

**СИНТЕЗ ПЕПТИДОВ — АНАЛОГОВ ФРАГМЕНТА КОЛЛАГЕНА,
СОСТОЯЩИХ ИЗ ГЛИЦИНА И ИМИНОКИСЛОТ**

***К. Т. Порошин, В. А. Шибнев, Т. Д. Козаренко,
В. Г. Дебабов***

Синтез пептидов, молекула которых состоит из глицина и иминокислот, имеет большое значение для выяснения химической и физической структуры белков группы коллагена. На основании данных, полученных при изучении кислотных [1,2] и ферментативных гидролизатов [3,4], можно считать, что указанные аминокислоты — глицин, пролин и оксипролин — находятся в определенной связи между собой и концентрируются в определенных областях молекулы белка. При исследовании коллагеназного гидролизата коллагена [4] были выделены два трипептида гли-про-оксипро¹ и гли-про-ала, из которых первый включает 43% всех иминокислот белка, второй — 20%. Еще раньше было предположено, что последовательность гли-про-оксипро или гли-про-оксипро-гли имеет место в молекуле коллагена [1,2].

Нами было обнаружено, что метиловый эфир гексапептида гли-про-оксипро-гли-про-оксипро гидролизуется коллагеназой с образованием фактически двух трипептидов гли-про-оксипро [5]. Поэтому нам казалось важным исследовать гидролиз коллагеназой подобного пептида, содержащего три или четыре такие трипептидные единицы, как гли-про-х, где х — пролин или оксипролин, с целью выяснить, может ли подобная последовательность при коллагеназном гидролизе служить источником образования трипептида гли-про-оксипро.

Для синтеза подобных пептидов мы использовали метод Буоссона. Сравнительно большой молекулярный вес нона- и додекапептида и однобразный аминокислотный состав потребовал применения следующих методов идентификации: по концевой метоксильной группе, по гидролизуемости коллагеназой и количественный аминокислотный анализ на колонках с ионообменной смолой.

Обсуждение результатов

В синтезе производных нона- и додекапептида по схеме 1 мы исходили из метилового эфира кбз-гли-про-оксипро (I) и кбз-гли-про-про (II).

Применение этих соединений позволило нам варьировать х в последовательности -гли-про-х-, заменяя его то на пролин, то на оксипролин. Соблюдая строго условия омыления указанных метиловых эфиров карбобензоксипептидов, можно с большой степенью чистоты отщепить сложно-эфирную метоксильную группу, не затрагивая пептидной связи, которая достаточно чувствительна к щелочному гидролизу. Так, применение 0,1 н. NaOH с равным объемом ацетона в течение 40 мин. при 22—25° оказалось оптимальным условием как для получения кбз-гли-про-оксипро (III), так и кбз-гли-про-про (IV). Однако эти же условия почти не применимы для гидролиза кбз-гли-про-про-гли-про-ОСН₃, так как в данном случае имеет место частичное расщепление и пептидных связей. Учитывая отсутствие тенденции к кристаллизации хлоргидратов метиловых

¹ н. Гли-про-оксипро-OH. — В тексте в соответствующих соединениях с N-конца опускается H, а с C-конца — OH.

эфиров гли-про-оксипро (V) и гли-про-про (VI), мы применили катализическое отщепление карбобензокси-группы над палладиевым катализатором в нейтральной среде [6]. В этом случае мы получали аналитически и хроматографически чистые эфиры как три-, так и гекса- (VII), (VIII) и nonапептида (IX).

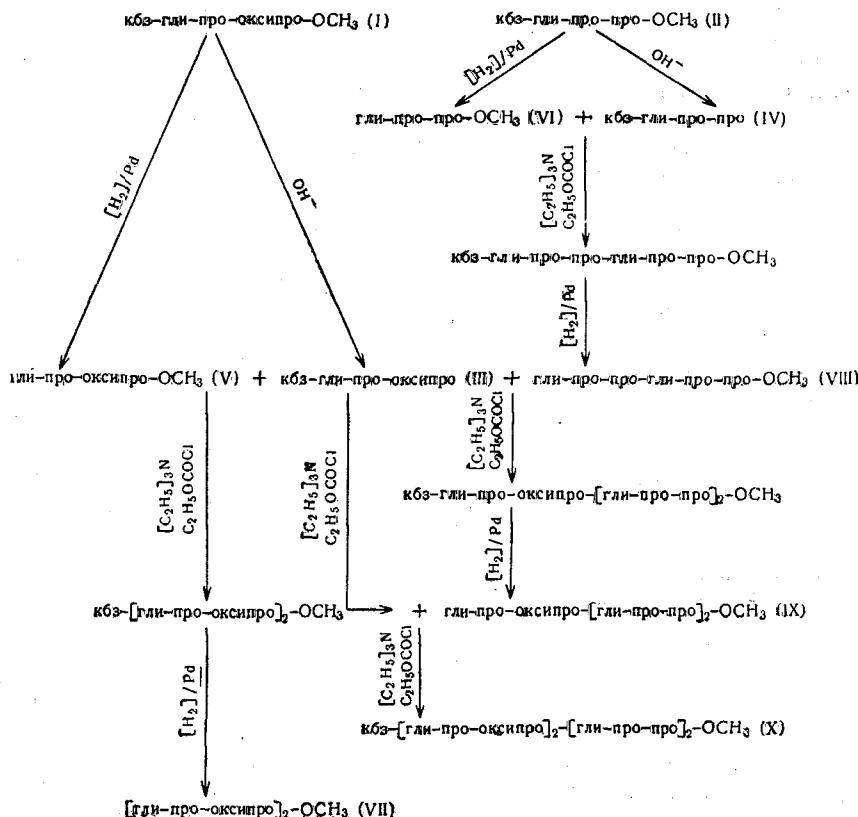


Схема 1

Синтезированные метиловые эфиры кбз-гли-про-оксипро-(гли-про-про)₂ и кбз-(гли-про-оксипро)₂ (гли-про-про)₂, как мы и предполагали, оказались субстратами коллагеназы, что показывает наличие в соединениях гидролизуемой оксипролил-глициновой связи. Нами не были проведены количественные измерения действия коллагеназы на полученные субстраты, но, видимо, действие достаточно, хотя продукт отщепления — метиловый эфир гли-про-про-гли-про-про на хроматограмме проявляется толидином очень слабо. Это свойство, очевидно, объясняется самой природой этого эфира пептида, окрашиваемого толидином лишь при большой концентрации. Метиловый эфир карбобензоксидодекапептида (X), содержащего две связи между оксипролином и глицином, должен расщепляться коллагеназой с образованием либо трех продуктов (не считая пептидов с карбобензокси-группой): гли-про-оксипро, (гли-про-про)₂-OCH₃, гли-про-оксипро-(гли-про-про)₂-OCH₃, либо двух продуктов: гли-про-окси-про и (гли-про-про)₂-OCH₃ (схема 2).

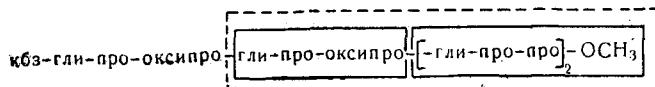


Схема 2

Но в связи с тем, что коллагеназа очень хорошо расщепляет такой пептид, как кбз-гли-про-оксипро-гли-про-оксипро- OCH_3 , который по существу входит в молекулу додекапептида, следовало бы ожидать в обоих случаях образование трипептида гли-про-оксипро, так как характер связи не изменился. Однако при хроматографировании коллагеназного гидролизата метилового эфира карбобензоксигидекапептида указанный трипептид не был обнаружен. Более того, обнаруженное пятно, соответствующее по своему положению на хроматограмме эфиру пептида, проявлялось толидином столь плохо, что по существу находилось на грани чувствительности реактива. Этот удивительный факт, как нам кажется, требует дальнейшего изучения, поскольку характер связей в пептиде не изменился, а коллагеназа оказалась по отношению к пептиду почти инертной.

Может оказаться, что в данном случае начинают сильно сказываться конформационные особенности, вызванные большой концентрацией иминокислот, что делает недоступным действию коллагеназы связи между

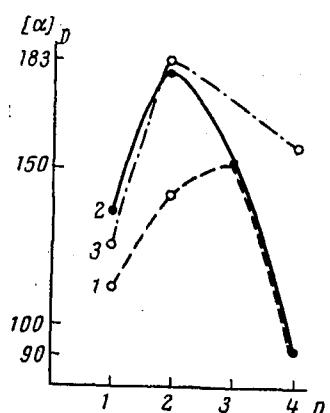


Рис. 1. Зависимость $[\alpha]_D$ от числа единиц гли-про- x , где x — пролин или оксипролин:

1 — последовательность кбз-(гли-про-оксипро)₂-(гли-про-про)₂- OCH_3 ; 2 — максимальные величины кбз-(гли-про- x)_n OCH_3 ; 3 — максимальные величины (гли-про- x)_n OCH_3 ; $[\alpha]_D$ даны при $c = 0,7$ в метаноле

ду оксипролином и глицином. Нам хочется отметить в этой связи такой факт, как инертность коллагеназы по отношению к такому соединению, как метиловый эфир кбз-про-гли-гли-про, и действие ее на пептид, где вместо двух остатков глицина будет три, т. е. метиловый эфир кбз-про-гли-гли-гли-про [5]. В свете полученных данных можно предположить, что и в молекуле коллагена чередование иминокислот должно перемежаться таким образом, что в результате его определенные связи делаются доступными действию коллагеназы, что и приводит, в частности, к образованию трипептида гли-про-оксипро и гли-про-ала. Таким образом, нам кажется маловероятным наличие в молекуле коллагена таких последовательностей, как гли-про-оксипро-, однако окончательный вывод можно сделать только после изучения действия фермента на последовательность, в которой оксипролин не заменен на пролин, так как мы установили, что подобная замена не всегда безразлична и в ряде случаев приводит к потере субстратной активности [5]. С нашей точки зрения наиболее вероятной последовательностью следует признать гли-про-оксипро-гли-[2], которая с количественной стороны не противоречит пептиду, насыщенному глицином и иминокислотами, выделенному из трипсического гидролизата коллагена Грассманном с сотрудниками [3]. К этому можно еще добавить, что синтезированный нами маленький участок такой последовательности в виде метилового эфира кбз-гли-про-оксипро-гли-гли-про оказался субстратом коллагеназы [5]. И может быть, что именно из подобного рода чередования, на которое в свое время указал Шродер с сотрудниками [2], и возникают при коллагеназном гидролизе коллагена трипептид гли-про-оксипро и глицин, как это обнаружил со своими сотрудниками Шроенлоэр [4]. При измерении удельного вращения эфиров пептидов и их карбобензоксигидекапептидов нами было отмечено, что удельное вращение заметно растет от трипептида к гексапептиду, после чего начинает столь же быстро уменьшаться, начиная с nona- и додекапептида (рис. 1), т. е. увеличение пептида на «трипептидную» единицу гли-про- x

не находится в прямой зависимости с изменением $[\alpha]_D$. Как известно из литературных данных, метод смешанных ангидридов не свободен от некоторой рацемизации [7], однако в случае иминокислот она не имеет места, поэтому на характер полученной нами зависимости она не может накладываться. Может оказаться, что падение величины $[\alpha]_D$ от увеличения числа подобных единиц имеет определенную связь с резким возрастанием инертности этих пептидов по отношению к коллагеназе как следствие конформационных изменений. При рентгеноструктурном исследовании этих пептидов не удалось получить коллагеноподобных рефлексов.

Экспериментальная часть

В синтезе применяли *l*-пролин и *l*-оксипролин [8]. Хроматографирование проводили на бумаге типа «Б», «Ленинград» в системе вода—бутанол—уксусная кислота (5 : 4 : 1). Метоксильную группу определяли по методу Цейзеля. Коллагеназа, выделенная из *Clostridium histolyticum*, не обладала неспецифической протеолитической активностью [9]. Кбз— $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{OCO}$ гли, про, оксипро—аминокислотные остатки глицина, пролина и оксипролина.

Метиловый эфир кбз-гли-про-про [10] синтезировали методом смешанных ангидридов, исходя из 5 г кбз-гли-про и 2,11 г метилового эфира пролина с выходом 85 %, т. пл. 148—149° (из воды), $[\alpha]_D^{23}$ — 135,5° (с 0,740 в метаноле).

Кбз-гли-про-про [10]. 1,5 г метилового эфира кбз-гли-про-про растворяют в 40 мл диоксана и, прибавив 40 мл 0,1 н. NaOH, оставляют на 40 мин. при комнатной температуре. Затем раствор фильтруют и подкисляют HCl до слабокислой реакции по конго-рот; выделяющееся масло экстрагируют хлороформом (200—250 мл). Хлороформенные вытяжки промывают водой и упаривают в вакууме. Остаток растворяют в 20 мл хлороформа и раствор экстрагируют водным раствором KNaCO_3 , затем водный экстракт подкисляют и выпавшее масло вновь экстрагируют хлороформом. Хлороформенные вытяжки тщательно промывают водой и сушат безводным Na_2SO_4 , фильтруют, упаривают в вакууме, остаток растворяют в метаноле, фильтруют и вновь упаривают; получают кбз-гли-про-про с выходом 79 % в виде легко истираемого порошка, $[\alpha]_D^{24}$ — 126,5° (с 0,3 в метаноле).

Метиловый эфир кбз-гли-про-оксипро [10] синтезирован методом смешанных ангидридов, исходя из 1,86 г кбз-гли-про и 1,81 г хлоргидрата метилового эфира оксипролина с выходом 59,9 %, $[\alpha]_D^{20,5}$ — 112,5° (с 0,9 в метаноле), $[\alpha]_D^{23}$ — 119° (с 0,3 в метаноле), $[\alpha]_D^{23}$ — 116° (с 0,748 в метаноле).

Кбз-гли-про-оксипро. 1,78 г метилового эфира кбз-гли-про-оксипро растворяют в 85 мл ацетона и прибавляют 85 мл 0,1 н. NaOH, выдерживают при 23° 45—60 мин., фильтруют и подкисляют 1 н. HCl до кислой реакции по конго-рот, ацетон отгоняют в вакууме при 30—35° и экстрагируют остаток тремя порциями хлороформа (всего 300—400 мл). Хлороформенный экстракт промывают водой и сушат безводным Na_2SO_4 , затем упаривают в вакууме до объема 2—3 мл и добавляют к ним 100 мл эфира, причем выпадает порошок; эфирный раствор отсасывают, а твердый остаток растворяют в 2 мл метанола и вновь высаживают вещество 100 мл эфира, эфирный слой отсасывают, а вещество сушат в вакууме при 50—60°. Выход 0,5 г (50 % от теоретич.), $[\alpha]_D^{23}$ — 124° (с 0,5 в хлороформе).

Метиловый эфир гли-про-про [11]. 1,21 г метилового эфира кбз-гли-про-про гидрируют в 20 мл метанола над 0,5 г палладиевого катализатора в нейтральной среде; после поглощения рассчитанного количества водорода (20—40 мин.) раствор фильтруют и упаривают в вакууме.

куууме при 25—40°; выделяют с выходом 92% метиловый эфир гли-про-про в виде твердой сильно гигроскопической камеди, $[\alpha]_D^{20} -123^\circ$ (с 0,6 в хлороформе), $[\alpha]_D^{23} -125^\circ$ (с 0,76 в метаноле). Найдено, %: С 53,6; Н 7,56. $C_{13}H_{21}N_3O_4 \cdot \frac{1}{2}H_2O$. Вычислено, %: С 53,4; Н 7,54.

Вещество хроматографически чистое, $R_f = 0,41$.

Метиловый эфир гли-про-оксипро. 1,2 г метилового эфира кбз-гли-про-оксипро гидрируют, как указано выше. С выходом 97% получают слегка желтоватое вещество в виде твердой, сильно гигроскопической камеди, $[\alpha]_D^{23} -114^\circ$ (с 0,7 в метаноле). Найдено, %: С 50,4; Н 7,24. $C_{13}H_{21}N_3O_5 \cdot \frac{1}{2}H_2O$. Вычислено, %: С 50,7; Н 7,15.

Вещество хроматографически чистое, $R_f = 0,40$.

Метиловый эфир кбз-гли-про-про-гли-про-оксипро. Раствор 1,02 г кбз-гли-про-про в 10 мл сухого хлороформа, содержащего 0,42 мл триэтиламина, охлаждают до -15° и прибавляют 0,25 мл этилового эфира хлоругольной кислоты; выдерживают 30 мин. при -15° и прибавляют раствор 0,7 г метилового эфира гли-про-про в 5 мл сухого хлороформа, предварительно охлажденного до -15° . При -15° реакционную смесь выдерживают 1 час, при $-5-0^\circ$ — 2 часа, а затем оставляют на ночь при 20° . Реакционную смесь разбавляют хлороформом вдвое и последовательно экстрагируют водой (8×2 мл), 1 н. HCl (8 мл $\times 1$), водой (8 мл $\times 1$), 0,5 н. NaHCO₃ (8 мл $\times 2$) и водой (8 мл $\times 2$). Хлороформенный раствор сушат безводным Na₂SO₄ и упаривают в вакууме досуха; остаток растворяют в метаноле, фильтруют, упаривают в вакууме. Получают 1,48 г вещества, легко истираемого в порошок и размягчающегося при 95—97°; выход 88%; $[\alpha]_D^{23,5} -181,5^\circ$ (с 0,74 в метаноле). Найдено, %: OCH₃ 5,01. $C_{33}H_{44}N_6O_9$. Вычислено, %: OCH₃ 4,64.

При хроматографировании примесей метилового эфира гли-про-про не обнаружено.

Метиловый эфир кбз-гли-про-оксипро-гли-про-оксипро получен аналогично предыдущему соединению, исходя из 0,9 г кбз-гли-про-оксипро и 0,644 г метилового эфира гли-про-оксипро. Выход легко истирающегося аморфного вещества составляет 28,7%. Вещество размягчается при 125—130°. Для дальнейшей очистки вещество растворяют в 3—4 мл хлороформа и осаждают эфиром; очистку повторяют дважды. $[\alpha]_D^{21} -141,5^\circ$ (с 0,7 в метаноле). Найдено, %: OCH₃ 4,60. $C_{33}H_{44}N_6O_{11}$. Вычислено, %: OCH₃ 4,43.

При хроматографировании метилового эфира гли-про-оксипро обнаружено не было.

Метиловый эфир гли-про-про-гли-про-про. Раствор 700 мг метилового эфира кбз-гли-про-про-гли-про гидрируют в 15 мл метанола над 0,5 г палладиевого катализатора в нейтральной среде в приборе для микрогидрирования. После поглощения рассчитанного количества водорода, потребного на отщепление карбобензоксигруппы, катализатор отфильтровывают, а раствор упаривают в вакууме при 40—50°; выделяют 0,5 г метилового эфира гли-про-про-гли-про-про в виде твердого аморфного вещества, выход количественный, $[\alpha]_D^{23,5} -183,5^\circ$ (с 0,77 в метаноле), $[\alpha]_D^{23,5} -165^\circ$ (с 0,9360 в метаноле). Найдено, %: OCH₃ 5,67. $C_{25}H_{38}N_6O_7$. Вычислено, %: OCH₃ 5,82.

Хроматографирование эфира указывает на наличие одного продукта с $R_f = 0,48$, который слабо проявляется толидином; при большей концентрации пятно сильно вытягивается.

Метиловый эфир гли-про-оксипро-гли-про-оксипро получен с количественным выходом аналогично предыдущему соединению, исходя из 80 мг метилового эфира кбз-гли-про-оксипро-гли-про-оксипро, в виде аморфного порошка, $[\alpha]_D^{24} -135,8^\circ$ (с 0,77 в метаноле). Найдено, %: OCH₃ 5,61. $C_{25}H_{38}N_6O_9$. Вычислено, %: OCH₃ 5,48.

Хроматографирование эфира указывает на наличие одного продукта с $R_f = 0,5$, который слабо проявляется толидином; при большей концентрации пятно сильно вытягивается.

Метиловый эфир кбз-гли-про-оксипро-(гли-про-про)₂. Раствор 0,107 г кбз-гли-про-оксипро в 2 мл сухого хлороформа, содержащего 0,034 мл триэтиламина, охлаждают до -15° и прибавляют 0,024 мл этилового эфира хлоругольной кислоты. После образования смешанного ангидрида прибавляют 0,127 г метилового эфира гли-про-про-гли-про-про; далее реакцию проводят как при синтезе метилового эфира кбз-гли-про-про-гли-про-про (см. выше). Выделяют 0,13 г метилового эфира кбз-гли-про-оксипро-(гли-про-оксипро)₂; выход 58,5 %. $[\alpha]_D^{21} = 153^\circ$ (с 0,698 в метаноле). Найдено, %: ОСН₃ 3,56. С₄₅H₆₃N₉O₁₄. Вычислено, %: ОСН₃ 3,32.

При хроматографировании полученного вещества не обнаруживается метиловый эфир гли-про-про-гли-про-про.

Метиловый эфир гли-про-оксипро-(гли-про-про)₂. 95 мг метилового эфира кбз-гли-про-оксипро-(гли-про-про)₂ гидролизуют, как указано выше, и с количественным выходом получают метиловый эфир гли-про-оксипро-(гли-про-про)₂ в виде твердого аморфного вещества, $[\alpha]_D^{22,5} = 156,5^\circ$ (с 0,752 в метаноле). Найдено, %: ОСН₃ 3,92. С₃₇H₅₅N₉O₁₁. Вычислено, %: ОСН₃ 3,76.

При хроматографировании полученного вещества обнаружена небольшая примесь вещества, соответствующего по R_f метиловому эфиру гли-про-про-гли-про-про, однако не было обнаружено примеси гли-про-оксипро.

Метиловый эфир кбз-(гли-про-оксипро)₂-(гли-про-про)₂. Раствор 55 мг кбз-гли-про-оксипро в 2 мл сухого хлороформа, содержащего 0,0184 мл триэтиламина, охлаждают до -15° и прибавляют 0,0123 мл этилового эфира хлоругольной кислоты. Спустя 30 мин. прибавляют 94,8 мг метилового эфира гли-про-оксипро-(гли-про-про)₂. Далее реакцию проводят, как при синтезе метилового эфира кбз-гли-про-про-гли-про-про (см. выше). Выделяют 51,1 мг метилового эфира кбз-(гли-про-оксипро)₂-(гли-про-про)₂; выход 32,3 %, $[\alpha]_D^{21,5} = 92,5^\circ$ (с 0,77 в метаноле). Найдено, %: ОСН₃ 2,2. С₅₇H₈₀N₁₂O₁₈. Вычислено, %: ОСН₃ 2,58.

При хроматографировании вещества не обнаружено следов метилового эфира гли-про-оксипро-(гли-про-про)₂.

Гидролиз пептидов коллагеназой. Гидролиз метиловых эфиров кбз-гли-про-оксипро-(гли-про-про)₂ и кбз-(гли-про-оксипро)₂-(гли-про-оксипро)₂ проводили в присутствии коллагеназы, выделенной из *Clostridium histolyticum* [9], в ранее сообщенных условиях [5].

Аминокислотный анализ производных нона и додеказептида. Аминокислотный анализ проводили по описанной в литературе методике [12] на колонках 150 × 0,9 см, заполненных ионообменной смолой типа DW-50-4X (200—400 меш, емкость 4,2 мг-экв/г при $30 \pm 0,1^\circ$). Температуру в колонке с рубашкой поддерживали в течение всего опыта $30 \pm 0,1^\circ$ электронагревателем, помещенным в рубашку и регулируемым через плунжерное реле и контактный термометр. Фракции элюата собирали по 3 мл на автоматическом коллекторе. Ионообменную смолу готовили гранульной сополимеризацией стирола (96 вес. %) с дивинилбензолом (4 %) по методике Кагана [13] с той модификацией, что температуру полимеризации поддерживали постоянной ($90 \pm 1^\circ$) в течение 6 час. при интенсивном размешивании быстроходной мешалкой пропеллерного типа (800 об/мин.). Сульфирование проводили в концентрированной серной кислоте при повышенной температуре. Полученную сульфомассу выливали в 10-кратный объем дистиллированной воды и после отстаивания смолу дважды промывали такими же порциями воды.

Полученная смола представляет собой смесь сферических частиц разного диаметра — от 5 до 200 мк. Для отбора нужной фракции полученную смесь пропускали через сито (200 меш), а затем слишком мелкие частицы ($d < 25 \mu$) были удалены седиментационным способом [14]. Приготовленная таким способом смола обеспечивает скорость протекания растворителя по колонке 10—12 мл/час, при давлении воздуха, создаваемом на верху колонки и равном 25 см рт. ст.

Способ приготовления колонки и режим ее работы были теми же, что описаны Штейном и Муром [15].

Навески вещества по 6—7 мг гидролизовали по описанной методике [16] в эвакуированных до 0,1 мм запаянных ампулах в 6 н. HCl при 10,5° в течение 22 час. Продукты гидролиза сгущали в вакуум-эксикаторе.

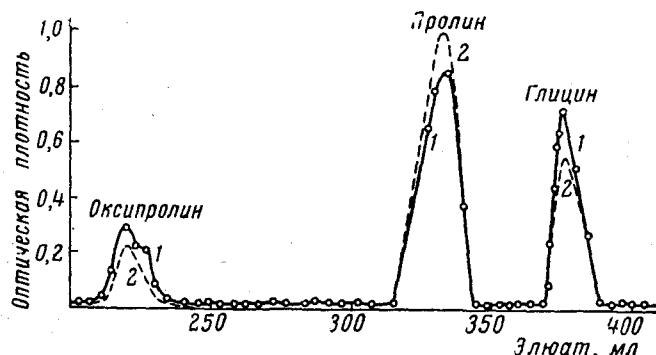


Рис. 2. Разделение аминокислот на колонке с ионообменной смолой типа DW-50-4X:

1 — иона-пептид, 2 — доде-капептид

торе (10 мм) над P_2O_5 и NaOH. Полученное кристаллическое вещество растворяли в 2 мл буферного раствора с pH 2,2, загружали в колонку с ионообменной смолой (описанной выше), забуференной при комнатной температуре буферным раствором с pH 2,2. Работа колонки проводилась по описанной методике с тем видоизменением, что в цитратный буферный раствор с pH 3,1 не добавляли детергент.

Нингидринный анализ аминокислот проводили по усовершенствованной методике Мура и Штейна [17], и выход цвета измеряли на фотоколориметре ФЭК-2. Для сопоставления аминокислотного анализа иона- и доде-капептида в колонку загружали продукты их гидролиза, соответствую-

Результаты аминокислотного анализа иона- и доде-капептида, проведенного ионообменной хроматографией на колонке

Аминокислота	Найдено, мг	Вычислено, мг	Аминокислота	Найдено, мг	Вычислено, мг
Метиловый эфир иона-пептида			Метиловый эфир карбобензоксида доде-капептида		
Гипролин	1,11	1,3	Оксипролин	1,43	1,52
Глицин	4,58	7	Пролин	3,76	4,02
Ицин	1,72	5	Глицин	1,51	1,74

щие одинаковым (по весу) количествам обоих веществ — 6,9 мг. Такое количество оказалось удобным тем, что обеспечивало выход цвета в нингидринном анализе пролина и оксипролина, близкий к выходу цвета для глицина. В случае половинного количества навески выход цвета для аминокислот заметно падает и требует повышенной точности фотоколориметрических измерений. Хроматограмма разделения продуктов гидролиза приведена на рис. 2.

Результаты хроматографического разделения продуктов гидролиза из нона- и додекапептидов приведены в таблице. Несколько заниженное содержание аминокислот в случае додекапептида, по-видимому, объясняется наличием в нем известного количества загрязнений; трудно отделимых от целевого вещества. Обращает на себя внимание то, что молярные соотношения между оксипролином, пролином и глицином, найденными в продуктах гидролиза додекапептида (1,09 : 3,28 : 2,02), близки к теоретическим (1 : 3 : 2).

В заключение авторы приносят благодарность В. Н. Ореховичу за предоставление коллагеназы.

Выводы

- Осуществлен синтез метиловых эфиров кбз-гли-про-про-гли-про-про, кбз-гли-про-оксипро-гли-про-оксипро, кбз-гли-про-оксипро-(гли-про-про)₂ и самих эфиров, а также метилового эфира кбз-(гли-про-окси-про)₂-(гли-про-про)₂.

- Применен ферментативный способ доказательства структуры пептидов при помощи коллагеназы.

- Обнаружено ослабевающее действие коллагеназы на синтезированные пептиды по мере удлинения пептида.

- Так как синтезированная нами последовательность -гли-про-х-, где х — пролин или оксипролин, близкая по своему строению к (-гли-про-оксипро-)_n, очень слабо гидролизовалась коллагеназой, можно предположить, что последовательность (-гли-про-оксипро-)_n мало вероятна в коллагене.

- При рентгеноструктурном исследовании полученных пептидов не удалось получить коллагеноподобных рефлексов.

Институт органической химии АН СССР
им. Н. Д. Зелинского

Поступила в редакцию
13 VI 1960

ЛИТЕРАТУРА

- T. D. Kroner, W. Tabroff, J. I. Mevarech, J. Amer. Chem. Soc., 77, 3357, 1955.
- W. A. Schröeder, L. M. Kay, J. Le Cutte, F. C. Green, J. Amer. Chem. Soc., 76, 3556, 1954.
- W. Gabmann, K. Hannig, H. Endress, A. Riedel, Z. physiol. chem., 306, 123, 1956.
- R. E. Schrophenlocher, J. D. Ogle, M. A. Logam, J. Biol. chem., 234, 58, 1959.
- K. T. Порошин, Т. Д. Козаренко, В. А. Шибнев, В. Г. Дебабов, Изв. АН СССР, Отд. хим. н., 1960, 550.
- В. А. Шибнев, Т. Д. Козаренко, К. Т. Порошин, Изв. АН СССР, Отд. хим. н., 1960, 1500.
- J. R. Vaughan, J. Amer. Chem. Soc., 74, 6137, 1952.
- В. А. Шибнев, Т. Д. Козаренко, К. Т. Порошин, Изв. АН СССР, Отд. хим. н., 1959, 1132.
- O. B. Казакова, В. Н. Орехович, В. О. Шниктер, Докл. АН СССР, 122, 657, 1958.
- К. Т. Порошин, Т. Д. Козаренко, В. А. Шибнев, В. Г. Дебабов, Изв. АН СССР, Отд. хим. н., 1959, 1851.
- Н. Е. Шукевер, В. А. Шибнев, М. И. Миллионова, Т. Д. Козаренко, К. Т. Порошин, Изв. АН СССР, Отд. хим. н., 1959, 2055.
- W. H. Stein, S. Moore, J. Biol. chem., 192, 663, 1951.
- W. S. Kagan, R. W. Shreve, Industr. and Engng. Chem., 45, 292, 1953.
- D. H. Spackmann, W. H. Stein, S. Moore, Analyt. Chem., 30, 1190, 1958.
- S. Moore, W. H. Stein, J. Biol. chem., 211, 893, 1954.
- S. Moore, W. H. Stein, J. Biol. chem., 211, 927, 1954.
- S. Moore, W. H. Stein, J. Biol. chem., 211, 907, 1954.

**SYNTHESIS OF GLYCINE-IMINO ACID PEPTIDE ANALOGS
OF A COLLAGEN FRAGMENT**

K. T. Poroshin, V. A. Shibnev, T. D. Kozarenko, V. G. Debabov

S u m m a r y

Hexa-, nona- and dodecapeptide derivatives with the sequence gly-pro-X, where X is proline or hydroxyproline, as possible fragments of a collagen molecule, have been synthesized by the mixed anhydride method. It was found that collagenase very weakly hydrolyses nona- and decapeptide and therefore the assumption has been advanced that the occurrence of such a sequence in the protein is of little probability. It has been assumed on the basis of a number of data that more probable is the sequence consisting of the alternating fragment — gly-pro-hydroxypro-gly — which may serve as the source of formation both of the tripeptide gly-pro-hydroxypro as well as of glycine during hydrolysis by collagenase. Collagen-like reflexes could not be obtained on X-ray structural analysis of the peptides and the change in value of the specific rotation of the peptides as the amount of iminoacids increases does not have the nature of a linear relationship.