

УДК 541.64:542.954:547.466

СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ α -ХИМОТРИПСИНОЛИЗА РЕГУЛЯРНЫХ ПОЛИЭФИРАМИДОВ НА ОСНОВЕ ФЕНИЛАЛАНИНА, ДИОЛОВ И ТЕРЕФТАЛЕВОЙ КИСЛОТЫ

© 1999 г. Д. Харадзе*, Л. Кирмелашивили*, Н. Медзмариашвили*, В. Беридзе*,
Г. Цитланадзе*, Д. Тугуши*, С. С. Chu**, Р. Кацарава*

*Центр медицинских полимеров и биоматериалов Министерства здравоохранения Грузии,
Грузинский технический университет
380079 Тбилиси, п/я 24

**Fiber and Polymer Science and Biomedical Engineering Programs, Department of Textiles and Apparel,
Cornell University and Ithaca
New York 14853-4401

Поступила в редакцию 05.10.98 г.
Принята в печать 02.02.99 г.

Тремя различными методами – поликонденсацией активированных терефталатов с ди-*n*-толуолсульфонатами *bis*-(*L*-фенилаланин)- α , ω -алкилендиэфиров, взаимодействием *bis*-азлактонов с алифатическими диолами и поликонденсацией калиевых солей N,N'-терефталоил-*bis*-*L*-фенилаланина с 1,2-дибромэтаном синтезированы регулярные полиефирамиды, содержащие жесткие *n*-фениленовые фрагменты в основных цепях макромолекул. Методом потенциометрического титрования в условиях, близких к физиологическому, изучен катализируемый α -химотрипсином специфический гидролиз полученных полиефирамидных субстратов, а также ряда низкомолекулярных субстратов, моделирующих элементарное звено полиефирамида. Показано, что введение в состав молекул жестких *n*-фениленовых фрагментов вместо гибких полиметиленовых звеньев существенно понижает склонность к специальному гидролизу как макромолекулярных, так и низкомолекулярных субстратов.

Биоаналогичные гетероцепенные полимеры AA–BB типа на основе α -аминокислот, получаемые из доступных мономеров в мягких условиях с использованием несложных поликонденсационных методов, привлекает внимание как перспективные биодеградируемые материалы биомедицинского назначения. Этот подход позволяет синтезировать высокомолекулярные полимеры на основе полифункциональных α -аминокислот, таких как лизин, цистин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты, или на основе димеризованных форм α -аминокислот, вводить в основные цепи макромолекул разнообразные гетеросвязи – уретановые, мочевинные, амидные, дисульфидные и сложноэфирные (см. работу [1] и литературу, цитированную там). Все это дает возможность в широких пределах варьировать строение и конформацию цепей макромолекул и соответственно физико-механические и биохимические свойства полиме-

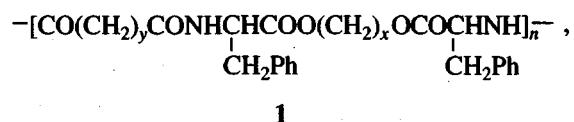
ров как потенциальных биомедицинских материалов. Кроме того, подобные полимеры представляют интерес в качестве макромолекулярных субстратов для изучения зависимости катализируемого ферментами *in vitro* гидролиза от строения цепей, что в свою очередь может позволить прогнозировать поведение биодеградируемых материалов *in vivo*.

Недавно мы показали [1, 2], что регулярные полиефирамиды (ПЭА) формулы 1, полученные на основе димеризованных форм аминокислот – *bis*-(*L*-фенилаланин)- α , ω -алкилендиэфиров и алифатических дикарбоновых кислот (адипиновой и себациновой), подвергаются катализируемому α -химотрипсином *in vitro* гидролизу. В дополнение к наличию легко гидролизуемых сложноэфирных связей и варьированию гидрофильно-гидрофобного баланса, конформационную подвижность

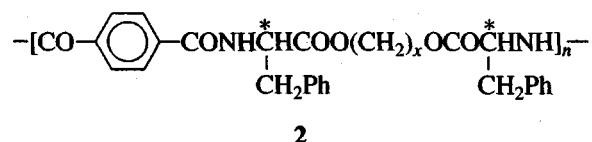
макроцепей следует рассматривать в качестве важнейшего фактора, вносящего вклад в склонность синтетических полимеров к биодеградации [3]. Справедливость этой мысли недавно была подтверждена нами в работе [4], в которой показано, что полимочевины на основе *bis*-(*L*-фенилаланин)- α,ω -алкилендиэфиров подвергаются *in vitro* α -химотрипсинолизу со значительно меньшей скоростью, чем соответствующие полиамиды и полиуретаны, по всей видимости, за счет более густой сетки межмолекулярных водородных связей, ограничивающих конформационную подвижность макромолекул. Возможное понижение конформационной подвижности макроцепей было рассмотрено также в качестве одной из вероятных причин уменьшения скорости катализируемого α -химотрипсином гидролиза эфирной связи при замене в ПЭА типа 1 ($y = 4$) *L*-фенилаланинового (Phe) остатка на дипептидный (Phe-Phe) фрагмент [5].

В настоящей работе мы решили гибкую полиметиленовую цепь дикислотного остатка в ПЭА типа 1 заменить на жесткий *n*-фениленовый фрагмент и изучить его влияние на катализируемый

α -химотрипсином *in vitro* гидролиз соответствующих ПЭА типа 2. Для получения ПЭА типа 2 были опробованы три разных метода, однако получены лишь низкомолекулярные полимеры, пригодные, однако, в качестве субстратов для проведения запланированных исследований

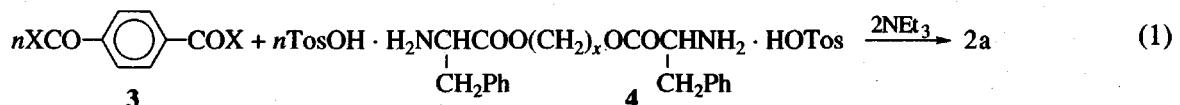


где $x = 2-4, 6$; $y = 4, 8$.



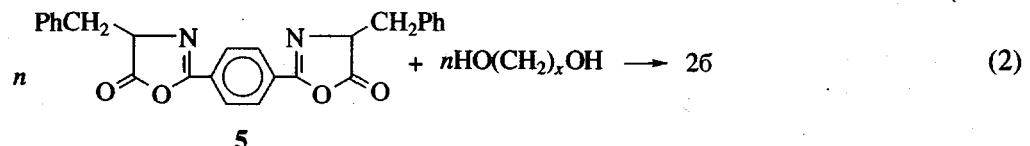
($x = 2-4$; $* = L$ (2a) и DL (2б)).

Синтез ПЭА типа 2а по методу А приведен ниже.



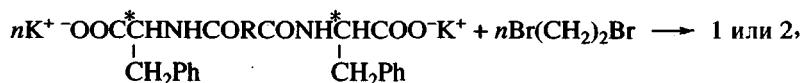
($x = 2-4$; X = *o*-*n*-C₆H₄-NO₂ (3a) и *o*-C₆F₅ (36); TosOH = CH₃-*n*-C₆H₄-SO₃H).

Синтез ПЭА типа 2б по методу Б:



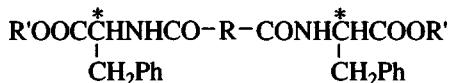
($x = 3, 4$),

Получение ПЭА типа 1 и 2 по методу В осуществляли в соответствии со схемой



где $x = 2$; $R = (\text{CH}_2)_4$, $* = L$ (6); $R = -\text{C}_6\text{H}_4-$, $* = L$ (7a); $R = -\text{C}_6\text{H}_4-$, $* = DL$ (7b).

Формулы и обозначения модельных субстратов 8–10 приведены ниже



Здесь R = , R' = CH₃, * = L (8a) и DL (86); R = (CH₂)₄, R' = CH₃ (9); R = , R' =  (10).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Все растворители и триэтиламин (ТЭА) очищали по стандартным методикам. 1,3-Пропандиол и 1,4-бутандиол ("Fluka") и 1,2-дигромэтан ("Реахим") очищали перегонкой в вакууме. HClO₄ (70%), CF₃COOH ("Реахим") и полиэтиленгликоль – ПЭГ 40000 ("Fluka") и дибензо-18-краун-6 ("Aldrich") применяли без дополнительной очистки. В работе использовали α -химотрипсин ("Fluka") с активностью 50–60 ед/мг. Определение активности: одна единица гидролизует 1 мкмоль этилового эфира N-бензоил-L-тирозина ("Fluka") за 1 мин при pH 7.8 и 25°C в 0.1 N растворе NaCl.

Синтез мономеров

Активированный диэфир 3а (M = 408.32) [6], ди-n-толуолсульфонаты бис-(L-фенилаланин)- α,ω -алкилendiэфиров 4 (x = 2, M = 700.83; x = 3, M = 714.86; x = 4, M = 728.90) [1, 2] и 2,2'-n-фенилен-4,4'-дибензил- Δ^2 -5-оксазолинон 5 (M = 424.46) [7] синтезировали и очищали как выше. Активированный диэфир 3б (M = 498.23) получали по методике, описанной ранее для бис-пентафтоФенилизофталата [6] и очищали перекристаллизацией из хлорбензола; T_{пл} = 197–199°C. Элементный состав диэфира 3б соответствовал вычисленному. Дикислоты для получения солей 6 (M = 516.68) и 7б (M = 536.67) синтезировали как ранее [7]. Аналогично получали оптически активную дикислоту для приготовления соли 7а – N,N'-терефталоил-бис-L-фенилаланин, которая после перекристаллизации из ледяной уксусной кислоты имела T_{пл} = 222–224°C и удельное вращение [α]_D = -123 (в DMAA, c = 5%, l = 10 см). Элементный состав данной дикислоты, ее ИК-спектр и кислотное число соответствовали приписываемой структуре. Соли 6 и 7 готовили нейтрализацией соответствующих дикислот в воде бикарбонатом калия до pH 8.5. Воду упаривали досуха и полученный

белый порошок сушили в вакууме при 120°C до постоянной массы.

Синтез модельных субстратов

Оптический неактивный модельный субстрат – диметиловый эфир N,N'-терефталоил-бис-DL-фенилаланина 8б (M = 488.54) – синтезировали кипячением бис-азлактона 5 (4 г) в среде абсолютного метанола (40 мл) в течение 5 ч в присутствии HClO₄ в качестве катализатора. Полученный белый порошок отфильтровывали, сушили и перекристаллизовывали из хлороформа; T_{пл} = 223–224.5°C. Элементный состав и ИК-спектр соединения 8б (в нуйоле) соответствовали приписываемой структуре.

Оптический активный аналог диметиловый эфир N,N'-терефталоил-бис-L-фенилаланина 8а получали по следующей методике: к раствору 6.47 г (0.03 моля) гидрохлорида метилового эфира L-фенилаланина (T_{пл} = 158–160°C, по лит. данным [8] T_{пл} = 159–161°C) и 1.68 г (0.03 моля) KOH в 50 мл воды при охлаждении льдом добавляли раствор 3.04 г (0.015 моля) терефталоилхлорида в 20 мл бензола. Смесь сильно встряхивали и по порциям добавляли еще 1.68 г (0.03 моля) KOH в виде 10%-ного водного раствора. Выпавший белый осадок отфильтровывали, сушили и перекристаллизовывали из смеси хлороформа с гексаном; T_{пл} = 202–203°C. Элементный состав и ИК-спектр соединения 8а (в нуйоле) соответствовали приписываемой структуре. Удельное вращение [α]_D = -115 (в DMAA, c = 5%, l = 10 см).

Диметиловый эфир N,N'-адипоил-бис-L-фенилаланина 9 (M = 468.55) получали аналогично соединению 8а, используя в приведенной выше методике вместо терефталоилхлорида 2.74 г (0.015 моля) адипоилхлорида. Выпавший белый осадок отфильтровывали, сушили и перекристаллизовывали из смеси этилацетата с гексаном; T_{пл} = 125–127°C. Элементный состав и ИК-спектр соединения 10 (в нуйоле) соответствовали приписываемой структуре. Удельное вращение [α]_D = -20 (в DMAA, c = 5%, l = 10 см).

Ди-n-нитрофениловый эфир N,N'-терефталоил-бис-DL-фенилаланина 10 (M = 702.68) синтезировали как ранее [5].

Синтез полимеров (общая методика)

Метод А. Взаимодействие активированных диэфиров 3 с ди-n-толуолсульфонатом 4 (схема (1)). К перемешиваемой смеси 10 ммолей 3 и 10 ммолей 4 в 5.25 мл сухого DMAA при комнатной

Таблица 1. Синтез ПЭА типа 2а взаимодействием активированных диэфиров 3 с ди-*n*-толуолсульфонатами 4 в среде ДМАА

Образец, №	Мономеры		ПЭА типа 2а		
	3	4 со значениями <i>x</i>	выход, %	$\eta_{\text{пр}}$ (<i>m</i> -крезол), дл/л	$[\alpha]_D^*$
1	3а	2	91	0.20	-102
2	3б	2	88	0.18	-108
3	3а	3	92	0.24	-104
4	3б	3	87	0.25	-
5	3а	4	95	0.28	-
6	3б	4	93	0.30	-

Примечание. Концентрация каждого мономера 1.2 моль/л, температура реакции 65°C, продолжительность 48 ч.

* Удельное вращение при 20°C, *c* = 5%, ДМАА.

температуре добавляли 3.1 мл (~22 ммоль) сухого ТЭА (общий объем ДМАА + ТЭА = 8.33 мл, *c* = 1.2 моль/л), температуру повышали до 65°C и перемешивали в течение 48 ч. Реакционный раствор охлаждали до комнатной температуры и выливали в холодную воду. Выпавший порошок отфильтровывали, тщательно промывали водой и сушили в вакууме при 30–40°C. Полученные результаты приведены в табл. 1. Элементный состав полимеров (определяли для образцов 3 и 6, табл. 1) соответствовал вычисленному. ИК-спектры (в нюйоле) образцов, полученных через соединения 3а и 3б полностью идентичны: в спектрах наблюдаются полосы 1660 (амид), 1720 (эфир) и 3350 cm^{-1} (NH).

Метод Б. Взаимодействие бис-азлактона 5 с диолами (схема 2). К перемешиваемой смеси 10 ммоль диола и 4.2446 г (10 ммоль) кристаллического бис-азлактона 5 в 16.6 мл органического растворителя добавляли катализатор и нагревали (использованные диолы, растворители и катализаторы, а также условия реакции даны в табл. 2).

Таблица 2. Синтез ПЭА типа 2а взаимодействием бис-азлактона 5 с диолами (концентрация каждого мономера 0.6 моль/л, продолжительность реакции 15 ч)

Образец, №	$\text{HO}(\text{CH}_2)_x\text{OH}$ со значениями <i>x</i>	Реакционная среда	Катализатор*, мкл	Температура реакции, °C	ПЭА типа 2б	
					выход, %	$\eta_{\text{пр}}^{**}$, дл/г
1	3	<i>o</i> - $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2$	CF_3COOH (20)	160	87	0.25
2	4	C_6H_6	HClO_4 (20)	80	86	0.10
3	4	C_6H_6	HClO_4 (20)	80	81	0.11
4	4	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$	HClO_4 (20)	120	89	0.22
5	4	<i>o</i> - $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2$	HClO_4 (20)	120	91	0.27
6	4	<i>o</i> - $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2$	HClO_4 (20)	160	93	0.31
7	4	<i>o</i> - $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2$	CF_3COOH (20)	160	96	0.40
8	4	<i>o</i> - $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2$	CF_3COOH (80)	160	97	0.36

* 20 микролитров HClO_4 (70%) соответствуют 0.23 мкмолям, а 20 микролитров CF_3COOH (98%) – 0.25 мкмолям активного катализатора; мольное соотношение мономер : катализатор = 40 : 1. В случае 80 микролитров – 10 : 1.

** Приведенная вязкость в *m*-крезоле, *T* = 25°C, *c* = 0.5 г/дл.

Таблица 3. Синтез ПЭА типа 1 и 2 взаимодействием калиевых солей 6 и 7 с 1,2-дибромэтаном в среде МП*

Образец, №	Соль	Катализатор**	Соотношение $\frac{\text{соль}}{\text{C}_2\text{H}_4\text{Br}_2}$, моль/л	ПЭА ($x = 2$)			
				1 или 2	выход, %	$\eta_{\text{пр}}$, дл/г	[α] _D ***
1	6	—	0.60 : 0.60	1	79	0.18	-18
2	6	ПЭГ 40000	0.60 : 0.66	1	85	0.27	-99
3	7а	18-Краун-6	0.60 : 0.60	2а	94	0.17	—
4	7а	18-Краун-6	0.60 : 0.66	2а	93	0.19	—
5	7б	—	0.60 : 0.60	2б	87	0.16	—
6	7б	ПЭГ 40000	0.60 : 0.60	2б	89	0.22	—
7	7б	ПЭГ 40000	0.60 : 0.60	2б	88	0.28	—
8	7б	ПЭГ 40000	0.66 : 0.60	2б	82	0.16	—
9	7б	18-Краун-6	0.60 : 0.66	2б	87	0.20	—

* Температура реакции 105°C, продолжительность 9 ч.

** ПЭГ 40000 добавляли в количестве 1 мол.%; дибензо-18-краун-6 – из расчета 2 моля на 1 моль соли.

*** Удельное вращение при 20°C, $c = 5\%$, ДМАА.

При нагревании реакционная смесь гомогенизируется (бис-азлактон растворяется) и спустя 30 мин начинается выпадение полимера. Смесь перемешивали при указанной температуре в течение 15 ч и охлаждали до комнатной температуры. Выпавший белый порошкообразный полимер отфильтровывали, сушили, промывали водой (для удаления катализатора) и сушили в вакууме при 30–40°C до постоянной массы. Полученные результаты приведены в табл. 2. Элементный состав полимеров (определяли для образцов 4 и 7, табл. 2) соответствовал вычисленному, ИК-спектры (в нуйоле) – приписываемой структуре.

Метод В. Взаимодействие солей 6 и 7 с 1,2-дибромэтаном (схема 3). К перемешиваемой смеси 10 ммолей 6 или 7 в 16.7 мл N-метил-2-пирролидона (МП) ($c = 0.6$ моль/л) добавляли 1.8787 г (10 ммолей) 1,2-дибромэтана при комнатной температуре (в некоторых случаях к реакционной смеси добавляли полиэтиленгликоль (ПЭГ 40000 или дибензо-18-краун-6)) после чего смесь нагревали до 105°C. При этом наблюдается растворение солей 6 (или 7), и реакция протекает гомогенно, однако спустя ~1 ч начинается выпадение KBr, не растворимого в МП. Реакционную смесь перемешивали при 105°C в течение 9 ч, охлаждали до комнатной температуры и выливали в холодную воду. Выпавший белый порошок отфильтровывали, тщательно промывали водой и сушили в вакууме при 30–40°C. Полученные результаты приведены в табл. 3. Элементный состав полимеров (опреде-

ляли для образцов 2 и 7, табл. 3) соответствовал вычисленному, ИК-спектры (в нуйоле) – приписываемой структуре.

Измерения

ИК-спектры снимали на приборе “Specord M-80”, УФ-спектры – на спектрометре “Specord UV-VIS” (оба “Carl Zeiss”, Jena). Удельное вращение ([α]_D) измеряли на поляриметре СМ-3 (Загорск). Приведенную вязкость полимеров определяли в *m*-крезоле при 25°C и концентрации 0.5 г/дл. Кинетику катализируемого α -химотрипсином гидролиза алкиловых эфиров (как полимерных, так и модельных субстратов) изучали потенциометрическим титрованием (автоматический регистрирующий титратор “Radiometer RTS-822”) карбоксильных групп, образующихся после гидролиза сложноэфирных групп как описывали ранее [2]. Лишь кинетику расщепления *n*-нитрофенилового эфира 10 изучали фотометрическим определением (при 430 нм) *n*-нитрофенола, выделяющегося после гидролиза сложноэфирных групп. Использовали порошкообразные субстраты, просеянные через сито № 01. Все реакции гетерогенны – субстраты в воде не растворяются. В случае ПЭА типа 2 и модельных субстратов 5 и 8 концентрация фермента равна 0.4 мг/мл, количество порошкообразного субстрата – 100 мг. В случае “активных” субстратов 1, 9 и 10 концентрация фермента составляла 0.04, 0.002 и 0.02 мг/мл, а количество субстрата –

10.0, 10.0 и 0.5 мг соответственно. Все субстраты вводили в виде мелкодисперсного порошка, кроме соединения 10, который добавляли в буферный раствор в виде 0.35%-ного раствора в диоксане (в водной среде субстрат выпадает). Все эксперименты по гидролизу проводили в следующих стандартных условиях: 5 мл раствора (0.1 N NaCl или фосфатного буфера), pH 8.2 (pH-оптимум фермента), $T = 37^\circ\text{C}$. В конце эксперимента активность фермента проверяли добавлением специфического субстрата – этилового эфира N-ацетил-L-тирофина (ATEE, "Sigma"). В каждом случае проводили по три параллельных опыта.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез полимеров

Поликонденсация активированных диэфиров 3 с ди-*n*-толуолсульфонатами 4 (метод А). Ранее мы показали [1, 2], что высокомолекулярные, гибкоцепные ПЭА типа 1 и их аналоги на основе других гидрофобных α -аминокислот, обладающие пленкообразующими свойствами, могут быть получены поликонденсацией ди-*n*-нитрофениловых эфиров алифатических дикарбоновых кислот с солями типа 4 в среде органического растворителя в присутствии ТЭА по уравнению (1). Оптимальными для данного процесса были найдены следующие условия: реакционная среда DMAA, концентрация мономеров (каждого) 1.2 моль/л, температура 65°C , продолжительность 48 ч. В этих условиях были синтезированы ПЭА с приведенной вязкостью до 3.49 дL/g (M_w до 1.7×10^5 (ГПХ)) [1].

Исходя из этих данных, мы решили использовать указанный метод и для синтеза "жестких" ПЭА типа 2. Однако, поликонденсацией активированного ди-*n*-нитрофенилтерефталя 3а с солями 4 в приведенных оптимальных условиях были получены лишь низкомолекулярные, порошкообразные ПЭА формулы 2а (табл. 1).

Использование более активного [6, 9] пентафторфенилового аналога соединения 3б не привело к значительному увеличению вязкостных характеристик полимера. Это можно связать со значительно меньшей активностью ароматических диэфиров по сравнению с их алифатическими аналогами [10]. Такая разница в активности диэфиров, по-видимому, особо оказывается в поликонденсационных процессах с участием солей типа 4, протекающих со значительно более низкими скоростями по сравнению со свободными диаминами (ср., например, данные работ [1] и [6]). Отметим, что ПЭА типа 2а, полученные по данной схеме, оптически активны (табл. 1).

Взаимодействие бис-азлактона 5 с диолами (метод Б). Синтез ПЭА реакцией 2,2'-*n*-фенилен-бис-азлактона (2,2'-*n*-фенилен-4,4'-дизобутил-бис- Δ^2 -5-оксазолинона) с гександиолом-1,6 в среде хлороформа по уравнению (2), впервые был описан в работе [11]. Взаимодействием указанных соединений получен лишь низкомолекулярный полимер с логарифмической вязкостью, не превышающей 0.14 дL/g (м-крезол, 25°C). Использование кислотных или основных катализаторов, или повышение температуры реакции не привело к заметному увеличению молекулярной массы ПЭА. Более того, было показано, что третичные основания, использованные в качестве катализитических добавок, ведут к побочной реакции образования N,N'-диацил-пиперазин-2,5-диона.

Для синтеза ПЭА типа 2б мы изучили аналогичную реакцию между бис-азлактоном 5 и диолами ($x = 3$ и 4), используя различные ароматические углеводороды (бензол, нитробензол и *o*-дихлорбензол) в качестве реакционной среды. Найдено, что в отсутствие катализатора, независимо от природы использованного растворителя, реакция между указанными соединениями не протекает даже при температурах до 160°C , и исходный бис-азлактон 5 был выделен практически с количественным выходом. И лишь после введения кислотного катализатора (HClO_4 , CF_3COOH) получены сравнительно низкомолекулярные, порошкообразные ПЭА типа 2б (табл. 2). ПЭА типа 2б с максимальной вязкостью ($\eta_{sp} = 0.4 \text{ дL/g}$) синтезирован при взаимодействии 5 с 1,4-бутандиолом в среде *o*-дихлорбензола при 160°C с использованием CF_3COOH в качестве катализатора. ПЭА типа 2б, полученные по данной схеме, оптически неактивны, что закономерно, поскольку рацемичен сам исходный бис-азлактон.

Взаимодействие 1,2-дибромэтана с калиевыми солями N,N'-диацил-бис-фенилаланина 6 и 7 (метод В). Поликонденсация α,ω -дибромалканов с калиевыми солями дикарбоновых кислот в среде МП при 105°C успешно была использована в работах [12, 13] для получения ряда функциональных полиэфиров. Мы решили применить этот подход для синтеза ПЭА типа 2 на основе калиевых солей 7 и 1,2-дибромэтана. В ряде случаев катализаторами реакции служили ПЭГ 40000 и дibenzo-18-краун-6. Из данных табл. 3 видно, что использование небольшого избытка 1,2-дибромэтана (до 10 мол. %) приводит к некоторому увеличению, а использование избытка соли дикислоты – к понижению вязкости ПЭА типа 2. Добавление ПЭГ 40000 увеличивает вязкость ПЭА, не оказывая значительного влияния на их выход. Введение краун-эфира, напротив, повышает выход ПЭА, не влияя существенно на их вязкость.

Таблица 4. Результаты α -химотрипсинализи полимерных и модельных субстратов (S – количество порошкообразного субстрата, мг; E – содержание фермента в 5 мл раствора, мг; V_0 – начальная скорость реакции, мкмоль/мин, A – расход NaOH, мкмоль/70 мин)

Субстрат	S	E	V_0/E	A
1				
$x = 2, y = 4$ [1]	10	0.2	0.13	–
1				
$x = 2, y = 4$ (табл. 3, образец 2)	10	0.2	0.16 ± 0.3	–
2a				
$x = 2$ (табл. 1, образец 1)	100	2.0	–	1–2
$x = 3$ (табл. 1, образец 4)	100	2.0	–	1–2
$x = 4$ (табл. 1, образец 6)	100	2.0	–	1–2
2б				
$x = 3$ (табл. 2, образец 1)	100	2.0	–	1–2
$x = 4$ (табл. 2, образец 7)	100	2.0	–	1–2
5	100	2.0	–	1–2
8a	100	2.0	–	1–3
8б	100	2.0	–	1–2
9	10	0.01	$142 \pm 15^{**}$	–
10	0.5*	0.1	43 ± 8	–

* Добавляли в виде 3,5%-ного раствора в диоксане.

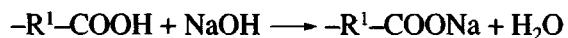
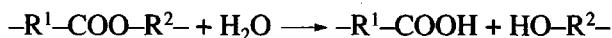
** Для близких по строению модельных субстратов $\text{CH}_3\text{CONHCH}(\text{CH}_2\text{Ph})\text{COO}(\text{CH}_2)_x\text{OCOCH}(\text{CH}_2\text{Ph})\text{NHCOCH}_3$ были определены следующие значения V_0/E : 128 ($x = 2$), 156 ($x = 3$), 188 ($x = 4$) [2].

В целом, приведенная вязкость ПЭА типа 2, полученных по данной реакции, не превышает 0,28 дL/г. Изменение природы дикислоты, т.е. переход от производных терефталевой кислоты – солей 7, к производной адипиновой кислоты – соли 6, к образованию высокомолекулярных ПЭА типа 1, по данной реакции, не привело. Отметим, что, согласно данным элементного анализа и ИК-спектроскопии, полученный ПЭА типа 1 идентичен полимеру, синтезированному ранее [1, 2] по реакции, аналогичной приведенной на схеме (1) – взаимодействием ди-*n*-нитрофениладипината с солью 4 ($x = 2$). Близки и значения удельного вращения: $[\alpha]_D = -20$ [1, 2] и $[\alpha]_D = -18$ (табл. 3). Значения $[\alpha]_D$ образца ПЭА типа 2а, полученного по данной схеме через соль 7а и по схеме (1) поликонденсацией соедине-

ния 3а с солью 4 ($x = 2$), также близки (ср. данные табл. 1 и 3).

Изучение α -химотрипсинализи ПЭА и модельных субстратов

Для оценки склонности ПЭА субстратов типа 1 и 2 к катализируемому α -химотрипсином гидролизу мы применяли метод потенциометрического титрования карбоксильных групп, высвобождающихся после гидролиза сложноэфирных связей [1, 2]



Таким образом, количество израсходованной щелочи соответствует количеству гидролизованных эфирных групп (моль/моль).

Цель настоящей работы – лишь характеристика общей тенденции синтезированных эфирных субстратов претерпевать *in vitro* α -химотрипсинализ. В рамках поставленной задачи гидролиз неактивных субстратов удобнее характеризовать расходом щелочи за определенный промежуток времени, а гидролиз активных – величиной V_0/E , поскольку в данных случаях количество фермента и субстратов варьируется, чтобы добиться регистрируемых скоростей гидролиза. Поэтому α -химотрипсинализ ПЭА типа 2 и модельных субстратов 5 и 8 оценивали расходом NaOH за 70 мин (один полный цикл автоматического титратора “Radiometer RTS-822”), а α -химотрипсинализ субстратов 1, 9 и 10 – величиной V_0/E .

Было установлено, что в описанных выше условиях гидролиз ПЭА типа 2 в заметной степени не происходит, причем независимо от метода синтеза и оптических свойств ПЭА (расход NaOH/70 мин 1–3 мкмоль находится в пределах ошибки эксперимента, табл. 4). В то же время образец ПЭА типа 1 ($x = 2, y = 4$), полученный по методу В, претерпевает гидролиз практически в той же степени, что и порошкообразный аналог, полученный ранее [2] взаимодействием ди-*n*-нитрофениладипината с солью 4 ($x = 2, y = 4$). Причины низкой склонности ПЭА типа 2 к α -химотрипсинализу могут быть следующие: эффекты макроцепей (ощущимые, например, при сравнении ПЭА типа 1 и соответствующих модельных субстратов [2]), ингибирование *D*-аминокислотными фрагментами (в случае ПЭА типа 2а их возникновение возможно в результате частичной рацемизации), конформационная жесткость самих терефталамидных фрагментов, и непродуктивное связывание, сильно тормозящее реакцию в случае малоактивных алкиловых

эфиров (т.е. алcoxидных уходящих групп). Чтобы хоть в первом приближении ответить на эти вопросы, был синтезирован ряд модельных субстратов и поставлены дополнительные эксперименты.

В первую очередь изучили склонность к α -химотрипсинолизу низкомолекулярных субстратов 8, моделирующих элементарные звенья ПЭА типа 2 и свободных от эффектов цепей. Указанные соединения, однако, как и полимерные субстраты (полученные на основе как *L*, так и *D,L* фенилаланина) не подвергаются α -химотрипсинолизу с заметной скоростью в условиях эксперимента. В то же время модельный субстрат 9, полученный на основе алифатической адипиновой кислоты, расщепляется с высокой скоростью: значение V_0/E составляет ~50% от величины того же параметра, определенного для специфического субстрата — АTEE, что согласуется с полученными ранее нами данными [2].

Низкая склонность производных терефталевой кислоты 8 могла быть связана с низкой активностью метиловых эфиров [10], обусловленной слабой метоксильной уходящей группой. Поэтому был изучен α -химотрипсинолиз циклического субстрата — бис-азлактона 5, проявляющего высокую электрофильную реакционную способность (например, в реакциях с аминами [7, 14]), сопоставимую с активностью *n*-нитрофениловых эфиров карбоновых кислот (ср. данные работ [9] и [14]). Было, однако, найдено, что данное вещество также не подвергается катализируемому α -химотрипсином гидролизу с заметной скоростью в условиях эксперимента.

Стабильность субстрата 5, помимо описанных выше тормозящих факторов, могла быть связана с жесткостью азлактонного цикла, препятствующей взаимодействию его карбонильной группы с активным центром фермента. Для прояснения этого вопроса мы решили изучить α -химотрипсинолиз нециклического субстрата 10, сопоставимого с 5 по реакционной способности [9, 14]. Гидролиз соединения 10 изучали фотометрическим измерением текущей концентрации *n*-нитрофенола, выделяющегося при гидролизе (при $\lambda_{\text{max}} = 430 \text{ нм}$).

Эксперимент проводили в фосфатном буфере с pH 8.2. Для компенсации *n*-нитрофенола, выделяющегося за счет химического гидролиза в слабощелочной среде, в кювету сравнения помещали фосфатный буфер с таким же количеством субстрата (без фермента). Было найдено, что субстрат 10 подвергается α -химотрипсинолизу со скоростью $43 \pm 8 \text{ мкмоль/мин}$ (мг фермента). Таким образом, наличие *D*-аминокислотных фраг-

ментов, возможно, и понижает скорость гидролиза, но не приводит к полной ее остановке. Следовательно, если ингибиование *D*-аминокислотными фрагментами имеет место, то оно носит обратимый характер. В подтверждение этого приведем результат, полученный нами ранее [1]: ПЭА типа 1 на основе *D,L*-фенилаланина ($x = 4, y = 4$) расщепляется α -химотрипсином со скоростью, составляющей около 25% от скорости расщепления чистого *L*-изомера.

Чтобы удостоверится, что выделение *n*-нитрофенола происходит за счет каталитического гидролиза, а не в результате аминолиза соединения 10 свободными аминогруппами белка (как это имеет место при изучении ферментативного гидролиза *n*-нитрофениловых эфиров в среде ДМСО [15]), в контрольных опытах использовали денатурированный α -химотрипсин (фермент денатурировали кипячением в среде буфера в течение 5 мин). В присутствии денатурированного фермента выделение *n*-нитрофенола с заметной скоростью в условиях эксперимента не происходило, что свидетельствует о ничтожном вкладе реакции аминолиза.

В заключение отметим, что скорость α -химотрипсинолиза субстрата 10 все же не так высока, как следовало бы ожидать с учетом высокой активности *n*-нитрофениловых эфиров — она сопоставима со скоростью гидролиза субстрата 9 с малоактивной метоксильной уходящей группой. Таким образом, введение ароматического *n*-фениленового фрагмента вместо алифатических полиметиленовых цепей приводит к существенному снижению склонности эфирных субстратов (как полимерных, так и низкомолекулярных) к катализируемому α -химотрипсином гидролизу. Полученные данные позволяют сделать предположение, что это связано не только с понижением конформационной подвижности молекул, но и с непродуктивным связыванием [15], обусловленным повышенной гидрофобностью N-ацильного остатка. В целом полученные результаты согласуются с данными, приведенными в работе [15], согласно которым в процессах α -химотрипсинолиза эфиры N-бензоил- α -аминокислот значительно менее активны, чем их N-ацетильные аналоги.

Настоящее исследование стало возможным вследствие гранта GB1-116 фонда США для гражданских исследований в странах бывшего СССР.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Katsarava R., Beridze V., Arabuli N., Kharadze D., Chu C.C., Won C.Y. // J. Polym. Sci., Polym. Chem. (in press).
2. Arabuli N., Tsitlanadze G., Edilashvili L., Kharadze D., Goguadze Ts., Beridze V., Gomurashvili Z., Katsarava R. // Makromol. Chem. Phys. 1994. B. 195. № 6. S. 2279.
3. Gilbert R.D., Stannet V., Pitt C.G., Schindler A. // Development in Polymer Degradation-4 / Ed. by Grassie N. Glasgow, UK: Chemistry Department, The University, 1982. P. 259.
4. Kartvelishvili T., Tsitlanadze G., Edilashvili L., Japaridze N., Katsarava R. // Makromol. Chem. Phys. 1997. B. 198. № 7. S. 1921.
5. Харадзе Д.П., Омиадзе Т.Н., Цитланадзе Г.В., Гогуадзе Ц.А., Арабули Н.М., Гомурашвили З.Д., Кацарава Р.Д. // Высокомолек. соед. А. 1994. Т. 36. № 9. С. 1462.
6. Кацарава Р., Харадзе Д.П., Авалишвили Л.М. // Chimia Stosowana (Polish J. Appl. Chem.). 1986. V. 30. № 2. P. 187.
7. Katsarava R., Kharadze D., Kirmelashvili L., Zaalistvili M. // Acta Polymerica. 1985. B. 36. № 1. S. 29.
8. Aldrich Catalogue Handbook of Fine Chemicals. 1996–1997.
9. Katsarava R., Kharadze D., Bendishvili T., Urman Ya.G., Slonim Ya.I., Cefelin P., Yanout V. // Acta Polymerica. 1988. B. 39. № 9. S. 523.
10. Gordon V., Miller J.G., Day A.R. // J. Am. Chem. Soc. 1948. V. 70. № 5. P. 1946.
11. Cleaver C.S., Pratt B.C. // J. Am. Chem. Soc. 1955. V. 77. № 6. P. 1541.
12. Sepulchre M.-O., Sepulchre M., Spasski N., Djonalagic J., Jacovic V.S. // Makromol. Chem. 1991. B. 192. № 5. S. 1073.
13. Sepulchre M.-O., Idrissi H.E., Sepulchre M., Spasski N. // Makromol. Chem. 1993. B. 194. № 3. S. 677.
14. Хосруашвили Т.А., Кирмелашивили Л.И., Харадзе Д.П., Кацарава Р.Д. // Сообщ. АН ГССР. 1989. Т. 136. № 2. С. 329.
15. Клесов А.А., Березин И.В. Ферментативный катализ. М.: МГУ, 1980. Ч. 2.

Synthesis and α -Chymotrypsinolysis of Regular Poly(ester amides) Based on Phenylalanine, Diols, and Terephthalic Acid

D. Kharadze*, L. Kirmelashvili*, N. Medzmariashvili*, V. Beridze*, G. Tsitlanadze*, D. Tugushi*, C. C. Chu**, and R. Katsarava*

*Center of Medical Polymers and Biomaterials, Ministry of Public Health of Georgia; Georgian Technical University, P/B 24, Tbilisi, 380079 Georgia

**Fiber and Polymer Science and Biomedical Engineering Programs, Department of Textiles and Apparel, Cornell University, and Ithaca, New York 14853–4401, USA

Abstract—Regular poly(ester amides) containing rigid *p*-phenylene fragments in the backbone were synthesized by three different methods including (A) polycondensation of activated terephthalates with bis(L-phenylalanine)- α , ω -alkylene diester di-*p*-toluenesulfonates, (B) interaction of bisazlactones with aliphatic diols, and (C) polycondensation of N,N'-terephthaloyl- bis-L-phenylalanine potassium salts with 1,2-dibromoethane. Specific α -chymotrypsin-induced hydrolysis of the obtained poly(ester amide)s and some low-molecular-mass substrates, modeling the elementary unit of poly(ester amides), was studied by the method of potentiometric titration under nearly physiological conditions. Introduction of the rigid *p*-phenylene fragments instead of flexible poly(methylene) units markedly decreases the susceptibility of both low-molecular-mass substances and macromolecules to the specific hydrolysis.