol. Biol. Rep.* – 2020. – V.47. – P.3347-3359.
25. Farhadian, S. Design, synthesis, and anti-gastric cancer activity of novel 2,5-diketopiperazine / S. Farhadian, B. Shareghi, F. Tirgir, S. Reisi, N.G. Dehkordi, L. Momeni, E. Heidari // *J. Mol. Liq.* – 2019. – V.294. – Article 111585.
26. Cornacchia, C. 2,5-Diketopiperazines as Neuroprotective Agents / C. Cornacchia, I. Cacciatore, L. Baldassarre, A. Mollica, F. Feliciani, F. Pinnen // *Mini Rev Med Chem.* – 2012. – V.12. – P.2-12.
27. Turkez, H. Histidyl-Proline Diketopiperazine Isomers as Multipotent Anti-Alzheimer Drug Candidates / H. Turkez, I. Cacciatore, M.E. Arslan, E. Fornasari,

- L. Marinelli, A. Di Stefano, A. Mardinoglu // *Biomolecules*. – 2020. – V.10. – Article 737.
28. Byun, H.-G. Novel antifungal diketopiperazine from marine fungus / H.-G. Byun, H. Zhang, M. Mochizuki, K. Adachi, Y. Shizuri, W.-J. Lee, S.-K. Kim. // *J. Antibiot.* – 2003. – V.56. – P.102-106.
29. Musetti, R. Antifungal activity of diketopiperazines extracted from *alternaria alternata* against *plasmopara viticola*: An ultrastructural study / R. Musetti, R. Polizzotto, A. Vecchione, S. Borselli, L. Zulini, M. D'Ambrosio, L.S.d. Toppi, I. Pertot // *Micron*. – 2007. – V.38. – P.643-650.
30. Agrios, G.N. *Plant Pathology* // Academic Press, San Diego, CA, USA, 1997. – 635 p.
31. Bérubé, C. Interfacial supramolecular biomimetic epoxidation catalysed by cyclic dipeptides / C. Bérubé, X. Barbeau, S. Cardinal, P.-L. Boudreault, C. Bouchard, N. Delcey, P. Lagüe, N. Voyer // *Supramol Chem.* – 2017. – V.29. – P.330-349.
32. Lozano-González, M. Antidiabetic in vitro and in vivo evaluation of cyclodipeptides isolated from *Pseudomonas fluorescens* IB-MR-66e / M. Lozano-González, B. Ovalle-Magallanes, M. Rangel-Grimaldo, S. De La Torre-Zavala, L.G. Noriega, C. Tovar-Palacio, A.R. Tovar, R. Mata // *New J. Chem.* – 2019. – V.43. – P.7756-7762.
33. Teixidó, M. Diketopiperazines as a tool for the study of transport across the blood-brain barrier (BBB) and their potential use as BBB-shuttles / M. Teixidó, E. Zurita, M. Malakoutikhah, T. Tarragó, E. Giralt // *J. Am. Chem. Soc.* – 2007. – V.129. – P.11802-11813.
34. Mishra, A.K. Cyclodipeptides: An overview of their biosynthesis and biological activity / A.K. Mishra, J. Choi, S.-J. Choi, K.-H. Baek // *Molecules*. – 2017. – V.22. – Article 1796.
35. Borthwick, A.D. 2,5-diketopiperazines in food and beverages: Taste and bioactivity / A.D. Borthwick, N.C. Da Costa // *Crit Rev Food Sci Nutr.* – 2017. – V.57. – P.718-742.

36. Stamatelopoulou, E. Diketopiperazines in wines / E. Stamatelopoulou, S. Agriopoulou, E. Dourtoglou, A. Chatzilazarou, F. Drosou, M. Marinea, V. Dourtoglou // *J. Wine Res.* – 2018. – V.29. – P.37–48.
37. Bellezza, I. Cyclic dipeptides: From bugs to brain / I. Bellezza, M.J. Peirce, A. Minelli // *Trends Mol. Med*. – 2014. – V.20. – P.551-558.
38. Romero-Diaz, C. Structural identification, synthesis and biological activity of two volatile cyclic dipeptides in a terrestrial vertebrate / C. Romero-Diaz, S.M. Campos, M.A. Herrmann, K.N. Lewis, D.R. Williams, H.A. Soini, M.V. Novotny, D.K. Hews, E.P. Martins // *Sci. Rep.* – 2020. – V.10. – Article 4303.
39. Fox, E.M. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology / E.M. Fox, B.J. Howlett // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2008. – V. 11. – P. 481–487
40. Chen, Y.S. Studies on the metabolic products of *Rosellinia necatrix* Berlese: part I. isolation and characterization of several physiologically active neutral substances / Y.S. Chen // *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan.* – 1960. – V.24. – P.372-381.
41. Li, X.J. Toxins from a symbiotic fungus, *Leptographium qinlingensis* associated with *Dendroctonus armandi* and their in vitro toxicities to *Pinus armandi* seedlings / X.J. Li, J.M. Gao, H. Chen, A.L. Zhang, M. Tang // *Eur. J. Plant Pathol.* – 2012. – V.134. – P.239-247.
42. Fan, Z. Dichotocejpins A–C: New diketopiperazines from a deep-sea-derived fungus *Dichotomomyces cejpui* FS110 / Z. Fan, Z.-H. Sun, Z. Liu, Y.-C. Chen, H.-X. Liu, H.-H. Li, W.-M. Zhang // *Marine drugs.* – 2016. – V.14. – Article 164.
43. Kumar, S.N. Identification of antimicrobial compound, diketopiperazines, from a *Bacillus* sp. N strain associated with a rhabditid entomopathogenic nematode against major plant pathogenic fungi / S.N. Kumar, C. Mohandas, J.V. Siji, K.N. Rajasekharan, B. Nambisan // *J. Appl. Microbiol.* – 2012. – V.113. – P.914-924.
44. Kumar, N. Isolation of proline-based cyclic dipeptides from *Bacillus* sp. N strain associated with rhabditid entomopathogenic nematode and its antimicrobial properties / N. Kumar, C. Mohandas, B. Nambisan, D.R.S. Kumar, R.S. Lankalapalli // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2013. – V.29. – P.355-364.

45. Wang, P. Diketopiperazine derivatives from the marine-derived actinomycete *Streptomyces* sp. FXJ7. 328 / P. Wang, L. Xi, P. Liu, Y. Wang, W. Wang, Y. Huang, W. Zhu // *Marine drugs*. – 2013. – V.11. – P.1035-1049.
46. Borthwick, A.D. 2, 5-Diketopiperazines: synthesis, reactions, medicinal chemistry, and bioactive natural products / A.D. Borthwick // *Chem. Rev.* – 2012. – V.112. – P. 3641-3716.
47. Suzuki, K. Acetic acid-catalyzed diketopiperazine synthesis / K. Suzuki, Y. Sasaki, N. Endo, Y. Mihara // *Chem. Pharm. Bull.* – 1981. – V.29. – P.233-237.
48. Depew, K.M. Total synthesis of 5-N-acetylardeemin and amauromine: Practical routes to potential MDR reversal agents / K.M. Depew, S.P. Marsden, D. Zatorska, A. Zatorski, W.G. Bornmann, S.J. Danishefsky, // *J. Am. Chem. Soc.* – 1999. – V.121. – P.11953-11963.
49. Bull, S.D. Practical synthesis of Schöllkopf's bis-lactim ether chiral auxiliary:(3*S*)-3, 6-dihydro-2, 5-dimethoxy-3-isopropyl-pyrazine / S.D. Bull, S.G. Davies, W.O. Moss // *Tetrahedron: Asymmetry*. – 1998. – V.9. – P. 321-327.
50. Falorni, M. Solution-Phase Synthesis of Mixed Amide Libraries by Simultaneous Addition of Functionalities (SPSAF) to a Diketopiperazine Tetracarboxylic Acid Scaffold Monitored by GC Analysis of Isobutyl Alcohol / M. Falorni, G. Giacomelli, A. Porcheddu, M. Taddei // *Eur. J. Org. Chem.* – 2000. – V.2000. – P.1669-1675.
51. González, A. Synthesis and structural study of piperazine-2, 5-diones derived from (R)-cysteine / A. González, S.L. Voróbeva, A. Linares // *Tetrahedron: Asymmetry*. – 1995. – V.6. – P.1357-1366.
52. Basiuk, V.A. A novel approach to the synthesis of symmetric optically active 2, 5-dioxopiperazines / V.A. Basiuk, T.Y. Gromovoy, A.A. Chuiko, V.A. Soloshonok, V.P. Kukhar // *Synthesis (Stuttgart)*. – 1992. – V.5. – P.449-451.
53. Majumdar, K.C. Intramolecular Aza-Wittig reaction: A new efficient tool for the construction of piperazine 2, 5-dione derivatives / K.C. Majumdar, K. Ray, S. Ganai // *Synlett*. – 2010. – V. 2010. – P. 2122-2124.

54. Sheradsky T. Synthesis of (2R, 5R)-2-amino-5-hydroxyhexanoic acid by intramolecular cycloaddition / T. Sheradsky, E.R. Silcoff // *Molecules*. – 1998. – V.3. – P.80-87.
55. Tullberg, M. Efficient synthesis of 2, 5-diketopiperazines using microwave assisted heating / M. Tullberg, M. Grøtli, K. Luthman // *Tetrahedron*. – 2006. – V. 62. – P.7484-7491.
56. Tullberg, M. Synthesis of Functionalized, Unsymmetrical 1, 3, 4, 6-Tetrasubstituted 2, 5-Diketopiperazines / M. Tullberg, M. Grøtli, K. Luthman // *J. Org. Chem.* – 2007. – V.72. – P.195-199.
57. López-Cobeñas, A. Microwave-assisted synthesis of 2, 5-piperazinediones under solvent-free conditions / A. López-Cobeñas, P. Cledera, J.D. Sánchez, P. López-Alvarado, M.T. Ramos, C. Avendaño, J.C. Menéndez, // *Synthesis*. – 2005. – V.2005. – P.3412-3422.
58. Kurbasic, M. Microwave-assisted cyclization of unprotected dipeptides in water to 2, 5-piperazinediones and self-assembly study of products and reagents / M. Kurbasic, S Semeraro, A.M. Garcia, S. Kralj, E. Parisi, C. Deganutti, R. De Zorzi, S. Marchesan // *Synthesis*. – 2019. – V.51. – P.2829-2838.
59. Fridkin, M. A synthesis of cyclic peptides utilizing high molecular weight carriers / M. Fridkin, A. Patchornik, E. Katchalski // *J. Am. Chem. Soc.* – 1965. – V.87. – P.4646-4648.
60. Cabon, G. Novel solution-and solid-phase syntheses of heterocyclic systems / G. Cabon, B. Gaucher, A. Gegout, S. Heulle, T. Masquelin // *CHIMIA International Journal for Chemistry*. – 2003. – V.57. – P.248-254.
61. Kennedy, A.L. A new resin-bound universal isonitrile for the Ugi 4CC reaction: preparation and applications to the synthesis of 2, 5-diketopiperazines and 1, 4-benzodiazepine-2, 5-diones / A.L. Kennedy, A.M. Fryer, J.A. Josey // *Org. Lett.* – 2002. – V.4. – P.1167-1170.
62. Tullberg, M. Microwave-assisted solid-phase synthesis of 2, 5-diketopiperazines: solvent and resin dependence / M. Tullberg, K. Luthman, M. Grøtli // *J. Comb. Chem.* – 2006. – V.8. – P.915-922.

63. Xia, P. Theoretical study on the cyclization mechanism of dipeptides / P. Xia, C. Wang, C. Qi // *Chinese J. Chem.* – 2013. – V.31. – P.813-818.
64. Li, Y. DFT study on reaction mechanisms of cyclic dipeptide generation / Y. Li, F. Li, Y. Zhu, X. Li, Z. Zhou, C. Liu, W. Zhang, M. Tang // *Struct Chem.* – 2016. – V.27. – P.1165-1173.
65. Carlini, L. Insights into the Thermally Activated Cyclization Mechanism in a Linear Phenylalanine-Alanine Dipeptide / L. Carlini, J. Chiarinelli, G. Mattioli, M.C. Castrovilli, V. Valentini, A. De Stefanis, E.M. Bauer, P. Bolognesi, L. Avaldi // *J. Phys. Chem. B.* – 2022. – V.126. – P.2968-2978.
66. Adler-Abramovich, L. The physical properties of supramolecular peptide assemblies: from building block association to technological applications / L. Adler-Abramovich, E. Gazit // *Chem. Soc. Rev.* – 2014. – V.43 – P. 6873-7238.
67. Manchineella, S. Molecular Self-Assembly of Cyclic Dipeptide Derivatives and Their Applications / S. Manchineella, T. Govindaraju // *ChemPlusChem* – 2017. – V.82. – P.88-106.
68. Wang, Y.-M. Fabrication and application of biocompatible nanogenerators / Y.-M. Wang, Q. Zeng, L. He, P. Yin, Y. Sun, W. Hu, R. Yang // *iScience.* – 2021. V.24. – Article 102274.
69. Görbitz, C. H. Microporous Organic Materials from Hydrophobic Dipeptides / C. H. Görbitz // *Chem. Eur. J.* – 2007. – V. 13. – P. 1022-1031.
70. Ziganshin, M.A. Interaction of l-alanyl-l-valine and l-valyl-l-alanine with organic vapors: Thermal stability of clathrates, sorption capacity and the change in the morphology of dipeptide films / M.A. Ziganshin, N.S. Gubina, A.V. Gerasimov, V.V. Gorbachuk, S.A. Ziganshina, A.P. Chuklanov, A.A. Bukharaev // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2015. – V.17. – P.20168-20177.
71. Comotti, A. Methane, Carbon Dioxide and Hydrogen Storage in Nanoporous Dipeptide-Based Materials / A. Comotti, S. Bracco, G. Distefano, P. Sozzani // *Chem. Commun.* – 2009. – V.3. – P.284–286.
72. Afonso, R.V. Dipeptide Crystals as Excellent Permselective Materials: Sequential Exclusion of Argon, Nitrogen, and Oxygen / R.V. Afonso, J. Durao, A.

Mendes, A.M. Damas, L. Gales // *Angew. Chem., Int. Ed.* – 2010. – V.49. – P.3034–3036.

73. Afonso, R. Hydrophobic Dipeptide Crystals: a Promising Ag-Free Class of Ultramicroporous Materials Showing Argon/Oxygen Adsorption Selectivity / R. Afonso, A. Mendes, L. Gales // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2014. – V.16. – P.19386–19393.

74. Bracco, S. Porous dipeptide crystals as volatile-drug vessels / S. Bracco, D. Asnaghi, M. Negroni, P. Sozzani, A. Comotti // *Chem. Commun.* – 2018. – V.54. – P.148.

75. Zhao, Z. Dipeptide Crystals as Reverse Osmosis Membranes for Water Desalination: Atomistic Simulation / Z. Zhao, K. M. Gupta, Z. He, J. Jiang // *J. Phys. Chem. C.* – 2018. – V.122. – P.6026–6032.

76. Misteli, T. The concept of self-organization in cellular architecture / T. Misteli // *J. Cell Biol.* – 2001. – V. 155. – P. 181-186.

77. Jones, R.G. Terminology for aggregation and self-assembly in polymer science (IUPAC Recommendations 2013) / R.G. Jones, C.K. Ober, P. Hodge, P. Kratochvil, G. Moad, M. Vert // *Pure Appl. Chem.* – 2013. – V. 85, N 2. – P. 463-492.

78. Whitesides, G. M. Self-assembly at all scales / G. M. Whitesides, B. Grzybowski // *Science.* – 2002. – V. 295. – P. 2418-2421.

79. Lehn, J.M. Toward complex matter: supramolecular chemistry and selforganization / J.M. Lehn // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2002. – V. 99 – P. 4763-4768.

80. Israelachvili, J.N. Intermolecular and surface forces / J. N. Israelachvili – 3rd ed. – Burlington: Academic Press, 2011. – 660 p.– ISBN 978-0-12-375182-9.

81. Richardson, J.J. Technology-driven layer-by-layer assembly of nanofilms / J.J. Richardson, M. Björnmalm, F. Caruso // *Science.* – 2015. – V.348. – P.411.

82. Faul, C.F. Ionic self-assembly: Facile synthesis of supramolecular materials / C.F. Faul, M. Antonietti // *Adv. Mater.* – 2003. – V. 15. – P. 673-683.

83. Zhu, P. Solvent-induced structural transition of self-assembled dipeptide: From organogels to microcrystals / P. Zhu, X. Yan, Y. Su, Y. Yang and J. Li // *Chem. – Eur. J.* – 2010. – V.16. – P.3176–3183.
84. Tsonchev, S. Phase diagram for assembly of biologically-active peptide amphiphiles / S. Tsonchev, K. L. Niece, G. C. Schatz, M. A. Ratner and S. I. Stupp, // *J. Phys. Chem. B.* – 2008. – V.112. – P.441–447.
85. Yan, X. Self-assembly and application of diphenylalanine-based nanostructures / X. Yan, P. Zhu, J. Li // *Chem. Soc. Rev.* – 2010. – V.39. – P. 1861-2336.
86. Wang, J. Peptide self-assembly: thermodynamics and kinetics / J. Wang, K. Liu, R. Xinga, X. Yan // *Chem. Soc. Rev.* – 2016. – V. 45 – P.5589-5604.
87. Guo, C. Probing the self-assembly mechanism of diphenylalanine-based peptide nanovesicles and nanotubes / C. Guo, Y. Luo, R. Zhou, G. Wei // *ACS Nano.* – 2012. – V. 6, N 5. – P. 3907-3918.
88. Erdogan, H. Morphological versatility in the self-assembly of Val-Ala and Ala-Val dipeptides / H. Erdogan, E. Babur, M. Yilmaz, E. Candas, M. Gordesel, Y. Dede, E. E. Oren, G. B. Demire, M. K. Ozturk, M. S. Yavuz, G. Demire // *Langmuir.* – 2015. – V. 31. – P. 7337-7345.
89. Handelman, A. Reconstructive phase transition in ultrashort peptide nanostructures and induced visible photoluminescence / A. Handelman, N. Kuritz, A. Natan, G. Rosenman // *Langmuir.* – 2016. – V. 32. – P. 2847-2862.
90. Mayans, E. Hierarchical self-assembly of di-, tri- and tetraphenylalanine peptides capped with two fluorenyl functionalities: from polymorphs to dendrites / E. Mayans, G. Ballano, J. Casanovas, L.J. del Valle, M.M. Perez-Madrigal, F. Estrany, A.I. Jimenez, J. Puiggal, C. Cativiela, C. Aleman // *Soft Matter.* – 2016. – V. 12. – P. 5475-5488.
91. Mason, T. O. Expanding the solvent chemical space for self-assembly of dipeptide nanostructures / T.O. Mason, D.Y. Chirgadze, A. Levin, L. Adler-Abramovich, E. Gazit, T.P.J. Knowles, A.K. Buell // *ACS Nano.* – 2014. – V. 8. – P. 1243-1253.

92. Huang, R. Solvent and surface controlled self-assembly of diphenylalanine peptide: From microtubes to nanofibers / R. Huang, W. Qi, R. Su, J. Zhao, Z. He // *Soft Matter*. – 2011. – V. 7. – P. 6418-6421.
93. Huang, R. Temperature-induced reversible self-assembly of diphenylalanine peptide and the structural transition from organogel to crystalline nanowires / R. Huang, Y. Wang, W. Qi, R. Su, Z. He // *Nanoscale Res.Lett.* – 2014. – V. 9. – P. 1-9.
94. Wang, X. Aligning 3D nanofibrous networks from self-assembled phenylalanine nanofibers / X. Wang, Y. C. Chen, B. Li // *RSC Adv.* – 2015. – V. 5. – P. 8022-8027.
95. Korolkov, V.V. Surface mediated L-phenylalanyl-L-phenylalanine assembly into large dendritic structures / V.V. Korolkov, S. Allen, C.J. Roberts, S.J.B. Tendler // *Faraday Discuss.* – 2013. – V. 166. – P. 257-267.
96. Wang, J. Trace solvent as a predominant factor to tune dipeptide selfassembly / J. Wang, K. Liu, L. Yan, A. Wang, S. Bai and X. Yan // *ACS Nano*. – 2016. – V. 10. – P. 2138-2143.
97. Lamm, M.S. Laminated morphology of nontwisting beta-sheet fibrils constructed via peptide self-assembly / M.S. Lamm, K. Rajagopal, J.P. Schneider, D.J. Pochan // *J. Am. Chem. Soc.* – 2005. – V. 127. – P. 16692-16700.
98. Handelman, A. Reconstructive phase transition in ultrashort peptide nanostructures and induced visible photoluminescence / A. Handelman, N. Kuritz, A. Natan, G. Rosenman // *Langmuir*. – 2016. – V. 32. – P. 2847-2862.
99. Adler-Abramovich, L. Self-assembled arrays of peptide nanotubes by vapour deposition / L. Adler-Abramovich, D. Aronov, P. Beker, M. Yevnin, S. Stempler, L. Buzhansky, et al // *Nat Nanotechnol.* – 2009. – V.4. – P.849-854.
100. Shklovsky, J. Bioinspired peptide nanotubes: deposition technology and physical properties / J. Shklovsky, P. Beker, N. Amdursky, E. Gazit, G. Rosenman // *Mater Sci Eng B*. – 2010. – V.169. – P.62–66.

101. Ryu, J. High-temperature self-assembly of peptides into vertically wellaligned nanowires by aniline vapor / J. Ryu, C.B. Park // *Adv Mater.* –2008. V.20. – P.3754–3758.
102. Ryu, J. High stability of self-assembled peptide nanowires against thermal, chemical, and proteolytic attacks / J. Ryu, C.B. Park // *Biotechnol Bioeng* – 2010. – V.105. – P.221–230.
103. Еремин, Е.Н. Основы химической кинетики / Е.Н. Еремин // Москва: Высшая школа. – 1976. – 375 с.
104. Ziganshin, M.A. Thermally Induced Self-Assembly and Cyclization of L-Leucyl-L-Leucine in Solid State / M.A. Ziganshin, A.S. Safiullina, A. V. Gerasimov, S.A. Ziganshina, A.E. Klimovitskii, K.R. Khayarov, V.V. Gorbachuk // *J. Phys. Chem. B.* – 2017. – V.121. – P.8603-8610.
105. Vyazovkin, S. ICTAC Kinetics Committee Recommendations for Performing Kinetic Computations on ThermalAnalysis Data / S. Vyazovkin, A. K. Burnham, J. M. Criado, L. A. Perez-Maqueda // *Thermochim. Acta* – 2011. – V.520. – P.1–19.
106. Vyazovkin, S. The Handbook of Thermal Analysis & Calorimetry in: M.E. Brown, P.K. Gallagher (Eds.), *Recent Advances, Techniques and Applications* / S. Vyazovkin // Elsevier. – 2008. – p.503.
107. Vyazovkin, S. Isoconversional kinetic analysis of thermally stimulated processes in polymers / S. Vyazovkin, N. Sbirrazzuoli, // *Macromol. Rapid Commun.* – 2006. – V.27. – P.1515–1532.
108. Friedman, H.L. Kinetics of thermal degradation of char-forming plastics from thermogravimetry. Application to a phenolic plastic / *J. Polym. Sci.* – 1964. – P.183–195.
109. Starink, M.J. The determination of activation energy from linear heating rate experiments: a comparison of the accuracy of isoconversion methods / M.J. Starink // *Thermochim. Acta.* – 2003. – V.404. – P.163–176.
110. Sbirrazzuoli, N. Is the Friedman method applicable to transformations with temperature dependent reaction heat? / N. Sbirrazzuoli // *Macromol. Chem. Phys.* – 2007. – V.208. – P.1592–1597.

111. Doyle, C.D. Estimating isothermal life from thermogravimetric data / J. Appl. Polym. Sci. – 1962. – V.6. – P.639.
112. Ozawa, T. A new method of analyzing thermogravimetric data / T. Ozawa // Bull. Chem. Soc. Japan. – 1965. – V.38. – P.1881.
113. Flynn, J.H. General treatment of the thermogravimetry of polymers / J.H. Flynn, L.A. Wall // J. Res. Nat. Bur. Standards. – 1966. – V.70. – P.487.
114. Akahira, T. Method of determining activation deterioration constant of electrical insulating materials / T. Akahira, T. Sunose, // Res. Report Chiba Inst. Technol. – 1971. – V.16. – P.22–31.
115. Vyazovkin, S. Model-free and model-fitting approaches to kinetic analysis of isothermal and nonisothermal data / S. Vyazovkin, C.A. Wight // Thermochim. Acta. – 1999. – P.53–68.
116. Brown, M.E. Computational aspects of kinetic analysis. Part A: The ICTAC kinetics project: data, methods, and results / M.E. Brown, M. Maciejewski, S. Vyazovkin, R. Nomen, et.al. // Thermochim. Acta – 2000. – V.355. – P.125–143.
117. Vyazovkin, S. ICTAC Kinetics Committee Recommendations for Collecting Experimental Thermal Analysis Data for Kinetic Computations / S. Vyazovkin, K. Chrissafis, M.-R. Di Lorenzo, N. Koga // Thermochim. Acta – 2014. – V.590. – P.1–23.
118. Kissinger, H. E. Variation of Peak Temperature with Heating Rate in Differential Thermal Analysis / H. E. Kissinger // J. Res. Natl. Bur. Stand. (U. S.) – 1956. – V.57. – P.217–221.
119. Boublik, T. The vapour pressures of pure substances / T. Boublik, V. Hala, E. Fried. // Amsterdam: Elsevier – 1973. – P.636.
120. Сиггия С. Ханна Дж. Количественный органический анализ по функциональным группам: Пер с англ. — М.: Химия, 1983, сс. 486—489.
121. Ларионов, Р.А. Кинетика циклизации дипептида глицил-глицин в твердой фазе / Р.А. Ларионов, Ш.Р. Ахметшин, А.В. Герасимов, А.С. Морозова, С.А. Зиганшина, Х.Р. Хаяров, В.В. Горбачук, М.А. Зиганшин // ЖОрХ – 2022. – Т.58. – С.787-795.

122. Ziganshin, M.A. Thermally induced cyclization of L-isoleucyl-L-alanine in solid state: Effect of dipeptide structure on reaction temperature and self-assembly / M.A. Ziganshin, R.A. Larionov, A.V. Gerasimov, S.A. Ziganshina, A.E. Klimovitskii, K.R. Khayarov, T.A. Mukhametzyanov, V.V. Gorbachuk // *J. Pept. Sci.* – 2019. – V.25. – Article e3177.
123. Миргазиева, Э.Р. Циклизация дипептида L-аланил-L-изолейцин в твердой фазе: влияние последовательности аминокислотных остатков на кинетику реакции / Э.Р. Миргазиева, Р.А. Ларионов, С.А. Зиганшина, Х.Р. Хаяров, В.В. Горбачук, М.А. Зиганшин // *Изв. Акад. наук. сер. хим.* – 2024. – Т.73. – С.1-9.
124. Görbitz, C.H. Nanotubes from hydrophobic dipeptides: pore size regulation through side chain substitution / C.H. Görbitz // *New Journal of Chemistry* – 2003. – V.27. – P.1789-1793.
125. Nitecki, D.E. Simple route to sterically pure diketopiperazines / D.E. Nitecki, B. Halpern, J.W. Westley // *J. Org. Chem.* – 1968. – V.33. – P.864-866.
126. Ларионов, Р.А. Циклизация дипептида L-лейцил-L-валин в кристаллической фазе в неизотермических условиях / Р.А. Ларионов, С.А. Зиганшина, А.Е. Климовицкий, Х.Р. Хаяров, О.Б. Бабаева, В.В. Горбачук, М.А. Зиганшин // *ЖОХ.* – 2023. – Т.93. – С.1711-1721.
127. Larionov, R.A. A new insight into the mechanism of solid-state cyclization of dipeptides: the effect of the sequence of amino acid residues in phenylalanyl-leucine and leucyl-phenylalanine / R.A. Larionov, S.A. Ziganshina, K.R. Khayarov, A.E. Klimovitskii, A.V. Gerasimov, V.V. Gorbachuk, N.V. Lantsova, M.A. Ziganshin // *Thermochim Acta.* – 2024. – V.731. – Article 179645.
128. Ding, Z.-G. ¹H and ¹³C NMR assignments of eight nitrogen containing compounds from *Nocardia albisp. nov* (YIM 30243T) / Z.-G. Ding, J.-Y. Zhao, P.-W. Yang, M.-G. Li // *Magn. Reson. Chem.* – 2009. – V.47. – P.366–370.
129. Ye, F. Absolute Configuration of (2 R, 3 R, 6 S, 8 R)-Methyl Homononactate, a Polyketide from Actinomycetes *Streptomyces* sp. R-527F of the Arctic Region /

- F. Ye, M. H. Cai, B. Chen, W. Xiao, X. W. Li, Y.W. Guo // *Chem Nat Compd.* – 2018. – V.54. – P.821-825.
130. Leyte-Lugo, M. Diketopiperazines from *Alternaria dauci* / M. Leyte-Lugo, P. Richomme, L.M. Peña-Rodriguez // *Journal of the Mexican Chemical Society* – 2020. – V.64. – P.283-290.
131. Lin, S. Control of the Handedness of Self-assemblies of Dipeptides by the Chirality of Phenylalanine and Steric Hindrance of Phenylglycine / S. Lin, Y. Li, B. Li, Y. Yang // *Langmuir.* – 2016. – V.32. – P.7420-7426.
132. Pérez-Mellor, A. Solid-state synthesis of cyclo LD-diphenylalanine: A chiral phase built from achiral subunits / A. Pérez-Mellor, K. Le Barbu-Debus, A. Zehnacker // *Chirality.* – 2020. – V.32. – P.693-703.
133. Bellamy, L.J. The infra-red spectra of complex molecules / New York: Wiley – 1975. – p.433.
134. Cheam, T.C. Vibrational analysis of crystalline diketopiperazine-I. raman and i.r. spectra / T.C. Cheam, S. Krimm // *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* – 1984. – V.40. – P.481-501.
135. Miyazawa, T. Normal vibrations of monosubstituted amides in the cis configuration and infrared spectra of diketopiperazine / *J Mol Spectrosc.* – 1960. – V.4. – P.155-167.
136. Morozova, A.S. Water admixture triggers the self-assembly of the glycyl-glycine thin film at the presence of organic vapors / A.S. Morozova, S.A. Ziganshina, E.O. Kudryavtseva, N.V. Kurbatova, L.I. Savostina, A.A. Bukharaev, M.A. Ziganshin // *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* – 2022. – V.649. – Article 129541.
137. Ziganshin, M.A. Additive and antagonistic effects of substrate and vapors on self-assembly of glycyl-glycine in thin films / M.A. Ziganshin, A.S. Morozova, S.A. Ziganshina, V.V. Vorobev, K. Suwińska, A.A. Bukharaev, V.V. Gorbachuk // *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* – 2019. – V. 690. – P. 67-83.

138. Pérez-Mellor, A. Solid-state synthesis of cyclo LD-diphenylalanine: A chiral phase built from achiral subunits / A. Pérez-Mellor, K. Le Barbu-Debus, A. Zehnacker // *Chirality*. – 2020. – V.32. – P.693-703.
139. NIST Mass Spec Data Center, S.E. Stein, director, "Retention Indices" in NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69, Eds. P.J. Linstrom and W.G. Mallard, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD, 20899, doi:10.18434/T4D303, (retrieved June 25, 2018).
140. Ziganshin, M.A. Thermal analysis of clathrates of tripeptide LLL with organic compounds and water / M.A. Ziganshin, A.V. Gerasimov, V.V. Gorbachuk // *J. Therm. Anal. Calorim.* – 2015. – V. 119. – P. 1811-1816.
141. Soldatov, D. V. The ability of lower peptides to form co-crystals: inclusion compounds of Leu-Leu-Leu tripeptide with pyridine and picolines / D. V. Soldatov, T. J. Burchell, G. D. Enright // *Cryst. Eng. Comm.* – 2007. – V. 9. – P. 922-929.
142. Perov, I.A. Smart thermal behavior of tripeptide leucyl-leucyl-leucine towards vapors of binary mixture of benzene and tetrachloromethane / I.A. Perov, S.A. Ziganshina, R.A. Larionov, A.V. Gerasimov, V.V. Gorbachuk, M.A. Ziganshin // *Thermochim Acta*. – 2021. – V.700. – Article 178937.
143. Gorbachuk, V.V. Unusually high efficiency of β -cyclodextrin clathrate preparation by water-free solid-phase guest exchange / V.V. Gorbachuk, A.K. Gatiatulin, M.A. Ziganshin, A.T. Gubaidullin, L.S. Yakimova // *J. Phys. Chem. B*. – 2013. – V.117. – P.14544-14556.
144. Ziganshin, M. A. Interaction of l-leucyl- l-leucyl- l-leucine thin film with water and organic vapors: receptor properties and related morphology / M.A. Ziganshin, A.V. Gerasimov, V.V. Gorbachuk // *J. Pept. Sci.* – 2012. – V. 18. – № 4. – P. 209-214.
145. Gorbachuk, V. V. Nonlinear Structure–Affinity Relationships for Vapor Guest Inclusion by Solid Calixarenes / V.V. Gorbachuk, A. G. Tsifarkin, I. S. Antipin // *J. Phys. Chem. B*. – 2002. – V. 106. – № 23. – P. 5845-5851.

146. Gatiatulin, A. K. Size exclusion effect in binary inclusion compounds of α -cyclodextrin / A. K. Gatiatulin, V. Yu. Osel'skaya, M. A. Ziganshin, V. V. Gorbachuk // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2018. – V. 20. – P. 26105-26116.
147. Ziganshin, M. A. Metastable tert-butylcalix[6]arene with unusually large tunable free volume for non-threshold enclathration of volatiles / M. A. Ziganshin, A. V. Yakimov, , A. T. Gubaidullin, V. V. Gorbachuk // *Org. Biomol. Chem.* – 2008. – V. 6. – P. 982-985.
148. Gataullina, K.V. Twice as smart behavior of tert-butylthiacalix[4]arene derivative in glassy and crystalline form / K. V. Gataullina, M. A. Ziganshin, I. I. Stoikov, A. T. Gubaidullin, V. V. Gorbachuk // *Physical Chemistry Chemical Physics.* – 2015. – V. 17. – P. 15887-15895.
149. Safina, G.D. Analysis of guest binary mixtures by tert-butylcalix[6]arene using host memory of previously bound guests / G. D. Safina, M. A. Ziganshin, A. T. Gubaidullin, V. V. Gorbachuk // *Org. Biomol. Chem.* – 2013. – V. 11. – P. 1318-1325.
150. Ziganshin, M. A. Unusually High Selectivity of Guest Exchange in tert-Butylthiacalix[4]arene Clathrate Producing More Thermostable Inclusion and Memory of Guest / M. A. Ziganshin, V. V. Gorbachuk, A. B. Drapailo // *The Journal of Physical Chemistry.* – 2012. – V. 116. – P. 11379-11385.
151. Safina, G. D. Molecular recognition of chloroform by divergent polymorphic transitions in tert-butylthiacalix[4]arene tetrasubstituted with N-(2-hydroxyethyl)carbamoylmethoxy groups in a lower rim / G.D. Safina, O. M. Gavrilova. M. A. Ziganshin, I. I. Stoikov, I. S. Antipin, V. V. Gorbachuk // *Mendeleev Communications.* – 2011. – V. 21. – P. 291-292.
152. Gabdulkhaev, M. N. Smart control of calixarene polymorphic states / M. N. Gabdulkhaev, M. A. Ziganshin, A. V. Buzyurov, C. Schick, S. E. Solovieva, E. V. Popova, A. T. Gubaidullin, V. V. Gorbachuk // *CrystEngComm.* – 2020. – V. 22. – P. 7002-7015.

153. Gorbachuk, V.V. Supramolecular interactions of solid human serum albumin with binary mixtures of solvent vapors / V.V. Gorbachuk, M.A. Ziganshin, B.N. Solomonov // *Biophys. Chem.* – 1999. – V. 81. – P. 107-123.
154. Go, K. Crystal structure and a twisted β -sheet conformation of the tripeptide L-leucyl-L-leucyl-L-leucine monohydrate trimethanol solvate: Conformation analysis of tripeptides / K. Go, R. Parthasarathy // *Biopolymers.* – 1995. – V. 36. – P. 607-614.
155. Solomonov, B.N. Solvation of organic-compounds - comparative enthalpy analysis of cavity formation in solvents / B. N. Solomonov, V.V. Gorbachuk, V. B. Novikov, A. I. Konovalov, A. N. Vedernikov, M. D. Borisover, I. S. Antipin // *Zhurnal Obshchei Khimii.* – 1982. – V. 52. – P. 2154–2160.
156. Hag. Park, J. Experimental reexamination of selected partition coefficients from Rohrschneider's data set / J. H. Park, A. Hussam, P. Couasson, D. Fritz, P. W. Carr // *Anal. Chem.* – 1987. – V. 59. – P. 1970-1976.

ПРИЛОЖЕНИЕ

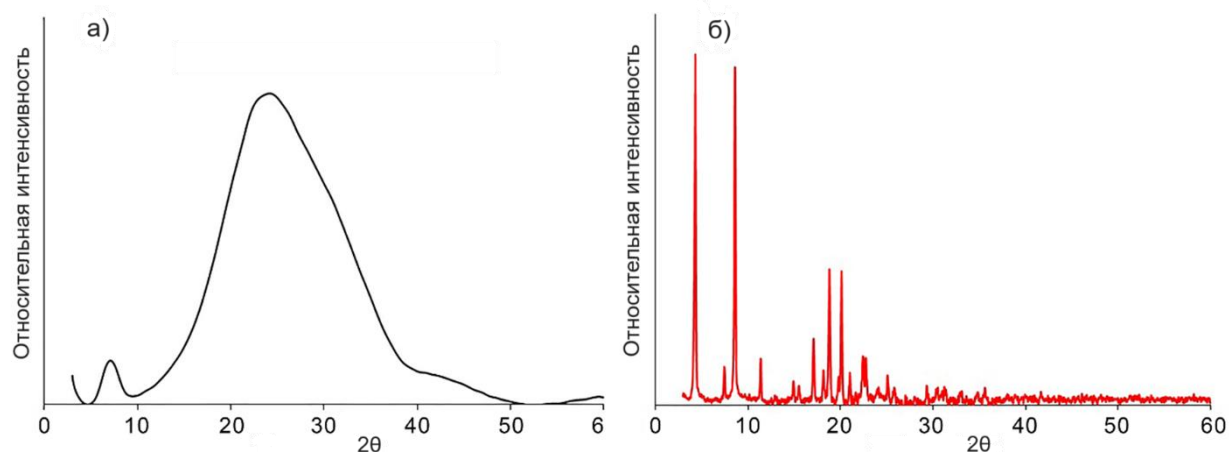


Рис. П1. Рентгеновские порошковые дифрактограммы а) аморфного и б) кристаллического **Leu-Phe**.

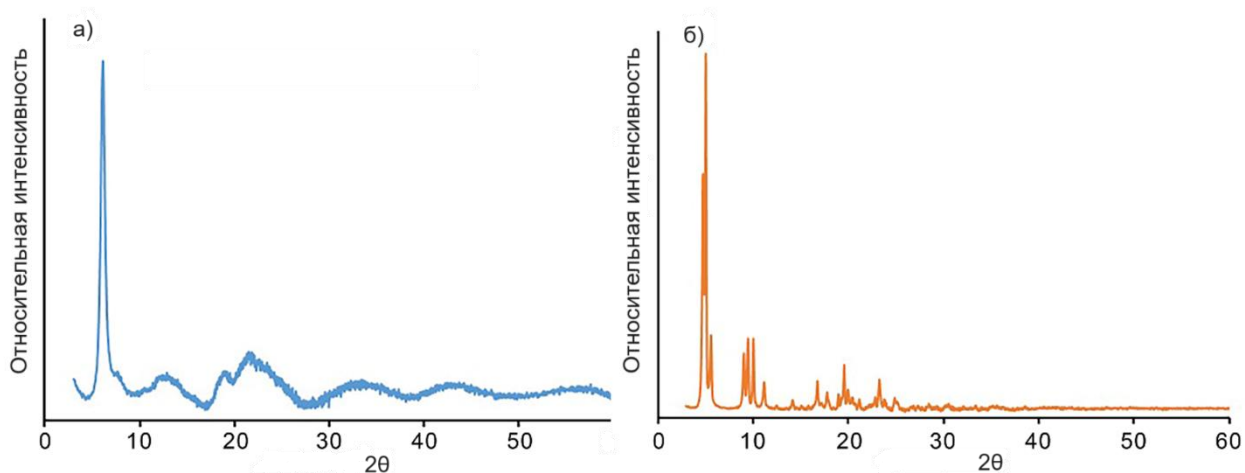


Рис. П2. Рентгеновские порошковые дифрактограммы а) аморфного и б) кристаллического **Phe-Leu**.

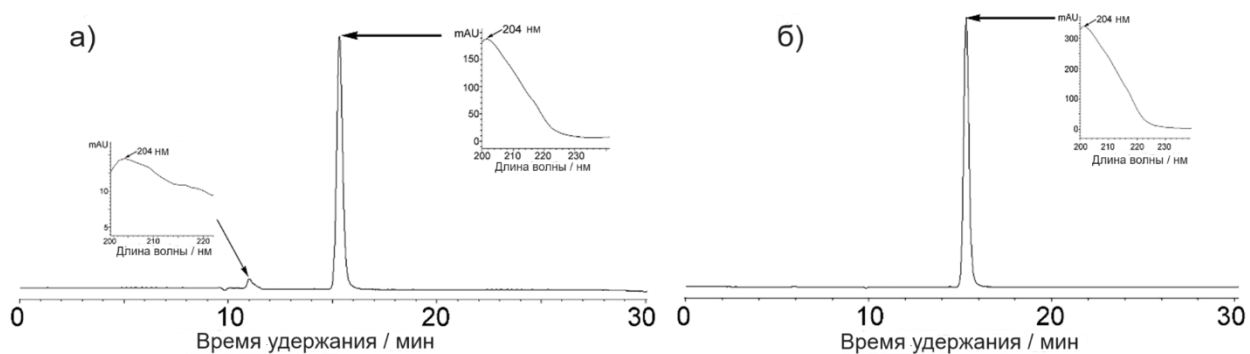


Рис. П3. Результаты энантиоселективной ВЭЖХ для а) *цикло(Leu-Phe)* и б) *цикло(Phe-Leu)*. УФ-спектры показаны на вставках.