

В. А. ШИБНЕВ, М. П. ФИНОГЕНОВА,  
академик АН ТаджССР К. Т. ПОРОШИН

**СИНТЕЗ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ПОЛИТРИПЕПТИДА  
(— Gly — Pro — Pro —)<sub>n</sub> СО СТРУКТУРОЙ КОЛЛАГЕНОВОГО ТИПА**

При изучении первичной структуры коллагена большую помощь оказывают структурные модели этого белка. В последнее время показано, что коллагеноподобная структура способна спонтанно образовываться в синтетических политрипептидах (1). Полипептиду подобного типа — полимеру с последовательностью —Gly—Pro—Pro—, его синтезу и изучению структуры посвящен ряд работ (1-5); рентгенограммы и и.-к. спектры указывают на наличие структуры коллагенового типа. Однако все полученные ранее образцы политрипептида (—Gly—Pro—Pro—)<sub>n</sub>, хотя и имели структуру, идентичную коллагеновой, отличались сравнительно невысоким молекулярным весом (не более 10 000). Несомненно, что значительный интерес в качестве структурных моделей коллагена, а также специфических субстратов для изучения таких ферментов, как коллагеназа или гидроксилаза проколлагена, представляют полипептиды с молекулярными весами, приближающимися к величине молекулярного веса самого коллагена.

В последнее время установлено, что наиболее высокомолекулярные полипептиды коллагенового типа получают при использовании пентахлорфениловых эфиров, которые являются наиболее реакционноспособными из активированных эфиров. Этим методом нами были получены такие полипептиды, как (—Gly—Hupro—Hupro—)<sub>n</sub> с константой седиментации  $S = 7$  и молекулярным весом  $\sim 160\,000$  (6), а также (—Gly—Pro—Hupro—)<sub>n</sub> с молекулярным весом 60 000 — 100 000 (7, 8). Для получения политрипепти-

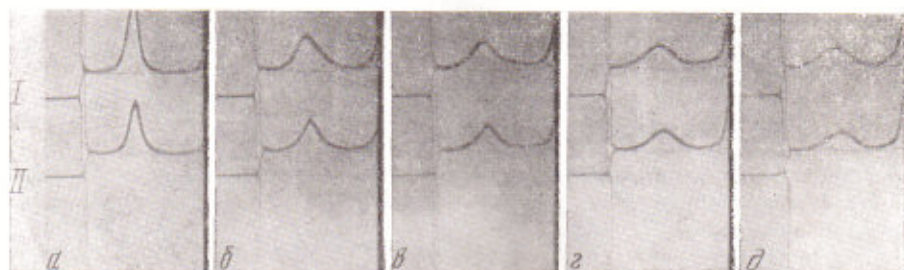


Рис. 1. Седиментационные пики политрипептида (Gly—Pro—Pro)<sub>n</sub> фракции I и II, полученных после деления полипептида на колонке с Сефадексом Г-25;  $v = 42\,000 \text{ мин}^{-1}$ , интервал съемки 16 мин.

да (—Gly—Pro—Pro—)<sub>n</sub> с высоким молекулярным весом мы также воспользовались методом активированных эфиров с применением пентахлорфеноловых эфиров.

Полипептиды, получаемые указанным методом, всегда обладают большей или меньшей степенью полидисперсности. В данной работе мы попытались использовать для ее ориентировочной оценки анализ полученных седиментационных пиков (рис. 1). С этой целью исходный полимер предварительно пропускался через колонку с Сефадексом Г-25 для определения

низкомолекулярных фракций. Молекулярный вес первых двух фракций (образец I и образец II), близких по составу и свойствам, определялся методом седиментации на центрифуге Спинко Е при 42 040 мин. При анализе седиментационных пиков в обоих образцах обнаружено по две фракции, которые образуют отдельную границу. Низкомолекулярные фракции образцов I и II имеют молекулярные веса 5500 и 4000 соответственно. Константа седиментации высокомолекулярных фракций обоих образцов 5—5,5. Молекулярный вес их, рассчитанный по приближенной формуле  $\lg S = 3,383 + \frac{2}{3} \lg M$ , равен 95 000 — 100 000, причем высокомолекулярные фракции в образцах I и II составляют ~10 и ~20% соответственно.

Полученные образцы обладали сравнительно плохой растворимостью в воде и в таких растворителях, как диметилсульфоксид и диметилформамид. Они растворялись в HCOOH и CH<sub>3</sub>COOH. Полное растворение в воде достигалось лишь при очень высоком разбавлении. Возможно, что методом седиментации не удалось выделить еще более высокомолекулярные фракции, так как полипептид, вероятно, в условиях опыта не растворился до конца. Рентгеноструктурные исследования полипептида показали, что оба образца имеют ярко выраженную структуру коллагенового типа с характерными рефлексами ~2,82 и ~11 Å (рис. 2а). И.к. спектроскопические исследования (рис. 3) показали сдвиг полосы NH-валентных колебаний (3350 см<sup>-1</sup>) в длинноволновую часть спектра, характерный для структуры коллагенового типа. Следует отметить высокую чистоту полимера, которая характеризуется качеством и.к. спектра и рентгенограммы, идентичной коллагеновой (рис. 2б).

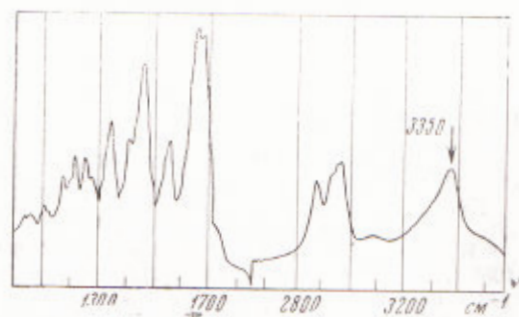


Рис. 3. И.к. спектр политрипептида (Gly — Pro — Pro)<sub>n</sub>. Виден сдвиг полосы NH-валентных колебаний (~3350 см<sup>-1</sup>) в длинноволновую часть спектра, характерный для структуры коллагенового типа

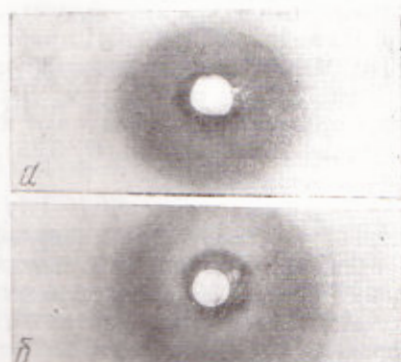


Рис. 2. Дебаеграммы: а — политрипептида (Gly — Pro — Pro)<sub>n</sub>, являющегося смесью фракции с молекулярным весом 100 000 (20%) и 6000 (80%); б — коллагена

Экспериментальная часть

В работе использовался L-пролин. Тонкослойная хроматография проводилась на закрепленном слое силикагеля 250 меш (пластинки 76 × 26 мм) в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (10 : 1 : 3). И.к. спектры снимались на приборе UR-10. Седиментация проводилась в 5% растворе NaCl.

Пентахлорфениловый эфир карбобензоксиглицил-пролил-пролина. К охлажденному до -15° раствору 2,7 Cbo — Gly — Pro — OH в 11 мл сухого хлороформа, содержащего 1,2 мл триэтиламина, при энергичном перемешивании прибавляют 1,15 мл изобутилхлорформиата. Перемешивают реакционную массу 45 мин. при ~-13° и 7 мин. при -5°. Понижают температуру до -15° и прибавляют охлажденный до той же температуры раствор 4,5 г HBr · H — Pro — OC<sub>6</sub>Cl<sub>5</sub> (избыток 15%) в 20 мл сухого хлороформа, содержащего 1,37 мл триэтиламина. Перемешивают 4 часа, посте-



ленно повышая температуру до комнатной, и оставляют на ночь. Реакционную массу разбавляют хлороформом вдвое и промывают последовательно водой, 1*N* HCl, водой, 0,5*N* NaHCO<sub>3</sub>, водой. Сушат над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривают в вакууме. Получают аморфный Cbo—Gly—Pro—Pro—OCS<sub>2</sub>. Выход 4,89 г (85%); *R*, 0,91; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> — 73,3° (с 1 в хлороформе).

Бромгидрат пентахлорфенилового эфира глицил-пролил-пролина. К раствору 1,3 г Cbo—Gly—Pro—Pro—OCS<sub>2</sub> в 1,8 мл ледяной CH<sub>3</sub>COOH прибавляют 1,8 мл 38% раствора HBr в ледяной CH<sub>3</sub>COOH и выдерживают 20 мин. при 20°. Высаждают и декантируют бромгидрат сухим эфиром. Выход 1,12 г (94%). После пересаживания из метанола эфиром получают хроматографически чистый HBr·H—Gly—Pro—Pro—OCS<sub>2</sub> (*R*, 0,65), который ввиду его лабильности сразу же заполимеризовывают.

Политрипептид (—Gly—Pro—Pro—)<sub>n</sub>. Растворяют 0,6285 г мономера в 0,7233 г диметилсульфоксиде (концентрация 46,5%) прибавляют 0,1064 г триэтиламина и оставляют на 5 дней при 20°. После пересаживания из 5 мл метанола сухим эфиром, декантации и сушки в вакууме получают 0,4470 г полипептида. После отделения от низкомолекулярных фракций на Сефадексе Г-25 (колонка *h* = 100 см и *l* = 2,5 см) получают несколько фракций, из которых исследуют две первые (образец *I* и образец *II*). При определении молекулярного веса методом седиментации каждый из этих образцов дает две фракции с молекулярными весами соответственно 4000—5500 и 95 000—100 000. Высокомолекулярная фракция составляет 10% в образце *I* и 20% в образце *II*. Методами рентгеноструктурного анализа и и.-к. спектроскопии установлено, что оба образца имеют структуру коллагенового типа.

Благодарим А. Д. Морозкина за седиментационный анализ полипептида и В. Н. Рогоуленкову за снятие рентгенограмм.

Институт молекулярной биологии  
Академии наук СССР  
Москва

Поступило  
29 VII 1970

Институт химии  
Академии наук ТаджССР  
Душанбе

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> В. А. Шибнев, А. В. Лазарева, Изв. АН СССР, сер. хим., 1969, 398.  
<sup>2</sup> I. Engel, I. Kurtz et al., J. Mol. Biol., 17, 255 (1966). <sup>3</sup> В. А. Шибнев, А. В. Лисовенко, Изв. АН СССР, сер. хим., 1966, 1287. <sup>4</sup> В. А. Шибнев, Н. Г. Есипова и др., Биофизика, 11, 1067 (1966). <sup>5</sup> Н. С. Андреева, Н. Г. Есипова и др., Молек. биол., № 5, 657 (1967). <sup>6</sup> В. А. Шибнев, Т. П. Чуваева, К. Т. Порошин, Изв. АН СССР, сер. хим., 1968, 1825. <sup>7</sup> К. Т. Порошин, В. А. Шибнев, Синтез полиаминокислот и регулярных полипептидов, Душанбе, 1968. <sup>8</sup> К. Т. Порошин, Т. П. Чуваева, В. А. Шибнев, Докл. АН ТаджССР, 12, № 8, 21 (1969).