



УДК 541.128.1 + 577.15.02

© 1993 А. Н. Семенов, И. В. Ломоносова, М. И. Титов

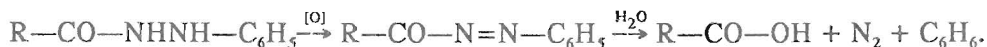
КОМПЛЕКСЫ МЕДИ(II) КАК МОДЕЛЬ ЛАККАЗЫ В РЕАКЦИИ КАТАЛИТИЧЕСКОГО УДАЛЕНИЯ ФЕНИЛГИДРАЗИДНОЙ ЗАЩИТНОЙ ГРУППЫ В МЯГКИХ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ

Российско-германское совместное предприятие «Константа», Москва

Показано, что комплексы меди(II) с азотсодержащими лигандами (пиридин, имидазол) эффективно имитируют каталитическую активность лакказы в реакции окислительного удаления фенилгидразидной защитной группы. Процесс деблокирования протекает в мягких условиях, исключающих окисление лабильных аминокислот. Изучено влияние различных факторов на скорость реакции деблокирования и степень конверсии. Определены оптимальные условия, в которых процесс деблокирования протекает количественно.

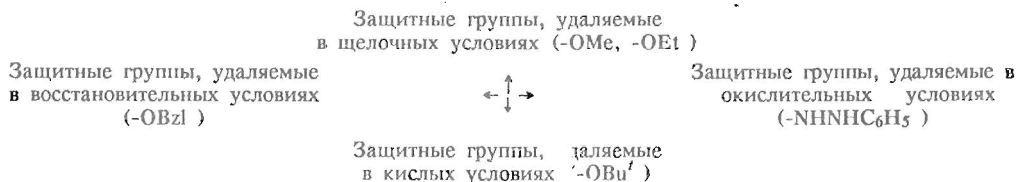
Фенилгидразидная защитная группа лишь эпизодически используется в практике пептидного синтеза для временного блокирования карбоксильной функции. Главное ограничение, препятствующее широкому применению этой защитной группы, — жесткие условия окислительного деблокирования, не исключающие протекания побочных реакций (см. обсуждение в [1]).

В предыдущей работе [1] мы показали, что ферменты класса оксидоредуктаз можно эффективно использовать для селективного удаления фенилгидразидной защитной группы в мягких окислительных условиях. Пероксидаза и лакказы катализируют окисление фенилгидразидной группы, блокирующей карбоксильную функцию, до высокоактивного и неустойчивого фенилдиимида, который в присутствии воды самопроизвольно распадается с образованием азота, бензола и свободной карбоксильной группы:



Наиболее перспективным с практической точки зрения представляется использование лакказы [1].

Введение в практику пептидного синтеза защит, селективно удаляемых в мягких окислительных условиях, способствует построению полностью ортогональной системы защитных групп для карбоксильной функции [2]:



Используемые сокращения: DMSO — диметилсульфоксид, DMF — диметилформамид, DCC — дициклогексилкарбодимид, HBT — N-гидроксибензотриазол, Py — пиридин, Im — имидазол, MeIm — N-метилимидазол, DMAP — диметиламинопиридин.

В то же время мы показали [1], что ферментативное деблокирование может быть лишь ограниченно использовано для деблокирования пептидов, плохо растворимых в воде, так как активность ферментов, в частности лакказы, подавляется в водно-органических смесях с высоким содержанием неводного компонента. Один из подходов, позволяющий решить проблему инактивации биокатализаторов в денатурирующих условиях, заключается в создании и использовании таких химических моделей биокатализаторов (ферментов), которые сохраняют в достаточной степени практически ценные функциональные свойства ферментов и в то же время эффективно функционируют в неприродных (денатурирующих) условиях [3—5].

В настоящей работе мы представляем низкомолекулярную химическую модель, которая эффективно имитирует лакказную активность в реакции окислительного удаления фенилгидразидной защитной группы и в то же время сохраняет активность в средах с высоким содержанием неводного компонента. Следовательно, предлагаемая нами химическая модель лакказы может быть использована как катализатор в реакции деблокирования водонерастворимых пептидов.

Химическая модель активного центра лакказы. Лакказа относится к так называемым голубым оксидазам, в активном центре которых расположены ионы меди. В частности, активный центр лакказы содержит 4 иона меди — один ион I типа, один ион II типа и два иона III типа. Классификация ионов меди сделана на основе их спектральных и электрохимических свойств. В лигандное окружение ионов меди входят имидазол, атомы серы и, возможно, вода. Стандартный окислительно-восстановительный потенциал ионов меди I и II типов равен +0,785 и +0,782 В соответственно, что существенно выше, чем окислительно-восстановительный потенциал неорганического иона меди. Важно заметить, что аномально высокое значение потенциала связывают обычно с лигандным окружением меди в активном центре. Другой важной особенностью строения активного центра лакказы является то, что два иона меди III типа находятся, вероятно, в непосредственной близости друг от друга и благодаря этому могут осуществлять скоординированный двухэлектронный перенос [6].

Низкомолекулярная химическая модель лакказы, очевидно, должна содержать ионы меди и лигандное окружение, структурно и, что более важно, функционально имитирующее лигандное окружение в активном центре фермента.

Химическое деблокирование. На рис. 1 представлены кинетические кривые, описывающие процесс деблокирования модельного трипептида Н-Phe-Trp-Gly-NHNHC₆H₅. Окислителем в данном процессе является кислород воздуха. Процесс окислительного деблокирования катализируется ионами меди (кривая 1) или ионами меди в присутствии лигандов (кривые 2—6). Обращает на себя внимание тот факт, что скорость реакции заметно возрастает в присутствии азотсодержащих лигандов, например пиридина, имидазола, метилимидазола и т. д. Комплексы ионов меди с этими лигандами имитируют каталитическое действие лакказы и, следовательно, могут рассматриваться как ее низкомолекулярная химическая модель.

По данным Коле с соавт. [7], минимальный активный центр лакказы представляет собой трехъядерный кластер, включающий ионы меди II и III типа. Комплексы ионов меди с низкомолекулярными лигандами вряд ли содержат более 2 ионов меди [4]. Следовательно, предлагаемая нами модель — скорее функциональная, нежели структурная, имитация активного центра лакказы.

Важная особенность ферментативного катализа — специфичность взаимодействия фермент—субстрат [8]. Ранее было показано, что ионы меди и кобальта в присутствии некоторых азотсодержащих лигандов обладают способностью катализировать электрохимическое четырехэлектронное восстановление кислорода [9]. Это явление рассматривалось с точки зрения моделирования активного центра оксидаз. Сравнение относительной эффективности различных ионов указывает на специфичность взаимодействия комплексов меди и кобальта с кислородом — субстратом оксидаз [9]. В настоящей работе показано, что пиридиновые

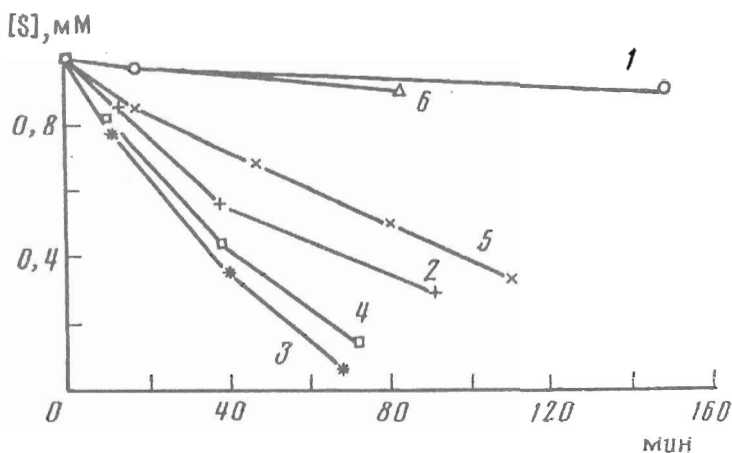


Рис. 1. Катализируемое ионами меди удаление фенилгидразидной защитной группы с трипептида $\text{H-Phe-Trp-Gly-NHNHC}_6\text{H}_5(\text{S})$: 1 — Cu^{2+} , 2 — $\text{Cu}(\text{Py})_n^{2+}$, 3 — $\text{Cu}(\text{Im})_n^{2+}$, 4 — $\text{Cu}(\text{MeIm})_n^{2+}$, 5 — $\text{Cu}(\text{DMAP})_n^{2+}$, 6 — $\text{Cu}(\text{Lys})_n$. Условия реакции: 0,2 М фосфатный буфер (рН 4,6), 2% DMSO, $[\text{S}]$ 1 мМ, $[\text{Cu}^{2+}]$ 0,1 мМ, концентрация лиганда во всех случаях равна 50 мМ

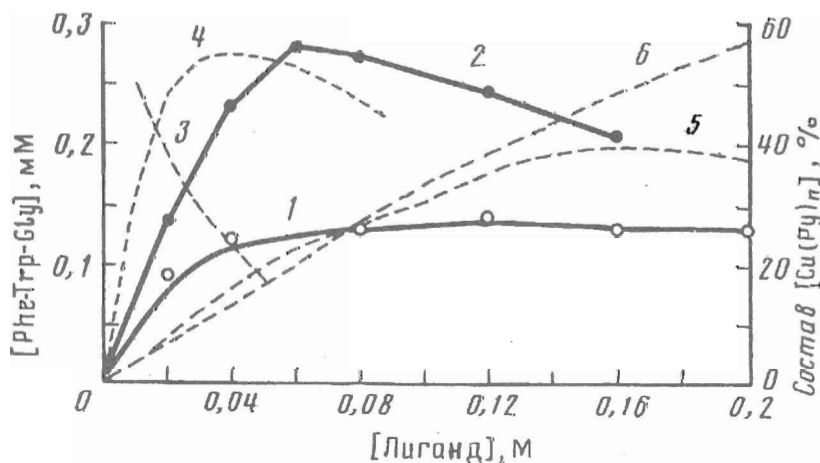


Рис. 2. Зависимость эффективности удаления фенилгидразидной защитной группы с трипептида $\text{H-Phe-Trp-Gly-NHNHC}_6\text{H}_5$ $[\text{S}]$, катализируемого комплексами меди с пиридином (кривая 1) и имидазолом (кривая 2) от концентрации лиганда. Условия реакции см. рис. 1. Реакцию инициировали добавлением водного раствора CuCl_2 до концентрации 0,1 мМ и через 15 мин определяли содержание свободного пептида методом ВЭЖХ. Кривые 3—6 указывают относительное содержание в реакционной смеси комплексов меди $[\text{Cu}(\text{Py})_n]^{2+}$ в зависимости от концентрации пиридина: $n=1$ (3), $n=2$ (4), $n=3$ (5), $n=4$ (6) (рассчитано по данным работы [11])

комплексы кобальта в отличие от аналогичных комплексов меди не катализируют окислительное удаление фенилгидразидной защитной группы. Это указывает на то, что комплексы меди в отличие от комплексов кобальта являются специфическими катализаторами для снятия фенилгидразидной группы. Следовательно, можно говорить о наличии в случае медных комплексов специфичности взаимодействия катализатор—субстрат (здесь имеется в виду второй субстрат лакказы — фенилгидразид пептида).

В присутствии лизина (кривая 6) процесс практически не ускоряется. Это

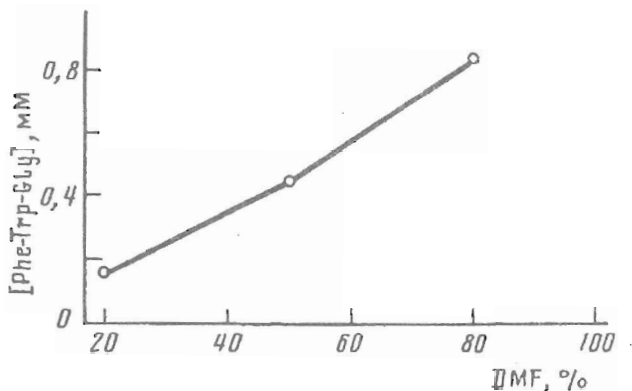


Рис. 3. Зависимость эффективности удаления фенилгидразидной группы с трипептида $\text{H-Phe-Trp-Gly-NHNHC}_6\text{H}_5$ [S], катализируемого комплексом меди с пиридином в смеси DMF/вода, от содержания DMF. Условия реакции: 0,2 М ацетатный буфер (рН 4,0), 2% DMSO, [S] 1 мМ, [Py] 20 мМ. Реакцию инициировали добавлением водного раствора CuCl_2 до концентрации 0,4 мМ и через 30 мин методом ВЭЖХ определяли содержание свободного пептида

достаточно удивительно, если учесть, что комплекс меди с лизином имитирует активность другой медьсодержащей оксидоредуктазы — супероксиддисмутазы [10].

Наиболее эффективные катализаторы — комплексы меди с пиридином, имидазолом или *N*-метилимидазолом. По-видимому, пиридин и имидазол действуют по сходному механизму и ускоряют одну и ту же стадию, так как при их совместном присутствии в реакционной смеси не наблюдается эффект синергизма (данные не приведены). Возможно также (но менее вероятно), что в присутствии пиридина и/или имидазола скорость процесса лимитируется другой стадией (см. ниже — *Скоростьлимитирующая стадия*).

Азотсодержащие лиганды в отсутствие ионов меди не катализируют реакцию удаления фенилгидразидной группы (данные не приведены).

При изучении зависимости эффективности деблокирования в присутствии комплекса меди от концентрации лиганда (рис. 2) показано, что избыток имидазола ингибирует процесс. Интересно, что и каталазная (каталитическое разложение перекиси водорода) активность комплексов меди также максимальна в случае комплексов с незаполненной координационной сферой [3]. В случае пиридина (рис. 2) вплоть до концентраций лиганда 0—0,20 М не удалось обнаружить его ингибирующего действия. На рис. 2 представлены также рассчитанные по данным работы [11] зависимости относительного содержания разных форм комплексов меди с пиридином ($[\text{Cu}(\text{Py})]^{2+}$, $[\text{Cu}(\text{Py})_2]^{2+}$, $[\text{Cu}(\text{Py})_3]^{2+}$ и $[\text{Cu}(\text{Py})_4]^{2+}$) от его концентрации. Максимум активности пиридиновых комплексов меди наблюдается при концентрации пиридина 0,04 М и выше (кривая 1). При этих концентрациях пиридина в реакционной смеси присутствуют преимущественно комплексы меди: $[\text{Cu}(\text{Py})_2]^{2+}$ (кривая 4), $[\text{Cu}(\text{Py})_3]^{2+}$ (кривая 5) и $[\text{Cu}(\text{Py})_4]^{2+}$ (кривая 6). Следовательно, можно сделать вывод, что в случае пиридина каталитической активностью обладают комплексы меди с числом лигандов 2 и более, в том числе и комплексы с полностью насыщенной координационной сферой.

Влияние органических растворителей. При деблокировании модельного трипептида $\text{H-Phe-Trp-Gly-NHNHC}_6\text{H}_5$ в смеси вода—DMF показано, что эффективность реакции заметно увеличивается при увеличении содержания диметилформамида в смеси (рис. 3). Таким образом, предлаемая химическая модель лакказы эффективно функционирует в среде с высоким содержанием неводного компонента и, следовательно, может быть использована для деблокирования водонерастворимых пептидов.

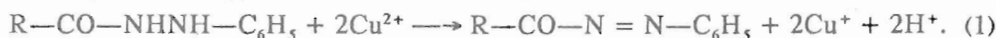
Влияние среды и концентрации растворенного кислорода на скорость окислительного удаления фенилгидразидной защитной группы, катализируемого комплексом меди с пиридином *

Растворитель	[Phe-Trp-Gly], мМ	Растворимость кислорода, см ³ /л [20]
H ₂ O	0,083	6,3
DMSO	0,223	—
Диметилацетамид	0,275	—
DMF	0,350	—
Диоксан	0,533	32,8
Изопропанол	0,663	46,0

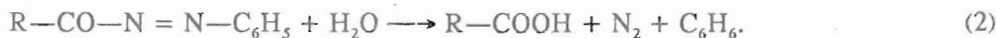
* Условия реакции: 0,2 М натрий-ацетатный буфер (рН 4,0), 50% указанного растворителя, 1 мМ Н-Phe-Trp-Gly-NHNHС₆H₅, 20 мМ пиридин, 0,4 мМ CuCl₂. Время реакции 30 мин.

Результаты эксперимента по исследованию влияния природы органического компонента на деблокирование (табл. 1) свидетельствуют, что эффективность реакции минимальна в воде и резко увеличивается в 50% диоксане или изопропаноле. Диметилформамид, растворитель, наиболее часто используемый в практике пептидного синтеза, занимает промежуточное положение.

Скоростьлимитирующая стадия. Процесс удаления фенилгидразидной защитной группы, катализируемый ионами меди в присутствии или отсутствие лигандов включает, как минимум, три стадии. Первая стадия, вероятно, окисление фенилгидразидной группы до фенилдиимидной ионами меди:



Высокоактивный неустойчивый фенилдиимид самопроизвольно распадается в присутствии воды:



Одновременно происходит регенерация окисленной формы меди под действием кислорода воздуха:



Можно было бы предположить, что лимитирующей стадией является гидролиз фенилдиимида (2), а пиридин и имидазол ускоряют эту стадию как нуклеофильные катализаторы. Но этому предположению противоречат результаты сравнения относительной каталитической эффективности пар имидазол — N-метилимидазол и пиридин — диметиламинопиридин (рис. 1). N-Метилимидазол — менее эффективный нуклеофильный катализатор, чем имидазол [12], и в то же время скорость деблокирования практически одинакова в присутствии имидазола и N-метилимидазола (ср. кривые 3 и 4). Диметиламинопиридин — более эффективный нуклеофильный катализатор, чем пиридин [13], и в то же время он менее эффективен как лиганд в реакции окислительного деблокирования (ср. кривые 2 и 5). Этому предположению противоречит также характер зависимости скорости реакции от концентрации пиридина и имидазола (рис. 2).

Можно также предположить, что лимитирующей является стадия регенерации окисленной формы меди (3). В пользу этого предположения, например, говорит тот факт, что соотношение скоростей реакции в воде, изопропанолe и диоксане качественно коррелирует с растворимостью кислорода (см. табл. 1). Но, по данным работы [14], реакция (3) очень быстрая, и ее скорость на несколько порядков выше, чем скорость суммарного процесса (1) — (3). Кроме того, снижение парциального давления кислорода над реакционной средой более чем в 2 раза и, следовательно, снижение концентрации растворенного кислорода практически

Влияние парциального давления кислорода (P) над реакционной смесью на скорость окислительного удаления фенилгидразидной защитной группы, катализируемой комплексом меди с имидазолом *

P, Торр	[Phe-Trp-Gly], мМ
296	0,14
471	0,18
608	0,15
760	0,17

* Условия реакции: 0,2 М фосфатный буфер (рН 4,6), 1 мМ Н-Phe-Trp-Gly-NHNHC₆H₅, 50 мМ имидазол. Реакционную смесь выдерживали при указанном давлении 15 мин, после чего, не меняя давления, реакцию инициировали добавлением водного раствора CuCl₂ до концентрации 0,01 мМ и через 35 мин состав реакционной смеси анализировали методом ВЭЖХ.

не влияет на скорость реакции (табл. 2), что также указывает на то, что стадия (3) не является лимитирующей.

Наиболее непротиворечивым представляется предположение, что скоростью лимитирующей стадией является окисление фенилгидразидной группы комплексом меди (I). Механизм окисления, безусловно, сложнее, чем это описывается уравнением (1). В частности, маловероятным представляется одновременный двух-электронный перенос на два иона Cu²⁺. Более вероятно, что реакция (1) протекает в два этапа, включающих два одноэлектронных, возможно опосредованных, переноса. На это, в частности, указывает также первый порядок реакции по меди (см. рис. 4, а также [4]). Изучение детального механизма реакции (1) очень важно как с точки зрения понимания этого механизма, так и с точки зрения оптимизации условий деблокирования. В настоящее время работа в этом направлении проводится в нашей лаборатории.

Побочные реакции. Комплексы меди с пиридином в присутствии кислорода — сильные окислители, способные, например, разрывать углерод-углеродную связь [4]. Следовательно, в условиях окислительного деблокирования высока вероятность окислительной дегградации таких лабильных аминокислот, как метионин или триптофан. Возможность окисления этих аминокислот была изучена в прямом эксперименте с комплексом Cu/Py на примере производных двух наиболее чувствительных к окислению аминокислот Вос-Met и Trp-OMe. Реакционная смесь содержала 50% диметилформамида, 50% ацетатного буфера, 0,2 М, рН 4,0, 20 мМ пиридин и 0,4 мМ CuCl₂. За 20 ч в реакционной смеси, по данным количественной ВЭЖХ, не появились продукты окисления или дегградации исходных реагентов и не изменилось их содержание.

Известно, что ацетамидометильная защитная группа (AcM) может удаляться в присутствии солей тяжелых металлов [15]. Мы показали, что комплекс меди с пиридином в условиях деблокирования в течение 20 ч не изменяет хроматографической подвижности Вос-Cys(AcM)-ОН, что можно рассматривать как подтверждение полной устойчивости ацетамидометильной защитной группы в условиях удаления фенилгидразидной защитной группы.

Аналогично в прямом эксперименте было показано, что в условиях удаления фенилгидразидной группы в присутствии комплексов меди с пиридином или имидазолом полностью устойчива в течение 48 ч флуоренилметилоксикарбонильная защитная группа.

Недавно было показано, что ионы меди в присутствии аскорбата катализируют окисление кислородом воздуха имидазольного кольца гистидина до 2-имидазолон [16]. В связи с этим нами была изучена устойчивость гистидина в условиях удаления фенилгидразидной защитной группы. В качестве модельного соединения использовали аналог люлиберина Glp-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ala-Leu-Arg-Pro-

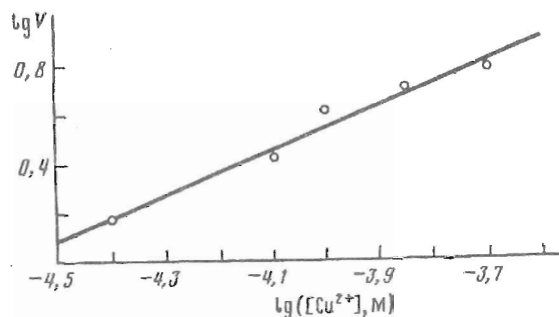


Рис. 4. Зависимость скорости удаления фенилгидразидной группы с трипептида Н-Phe-Trp-Gly-NHNHC₆H₅ [S], катализируемого комплексом меди с пиридином, от концентрации ионов меди. Условия реакции см. рис. 3. Реакцию инициировали добавлением водного раствора CuCl₂, и через 30 мин состав реакционной смеси анализировали методом ВЭЖХ

NHC₂H₅ (сурфагон). Реакционная смесь содержала 2,5 мг/мл сурфагона, 50 мМ пиридин и 0,5 мМ CuCl₂ в 0,2 М фосфатном буфере, pH 4,6. Реакционную смесь инкубировали в условиях свободного доступа кислорода. По данным количественной ВЭЖХ, за 24 ч в реакционной смеси не появились продукты окисления сурфагона и не уменьшилась его концентрация. Полученный результат несомненно указывает на то, что в условиях деблокирования описанная реакция окисления гистидина не протекает.

При деблокировании модельного соединения Z-Ser-NHNHC₆H₅ помимо основного продукта Z-Ser-OH методом ТСХ было зафиксировано образование побочных продуктов (см. «Экспериментальную часть»). Побочные продукты Z-Ser-NHN(C₆H₅)₂ и Z-Ser-N(C₆H₅)NH(C₆H₅), выделенные и идентифицированные методом ¹H-ЯМР, вероятно, образуются на стадии распада активированного фенилдиимида по радикальному механизму [17, 18].

Образование побочных продуктов, разумеется, крайне нежелательно в препаративном синтезе. Нами было показано, что в определенных условиях протекание побочной реакции можно подавить практически полностью.

Оптимальные условия деблокирования. На примере деблокирования модельного соединения Z-Ser-NHNHC₆H₅ было изучено влияние некоторых условий протекания процесса (концентрация деблокируемого вещества, растворитель, добавки). Результаты экспериментов оценивали с точки зрения скорости и полноты протекания реакции, а также отсутствия побочных продуктов, т. е. использовали критерии, наиболее важные для препаративного синтеза. За протеканием реакции следили методом ТСХ. Были установлены следующие эмпирические правила:

минимальное количество примесей наблюдается при деблокировании разбавленных растворов пептидов (< 5 мг/мл);

содержание примесей минимально в диоксане и диметилформамиде;

добавление уксусной кислоты существенно снижает содержание примесей, в то время как соляная кислота на содержание примесей не влияет;

при молярном соотношении Z-Ser-NHNHC₆H₅/Cu 5:1 реакция протекает полностью за 4–8 ч.

При выполнении этих правил процесс препаративного деблокирования протекает с количественным выходом и без образования побочных продуктов.

Полученные результаты показывают, что комплексы меди с азотсодержащими лигандами, имитирующие лакказную активность, можно использовать как катализаторы для удаления фенилгидразидной защитной группы в мягких окислительных условиях. Реакция протекает достаточно быстро, в том числе и в водно-органических смесях с высоким содержанием неводного компонента, не

приводит к побочным продуктам, снятию ацетамидометильной и флуоренилметилоксикарбонильной защитных групп или окислению лабильных аминокислот. По окончании реакции катализатор легко выводится при промывании водой раствора деблокированного пептида в органическом растворителе или при осаждении водой из раствора в диметилформамиде. Для полноты удаления ионов меди в промывающие растворы можно также добавлять комплексообразующие агенты.

Дальнейшее совершенствование катализаторов на основе комплексов меди для мягкого снятия фенилгидразидной защитной группы может идти в принципе по трем направлениям:

1) создание гетерогенного катализатора, что позволит существенно упростить процедуру его удаления из реакционной смеси по окончании деблокирования;

2) создание катализатора с двумя спаренными ионами меди, что, по аналогии с активным центром лакказы, должно существенно повысить каталитическую активность;

3) поиск таких производных фенилгидразидной группы, которые обладают повышенной стабильностью на стадиях конденсации или удаления других защитных групп и в то же время удаляются в мягких окислительных условиях под действием комплексов меди.

Экспериментальная часть

В работе использовали аминокислоты, дициклогексилкарбодиимид, бензилхлороформат, трифторуксусную кислоту, имидазол, ацетонитрил и *para*-нитрофенол (Fluka), ацетат натрия, тригидрат (Reanal), *N*-метилимидазол (Aldrich), диметиламинопиридин, папаин и пластинки для ТСХ DC-Fertigplatten Kieselgel 60 (Merck), неорганические соли и органические растворители (Союзреактив).

Субстраты были синтезированы методом DCC/HBT. Z-Ser-NHNHC₆H₅ был синтезирован с использованием папаина [19]. За протеканием реакции деблокирования Phe-Trp-Gly-NHNHC₆H₅ следили методом ВЭЖХ на хроматографе Gilson с использованием колонки Chromatronix ODS (4,6×250 мм) в градиенте 0,05 М фосфат натрия, pH 3,0/ацетонитрил. Для количественной обработки хроматограмм использовали интегратор Shimadzu C-R6A.

Выделение побочных продуктов, образующихся при деблокировании фенилгидразидной защитной группы. 1 г Z-Ser-NHNHC₆H₅ растворяли в смеси, содержащей 90 мл диоксана, 45 мл 1 М пиридин-ацетатного буфера и 4,5 мл 0,2 М CuCl₂. Смесь перемешивали 24 ч в условиях доступа воздуха. По окончании реакции реакционную смесь упаривали и растворяли в смеси, содержащей 200 мл воды (pH 9,0) и 200 мл этилацетата. Водную фазу отбрасывали, органическую фазу промывали водой (2×100 мл), 1 н. H₂SO₄ (100 мл) и водой (3×100 мл). Органическую фазу упаривали досуха, остаток кристаллизовали в эфире. Полученные кристаллы отфильтровывали, высушивали и перекристаллизовывали из эфира. Выход 230 мг.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Семенов А. Н., Ломоносова И. В., Березин В. И., Титов М. И. // Биоорганич. химия. 1991. Т. 17. № 8. С. 1074—1076.
2. Bodanszky M. Peptide Chemistry. A Practical Textbook. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1988. P. 132.
3. Метелица Д. И. Моделирование окислительно-восстановительных ферментов. Минск: Наука и техника, 1984. С. 165—166.
4. Rogic M. M., Demmin T. R. // J. Amer. Chem. Soc. 1978. V. 100. № 11. P. 5472—5487.
5. Яцимирский А. К. Биоимитирующий катализ. Итоги науки и техники, серия «Биоорганическая химия». М.: ВИНТИ, 1990. Т. 17. С. 5—147.

6. Налбандян Р. М.//Окислительно-восстановительные ферменты и их модели/Ред. Лихтенштейн Г. И. Черноголовка: ИХФ АН СССР, 1982. С. 62—73.
7. Cole J. L., Tan G. O., Yang E. K., Hodgson K. O., Solomon E. I.//J. Amer. Chem. Soc. 1990. V. 112. № 9. P. 2243—2249.
8. Березин И. В., Мартинек К. Основы физической химии ферментативного катализа. М.: Высш. шк., 1977. С. 34—70.
9. Тарасевич М. Р., Вольпин М. Е., Богдановская В. А., Орлов С. Б., Новодарова Г. Н., Колосова Е. М.//Электрохимия. 1981. Т. 27. № 9. С. 1327—1334.
10. Younes M., Weser U.//FEBS Lett. 1976. V. 61. № 1. P. 209—211.
11. Лурье Ю. Ю. Справочник по аналитической химии. М.: Химия, 1989. С. 324.
12. Bender M. L., Bergeron R. J., Komiyama M. The Bioorganic Chemistry of Enzymatic Catalysis. N. Y.: John Wiley and Sons. 1984. Ch. 7.
13. Hofle G., Steglich W., Vorbruggen H.//Angew. Chem. 1978. V. 90. № 4. P. 602—615.
14. Ахрем А. А., Киселев П. А., Метелица Д. И.//Кинетика и катализ. 1976. Т. 17. № 10. С. 1492—1496.
15. Fujii N., Otaka A., Okamachi A., Watanabe T., Arai H., Tamamura H., Funakoshi S., Zajima H.//Proceedings of the 20th European Peptide Symposium/Eds Jung G., Bayer E. Berlin: Walter de Gruyter & Co., 1988. P. 58—60.
16. Ichida K., Kawakishi S.//Arch. Biochem. and Biophys. 1990. V. 283. № 1. P. 20—26.
17. Cohen S. G., Nickolson J.//J. Amer. Chem. Soc. 1964. V. 86. № 6. P. 3892—3893.
18. Koga J., Koga N.//The Chemistry of the Hydrazo, Azo and Azoxy Compounds/Ed. Patai S. New York, Sidney: John Wiley & Sons, 1975. V. 2. P. 896.
19. Cerovsky V., Jost K.//Collect. Czech. Chem. Commun. 1984. V. 49. № 12. P. 2557—2561.
20. Schlapfer P., Audykowski T., Bukowiecki A.//Schweiz. Arch. Angew. Wiss. Tech. 1949. V. 15. № 2. P. 299—307.

Поступила в редакцию
21.IV.1992

A. N. SEMENOV, I. V. LOMONOSOVA, M. I. TITOV

COPPER(II) COMPLEXES AS A LACCASE MODEL FOR CATALYTIC REMOVAL OF THE PHENYLHYDRAZIDE PROTECTING GROUP UNDER MILD CONDITIONS

Russian-German Joint Venture «Constanta», Moscow

Copper(II) complexes with some nitrogen-containing ligands (pyridine, imidazole) perfectly simulate the catalytic activity of laccase in the reaction of oxidative removal of the phenylhydrazide protecting group. The deprotection occurs under mild conditions preventing oxidation of labile amino acids. The effect of certain factors on the rate and degree of deblocking were studied and optimal conditions providing quantitative yield of the deblocked products were found.