



УДК 542.91+547.466.1+547.963

**СИНТЕЗ И КАТАЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИПЕПТИДОВ
РЕГУЛЯРНОГО СТРОЕНИЯ, СОДЕРЖАЩИХ
ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ****Халиков И. Х., Собиров М. М., Бердыева М. И.,
Валиев Р. В., Варфоломеев С. Д.****Таджикский государственный университет им. В. И. Ленина, Душанбе;*** Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

Описываются синтез и исследование каталитических свойств серии полипептидов регулярного строения, включающих остатки полифункциональных аминокислот, входящих в активный центр эстераз: $(\text{Ala-Tyr-Glu})_n$, $(\text{His-Ser-Glu})_n$, $(\text{Glu-His-Glu})_n$, $(\text{His-Glu})_n$, $(\text{Ser-His-Glu})_n$ и $(\text{His-Tyr-Glu})_n$. Мономеры для реакции поликонденсации синтезированы карбодимидным методом в растворе, полипептиды получены с помощью 2,4,5-трихлорфениловых эфиров. Для определения молекулярных масс свободных полипептидов и их фракционирования использован метод гель-фильтрации. Исследованы каталитические свойства синтетических полипептидов и показано, что полипептиды $(\text{Ala-Tyr-Glu})_n$ и $(\text{His-Ser-Glu})_n$ обладают некоторой энантиоселективностью в отношении гидролиза $Z\text{-L-Ala-ONp}$ и $Z\text{-D-Ala-ONp}$ (K_D/K_L равняются 1,3 и 1,17 соответственно).

Важную роль в выполнении биологических функций в живом организме играют ферменты, которые с поразительно высокой скоростью катализируют различные химические реакции, происходящие в живых клетках. Эти белки в настоящее время широко изучаются, так как находят применение в различных сферах медицины и биотехнологии. Однако источники их поставки ограничены, поэтому многие исследователи заняты поиском более рациональных способов их получения или же стремятся заменить их модельными соединениями, обладающими близкими к ним свойствами.

Химический синтез молекул даже небольших белков требует много сложных и трудоемких химических операций [1], поэтому весьма перспективным представляется синтез отдельных их фрагментов, приближающихся по своей структуре и свойствам к природным макромолекулам. В данной работе в качестве объектов исследования выбраны полипептиды регулярного строения, моделирующие активный центр некоторых эстераз [2]. Известно, что в ферментативном катализе, где происходит доворонкоакценторное взаимодействие с субстратом, принимают участие определенные функциональные группы аминокислот, в частности имидазольная группа гистидина и карбоксильные группы глутаминовой и аспарагиновой кислот. Поэтому изучение влияния отдельных функциональных групп на процесс катализа на примере полипептидов регулярного строения, содержащих упомянутые выше аминокислоты, представляется интересным.

В настоящее время установлено, что «активный центр» фермента образуется при формировании определенной пространственной структуры белка и для его функционирования вовсе не обязательно наличие полного набора аминокислот, входящих в состав данного фермента. Именно с этой точки зрения создание определенных синтетических моделей полипептидов-катализаторов, которые по принципу своего действия могут быть близки к природным ферментам, помогло бы созданию искусствен-

Принятые сокращения: NFA — *n*-нитрофенилацетат, DCC — *N,N'*-дициклогексилкарбодимид, Et₃N — триэтиламин, DMF — диметилформамид, ONp — *o*-нитрофенилокс-, OTcr — трихлорфенилокс-, Nps — нитрофенилсульфенил-, OPfp — пентафторфенилокси-.

ных биокатализаторов. Не исключено, что одним из путей решения этого вопроса является получение полипептидов регулярного строения, содержащих полифункциональные аминокислоты.

К настоящему времени опубликованы работы, в которых исследовалась эстеразная активность как смеси аминокислот, так и синтетических олиго- и полипептидов разного строения, а также изучалось влияние различных факторов на их гидролитическую активность [3—10]. Интерес к такого рода работам все возрастает. В предыдущих работах [2, 9] мы сообщали, что полипептиды, содержащие трифункциональные аминокислоты, способны гидролитически расщеплять *n*-нитрофенилацетат, однако скорость расщепления была на несколько порядков ниже, чем в случае протеолитических ферментов.

Структурные исследования показали, что каталитическая активность в случае регулярных полипептидов мало зависит от упорядоченности структуры. Поэтому в данной работе нами предпринята попытка путем варьирования аминокислотной последовательности существенно повысить каталитическую активность полипептидов. С этой целью были синтезированы 6 полипептидов регулярного строения: $(\text{His-Glu})_n$ (I), $(\text{His-Ser-Glu})_n$ (II), $(\text{Ala-Tyr-Glu})_n$ (III), His-(Tyr-Glu)_n (IV), $(\text{Glu-His-Glu})_n$ (V), $(\text{Ser-His-Glu})_n$ (VI).

Синтез полипептидов осуществляли классическими методами пептидной химии. В процессе синтеза пептидов-мономеров N^α -аминогруппы аминокислот блокировали *o*-нитрофенилсульфенильной, карбобензокси- и трет-бутилоксикарбонильной группировками, а γ -карбоксильную группу глутаминовой кислоты, гидроксил фенольной группы тирозина и имидазольную группу гистидина — бензильной группой. 2,4,5-Трихлорфениловые эфиры *N*-защищенных аминокислот и пептидов синтезировали карбодимидным методом. Полученные защищенные пептиды очищали перекристаллизацией из органических растворителей и в некоторых случаях хроматографией на колонках с силикагелем марки L100/160 (ЧССР). Синтезированные 2,4,5-трихлорфениловые эфиры пептидов подвергали поликонденсации в диметилформамиде или диметилсульфоксиде, содержащих триэтиламин, в течение 7—10 сут. Бензильные защиты с боковых функциональных групп удаляли каталитическим гидрогенолизом в присутствии палладиевой черни в течение 4 сут. Полноту удаления групп с полипептидов контролировали по исчезновению характерных полос поглощения в ИК-спектрах в области 1750, 750, 700 см^{-1} и в УФ-спектрах в области 245—255 нм. Следует отметить, что снятие бензильной защиты в случае $\text{His(Bzl)-Ser-Glu(Bzl)}_n$ в описанных условиях проходило не полностью, поэтому пришлось увеличить время гидрирования и часто менять катализатор.

Полученные свободные полипептиды очищали диализом и гель-фильтрацией на сефадексе LH-20, а затем фракционировали на сефадексе G-50 (рис. 1). Полипептид $(\text{Ser-His-Glu})_n$ вследствие очень низкой растворимости в водных растворах был фракционирован в смеси диоксан — вода (1:3) на геле HW-50 (рис. 2). Молекулярная масса этого полипептида определена методом Ван-Слайка. В результате фракционирования были отобраны основные фракции полипептидов с молекулярными массами 6500—16 000, которые использовались для изучения их каталитических свойств.

Из всего имеющегося у нас набора полипептидов каталитическую активность проявляли лишь полимеры (I) — (IV), полимеры (V), (VI) подобными свойствами не обладали.

Были исследованы зависимости скорости гидролиза трех субстратов (*n*-нитрофенилацетата, *Z-L-Ala-ONp* и *Z-D-Ala-ONp*) от концентрации субстрата (рис. 3—6). Для всех изученных случаев зависимости линейны и не наблюдается характерных для ферментативных реакций кривых с «насыщением» по субстрату. Тангенс угла наклона зависимости скорости от концентрации субстрата дает наблюдаемую константу скорости первого порядка. Если разделить эту величину на концентрацию полимера, приняв в качестве основы концентрацию мономерных звеньев, можно по-

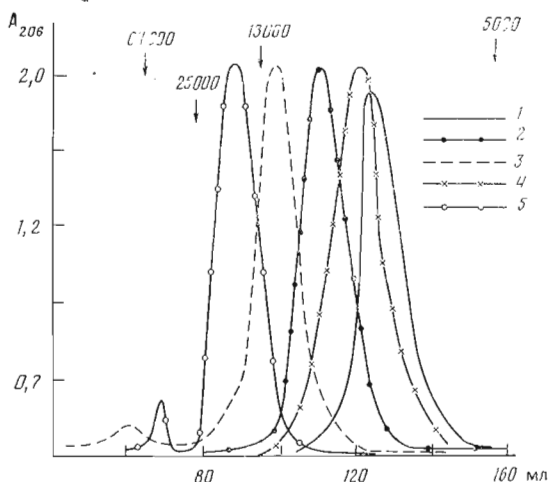


Рис. 1

Рис. 1. Кривые элюции полипептидов (I) (1), (II) (2), (III) (3), (IV) (4) и (V) (5) на колонке с сефадексом G-50 в воде. Скорость элюции 12 мл/ч. Стрелками указано место выхода маркерных белков; цифры соответствуют их молекулярной массе

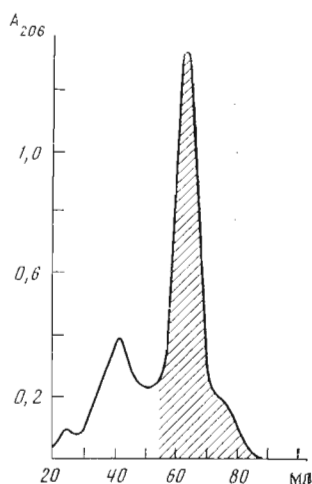


Рис. 2

Рис. 2. Кривая элюции полипептида (Ser-His-Glu)_n на колонке (50×20 см) с HW-50. Скорость элюции 12 мл/м. Отобраны заштрихованные фракции

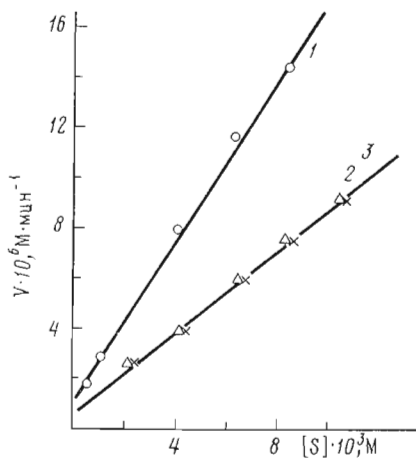


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость каталитической активности (His-Glu)_n от [S] при [E] 5·10⁻³ M, pH 8,0, t 30° C: 1 - *p*-NFA; 2 - *Z-L*-Ala-ONp, 3 - *Z-D*-Ala-ONp

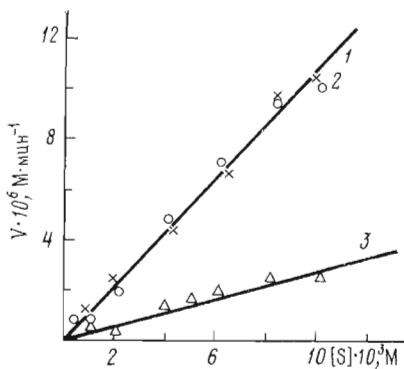


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость каталитической активности His-(Tyr-Glu)_n от [S] при [E] 5·10⁻³ M, pH 8,0, t 30° C: 1 - *Z-L*-Ala-ONp, 2 - *Z-D*-Ala-ONp, 3 - *p*-NFA

лучить эффективную константу скорости второго порядка, характеризующую реакционную способность данного полимера в реакции гидролиза *n*-нитрофениловых эфиров. Значения найденных констант скорости второго порядка приведены в табл. 1. Видно, что синтезированные полимерные катализаторы обладают определенной специфичностью. Так, реакционная способность (His-Ser-Glu)_n, (Ala-Tyr-Glu)_n и His-(Tyr-Glu)_n в реакции гидролиза аминокислотных субстратов в несколько раз выше, чем в реакции гидролиза *n*-нитрофенилацетата, в то время как под действием (His-Glu)_n все исследованные субстраты гидролизуются примерно с одинаковой скоростью.

Наибольший интерес представляет обнаруженный эффект энантиоселективности в реакции гидролиза *Z-L*-Ala-ONp и *Z-D*-Ala-ONp, который наблюдается в реакциях с участием (His-Ser-Glu)_n и (Ala-Tyr-Glu)_n. Константы энантиоселективного гидролиза (K_D/K_L) для вышеупомянутых

Реакционная способность каталитически активных полимеров в реакции гидролиза различных субстратов
Константы скорости второго порядка, $M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$, $30^\circ C$, pH 8,0

Субстрат	(His-Glu) _n	(His-Ser-Glu) _n	(Ala-Tyr-Glu) _n	His-(Tyr-Glu) _n
<i>n</i> -Нитрофенилацетат	$2,98 \cdot 10^{-1}$	$6,7 \cdot 10^{-2}$	$3,5 \cdot 10^{-2}$	$4,4 \cdot 10^{-2}$
<i>Z-L</i> -Ala-ONp	$2,3 \cdot 10^{-1}$	$2,1 \cdot 10^{-1}$	$1,86 \cdot 10^{-1}$	$2,5 \cdot 10^{-1}$
<i>Z-D</i> -Ala-ONp	$1,8 \cdot 10^{-1}$	$2,5 \cdot 10^{-1}$	$2,3 \cdot 10^{-1}$	$2,4 \cdot 10^{-1}$

Таблица 2

Зависимость энантиоселективности полипептидов от их молекулярных масс

$M_r \cdot 10^{-3}$ His-Ser-Glu) _n при <i>n</i>	K_D/K_L	$M_r \cdot 10^{-3}$ (Ala-Tyr-Glu) _n при <i>n</i>	K_D/K_L
4	1,08	4	1,07
6	1,12	6	1,15
8	1,17	7	1,20
9	1,17	8	1,25
10	1,17	9	1,30
11	1,16	10	1,28

полипептидов соответственно равны 1,17 и 1,3. Следует отметить, что для этих полипептидов были также исследованы зависимости энантиоселективности от молекулярных масс (табл. 2). При этом было обнаружено, что предельное значение молекулярных масс, при котором проявляется энантиоселективность, для (Ala-Tyr-Glu)_n составляет $9-10 \cdot 10^3$, а для (His-Ser-Glu)_n — $8-10 \cdot 10^3$.

Исследование pH-зависимости каталитического действия соединений (I) — (IV) показывает, что в катализе участвует ионогенная группа с $pK \approx 7,0$ (рис. 7, 8). Это позволяет думать, что в катализе принимает участие ионогенная группа глутаминовой кислоты, pK_a которой существенно смещено в сторону высоких значений.

Исходя из изложенных выше данных, следует отметить, что синтетические полипептиды регулярного строения по характеру своего действия сходны с природными гидролитическими ферментами, однако степень их активности сравнительно невелика.

Экспериментальная часть

В работе были использованы аминокислоты фирмы Reanal (Венгрия). Чистота продуктов контролировалась ТСХ (на пластинках Silufol) и хроматографией на бумаге FN-14 (ГДР) в следующих системах растворителей: *n*-бутанол — вода — уксусная кислота, 4:1:1 (А), *n*-бутанол — вода, пиридин, уксусная кислота, 3:2,4:2:0,6 (Б), толуол — диоксан — гептан — этанол, 10:6:3:1 (В), бензол — этанол, 2:1 (Г), хлороформ — метанол, 60:13 (Д). Пептиды детектировали парами иода и 0,5% раствором нингидрина в ацетоне.

Промежуточные соединения Вос-Ala-OH, Вос-Tyr(Bzl)-OH, Nps-Glu(Bzl)-OТер, Z₂-His-OPfp, Вос-His(Bzl)-OH, Nps-Ser-Glu(Bzl)-OТер, (Tyr-Glu)_n были получены по описанным методикам [11-15]. В процессе ступенчатого синтеза полипептидов Z-группу снимали действием HBr/CH₃COOH (лед.) и HBr/диоксан, Nps-группу — 2,5 н. HCl в этилацетате, а Вос — 3 н. раствором HCl в этилацетате или CF₃COOH. Полипептиды выделяли из раствора осаждением из метанола эфиром, осадок промывали водой до полного удаления триэтиламмонийных солей и высушивали в вакууме. Растворители, в которых проводили гидролиз, во избежание отравления катализатора выдерживали над никелем Ренея. Полученные свободные полипептиды очищали гель-фильтрацией на колонке (40×1,5 см) с сефадексом LH-20 (25-100 мкм). В качестве элюента использовали смесь диоксан — вода (1:1). Очищенные таким образом полипептиды фракционировали на калиброванной маркерными белками колонке (60×2 см) с сефадексом G-50 со скоростью 12 мл/ч (рис. 1), что позволило определить молекулярные массы фракций.

Исследования каталитических свойств полипептидов проводили в Межфакультетской научно-исследовательской лаборатории молекулярной биологии и биооргани-

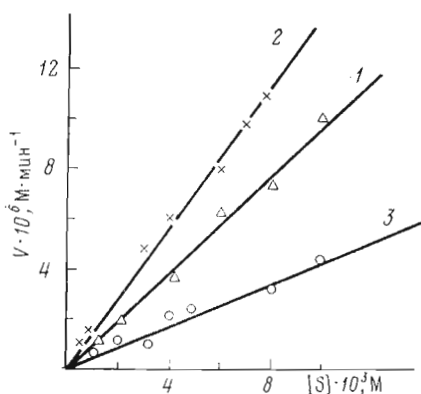


Рис. 5

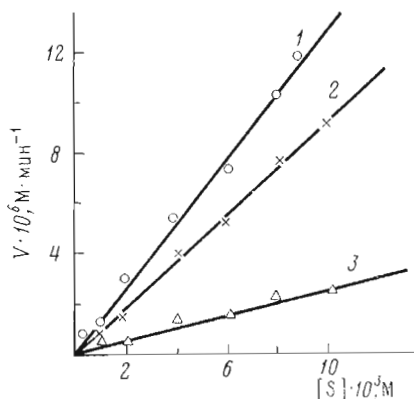


Рис. 6

Рис. 5. Зависимость каталитической активности $(\text{His-Ser-Glu})_n$ от $[S]$ при $[E] 5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $\text{pH } 8,0$, $t 30^\circ \text{C}$: 1 — $Z\text{-L-Ala-ONp}$, 2 — $Z\text{-D-Ala-ONp}$, 3 — $p\text{-NFA}$

Рис. 6. Зависимость каталитической активности $(\text{Ala-Tyr-Glu})_n$ от $[S]$ при $[E] 5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $\text{pH } 8,0$, $t 30^\circ \text{C}$: 1 — $Z\text{-D-Ala-ONp}$, 2 — $Z\text{-L-Ala-ONp}$, 3 — $p\text{-NFA}$

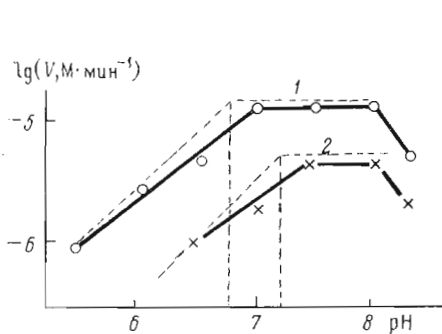


Рис. 7

Рис. 7. pH-Зависимость каталитической активности полипептидов $(\text{His-Glu})_n$ (1) и $(\text{Ala-Tyr-Glu})_n$ (2) при $[S] 10^{-3} \text{ M}$, $[E] 5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $t 30^\circ \text{C}$. Для оценки pK_a групп, контролирующую каталитическую активность, проведены штриховые линии с тангенсом угла наклона 1 и 0

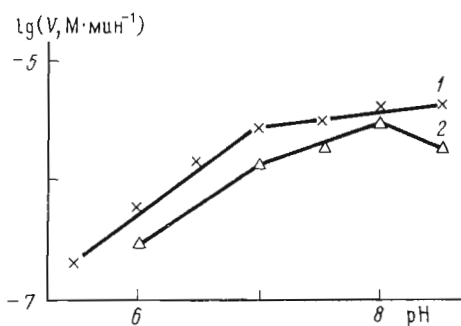


Рис. 8

Рис. 8. pH-Зависимость каталитической активности полипептидов His-(Tyr-Glu)_n (1) и $(\text{His-Ser-Glu})_n$ (2) при $[S] 10^{-3} \text{ M}$, $[E] 5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $t 30^\circ \text{C}$

ческой химии им. А. Н. Белозерского (МГУ). Кинетические измерения проводились на спектрофотометре «Хитачи-124» при 320 нм (λ_{max} p -нитрофенола) и 400 нм (λ_{max} p -нитрофенолят-ионов). В качестве субстратов были использованы $p\text{-NFA}$, $Z\text{-L-Ala-ONp}$ и $Z\text{-D-Ala-ONp}$.

1. *Вос-His(Bzl)-Ser-Glu(Bzl)-ОТср (VII)*. К раствору 1,59 г (3,68 ммоль) Вос-His(Bzl)-Ser-OH и 0,94 г (4,56 ммоль) DCC в 30 мл тетрагидрофурана при интенсивном перемешивании и охлаждении до -5°C прибавили 2,5 г (5,5 ммоль) HCl-Glu(Bzl)-ОТср и 0,77 мл (5,5 ммоль) Et_3N и перемешивали 2 ч при 0°C . Затем перемешивание продолжали 4 ч при 18°C и реакционную смесь оставили на 8 ч, после чего раствор отфильтровали от дициклогексилмочевины, растворитель выпарили, остаток растворили в 40 мл хлороформа и промыли 10% лимонной кислотой, водой, 0,5 н. NaHCO_3 , водой и сушили над Na_2SO_4 . Растворитель упарили, остаток хроматографировали на колонке (2,5×100 см) с силикагелем L 100/160 в системе Г, получили 3 г (98,4%) маслообразного продукта (VII). R_f 0,36 (А), 0,72 (Г). $[\alpha]_D^{20} -16^\circ$ (c 2, CHCl_3).

2. *Вос-His(Bzl)-Glu(Bzl)-ОТср (VIII)* получали аналогично методике 1, исходя из 1,73 г (5 ммоль) Вос-His(Bzl)-OH, 2,26 г (5 ммоль) HCl-Glu(Bzl)-ОТср , 1,03 г (5 ммоль) DCC и 0,7 мл (5 ммоль) Et_3N ; реакцию проводили в 20 мл хлороформа. Получили 3 г (81%) маслообразного продукта (VIII). R_f 0,44 (В), 0,69 (Д), 0,84 (Е). $[\alpha]_D^{25} -5,26^\circ$ (c 2, DMF).

3. *Вос-Tyr(Bzl)-Glu(Bzl)-ОТср (IX)*. К охлажденному до -5°C раствору 2,5 г (6,73 ммоль) Вос-Tyr(Bzl)-OH и 1,6 г (7,8 ммоль) DCC в 20 мл тетрагидрофурана добавили 3 г (6,63 ммоль) HCl-Glu(Bzl)-ОТср и 0,92 мл (6,63 ммоль) Et_3N . Реакционную смесь перемешивали 2 ч при этой же температуре, 4 ч при 20°C и оставили на 14 ч при 18°C . Затем раствор отфильтровали, растворитель выпарили досуха в вакууме, а остаток растворили в 35 мл этилацетата и промыли 5% раствором лимон-

ной кислоты, водой, 0,5 н. NaHCO_3 , водой и сушили над Na_2SO_4 . Растворитель упарили в вакууме досуха, получили 4,36 г (85,5%) маслообразного продукта (IX). R_f 0,96 (А), 0,76 (Б). $[\alpha]_D^{20} + 6,94^\circ$ (с 4, этилацетат).

4. *Вос-Ala-Tyr(Bzl)-Glu(Bzl)-OTcp* (X) получали как описано в методике 1, исходя из 1 г (5,28 ммоль) *Вос-Ala-OH*, 1,09 г (5,28 ммоль) DCC, 4,1 г (5,3 ммоль) $\text{CF}_3\text{COOH} \cdot \text{Tyr(Bzl)-Glu(Bzl)-OTcp}$, 0,74 мл (5,3 ммоль) Et_3N . Получили 4,07 г (91,7%) маслообразного продукта (X). R_f 0,95 (А), 0,67 (Б), $[\alpha]_D^{20} + 8,2^\circ$ (с 2, CHCl_3).

5. *Вос-Ser-His(Bzl)-Glu(Bzl)-OTcp* (XI). К охлажденному до -15°C раствору 0,37 г (1,8 ммоль) *Вос-Ser-OH* в 5 мл этилацетата при интенсивном перемешивании добавили 0,37 г (1,8 ммоль) DCC, через 10 мин к этой смеси добавили охлажденную до -10°C суспензию 1,22 г (1,8 ммоль) $\text{HCl-His(Bzl)-Glu(Bzl)-OTcp}$ и 0,25 мл (1,8 ммоль) Et_3N в 10 мл этилацетата. Реакционную смесь перемешивали 2 ч при -10°C и 6 ч при 18°C . Затем раствор отфильтровали, фильтрат промыли 5% лимонной кислотой, водой, 0,5% NaHCO_3 , водой и сушили над Na_2SO_4 . После упаривания растворителя и очистки на колонке (2,5×100 см) с силикагелем L 100/160 в системе Д получили 1,2 г (80%) маслообразного продукта (XI). R_f 0,69 (Д), 0,87 (Б). $[\alpha]_D^{20} - 4,54^\circ$ (с 2,92, DMF).

6. *Вос-Glu(Bzl)-His(Bzl)-Glu(Bzl)-OTcp* (XII) получали аналогично методике 5, исходя из 3 г (4,4 ммоль) $\text{HCl-His(Bzl)-Glu(Bzl)-OTcp}$, 5 г (4,43 ммоль) *Вос-Glu(Bzl)-OH*, 1,2 г (5,82 ммоль) DCC и 0,62 мл (4,4 ммоль) Et_3N . После соответствующей обработки получили 4 г (92,6%) маслообразного продукта (XII). R_f 0,65 (Д), 0,9 (Б). $[\alpha]_D^{20} + 11,7^\circ$ (с 1,63, CHCl_3).

7. *HCl-His(Bzl)-Ser-Glu(Bzl)-OTcp* (XIII). К раствору 4 г (4,82 ммоль) продукта (VII) в 20 мл абсолютного этилацетата добавили 3,33 мл 3 н. HCl в этилацетате. Через 1 ч продукт осадили сухим эфиром, осадок отфильтровали, промыли эфиром и высушили под вакуумом. После перекристаллизации из сухого ацетона получили 2,5 г (67,5%) кристаллического продукта. Т. пл. 150°C , R_f 0,13 (А), 0,18 (Д).

8. *HCl-His(Bzl)-Glu(Bzl)-OTcp* (XIV) получали аналогично методике 7, исходя из 4,34 г (5,9 ммоль) продукта (VIII) и 4,8 мл (2 ммоль) 2,5 н. HCl в этилацетате. После добавления эфира выпадает тестообразная масса, которая кристаллизуется при растирании с сухим эфиром. Выход 3 г (74,7%). R_f 0,13 (Д). Т. пл. $79-80^\circ\text{C}$.

9. *CF}_3\text{COOH} \cdot \text{Tyr(Bzl)-Glu(Bzl)-OTcp}* (XV). К раствору 4,3 г (5,59 ммоль) продукта (IX) в 10 мл CH_2Cl_2 добавили 2 мл (1,5 экв.) CF_3COOH , энергично перемешали и оставили на 40 мин при 20°C . После этого добавили абсолютный бензол и упарили в вакууме досуха; эту операцию повторили несколько раз. Осадок несколько раз промыли декантацией абсолютным эфиром. Получили 3,5 г (80%) маслообразного продукта (XV). R_f 0,64 (А), 0,9 (Б), $[\alpha]_D^{20} + 8,67^\circ$ (с 4, этилацетат).

10. *CF}_3\text{COOH} \cdot \text{Ala-Tyr(Bzl)-Glu(Bzl)-OTcp}* (XVI) получали аналогично методике 9, исходя из 3,4 г (4,046 ммоль) продукта (X) и 0,6 мл CF_3COOH . В отличие от методики 9 смесь оставили на 4 ч при 20°C . Получили 2,7 г (78%) маслообразного продукта (XVI). R_f 0,56 (А), 0,51 (Б).

11. *HCl-Ser-His(Bzl)-Glu(Bzl)-OTcp* (XVII) получали аналогично методике 7, исходя из 1,2 г (1,45 ммоль) продукта (XI). Выход 0,85 г (77,2%). R_f 0,13 (Д), 0,36 (Б).

12. *HCl-Glu(Bzl)-His(Bzl)-Glu(Bzl)-OTcp* (XVIII) получали аналогично методике 7, исходя из 4 г (3,93 ммоль) продукта (XII). Выход 2,6 г (69,32%). Т. пл. $48-50^\circ\text{C}$, R_f 0,28 (А).

13. $[\text{His(Bzl)-Ser-Glu(Bzl)}]_n$ (XIX). 2 г (2,6 ммоль) $\text{HCl-His(Bzl)-Ser-Glu(Bzl)-OTcp}$ растворили в 2 мл DMF и при перемешивании и охлаждении добавили 0,36 мл (2,57 ммоль) абсолютного Et_3N . Смесь оставили при 18°C на 10 сут. Затем продукт осадили эфиром, отфильтровали, остаток промыли дистиллированной водой, смесью метанол-эфир (1:3) и высушили под вакуумом. Выход 1,7 г (86,3%).

14. $[\text{His(Bzl)-Glu(Bzl)}]_n$ (XX) получали аналогично методике 13, исходя из 2-г (2,94 ммоль) продукта (XIV), 0,8 мл (5,7 ммоль) Et_3N в 2 мл DMF. Выход 3 г (66,7%).

15. $[\text{Ala-Tyr(Bzl)-Glu(Bzl)}]_n$ (XXI) получали аналогично методике 13, исходя из 1,7 г (2,02 ммоль) $\text{CF}_3\text{COOH} \cdot \text{Ala-Tyr(Bzl)-Glu(Bzl)-OTcp}$, 0,71 мл (5,07 ммоль) Et_3N . Реакцию проводили в 1,7 мл DMF в течение 8 сут. Выход соединения (XXI) 0,88 г (50%).

16. $[\text{Tyr(Bzl)-Glu(Bzl)}]_n$ (XXII) получали по методике 15, исходя из 1,2 г (1,74 ммоль) продукта (XV), 0,36 мл (2,57 ммоль) Et_3N в 1,2 мл DMF. Полученный продукт очищали гель-фильтрацией на сефадексе LH-20. Выход 0,53 г.

17. $[\text{Ser-His(Bzl)-Glu(Bzl)}]_n$ (XXIII) получали аналогично методике 13, исходя из 0,85 г (1,13 ммоль) продукта (XVII). Реакцию полимеризации проводили 8 сут. Выход 0,5 г.

18. $[\text{Glu(Bzl)-His(Bzl)-Glu(Bzl)}]_n$ (XXIV) получали аналогично методике 13, исходя из 2 г (2,81 ммоль) продукта (XVIII). Полимеризацию проводили в течение 10 сут. Выход 1 г (50%).

19. $\text{Z}_2\text{-His-[Tyr(Bzl)-Glu(Bzl)]}_n$ (XXV). К раствору 1,23 г (2,1 ммоль) пентафторфенилового эфира дикарбобензоксигистидина в 8 мл DMF добавили 0,9 г продукта (XXII) и 20 мл 2-оксипиридина. Реакционную смесь перемешивали 8 сут. Продукт осаждали смесью метанол-эфир (1:3). Выход 0,82 г. Т. пл. 250°C (с разл.).

20. $[(\text{His-Glu})_n]$ (I). 1 г продукта (XX) растворили в метаноле и гидрировали над палладиевой чернью 4 сут при 18°C . Катализатор отделяли фильтрованием, а про-

дукт осаждали смесью метанол – эфир (1 : 3). После 3-часового диализа против воды и очистки гель-фильтрацией на сефадексах LH-20, G-25, фракционирования на сефадексе G-50 и лиофилизации получили 0,2 г (32,8%) продукта (I). Молекулярная масса, по данным гель-фильтрации на сефадексе G-50, равна ≈ 6500 Да.

21. $(His-Ser-Glu)_n$ (II) получали аналогично методике 20, исходя из 0,6 г продукта (XIX). Реакцию проводили в смеси метанол – DMF (1 : 10) в течение 3 сут. Выход продукта (II) составляет 0,3 г (50%). Молекулярная масса, по данным гель-фильтрации на сефадексе G-50 в воде, равна ~ 8000 Да.

22. $(Ala-Tyr-Glu)_n$ (III) получали аналогично методике 20, исходя из 0,5 г продукта (XXI). Реакцию проводили в 2 мл смеси метанол – диоксап – 6 н. соляная кислота (1 : 1 : 0,28) в течение 6 сут. Выход продукта (III) составляет 0,17 г (50%). Молекулярная масса, по данным гель-фильтрации на сефадексе G-50 в воде, равна ~ 10000 Да.

23. $(His-Tyr-Glu)_n$ (IV) получали аналогично методике 20, исходя из 0,5 г продукта (XXV). Выход продукта (IV) составляет 0,32 г (93,75%). Молекулярная масса, по данным гель-фильтрации на сефадексе G-50 в воде, равна ~ 7000 Да.

24. $(Glu-His-Glu)_n$ (V) получали аналогично методике 20, исходя из 1 г продукта (XXIV). Выход продукта (V) составляет 0,4 г (67,34%). Молекулярная масса, по данным гель-фильтрации в воде, равна ~ 16000 Да.

25. $(Ser-His-Glu)_n$ (VI) получали аналогично методике 20, исходя из 0,5 г продукта (XXIII). Свободный полипептид был очищен на колонке с сефадексом LH-20, а затем на колонке с гелем HW-50 в смеси диоксап – вода (1 : 1). Молекулярная масса по Ван-Слайку ≈ 8000 Да.

26. Кислотный гидролиз полипептидов. По 2 мг очищенных полипептидов поместили в ампулы со 100-кратным избытком 6 н. соляной кислоты. Запаянные ампулы выдерживали 18 ч при 105°C . Хроматография гидролизатов подтверждает аминокислотный состав полученных полипептидов.

27. Измерение каталитической активности полипептидов. В кювету объемом 0,6 мл и оптическим путем, равным 0,2 см, вносили 0,36 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 8), 0,02 мл водного раствора полипептида с концентрацией 0,1 М (на мономерную единицу) и по 0,04 мл раствора субстратов с концентрациями $5 \cdot 10^{-3}$, $2 \cdot 10^{-2}$, 10^{-2} , $4 \cdot 10^{-2}$, $6 \cdot 10^{-2}$, $8 \cdot 10^{-2}$, 10^{-1} М для достижения концентрации в кювете $5 \cdot 10^{-4}$, 10^{-3} , $2 \cdot 10^{-3}$, $4 \cdot 10^{-3}$, $6 \cdot 10^{-3}$, $8 \cdot 10^{-3}$ и 10^{-2} М. Изменение оптической плотности раствора как функции времени измеряли на спектрофотометре. Скорость каталитической реакции вычисляли как разность тангенса угла наклона контрольного и холостого опытов:

$$V_k = V_n - V_0,$$

где V_k – скорость каталитической реакции, V_n – наблюдаемая скорость контрольной реакции, V_0 – скорость спонтанного гидролиза субстрата при холостом опыте. Константы первого порядка каталитического гидролиза вычисляли как соотношение изменения скорости к изменению концентрации субстратов. Условные константы второго порядка вычисляли как соотношения констант первого порядка к концентрации полипептида (в молях на мономерную единицу). В процессе вычислений длина оптического пути кюветы была учтена. Все измерения проводили по 3 раза, ошибка эксперимента составляла 2%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вольпина О. М., Михалева И. И., Иванов В. Т. // Биоорганическая химия. 1982. Т. 8. № 1. С. 5–43.
2. Шибнев В. А., Исмаилов М. И., Халиков Ш. Х., Лакизова Н. Ю. // Химия природных соединений. 1979. № 1. С. 687–699.
3. Fox I. L. // Chem. and Eng. News. 1983. V. 61. № 7. P. 33–34.
4. Goren H. J., Fletcher T., Fridkin M., Katchalski-Katzir E. // Biopolymers. 1978. V. 17. P. 1679–1692.
5. Pets D., Schneider F. // FEBS Lett. 1976. V. 167. № 1. P. 32–35.
6. Noguchi J., Yamamoto H. // J. Biochem. 1969. V. 65. № 1. P. 123–132.
7. Yamamoto H., Noguchi J. // J. Biochem. 1970. V. 67. № 1. P. 103–111.
8. Kotai T., Noguchi J. // J. Biochem. 1971. V. 70. № 3. P. 467–476.
9. Халиков Ш. Х., Алиева С. В., Валиев Р. В. // Химия природных соединений. 1984. № 4. С. 503–506.
10. Photaki I., Bardanos V. // Chem. Commun. 1967. P. 257.
11. Халиков Ш. Х., Алиева С. В., Исмаилов М. И., Шибнев В. А. // XI Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. Реф. докл. и сообщ. М., 1974. № 2. С. 111–112.
12. Халиков Ш. Х., Исмаилов М. И., Алиева С. В., Валиев Р. В. // Химия природных соединений. 1982. № 1. С. 91–95.
13. Goeldeler J., Holst A. // Angew. Chem. 1959. V. 71. P. 775.
14. Avold H., Reermann S. // J. Chem. 1968. V. 8. № 3. P. 107.
15. Шибнев В. А., Исмаилов М. И., Халиков Ш. Х. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1975. № 9. С. 2082–2088.

Поступила в редакцию
10.XI.1985
После доработки
3.II.1987

SYNTHESIS AND STUDY OF CATALYTIC PROPERTIES OF REGULAR POLYPEPTIDES CONTAINING POLYFUNCTIONAL AMINO ACID RESIDUES

KHALIKOV Sh. Kh., SOBIROV M. M., BERDIEVA M. I., WALIEV R. W.,
WARFOLOMEEV S. D.*

V. I. Lenin Tadjik State University, Dushanbe;

** M. V. Lomonosov State University, Moscow*

Synthesis and study of catalytic properties of a series of regular polypeptide which contain residues of polyfunctional amino acids forming the active centre of esterases are described viz. $(\text{Ala-Tyr-Glu})_n$, $(\text{His-Ser-Glu})_n$, $(\text{Glu-His-Glu})_n$, $(\text{His-Glu})_n$, $(\text{Ser-His-Glu})_n$, His-(Tyr-Glu)_n .

Possibility of constructing catalytically active model polypeptides which can substitute some hydrolytic enzymes is assessed. Monomers for polycondensation were been synthesised by carbodiimide method in solution, and polypeptides were obtained via 2,4,5-trichlorophenylates. Gel-filtration was used for fractionation of and molecular mass determination of polypeptides. Catalytic properties of the synthetic polypeptides were studied in hydrolysis of *p*-NFA, *Z-L-Ala-ONp*, and *Z-D-Ala-ONp*. It was revealed that polypeptides $(\text{Ala-Tyr-Glu})_n$ and $(\text{His-Ser-Glu})_n$ possess, in hydrolysis of *Z-L-Ala-ONp* and *Z-D-Ala-ONp* some enantioselectivity with the value K_D/K_L 1,3 and 1,17, resp. The upper and lower limits of enantioselectivity as dependent of the molecular mass of the corresponding polypeptides have been determined.