

ΣΥΝΘΕΣΗ, ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΜΟΡΦΩΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΗΣ ΩΚΥΤΟΚΙΝΗΣ ΜΕ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΣΤΙΣ

ΘΕΣΕΙΣ 8 ΚΑΙ 9.

ΦΡΑΓΚΙΑΔΑΚΗ ΜΑΡΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Π. ΚΟΡΔΟΠΑΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ Ε.Π.Ε.Α.Ε.Κ.
«ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΜΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ
ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ»

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

2000/2001

◆ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ◆

I. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	v
II. ΠΡΟΛΟΓΟΣ	vii

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A.1 ΠΕΡΙ ΩΚΥΤΟΚΙΝΗΣ

A.1.1. Ορμόνες Της Υπόφυσης.	4
A.1.2. Ωκυτόκειος Υποδοχέας.....	6
A.1.3. Μεταβολισμός Της Ωκυτοκίνης	8
A.1.4. Σχέσεις Δομής Δράσης των Συνθετικών Αναλόγων	9
A.1.5. Διαμορφωτικά Πρότυπα Της Ωκυτοκίνης.....	19

A.2 ΠΕΠΤΙΔΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ

A.2.1 Εισαγωγή.....	23
A.2.2 Προστατευτικές Ομάδες της α-Αμινομάδας	25
A.2.2.1 Προστατευτικές Ομάδες Τύπου Ουρεθάνης	25
A.2.2.2 Αλκυλο-προστατευτικές Ομάδες.....	29
A.2.2.3 Προστατευτικές Ομάδες Παραγώγων Θείου	29
A.2.2.4 Προστατευτικές Ομάδες Ακυλο-τύπου....	30
A.2.3 Προστασία της Καρβοξυλομάδας.....	31
A.2.3.1 Μεθυλ- και Αιθυλ-εστέρες.....	31

A.2.3.2	Βενζυλεστέρες.....	31
A.2.3.3	Τριτοταγείς Βουτυλεστέρες	32
A.2.4	Προστασία των Δραστικών Πλευρικών Ομάδων...	32
A.2.4.1	Προστασία της Γουανιδινομάδας της Αργινίνης	33
A.2.4.2	Προστασία του Καρβοξαμιδίου της Ασπαραγίνης και της Γλουταμίνης.....	34
A.2.4.3	Προστασία της β- και γ-Καρβοξυλομάδας του Ασπαραγινικού και του Γλουταμινικού Οξέος	36
A.2.4.4	Προστασία του Ινδολικού Δακτυλίου της Θρυπτοφάνης	36
A.2.4.5	Προστασία του Ιμιδαζολικού Δακτυλίου της Ιστιδίνης	37
A.2.4.6	Προστασία της Σουλφυδρυλομάδας της Κυστεΐνης.....	41
A.2.4.7	Προστασία της ε-Αμινομάδας της Λυσίνης..	44
A.2.4.8	Προστασία της Θειοαιθερικής Ομάδας της Μεθειονίνης	44
A.2.4.9	Προστασία της Υδροξυλομάδας της Σερίνης και της Θρεονίνης	45
A.2.4.10	Προστασία της Υδροξυλομάδας της Τυροσίνης	45
A.2.5	Μέθοδοι Σχηματισμού του Πεπτιδικού Δεσμού	46
A.2.5.1	Μέθοδος των Αζιδίων	47
A.2.5.2	Μέθοδος των Καρβοδιμιδίων	48
A.2.5.3	Μέθοδος των Ανυδριτών	50
A.2.5.4	Μέθοδος των Ενεργών Εστέρων.....	52
A.2.5.5	Αντιδραστήρια Σύζευξης	53
A.2.5.6	Ένζυμα	56

A.2.6	Σύνθεση Πεπτιδίων σε Στερεή Φάση.....	58
A.2.6.1	Βασικές Αρχές της Μεθόδου.....	58
A.2.6.2	Το Στερεό Υπόστρωμα	58
A.2.7	Μέθοδοι Απομάκρυνσης του Πεπτιδίου από τη Ρητίνη	64
A.2.8	Κριτική της Μεθόδου Σύνθεσης Πεπτιδίων σε Στερεή Φάση	68
A.2.9	Σύγκριση Fmoc/tBu και Boc/Bzl Μεθοδολογίας Σύνθεσης	70
A.2.10	Σύνθεση Πεπτιδίων σε Στερεή Φάση υπό Συνεχή Ροή (Continuous Flow).....	72
A.2.11	Ανεπιθύμητες Αντιδράσεις κατά την Πεπτιδική Σύνθεση	73
A.2.11.1	Ρακεμίωση.....	74
A.2.11.2	Σχηματισμός Δικετοπιπεραζινών.....	76
A.2.11.3	Όξινα Καταλυόμενος Σχηματισμός Δακτυλίων	77

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B.1	Σκοπός και Αντικείμενο της Μελέτης.....	79
B.2	Στρατηγική της Σύνθεσης των Αναλόγων της Ωκυτοκίνης	82
B.3	Αποτελέσματα των Βιολογικών Δοκιμών που Έγιναν στα Νέα Ανάλογα	83
B.4	Διαμορφωτική Μελέτη των Αναλόγων G ₉ , MT _{1,9} και MT _{1,8}	84
B.4.1	Συγκριτική Μελέτη των G ₉ , MT _{1,9} και MT _{1,8}	

	Σε Διάλυμα	89
B.5	Αποτελέσματα–Συμπεράσματα	95
	B.5.1 Αποτίμηση Αποτελεσμάτων Βιολογικού	
Ελέγχου.....		95
	B.5.2 Αποτίμηση Αποτελεσμάτων Διαμορφωτικής	
	Μελέτης των G ₉ , MT _{1,9} και MT _{1,8} σε Διάλυμα	
	97

Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Γ.1	ΣΥΣΚΕΥΕΣ – ΟΡΓΑΝΑ – ΥΛΙΚΑ	99
Γ.2	ΜΕΘΟΔΟΙ.....	101
	Γ.2.1 Γενική Μέθοδος Σύζευξης με DIC/HOBt....	103
	Γ.2.2 Έλεγχος της Αντίδρασης Σύζευξης με τη	
Δοκιμή Kaiser (Kaiser Test)		103
	Γ.2.3 Μεθοδολογία NMR	104
Γ.3	ΣΥΝΘΕΣΕΙΣ.....	105
	Γ.3.1 Σύνθεση των Αναλόγων [Gly(tBu) ⁸]OT (G ₈) και	
	[Mpa ¹ ,DTyr(OEt) ² ,Gly(tBu) ⁸]OT(MT _{1,8})	105
	Γ.3.2 Σύνθεση Του Αναλόγου[Gly(tBu) ⁹]OT (G ₉)..	107
	Γ.3.3 Σύνθεση Των Αναλόγων[Mpa ¹ ,Gly(tBut) ⁹]OT	
	(MG _{1,9}) και [Mpa ¹ ,DTyr(OEt) ² ,Gly(tBut) ⁹]OT(MT _{1,9})	
	109

Δ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Δ.1	ΓΕΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	111
Δ.2	ΕΙΔΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	112

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

Οι συντμήσεις οι οποίες χρησιμοποιούνται στην παρούσα μελέτη έχουν προταθεί από την Επιτροπή Βιοχημικής Ονοματολογίας της Διεθνούς Ένωσης Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας (IUPAC) και της Διεθνούς Ένωσης Βιοχημείας (IUB). Οι προτάσεις αυτές ανακοινώθηκαν το 1972 και συμπληρώθηκαν σταδιακά μέχρι το 1989 [IUPAC–IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN), Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides, Recommendations, *Eur. J. Biochem.*, [221] (1984) 9; *J. Biol. Chem.*, [222] (1989) 663].

Τα αμινοξέα τα οποία αναγράφονται στο κείμενο είναι L–στεreoχημική διάταξης, εκτός αν χαρακτηρίζονται διαφορετικά.

Σύντμηση Πλήρης ονομασία

AA αμινοξύ	προπυλοξυκαρβονυλ ομάδα	
Ac ακετυλομάδα	tBu τριτοταγής βουτυλομάδα
AcCN ακετονιτρίλιο	Bum τριτοταγής βουτυλοξυμεθυλομά δα
AcM	ακεταμιδομεθυλο μάδα	BuOH βουτανόλη
AcOH οξικό οξύ	Bzl βενζυλομάδα
ACTH κορτικοτροπίνη	Cha κυκλοεξυλαλανίνη
Adoc αδαμαντυλοξυ- καρβονυλομάδα	CHx κυκλοεξυλομάδα
Aib α- αμινοϊσοβουτυρικό οξύ	Cle 1-αμινοκυκλοεξαν- καρβοξυλικό οξύ
All αγγειοτενσίνη II	2-Cl-Trt	2-χλωρο- τριφαινυλο-μεθυλο- ρητίνη
Ala αλανίνη	Cys κυστεΐνη
Arg αργινίνη	DCC N,N' -δικυκλο- εξυλοκαρβοδιιμίδιο
Asn ασπαραγίνη	DCM διχλωρομεθάνιο
Asp ασπαραγινικό οξύ	Dde 1-(4,4-διμεθυλο-2,6- δι-οξο- κυκλοεξυλιδεν)αιθυλ ομάδα
BHA	βενζυδρυλαμινομ άδα	Ddz α,α-διμεθυλο-3,5- διμεθοξυ- βενζυλοξυ- καρβονυλομάδα
Boc τριτοταγής βουτυλοξυκαρβονυλ ομάδα	DIC N,N' - δισοπροπυλο- καρβοδιιμίδιο
Bom	βενζυλοξυμεθυλο μάδα	DIPEA	δισοπροπυλαιθυ λαμίνη
BOP	εξαφθοροφωσφο ρικό άλας του βενζοτρίαζολυλοξυ - τρις(διμεθυλαμινο) φωσφονίου	DMA διμεθυλακεταμίδιο
Broc 2-(π-διφαινυλο)-2- ισο-		

DMAP	διμεθυλαμινοπυριδίνη	HPLC	υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
DMF διμεθυλοφορμαμίδιο	Ile ισολευκίνη
DMS διμεθυλοσουλφίδιο	Leu λευκίνη
DMSO	διμεθυλοσουλφοξείδιο	Lys λυσίνη
Dnp 2,4-δινιτρο- φαινυλομάδα	Mal μηλικό οξύ
EDT 1,2-αιθανοδιθειόλη	Mbh 4,4-διμεθυλοξυ- βενζυδρυλομάδα
EMS	αιθυλομεθυλο- σουλφίδιο	MBHA	μεθυλοβενζυδρυλ αμινο
Et αιθύλιο	Me μεθύλιο
Et ₂ O διαιθυλεθέρας	Meb 4- μεθυλοβενζυλομάδα
Et ₃ N τριαιθυλαμίνη	MeOH μεθανόλη
EtOAc οξικός αιθυλεστέρας	Met μεθειονίνη
EtOH αιθανόλη	Mmt 4- μεθοξυτριτυλομάδα
Fmoc 9-φλουορενυλο- μεθοξυκαρβονυλομάδα	Mob π- μεθοξυβενζυλομάδα
Gln γλουταμίνη	Moxan	... 2-μεθοξυ-9- υδροξανθενυλομάδα
Glu γλουταμινικό οξύ	Mpa μερκαπτο- προπιονικό οξύ
Gly γλυκίνη	Mtr 4-μεθοξυ-2,3,6- τριμεθυλοφαινυλο- σουλφονυλομάδα
Gly(tBut)	τερτ-βουτυλ- γλυκίνη	Mtt 4- μεθυλοτριτυλομάδα
His ιστοιδίνη	Neo 4,4-διμεθυλο-2- αμινοπεντανοϊκό οξύ
HOAt 1-υδροξυ-7- αζαβενζοτριαζόλιο	Nip νιπεκοτικό οξύ
HOBt 1- υδροξυβενζοτριαζόλιο	Nle νορλευκίνη
HOSu N- υδροξηλεκτριμίδιο		

Nps 2-νιτροφαινυλο- σουλφονυλομάδα	TFMSA	... τριφθορομεθανο- σουλφονικό οξύ
Orn ορνιθίνη	Thr θρεονίνη
OT ωκυτοκίνη	TLC χρωματογραφία λεπτής στιβάδας
Pam φαινυλακεταμιδο- μεθυλομάδα	Tle 3,3-διμεθυλο-2- αμινοβουτανοϊκό οξύ
Pbf 2,2,4,6,7- πενταμεθυλο- διυδροβενζοφουραν ο-5- σουλφονυλομάδα	Tmb 2,4,6-τριμεθυλο- βενζυλομάδα
Pen πενικιλαμίνη	Tmob	... 2,4,6-τριμεθοξυ- βενζυλομάδα
PG προσταγλαδίνη	TMSBr	... τριμεθυλοσιλυλο- βρωμίδιο
Phe φαινυλαλανίνη	TMSOTf	. τριμεθυλοσιλυλο- τριφθορομεθανο- σουλφονικός εστέρας
Pip πιπεκολικό οξύ	Tos 4-τολουολο- σουλφονυλομάδα ή τοζυλομάδα
Pmc 2,2,5,7,8- πενταμεθυλο- χρωμανο-6- σουλφονυλο-μάδα	Trt τριφαινυλομεθυλ ομάδα ή τριτυλομάδα
Pmp β,β- πενταμεθυλενο -β-προπιονικό οξύ	Tyr τυροσίνη
Pr προπύλιο	Tyr(OEt)	O-αιθυλ-τυροσίνη
Pro προλίνη	Tyr(OMe)	O-μεθυλ-τυροσίνη
PγBOP εξαφθοροφωσφο ρικό άλας του βενζοτριαζολυλοξυ -τρεις-πυρρολιδινο- φωσφονίου	Val βαλίνη
Sar σαρκοσίνη	Xan 9- υδροξανθενυλομάδα
Ser σερίνη	Z βενζυλοξυκαρβον υλ-ομάδα
Tacm τριμεθυλακεταμιδο- μεθυλομάδα		
TFA τριφθοροξικό οξύ		
TFE τριφθοροαιθανόλη		

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εργασία αυτή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας & Χημείας Φυσικών Προϊόντων από τον Οκτώβριο του 1999 έως τον Ιανουάριο του 2001 –στα πλαίσια της φοίτησής μου στο Τμήμα Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Πατρών– για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης.

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Παύλο Κορδοπάτη για την εμπιστοσύνη την οποία μου έδειξε, την καθοδήγηση, την αμέριστη συμπαράσταση, καθώς και για την πολύτιμη συμβολή του στη συγγραφή και τελική παρουσίαση του κειμένου.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια κα. Κική Θερμού και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Γεώργιο Πάϊρα για το ενδιαφέρον και την ηθική συμπαράστασή τους.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στη Λέκτορα κα. Βασιλική Μαγκαφά για την ανεκτίμητη βοήθεια της στο χώρο του Εργαστηρίου, καθώς και για την αμέριστη συμπαράστασή της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης τον Δόκτορα κ. Γεώργιο Α. Σπυρούλια, που είχα την τύχη να με βοηθήσει με τη διαμορφωτική μελέτη των αναλόγων μου. Και πέραν αυτού τον ευχαριστώ για την υπομονή του και τις γνώσεις που μου προσέφερε. Ακόμη, ευχαριστώ θερμά τους συναδέλφους μου στο Εργαστήριο για τη συμπαράσταση και τη βοήθεια τους.

Τέλος, ευχαριστώ τους φίλους μου για τη στήριξη που μου προσέφεραν, καθώς και όλους όσους, άμεσα ή έμμεσα, βοήθησαν στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Η εργασία αυτή αφιερώνεται στην οικογένειά μου, ως ελάχιστη τιμή και αναγνώριση της καθολικής συμπαράστασή τους σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι πρωτεΐνες, τα νουκλεϊκά οξέα και οι πολυσακχαρίτες αποτελούν τις τρεις κυριότερες κατηγορίες μακρομορίων, η παρουσία των οποίων θεωρείται απαραίτητη για την ύπαρξη κάθε μορφής ζωής. Ανάμεσα στις παραπάνω ενώσεις οι πρωτεΐνες είναι η πλέον διαδεδομένη κατηγορία μακρομορίων αφού απαντώνται όχι μόνο σε όλα τα κύτταρα, αλλά και σε κάθε μέρος του κύτταρου. Είναι χαρακτηριστικό ότι τουλάχιστον το 50% του ξηρού βάρους κάθε κυττάρου αποτελείται από πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες και τα πεπτιδία απαρτίζονται κατά κύριο λόγο από δεκαεννέα L-αμινοξέα και ένα αμινοξύ, την L-προλίνη. Ο όρος πρωτεΐνες (παράγεται από την ελληνική λέξη πρωτέας) χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1838, για μια ομάδα αζωτούχων ουσιών οι οποίες ανιχνεύθηκαν σε ιστούς φυτών και ζώων. Μέχρι την αρχή του εικοστού αιώνα η έρευνα στον καινούργιο αυτό τομέα οδήγησε στη διαπίστωση ότι οι πρωτεΐνες αποτελούνται από α-αμινοξέα ενωμένα μεταξύ τους με ομοιοπολικό δεσμό. Ο ομοιοπολικός αυτός δεσμός δεν είναι παρά ένας αμιδικός δεσμός, ο οποίος δημιουργείται μεταξύ της αμινομάδας ενός αμινοξέος και της καρβοξυλομάδας ενός άλλου, ύστερα από την αποβολή ενός μορίου ύδατος. Η επανάληψη του αμιδικού δεσμού (ευρύτερα γνωστού ως πεπτιδικού δεσμού) αποτελεί το χαρακτηριστικότερο γνώρισμα των πρωτεϊνών, αλλά και των πεπτιδίων. Σύμφωνα με την αρχική άποψη η διαφορά μεταξύ των παραπάνω ενώσεων έγκειται στο μέγεθός τους. Συγκεκριμένα όταν το μόριο

αποτελείται από λιγότερα των 50 αμινοξέων χαρακτηρίζεται ως πεπτιδίο, ενώ μακρομοριακοί σχηματισμοί με περισσότερα των 50 αμινοξέων, ως πρωτεΐνες. Σήμερα η παραπάνω θεώρηση έχει αρχίσει να εγκαταλείπεται και ως πεπτιδίο χαρακτηρίζεται οποιαδήποτε ουσία πεπτιδικής φύσεως, μπορεί να συντεθεί στο εργαστήριο με χημικό τρόπο.

Το εύρος των βιολογικών λειτουργιών στις οποίες τα πεπτιδικής φύσεως μόρια λαμβάνουν μέρος και το οποίο ως σημειωθεί ότι και μέχρι σήμερα δεν έχει οριοθετηθεί, αποτέλεσε το κίνητρο για την ανάπτυξη της **Πεπτιδικής Χημείας**.

Οι βάσεις της πεπτιδικής χημείας τέθηκαν στις αρχές του αιώνα μας από τις πρωτοποριακές εργασίες των Th. Curtius και E. Fischer, οι οποίοι εκτός από τις πολύτιμες πληροφορίες που μας προσέφεραν όσον αφορά τη σύνταξη και τη στερεοχημική διάταξη των περισσοτέρων α-αμινοξέων, κατάφεραν να συνθέσουν πεπτιδία τα οποία περιείχαν μέχρι και 19 αμινοξέα. Η σύνθεση των πεπτιδίων αυτών πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας τις μεθόδους των αζιδίων και χλωριδίων. Παρά όμως τη μεγάλη σημασία των ανακοινώσεων αυτών, για τα επόμενα εικοσιπέντε χρόνια επιτελέστηκε μικρή πρόοδος στον τομέα της πεπτιδικής σύνθεσης. Οι μόνες αναφορές που είχαν κάποιο ενδιαφέρον προήλθαν από τον E. Abderhalden και είχαν ως αντικείμενο την απομόνωση και την παρουσίαση νέων μορίων πεπτιδικής φύσεως, χωρίς όμως να αναφέρονται οι συνθετικές διαδικασίες.

Η εισαγωγή της καρβοβενζοξυ-ομάδας (Cbz ή Z) από τους Bergmann και Ζέρβα το 1932 αποτέλεσε σταθμό για την εξέλιξη της σύγχρονης Πεπτιδικής Χημείας, ανοίγοντας το δρόμο για τη χρησιμοποίηση αμινοξέων με δραστικές πλευρικές ομάδες [1]. Η σχετικά

απλή διαδικασία με την οποία εισάγεται η Z-ομάδα και ο ήπιος τρόπος απομάκρυνσής της σε συνδυασμό με τη σταθερότητα που επιδεικνύει στις συνθήκες στις οποίες πραγματοποιούνται οι αντιδράσεις σύζευξης την καθιστούν ακόμα και σήμερα μια σημαντική προστατευτική ομάδα. Σχεδόν αμέσως μετά την παρουσίαση της Z-ομάδας πραγματοποιήθηκε η σύνθεση δύο μικρών πεπτιδίων, της καρνοσίνης [2] και της γλουταθειόνης [3].

Το 1963 παρουσιάστηκε από τον R.B. Merrifield η μέθοδος σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση (Solid Phase Peptide Synthesis), η οποία τροποποίησε ριζικά την ισχύουσα τάξη πραγμάτων [4]. Με την εφαρμογή της μεθόδου αυτής κατέστη δυνατή η σύνθεση μεγάλου αριθμού πεπτιδίων σε σύντομο χρονικό διάστημα με σχετικά απλές διαδικασίες χαμηλού κόστους.

Δε θεωρείται υπερβολή ο ισχυρισμός ότι το μεγαλύτερο μέρος των γνώσεων για τον τρόπο δράσης των πεπτιδίων αποκτήθηκε μετά την εισαγωγή της μεθόδου σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση. Για τη συνεισφορά του αυτή στην πρόοδο της επιστήμης, ο Merrifield τιμήθηκε το 1984 με το βραβείο Nobel Χημείας.

Τα τελευταία εικοσιπέντε χρόνια η ανάπτυξη της Πεπτιδικής Χημείας πραγματοποιείται πλέον με ρυθμούς γεωμετρικής προόδου. Οι συνεχείς βελτιώσεις στο χώρο των χρησιμοποιούμενων μεθόδων σύνθεσης σε συνδυασμό με την εφαρμογή σύγχρονων μεθόδων προσδιορισμού της δομής και της διαμόρφωσης πεπτιδίων και πρωτεϊνών επέτρεψαν τη χρησιμοποίηση ενός σημαντικού αριθμού συνθετικών πεπτιδίων στους τομείς της βιολογίας και της ιατρικής. Ταυτόχρονα η συμβολή των μεθόδων μοριακής βιολογίας και της ασύμμετρης σύνθεσης καθιστά δυνατή την ερευνητική προσέγγιση

επιστημονικών πεδίων όπως, ο σχεδιασμός φαρμάκων, η χημειοθεραπεία, η μοριακή ανοσολογία κ.ά. Ειδικότερα τα συνθετικά πεπτίδια βρίσκουν σήμερα εφαρμογή στη ρύθμιση της αναπαραγωγής και της ανάπτυξης, στον έλεγχο του πόνου, στην αντιμετώπιση του καρκίνου και των αυτοάνοσων νοσημάτων, στη θεραπευτική αντιμετώπιση καρδιαγγειακών παθήσεων και ασθενειών του συνδετικού ιστού, ανωμαλιών του πεπτικού συστήματος, αλλά και ως αντιβιοτικά έναντι παθογόνων βακτηρίων. Έτσι συνθετικά πεπτίδια, όπως η ωκυτοκίνη, η βασοπρεσίνη, η ACTH, η καλσιτονίνη, η σεκρετίνη, η σωματοστατίνη, η κυκλοσπορίνη, η ινσουλίνη, η GnRH, η πενταγαστρίνη και πλήθος αναλόγων τους βρίσκονται ήδη σε κλινική εφαρμογή. Πέραν αυτών οι αντιγονικές και ανοσολογικές χρήσεις των πεπτιδίων, η δράση τους ως νευροδιαβιβαστές και αναστολείς ενζύμων και η συμβολή τους στον προσδιορισμό υποδοχέων μέσω της μελέτης των σχέσεων δομής δραστηριότητας δείχνουν ότι η φύση έχει "ανακαλύψει" τη δυνατότητα ελέγχου όλων σχεδόν των βιολογικών διεργασιών μέσω μοριακής αναγνώρισης διαφόρων τύπων. Τα πεπτίδια αποτελούν ίσως τα καταλληλότερα μέσα μοριακής αναγνώρισης τα οποία διαθέτει η φύση. Ολοκληρώνοντας τον πρόλογο αυτό, θα πρέπει να υπογραμμισθεί ότι τα συνθετικά πεπτίδια έχουν τις δυνατότητες να αποτελέσουν τη σημαντικότερη και πολυπληθέστερη κατηγορία φαρμάκων του μέλλοντος. Ως εκ τούτου το πεδίο της πεπτιδικής σύνθεσης και της εφαρμογής των πεπτιδίων έχει να παρουσιάσει και στο μέλλον σημαντικά επιτεύγματα.

A.1. Περί Ωκυτοκίνης

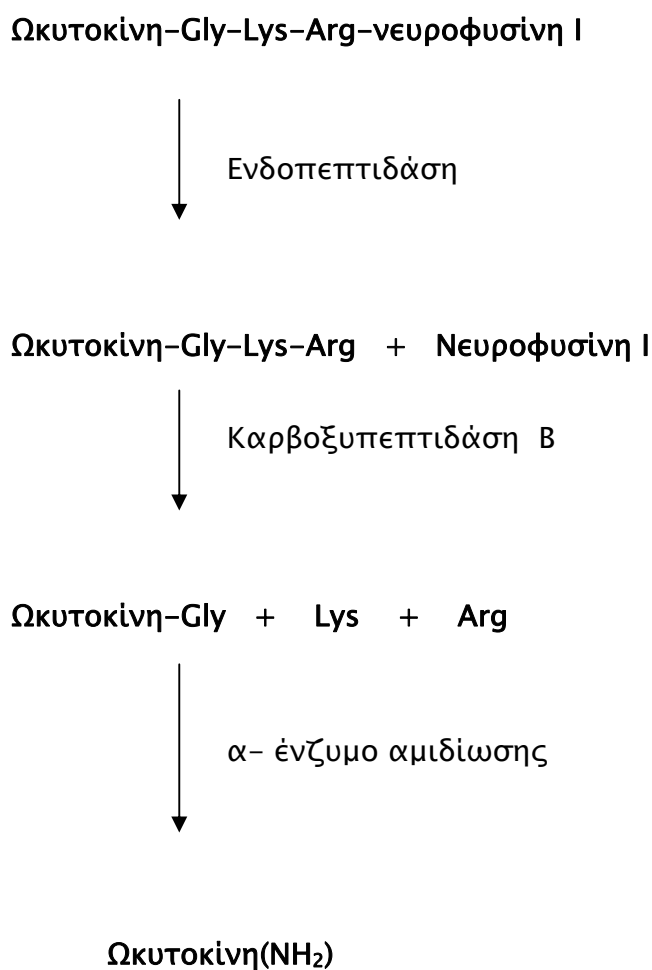
A.1.1. Ορμόνες της υπόφυσης

Η υπόφυση είναι ένας μικρός ωοειδής αδένας στη βάση του εγκεφάλου, ανατομικά, η υπόφυση, διαιρείται σε τρεις λοβούς: τον πρόσθιο, τον οπίσθιο και τον ενδιάμεσο. Όλοι, και ιδιαίτερα ο πρόσθιος, παράγουν ορμόνες, που οι περισσότερες των οποίων ελέγχουν την παραγωγή ορμονών σε άλλους ενδοκρινείς αδένες. Στον οπίσθιο λοβό της υπόφυσης, που καλείται και νευροπόφυση, παράγονται δύο ορμόνες η βασοπρεσίνη και η ωκυτοκίνη. Και οι δύο ορμόνες είναι κυκλικά εννεαπεπτιδία. Αυτού του είδους οι ορμόνες ονομάζονται και πεπτιδορμόνες. Οι πεπτιδικές ορμόνες, οι νευροδιαβιβαστές και οι ιικές πρωτεΐνες γενικά συντίθενται μέσα στα κύτταρα ως ανενεργές προμορφές μεγάλου μοριακού βάρους.

Οι βιοενεργές μορφές απελευθερώνονται μετά από μετα-μεταγραφική ενεργοποίηση, μέσω ειδικών πρωτεασών [5]. Όσον αφορά την ωκυτοκίνη το πρόδρομο μόριο της είναι γνωστό ως προ-ωκυτοκίνη-νευροφυσίνη (pro-OT/Np).

Το μεταγραφικό προϊόν του γονιδίου της ωκυτοκίνης είναι ένα μεγάλο πεπτιδίο, που περιέχει την αλληλουχία της ορμόνης και της νευροφυσίνης I. Αυτά τα δύο πεπτιδία συνδέονται με το τριπεπτιδίο Gly-Lys-Arg.

Στο σχήμα που ακολουθεί δίνεται μια σχηματική παράσταση της διαδικασίας κατά την οποία η βιοενεργή μορφή της ωκυτοκίνης απελευθερώνεται από το προμόριο [6], με τη βοήθεια συγκεκριμένων ενζύμων.



Σχημα.Α.1. Μεταγραφικά προϊόντα από την κωδικοποίηση του *m-RNA* της ωκυτοκίνης.

Η ωκυτοκίνη [κύκλο (Cys¹-Tyr²-Ile³-Gln⁴-Asn⁵-Cys⁶)-Pro⁷-Leu⁸-Gly⁹-NH₂](ΟΤ) παρουσιάζει ευρύ φάσμα βιολογικών ιδιοτήτων, όπως ωκυτόκειο και αντιδιουρητική δράση, δράση επί της έκθλιψης του γάλακτος, κατασταλτική δράση επί της πίεσης του αίματος των πτηνών,

δράση επί της σεξουαλικής συμπεριφοράς, ενώ προσφάτως βρέθηκε ότι επιφέρει αναστολή της ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων του μαστού [7]. Η ωκυτοκίνη έχει ευρέως μελετηθεί από τη δεκαετία του 1950 και είναι η πρώτη ορμόνη πεπτιδικής φύσεως της οποίας η χημική της δομή αποσαφηνίστηκε και αποδείχτηκε με ολική σύνθεση από τον Du Vigneaud και τους συνεργάτες του το 1953 [8]. Για το λόγο αυτό ο Du Vigneaud πήρε το βραβείο Νόμπελ το 1955.

Ο ιδιαίτερος ρόλος τον οποίο διαδραματίζει το εννεαπεπτίδιο της ωκυτοκίνης στη διαδικασία του τοκετού έχει προσελκύσει το έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον, με σκοπό τη σύνθεση ανταγωνιστών της ωκυτοκίνης για την αντιμετώπιση του πρόωρου τοκετού.

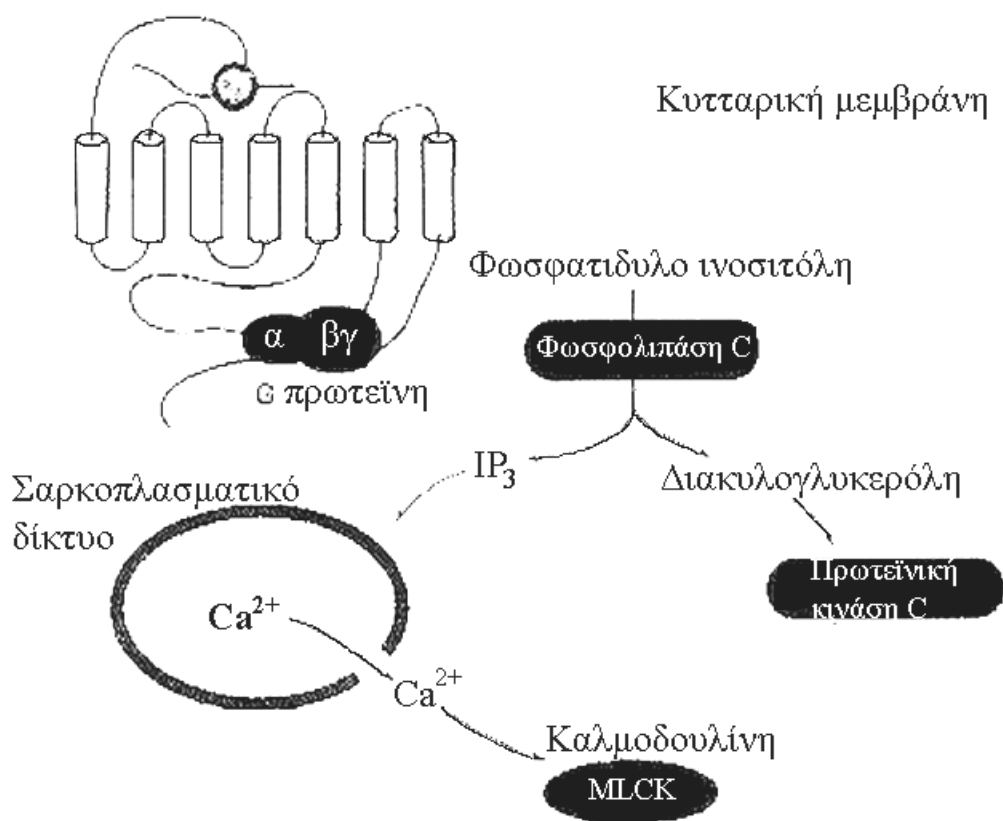
A.1.2. Ωκυτόκειος Υποδοχέας

Ο υποδοχέας της ωκυτοκίνης (OTR) και οι υποδοχείς της βασοπρεσίνης (V_{1a} , V_2) ανήκουν σε μια υποκατηγορία υποδοχέων της κατηγορίας των G-πρωτεϊνικών υποδοχέων. Ο OTR υποδοχέας παρουσιάζει μεγάλη δομική ομοιότητα με τους υποδοχείς V_{1a} και V_2 . Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα ένας ανταγωνιστής της ωκυτοκίνης να δρα συνήθως και ως ανταγωνιστής της βασοπρεσίνης στον V_{1a} (κυρίως) και στον V_2 (λιγότερο) υποδοχέα [9].

Η σύνθεση του OTR ενεργοποιείται από τα οιστρογόνα, ενώ αναστέλλεται από την προγεστερόνη. Επίσης υπάρχει μια ανάδρομη σχέση μεταξύ του OTR και των προσταγλανδινών (PG). Οι PG ενεργοποιούν την σύνθεση του OTR, ο οποίος με την σειρά του ενεργοποιεί την σύνθεση των PG. [6]

Σημαντικό ρόλο στην κατανόηση της δραστηριότητας ενός ανταγωνιστή της ωκυτοκίνης παίζει το γεγονός ότι οι υποδοχείς της

υπάρχουν τόσο στο μυομήτριο όσο και στο ενδομήτριο. Έτσι στο ανθρώπινο μυομήτριο το σύμπλοκο OT-υποδοχέα οδηγεί σε συσπάσεις της μήτρας μέσω ενδοκυτταρικής απελευθέρωσης ιόντων ασβεστίου (σχήμα A.1), ενώ στο ενδομήτριο η αλληλεπίδραση της OT με τον υποδοχέα της οδηγεί στην παραγωγή προσταγλανδινών, κυρίως $PGF_{2\alpha}$, οι οποίες αυξάνουν την ευαισθησία της μήτρας στην ωκυτοκίνη [6,10]. Επομένως ένας ανταγωνιστής της ωκυτοκίνης πρέπει να αλληλεπιδρά, τόσο με τον υποδοχέα ο οποίος βρίσκεται στο μυομήτριο, όσο και με εκείνον υποδοχέα του ενδομητρίου.



Σχήμα A.2. Μηχανισμός μεταγωγής σήματος για τον υποδοχέα της ωκυτοκίνης ο οποίος βρίσκεται στο μυομήτριο. Ο υποδοχέας αυτός συνδέεται διαμέσου της G πρωτεΐνης με την φωσφολιπάση C. Μετά την ενεργοποίηση του υποδοχέα από την ωκυτοκίνη η α -υπομονάδα της ετεροτριμερούς G πρωτεΐνης υδρολύει την GTP σε GDP και ελευθερώνει

την βγ-υπομονάδα η οποία με την σειρά της ενεργοποιεί την φωσφολιπάση C. Αυτό το ένζυμο μετατρέπει τη φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη σε διακυλογλυκερόλη και 1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP_3). Η IP_3 ενεργοποιεί την ροή των ιόντων Ca^{2+} από το σαρκοπλασματικό δίκτυο (κυρίως) αλλά και από τον εξωκυττάριο χώρο, προς το κυτταρόπλασμα διαμέσου των καναλιών ασβεστίου.

Η αύξηση των ιόντων Ca^{2+} σε συνδυασμό με την καλμοδουλίνη ενεργοποιεί την ελαφριά αλυσίδα της κινάσης της μυοσίνης (MLCK) η οποία προκαλεί συσπάσεις στο μυομήτριο, ενώ στο ενδομήτριο λαμβάνει χώρα σύνθεση και απελευθέρωση προσταγλανδινών [10].

A.1.3. Μεταβολισμός της Ωκυτοκίνης

Έχει αποδειχθεί ότι ο ορός του αίματος εγκύων γυναικών έχει την ικανότητα να μεταβολίζει την ωκυτοκίνη. Οι Hooper και Jessup το 1959 [11] απέδειξαν την παρουσία της «ωκυτοκινάσης», η οποία δρα κυρίως στο κυτταρόπλασμα του πλακούντα. Η δράση της διακρίνεται από εκείνη της βασοπρεσινάσης, η οποία εντοπίζεται σε διαφορετικά υποκυτταρικά σωματίδια. Ο ρυθμός καταβολισμού της ωκυτοκίνης τετραπλασιάζεται κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης και είναι ανεξάρτητος από τη συγκέντρωση της ωκυτοκίνης στο πλάσμα, ενώ είναι πιθανόν να εξαρτάται από τη συγκέντρωση της ωκυτοκινάσης στο πλάσμα, η οποία

είναι γνωστό ότι αυξάνεται προοδευτικά κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης. Ανωμαλίες στην ωκυτοκινάση του ορού έχει προταθεί ότι ενέχονται σε μηχανισμούς πρόκλησης πρόωρου τοκετού και προεκλαμψίας χωρίς κάτι τέτοιο να έχει αποδειχτεί.

Στους εσωτερικούς ιστούς της μήτρας η ωκυτοκίνη μεταβολίζεται (με τον ίδιο τρόπο που μεταβολίζεται στον πλακούντα), μέσω δύο οδών.

α) Την οδό της αμινοπεπτιδάσης της κυστεΐνης, η δράση της οποίας έχει ως αποτέλεσμα το άνοιγμα του 20μελούς δισουλφιδικού δακτυλίου της ωκυτοκίνης (ο οποίος είναι ουσιαστικά υπεύθυνος για την εμφάνιση βιολογικής δράσης) ανάμεσα στη θέση 1 της Cys και στη θέση 2 της Tyr. Στη συνέχεια επέρχεται διαδοχική απόσπαση των αμινοξέων, από το N-τελικό άκρο.[12]

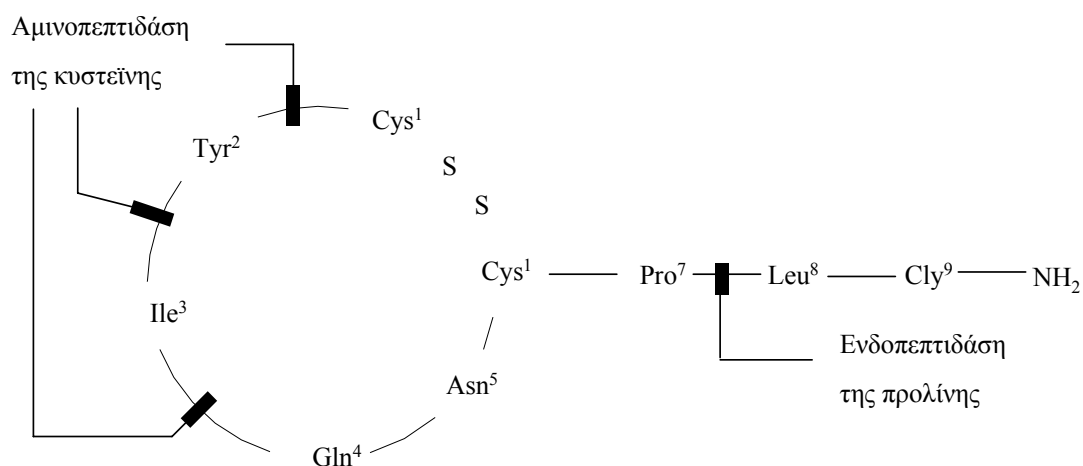
β) την οδό της ενδοπεπτιδάσης της προλίνης, η δράση της οποίας επιφέρει την διάσπαση της ωκυτοκίνης ανάμεσα στην Pro που βρίσκεται στη θέση 7 και στην Leu που βρίσκεται στη θέση 8.

Γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την απόσπαση του C-τελικού διπεπτιδίου (λευκινυλογλυκιναμιδίου) σχήμα Α.3.

Έχει επίσης προταθεί ότι ο καταβολισμός της ωκυτοκίνης μπορεί να πραγματοποιηθεί με την δράση της καρβοξυπεπτιδάσης, η οποία αποσπά αμινοξέα από το C-τελικό άκρο, καθώς επίσης και με την ενζυματική διάσπαση του δισουλφιδικού δεσμού. Κάτι τέτοιο όμως δεν φαίνεται ιδιαίτερα πιθανό.

Μελέτες που έγιναν στο εσωτερικό ιστών της μήτρας τόσο σε ανθρώπους όσο και σε επίμυες οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι ο

καταβολισμός της ωκυτοκίνης σε αυτούς τους ιστούς ελαττώνεται πριν τον τοκετό με αποτέλεσμα μια σημαντική αύξηση της συγκέντρωσής της [6].



Σχήμα Α.3. Μεταβολισμός της ωκυτοκίνης

Α.1.4. Σχέσεις Δομής - Δράσης Συνθετικών Αναλόγων της Ωκυτοκίνης.

Η μελέτη των σχέσεων δομής δράσης σειράς αναλόγων της ωκυτοκίνης, έχει ως στόχο την κατανόηση του τρόπου αλληλεπίδρασης της ορμόνης με τον υποδοχέα της. Η κατανόηση της αλληλεπίδρασης αυτής θα οδηγήσει σε ανάλογα με ενισχυμένες αγωνιστικές και ανταγωνιστικές ιδιότητες, τα οποία θα δρουν εκλεκτικά στον ωκυτόκειο υποδοχέα (OTR) χωρίς να δρουν ταυτόχρονα και στους υποδοχείς (V_{1a}, V₂) της βασοπρεσίνης. Η εισαγωγή του β-μερκαπτοπροπιονικού οξέος (Mpa) στην θέση 1, οδηγεί σε ανάλογα με αυξημένες αγωνιστικές ή

ανταγωνιστικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα το ανάλογο [Mpa₁]OT εμφανίζει αυξημένες αγωνιστικές ιδιότητες (803±36 IU/mg).

Ισχυρότεροι ακόμη ανταγωνιστές παρασκευάζονται με εισαγωγή στην ίδια θέση αμινοξέων που περιέχουν ογκώδεις ομάδες στον β άνθρακα, γεγονός που πιθανόν να οφείλεται στον περιορισμό της διαμορφωτικής ελευθερίας του 20μελούς δισουλφιδικού δακτυλίου.

Τα ανάλογα [1-β-Mpa(β-Me₂)]OT ([dPen¹]OT), [1-β-Mpa(β-Et₂)]OT, [1-β-Mpa(β-CH₂)₃]OT, εμφανίζουν ανταγωνιστική δράση με τιμές pA₂ 6,94, 7,24 και 7,43 αντίστοιχα [13]. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η εισαγωγή στη θέση 1 αμινοξέων, των οποίων η N^α -αμινομάδα έχει απομακρυνθεί οδηγεί σε ανάλογα με παρατεταμένη δράση [14].

Με την εισαγωγή στην θέση 2 ενός D-αρωματικού αμινοξέος, ιδιαίτερα εάν αυτό χαρακτηρίζεται από έλλειψη ελεύθερου φαινολικού υδροξυλίου οδηγεί σε ανάλογα με αυξημένες ανταγωνιστικές ιδιότητες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα ανάλογα [L-Phe²]OT και [D-Phe²]OT. Ενώ το L-ανάλογο εμφανίζει ασθενή αγωνιστική δράση (22.2IU/mg) το D-ανάλογο εμφανίζεται ως μέτριος ανταγωνιστής με pA₂=7,3 [15]. Το γεγονός αυτό οφείλεται, μάλλον στον διαφορετικό, προσανατολισμό, της πλευρικής αλυσίδας του D-αρωματικού αμινοξέος στην θέση 2, ο οποίος πιθανόν οδηγεί σε αύξηση της τάσης για δημιουργία β-στροφής στην θέση 3.

Η εισαγωγή της Phe στη θέση 3 έχει οδηγήσει σε ανάλογα με αυξημένες ανταγωνιστικές ιδιότητες, ιδιαίτερα όταν συνδυάζεται με την εισαγωγή στην θέση 8 της Arg [16]. Όμως τα ανάλογα αυτά δεν είναι καθόλου εκλεκτικά αφού συνήθως εμφανίζουν ισχυρή ανταγωνιστική δράση στους V_{1a} και V₂ υποδοχείς της βασοπρεσίνης γεγονός αναπόφευκτο αφού τόσο η Phe 3 όσο και η Arg 8 απαντώνται στο φυσικό

μόριο της βασοπρεσίνης. Επίσης έχει γίνει υποκατάσταση με Aib ,τα ανάλογα αυτά συντέθηκαν στο εργαστήριό μας, ([Aib³]OT) και τα ανάλογα αυτά είναι ασθενείς ανταγωνιστές[223].

Σύγκριση των διαμορφώσεων χαμηλής ενέργειας, του μη πεπτιδικού ανταγωνιστή L-366,509 ($pA_2=7,3$) με τον δικυκλικό ανταγωνιστή [dPen¹]OT-BC έδειξε ότι υπάρχει πλήρης ταύτιση (αλληλεπικάλυψη) της Ile 3 του δικυκλικού αναλόγου με το τμήμα της καμφοράς του L-366,509. Το γεγονός αυτό δείχνει πόσο σημαντική είναι η Ile 3 για τη σύνδεση του αναλόγου με τον υποδοχέα, και την εμφάνιση ανταγωνιστικής δράσης.[17]

Έχουν παρασκευασθεί πολλά ανάλογα της ωκυτοκίνης με αλλαγές στη θέση 4. Τα πιο ενδιαφέροντα ανάλογα έχουν προκύψει με εισαγωγή στην θέση αυτή της Thr. Εισαγωγή της Thr στην θέση 4 της φυσικής ορμόνης οδηγεί στο ανάλογο [Thr⁴]OT το οποίο εμφανίζει πολύ ισχυρότερη αγωνιστική δράση (920 IU/mg) εισαγωγή όμως της Thr στην θέση 4 του αναλόγου [Pen¹]OT με $pA_2=6,77$ οδηγεί στο ανάλογο [Pen¹,Thr⁴]OT το οποίο εμφανίζει ισχυρότερη ανταγωνιστική δράση με $pA_2=7,55$ [18]. Το Atosiban [Mpa¹, DTyr(Et)², Thr⁴,Orn⁸]OT με $pA_2=8,29$ είναι το μόνο ανάλογο που έχει δοκιμαστεί κλινικά.[19] Επίσης το ανάλογο [Mpa¹, Tyr(Et)², Thr⁴, Orn⁸]OT με $pA_2=8,9\pm 0,6$ είναι από τα ισχυρότερα ανάλογα που έχουν συντεθεί [20]. Γενικά η εισαγωγή της Thr στην θέση 4 οδηγεί σε ανάλογα με αυξημένες αγωνιστικές ιδιότητες, ή σε ανάλογα που διατηρούν σε μεγάλο βαθμό της ανταγωνιστικές τους ιδιότητες. Φαίνεται ότι η αντικατάσταση της Gln από Thr διατηρεί τον υδρόφιλο χαρακτήρα της πλευρικής αλυσίδας, ο οποίος πιθανόν να είναι σημαντικός για την σύζευξη των αναλόγων με τον υποδοχέα ενώ

συντελεί στην δημιουργία μιας διαμόρφωσης η οποία αντιτίθεται στην εμφάνιση βιολογικής δράσης.

Υποκατάσταση της Asn στη θέση 5 από οποιοδήποτε αμινοξύ οδηγεί είτε σε ανάλογα με αρκετά μειωμένη αγωνιστική δράση, είτε σε ανάλογα με ασθενή ανταγωνιστική δράση. Το γεγονός αυτό διαπιστώνεται από παρατήρηση του πίνακα A.1 όπου παρουσιάζεται η ωκυτόκειος δράση in vitro της ωκυτοκίνης και ορισμένων συνθετικών αναλόγων της [21].

Πίνακας A.1. Ωκυτόκειος δράση ορισμένων συνθετικών αναλόγων της OT.

	Ανάλογα	Ωκυτόκειος Δράση in vitro (IU\mg)
1.	OT	546
2.	[Ser ⁵]OT	0,7
3.	[Thr ⁵]OT	0,45
4.	[Orn ⁵]OT	42
5.	[Thr(OMe) ⁵ ,Orn ⁵]OT	0,1
6.	[Thr(OMe) ⁵]OT	5,80±0,1
7.	[Ser (OMe) ⁵]OT	5,70±0,1
8.	[Pen ¹ , D-Phe ² , Thr ⁴ , Orn ⁸]OT	7,23±0,07
9.	[Pen ¹ , D-Phe ² , Thr ⁴ , Thr ⁵ , Orn ⁸]OT	7,16±0,03
10.	[Pen ¹ , D-Phe ² , Thr ⁴ , Leu ⁵ , Orn ⁸]OT	6,67±0,04
11.	[Pen ¹ , D-Phe ² , Thr ⁴ , Asp ⁵ , Orn ⁸]OT	7,21±0,06
12.	[Pen ¹ , D-Phe ² , Thr ⁴ , Tyr ⁵ , Orn ⁸]OT	6,76±0,06

Ισοστερική υποκατάσταση της Asn στη θέση 5 σε διάφορους ανταγωνιστές της OT, οδηγεί σε υψηλής εκλεκτικότητας ανταγωνιστές οι οποίοι διατηρούν την ανταγωνιστική τους ισχύ σε μεγάλο βαθμό. Παρόλα αυτά η υποκατάσταση στη θέση αυτή, δεν φαίνεται από τα ως τώρα βιολογικά αποτελέσματα διαφόρων συνθετικών αναλόγων της OT να οδηγεί σε ιδιαίτερα ισχυρούς ανταγωνιστές. Από τα παραπάνω βιολογικά αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον πίνακα Α.1, γίνεται αντιληπτό ότι η διατήρηση της Asn στη θέση 5 των αναλόγων της ωκυτοκίνης, είναι σημαντική τόσο για την εκδήλωση αγωνιστικής όσο και για την εκδήλωση ανταγωνιστικής δράσης, γεγονός που σχετίζεται με τον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει η Asn5 κατά τη σύζευξη της ωκυτοκίνης και των αναλόγων της, με τον υποδοχέα της.

Στο ανάλογο [Pmp¹, D-Trp², Arg⁸]OT (Pmp=β,β-πενταμεθυλενο - β-μερκαπτο-προπιονικό οξύ) το οποίο είναι ένας δραστικός ανταγωνιστής ($pA_2=7,77$) της ωκυτοκίνης, έγινε αντικατάσταση ενός αμινοξέος κάθε φορά στις θέσεις 3-8 από ένα D-αρωματικό αμινοξύ. Τα νέα ανάλογα που προέκυψαν εμφάνισαν ασθενέστερη ανταγωνιστική δράση. Εξαιρέση αποτέλεσαν τα ανάλογα με D-Phe στη θέση 6 ($pA_2=7,98$), D-Pro στη θέση 7 ($pA_2=7,85$), D-Arg στη θέση 8 ($pA_2=7,91$) που εμφάνισαν λίγο μεγαλύτερη ανταγωνιστική ισχύ καθώς και το ανάλογο με D-Cys στην θέση 6 το οποίο αύξησε την ανταγωνιστική του ισχύ πάνω από τρεις φορές ($pA_2=8,29$). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν την άποψη κατά την οποία εισαγωγή της D-Cys στην θέση 6 της ωκυτοκίνης προκαλεί την προς τα πίσω αναδίπλωση του C-τελικού τριπεπτιδίου σε σχέση με τον 20μελή δισουλφιδικό δακτύλιο,

γεγονός που πιθανόν επιφέρει την σταθεροποίηση ενεργών ανταγωνιστικών διαμορφώσεων [22].

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η Pro καταλαμβάνει στη θέση 7 όλων των ορμονών της νευροϋποφύσεως. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην διαμόρφωση του μορίου της ωκυτοκίνης, αφού αποτελεί σύμφωνα με τα περισσότερα διαμορφωτικά πρότυπα ένα από τα 4 αμινοξέα, τα οποία συμμετέχουν στις δύο β-στροφές του μορίου .

Εισαγωγή στην θέση 7 της φυσικής ορμόνης L-3,4 δευδροπρόλινης , οδηγεί στο ανάλογο [Δ^3 -Pro⁷]OT (1071 IU/mg) το οποίο είναι πολύ ισχυρός αγωνιστής. Η μεγάλη συγγένεια που παρουσιάζει η ακόρεστη πλευρική αλυσίδα στην θέση 7 του αναλόγου με τον ωκυτόκειο υποδοχέα πιθανόν να οφείλεται σε μεταξύ τους π-π ηλεκτρονικές αλληλεπιδράσεις. Όσον αφορά την ανταγωνιστική δράση των αναλόγων της ωκυτοκίνης που περιέχουν στην θέση 7 Δ^3 -Pro⁷ δεν υπάρχουν ξεκάθαρα συμπεράσματα. Εισαγωγή της Δ^3 -Pro⁷ στην θέση 7 του αναλόγου [Pen¹]OT οδηγεί στο ανάλογο [Pen¹, Δ^3 -Pro⁷]OT το οποίο έχει αυξημένες ανταγωνιστικές ιδιότητες ενώ η εισαγωγή της Δ^3 -Pro⁷ στην ίδια θέση στα ανάλογα [Pen¹, Thr⁴]OT, [Pen¹, Phe², Thr⁴]OT οδηγεί σε ανάλογα που εμφανίζουν μειωμένη ανταγωνιστική δράση.[23]

Εισαγωγή της Sar στην θέση 7 σε ανάλογα τα οποία εμφανίζουν έντονη ανταγωνιστική δράση οδηγεί σε νέα ανάλογα με παραπλήσια η ελαφρά μειωμένη ανταγωνιστική δράση [24]. Στο εργαστήριό μας ήδη έχει πραγματοποιηθεί η σύνθεση αναλόγων με α - αμινοϊσοβουτυρικό οξύ στη θέση 7. Έχει αποδειχθεί από θεωρητικές μελέτες ότι τα πεπτίδια περιέχουν α,α -διαλκυλαμινο-αμινοξέα εμφανίζουν περιορισμένη διαμορφωτική ελευθερία [25]. Η χρησιμοποίηση του α -αμινοϊσοβουτυρικού οξέος σε μελέτες διαμορφωτικής ανάλυσης μπορεί

να δημιουργήσει ιδιαίτερα ελκυστικά πρότυπα. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι το συγκεκριμένο αμινοξύ είναι σε θέση να περιορίσει κατά πολύ τις δυνατές στερεοχημικές διαμορφώσεις ενός πεπτιδίου ελαττώνοντας έτσι τα προβλήματα τα οποία οφείλονται στην ύπαρξη δομών παραπλήσιες ενέργειες. Μελέτες NMR έχουν δείξει ότι το α -αμινοϊσοβουτυρικό οξύ είναι υπεύθυνο για την έναρξη δημιουργίας διαμόρφωσης τύπου β -στροφής, η οποία σταθεροποιείται με ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου. Ήδη έχει εξεταστεί η επίδραση την οποία έχει η εισαγωγή του α -αμινοϊσοβουτυρικού οξέος στις θέσεις 1 και 7 στο μόριο της Αγγειοτενσίνης II από τον Κορδοπάτη και τους συνεργάτες του [26].

Μέχρι σήμερα έχουν συντεθεί αρκετά ανάλογα της ωκυτοκίνης με Arg στη θέση 8, τα περισσότερα από τα οποία εμφανίζουν πολύ ισχυρή ανταγωνιστική δράση. Δυστυχώς όμως τα ανάλογα αυτά χαρακτηρίζονται από έλλειψη εκλεκτικότητας, εμφανίζουν δηλαδή παραπλήσια ανταγωνιστική δράση και στους υποδοχείς V_{1a} (κυρίως) και V_2 της βασοπρεσίνης. Το γεγονός αυτό ως ένα σημείο είναι αναμενόμενο, αφού η Arg στη θέση 8, είναι πολύ σημαντική για τη σύζευξη της βασοπρεσίνης με τους υποδοχείς της [27]. Το ανάλογο d[Pen¹, Tyr(Me)², Arg⁸]OT είναι ένας από τους πιο ισχυρούς ανταγωνιστές της ωκυτοκίνης που έχουν συντεθεί μέχρι σήμερα (pA₂=9,12) είναι όμως και ισχυρός

ανταγωνιστής της βασοπρεσίνης στον V_{1a} υποδοχέα της ($pA_2=8,43$). Η αντικατάσταση της Arg στη θέση 8 από την Orn οδηγεί σε ελαφρώς ασθενέστερους ανταγωνιστές, αλλά σαφώς πιο εκλεκτικούς.

Στον πίνακα A.2 παρουσιάζονται τα βιολογικά αποτελέσματα ορισμένων συνθετικών αναλόγων της ωκυτοκίνης, τα οποία υποστηρίζουν τους παραπάνω ισχυρισμούς.

Πίνακας A.2. *Μερικές φαρμακολογικές ιδιότητες μη εκλεκτικών ανταγωνιστών της ωκυτοκίνης.*

	Ανάλογα	Ωκυτόκειος δράση In vitro (pA_2)	Αγγειοδιασταλτική δράση (pA_2)
1	[Pmp ¹ , Tyr(Me) ² , Phe ³ , Arg ⁸]OT	8,13±0,12	8,62±0,03
2	[Pmp ¹ , D- Tyr(Me) ² , Phe ³ , Arg ⁸]OT	7,87±0,11	8,27±0,02
3	[Pmp ¹ , Tyr(Me) ² , Phe ³ , Val ⁴ , Arg ⁸]OT	8,36±0,13	8,32±0,08
4	[Pmp ¹ , D-Tyr(Et) ² , Val ⁴ , Arg ⁸]OT	8,32±0,10	8,22±0,12
5	[Pmp ¹ , Tyr(Me) ² , Arg ⁸]OT	8,72±0,16	7,80±0,09
6	d[Pmp ¹ , Tyr(Me) ² , Arg ⁸]OT	9,12±0,09	8,45±0,05
7	[Pmp ¹ , Tyr(Me) ² , Orn ⁸]OT	8,52±0,10	7,96±0,10
8	[Pmp ¹ , Tyr(Me) ² , Thr ⁴ , Orn ⁸]OT	8,02±0,09	6,85±0,07
9	[Pmp ¹ , Tyr(Me) ² , Thr ⁴ , Orn ⁸ , Leu-NH ₂]OT	7,78±0,10	6,39±0,03

Η Leu της θέσης 8 έχει επίσης αντικατασταθεί και με μη κωδικοποιημένα αμινοξέα, όπως είναι τα: neopentylglycine, tert-leucine,

cycloleucine και N-methylleucine. Οι ιδιότητες των αναλόγων αυτών αναφέρονται στον πίνακα που ακολουθεί

Πίνακας Α.3. Βιολογικές ιδιότητες (I.U./mg) ανάλογων ωκυτοκίνης στη θέση 8, με μη κωδικοποιημένα αμινοξέα.

<i>Ανάλογα</i>	Ωκυτόκειως δράση in vitro (IU/mg)	Ωκυτόκειως δράση in vivo (IU/mg)	Γαλακτογωγική ή δράση in vivo (IU/mg)	<i>Πίεση</i> (IU/mg)
Ωκυτοκίνη	450	450	450	5
[8-Neo]OT	61.5	87.6	52.9	0.15
[8-Cle]OT	149	421	368	~0.5
[8-t-Leu]OT	45	38.5	508	2.7
[8-Met-Leu]OT	45	17.2	46	0.2

Οι δομικές μετατροπές στη θέση 8 της ωκυτοκίνης, χωρίς να γίνει κάποια αλλαγή σε άλλη θέση, δεν επηρεάζουν τις βιολογικές ιδιότητες του μορίου τόσο δραματικά [28]. Συνήθως παρουσιάζουν αυξημένη δράση όσον αφορά τη σύσπαση της μήτρας παρά τη πρόκληση γαλακτόρροιας. Όπως μπορούμε να δούμε και στον παραπάνω πίνακα το ανάλογο με την t-Leu, με μια μικρή λιπόφιλη αλλά ογκώδη πλευρική ομάδα στη θέση 8, παρουσιάζει πλήρη γαλακταγωγική ιδιότητα, αλλά μόνο το 10% της ωκυτόκειου δράσης. Όλα τα παραπάνω ανάλογα εμφανίζουν μικρότερη δραστηριότητα σε σχέση με το φυσικό μόριο. Από τη συγκεκριμένη εργασία όσον αφορά μετατροπές στη θέση αυτή μόνο ελήφθησαν τα παρακάτω συμπεράσματα:

Οι δομικές αλλαγές που είναι απαραίτητες για τη θέση 8 όσον αφορά την αλληλεπίδραση με τον γαλακταγωγικό υποδοχέα εξαρτάται

περισσότερο από το μήκος παρά από τον όγκο της λιπόφιλης πλευρικής ομάδας. Μια ογκώδης αλλά μικρότερη πλευρική ομάδα (σε σύγκριση με την Leu) είναι συμβατή με τον γαλακταγωγικό υποδοχέα, ο οποίος δείχνει να έχει μεγαλύτερη ανοχή στις δομικές μετατροπές από ότι ο υποδοχέας που είναι υπεύθυνος για τη σύσπαση της μήτρας. Ωστόσο το γεγονός ότι στο ανάλογο με την Cle διατηρεί in vivo δράση για τη σύσπαση της μήτρας, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι περιορίζεται ισχυρά η διαμορφωτική ελευθερία, πράγμα που οδηγεί στην αύξηση της αλληλεπίδρασης με τον υποδοχέα.

Σύμφωνα επίσης με βιβλιογραφικές αναφορές [29] η εισαγωγή μιας ογκώδους ομάδας στη θέση 8 έχει ως αποτέλεσμα τον διαμορφωτικό περιορισμό του τελικού τριπεπτιδίου, όπως ήδη προαναφέραμε. Έτσι λοιπόν σε πειράματα που έγιναν για να ελεγχθεί η ταχύτητα αποικοδόμησης κάποιων αναλόγων από την α-χυμοθρυψίνη, παρατηρήθηκε ότι ανάλογα τα οποία στη θέση 8 είχαν τα παράγωγα κυκλολευκίνη και Gly(tBu) καθώς και το δικυκλικό ανάλογο με κυστεΐνη στις θέσεις 7 και 9 (χωρίς καμία άλλη δομική αλλαγή) αποικοδομούνταν πιο αργά. Επομένως η αποικοδομητική ικανότητα της χυμοθρυψίνης, όσον αφορά τον πεπτιδικό δεσμό μεταξύ Tyr-Ile επηρεάζεται από τη δομή του μορίου στη θέση 8. Η σταθερότητα αυτού του δεσμού αυξάνει όταν αυξάνει και η στερική παρεμπόδιση της πεπτιδικής ραχοκοκαλιάς στη θέση 8, πράγμα που επηρεάζει τη διαμόρφωση στο χώρο του δακτυλίου και ιδιαίτερα της πλευρικής αλυσίδας της τυροσίνης, έτσι ώστε το ενζυμο να μην μπορεί να υδρολύσει τον πεπτιδικό δεσμό.

Όσον αφορά τη θέση 9 μετατροπή του γλυκιναμιδίου της ωκυτοκίνης σε διμεθυλο- γλυκιναμίδιο οδηγεί στην παρασκευή του ([Gly-N(CH₃)₂]⁹OT). Το ανάλογο αυτό διατηρεί κατά προσέγγιση μόνο το 3% της ωκυτόκειου δράσης, ενώ παράλληλα, το δυναμικό

του όσον αφορά την καταστολή της πίεσεως του αίματος των πτηνών, την αγγειοσταλτική του δράση (σε επίμυες) καθώς και την αντιδιουρητική του δράση (σε επίμυες) είναι αντίστοιχα 0,07, 0,01 και 0,0096 IU/mg αντίστοιχα [30].

Η αντικατάσταση των υδρογόνων της τελικής αμινομάδας του γλυκαναμιδίου από τις πιο ογκώδεις και λιγότερο υδρόφιλες μεθυλομάδες, οδηγεί πιθανόν σε καταστροφή του κατάλληλου προσανατολισμού του C-τελικού τριπεπτιδίου, ο οποίος είναι σημαντικός για την σύζευξη της ωκυτοκίνης και των αναλόγων της με τον υποδοχέα. Η αντικατάσταση της τελικής αμινομάδας του γλυκαναμιδίου από ένα άτομο υδρογόνου ή από μια υδροξυλομάδα οδηγεί σε ανάλογα με αυξημένη αγωνιστική δράση [31]. Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται στην αυξημένη υδροφυλικότητα του C-τελικού αμινοξέος η οποία οδηγεί σε κατάλληλο προσανατολισμό του C-τελικού τριπεπτιδίου. Επίσης έχει αποδειχθεί εκ της βιβλιογραφίας [16(B)] ότι αντικατάσταση του πεπτιδικού δεσμού (-CONH) στις θέσεις 8 και 9 με ομάδες του τύπου CH₂NH ή CH₂S η με την ογκώδη καρβοβένζοξυ ομάδα οδηγεί σε μείωση των βιολογικών ιδιοτήτων γενικότερα.

Στον πίνακα A.3 παρουσιάζεται η βιολογική δράση ορισμένων αναλόγων της ωκυτοκίνης [16].

Πίνακας A.3. Ωκυτόκειος δράση ορισμένων συνθετικών αναλόγων της OT.

Ανάλογα	Ωκυτόκειος δράση In vitro (pA ₂)
[Pmp ¹ , Tyr(Me) ² , Thr ⁴ , Orn ⁸]OT	8,02±0,09
des Gly-NH ₂ [Pmp ¹ , Tyr(Me) ² , Thr ⁴ , Orn ⁸]OT	7,89±0,04
des Gly-[Pmp ¹ , Tyr(Me) ² , Thr ⁴ , Orn ⁸]OT	8,02±0,09
[Leuψ[CH ₂ S]Gly ⁸⁻⁹]OXT	10,2(I.U/mg)
[Mpa ¹ , Ile ³ [CH ₂ NH]Gly ⁸⁻⁹]OT	0.1(I.U/mg)

Η διατήρηση του αμιδικού χαρακτήρα των αναλόγων της OT είναι σημαντική διότι πιθανόν συνεισφέρει στον κατάλληλο προσανατολισμό της τελικής καρβοξαμιδομάδας, γεγονός σημαντικό για τη δημιουργία του συμπλόκου υποδοχέα-ανταγωνιστή.

Στον πίνακα A.4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των βιολογικών δοκιμών διαφόρων αναλόγων της OT.

Πίνακας A.4: Ωκυτόκειος δράση ορισμένων συνθετικών αναλόγων της ωκυτοκίνης.

Ανάλογα		Ωκυτόκειος Δράση in vitro (IU\mg)
1.	[Mpa ¹]OT	803
2.	[Glu ⁴]OT	1,5
3.	[Mpa ¹ , Glu ⁴]OT	13,3
4.	[Lys ⁸]OT	80
5.	[Mpa ¹ , Lys ⁸]OT	20
6.	[Mpa ¹ ,Glu ⁴ ,Cys ⁶ ,Lys ⁸]OT	0,4±0,2
7.	[Mpa ¹ , cyclo (Glu ⁴ , Lys ⁸)OT]	pA ₂ =8,2
8.	[dPen ¹ , cyclo (Glu ⁴ ,Lys ⁸)OT	pA ₂ =8,7

pA₂: Αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος του ID₅₀(όπου ID₅₀ η δόση του ανταγωνιστή που μειώνει τη δράση του αγωνιστή στο μισό.)

Από τον παραπάνω πίνακα [32] διαπιστώνουμε ότι ενώ το δικυκλικό ανάλογο 7 [Mpa¹, cyclo(Glu⁴,Lys⁸)OT] είναι ισχυρός ανταγωνιστής, το αντίστοιχο μονοκυκλικό ανάλογο [Mpa¹,Glu⁴,Cys⁶,Lys⁸]OT, καθώς και τα ανάλογα [Mpa¹, Glu⁴]OT, [Mpa¹, Lys⁸]OT, [Glu⁴]OT, [Lys⁸]OT είναι ασθενείς αγωνιστές. Η κύρια δομική διαφορά του δικυκλικού αναλόγου με τα υπόλοιπα είναι ο σχηματισμός ενός επιπλέον δακτυλίου μέσω αμιδικού δεσμού μεταξύ των αμινοξέων Glu στη θέση 4 και Lys στη θέση 8. Ο επιπλέον αυτός δακτύλιος, οδηγεί σε μία διαμόρφωση η οποία χαρακτηρίζεται από μια β-στροφή στην περιοχή των αμινοξέων στις θέσεις 2 και 3 καθώς και σε μία cis γεωμετρία του αμιδικού δεσμού ανάμεσα στην Cys 6 και στην Pro7. Η cis διάταξη του αμιδικού δεσμού μεταξύ της Cys στη θέση 6 και της Pro στη

θέση 7, οδηγεί πιθανόν σε μια ανάστροφη κάμψη στις θέσεις 6 και 7 του μορίου καθώς και σε μια προς τα πίσω (ανάστροφη) αναδίπλωση του C-τελικού τριπεπτιδίου, σε σχέση με τον 20μελή δισουλφιδικό δακτύλιο. Ο πιθανός αυτός προσανατολισμός του Cτελικού τριπεπτιδίου είναι σημαντικός για την σύνδεση των αναλόγων αυτών της ωκυτοκίνης με τον υποδοχέα της. Σημαντικός είναι επίσης ο περιορισμός της διαμορφωτικής ελευθερίας του 20μελούς δισουλφιδικού δακτυλίου, στα δικυκλικά ανάλογα της ωκυτοκίνης, ο οποίος είναι δυνατόν να οδηγήσει σε σταθεροποίηση πιθανών ενεργών διαμορφώσεων, όπως συμβαίνει στην συγκεκριμένη περίπτωση.

Ο ισχυρότερος δικυκλικός ανταγωνιστής της ωκυτοκίνης που έχει συντεθεί μέχρι σήμερα, είναι το ανάλογο [dPen¹, cyclo (Glu⁴,Lys⁸)]OT το οποίο εμφανίζει $pA_2=8,7$ [17]. Είναι πολύ δύσκολο ένα μονοκυκλικό ανάλογο της OT να εμφανίσει προσανατολισμό C-τελικού τριπεπτιδίου παρόμοιο με τον προσανατολισμό του C-τελικού τριπεπτιδίου στα δικυκλικά ανάλογα της OT. Εξαιρέση αποτελούν τα μονοκυκλικά ανάλογα της OT που περιέχουν στην θέση 6 D-Cys και στα οποία εμφανίζεται μια ανάστροφη αναδίπλωση του C-τελικού τριπεπτιδίου, σε σχέση με τον 20μελή δισουλφιδικό δακτύλιο όπως και στα δικυκλικά ανάλογα. Το γεγονός αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η εισαγωγή της D-Cys να οδηγεί σε ισχυρούς ανταγωνιστές [22].

Τα έως τώρα συμπεράσματα τα οποία έχουν προκύψει ύστερα από μελέτη των σχέσεων δομής δραστηριότητας, σειράς αναλόγων της ωκυτοκίνης οδηγούν συνοπτικά στα εξής:

- α). Εισαγωγή στην θέση 1 του Mpa (ή οποιουδήποτε β-αλκυλο παραγώγου του όπως Pen, dPen, Pmp κ.α.) σε συνδυασμό με την εισαγωγή στην θέση 2 ενός D-αρωματικού αμινοξέος,

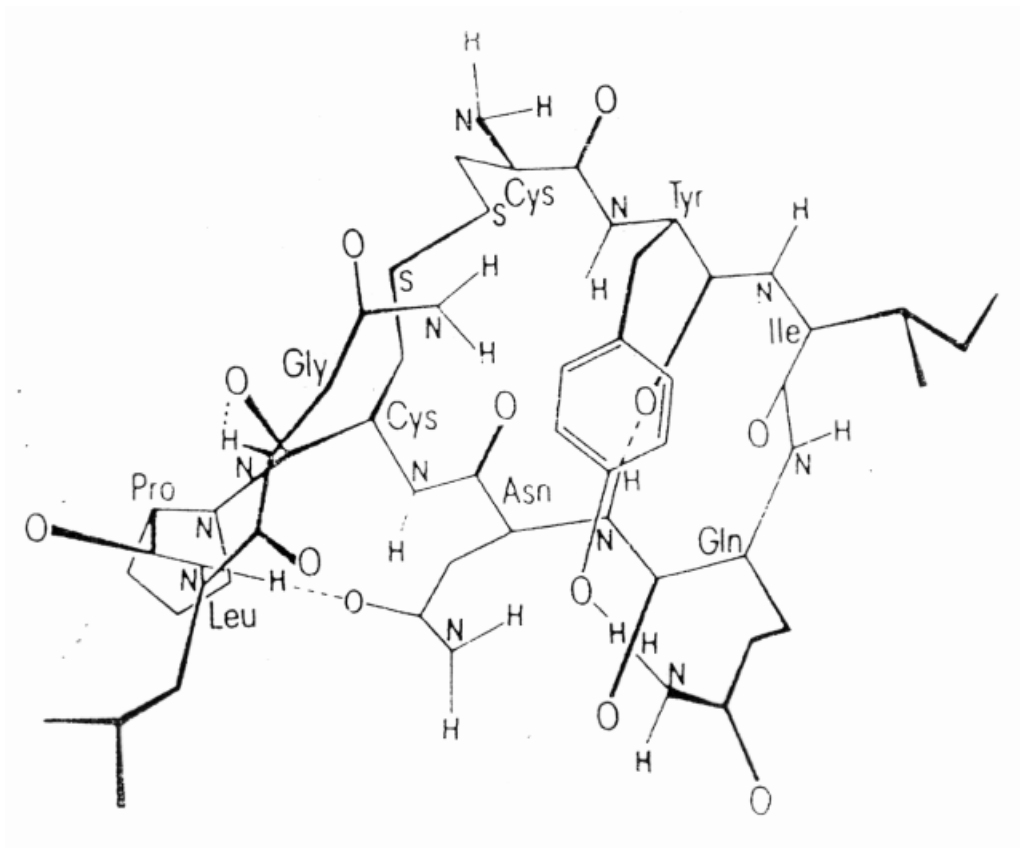
ιδιαίτερα όταν αυτό χαρακτηρίζεται από έλλειψη ελεύθερου υδροξυλίου έχει σαν αποτέλεσμα την παρασκευή αναλόγων με ισχυρές ανταγωνιστικές ιδιότητες. Η εισαγωγή των προαναφερθέντων αμινοξέων στις θέσεις 1 και 2 αντίστοιχα είναι η ελάχιστη δομική απαίτηση για ένα σύγχρονο πεπτιδικό ανταγωνιστή της ωκυτοκίνης. Οι ανταγωνιστικές αυτές ιδιότητες μπορούν να αυξηθούν περαιτέρω με την εισαγωγή κυρίως της Arg στην θέση 8, καθώς και με την εισαγωγή στην θέση 3 της Phe, οδηγώντας όμως παράλληλα σε μη εκλεκτικά ανάλογα.

β). Διατήρηση η αύξηση των ανταγωνιστικών ιδιοτήτων ενός αναλόγου φαίνεται να επέρχεται με εισαγωγή της Thr στη θέση 4. Η εισαγωγή της D-Cys στην θέση 6 λόγω ιδιαίτερου και κατάλληλου προσανατολισμού του C-τελικού τριπεπτιδίου, οδηγεί σε ανάλογα με αυξημένη ανταγωνιστική δράση. Θετική επίδραση όσον αφορά την ανταγωνιστική δράση αλλά και την εκλεκτικότητα φαίνεται ότι επιφέρει σε ένα ανάλογο η εισαγωγή της Orn στη θέση 8.

γ). Η διατήρηση του καρβοξαμιδικού χαρακτήρα των αναλόγων είναι σημαντική για την εμφάνιση ανταγωνιστικής δράσης. Τέλος τα δικυκλικά ανάλογα αποτελούν πολύ σημαντικούς ανταγωνιστές όχι μόνο διότι εμφανίζουν έντονη ανταγωνιστική δράση, αλλά γιατί λόγω των δύο δακτυλίων, αποκτούν πολύ σταθερές ενεργές διαμορφώσεις οι οποίες δεν επηρεάζονται ιδιαίτερα από το περιβάλλον.

A.1.4. Διαμορφωτικά Πρότυπα της Ωκυτοκίνης Κατά την Σύζευξή της με τον Υποδοχέα της

Το 1977, ο R. Walter και οι συνεργάτες του, μετά από εκτεταμένη NMR μελέτη, πρότειναν ένα διαμορφωτικό πρότυπο της ωκυτοκίνης κατά τη σύζευξή της με τον υποδοχέα της. Σύμφωνα με το πρότυπο αυτό, το οποίο ονομάστηκε «συνεργατικό» το μόριο εμφανίζει μια β-στροφή στην περιοχή των αμινοξέων Tyr²-Ile³-Gln⁴-Asn⁵, η οποία σταθεροποιείται με δεσμό υδρογόνου μεταξύ του NH αμιδικού πρωτονίου της Asn στη θέση 5 και του οξυγόνου του C=O της Tyr στη θέση 2. Η πλευρική αλυσίδα της τελευταίας βρίσκεται υπεράνω και παράλληλα προς τον 20μελή δισουλφιδικό δακτύλιο και αποτελεί μαζί με τις καρβοξαμιδικές ομάδες των Gln στην θέση 4, Asn στην θέση 5 και Gly στην θέση 9 την υδρόφιλη περιοχή της ορμόνης, η οποία είναι υπεύθυνη για την έναρξη της ωκυτοκείου δράσεως. Μια β-στροφή εμφανίζει επίσης η αλληλουχία Cys⁶-Pro⁷-Leu⁸-Cly⁹-NH₂ στο μη κυκλικό τμήμα, η οποία σταθεροποιείται από τον δεσμό υδρογόνου μεταξύ του NH αμιδικού πρωτονίου της Gly στη θέση 9 και του οξυγόνου του C=O της Cys στη θέση 6. Τέλος το μόριο της ωκυτοκίνης σταθεροποιείται από έναν ακόμη δεσμό υδρογόνου μεταξύ του οξυγόνου του C=O της Asn στη θέση 5 (του 20μελούς δισουλφιδικού δακτυλίου) και του NH αμιδικού πρωτονίου της Leu στη θέση 8 (στο C-τελικό άκρο)[33,34].



Σχήμα Α.2. Το τρισδιάστατο διαμορφωτικό πρότυπο της ΟΤ το οποίο έχει προταθεί από τον R. Walter.

Αυτό το τρισδιάστατο πρότυπο οδήγησε για πρώτη φορά στην υπόθεση ότι η ΟΤ (πιθανόν και άλλες ορμόνες της υποφύσεως) αλληλεπιδρά με διαφορετικούς υποδοχείς στους διάφορους κυτταρικούς στόχους. Οι διαφορετικοί υποδοχείς αναγνωρίζουν, πλήρως ή μερικώς, διαφορετικές περιοχές δέσμευσης των υπό σύζευξη μορίων.

Το 1981 ο Hruby και οι συνεργάτες του πρότειναν ένα διαφορετικό διαμορφωτικό πρότυπο για την αλληλεπίδραση της ωκυτοκίνης με τον υποδοχέα της, το λεγόμενο «δυναμικό» πρότυπο.

Το “δυναμικό πρότυπο” δίνει έμφαση στη σπουδαιότητα μιας ευέλικτης διαμόρφωσης για την εμφάνιση αγωνιστικής δράσης και μιας σχετικά άκαμπτης διαμόρφωσης για την εμφάνιση ανταγωνιστικής δράσης. Η τοποχημεία των πλευρικών δραστικών ομάδων της Cys¹, Tyr², Asn⁵, του

εικοσαμελούς δισουλφιδικού δακτυλίου και η σχέση αυτού με το πιο ευέλικτο C-τελικό τριπεπτίδιο θεωρείται κρίσιμη για την σύνδεση (με τον υποδοχέα) και την έναρξη βιολογικής απόκρισης [35].

Το 1990 ο Turner και οι συνεργάτες του ύστερα από μελέτες φθορισμού της Tyr (LFT), κατέληξαν σε ένα διαμορφωτικό πρότυπο για την ωκυτοκίνη (κατά την σύζευξη της με τον υποδοχέα της) το οποίο σε γενικές γραμμές επιβεβαιώνει τη «συνεργατικό» πρότυπο που προτάθηκε από τον Walter.

Η μόνη διαφοροποίηση είναι ότι ο Turner προτείνει την ύπαρξη ενός δεσμού υδρογόνου μεταξύ του πρωτονίου του υδροξυλίου της Tyr στην θέση 2 και του οξυγόνου της C=O της Asn στη θέση 5, σε αντίθεση με το συνεργατικό πρότυπο το οποίο προτείνει ότι το οξυγόνο της C=O της Asn5 σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το NH αμιδικό πρωτόνιο της Leu στη θέση 8. Η διαφορά αυτή πιθανόν να οφείλεται στο ότι οι μελέτες NMR έγιναν χρησιμοποιώντας ως διαλύτη DMSO ενώ οι μελέτες LFT από τον Turner πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ως διαλύτη προπυλενο-γλυκόζη. Το διαφορετικό περιβάλλον της ωκυτοκίνης στις δύο περιπτώσεις πιθανόν να είναι η ειδοποιός διαφορά. [36]

Τα περισσότερα από τα διαμορφωτικά πρότυπα συμφωνούν στο γεγονός ότι μια διαμόρφωση η οποία χαρακτηρίζεται από β-στροφή στις θέσεις 3 και 4 και μια ανάστροφη κάμψη στις θέσεις 7 και 8, είναι πιθανό να ευθύνεται για την ωκυτόκειο δράση της ωκυτοκίνης [37-41]

Το 1986 ο SP Wood και οι συνεργάτες του ύστερα από μελέτες που έγιναν με τη χρήση ακτινών X, πρότειναν ένα διαμορφωτικό πρότυπο για τη δεαμινο-ωκυτοκίνη ([Mpa¹]OT) η οποία βρισκόταν σε κρυσταλλική μορφή. Το διαμορφωτικό αυτό πρότυπο συμφωνεί σε μεγάλο βαθμό με το «συνεργατικό» πρότυπο, που προτάθηκε για την ωκυτοκίνη, με την

διαφορά, ότι η β-στροφή που εμφανίζει το μόριο της δεαμινο-ωκυτοκίνης στην περιοχή των αμινοξέων Tyr²-Ile³-Gln⁹-Asn⁵ σταθεροποιείται με τη βοήθεια δύο δεσμών υδρογόνου. Ο πρώτος δεσμός αναπτύσσεται μεταξύ του NH αμιδικού πρωτονίου της Asn⁵ και του οξυγόνου του C=O της Tyr² ενώ ο δεύτερος δεσμός υδρογόνου αναπτύσσεται μεταξύ του NH αμιδικού πρωτονίου της Tyr² και του οξυγόνου του C=O της Asn⁵. Μελέτες NMR που έγιναν με σκοπό τον καθορισμό της διαμόρφωσης της δεαμινο-ωκυτοκίνης σε νερό, οδήγησαν σε ένα όμοιο διαμορφωτικό πρότυπο, ενώ μελέτες NMR που έγιναν με διαλύτη DMSO οδήγησαν σε ένα διαμορφωτικό πρότυπο, ταυτόσημο με αυτό που προτάθηκε από τον Walter [42].

Το 1994 ο M.D. Shenderovich και οι συνεργάτες του ύστερα από συνδυασμένες μελέτες NMR (σε DMSO) και MD κατέληξαν σε ένα διαμορφωτικό πρότυπο για τους δικυκλικούς ανταγωνιστές της ωκυτοκίνης. (OT-BC). Σύμφωνα με αυτό το διαμορφωτικό πρότυπο το μόριο παρουσιάζει μια β-στροφή στις θέσεις 2 και 3 καθώς και μια ανάστροφη κάμψη στις θέσεις 6 και 7. Η cis διάταξη του αμιδικού δεσμού μεταξύ της Cys στη θέση 6 και της Pro στη θέση 7, οδηγεί σε μια προς τα πίσω αναδίπλωση του C-τελικού τριπεπτιδίου, σε σχέση με τον 20μελή δισουλφιδικό δακτύλιο γεγονός το οποίο δεν μπορεί να επιτευχθεί από την πλειοψηφία των μονοκυκλικών αναλόγων. Ο προσανατολισμός αυτός του C-τελικού τριπεπτιδίου είναι σημαντικός για τη σύνδεση του με τον υποδοχέα. Ο πρόσθετος αμιδικός δακτύλιος, επιφέρει ένα σημαντικό περιορισμό στην διαμορφωτική ελευθερία του δισουλφιδικού δακτυλίου, με αποτέλεσμα το δικυκλικό μόριο να εμφανίζει μια σχετικά σταθερή διαμόρφωση, η οποία δεν επηρεάζεται σημαντικά από το περιβάλλον [17,43].

A.2 Πεπτιδική Σύνθεση

A.2.1.Εισαγωγή

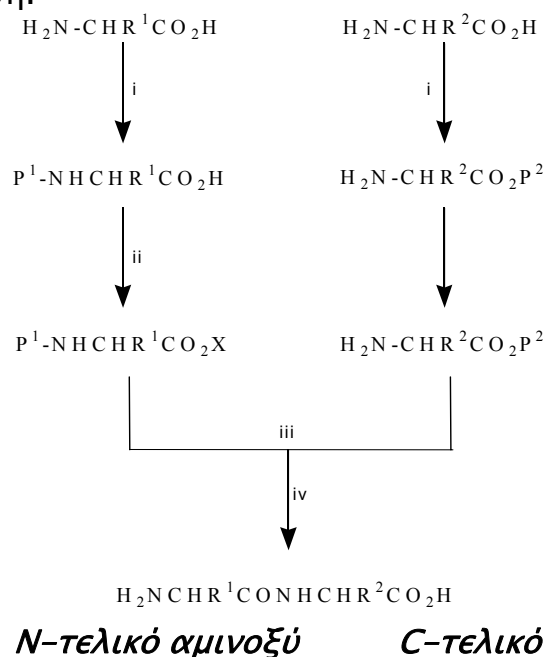
Ελάχιστες είναι εκείνες οι διεργασίες των βιολογικών συστημάτων στις οποίες δε λαμβάνουν μέρος οι πρωτεΐνες. Απαντώνται σε όλα τα οργανίδια του κυττάρου, από την κυτταρική μεμβράνη έως τον πυρήνα. Μπορεί να είναι απλά δομικά στοιχεία, υποδοχείς, ένζυμα, ρυθμιστικά στοιχεία, διάλυτοι ιόντων, πρωτεΐνες μεταφορείς άλλων μορίων κ.ά., ενώ πολλές ορμόνες είναι πεπτιδικής φύσεως, όπως η αγγειοτενσίνη II, η ινσουλίνη, η ωκυτοκίνη, η ουσία Π (*substance P*), κ.ά.

Η σημασία αυτή των πρωτεϊνών και των πεπτιδίων και η ανάγκη για επαρκείς ποσότητες για τη μελέτη και χρήση τους, αποτέλεσε κινητήρια δύναμη για την ανάπτυξη της πεπτιδικής χημείας. Έτσι, κατέστη δυνατή η παραγωγή πεπτιδίων σε ποσότητα αφενός και με δομικές αλλαγές αφετέρου. Βέβαια η σύνθεση πεπτιδίων στο εργαστήριο είναι μία επίπονη διαδικασία σε αντιδιαστολή με την ευκολία και την ταχύτητα με την οποία αυτή συμβαίνει στη φύση.

Για το σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού και την ανοικοδόμηση της πεπτιδικής αλυσίδας η αμινομάδα ενός αμινοξέος αντιδρά με την καρβοξυλομάδα άλλου αμινοξέος. Στο κύτταρο η αντίδραση αυτή καταλύεται από τις ενζυμικές θέσεις των ριβοσωμάτων και είναι, φυσικά, ειδική. Στο εργαστήριο θα πρέπει να υπάρχει πρόνοια να μην υπάρχουν άλλες διαθέσιμες ομάδες για να αντιδράσουν.

Έτσι, θα πρέπει να προστατευτούν τυχόν δραστικές πλευρικές ομάδες των αμινοξέων, καθώς και η καρβοξυλομάδα του C-τελικού αμινοξέος και η αμινομάδα του N-τελικού αμινοξέος. Επίσης απαιτούνται εκλεκτικές μέθοδοι απομάκρυνσης των προστατευτικών ομάδων, με τρόπο ώστε να μην δίνουν παραπροϊόντα επιδρώντας δευτερογενώς στο υπό σύνθεση πεπτίδιο (Σχήμα A.1). Ένα ακόμη σημαντικό πρόβλημα που πρέπει

να λαμβάνεται υπόψη για το σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού είναι η ρακεμίωση.



Σχήμα A.14. Συνοπτική παρουσίαση σύνθεσης ενός διπεπτιδίου.

Συνθήκες: i) προστασία, ii) ενεργοποίηση, iii) σύζευξη, iv) αποπροστασία

Η ανοικοδόμηση της πεπτιδικής αλυσίδας μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο διαφορετικούς τρόπους:

α. πεπτιδική σύνθεση κατά στάδια (step by step). Στην πεπτιδική σύνθεση κατά στάδια γίνεται βήμα προς βήμα αύξηση της πεπτιδικής αλυσίδας προσθέτοντας κάθε φορά ένα προστατευμένο αμινοξύ. Θεωρητικά η ανοικοδόμηση της πεπτιδικής αλυσίδας μπορεί να συμβεί με δύο τρόπους: ξεκινώντας από το C-τελικό άκρο προσθέτοντας αμινοξέα μέχρι την προσθήκη του N-τελικού αμινοξέος ή ξεκινώντας από το N-τελικό άκρο προσθέτοντας αμινοξέα μέχρι να προστεθεί και το C-τελικό αμινοξύ. Στη φύση ακολουθείται η δεύτερη διαδικασία, αλλά στο εργαστήριο ακολουθείται η πρώτη, γιατί έτσι εξασφαλίζονται χαμηλά ποσοστά ρακεμίωσης.

β. πεπτιδική σύνθεση μέσω συμπύκνωσης πεπτιδικών τμημάτων (fragment or segment condensation). Στη συγκεκριμένη περίπτωση κατάλληλα προστατευμένα πεπτίδια δύο ή περισσότερων αμινοξέων (fragments) συνδέονται μέσω πεπτιδικού δεσμού προς μεγαλύτερα τμήματα συνθέτοντας έτσι τον πεπτιδικό σκελετό. Το

πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η παρασκευή καθαρών πεπτιδικών κλασμάτων και βρίσκει εφαρμογή κυρίως στη σύνθεση μεγάλων πεπτιδικών αλληλουχιών. Το μειονέκτημα της μεθόδου είναι το μεγάλο ποσοστό ρακεμίωσης του ενεργοποιημένου C-τελικού αμινοξέος του καρβοξυπαράγωγου. Το πρόβλημα αντιμετωπίζεται με την επιλογή, όπου φυσικά είναι δυνατή, κατάλληλων πεπτιδικών τμημάτων, τα οποία έχουν ως C-τελικό αμινοξύ γλυκίνη (αμινοξύ χωρίς ασύμμετρο άτομο άνθρακα) ή προλίνη (ιμινοξύ του οποίου το ασύμμετρο άτομο άνθρακα ανήκει σε δακτύλιο και δυσχεραίνεται η ρακεμίωση).

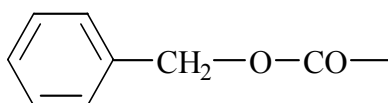
A.2.2 Προστατευτικές ομάδες της α -Αμινομάδας

Η προστασία της α -αμινομάδας είναι απαραίτητη για την αποφυγή πρώτα απ' όλα πεπτιδίων με επαναλαμβανόμενα αμινοξέα. Αν π.χ. σε μία Gly προστεθεί Ala με την α -αμινομάδα απροστάτευτη θα λάβουμε μίγμα προϊόντων: Ala-Gly, Ala-Ala, Ala-...-Ala-Gly, Ala-...-Ala, κ.ο.κ. Η προστασία της α -αμινομάδας είναι παροδική και απομακρύνεται εκλεκτικά όταν η σύζευξη ολοκληρωθεί, έτσι ώστε να προκύψει ελεύθερη αμινομάδα, με την οποία θα αντιδράσει η καρβοξυλομάδα του επομένου αμινοξέος. Οι προστατευτικές ομάδες της αμινομάδας κατατάσσονται σε τέσσερις βασικές κατηγορίες: τύπου ουρεθάνης, αλκυλο-τύπου, παραγώγων θείου και ακυλο-τύπου.

A.2.2.1 Προστατευτικές Ομάδες Τύπου Ουρεθάνης

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι σημαντικότερες και ευρύτερα χρησιμοποιούμενες ομάδες της πεπτιδικής σύνθεσης. Η αμινομάδα μπορεί πολύ εύκολα να μετατραπεί σε ένα αλκοξυκαρβονυλο-παραγώγο, κοινώς σε ένα παράγωγο ουρεθανικού τύπου, το οποίο μπορεί να χαρακτηριστεί, τόσο ως αμίδιο, όσο και ως εστέρας. Το πλεονέκτημα αυτού του τύπου της προστασίας είναι η έλλειψη προβλημάτων ρακεμίωσης.

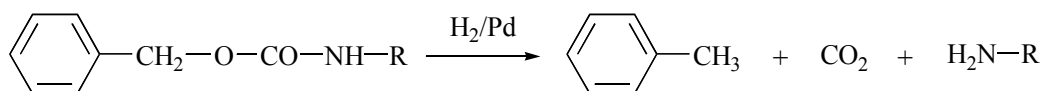
A) Βενζυλοξυκαρβονυλομάδα ή καρβοβενζοξυ-ομάδα (Cbz- ή Z-ομάδα). Η πρώτη σημαντική ουρεθανικού τύπου ομάδα που χρησιμοποιήθηκε ήταν η βενζυλοξυκαρβονυλομάδα ή καρβοβενζοξυ-ομάδα ή Z-ομάδα (1) [44]. Εισήχθηκε το 1932 από τους Bergman και Ζέρβα και το πρώτο γράμμα του επιθέτου του Λ. Ζέρβα ήταν αυτό που έδωσε τη συντομογραφία στην ομάδα.



1

Η ανακάλυψη της καρβοβενζοξυομάδας αποτέλεσε σταθμό στην ιστορία της πεπτιδικής χημείας και ουσιαστικά άνοιξε μια νέα εποχή στην πεπτιδική σύνθεση.

Η απομάκρυνση της Z-ομάδας μπορεί να γίνει με καταλυτική υδρογόνωση:



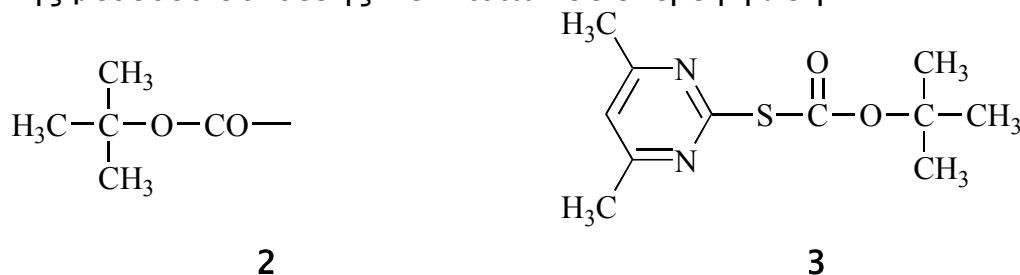
Η μέθοδος της καταλυτικής υδρογόνωσης δεν μπορεί να εφαρμοστεί όταν το πεπτίδιο περιέχει Cys ή κυστίνη, γιατί το θείο δηλητηριάζει τον καταλύτη.

Η Z-ομάδα μπορεί να απομακρυνθεί επίσης με επίδραση Na σε υγρή αμμωνία, καθώς και με HBr σε οξικό οξύ, από τριφθοροξικό οξύ με βρασμό και με TFMSA/TFA. Η μικρή πιθανότητα ρακεμίσωσης των παράγωγων αμινοξέων, η απομάκρυνση της Z-ομάδας σε συνθήκες που δεν επηρεάζουν τον πεπτιδικό δεσμό και το γεγονός ότι τα Z-αμινοξέα είναι κρυσταλλικά και σταθερά, είναι τα πλεονεκτήματα της χρησιμοποίησης της Z-ομάδας. Τα μειονεκτήματα της ομάδας είναι η S-βενζυλίωση της Met και η C-βενζυλίωση των Tyr και Trp από τα βενζυλοκατιόντα που σχηματίζονται κατά την απομάκρυνσή της, καθώς και ο κίνδυνος σχηματισμού υδαντοΐνης

και ουρίας στο στάδιο του διπεπτιδίου όταν το C-τελικό αμινοξύ είναι Gly.

B) Τριτοταγής βουτυλοξυκαρβονυλομάδα (Boc-ομάδα) (2).

Παρουσιάστηκε από τους McKay & Albertson το 1957 [45] και αποτέλεσε την κύρια M^α-προστατευτική ομάδα κατά την ανάπτυξη της μεθόδου σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση.

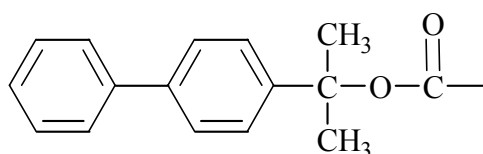


Η εργαστηριακή παρασκευή των Boc-αμινοξέων γίνεται, είτε με τη χρήση τριτοταγούς βουτυλοξυκαρβονυλο-ανυδρίτη (Boc₂O), είτε με τη χρήση τριτοταγούς βουτυλοξυκαρβονυλο-4,6-διμεθυλο-2-μερκαπτο-πυριμιδίνης (3). Και οι δυο μέθοδοι δίνουν πολύ καλές αποδόσεις με απλές διαδικασίες.

Η Boc-ομάδα είναι μία ευαίσθητη στα οξέα ομάδα και απομακρύνεται με τριφθοροξικό οξύ ή με ξηρό HCl σε οργανικούς διαλύτες (π.χ. αιθέρα, οξικό αιθυλεστέρα, διοξάνη, οξικό οξύ). Επίσης η Boc-ομάδα απομακρύνεται με την επίδραση 98% μυρμηκικού οξέος σε θερμοκρασία δωματίου, Me₃SiI σε χλωροφόρμιο ή ακετονιτρίλιο και BF₃.Et₂O σε χλωροφόρμιο .

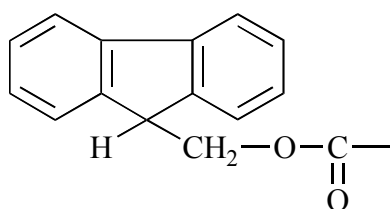
Η Boc-ομάδα χρησιμοποιείται κυρίως λόγω των ήπιων συνθηκών απομάκρυνσής της και της συμβατότητάς της με όλες τις μεθόδους σύζευξης. Επίσης, είναι συμβατή με άλλες προστατευτικές ομάδες λόγω της δυνατότητας εκλεκτικής απομάκρυνσης και τα Boc-αμινοξέα παρασκευάζονται εύκολα και με μικρό κόστος.

Γ) 2-(π-Διφαινυλο)-2-προπυλοξυκαρβονυλομάδα (Broc-ομάδα) (4).

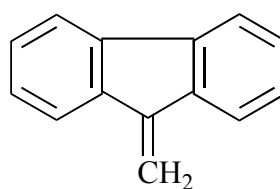


Εισήχθη από τους Sieber & Iselin το 1968 [46] και διακρίνεται από μεγάλη ευαισθησία έναντι των οξέων. Αυτή της η ιδιότητα την καθιστά πολύ χρήσιμη σε συνθέσεις όπου απαιτείται εκλεκτική αποπροστασία. Απομακρύνεται σε πολύ ήπιες συνθήκες (0,5% χλωροοξικό οξύ σε διχλωρομεθάνιο) που αφήνουν ανέπαφες άλλες ομάδες ευαίσθητες στα οξέα, όπως είναι η Boc- και η Z-ομάδα.

Δ) 9-φλουορενυλομεθοξυκαρβονυλομάδα (Fmoc-ομάδα) (5). Η Fmoc-ομάδα παρουσιάστηκε στις αρχές της δεκαετίας του '70 από τους Carpino & Han [47-48] και είναι διαφορετικής φιλοσοφίας από τις προηγούμενες ουρεθανικού τύπου ομάδες. Απομακρύνεται με επίδραση βάσεων, ενώ είναι σταθερή στα οξέα. Έτσι συνδυάζεται για τη σύνθεση πεπτιδίων στα οποία οι πλάγιες προστατευτικές ομάδες απομακρύνονται υπό όξινες συνθήκες (π.χ. Boc-, Z- ή *t*Bu-ομάδα). Η αποπροστασία της Fmoc-ομάδας γίνεται με απόσπαση πρωτονίου μέσω E₂ μηχανισμού. Ως βάση χρησιμοποιείται μια δευτεροταγής αμίνη, συνήθως διάλυμα πιπεριδίνης σε DMF, ενώ το παραπροϊόν της αντίδρασης, το διβενζοφουλβένιο (6) μπορεί να απομονωθεί, αν και μέρος του πολυμερίζεται.

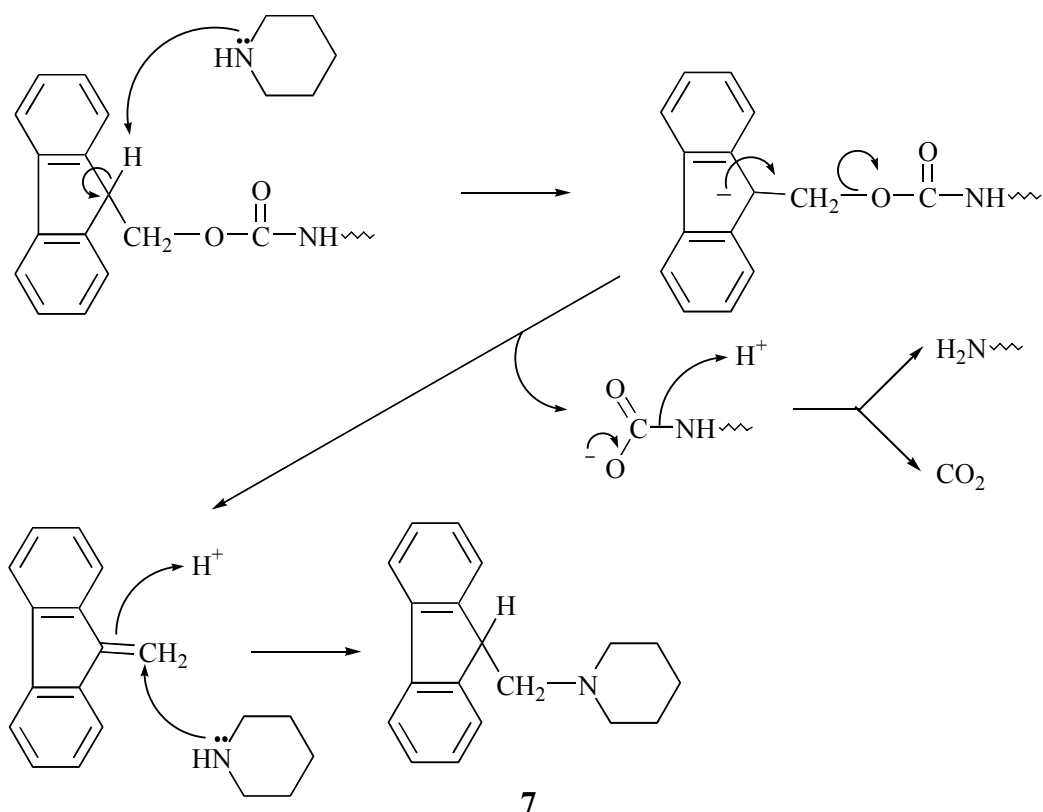


5

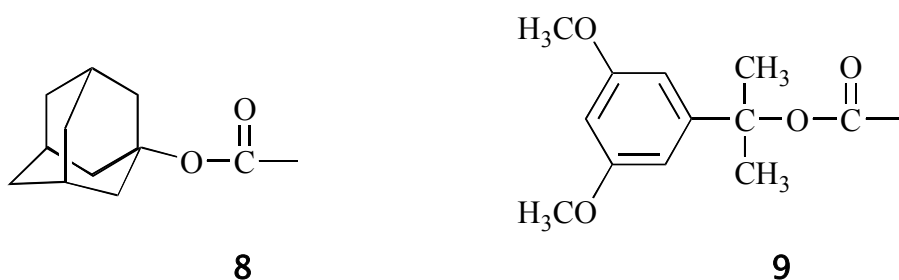


6

Η χρήση δευτεροταγών αμινών όπως η πιπεριδίνη, για την απομάκρυνση της Fmoc-ομάδας από την α-αμινομάδα, μπορεί να δεσμεύσει το διβενζοφουλβένιο, δίνοντας μια σταθερή τριτοταγή βάση (7), η οποία απομακρύνεται εύκολα:



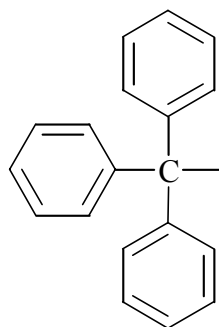
Η σύνθεση των Fmoc-αμινοξέων γίνεται με τη χρήση Fmoc-ηλεκτριμιδίου [49] ή την εφαρμογή της σιλυλ-μεθόδου [50]. Δύο ακόμα ομάδες ουρεθανικού τύπου ευαίσθητες σε οξέα με ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά είναι η αδαμαντυλοξυκαρβονυλομάδα ή Adoc-ομάδα (8) [51] και η α,α-διμεθυλο-3,5-διμεθοξυ-βενζυλοξυκαρβονυλομάδα ή Ddz-ομάδα (9) [52].



A.2.2.2 Αλκυλο-προστατευτικές Ομάδες

Η σημαντικότερη αλκυλο-προστατευτική ομάδα είναι η τριφαινυλομεθυλομάδα ή τριτυλομάδα (10) (Trt). Η πρώτη σχετική αναφορά για την Trt-ομάδα έγινε από τον Helferich το 1925 [53]. Η χρήση της όμως ως *N*^α-προστατευτικής ομάδας καθιερώθηκε από τους Ζέρβα & Θεοδωρόπουλο 30 χρόνια αργότερα [54]. Σύμφωνα

με τη μέθοδο που εισήγαγαν, η τριτυλίωση των α -αμινοξέων γίνεται με τη χρήση τριτυλοχλωριδίου.

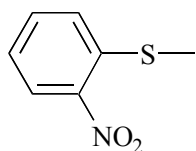


10

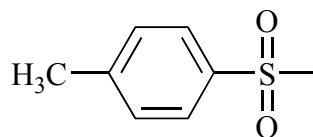
Η τριτυλομάδα είναι εξαιρετικά ευαίσθητη στα οξέα και μπορεί πολύ εύκολα να απομακρυνθεί ύστερα από απλή θέρμανση με αραιό διάλυμα (~5%) οξικού οξέος. Τα τριτυλο-αμινοξέα έχουν μερικώς βασικό χαρακτήρα και η ελάττωση της δραστηρότητας του αζώτου οφείλεται στη στερεοχημική παρεμπόδιση από την ογκώδη τριτυλομάδα. Διακρίνεται επίσης από σταθερότητα έναντι των αλκαλίων και της υδραζίνης.

A.2.2.3 Προστατευτικές Ομάδες Παραγώγων Θείου

Η 2-νιτροφαινυλοσουλφενυλομάδα (Nps) (11) και η 4-τολουολοσουλφονυλομάδα ή τοζυλομάδα (Tos) (12) είναι οι σπουδαιότερες ομάδες της κατηγορίας αυτής.



11



12

Η Nps-ομάδα είναι σταθερή έναντι των βάσεων, αλλά απομακρύνεται πολύ εύκολα από οξέα ή με καταλυτική υδρογόνωση. Η απλούστερη διαδικασία απομάκρυνσής της περιλαμβάνει την κατεργασία με αραιό HCl σε οργανικό διαλύτη [55,56]. Ταυτόχρονα η αποπροστασία των Nps-αμινοξέων μπορεί

να γίνει και θειολυτικά χρησιμοποιώντας για παράδειγμα 2-μερκαπτοπυριδίνη σε οξικό οξύ.

Με τη διαδικασία αυτή μπορεί να επιτευχθεί εκλεκτική απομάκρυνση της Nps-ομάδας έναντι άλλων, ευαίσθητων σε οξέα προστατευτικών ομάδων, ενώ ταυτόχρονα παραλείπεται το νιτροφαινυλοσουλφενυλοχλωρίδιο, το οποίο προκύπτει ως παραπροϊόν κατά τη διαδικασία της όξινης υδρόλυσης και το οποίο μπορεί (ειδικά στην περίπτωση που είναι παρόν στο μόριο το αμινοξύ θρυπτοφάνη) να προκαλέσει σημαντικά προβλήματα.

Η πιο εύχρηστη μέθοδος αποπροστασίας των τοζυλο-αμινοξέων είναι η αναγωγή τους από νάτριο σε υγρή αμμωνία. Εντούτοις, η τάση των τοζυλο-αμινοξέων για παράπλευρες αντιδράσεις, όπως για παράδειγμα, η δυνατότητα ενός τοζυλο-αμινοξέος να δεχθεί μια δεύτερη ακυλομάδα στο άτομο αζώτου, περιορίζουν κατά πολύ τη χρησιμοποίηση της τοζυλομάδας ως N^α-προστατευτικής ομάδας.

A.2.2.4 Προστατευτικές Ομάδες Ακυλο-τύπου

Η προστασία αυτού του τύπου είναι συνήθης στην οργανική χημεία. Οι δεσμοί όμως που σχηματίζουν επιδεικνύουν μεγάλη σταθερότητα και απαιτούν δραστικές συνθήκες για την απομάκρυνσή τους, οι οποίες επηρεάζουν τον πεπτιδικό δεσμό. Έτσι, η χρήση τους στην πεπτιδική σύνθεση είναι σπάνια. Ακόμη, ένας ανασταλτικός για τη χρήση τους παράγοντας είναι η ρακεμίσωση σε υψηλό ποσοστό των ενεργοποιημένων παραγώγων.

Αντιπροσωπευτικές ακυλο-τύπου προστατευτικές ομάδες είναι η φορμυλομάδα (-CHO) και η τριφθορο-ακετυλομάδα (-COCF₃). Τα φορμυλο-αμινοξέα αποπροστατεύονται με υδραζινόλυση, κατεργασία με αλκοολικό διάλυμα HCl 0,5-1 N σε θερμοκρασία δωματίου για 12-48 ώρες και οξείδωση με H₂O₂. Η τριφθορο-ακετυλομάδα απομακρύνεται με επίδραση αλκαλικού διαλύματος ή με οξείδωση με NaBH₄.

A.2.3 Προστασία Της Καρβοξυλομάδας

Η προστασία της καρβοξυλομάδας του C-τελικού αμινοξέος κατά τη διάρκεια της πεπτιδικής σύνθεσης είναι απαραίτητη, έτσι ώστε να μην είναι δυνατόν να προσβληθεί από πυρηνόφιλα αντιδραστήρια, όπως ελεύθερες αμινομάδες, κατά το στάδιο της σύζευξης προς σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού.

Η μετατροπή του καρβοξυλίου σε εστέρα είναι ένας αποδοτικός τρόπος προστασίας της καρβοξυλομάδας. Οι κυριότεροι εστέρες οι οποίοι έχουν χρησιμοποιηθεί είναι οι μεθυλ- και αιθυλ-εστέρες, οι βενζυλεστέρες και οι τριτοταγείς βουτυλεστέρες.

A.2.3.1 Μεθυλ- και Αιθυλ-εστέρες

Οι μεθυλ- και αιθυλ-εστέρες είναι μεταξύ τους ισοδύναμοι, όσον αφορά στην αποτελεσματικότητά τους να προστατέψουν την καρβοξυλομάδα του C-τελικού αμινοξέος. Η παρασκευή τους γίνεται με την κλασική μέθοδο της όξινα καταλυόμενης εστεροποίησης. Η απομάκρυνση των μεθυλ- και αιθυλ-εστέρων πραγματοποιείται με αλκαλική υδρόλυση εντός ακετόνης, μεθανόλης ή διοξάνης. Εναλλακτικοί τρόποι υδρόλυσης του εστέρα είναι η χρήση αραιών οξέων, η κατεργασία με LiI ή με Me₃Sil. Η σταθερότητα των ανωτέρω εστέρων στις συνήθεις συνθήκες αποπροστασίας κατά την πεπτιδική σύνθεση επιτρέπει την εκλεκτική απομάκρυνση άλλων προστατευτικών ομάδων. Μειονεκτήματα των εστέρων αυτών είναι οι παράπλευρες αντιδράσεις που συνοδεύουν τη διαδικασία σαπωνοποίησης (π.χ. μερική υδρόλυση των καρβοξαμιδικών ομάδων της Asn και της Gln), ο σχηματισμός δικετοπιπεραζίνης στο στάδιο του διπεπτιδίου και ο κίνδυνος ρακεμίωσης, η οποία ευνοείται από το αλκαλικό περιβάλλον της υδρόλυσης.

A.2.3.2 Βενζυλεστέρες

Οι βενζυλεστέρες παρασκευάζονται με επίδραση βενζυλικής αλκοόλης παρουσία π-τολουολοσουλφονικού οξέος εντός κατάλληλης συσκευής (Dean & Stark) αζεοτροπικής απομάκρυνσης του νερού. Μπορούν επίσης να παρασκευαστούν με αντίδραση του μετά καισίου άλατος των N^α-προστατευμένων αμινοξέων με

βενζυλοχλωρίδιο. Μέθοδοι αποπροστασίας είναι η καταλυτική υδρογόνωση, η αναγωγή με Na/NH₃ και η χρήση ισχυρών οξέων, όπως HF και HBr/AcOH. Και με τους βενζυλεστέρες ελλοχεύει ο κίνδυνος σχηματισμού δικετοπιπεραζίνης. Οι *π*-μεθοξυβενζυλεστέρες απομακρύνονται με πολύ πιο ήπιους τρόπους, όπως για παράδειγμα με επίδραση TFA.

Οι βενζυλεστέρες είναι από τις δημοφιλέστερες προστατευτικές ομάδες της καρβοξυλομάδας, μαζί με τους μεθυλ- και αιθυλ-εστέρες. Υπερτερούν όμως έναντι των τελευταίων αφού κατά τις συνθήκες απομάκρυνσης ενός βενζυλεστέρα ο κίνδυνος ρακεμίωσης είναι αμελητέος.

A.2.3.3 Τριτοταγείς Βουτυλεστέρες

Η παρασκευή των τριτοταγών βουτυλεστέρων μπορεί να γίνει άμεσα με την επίδραση ισοβουτενίου στο ελεύθερο αμινοξύ παρουσία *π*-τολουολοσουλφονικού οξέος. Μπορεί επίσης να γίνει με αντίδραση των βενζυλοξυκαρβονυλοπαραγώγων με ισοβουτένιο, παρουσία όξινου καταλύτη, αντίδραση η οποία όμως ακολουθείται από την απομάκρυνση της αμινοπροστατευτικής ομάδας. Πλεονέκτημα των εστέρων αυτών είναι ότι δεν υφίσταται ο κίνδυνος σχηματισμού δικετοπιπεραζίνης στο στάδιο του διπεπτιδίου. Η απομάκρυνση των τριτοταγών βουτυλεστέρων πραγματοποιείται κάτω από ήπιες συνθήκες και κατ' ανάλογο τρόπο με την απομάκρυνση της Βοc-ομάδας. Έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί HCl σε οξικό αιθυλεστέρα, αλλά και *π*-τολουολοσουλφονικό οξύ σε βενζόλιο.

Κατά καιρούς έχουν προταθεί και χρησιμοποιηθεί και άλλοι εστέρες για την προστασία της καρβοξυλομάδας όπως οι φθαλιμιδομεθυλεστέρες, οι *π*-νιτροβενζυλε-στέρες, οι φαινακυλεστέρες, οι αλλυλεστέρες και οι φλουορενυλομεθυλεστέρες.

A.2.4 Προστασία των Δραστικών Πλευρικών Ομάδων των Αμινοξέων

Τις περισσότερες φορές κατά την ανοικοδόμηση μιας πεπτιδικής αλυσίδας απαιτείται η προστασία των δραστικών πλευρικών ομάδων των αμινοξέων, για την αποφυγή παράπλευρων αντιδράσεων. Η προστασία αυτή γίνεται με ομάδες οι οποίες είναι συμβατές με την N^{α} -προστατευτική ομάδα, με την έννοια ότι, στις συνθήκες στις οποίες η τελευταία απομακρύνεται από το προς σύνθεση πεπτίδιο, η προστασία της πλάγιας ομάδας είναι σταθερή. Η απομάκρυνση των προστατευτικών αυτών ομάδων γίνεται συνήθως στο τέλος της σύνθεσης.

A.2.4.1 Προστασία της Γουανιδινομάδας της Αργινίνης

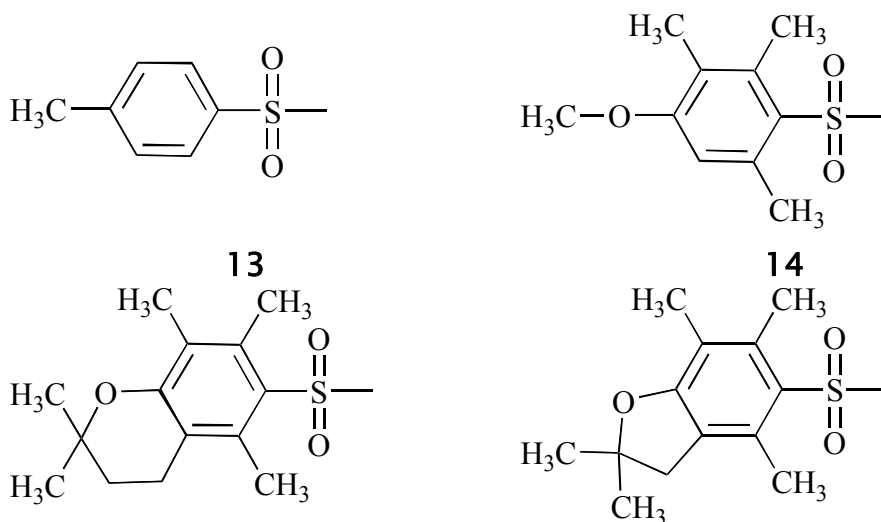
Η γουανιδινομάδα της αργινίνης παρουσιάζει ισχυρό βασικό ($pK_a=12$) και νουκλεόφιλο χαρακτήρα. Επομένως κατά τη διάρκεια της πεπτιδικής σύνθεσης μπορεί πολύ εύκολα να αλκυλιωθεί. Για το λόγο αυτό η προστασία της πλευρικής ομάδας της αργινίνης θεωρείται αναγκαία. Επίσης, μπορεί να συμβεί αφυδάτωση της πλευρικής αλυσίδας κατά την ενεργοποίηση [57, 58] και σχηματισμός ιμιδίων [59]. Αν και θα ήταν ιδανική η προστασία και των τριών ατόμων αζώτου της γουανιδινομάδας, προστατεύεται συνήθως το ένα άτομο και σε ορισμένες περιπτώσεις τα δύο.

Στην πεπτιδική σύνθεση σε υγρή φάση, χρησιμοποιήθηκε αρχικά ως μέσο προστασίας της γουανιδινομάδας η πρωτονίωσή της, λόγω του βασικού χαρακτήρα της. Η μη καλή διαλυτότητα των ενδιαμέσων παραγώγων (με πρωτονιωμένη γουανιδινομάδα) σε συνδυασμό με την παρατηρούμενη συμπεριφορά των πρωτονιωμένων πεπτιδίων ως ιοντοανταλλακτικών ρητινών, επέβαλαν την ανάπτυξη προστατευτικών ομάδων για τη γουανιδινομάδα της αργινίνης. Μία από τις πρώτες ομάδες η οποία χρησιμοποιήθηκε ευρέως ήταν η νιτρομάδα. Μερικά πλεονεκτήματα της ομάδας αυτής είναι η αύξηση της διαλυτότητας στους οργανικούς διαλύτες των προστατευμένων ενδιαμέσων παραγώγων και η μείωση της βασικότητας της γουανιδινομάδας. Η τάση του καρβοξυλίου του προστατευμένου

αμινοξέος για σχηματισμό λακτάμης (παράγωγο της 2-πιπεριδόνης) κατά την ενεργοποίηση [60, 61] και ο σχηματισμός ορνιθίνης η οποία λαμβάνει χώρα με την επίδραση βάσεως, αλλά και ισχυρών οξέων, όπως συμβαίνει κατά την απομάκρυνση ενός πεπτιδίου από τη ρητίνη, αποτελούν σοβαρά μειονεκτήματα αυτής. Η απομάκρυνση της νιτρομάδας γίνεται κατά κύριο λόγο με τη χρήση HF, αφού οξέα όπως το HBr ή το TFMSA αφήνουν απρόσβλητη τη νιτροαργινίνη, ενώ η καταλυτική υδρογόνωση, στις περιπτώσεις στις οποίες μπορεί να εφαρμοστεί, είναι σχετικά αργή και συνοδεύεται από τη δημιουργία παραπροϊόντων.

Αν και οι ουρεθάνικου τύπου ομάδες, όπως η Boc [62], η Adoc [63] και η Z-ομάδα [64-66], έχουν χρησιμοποιηθεί για την προστασία της γουανιδινομάδας της αργινίνης, έχει αποδειχθεί ότι και αυτές δεν προστατεύουν επαρκώς από αλκυλίωση, ενώ λόγω της έλξης των ηλεκτρονίων που ασκούν την καθιστούν ευαίσθητη σε προσβολή από νουκλεόφιλα. Η απομάκρυνση της Boc και της Adoc ομάδας γίνεται χρησιμοποιώντας TFA, ενώ η απομάκρυνση της Z-ομάδας, όπου αυτή χρησιμοποιείται, πραγματοποιείται με καταλυτική υδρογόνωση.

Οι περισσότερο εύχρηστες προστατευτικές ομάδες για τη γουανιδινομάδα της αργινίνης είναι οι αρυλοσουλφονυλομάδες, όπως η 4-τολουολοσουλφονυλο-μάδα ή Tos (13) [67], η 4-μεθοξυ-2,3,6-τριμεθυλο-φαινυλο-σουλφονυλομάδα ή Mtr (14) [68, 69], η 2,2,5,7,8-πενταμεθυλο-χρωμαν-6-σουλφονυλομάδα ή Pmc (15) [70, 71] και η 2,2,4,6,7-πενταμεθυλο-διυδροβενζοφουρανο-5-σουλφονυλο-μάδα ή Pbf (16) [72].



Η ευαισθησία των παραπάνω ομάδων έναντι των οξέων αυξάνεται σύμφωνα με τη σειρά Tos < Mtr < Pmc < Pbf. Η Tos ομάδα διακρίνεται για την υψηλή σταθερότητα έναντι των οξέων και η απομάκρυνσή της πραγματοποιείται ύστερα από επίδραση HF και TFMSA. Η αποπροστασία της Arg(Mtr) λαμβάνει χώρα ύστερα από επίδραση TFA για έξι ώρες [68, 69], ενώ πολύ πιο εύκολα απομακρύνεται η Pmc-ομάδα με διαλύματα 90% TFA σε δύο ώρες [70, 71]. Η Pbf-ομάδα εισήχθη σχετικά πρόσφατα από τον Carpino [72], με κύριο πλεονέκτημα τη μεγαλύτερη ευαισθησία της σε όξινα αντιδραστήρια. Η ταχύτητα απομάκρυνσης της Pbf-ομάδας είναι κατά 1,2 έως 1,4 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με αυτήν της Pmc. Η τοζυλομάδα χρησιμοποιείται κυρίως με τη Boc/Bzl μεθοδολογία σύνθεσης πεπτιδίων, ενώ αντίθετα οι Mtr, Pmc και Pbf προστατευτικές ομάδες αποτελούν τις βασικές ομάδες επιλογής όταν χρησιμοποιείται η Fmoc/tBu μεθοδολογία.

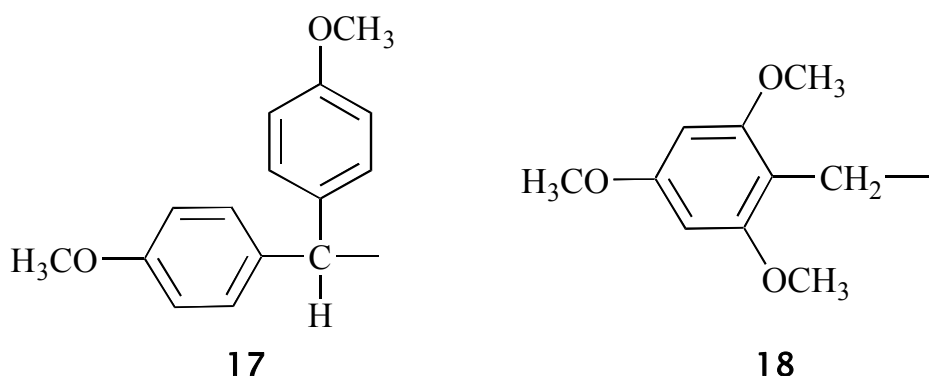
Το κυριότερο μειονέκτημα των παραπάνω ομάδων είναι η παρατηρούμενη μετατόπιση της αρυλοσουλφονυλομάδας μέσω *O*-ακυλο-ενδιαμέσου από τη γουανιδινομάδα στον αρωματικό δακτύλιο της τυροσίνης, αλλά και της θρυπτοφάνης [73,74]. Η παραπάνω παράπλευρη αντίδραση λαμβάνει χώρα κατά την αποπροστασία της γουανιδινομάδας με τη χρήση όξινων αντιδραστηρίων.

A.2.4.2 Προστασία του Καρβοξαμιδίου της Ασπαραγίνης και της Γλουταμίνη

Η ασπαραγίνη και η γλουταμίνη εισάγονται στην πεπτιδική αλυσίδα συνήθως χωρίς προστασία των δραστικών πλευρικών ομάδων τους. Οι παράπλευρες όμως αντιδράσεις οι οποίες λαμβάνουν χώρα κατά τη διαδικασία της ενεργοποίησης και σύζευξης υποχρεώνουν πολλές φορές την προστασία του καρβοξαμιδίου των δύο αμινοξέων. Η κύρια παράπλευρη αντίδραση η οποία παρατηρείται είναι ο σχηματισμός νιτριλίου μέσω αφυδάτωσης του πλευρικού καρβοξαμιδίου κατά τη διάρκεια της ακυλίωσης [58, 75]. Η συγκεκριμένη αντίδραση έχει

παρατηρηθεί σε ένα σημαντικό αριθμό αντιδραστηρίων ενεργοποίησης, όπως καρβοδιιμίδια [75], BOP, PyBOP® και HBTU [76]. Η σύζευξη όμως μέσω ενεργών εστέρων, όπως π.χ. *π*-νιτρο-φαινυλεστέρων, επιφέρει σημαντική ελάττωση του ποσοστού αφυδάτωσης [77].

Αναφορικά με τις ομάδες οι οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί για την προστασία του καρβοξαμιδίου οι κυριότερες είναι, η 4,4' - διμεθυλοξυβενζυδρομομάδα ή Mbh (17) [78], η 2,4,6-τριμεθοξυβενζυλομάδα ή Tmob (18) [79] και κυρίως η τριτυλομάδα [80, 81]. Οι ομάδες αυτές είναι συμβατές με *N*^α-Fmoc-προστασία και η απομάκρυνσή τους επιτυγχάνεται με τη χρήση διαλυμάτων TFA/DCM (9:1, v/v).



Η τριτυλομάδα πλεονεκτεί συγκριτικά με τις άλλες δύο ομάδες κατά το ότι τα παράγωγα Fmoc-Asn(Trt)-OH^Σ και Fmoc-Gln(Trt)-OH επιδεικνύουν πολύ καλή διαλυτότητα σε διαλύτες, όπως DMF και DMA, ενώ παράλληλα τα τριτυλοκατιόντα τα οποία απελευθερώνονται από την επίδραση του TFA δεν αλκυλιώνουν ευαίσθητα αμινοξέα, όπως την θρυπτοφάνη [80, 81].

^Σ Όσον αφορά στο συμβολισμό αυτό γίνονται οι συμβάσεις ότι *α*) η συντομογραφία της ομάδας αριστερά του αμινοξέος (τα οποία συμβολίζονται με τρία γράμματα) αντιστοιχεί στην προστατευτική ομάδα της *α*-αμινομάδας του αμινοξέος, *β*) η συντομογραφία της ομάδας μέσα σε παρενθέσεις αντιστοιχεί σε ομάδα η οποία συνδέεται με την πλάγια δραστική ομάδα του αμινοξέος, και *γ*) η συντομογραφία της ομάδας δεξιά του αμινοξέος αντιστοιχεί σε ομάδα η οποία έχει αντιδράσει με το καρβοξύλιο του αμινοξέος, ενεργοποιώντας το ή προστατεύοντάς το.

A.2.4.3 Προστασία της β- και γ-Καρβοξυλομάδας του Ασπαραγινικού και Γλουταμινικού οξέος

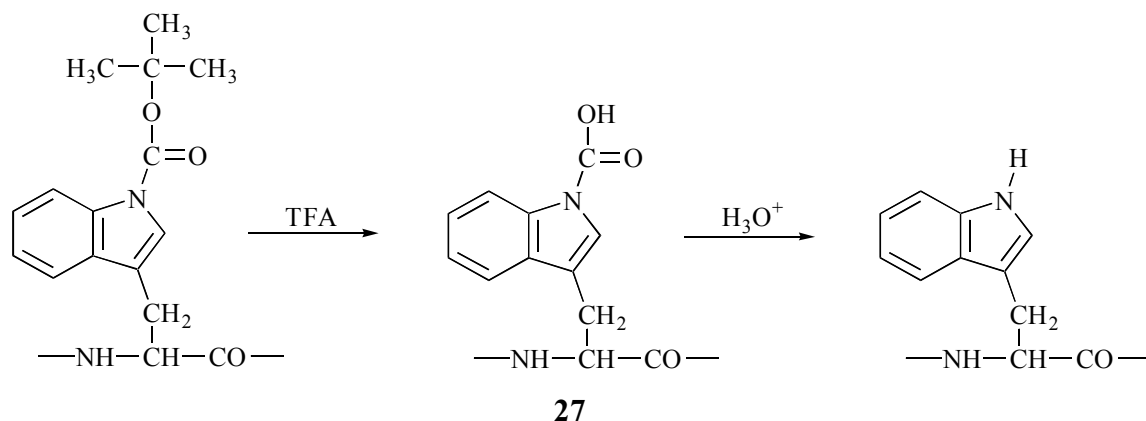
Η προστασία αντίστοιχα της β- και γ-καρβοξυλομάδας των εν λόγω αμινοξέων επιτυγχάνεται συνήθως μέσω εστεροποίησης τους προς βενζυλεστέρα [82] και τριτοταγή βουτυλεστέρα [83]. Οι βενζυλεστέρες χρησιμοποιούνται στη Boc/Bzl μεθοδολογία, ενώ κατά την Fmoc/tBu μεθοδολογία χρησιμοποιείται η τριτοταγής βουτυλομάδα. Για την απομάκρυνση των βενζυλεστέρων χρησιμοποιείται κυρίως υγρό HF, ενώ για τους τριτοταγείς βουτυλεστέρες TFA.

Εναλλακτική επιλογή για την προστασία των β- και γ-καρβοξυλομάδων του Asp και Glu αντίστοιχα, αποτελεί ο κυκλοεξυλεστέρας [84], ο οποίος προσφέρει επαρκή προστασία στις περιπτώσεις όπου το ασπαραγινικό οξύ συνοδεύεται από αμινοξέα τα οποία μπορούν να ευνοήσουν το σχηματισμό ηλεκτριμιδίου (π.χ. Asp-Gly ή Asp-Ser).

A.2.4.4. Προστασία του Ινδολικού Δακτυλίου της Θρυπτοφάνης.

Σε πολλές περιπτώσεις η θρυπτοφάνη χρησιμοποιείται στην πεπτιδική σύνθεση απροστάτευτη. Σε όξινες συνθήκες όμως, ο ινδολικός δακτύλιος οξειδώνεται ταχύτατα, ενώ αλκυλιώνεται από κατιόντα στη θέση 2. Όλα αυτά επιβάλλουν την προστασία του. Η φορμυλομάδα διακρίνεται από υψηλή σταθερότητα έναντι των οξέων και απομακρύνεται σε ξεχωριστό στάδιο με κατεργασία με κάποια υδατική βάση, όπως για παράδειγμα πιπεριδίνη, υδραζίνη ή υδροξυλαμίνη. Στις συνθήκες αυτές όμως υπάρχει η τάση η φορμυλομάδα να μεταναστεύει στην ελεύθερη αμινομάδα. Εναλλακτικά για την απομάκρυνσή της μπορεί να χρησιμοποιηθεί η "χαμηλής-υψηλής συγκέντρωσης σε HF διαδικασία απόσπασης" (*low-high HF procedure*) [219]. Κατά την Boc/Bzl μεθοδολογία σύνθεσης, για την προστασία του ινδολικού δακτυλίου της θρυπτοφάνης έχει προταθεί η κυκλοεξυλοξυκαρβονυλομάδα [220], η οποία απομακρύνεται με HF ή άλλα ισχυρά οξέα.

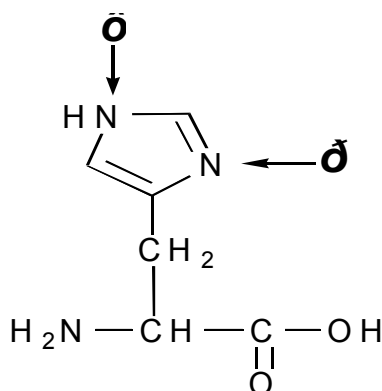
Σε συνθέσεις με Fmoc-αμινοξέα προτάθηκε πρόσφατα η χρήση της Boc-ομάδας για την προστασία του ινδολικού δακτυλίου της Trp. Κατά την απομάκρυνση της Boc-ομάδας, στη διάρκεια της τελικής αποπροστασίας με TFA, σχηματίζεται αρχικά το M^n -καρβοξυπαράγωγο (27), το οποίο είναι σχετικά σταθερό έναντι νουκλεόφιλων προσβολών. Το ενδιαμέσο αυτό είναι σταθερό σε TFA και μετατρέπεται σε Trp με όξινη κατεργασία.



A.2.4.5 Προστασία του Ιμιδαζολικού Δακτυλίου της Ιστιδίνης

Η N^{im} -ακυλίωση και η ρακεμίωση είναι τα σημαντικότερα προβλήματα τα οποία παρουσιάζονται κατά τη συμμετοχή του αμινοξέος στην πεπτιδική σύνθεση. Αν και πολλές φορές τα παραπροϊόντα της αντίδρασης μπορούν εύκολα να διαχωριστούν κατά τον καθαρισμό του πεπτιδίου, παρ' όλα αυτά η προστασία του ιμιδαζολικού δακτυλίου της ιστοιδίνης θεωρείται απαραίτητη, αφού τα παραγόμενα με αυτόν τον τρόπο ακυλιμιδαζόλια είναι ακυλιωτικές ενώσεις και έχουν τη δυνατότητα να αντιδράσουν με τις πλευρικές ομάδες των αμινοξέων.

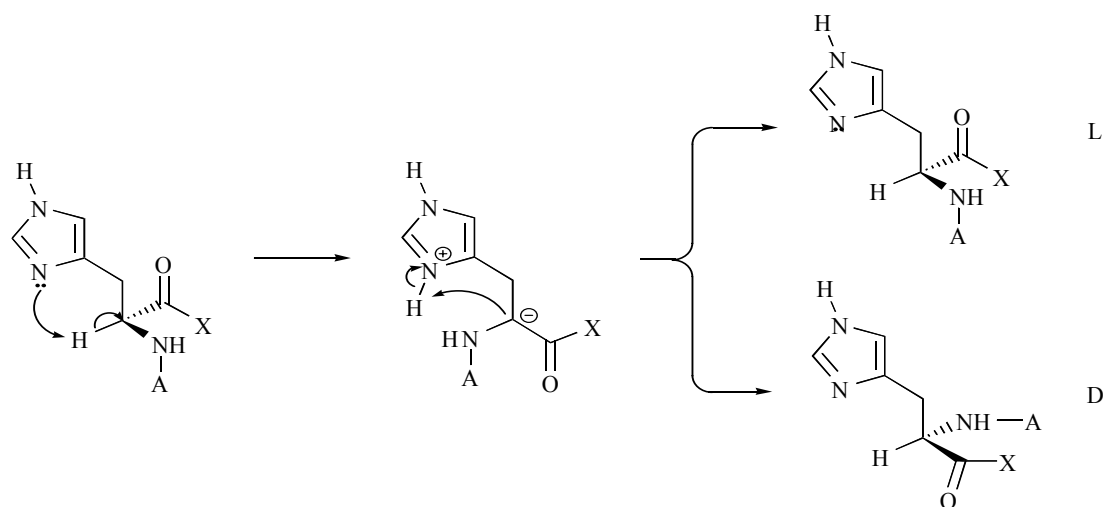
Αρχικά στις βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με την προστασία της ιστιδίνης είχε αγνοηθεί η διαφορά μεταξύ των τ και π ατόμων αζώτου του ιμιδαζολικού δακτυλίου.



Η χρήση ακυλιωτικών αντιδραστηρίων χωρίς ιδιαίτερη στερεοχημική παρεμπόδιση μπορεί να οδηγήσει όχι μόνο σε μονοϋποκατεστημένα παράγωγα, αλλά και διυποκατεστημένα, αφού η ακυλίωση του ενός ατόμου αζώτου δε φαίνεται να απενεργοποιεί το άλλο. Ο σχηματισμός των τ - και π -μονοακυλο-παραγώγων φαίνεται να πραγματοποιείται σε μια αναλογία 3:1. Η αναλογία αυτή μεταβάλλεται κατά τη χρήση αντιδραστηρίων με αυξημένη στερεοχημική παρεμπόδιση. Για παράδειγμα, η χρησιμοποίηση τριτυλοχλωριδίου δίνει υποκατεστημένα παράγωγα σε τ -θέση. Παράλληλα, η χρήση ακυλιωτικών ή αρυλοσουλφονικών παραγώγων μπορεί να οδηγήσει σε μονοϋποκατεστημένα ενδιάμεσα, αφού λόγω της ηλεκτραρνητικότητας της ακυλο- και αρυλοσουλφονυλομάδας που καταλαμβάνει τη μια θέση επηρεάζεται σημαντικά η δραστηριότητα της άλλης θέσης.

Η ρακεμίωση αποτελεί ίσως το σοβαρότερο πρόβλημα κατά τη σύζευξη της ιστιδίνης. Τα πειραματικά αποτελέσματα δείχνουν σημαντική μείωση του ποσοστού ρακεμίωσης ύστερα από προστασία του π -ατόμου αζώτου του ιμιδαζολικού δακτυλίου [85, 86]. Αυτό εξηγείται λαμβάνοντας υπόψιν το μηχανισμό ο οποίος οδηγεί σε ρακεμικά προϊόντα. Ο μηχανισμός αυτός περιλαμβάνει την απόσπαση του πρωτονίου από το α -άτομο άνθρακα της ιστιδίνης από το ισχυρώς βασικό π -άτομο αζώτου του ιμιδαζολικού δακτυλίου. Για το λόγο αυτό ομάδες οι οποίες

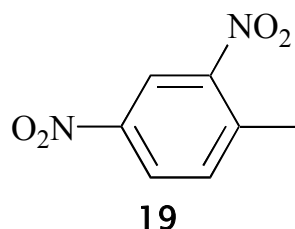
ελαττώνουν τη βασικότητα του π-ατόμου αζώτου συνεισφέρουν σημαντικά στην ελάττωση της παρατηρούμενης ρακεμίσωσης.



Οι κυριότερες ομάδες που χρησιμοποιούνται για την προστασία του ιμιδαζολικού δακτυλίου της ιστοιδίνης είναι :

α. Τοζυλομάδα (Tos). Είναι συμβατή με τη Boc/Bzl μεθοδολογία σύνθεσης πεπτιδίων. Πλεονεκτήματα της Boc-His(Tos)-OH αποτελούν η υψηλή διαλυτότητα και η εύκολη απομάκρυνση της Tos-ομάδας, ενώ το σημαντικότερο μειονέκτημά της είναι η απομάκρυνσή της με επίδραση 1-υδροξυβενζοτριάζολιου (HOBT) [87]. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα μέθοδοι σύζευξης, όπως αυτές που περιλαμβάνουν τη χρησιμοποίηση DCC/HOBT ή PyBOP®, να μην μπορούν να εφαρμοστούν μετά την εισαγωγή της τοζυλο-ιστιδίνης στην πεπτιδική αλυσίδα.

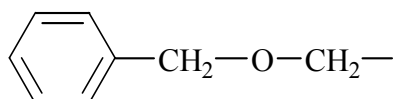
β. 2,4-Δινιτροφαινυλομάδα (Dnp). Το πλεονεκτήματά οποία παρουσιάζει η 2,4-δινιτροφαινυλομάδα (19) [88] είναι η υψηλή σταθερότητα σε κάθε εφαρμοζόμενη μέθοδο σύζευξης.



Η Dnp-ομάδα χρησιμοποιείται με τη Boc/Bzl μεθοδολογία σύνθεσης πεπτιδίων και είναι σταθερή στην επίδραση ισχυρών οξέων, όπως TFMSA ή HF. Η απομάκρυνσή της πραγματοποιείται

σε ξεχωριστό στάδιο χρησιμοποιώντας υδραζίνη, 2-μερκαπτοαιθανόλη ή θειοφαινόλη.

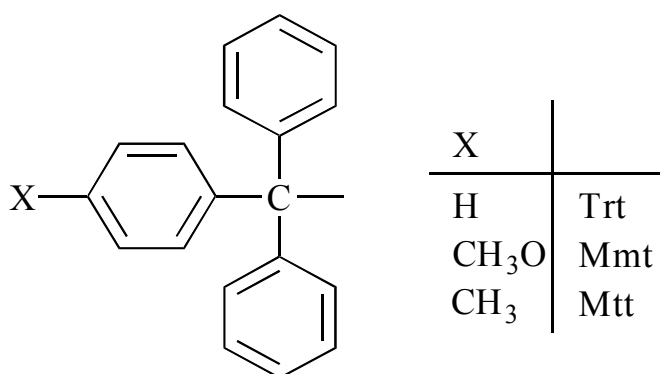
γ. Βενζυλοξυμεθυλομάδα (Bom). Η βενζυλοξυμεθυλομάδα (20) συνδυάζεται ως επί το πλείστον με N^{α} -Boc-προστασία [89,90]. Συνδέεται με το π -άτομο αζώτου και έτσι ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο ρακεμίωσης κατά τη διάρκεια σχηματισμού του πεπτιδικού δεσμού [89-91].



20

Η χρήση της Bom ομάδας είναι συμβατή με κάθε αντιδραστήριο σύζευξης, ενώ η απομάκρυνσή της πραγματοποιείται εύκολα με τη χρήση HF ή ακόμα και με καταλυτική υδρογόνωση.

δ. Τριτυλομάδα και παράγωγά της (21). Το μεγάλο πλεονέκτημα της της τριτυλομάδας [92,93] για την προστασία του ιμιδαζολικού δακτυλίου της ιστιδίνης, είναι η εύκολη απομάκρυνσή της. Η αποπροστασία της τριτυλο-ιστιδίνης πραγματοποιείται συνήθως με τη χρήση πυκνού διαλύματος TFA (~ 95%) σε DCM [92].

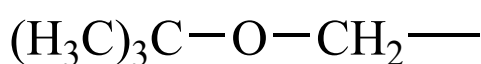


21

Αν και η τριτυλομάδα προστατεύει το τ -άτομο αζώτου έχει αποδειχθεί ότι είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική όσον αφορά τη μείωση του ποσοστού ρακεμίωσης [92], ενώ ταυτόχρονα είναι σταθερή σε όλες τις συνθήκες σχηματισμού του πεπτιδικού δεσμού. Γενικά η τριτολομάδα αποτελεί την περισσότερο

χρησιμοποιούμενη προστατευτική ομάδα για την πλάγια προστασία της ιστιδίνης, ενώ αποτέλεσε και τη βάση για το σχεδιασμό δύο άλλων ομάδων, της 4-μεθοξυ-τριτυλομάδας (Mmt) και της 4-μεθυλο-τριτυλομάδας (Mtt) [93]. Οι ομάδες αυτές είναι πολύ πιο ευαίσθητες σε οξέα συγκρινόμενες με την τριτυλομάδα και η απομάκρυνσή τους πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας 15% και 5% αντίστοιχα TFA σε DCM. Είναι ευνόητο ότι η χρήση της Trt, της Mmt και της Mtt ομάδας είναι συμβατή με την Fmoc μεθοδολογία σύνθεσης πεπτιδίων.

ε. Τριτοταγής βουτυλοξυμεθυλομάδα (Bum). Κατά ανάλογο τρόπο με την Bom-ομάδα, η Bum-ομάδα (22) καταλαμβάνει το π-άτομο αζώτου με αποτέλεσμα την ελαχιστοποίηση της εμφάνισης ρακεμικών προϊόντων.



22

Χρησιμοποιείται για τη σύνθεση πεπτιδίων με τη Fmoc/*t*Bu μεθοδολογία, ενώ η απομάκρυνσή της πραγματοποιείται με τη χρήση TFA ή HBr/AcOH.

A.2.4.6 Προστασία της Σουλφυδρυλομάδας της Κυστεΐνης

Η σουλφυδρυλομάδα της κυστεΐνης κατά τη διάρκεια της πεπτιδικής σύνθεσης μπορεί να αντιδράσει με διάφορα αντιδραστήρια, να ανταγωνιστεί την αμινομάδα ως προς το ενεργοποιημένο καρβοξύλιο ή να υποστεί οξείδωση, λόγω του πυρηνόφιλου χαρακτήρα της. Για όλους αυτούς τους λόγους η προστασία της σουλφυδρυλομάδας είναι απαραίτητη. Για τον σκοπό αυτό έχουν προταθεί πολλές προστατευτικές ομάδες, οι σημαντικότερες από τις οποίες είναι:

- α) **Βενζυλομάδα** ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2-$ = Bzl) [94,95]. Είναι σταθερή στα όξινα αντιδραστήρια και έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με τις Z- και Boc-*N*^α-προστατευτικές ομάδες. Η βενζυλομάδα εισάγεται χρησιμοποιώντας βενζυλοβρωμίδιο σε αλκαλικό pH, ενώ η απομάκρυνσή της πραγματοποιείται

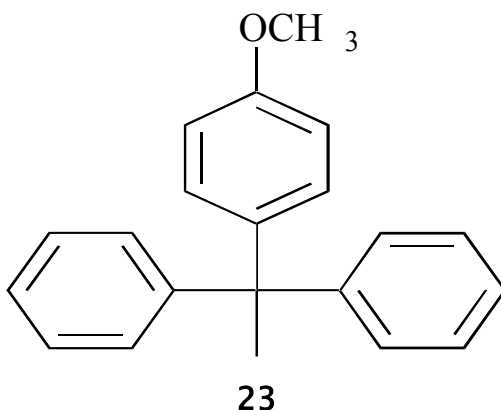
ύστερα από αναγωγή με Na σε υγρή αμμωνία ή με τη χρήση άνυδρου HF.

- β) Μεθυλοβενζυλομάδες.** Στην κατηγορία αυτή ανήκουν η 4-μεθυλοβενζυλομάδα (Meb) [96], η 3,4-διμεθυλοβενζυλομάδα [97] και η 2,4,6-τριμεθυλοβενζυλομάδα (Tmb) [98]. Οι δυο πρώτες εισάγονται με τη βοήθεια των χλωριδίων τους σε αλκαλικό διάλυμα, ενώ η τρίτη με τη βοήθεια της αντίστοιχης αλκοόλης. Διακρίνονται από υψηλή σταθερότητα έναντι του TFA, ενώ για την απομάκρυνσή τους απαιτείται η χρήση ισχυρότερων οξέων, όπως για παράδειγμα HF.
- γ) Μεθοξυβενζυλομάδες.** Η *π*-μεθοξυβενζυλομάδα (Mob) [99] και η 2,4,6-τριμεθοξυ-βενζυλομάδα (Tmob) [100] διακρίνονται από ακόμη μεγαλύτερη ευαισθησία σε όξινα αντιδραστήρια συγκρινόμενες με τις μεθυλοβενζυλομάδες. Η απομάκρυνση της Mob-ομάδας γίνεται με TFA ή HF σε θερμοκρασία δωματίου. Η Tmob-ομάδα βρίσκει εφαρμογή στη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση σε συνδυασμό με τη χρήση της Fmoc-ομάδας για *N*^α-προστασία.
- δ) Ακεταμιδομεθυλομάδα (CH₃CONHCH₂- ≡ Ac_m).**
Χρησιμοποιείται στην πεπτιδική σύνθεση σε υγρή και σε στερεή φάση. Είναι ανθεκτική στην επίδραση οξέων και στις συνήθειες, στην πεπτιδική σύνθεση, αλκαλικές συνθήκες. Η απομάκρυνσή της πραγματοποιείται με επίδραση Hg(II)/H₂S, NPSCI/NaBH₄ ή HSCH₂CH₂OH, (CF₃COO)₃Tl/HSCH₂CH₂SH, AgBF₄/TFA παρουσία διθειοθρεϊτόλης και τέλος I₂/MeOH. Το πλεονέκτημα της τελευταίας μεθόδου είναι η ταυτόχρονη οξείδωση των *S*-Ac_m ομάδων προς σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών, όταν αυτό είναι επιθυμητό.
- ε) Τριμεθυλακεταμιδομεθυλομάδα ((CH₃)₃C-CONH-CH₂- ≡ Tac_m).**
Η Tac_m-ομάδα παρουσιάζει μεγαλύτερη σταθερότητα κατά τη διάρκεια της πεπτιδικής σύνθεσης σε σύγκριση με την Ac_m-ομάδα. Εισάγεται μέσω της αντίστοιχης αλκοόλης σε ισχυρά όξινο περιβάλλον. Απομακρύνεται με την επίδραση αλάτων Hg(II) σε περιβάλλον H₂S, AgBF₄ παρουσία διθειοθρεϊτόλης, ενώ παρουσία I₂ σε διάλυμα EtOH/AcOH οξειδώνεται σχηματίζοντας παράγωγα κυστίνης. Ένα ακόμη σημαντικό πλεονέκτημα της Tac_m-ομάδας έναντι της Ac_m-

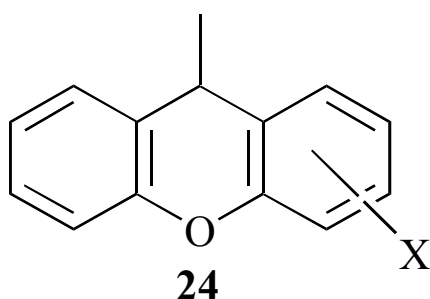
ομάδας είναι η μικρότερη ευπάθειά της προς σχηματισμό σουλφοξειδίου.

στ) Τριτοταγής Βουτυλομάδα ($(\text{CH}_3)_3\text{C}- \equiv t\text{Bu}$). Η σταθερότητα της $t\text{Bu}$ -ομάδας σε διάφορα όξινα αντιδραστήρια, όπως HClO_4 , HBr , HCl , στις συνθήκες υδρόλυσης των εστέρων καθώς και σε $\text{Na}/\text{υγρή NH}_3$ επιτρέπει τη χρησιμοποίησή της σε συνδυασμό με μια ποικιλία M^α -προστατευτικών ομάδων και εστέρων. Η απομάκρυνσή της γίνεται με επίδραση υγρού HF , $\text{Hg(II)}/\text{H}_2\text{S}$. Επιπλέον η σταθερότητά της σε διαλύματα I_2 επιτρέπει την εκλεκτική δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλες S -προστατευτικές ομάδες, οι οποίες οξειδώνονται εύκολα με I_2 .

ζ) Τριφαινυλομεθυλομάδα ($(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{C}- \equiv \text{Trt}$) και **4-μεθοξυ-τριφαινυλο-μεθυλομάδα** (Mmt) (**23**). Η Trt -ομάδα χαρακτηρίζεται από την ευαισθησία της σε όξινες συνθήκες (ζέον CF_3COOH , HBr/AcOH , HCl/AcOH) και σε άλατα βαρέων μετάλλων [Ag(I) ή Hg(II)]. Επιπλέον η κατεργασία των S - Trt παραγώγων με I_2 είναι μία από τις περισσότερο χρησιμοποιούμενες μεθόδους για τη σύνθεση παραγώγων κυστίνης. Η Mmt -ομάδα διακρίνεται για τη μεγαλύτερη ευαισθησία της έναντι των όξινων αντιδραστηρίων σε σύγκριση με την Trt -ομάδα [101]. Η απομάκρυνσή της επιτυγχάνεται με την επίδραση 0,5-1% TFA . Οι συνθήκες αυτές επιτρέπουν την εκλεκτική απομάκρυνση της Mmt -ομάδας έναντι άλλων ευαίσθητων σε οξέα ομάδων (π.χ. Trt ή $t\text{Bu}$).



Η 9-υδρο-ξανθενυλομάδα (Xan) και η 2-μεθοξυ-9-υδρο-ξανθενυλομάδα (Moxan) (24) [102] είναι δύο νέες ομάδες, οι οποίες προτάθηκαν για την προστασία της σουλφυδρυλομάδας της κυστεΐνης. Τα πλεονεκτήματα αυτών φαίνεται να είναι η αποτελεσματική δέσμευση (με ενώσεις Si ή θειολών) των κατιόντων τα οποία σχηματίζονται κατά την αποπροστασία και η ποσοτική και ταχεία απομάκρυνσή τους με αραιά διαλύματα TFA. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι με τη χρήση των ομάδων αυτών μπορεί να επιτευχθεί σχηματισμός δισουλφιδικής γέφυρας χρησιμοποιώντας απλά I₂ ή ακολουθώντας τη διαδικασία του [Ti(CF₃COO)₃]

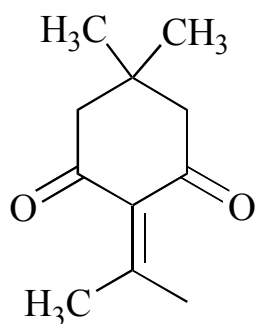


X	
H	Xan
MeO	Moxan

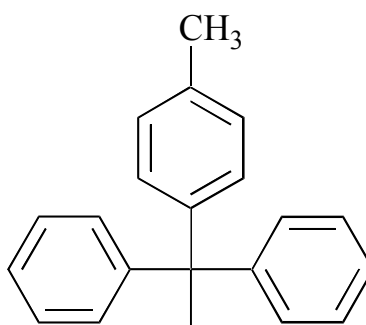
A.2.4.7. Προστασία της ε-Αμινομάδας της Λυσίνης

Για την προστασία της ε-αμινομάδας χρησιμοποιείται η καρβοβενζοξυ-ομάδα και η 2-χλωρο- ή η 2-βρωμο-καρβοβενζοξυ-ομάδα [103,104] κατά την Boc/Bzl μεθοδολογία. Απομακρύνονται εύκολα με τη χρήση HF και φυσικά με καταλυτική υδρογόνωση. Όταν επιλεγεί η Fmoc-ομάδα για την προστασία της α-αμινομάδας, η ε-αμινομάδα προστατεύεται κατά κύριο λόγο από τη Boc-ομάδα, η οποία απομακρύνεται με την επίδραση διαλύματος TFA.

Άλλες προστατευτικές ομάδες που έχουν προταθεί για την προστασία της ε-αμινομάδας της λυσίνης είναι : α) η τριφθορο-ακετυλομάδα, [105], β) η Dde-ομάδα (25) [106] και γ) η 4-μεθυλοτριτυλο(Mtt)-ομάδα (26) [107].



25



26

A.2.4.8 Προστασία της Θειοαιθερικής Ομάδας της Μεθειονίνης

Η μεθειονίνη εισάγεται συνήθως στην πεπτιδική αλυσίδα χωρίς προστασία της θειοαιθερικής ομάδας. Βέβαια κατά τη διάρκεια της πεπτιδικής σύνθεσης η ομάδα αυτή είναι δυνατό να οξειδωθεί προς σουλφοξείδιο, η αναγωγή του οποίου πραγματοποιείται σχετικά εύκολα με τη χρήση ιωδιδίων σε TFA. Πολλές φορές μάλιστα η μετατροπή σε σουλφοξείδιο χρησιμοποιείται ως μέσο προστασίας, δεδομένης της δυνατότητας αλκυλίωσης του ατόμου θείου.

A.2.4.9 Προστασία της Υδροξυλομάδας της Σερίνης και της Θρεονίνης

Η χρήση της σερίνης και της θρεονίνης χωρίς προστασία των υδροξυλίων τους περικλείει τον κίνδυνο ανεπιθύμητων παράπλευρων αντιδράσεων, όπως αλκυλίωση, σχηματισμό δεϋδροπαραγώγων, αλλά και *N* → *O* μετατόπιση ή άκυλο μετανάστευση. Η προστασία των παραπάνω υδροξυλομάδων γίνεται κυρίως με μετατροπή τους σε βενζυλαιθέρα ή τριτοταγή βουτυλαιθέρα. Οι βενζυλαιθέρες είναι σταθεροί σε όξινες συνθήκες και έτσι μπορούν να χρησιμοποιηθούν με *N*-προστατευτικές ομάδες ευαίσθητες σε οξέα ομάδες.

Απομακρύνονται με επίδραση HF, καταλυτική υδρογόνωση και με αναγωγή με νάτριο σε υγρή αμμωνία. Αντίθετα, η βουτυλομάδα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στην επίδραση οξέων. Έτσι, απομακρύνεται σε ήπιες συνθήκες, όπως με την επίδραση διαλύματος TFA ή HCl/διοξάνη 4 N. Για το λόγο αυτό μπορεί να συνδυαστεί με την Z και την Fmoc-ομάδα ως α -αμινοπροστατευτικές ομάδες, όχι όμως με την Boc-ομάδα. Στη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση, για την προστασία της υδροξυλομάδας της σερίνης και της θρεονίνης χρησιμοποιείται η τριφαινυλομεθυλομάδα (Trt) [108,109], η οποία είναι συμβατή με N^{α} -Fmoc-προστασία. Η Trt-ομάδα απομακρύνεται με καταλυτική υδρογόνωση, με τη βοήθεια όξινων αντιδραστηρίων, όπως για παράδειγμα TFA, με Na/NH₃ και με BF₃.Et₂O.

A.2.4.10 Προστασία της Υδροξυλομάδας της Τυροσίνης

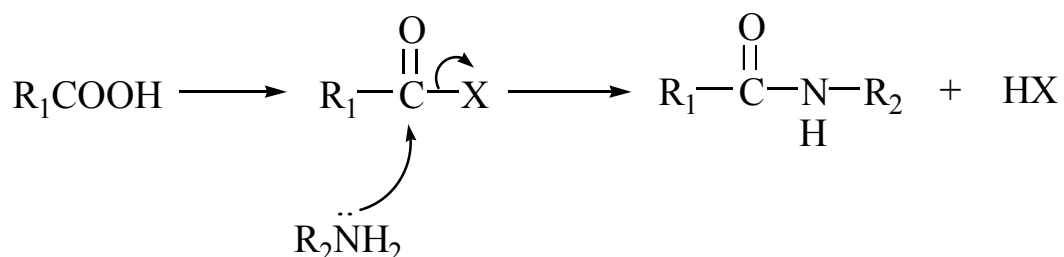
Για την προστασία του υδροξυλίου της τυροσίνης χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο αλογονωμένα παράγωγα (2,6-διχλωρο- και 2-βρωμο-) της καρβοβενζοξυ-ομάδας και η τριτοταγής βουτυλομάδα.

Τα αλογονωμένα παράγωγα της καρβοβενζοξυ-ομάδας μπορούν να συνδυαστούν με N^{α} -Boc-προστασία, αφού διακρίνονται από αυξημένη σταθερότητα έναντι του TFA και απομακρύνονται κάτω από ιδιαίτερα δραστικές συνθήκες, όπως με επίδραση HF. Αντίθετα η τριτοταγής βουτυλομάδα συνδυάζεται με N^{α} -Fmoc-προστασία αφού απομακρύνεται πολύ εύκολα χρησιμοποιώντας διαλύματα TFA.

Επίσης για την προστασία της τυροσίνης έχει προταθεί η τριφαινυλομεθυλομάδα [109] και η 2-χλωρο-τριφαινυλομεθυλομάδα [92]. Η απομάκρυνση των ομάδων αυτών γίνεται κάτω από ιδιαίτερα ήπιες συνθήκες με χρήση αραιών διαλυμάτων TFA σε διχλωρομεθάνιο. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται εκλεκτική αποπροστασία της υδροξυλομάδας του αμινοξέος.

A.2.5. Μέθοδοι Σχηματισμού Του Πεπτιδικού Δεσμού

Ο σχηματισμός του πεπτιδικού δεσμού περιλαμβάνει, εκτός ελάχιστων εξαιρέσεων, την ενεργοποίηση της καρβοξυλομάδας του προστιθέμενου αμινοξέος και τη νουκλεόφιλη προσβολή του παραπάνω ενδιάμεσου από την ελεύθερη αμινομάδα.



Η ενεργοποίηση της καρβοξυλομάδας του καρβοξυ-συστατικού θεωρείται απαραίτητη, αφού σε θερμοκρασία δωματίου τα καρβοξυλικά οξέα σχηματίζουν άλατα με την αμινομάδα, η μετατροπή των οποίων σε αμίδια απαιτεί υψηλές θερμοκρασίες με αρνητικές επιδράσεις σε κάθε πεπτιδικό μόριο. Επίσης, η όξινη κατάλυση έχει απορριφθεί γιατί η ελεύθερη αμινομάδα πρωτονιώνεται και απενεργοποιείται.

Οι κυριότεροι παράγοντες που λαμβάνονται υπόψη για την επιλογή της μεθόδου σύζευξης κατά τη σύνθεση πεπτιδίων είναι:

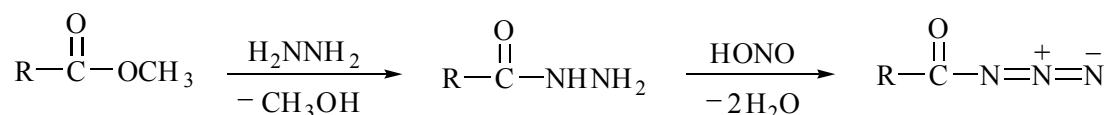
- α) ο γρήγορος σχηματισμός του πεπτιδικού δεσμού
- β) η υψηλή απόδοση
- γ) η απουσία παράπλευρων αντιδράσεων
- δ) η απλή διαδικασία καθαρισμού του προϊόντος, και
- ε) η καταστολή της ρακεμίωσης.

Θα πρέπει να τονισθεί ότι στην πεπτιδική σύνθεση απαιτείται οι αντιδράσεις να είναι ποσοτικές, γιατί ακόμη και μια μικρή απώλεια στην απόδοση των αντιδράσεων μεγενθύνεται και μειώνει κατά πολύ περισσότερο την ολική απόδοση σε καθαρό πεπτίδιο, λόγω του γεγονότος ότι υπάρχουν πολλοί κύκλοι για τη σύνθεση ενός πεπτιδικού μορίου.

Οι κύριες μέθοδοι για τη δημιουργία πεπτιδικού δεσμού είναι η μέθοδος των αζιδίων, των καρβοδιιμιδίων, των ανυδριτών και των αντιδραστηρίων σύζευξης.

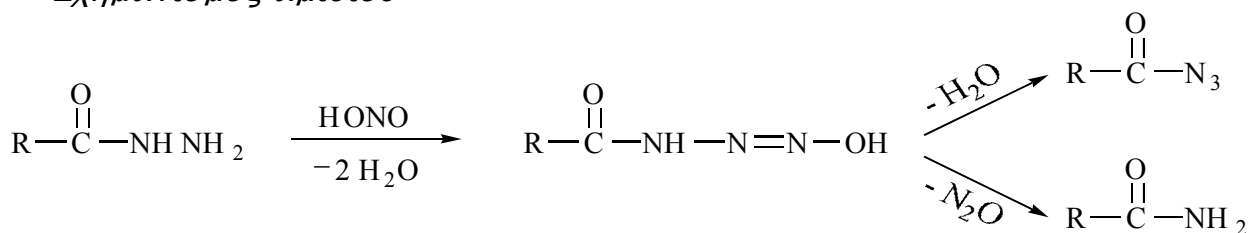
A.2.5.1 Μέθοδος των Αζιδίων

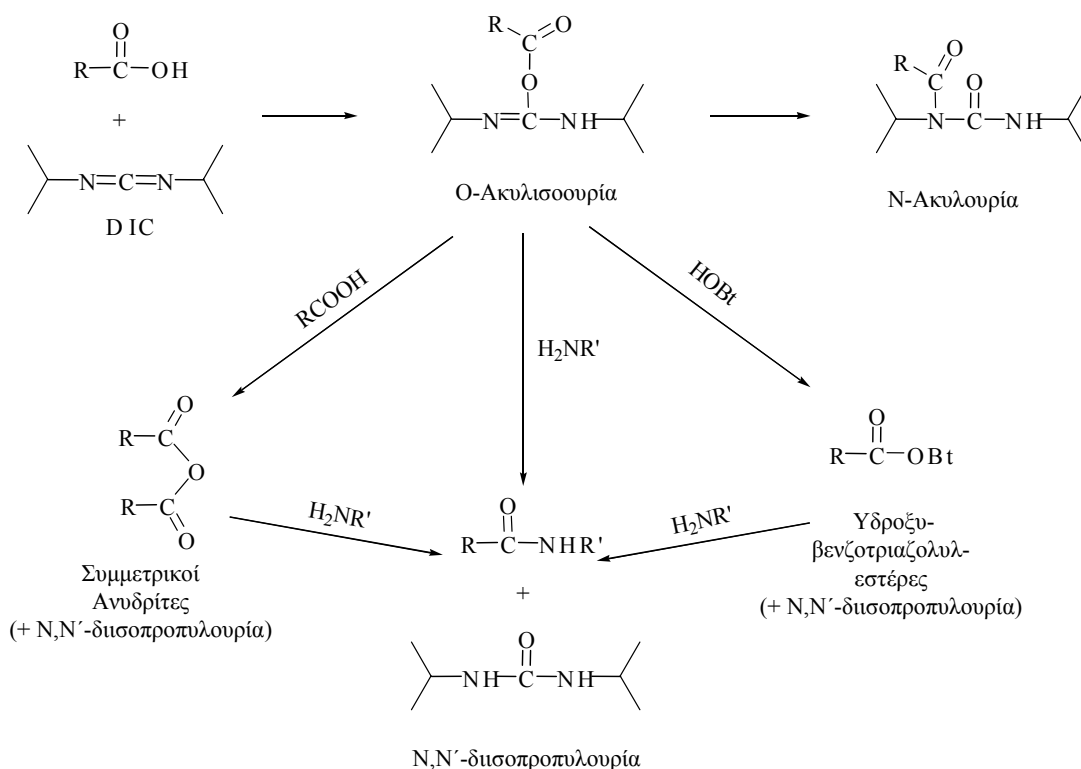
Η μέθοδος εισήχθη από τον Curtius στις αρχές του αιώνα [110] και βρίσκει ακόμα εφαρμογή, ιδιαίτερα στη σύζευξη πεπτιδικών κλασμάτων, λόγω του μικρού παρατηρούμενου ποσοστού ρακεμίσσης [111, 112]. Αρχικά, τα L^{α} -προστατευμένα αμινοξέα ή πεπτιδικά κλάσματα μετατρέπονται σε υδραζίδια και τελικά σε αζίδια αντιδρώντας με νιτρώδη παράγωγα. Η αντίδραση των τελευταίων με την αμινομάδα του αμινο-συστατικού οδηγεί στο σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού.



Μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ο σχηματισμός αμιδίου κατά τη διάρκεια παρασκευής του αζιδίου και η μετάθεση Curtius [113].

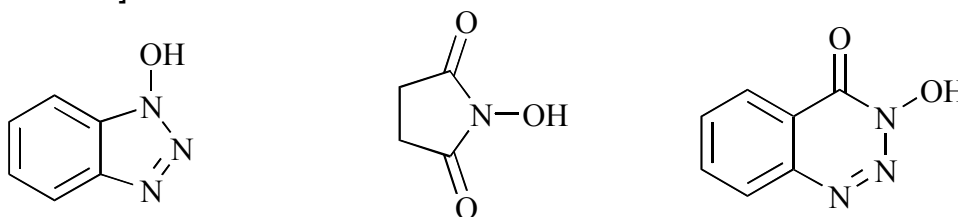
Σχηματισμός αμιδίου





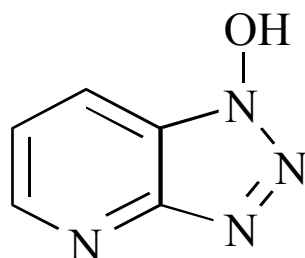
Σχήμα Α.15. Μηχανισμός αντιδράσεων δικυκλοεξυλοκαρβοδιμιδίου

Ο κύριος περιορισμός στη χρήση καρβοδιμιδίων είναι η αφυδάτωση των αμινοξέων Asn και Gln. Η προσθήκη HOBt στο μίγμα της αντίδρασης προλαμβάνει την αφυδάτωση και επιπλέον δρα ως καταλύτης επιταχύνοντας τις αργές αντιδράσεις [58, 117–119]. Το κύριο μειονέκτημα της χρήσης DCC είναι ο σχηματισμός της αδιάλυτης δικυκλοεξυλουρίας κατά την ενεργοποίηση και ακυλίωση. Το πρόβλημα αυτό, καθώς και ο κίνδυνος της αυξημένης ρακεμίωσης αντιμετωπίζεται με τη χρήση πρόσθετων πυρηνόφιλων αντιδραστήριων. Το περισσότερο διαδεδομένο αντιδραστήριο αυτής της κατηγορίας είναι το 1-υδροξυ-βενζοτρίαζόλιο ή HOBt (28) [116–118]. Έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί το *N*-υδροξυ-ηλεκτριμίδιο ή HOSu (29) [120] και η 3-υδροξυ-3,4-διυδρο-1,2,3-βενζοτρίαζιν-4-όνη ή HOObt (30) [116–118].



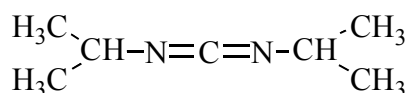
Τα παραπάνω αντιδραστήρια προσβάλλουν το ενδιάμεσο προϊόν της ακυλισοουρίας, σχηματίζοντας έναν ενεργό εστέρα ο οποίος είναι ισχυρό ακυλιωτικό αντιδραστήριο.

Τελευταία στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί ένα νέο αντιδραστήριο, ανάλογο του HOBT, το ονομαζόμενο 1-υδροξυ-7-αζαβενζοτρίαζόλιο ή HOAt (31) [121, 122]. Υποστηρίζεται ότι η χρήση του HOAt αντί του HOBT, ως πρόσθετου αντιδραστηρίου σύζευξης, οδηγεί σε υψηλότερες αποδόσεις σύζευξης για αμινοξέα με στερεοχημική παρεμπόδιση, καθώς και σε χαμηλότερο ποσοστό ρακεμίσωσης.

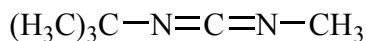


31

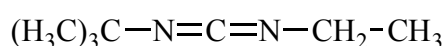
Άλλα καρβοδιιμίδια, τα οποία χρησιμοποιούνται στην πεπτιδική σύνθεση σε στερεά φάση -και των οποίων η σχηματιζόμενη ουρία είναι περισσότερο ευδιάλυτη από την DCU- είναι το *N,N'*-δισοπροπυλοκαρβοδιιμίδιο ή DIC (32) [123, 124], το *N*-τριτοταγές βουτυλο,*N'*-μεθυλοκαρβοδιιμίδιο (33) [125], το *N*-τριτοταγές βουτυλο,*N'*-αιθυλοκαρβοδιιμίδιο (34) [126] και το *N*-αιθυλο,*N'*-[3-(διμεθυλαμινο)προ-πυλο]καρβοδιιμίδιο ή EDC (35) [127].



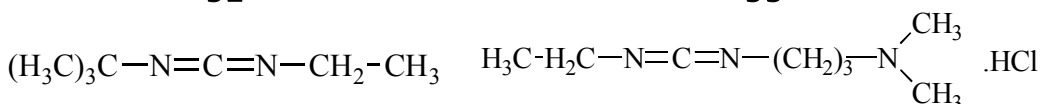
32



33



34

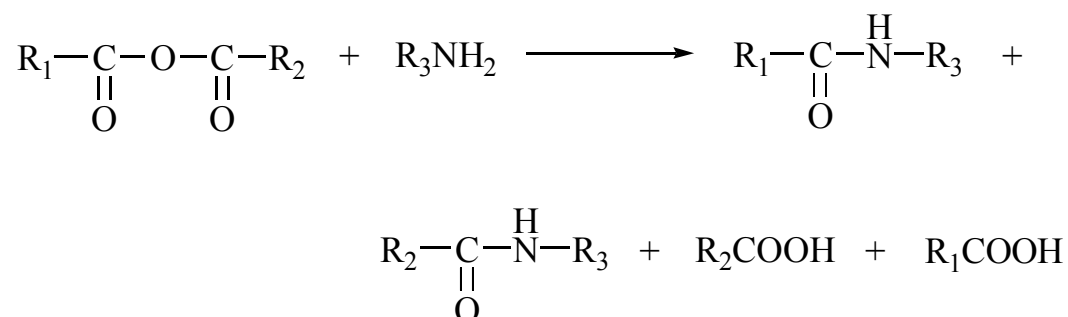


35

A.2.5.3 Μέθοδος των Ανυδριτών.

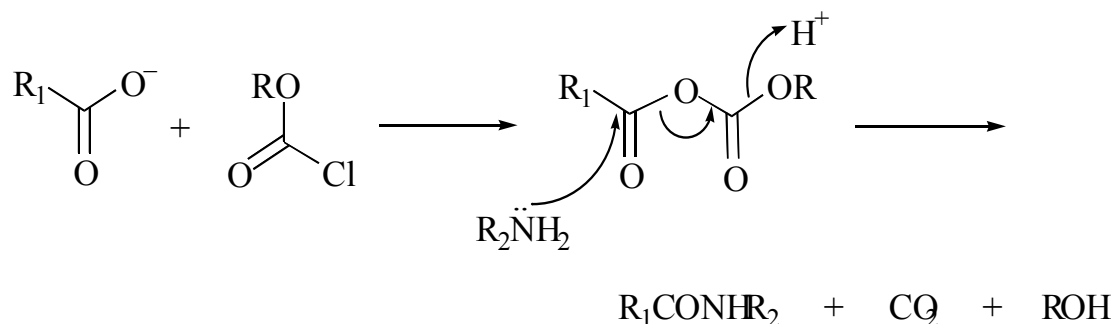
α. Συμμετρικοί ανυδρίτες. Η παρασκευή συμμετρικών ανυδριτών ακυλο-αμινοξέων πραγματοποιείται συνήθως με την επίδραση DCC σε διάλυμα του αντίστοιχου αμινοξέος [128, 129]. Η χρησιμοποίησή τους έχει συνδυαστεί κυρίως με την Boc/Bzl μεθοδολογία σύνθεσης πεπτιδίων. Αν και η αμινόλυση των ανυδριτών είναι ταχύτατη, η μέθοδος παρουσιάζει προβλήματα που σχετίζονται, τόσο με το υψηλό ποσοστό της παρατηρούμενης ρακεμίσωσης, όσο και με την απώλεια της μισής ποσότητας του καρβοξυ-συστατικού.

β. Μικτοί ανυδρίτες με καρβοξυλικά οξέα. Οι μικτοί ανυδρίτες σχηματίζονται μεταξύ ενός ακυλαμινοξέος ή ακυλοπεπτιδίου και ενός καρβοξυλικού οξέος και έχουν χρησιμοποιηθεί στη σύνθεση πεπτιδίων σε υγρή φάση. Το βασικό πρόβλημα που αντιμετωπίζεται κατά την εφαρμογή της μεθόδου είναι η ύπαρξη δύο σχεδόν ισοδύναμων ηλεκτρόφιλων κέντρων, τα οποία κατά την αμινόλυση μπορούν να δώσουν μίγμα προϊόντων.



Η εκλεκτικότητα της αντίδρασης βελτιώνεται με τη χρησιμοποίηση οξέων, των οποίων η στερεοχημική και ηλεκτρονιακή συμπεριφορά μπορεί να κατευθύνει την πορεία της αμινόλυσης προς το σχηματισμό των επιθυμητών προϊόντων. Το πιβαλικό οξύ [(CH₃)₃C-COOH] αποτελεί τη χαρακτηριστικότερη περίπτωση τέτοιου οξέος [128, 129].

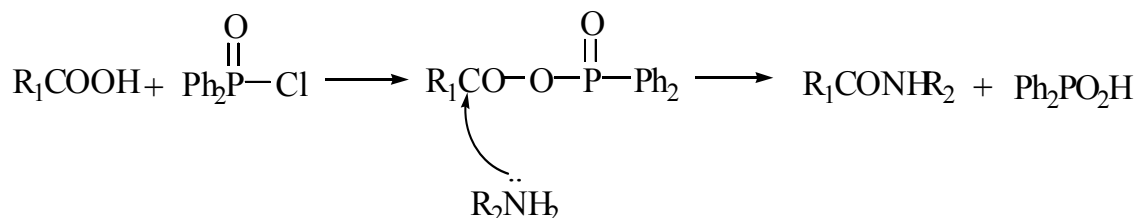
γ. Μικτοί ανυδρίτες του ανθρακικού οξέος. Οι μικτοί ανυδρίτες του ανθρακικού οξέος αποτελούν τη δημοφιλέστερη κατηγορία μικτών ανυδριτών.



Για το σχηματισμό των ενεργοποιημένων παραγώγων χρησιμοποιείται συνήθως ο χλωρομυρμηκικός ισοβουτυλεστέρας και ο χλωρομυρμηκικός αιθυλεστέρας.

Η δραστηριότητα των μικτών ανυδριτών οφείλεται στη μειωμένη ηλεκτροφιλικότητα του ατόμου άνθρακα το οποίο συνδέεται με απλό δεσμό με τα δύο άτομα οξυγόνου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η νουκλεόφιλη προσβολή να πραγματοποιείται στο καρβονύλιο του επιθυμητού καρβοξυσυστατικού.

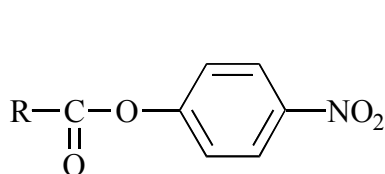
δ. Μικτοί ανυδρίτες των φωσφινικών οξέων. Με τη χρησιμοποίηση των μικτών φωσφινικών ανυδριτών [130] έγινε δυνατό να ξεπεραστούν μερικά από τα μειονεκτήματα των μικτών καρβοξυλικών ανυδριτών, όπως για παράδειγμα η διάσπασή τους από την αύξηση της θερμοκρασίας.



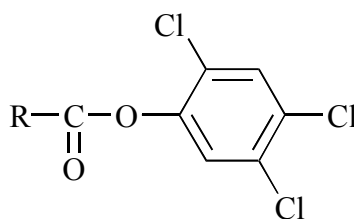
Οι κυριότεροι φωσφινικοί ανυδρίτες που χρησιμοποιούνται είναι οι ανυδρίτες του διφαινυλοφωσφινικού οξέος (Dpp) [131] και του 1-οξο-1-υδροξυ-φωσφολανίου (Cpt) [132]. Οι Cpt ανυδρίτες πλεονεκτούν έναντι των Dpp στην καθαρότητα του τελικού προϊόντος, αφού το παραγόμενο κυκλικό φωσφινικό οξύ είναι διαλυτό στο νερό.

A.2.5.4 Μέθοδος των Ενεργών Εστέρων.

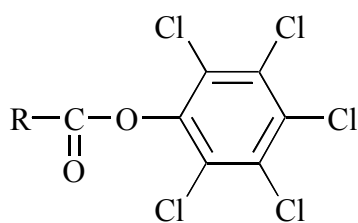
Έχουν γίνει εκτενείς μελέτες για τη χρήση των ενεργοποιημένων εστέρων. Κάποιοι από αυτούς έχουν καθιερωθεί και χρησιμοποιούνται ευρέως στη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση. Κυριότεροι ενεργοί εστέρες είναι οι *π*-νιτροφαινυλεστέρες (ONp) (36) [133], οι 2,4,5-τριχλωροφαινυλεστέρες (OTcp) (37) [134], οι πενταχλωροφαινυλεστέρες (OPcp) (38) [133], οι πενταφθοροφαινυλεστέρες (OPfp) (39) [136], οι 1-υδροξυηλεκτριμιδικοί εστέρες (40) [137], οι 1-υδροξυβενζοτριάζολυλεστέρες (OBt) (41) [116-118], οι 1-οξο-2-υδροξυ-διυδροβενζοτριάζινεστέρες (ODhbt) [138] και οι 1-υδροξυ-7-αζαβενζοτριάζολυλεστέρες (OAt) (42) [121, 122].



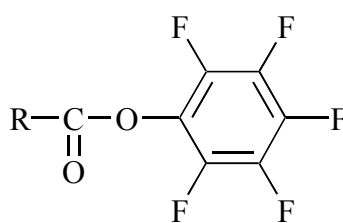
36



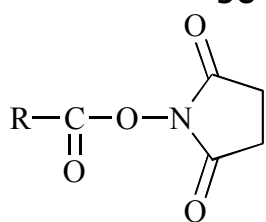
37



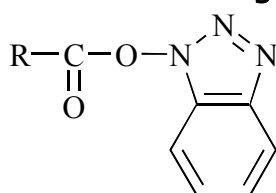
38



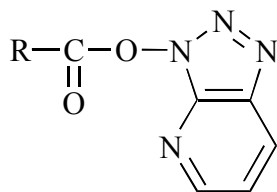
39



40



41



42

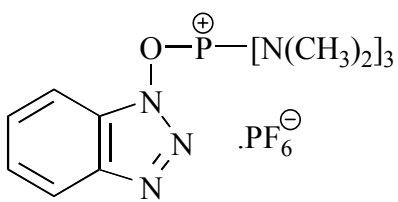
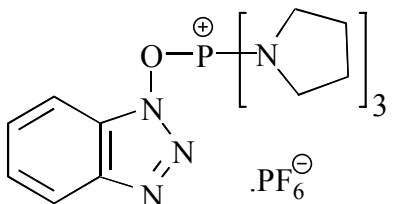
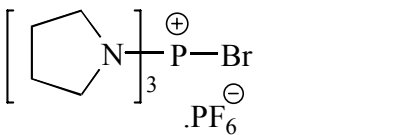
Η σύνθεση των ενεργών εστέρων πραγματοποιείται συνήθως με επίδραση DCC σε μίγμα του M^{α} -προστατευμένου αμινοξέος και κατάλληλης αλκοόλης.

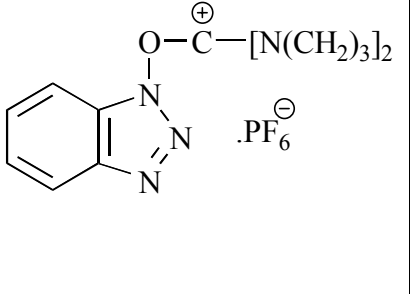
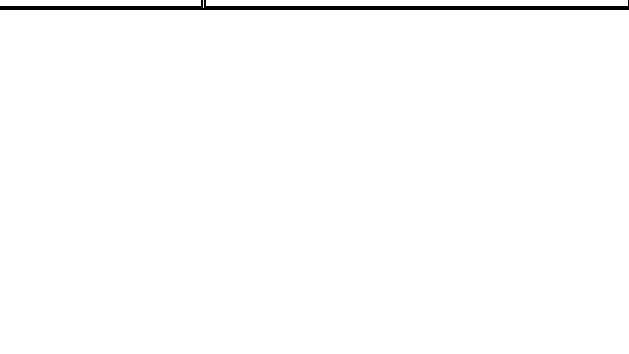
A.2.5.5 Αντιδραστήρια Σύζευξης

Στις μέρες μας, τα *in situ* αντιδραστήρια ενεργοποίησης είναι ευρέως αποδεκτά και χρησιμοποιούμενα λόγω της ευκολίας χρήσης τους, της ταχύτητας των αντιδράσεων ακόμη και όταν χρησιμοποιούνται αμινοξέα με στερεοχημική παρεμπόδιση, καθώς και της έλλειψης παράπλευρων αντιδράσεων. Τα περισσότερα από τα αντιδραστήρια σύζευξης είναι φωσφονικά και ουρονικά άλατα και χρησιμοποιούνται κύρια για την παραγωγή εστέρων του HOBt.


Τα κυριότερα από τα αντιδραστήρια της κατηγορίας αυτής παρουσιάζονται στον Πίνακα A.5

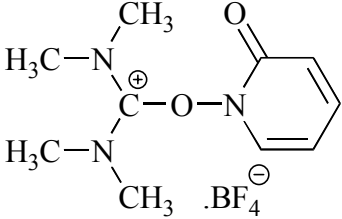
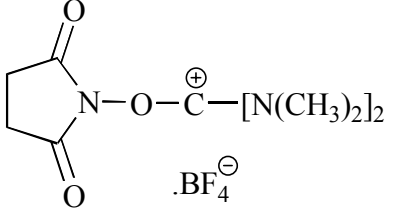
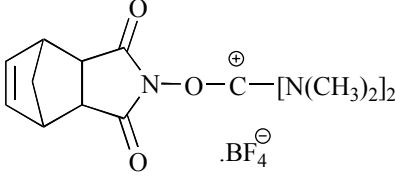
Πίνακας A.5: Φωσφονικά και ουρονικά παράγωγα

Όνομασία	Χημικός Τύπος	Βιβλιογραφία
Εξαφθοροφωσφορικό άλας του βενζοτριαζολυλοξυ-τρεις(διμεθυλαμινο)-φωσφονίου (BOP)		[139]
εξαφθοροφωσφορικό άλας του βενζοτριαζολυλοξυ-τρεις-πυρρολιδινο-φωσφονίου (PyBOP)		[140]
εξαφθοροφωσφορικό άλας του τρεις-πυρρολιδινο		[141]

βρωμιούχου φωσφονίου (PyBroP)		
εξαφωσφορικό άλας της 2-(1H- βενζοτρίαζολυλ)- 1,1,3,3- τετραμεθυλουρίας (HBTU)		[142]
εξαφωσφορικό άλας της O-(7- αζαβενζοτρίαζολυλ)- 1,1,3,3- τετραμεθυλοουρίας (HATU)		[121, 122]

Πίνακας A.5: Συνέχεια

Όνομασία	Χημικός Τύπος	Βιβλιογραφία
τετραφθοροβορικό άλας της 2-(1H- βενζοτρίαζολυλ)- 1,1,3,3- τετραμεθυλουρίας (TBTU)		[142]

<p>τετραφθοροβορικό άλας της 2-[2-οξο- 1(2H)-πυριδυλ]- 1,1,3,3- τετραμεθυλουρίας (TDTU)</p>		<p>[142]</p>
<p>τετραφθοροβορικό άλας της 2- ηλεκτριμιδυλ-1,1,3,3- τετραμεθυλουρίας (TSTU)</p>		<p>[142]</p>
<p>τετραφθοροβορικό άλας της 2-(5- νορβορνεν-2,3- δικαρβοξιμιδο)- 1,1,3,3- τετραμεθυλουρίας (TNTU)</p>		<p>[142]</p>

Η αποτελεσματικότητα και η ταχύτητα των αντιδράσεων έχει ερευνηθεί για αρκετούς ενεργούς εστέρες και αντιδραστήρια σύζευξης [143] και έχουν καταταγεί ως εξής:
BOP/HOBt>DIC/HOBt>DIC/ODhbt>DIC/OPfp.

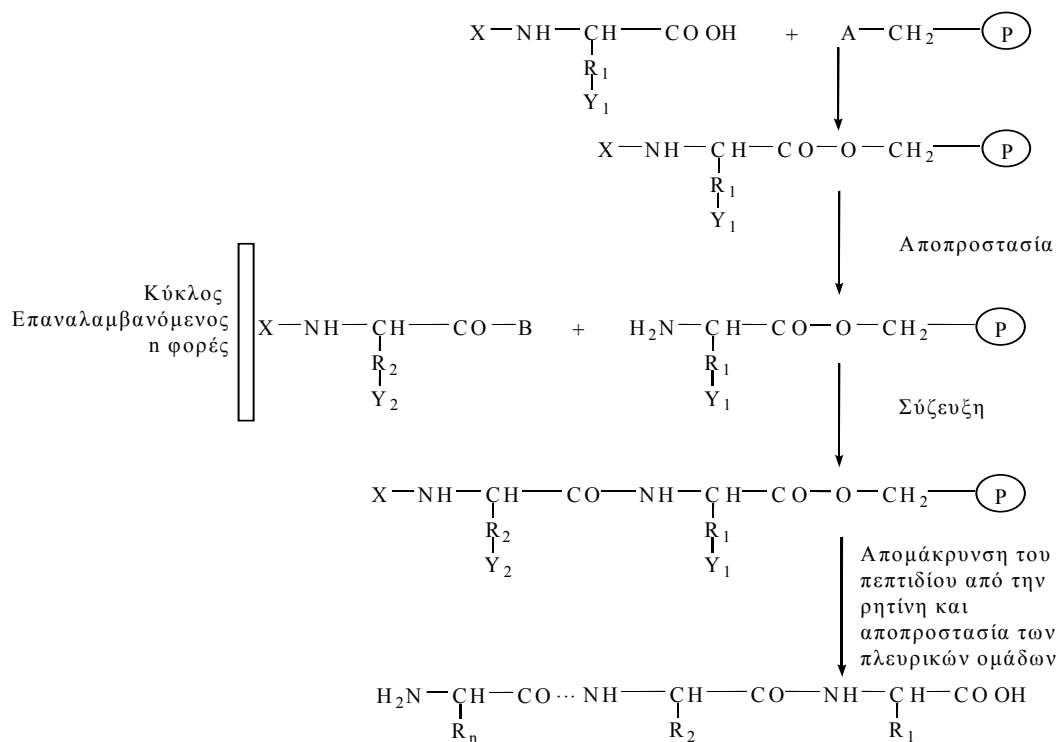
A.2.5.6. Ένζυμα.

Η φύση παρουσιάζει ένα μεγάλο εύρος πρωτεολυτικών ενζύμων, τα οποία μπορούν να καταλύσουν τη δημιουργία πεπτιδικού δεσμού αντί για την υδρόλυση αυτού, ελέγχοντας τις συνθήκες της αντίδρασης.

εισαγωγή της έγινε από τον Merrifield στις αρχές της δεκαετίας του 1960 [144, 145]. Στο κύριο άρθρο [144], παρουσιάστηκε η σύνθεση του τετραπεπτιδίου Leu-Ala-Gly-Val σε αδιάλυτο πολυμερές υπόστρωμα, χρησιμοποιώντας Z-αμινοξέα. Το 1964 έγινε η πρώτη σημαντική τροποποίηση της μεθόδου (από τον ίδιο τον Merrifield) κατά την οποία η Z-ομάδα αντικαταστάθηκε από την Boc-ομάδα για την προστασία της α -αμινομάδας [146]. Η μέθοδος αυτή είναι ταχεία και απλή στους χειρισμούς της. Έτσι, πολλοί ερευνητές επιδόθηκαν στην έρευνα για τη βέλτιστοποίησή της. Χαρακτηριστικό της ταχύτητας της σύνθεσης είναι ότι η σύνθεση του οκταπεπτιδίου της βραδυκινίνης [147] πραγματοποιήθηκε μέσα σε λίγες μόνο ημέρες, ενώ με την κλασική μέθοδο σύνθεσης σε υγρή φάση ανάλογη προσπάθεια θα χρειαζόταν αρκετές εβδομάδες εργασίας. Σήμερα, εκτός ειδικών περιπτώσεων, η μέθοδος σύνθεσης σε στερεή φάση είναι το κύριο εργαλείο των ερευνητών για την παρασκευή πεπτιδίων.

A.2.6.1 Βασικές Αρχές της Μεθόδου

Η ανάπτυξη της πεπτιδικής αλυσίδας πραγματοποιείται αφού το C-τελικό αμινοξύ συνδεθεί μέσω ομοιοπολικού δεσμού με μια χαρακτηριστική ομάδα (linker) ενός αδιάλυτου, στις συνθήκες της σύνθεσης, στερεού υποστρώματος. Ακολουθούν διαδοχικοί κύκλοι αντιδράσεων: απομάκρυνση της M^x -προστατευτικής ομάδας και σύζευξη με το επόμενο M^x -προστατευμένο αμινοξύ. Μεταξύ των αντιδράσεων αυτών παρεμβάλλονται πλύσεις με διάφορους οργανικούς διαλύτες για να απομακρυνθούν τα παραπροϊόντα και τα υπολείμματα των αντιδραστηρίων, καθώς και για την προετοιμασία της ρητίνης για το επόμενο στάδιο.



Σχήμα Α.16. Συνοπτική παρουσίαση της σύνθεσης ενός διπεπτιδίου σε στερεή φάση

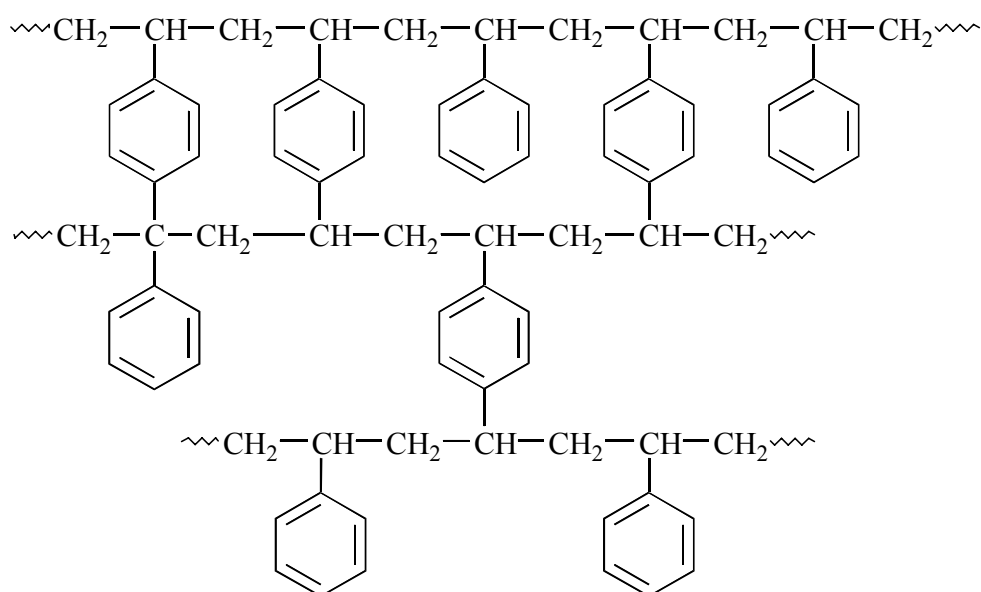
A.2.6.2. Το Στερεό Υπόστρωμα

Η ειδοποιός διαφορά ανάμεσα στη σύνθεση πεπτιδίων σε υγρή και στερεή φάση είναι το στερεό υπόστρωμα. Τα γενικά χαρακτηριστικά τα οποία πρέπει να συγκεντρώνει ένα ιδανικό στερεό υπόστρωμα είναι:

- α) φυσική και χημική σταθερότητα του υποστρώματος σε όλη τη διάρκεια της σύνθεσης
- β) ικανοποιητικός αριθμός ενεργών σημείων ανά μονάδα μάζας για την ανοικοδόμηση της πεπτιδικής αλυσίδας
- γ) δομή τέτοια που επιτρέπει την ταχεία και χωρίς στερεοχημικούς περιορισμούς αλληλεπίδραση μεταξύ του πεπτιδίου και των διαφόρων αντιδραστηρίων

δ) δυνατότητα διαχωρισμού του στερεού υποστρώματος από την υγρή φάση σε κάθε στάδιο της σύνθεσης

Το στερεό υπόστρωμα που χρησιμοποίησε ο Merrifield αποτελείται από κόκκους διάμετρου 20-50 μ μιας συνθετικής ρητίνης, η οποία παρασκευάζεται από συμπολυμερισμό στυρολίου - διβινυλοβενζολίου.



Το ποσοστό του διβινυλοβενζολίου στο συμπολυμερές ήταν αρχικά 2%. Τα πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν ότι με τη μείωση του ποσοστού του διβινυλοβενζολίου στο 1%, η ρητίνη διογκώνεται πολύ περισσότερο στο διχλωρομεθάνιο (βασικός διαλύτης στην πεπτιδική σύνθεση). Η διόγκωση του πολυμερούς είναι αναγκαία, έτσι ώστε τα σημεία στα οποία ανοικοδομείται η πεπτιδική αλυσίδα να είναι εύκολα προσβάσιμα. Έτσι επιτυγχάνονται ταχύτερες και ποσοτικές αντιδράσεις. Η περαιτέρω μείωση του ποσοστού του διβινυλοβενζολίου προκαλεί σημαντικά προβλήματα στη συμπεριφορά της ρητίνης, αφού γίνεται εξαιρετικά μαλακή και η χρησιμοποίησή της δύσκολη. Είναι χαρακτηριστικό ότι τα ενεργά σημεία κατανέμονται μέσα, αλλά και έξω από τους πόρους των σωματιδίων της ρητίνης με τυχαίο τρόπο. Έτσι οι διάφορες αντιδράσεις της πεπτιδικής σύνθεσης γίνονται όχι μόνο στην επιφάνεια των σωματιδίων, αλλά και στο εσωτερικό τους.

Έχουν προταθεί επίσης, ως εναλλακτικές επιλογές, οι πολυαμιδικές ρητίνες [148], όπως το πολυδιμεθυλακρυλαμίδιο [149,150], το πολυαιθυλενοϊμίδιο [151], η πολυακρυλοπυρολιδόνη [152] και η πολυακρυλομορφολίνη [153]. Το μειονέκτημα αυτών των ρητινών είναι η πολύ μικρή υποκατάστασή τους και τα προβλήματα διόγκωσης που παρατηρήθηκαν. Έτσι, σήμερα έχουν επικρατήσει οι ρητίνες στυρολίου - διβινυλοβενζολίου.

Τα τελευταία χρόνια έχει παρουσιαστεί μια νέα σειρά ρητινών με εφαρμογή σε σύγχρονες μεθοδολογίες σύνθεσης, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση σύνθεσης πεπτιδίων με διεργασίες συνεχούς ροής (continuous flow). Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων ρητινών, είναι η NovaSyn® TG ρητίνη [154, 155], όπου το στερεό υπόστρωμα αποτελείται από πολυστυρόλιο πάνω στο οποίο έχουν συνδεθεί μόρια πολυαιθυλενογλυκόλης, η NovaSyn®P ρητίνη [156] και η PEGA ρητίνη [157, 158]. Η ανάπτυξη της πεπτιδικής αλυσίδας σε οποιοδήποτε στερεό υπόστρωμα προϋποθέτει τη σύνδεση του C-τελικού αμινοξέος με αυτό. Η σύνδεση πραγματοποιείται σε συγκεκριμένα κέντρα του πολυμερούς τα οποία έχουν τροποποιηθεί χημικά με την εισαγωγή μιας χαρακτηριστικής ομάδας-συνδέτη (*linker*). Η φύση και η ισχύς του ομοιοπολικού δεσμού πεπτιδίου-ρητίνης επηρεάζει τη στρατηγική, η οποία θα ακολουθηθεί. Για παράδειγμα, στην περίπτωση όπου η απομάκρυνση του πεπτιδίου από τη ρητίνη πραγματοποιείται με τη χρησιμοποίηση πυκνών διαλυμάτων TFA, η επιλογή της N^{α} -Boc-προστατευτικής ομάδας θα καθιστούσε την όλη διαδικασία της σύνθεσης ανέφικτη, αφού σε κάθε κύκλο η αποπροστασία της αμινομάδας θα προκάλούσε την απώλεια σημαντικού μέρους του υπό σύνθεση πεπτιδίου. Επίσης, σήμερα είναι διαθέσιμος ένας μεγάλος αριθμός linker, διευκολύνοντας τη σύνθεση πεπτιδίων με τη μορφή οξέος ή αμιδίου στο C-τελικό αμινοξύ, προστατευμένων πεπτιδικών κλασμάτων κ.ο.κ. Η σύνδεση του C-τελικού αμινοξέος στη ρητίνη συνήθως γίνεται μέσω εστερικού δεσμού. Η σύνδεση συχνά είναι δύσκολη και αν δεν ελεγχούν κάποιες κάθε φορά συνθήκες, μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλή υποκατάσταση, ρακεμίωση ή σχηματισμό

δικετοπιπεραζίνης. Ένας απλός τρόπος για την εστεροποίηση με linkers που περιέχουν υδροξυμεθυλομάδες είναι η χρήση συμμετρικών ανυδριτών του προστατευμένου αμινοξέος παρουσία ποσότητας *π*-διμεθυλαμινονοπυριδίνης (DMAP).

Στην περίπτωση αυτή το ποσοστό της χρησιμοποιούμενης DMAP πρέπει να παραμένει σε καταλυτικά επίπεδα, για να μην επιφέρει προβλήματα ρακεμίωσης [159] και επιπλέον οι τυχόν εναπομένουσες από την παραπάνω διαδικασία ελεύθερες υδροξυλομάδες θα πρέπει να αλκυλιώνονται για να αποφευχθεί ο σχηματισμός ημιτελών πεπτιδίων. Μία καλή εναλλακτική μέθοδος, η οποία όμως απαιτεί μεγαλύτερους χρόνους αντίδρασης, είναι η χρήση 2,6-διχλωροβενζοϋλοχλωριδίου, η οποία δεν προκαλεί ρακεμίωση [160].

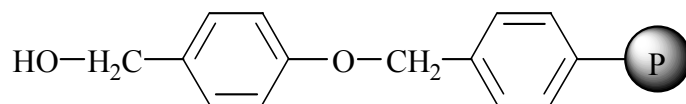
Η χρησιμοποίηση της χλωρομεθυλο- και της υδροξυμεθυλο-ρητίνης συνδυάστηκε με την Boc/Bzl μεθοδολογία σύνθεσης πεπτιδίων. Επειδή η ισχύς του ομοιοπολικού δεσμού πεπτιδίου-ρητίνης είναι αρκετά υψηλή, η απομάκρυνση του πεπτιδίου από τη ρητίνη πραγματοποιείται συνήθως με τη χρησιμοποίηση ισχυρών οξέων, όπως για παράδειγμα HF ή TFMSA. Στην περίπτωση αυτή επιτυγχάνεται και η ταυτόχρονη αποπροστασία των δραστικών πλευρικών ομάδων.

Οι δύο αυτές ρητίνες χρησιμοποιήθηκαν ευρέως, αλλά σύντομα διαπιστώθηκε ότι επηρεάζεται η σταθερότητα του δεσμού πεπτιδίου-ρητίνης στα διαλυμάτα TFA. Η εισαγωγή της φαινυλακεταμιδομεθυλο-ρητίνης (PAM) [161,162] επέλυσε το πρόβλημα αυτό.

Με την εμφάνιση της Fmoc/*t*Bu μεθοδολογίας αναπτύχθηκε μία νέα σειρά ρητινών, χαρακτηριστικό των οποίων είναι οι ήπιες συνθήκες στις οποίες διασπάται ο ομοιοπολικός δεσμός μεταξύ C-τελικού αμινοξέος και συνδέτη (*linker*). Οι κυριότερες από τις ρητίνες αυτής της κατηγορίας είναι:

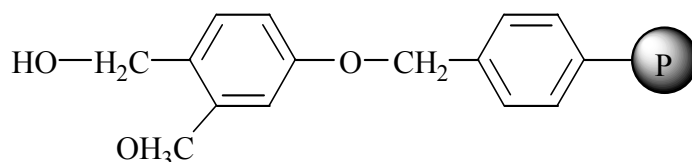
α. Ρητίνη του Wang (43). Η πρώτη ρητίνη αυτής της κατηγορίας των ρητινών, οι οποίες απαιτούν ήπιες συνθήκες για τη διάσπαση του δεσμού μεταξύ του C-τελικού αμινοξέος και συνδέτη (*linker*), παρουσιάστηκε από τον Wang [163] και φέρει το όνομά του. Η *π*-αλκοξυβενζυλο-υδροξυλομάδα, η οποία αποτελεί τη χαρακτηριστική ομάδα με την οποία συνδέεται το C-τελικό

αμινοξύ, επιτρέπει τη χρήση διαλυμάτων TFA (TFA/DCM 50%) για την απομάκρυνση του πεπτιδίου από τη ρητίνη.



43

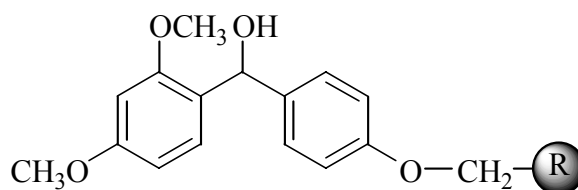
β. Sasrin™ ρητίνη (44). Η Sasrin® (Super Acid Sensitive Resin) παρουσιάστηκε το 1987 [164].



44

Το κύριο χαρακτηριστικό της, όπως φαίνεται από το όνομά της, είναι η πολύ μεγάλη ευαισθησία στα οξέα και έτσι η απομάκρυνση του πεπτιδίου από τη ρητίνη επιτυγχάνεται με τη χρησιμοποίηση διαλύματος 1% TFA/DCM [165]. Λόγω αυτής της ιδιότητας της η Sasrin-ρητίνη έχει χρησιμοποιηθεί στη σύνθεση προστατευμένων πεπτιδικών τμημάτων. Πλεονεκτήματα της ρητίνης είναι η χαμηλή ρακεμίωση την οποία παρουσιάζουν τα προϊόντα της σύνθεσης, ο ικανοποιητικός βαθμός υποκατάστασης (0,45–0,7 meq/g) και η μηχανική σταθερότητα.

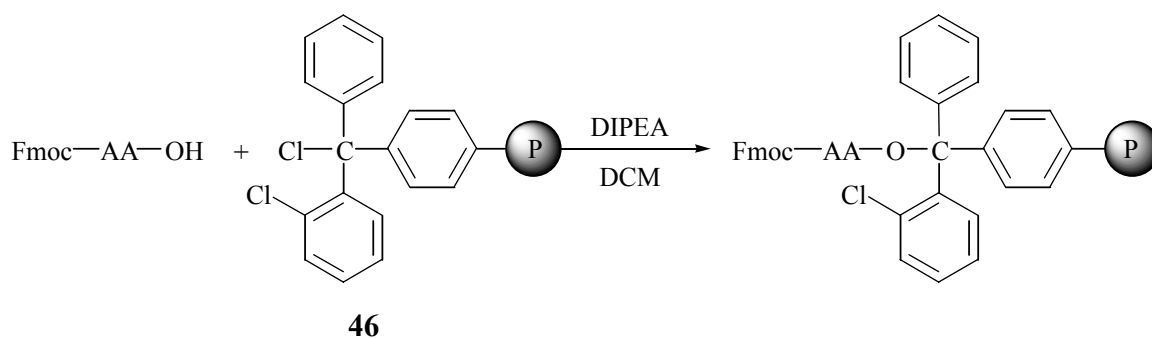
γ. Η ρητίνη του Rink (45). Όπως και η Sasrin, έτσι και η ρητίνη του Rink [166] χαρακτηρίζεται από μεγάλη ευαισθησία έναντι των οξέων.



45

Χρησιμοποιείται, όπως είναι φυσικό, σε συνδυασμό με την Fmoc/*t*Bu μεθοδολογία και η απομάκρυνση του πεπτιδίου από τη ρητίνη πραγματοποιείται κυρίως με αραιά διαλύματα TFA (π.χ. 2% TFA/DCM). Αντικατάσταση της υδροξυλομάδας από αμινομάδα, επιτρέπει τη χρησιμοποίηση της ρητίνης στη σύνθεση αμιδίων.

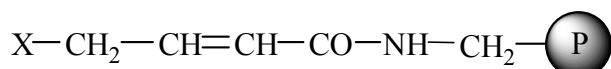
δ. 2-χλωρο-τριφαινυλο-μεθυλο-ρητίνη (Cl-Trt) (46). Η 2-χλωρο-τριφαινυλο-μεθυλο-ρητίνη έχει χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση πεπτιδίων και προστατευμένων πεπτιδικών τμημάτων με εξαιρετικά αποτελέσματα, τόσο στον τομέα της απόδοσης, όσο και στον τομέα της καθαρότητας των προϊόντων [167-169]. Η σύνδεση του πρώτου αμινοξέος (Fmoc-αμινοξύ) στη 2-χλωρο-τριφαινυλο-μεθυλο-ρητίνη γίνεται εύκολα με την επίδραση διισοπροπυλοαιθυλαμίνης (DIPEA).



Η εστεροποίηση αυτή πραγματοποιείται χωρίς κινδύνους ρακεμίσωσης [169] και καθιστά τη Cl-Trt ρητίνη ιδιαίτερα χρήσιμη σε συνθέσεις πεπτιδίων με ιστιδίνη ή κυστεΐνη στο C-τελικό άκρο. Επιπλέον, η στερεοχημική παρεμπόδιση και το +I επαγωγικό φαινόμενο, χαρακτηριστικά της τριτυλομάδας, αποτρέπουν το σχηματισμό δικετοπιπεραζίνης, ακόμα και όταν αυτός ευνοείται [170]. Η απομάκρυνση του πεπτιδίου από τη ρητίνη πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας διάλυμα DCM/TFE/AcOH σε

θερμοκρασία δωματίου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα των δυνατοτήτων της Cl-Trt ρητίνης είναι η επιτυχημένη χρησιμοποίησή της στη σύνθεση πρωτεϊνών και πεπτιδίων τα οποία αριθμούν μέχρι και 109 αμινοξέα [171].

ε. Hycram ρητίνη (47). Η υδροξυ- ή βρωμο-κροτωνυλο-αμινομεθυλο-ρητίνη (Hycram®) [172, 173] έχει χρησιμοποιηθεί με την Boc και με την Fmoc μεθοδολογία σύνθεσης πεπτιδίων.



X = Br, OH

47

Ο δεσμός του πεπτιδίου με τη ρητίνη είναι σταθερός στην επίδραση οξέων ή βάσεων και η απομάκρυνση του πεπτιδίου πραγματοποιείται καταλυτικά. Η παραπάνω διαδικασία οδηγεί στην παραλαβή προστατευμένων πεπτιδικών τμημάτων.

Μειονέκτημα της ρητίνης είναι ότι στην πεπτιδική αλληλουχία δεν πρέπει να υπάρχουν θειο-αμινοξέα, γιατί κατά την απομάκρυνση του πεπτιδίου δηλητηριάζεται ο καταλύτης.

Τα τελευταία χρόνια έχουν προταθεί και άλλες ρητίνες όπως, η βρωμιωμένη ρητίνη (PPOA) [174], η ρητίνη οξιμής [175, 176], η βενζυδρυλαμινο (BHA)- [177] και η μεθυλο-βενζυδρυλαμινο (MBHA)- [178] και η HMPB-ρητίνη [179].

A.2.7. Μέθοδοι Απομάκρυνσης του Πεπτιδίου από τη Ρητίνη.

Η απομάκρυνση του πεπτιδίου από τη ρητίνη πραγματοποιείται συνήθως με την επίδραση κάποιου οξέος. Το είδος της ρητίνης είναι αυτό που καθορίζει και το οξύ το οποίο θα χρησιμοποιηθεί. Σε ρητίνες οι οποίες έχουν συνδυαστεί με τη Boc/Bzl μεθοδολογία σύνθεσης, ο ομοιοπολικός δεσμός πεπτιδίου-ρητίνης είναι αρκετά ισχυρός και η απομάκρυνση του πεπτιδίου πραγματοποιείται με τη βοήθεια ισχυρών οξέων. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε HBr/AcOH με τη

χρήση του οποίου μπορούν εύκολα να απομακρυνθούν οι βεζυλο-τύπου προστατευτικές ομάδες [180].

Αργότερα το AcOH αντικαταστάθηκε από TFA. Παρ' όλα αυτά, η ατελής απόσπαση του πεπτιδίου από τη ρητίνη και ο σχηματισμός παράπλευρων αντιδράσεων, όπως βρωμίωση της τυροσίνης [181] και σχηματισμός κυκλικών διακυλο-ιμιδίων [182], έχουν περιορίσει σημαντικά την εφαρμογή του HBr/TFA. Το 1967 προτάθηκε η χρήση του HF [183]. Η χρήση του HF καθιερώθηκε γρήγορα, γιατί με τον τρόπο αυτό έχουμε μεγαλύτερες αποδόσεις και καθαρότερα προϊόντα, ενώ σχεδόν όλες οι προστατευτικές ομάδες απομακρύνονται ταυτόχρονα με την απόσπαση του πεπτιδίου από τη ρητίνη. Βέβαια το άνυδρο HF σε θερμοκρασία δωματίου είναι αέριο τοξικό και πολύ διαβρωτικό και η χρήση του απαιτεί ειδικό εξοπλισμό.

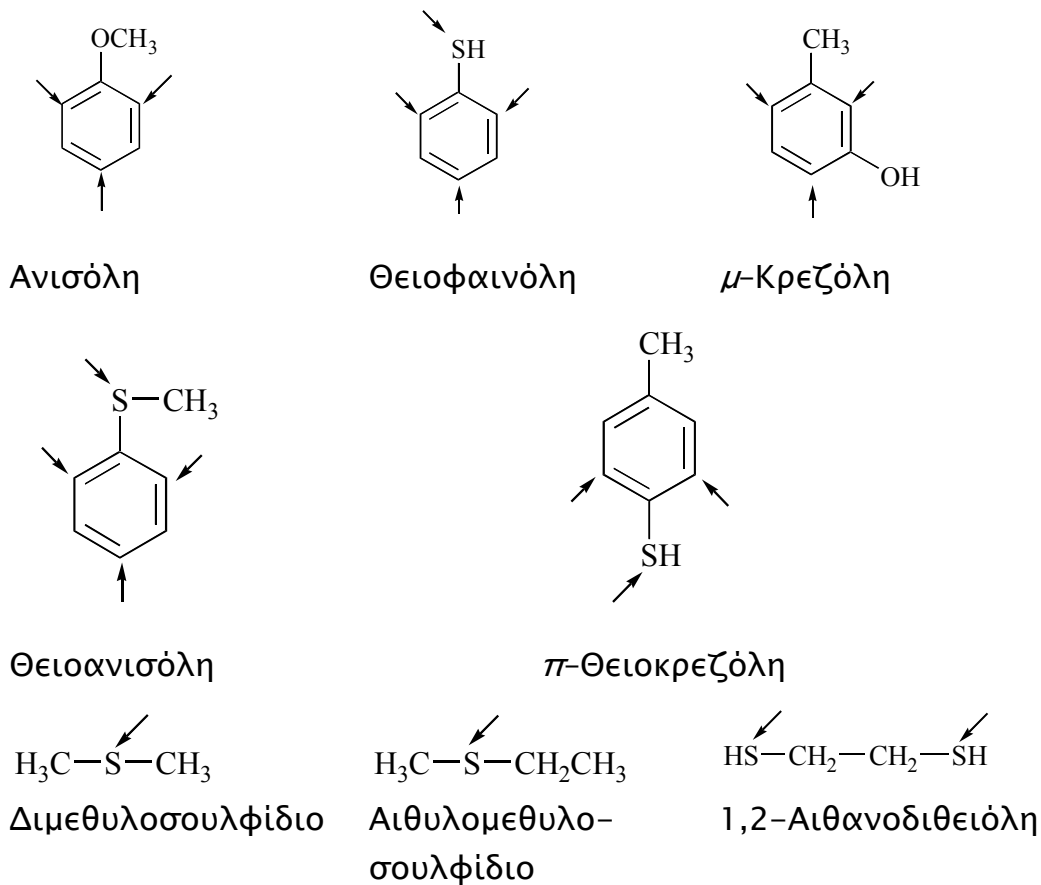
Μία άλλη διαδικασία απόσπασης του πεπτιδίου από τη ρητίνη είναι "χαμηλής-υψηλής συγκέντρωσης σε HF διαδικασία απόσπασης" (low-high HF procedure) [219]. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, όταν το μίγμα της αντίδρασης αποτελείται από ισομοριακό μίγμα HF και διμεθυλοσουλφιδίου (1:3, v/v) ο μηχανισμός της αντίδρασης αλλάζει από SN₁ σε SN₂ ("*low HF*" procedure). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον περιορισμό αλκυλίωσης του δακτυλίου της τυροσίνης και την ελάττωση του ποσοστού σχηματισμού ηλεκτριμιδίου σε πεπτίδια με αλληλουχίες, όπως Asp-Gly, καθώς και του σχηματισμού σουλφοξειδίου της μεθειονίνης. Βέβαια με την παραπάνω διαδικασία δεν μπορεί να αποπροστατευτούν αμινοξέα, όπως η Arg(Tos), Asp(cHx) και Cys(Meb). Για το σκοπό αυτό ακολουθεί η συνήθης κατεργασία με HF ("*high HF*" procedure), οπότε απομακρύνονται όλες οι υπόλοιπες προστατευτικές ομάδες. Είναι σημαντικό να τονισθεί ότι με τη συγκεκριμένη μέθοδο μπορεί να απομακρυνθεί και η φορμυλομάδα από την θρυπτοφάνη χωρίς να χρειαστεί να γίνει ιδιαίτερη αποφορμυλίωση [219].

Για την αντικατάσταση της χρήσης του επικίνδυνου HF έχουν προταθεί εναλλακτικές μέθοδοι απόσπασης του πεπτιδίου από τη ρητίνη, οι οποίες περιλαμβάνουν τη χρήση τριφθορομεθανοσουλφονικού οξέος (TFMSA) [184] ή τη χρήση τριμεθυλοσιλυλο-τριφθορομεθανο-σουλφονικού εστέρα (TMSOTf)

σε TFA ως μέσο αποπροστασίας και απομάκρυνσης του πεπτιδίου από τη ρητίνη [185].

Κάθε διαδικασία απομάκρυνσης των πλάγιων προστατευτικών ομάδων σε όξινες συνθήκες δημιουργεί μια σειρά κατιόντων τα οποία προέρχονται από τις ομάδες αυτές. Τα κατιόντα αυτά μπορούν εύκολα να επαναπροσβάλουν ευαίσθητα σημεία μέσα του υπό σύνθεση μορίου, δημιουργώντας σημαντικό αριθμό παραπροϊόντων, με επίπτωση στην απόδοση και την καθαρότητα των προϊόντων. Για την ελαχιστοποίηση του ποσοστού αυτών των παραπροϊόντων είναι απαραίτητη η προσθήκη στο διάλυμα της αντίδρασης ενώσεων οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να δεσμεύουν τα παραγόμενα κατιόντα, οι οποίες ονομάζονται δεσμευτές (*scavengers*). Χαρακτηριστικά παραδείγματα δεσμευτών (Σχήμα A.17) είναι η ανισόλη, η θειοανισόλη [186], το διμεθυλοσουλφίδιο [219], το αιθυλομεθυλοσουλφίδιο [187], η 2-μερκαπτοαιθανόλη [188], η 1,2-αιθανοδιθειόλη [188], η διθειοθρεϊτόλη [189], η 2-μερκαπτοπυριδίνη [190], η *π*-κρεζόλη και *π*-θειοκρεζόλη [219], ενώ και η προσθήκη νερού στο διάλυμα έχει αποδειχθεί ότι είναι πολλές φορές χρήσιμη [191].

Ανάλογα με τα αμινοξέα που απαρτίζουν το πεπτίδιο και τις προστατευτικές ομάδες που έχουν επιλεγεί, επιλέγεται ο κατάλληλος δεσμευτής ή μίγμα αυτών. Όταν απόσπαση και αποπροστασία ενός πεπτιδίου γίνεται με τη χρήση HF, η προσθήκη ανισόλης βοηθά στην αποφυγή αλκυλίωσης της θρυπτοφάνης από τριτοταγή βουτυλοκατιόντα και βενζυλοκατιόντα. Σε συνδυασμό επίσης με το διμεθυλοσουλφίδιο και την *π*-θειοκρεζόλη, η ανισόλη μπορεί να αποτρέψει την αλκυλίωση της μεθειονίνης [187] και της κυστεΐνης. Πρέπει να σημειωθεί ότι για κάθε διαφορετική μέθοδο απόσπασης και αποπροστασίας οι δεσμευτές που χρησιμοποιούνται σπανίως παραμένουν οι ίδιοι. Έτσι στην περίπτωση του TFMSA χρησιμοποιείται ευρύτατα η 1,2-αιθανοδιθειόλη, ενώ με τη διαδικασία του TMSOTf προτιμάται η *μ*-κρεζόλη.



Σχήμα Α.17. Οι πλέον χρησιμοποιούμενοι δεσμευτές (scavengers). Τα βέλη δείχνουν τις θέσεις όπου δεσμεύονται τα κατιόντα

Οι ευαίσθητες σε οξέα ρητίνες προσέφεραν τη δυνατότητα στους ερευνητές να απομακρύνουν σε πρώτο στάδιο το πεπτιδίο από τη ρητίνη και εν συνεχεία σε δεύτερο στάδιο τις πλάγιες προστατευτικές ομάδες. Για παράδειγμα, η απόσπαση του πεπτιδίου από τη Cl-Trt ρητίνη πραγματοποιείται με τη χρήση διαλύματος DCM/TFE/AcOH (7:2:1, v/v) σε χρονικό διάστημα 2 ωρών [167-169]. Στις συνθήκες αυτές οι πλάγιες προστατευτικές ομάδες μένουν ανέπαφες και για την απομάκρυνσή τους χρησιμοποιείται διάλυμα TFA παρουσία δεσμευτών. Η 1,2-αιθανοδιθειόλη αποτελεί μια πολύ καλή επιλογή για κατιόντα τα οποία προέρχονται από τις *t*Bu-, Boc- και Trt-ομάδες.

Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι πολύ καλά αποτελέσματα λαμβάνονται και με τη χρήση ενώσεων του πυριτίου, όπως τριαιθυλοπυρίτιο ή τρισοπροπυλοπυρίτιο [191, 192].

Κατά καιρούς έχουν προταθεί συγκεκριμένα διαλύματα αποπροστασίας τα οποία μπορούν να ελαχιστοποιήσουν το ποσοστό των παραπροϊόντων, τα οποία δημιουργούνται κατά την τελική αποπροστασία. Τέτοια διαλύματα είναι το αντιδραστήριο R (90% TFA, 2% ανισόλη, 5% θειοανισόλη, 3% 1,2-αιθανοδιθειόλη) [193], το αντιδραστήριο K (82,5% TFA, 5% φαινόλη, 5% θειοανισόλη, 2,5% 1,2-αιθανοδιθειόλη και 5% νερό) [194] και το αντιδραστήριο B (88% TFA, 5% νερό, 5% φαινόλη, 2% τρισοπροπυλοπυρίτιο) [172]. Επίσης, ανάλογα με την επιθυμητή μορφή του υπό σύνθεση πεπτιδίου μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες μέθοδοι απόσπασης, όπως:

- α) Μετεστεροποίηση από αλκοόλη παρουσία τριαιθυλαμίνης [194], η οποία οδηγεί σε πεπτιδικούς εστέρες
- β) Αμμωνόλυση, η οποία οδηγεί σε αμίδια και περιλαμβάνει την επεξεργασία της ρητίνης με κορεσμένο διάλυμα NH_3 σε CH_3OH ή $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ [195]. Η χρησιμοποίηση ρητινών, όπως η MBHA ρητίνη και η ρητίνη του Rink, οι οποίες κατά την όξινη διάσπαση του ομοιοπολικού δεσμού πεπτιδίου - ρητίνης δίνουν κατευθείαν αμίδια, έχει αντικαταστήσει την προηγούμενη διαδικασία σε σημαντικό βαθμό
- γ) Υδραζινόλυση του πεπτιδίου, διαδικασία η οποία πραγματοποιείται με μίγμα άνυδρης υδραζίνης σε DMF (1:9) και η οποία οδηγεί σε υδραζίδια [196]. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί όταν υπάρχουν στο πεπτίδιο β - και γ -καρβοξυ-προστατευμένα ασπαραγινικό και γλουταμινικό οξέα, αφού μετατρέπονται σε πλευρικά αζίδια. Στην περίπτωση αυτή η μέθοδος δεν είναι εφαρμόσιμη.

A.2.8 Κριτική Της Μεθόδου Σύνθεσης Πεπτιδίων Σε Στερεή Φάση

Η ανάπτυξη της μεθόδου σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση αποτέλεσε τη βασική αιτία για την αλματώδη εξέλιξη της πεπτιδικής χημείας τα τελευταία τριανταπέντε χρόνια. Οι δυνατότητες τις οποίες προσφέρει, όσον αφορά στην ταχύτητα της σύνθεσης, στην απλότητα των χειρισμών αλλά και στην απόδοση των αντιδράσεων, έχουν συντελέσει ώστε την τελευταία δεκαπενταετία να αποτελεί την κύρια μέθοδο σύνθεσης πεπτιδίων.

Θα πρέπει βέβαια να σημειωθεί ότι για την ανάπτυξη της μεθόδου σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση χρησιμοποιήθηκε η εμπειρία και η γνώση από τη σύνθεση πεπτιδίων σε υγρή φάση. Έτσι, τόσο οι πλευρικές προστατευτικές ομάδες, όσο και τα αντιδραστήρια σύζευξης τα οποία χρησιμοποιήθηκαν αρχικά, είχαν παρουσιαστεί πολύ πιο πριν από την εισαγωγή της μεθόδου σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση. Για παράδειγμα τα αντιδραστήρια δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμίδιο και PyBOP® μελετήθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν πρώτα στη σύνθεση πεπτιδίων σε υγρή φάση.

Εκτός όμως από τα ιδιαίτερα πλεονεκτήματα, η μέθοδος σύνθεσης σε στερεή φάση παρουσιάζει και ορισμένα μειονεκτήματα, όπως:

- α) Ατελείς αντιδράσεις αποπροστασίας και σύζευξης, συνέπεια των οποίων είναι ο σχηματισμός ελλειπών πεπτιδίων.
- β) Απώλεια του πεπτιδίου από τη ρητίνη κατά τη διάρκεια των επαναλαμβανομένων διαδικασιών και κυρίως κατά τις διαδοχικές επιδράσεις του TFA στην περίπτωση εφαρμογής της Boc/Bzl μεθοδολογίας.
- γ) Την αδυναμία συνεχών και επαρκών αναλυτικών ελέγχων κατά την πορεία των αντιδράσεων σύνθεσης.

Για τον έλεγχο της απόδοσης των αντιδράσεων σύζευξης χρησιμοποιείται κυρίως η χρωματομετρική μέθοδος του Kaiser

[197] (αντίδραση νινυδρίνης). Για τον έλεγχο της αποπροστασίας, όταν χρησιμοποιείται η Fmoc/tBu μεθοδολογία, χρησιμοποιείται η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, γιατί η Fmoc-ομάδα απορροφά στα 300–320 nm και τα N^{α} -Fmoc-προστατευμένα πεπτιδία είναι λιγότερο υδρόφιλα, οπότε διαχωρίζονται από τα αντίστοιχα απροστάτευτα πεπτιδία στα συστήματα ανάπτυξης των χρωματογραφιών αυτών.

Στον Πίνακα Α.6 παρουσιάζονται συνοπτικά τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα των μεθόδων σύνθεσης σε υγρή και στερεή φάση.

Πίνακας Α.2.2: Σύγκριση των μεθόδων πεπτιδικής σύνθεσης

Σύνθεση σε στερεή φάση	
<i>Πλεονεκτήματα</i>	<i>Μειονεκτήματα</i>
Ταχεία – Απλή	Παραλαβή μίγματος προϊόντων
Απουσία προβλημάτων αδιαλυτότητας	Εκτεταμένος και προσεκτικός καθαρισμός του τελικού προϊόντος
Αποφυγή των ενδιάμεσων επίπονων καθαρισμών	Δυσχερής ταυτοποίηση και ανάλυση των ενδιάμεσων προϊόντων
Δυνατότητα αυτοματοποίησης	
Σύνθεση σε υγρή φάση	
<i>Πλεονεκτήματα</i>	<i>Μειονεκτήματα</i>

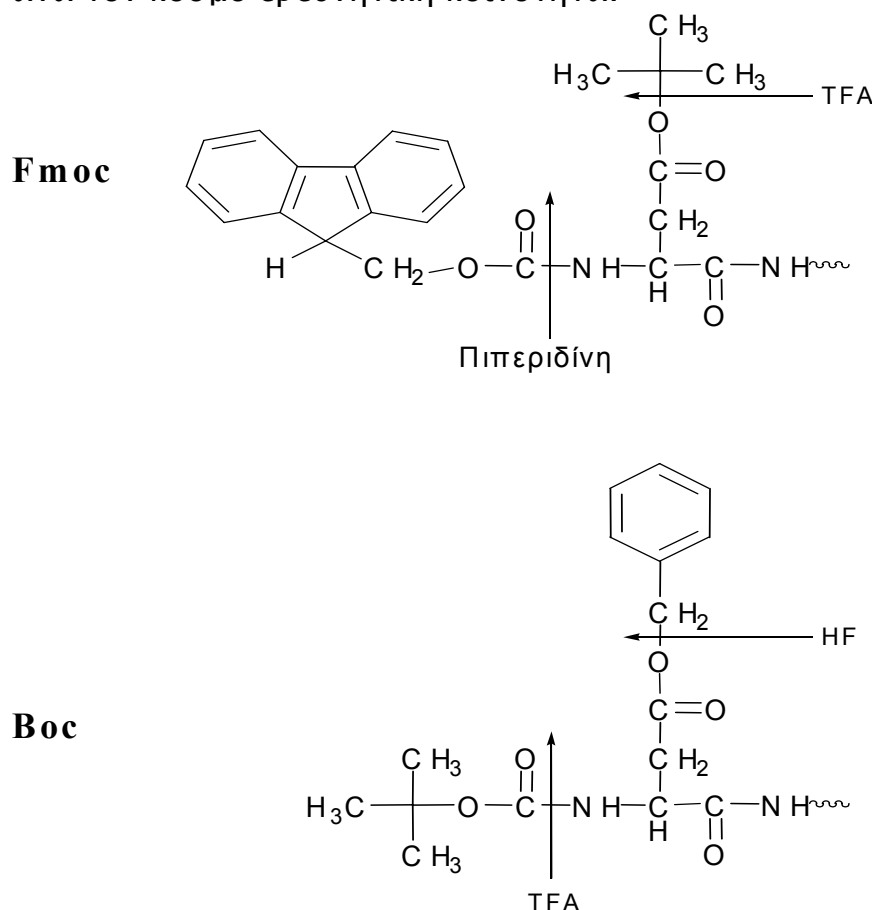
Ομογενές προϊόν	Αργή και επίπονη
Δυνατότητα καθαρισμού και ταυτοποίησης των ενδιαμέσων προϊόντων	Προβλήματα αδιαλυτότητας των ενδιαμέσων προϊόντων
	Υψηλό κόστος σύνθεσης

A.2.9 ΣΥΓΚΡΙΣΗ Fmoc/tBu ΚΑΙ Boc/Bzl ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ

Εξετάζοντας τις συνθετικές επιλογές οι οποίες μπορούν να εφαρμοστούν στη στερεή φάση, παρατηρούμε την ύπαρξη δύο βασικών μεθοδολογιών. Την Boc/Bzl μεθοδολογία και την Fmoc/tBu. Η χρησιμοποίηση της Boc-ομάδας για την προστασία της α -αμινομάδας και των βενζυλο-τύπου πλάγιων προστατευτικών ομάδων ήταν η βασική επιλογή για τη σύνθεση πεπτιδίων μέχρι πριν κάποια χρόνια. Από τις αρχές της δεκαετίας του 1990 η ανάπτυξη ευαίσθητων σε οξέα ρητινών καθιέρωσαν την Fmoc/tBu μεθοδολογία, λόγω των ιδιαίτερων πλεονεκτημάτων της, όπως η καθαρότητα των προϊόντων, η υψηλή απόδοση και η δυνατότητα ελέγχου της πορείας της σύνθεσης. Ταυτόχρονα η χρησιμοποίηση της Fmoc/tBu μεθοδολογίας δίνει τη δυνατότητα παραλαβής προστατευμένων πεπτιδικών τμημάτων, γεγονός που επιτρέπει τη σύνθεση σχετικά μεγάλων σε μέγεθος πεπτιδίων μέσω συμπύκνωσης των αντίστοιχων πεπτιδικών κλασμάτων. Το μοναδικό ίσως μειονέκτημα της Fmoc/tBu μεθοδολογίας, έναντι της Boc/Bzl, είναι το κόστος της σύνθεσης αφού τόσο τα παράγωγα των χρησιμοποιούμενων αμινοξέων, όσο και οι ρητίνες έχουν πολλαπλάσια τιμή έναντι των αντίστοιχων που χρησιμοποιούνται με τη Boc/Bzl.

Η ανάπτυξη της Fmoc/tBu μεθοδολογίας σύνθεσης ωθήθηκε από το γεγονός ότι η επαναλαμβανόμενη χρήση του TFA για την απομάκρυνση της Boc-ομάδας, μπορεί να έχει επιπτώσεις στους ευαίσθητους πεπτιδικούς δεσμούς καθώς και να ευνοήσει όξινα καταλυόμενες παράπλευρες αντιδράσεις. Στην Fmoc στατηγική, το πεπτίδιο που ανοικοδομείται υπόκειται σε ήπια βασικές συνθήκες με χρήση πιπεριδίνης κατά την απομάκρυνση της Fmoc-ομάδας,

ενώ TFA απαιτείται μόνο κατά την τελική αποπροστασία και απόσπαση του πεπτιδίου από τη ρητίνη (Σχήμα A.18). Εν αντιθέσει, η αποπροστασία από τις πλάγιες προστατευτικές ομάδες και η απόσπαση του πεπτιδίου από τη ρητίνη στη Boc στρατηγική απαιτεί τη χρήση του επικίνδυνου HF και ακριβές συσκευές, οι οποίες δεν είναι πάντα διαθέσιμες σε πολλούς ερευνητές. Στο παρελθόν, το κόστος των Fmoc αντιδραστηρίων ήταν αποτρεπτικός παράγοντας για την αποδοχή της Fmoc/ tBu μεθοδολογίας. Όμως, η παραγωγή σε βιομηχανική κλίμακα των αντιδραστηρίων αυτών, οι συναγωνιστικές πια τιμές και η δημοσίευση πολλών πλεονεκτημάτων της Fmoc χημείας, έχουν συνεισφέρει την ευρύτερη αποδοχή της Fmoc στρατηγικής στην ανά τον κόσμο ερευνητική κοινότητα.



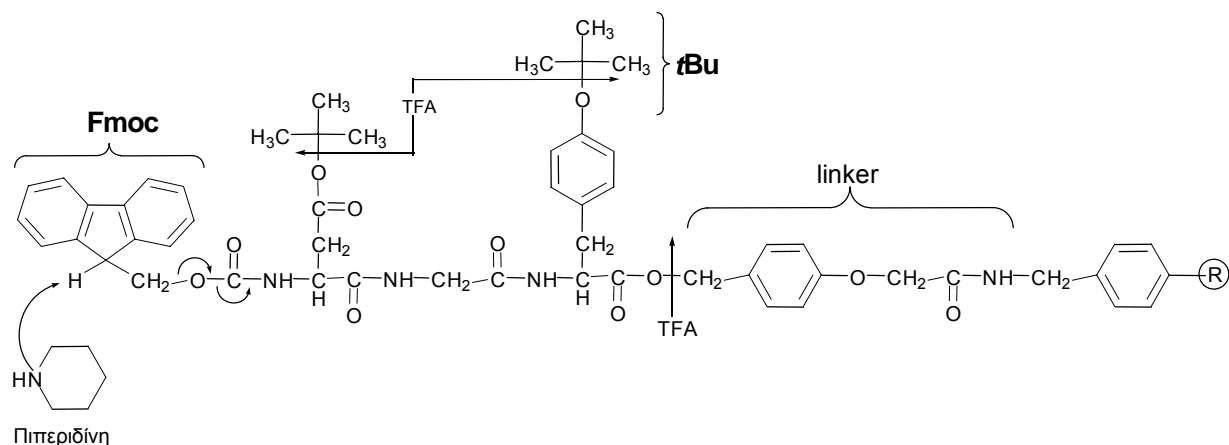
Σχήμα A.18. Στρατηγικές προστασίας στην πεπτιδική σύνθεση σε στερεά φάση

Υπάρχουν στη βιβλιογραφία δημοσιεύσεις οι οποίες συγκρίνουν τις αποδόσεις σε καθαρό πεπτίδιο που έδειξαν ότι η χρήση της

Fmoc/*t*Bu μεθοδολογίας έδωσε ιδιαίτερα καλά αποτελέσματα [198]. Νεώτερα αποτελέσματα συνθέσεων πεπτιδίων με αλληλουχία που κάνει προβληματική τη σύνθεσή τους, όπως για παράδειγμα πεπτίδια που περιέχουν πολλά υδροφοβικά αμινοξέα, δείχνουν καθαρά ότι η Fmoc στρατηγική και ιδιαίτερα η συνεχούς ροής, υπερέχει έναντι της Boc/Bzl μεθοδολογίας [199]. Έχει γίνει μάλιστα το εξής ενδιαφέρον πείραμα για τη σύγκριση των δύο μεθοδολογιών: 40 εργαστήρια της Assosiation of Biomolecular Research Facilities (ABRF) συνέθεσαν ένα πεπτίδιο με δεκαέξι αμινοξέα, χρησιμοποιώντας Boc ή Fmoc χημεία και επιλέγοντας διάφορες ρητίνες και προστατευτικές ομάδες [200]. Αυτό το πεπτίδιο είχε δυνητικές θέσεις για μετασυνθετικές τροποποιήσεις και σε πολλές θέσεις η σύζευξη ήταν προβληματική ή πολύ αργή. Τα εργαστήρια - μέλη κλήθηκαν να παρέχουν ένα ακαθάριστο (όπως λαμβάνεται μετά το σπάσιμο από τη ρητίνη και την αποπροστασία από τις πλάγιες προστατευτικές ομάδες, *crude*) πεπτίδιο για να αναλυθεί με διάφορες μεθόδους.

Τα αποτελέσματα απέδειξαν την υπεροχή της Fmoc στρατηγικής. Πάνω από 33% των δειγμάτων που έγιναν χρησιμοποιώντας την Boc χημεία δεν περιείχε το επιθυμητό πεπτίδιο, ενώ σε ποσοστό 44% των ακαθάριστων προϊόντων που περιείχαν το επιθυμητό πεπτίδιο, όταν αυτό απομονώθηκε δεν ήταν πάνω από 25% του συνολικού προϊόντος. Εν αντιθέσει, 31% των δειγμάτων που έγιναν με τη Fmoc μεθοδολογία είχε πάνω από 75% του επιθυμητού πεπτιδίου.

Βέβαια, η καθαρότητα των καλύτερων δειγμάτων που έγιναν με τη Boc χημεία ήταν συγκρίσιμη με αυτή των καλύτερων δειγμάτων που ελήφθησαν με τη Fmoc χημεία. Αυτό υποδεικνύει ότι, σε επιδέξια και έμπειρα χέρια, και οι δύο μεθοδολογίες μπορούν να δώσουν εξίσου καλά αποτελέσματα. Ταυτόχρονα όμως φαίνεται ότι για το "*μέσο χρήστη*" η Fmoc/*t*Bu μεθοδολογία σύνθεσης είναι πιο εύκολη και πιθανά πιο αποτελεσματική να δώσει τα καλύτερα αποτελέσματα στην πεπτιδική σύνθεση. Το Σχήμα A.19 παρουσιάζει την προστατευτική ομάδα και τη στρατηγική απόσπασης για την Fmoc χημεία.



Σχήμα A.19. Προστατευτικές ομάδες και στρατηγική απόσπασής τους κατά την Fmoc/tBu μεθοδολογία σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεά φάση

A.2.10 Σύνθεση Πεπτιδίων Σε Στερεή Φάση Υπό Συνεχή Ροή (Continuous Flow)

Σύμφωνα με τη μεθοδολογία της σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεά φάση υπό συνεχή ροή, τα αντιδραστήρια της σύνθεσης διέρχονται με συνθήκες συνεχούς ροής μέσα από μια στήλη η οποία περιέχει το στερεό υπόστρωμα πάνω στο οποίο ανοικοδομείται το υπό σύνθεση πεπτίδιο. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η μεθοδολογία αυτή είναι συμβατή μόνο με τη Fmoc/tBu στρατηγική.

Η πορεία των αντιδράσεων παρακολουθείται με UV φωτοκύτταρο ροής. Τη δυνατότητα αυτή παρέχει η ιδιότητα της Fmoc ομάδας να απορροφά στα 300–320 nm [201]. Η όλη διαδικασία είναι αυτοματοποιημένη και οι γρήγορες αλλαγές των διαλυτών ελαττώνουν τους χρόνους των πλύσεων και την κατανάλωσή τους. Επίσης, η χρήση πολλαπλών κολώνων διευκολύνει τη σύνθεση αναλόγων. Τέλος, η ρητίνη καταπονείται λιγότερο και υπάρχουν λιγότερες φυσικές φθορές, από ότι όταν αναδεδεύεται ή αναταράσσεται συνεχώς.

Έχει σχεδιαστεί μία σειρά ρητινών ειδικά για την continuous flow σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση όπως, PepSyn[®], Ultrosyn[®], NovaSyn KA[®], ενώ είναι διαθέσιμες πολλές ειδικές συσκευές Fmoc-Continuous-Flow σύνθεσης (Pharmacia KKB 4175, MiUigen 9020, MiUigen 9050, Pharmacia-LKB Biolyn, κ.λ.π.)

A.2.11. Ανεπιθύμητες Αντιδράσεις Κατά Την Πεπτιδική Σύνθεση

Υπάρχουν πολλά προβλήματα που μπορούν να προκύψουν κατά την πεπτιδική σύνθεση, ανάλογα με την αλληλουχία και τα αμινοξέα που περιέχει, την επιλογή της στρατηγικής που θα ακολουθηθεί (Fmoc/*t*Bu ή Boc/Bzl), την επιλογή των επιμέρους προστατευτικών ομάδων των πλάγιων δραστικών αλυσίδων, τη μέθοδο αποπροστασίας από αυτές και τη μέθοδο απόσπασης του πεπτιδίου από τη ρητίνη. Μερικά από αυτά μελετώνται παρακάτω. Όλα τα προβλήματα αντιμετωπίζονται κατά περίπτωση και κατ' εκτίμηση.

A.2.11.1 Ρακεμίωση

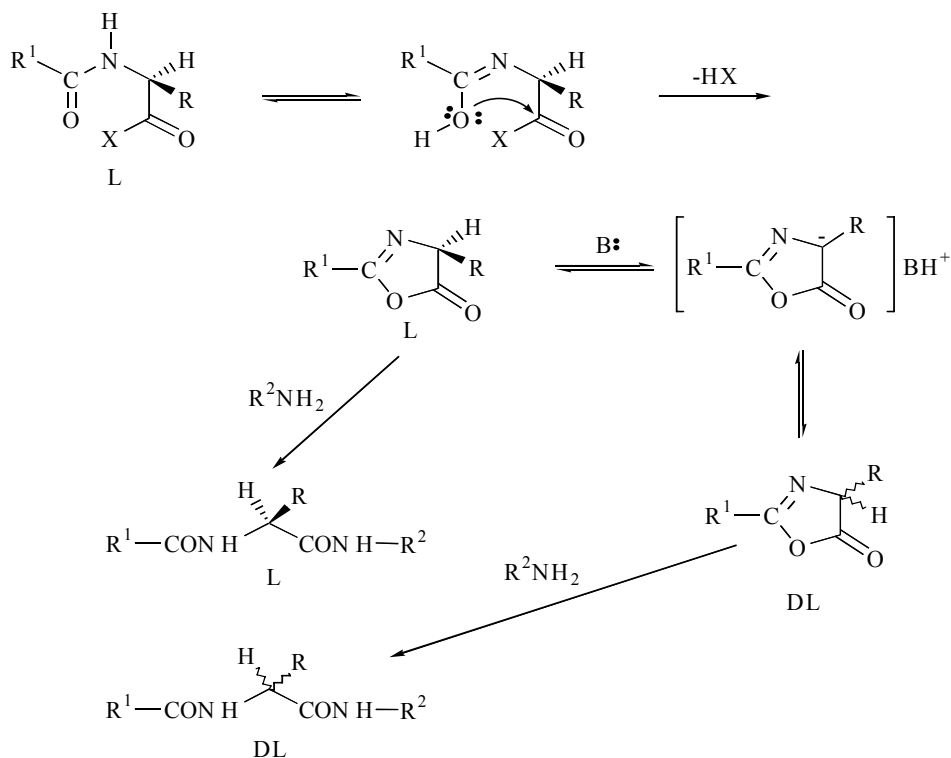
Η ρακεμίωση είναι σημαντικό πρόβλημα στην πεπτιδική σύνθεση, αφού ο διαχωρισμός των μιγμάτων των διαστερομερών συχνά είναι πολύ δύσκολος, ενώ η απώλεια της οπτικής καθαρότητας διαφοροποιεί κατά πολύ τις βιολογικές ιδιότητες ενός πεπτιδίου. Η ταχύτητα και η έκταση της ρακεμίωσης εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από τη χρησιμοποιούμενη βάση, το διαλύτη, αλλά και τις ηλεκτρονιακές επιδράσεις των ομάδων γύρω από το ασύμμετρο άτομο άνθρακα. Έτσι στην περίπτωση κατά την

οποία χρησιμοποιείται μια ισχυρή βάση, χωρίς ιδιαίτερη στερεοχημική παρεμπόδιση, τα ποσοστά ρακεμίωσης είναι πολύ μεγαλύτερα. Με την αύξηση επίσης της πολικότητας του διαλύτη (π.χ. περιπτώσεις χρήσης DMF ή DMSO) αυξάνεται και το ποσοστό της παρατηρούμενης ρακεμίωσης.

Ταυτόχρονα, όσο ισχυρότερα έλκει ηλεκτρόνια η ομάδα με την οποία ενεργοποιείται το καρβονύλιο του αμινοξέος, τόσο αυξάνει και η πιθανότητα δημιουργίας ρακεμικών προϊόντων. Τέλος αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνει τον κίνδυνο ρακεμίωσης, ενώ πολλές φορές και η ίδια η φύση των αμινοξέων που λαμβάνουν μέρος στην αντίδραση σύζευξης επηρεάζει την οπτική καθαρότητα των προϊόντων [116, 117, 118, 202, 203]. Η ρακεμίωση λαμβάνει χώρα κυρίως στα στάδια ενεργοποίησης και σύζευξης. Οι βασικοί μηχανισμοί ρακεμίωσης είναι ο σχηματισμός οξαζολόνης (αζλακτόνης) και η απόσπαση πρωτονίου.

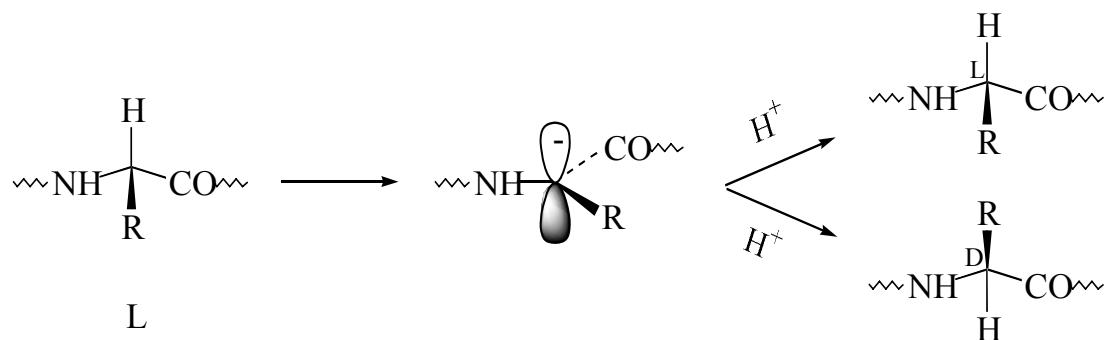
α. Σχηματισμός οξαζολόνης. Είναι ο περισσότετρο συναντώμενος μηχανισμός στην πεπτιδική σύνθεση. Ενεργοποιημένα ακυλο-αμινοξέα και πεπτιδία σε βασικό περιβάλλον μπορούν να κυκλοποιηθούν δίνοντας οξαζολόνες [5(4H)-οξαζολόνη ή αζλακτόνη] [204]. Η οξαζολόνη, η οποία αποτελεί από μόνη της ενεργοποιημένο παράγωγο, μπορεί να δεχθεί νουκλεόφιλη προσβολή από την ελεύθερη αμινομάδα, οδηγώντας σε καθαρό προϊόν ή να υποστεί απόσπαση πρωτονίου από τη βάση και να οδηγήσει στο σχηματισμό ρακεμικού προϊόντος (Σχήμα A.21).

Ο σχηματισμός της οξαζολόνης ευνοείται ιδιαίτερα στα N^{α} -βενζουλο- και N^{α} -ακετυλο-αμινοξέα, ενώ περιορίζεται σημαντικά όταν για την N^{α} -προστασία χρησιμοποιούνται ουρεθανικού τύπου ομάδες.



Σχήμα Α.21. Μηχανισμός ρακεμίωσης μέσω σχηματισμού οξαζολόνης

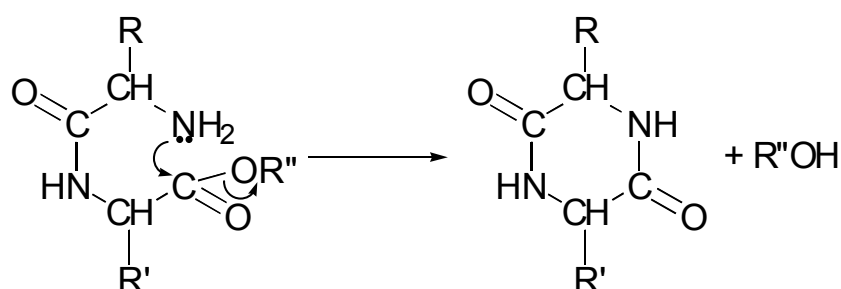
β. Απευθείας απόσπαση του πρωτονίου του α-ατόμου C. Η απόσπαση του πρωτονίου από το α-άτομο άνθρακα έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ρακεμικών προϊόντων, αφού το ενδιάμεσο καρβανιόν μπορεί να πρωτονιωθεί από οποιαδήποτε πλευρά [205] (Σχήμα Α.22).



Σχήμα Α.22. Μηχανισμός ρακεμίωσης μέσω απόσπασης πρωτονίου από το α-άτομο C

A.2.11.2 Σχηματισμός Δικετοπιπεραζινών

Κατά την ανοικοδόμηση της πεπτιδικής αλυσίδας, η προσθήκη του τρίτου αμινοξέος (ή ενός πεπτιδίου) σε ένα διπεπτίδιο μπορεί να είναι προβληματική. Οι εστέρες των διπεπτιδίων (όπου R'' αλκύλιο ή ρητίνη με *linker*) υφίστανται αυθόρμητη κυκλοποίηση και παράγουν 2,5-δικετοπιπεραζίνες (Σχήμα A.23).



Σχήμα A.23. Μηχανισμός σχηματισμού δικετοπιπεραζινών

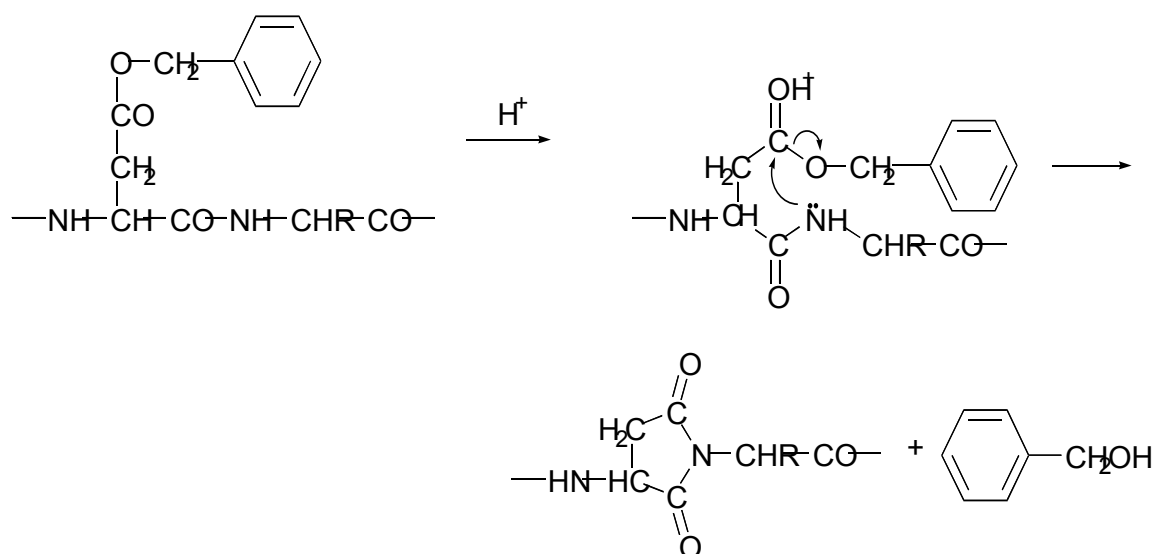
Στις δικετοπιπεραζίνες που προκύπτουν και τα δύο αμίδια είναι *cis*, ενώ, όπως είδαμε μιλώντας για τον πεπτιδικό δεσμό, ο δεσμός C-N έχει χαρακτήρα διπλού δεσμού και έτσι μπορεί να θεωρηθεί *trans*. Η οδηγούσα δύναμη (*driving force*) για το μετασχηματισμό αυτό είναι η δημιουργία του πολύ σταθερού δακτυλίου της δικετοπιπεραζίνης.

Η αντίδραση ευνοείται ιδιαίτερα στα πεπτίδια που περιέχουν γλυκίνη και προλίνη. Στην πρώτη περίπτωση λόγω της έλλειψης πλευρικής αλυσίδας, η οποία θα εμπόδιζε στερεοχημικά το σχηματισμό δακτυλίου, και στη δεύτερη περίπτωση επειδή η κυκλική πλευρική αλυσίδα της προλίνης "ταιριάζει" στη δομή της δικετοπιπεραζίνης. Ο σχηματισμός δικετοπιπεραζίνης ευνοείται επίσης στην περίπτωση όπου το ένα αμινοξύ είναι L και το άλλο D στερεοχημικής διαμόρφωσης.

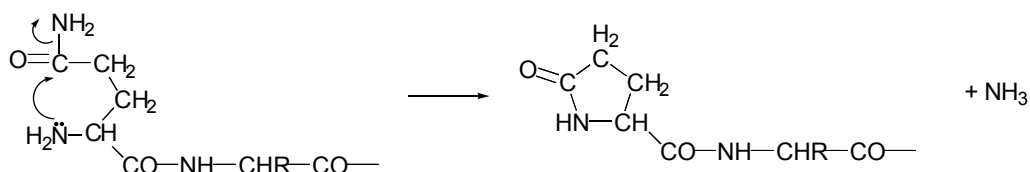
Υψηλές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων αυξάνουν τη ταχύτητα της επιθυμητής αντίδρασης σύζευξης και μειώνει το βαθμό της κυκλοποίησης.

A.2.11.3 Όξινα Καταλυόμενος Σχηματισμός Δακτυλίων

Σε ισχυρά όξινες συνθήκες πεπτίδια που περιέχουν β -ασπαρτυλο αμινοξέα μετατρέπονται σε αμινοηλεκτρολυτο πεπτίδια:

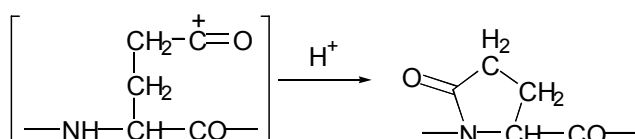
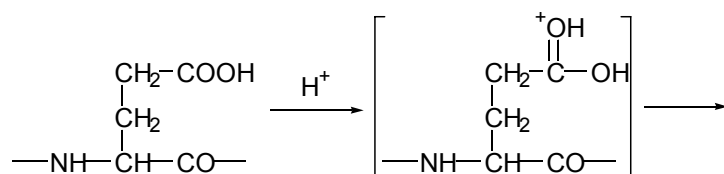


Παρόμοια κυκλοποίηση μπορεί να συμβεί και όταν η β -καρβοξυλομάδα είναι ελεύθερη, ενώ η ίδια αντίδραση έχει παρατηρηθεί ακόμα και κάτω από ουδέτερες συνθήκες. Στα πεπτίδια με γλουταμίνη στο *N*-τελικό άκρο λαμβάνει χώρα αυθόρμητα ο σχηματισμός πυρρολιδόνης [206], αντίδραση η οποία καταλύεται από ασθενή οξέα:



Κατά την κατεργασία πεπτιδίων με υγρό HF η πλευρική καρβοξυλική ομάδα του γλουταμινικού οξέος πρωτονιώνεται και

έτσι προκύπτουν ακυλο-κατιόντα, τα οποία κυκλοποιούμενα δίνουν πυρογλουταμικούς δακτυλίους, οι οποίοι παρεμβάλλονται στην πεπτιδική αλυσίδα:



Όλα αυτά τα προβλήματα θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά το σχεδιασμό και την επιλογή των μεθόδων σύζευξης, αποπροστασίας και απόσπασης των πεπτιδίων, καθώς και των προστατευτικών ομάδων των πλάγιων δραστικών ομάδων των αμινοξέων, ώστε το επιθυμητό πεπτίδιο να παρασκευαστεί σε ικανοποιητική απόδοση και καθαρότητα.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B. Θεωρητικό Μέρος

B. 1. Σκοπός Της Παρούσης Εργασίας

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το εννεαπεπτιδίο της ωκυτοκίνης, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία του τοκετού, με αποτέλεσμα την προσέλκυση του έντονου ερευνητικού ενδιαφέροντος, με σκοπό τη σύνθεση ανταγωνιστών της ωκυτοκίνης για την αντιμετώπιση του πρόωρου τοκετού. Η εύρεση ενός ισχυρού και εκλεκτικού ανταγωνιστή της ωκυτοκίνης είναι επιτακτική ανάγκη, αφού ο πρόωρος τοκετός ανέρχεται σε ποσοστό 6-7% των συνολικών γεννήσεων, ενώ ευθύνεται κατά προσέγγιση για το 75% των περιπτώσεων εμβρυϊκής θνησιμότητας.

Σημαντικό ρόλο στη κατανόηση της δραστηριότητας ενός ανταγωνιστή της ωκυτοκίνης διαδραματίζει το γεγονός ότι ο υποδοχέας της (OTR) εκφράζεται τόσο στο μυομήτριο όσο και στο ενδομήτριο. Έτσι στο ανθρώπινο μυομήτριο το σύμπλοκο ωκυτοκίνης-υποδοχέα οδηγεί σε συσπάσεις της μήτρας μέσω ενδοκυτταρικής απελευθέρωσης ιόντων ασβεστίου, ενώ στο μυομήτριο η αλληλεπίδραση της ωκυτοκίνης με τον υποδοχέα της οδηγεί στην παραγωγή προσταγλανδινών κυρίως PGF_{2a} οι οποίες αυξάνουν τη ευαισθησία της μήτρας στην ωκυτοκίνη. Επομένως ένας ανταγωνιστής της ωκυτοκίνης πρέπει να αλληλεπιδρά τόσο με τον υποδοχέα ο οποίος βρίσκεται στο μυομήτριο όσο και με τον υποδοχέα του που βρίσκεται στο ενδομήτριο. Πειράματα που έγιναν σε επιμύες, έδειξαν ότι ανάλογα της ωκυτοκίνης που δρουν ως ανταγωνιστές της

στο μυομήτριο, ενώ δρουν ταυτόχρονα και ως αγωνιστές της στο ενδομήτριο, παράγοντας προσταγλανδίνες, δεν καθυστερούν τη έναρξη του τοκετού, αλλά αυξάνουν τη διάρκεια των συσπάσεων της μήτρας, με αποτέλεσμα το θάνατο του εμβρύου.[207]

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι:

α. Η προσπάθεια σύνθεσης ισχυρών με παρατεταμένη In vivo δράση πεπτιδικών ανταγωνιστών της ωκυτοκίνης. Οι ενώσεις αυτές προκειμένου να χρησιμοποιηθούν στη θεραπευτική θα πρέπει να εμφανίζουν ελάχιστες ή καθόλου αγωνιστικές ιδιότητες. Θα πρέπει επίσης να δρουν εκλεκτικά, να μην δρουν δηλαδή ως ανταγωνιστές της βασοπρεσίνης στους V_{1a} (προκαλώντας έτσι αγγειοδιασταλτική δράση) και V_2 υποδοχείς (εμποδίζοντας έτσι τη αντιδιουρητική της δράση). Ταυτόχρονα η ανθεκτικότητα των πεπτιδίων στη δράση των υδρολυτικών ενζύμων θα πρέπει να είναι τέτοια που να τους εξασφαλίζει ικανοποιητικό χρόνο ημιζωής, και κατά συνέπεια παρατεταμένη δραστηριότητα. Ο κύριος τρόπος για να επιτευχθεί κάτι τέτοιο είναι η εισαγωγή στη πεπτιδική αλυσίδα D-αμινοξέων. Για το λόγο αυτό η εισαγωγή ενός D-αρωματικού αμινοξέος στη θέση 2 του μορίου της ωκυτοκίνης, πέρα από το γεγονός ότι του προσδίδει αυξημένες ανταγωνιστικές ιδιότητες, καθυστερεί επίσης τη διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού ανάμεσα στην Cys στη θέση 1 και στο D-αρωματικό οξύ από την ωκυτοκινάση (αμινοπεπτιδάση της Cys).

β. Η μελέτη της σημασίας την οποία έχουν οι πλευρικές ομάδες των αμινοξέων του μορίου στην εμφάνιση της βιολογικής δράσης Τα πειραματικά αποτελέσματα τα οποία προκύπτουν μπορούν να

οδηγήσουν στη εξαγωγή πολύτιμων συμπερασμάτων αναφορικά με την σχέση μεταξύ χημικής δομής και βιολογικής δραστηριότητας. Οι παραπάνω διαπιστώσεις αποτελούν τη βάση για τη ανάπτυξη νέων αναλόγων της ωκυτοκίνης. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων διαπιστώσεων, είναι ότι η ανταγωνιστική δράση των αναλόγων αυξάνει σημαντικά εάν στη θέση 1 εισαχθεί το Mpa (ή κάποια συγγενείς προς αυτό ένωση, όπως dPen, Pmp1 κ.α.), σε συνδυασμό όμως με την εισαγωγή στην θέση 2 ενός D-αρωματικού αμινοξέος, το οποίο χαρακτηρίζεται από έλλειψη ελεύθερου φαινολικού υδροξυλίου.

γ. Η διερεύνηση και η προσδιορισμού της διαμόρφωσης του πεπτιδίου κατά την σύνδεση του μορίου με τον υποδοχέα. Η γνώση της ενεργής διαμόρφωσης θα βοηθούσε σημαντικά στην σύνθεση ανταγωνιστών της πεπτιδοορμόνης με ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην θεραπευτική. Θα πρέπει να τονιστεί ότι η ωκυτοκίνη, όπως και οποιοδήποτε πεπτίδιο χαμηλού μοριακού βάρους, χαρακτηρίζεται από σχετικά υψηλή διαμορφωτική ελευθερία, η οποία έχει ως επακόλουθο τον σημαντικό επηρεασμό της διαμόρφωσης του μορίου της ωκυτοκίνης, από το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται. Το γεγονός αυτό έχει οδηγήσει στην διατύπωση διαφορετικών διαμορφωτικών προτύπων, μερικά από τα οποία έχουν ήδη παρουσιαστεί σε προηγούμενο κεφάλαιο. Πρώτος ο Hruby το 1981 με την διατύπωση του «δυναμικού» προτύπου αναφέρθηκε στην σπουδαιότητα της περιορισμένης διαμορφωτικής ελευθερίας, ενός αναλόγου, για την εμφάνιση ανταγωνιστικής δράσης.

Πράγματι αποδείχτηκε ότι ανάλογα με περιορισμένη διαμορφωτική ελευθερία, είτε λόγω δημιουργίας ενός δευτέρου αμιδικού δακτυλίου (δικυκλικά ανάλογα), είτε λόγω εισαγωγής ειδικών αμινοξέων

σε κατάλληλες θέσεις (εισαγωγή D-Cys στη θέση 6), εμφανίζουν αυξημένες ανταγωνιστικές ιδιότητες. Στη παρούσα εργασία ο περιορισμός της διαμορφωτικής ελευθερίας επιτεύχθηκε με την χρησιμοποίηση της τερτ-βούτυλο γλυκίνης στις θέσεις 8 και 9. Πολύ λίγα ανάλογα της ωκυτοκίνης έχουν ελεγχθεί σε εγκυμονούντα ζώα και μόνο ένα, το atosiban ([Mpa¹, D-Tyr(Et)², Thr⁴, Orn⁸])OT έχει χορηγηθεί σε έγκυες γυναίκες. Για τον λόγο αυτό το atosiban αποτελεί πρότυπο σύγκρισης για τους υπόλοιπους ανταγωνιστές της ωκυτοκίνης.

Σήμερα ο σχεδιασμός ενός ανταγωνιστή (στο σχήμα 1 αναγράφονται τα ανάλογα που συνετέθησαν) της ωκυτοκίνης βασίζεται στη βελτίωση συγκεκριμένων παραμέτρων [19] έτσι ακολουθούμε συγκεκριμένη τακτική, έτσι ώστε να φτιάξουμε ανάλογα με τέτοιες προδιαγραφές ώστε να είναι ικανά να αναστέλλουν τον πρόωρο τοκετό. Ενώ παράλληλα θα πρέπει να μην προκαλούν άλλες δράσεις. Επιθυμούμε να συνθέσουμε εκλεκτικούς ανταγωνιστές.

Ανάλογα	
1	[Gly(tBut) ⁸]OT
2	[Gly(tBut) ⁹]OT
3	[Mpa ¹ ,Gly(tBut) ⁹]OT
4	[Mpa ¹ ,DTyr(OEt), ² Gly(tBut) ⁸]OT
5	[Mpa ¹ , DTyr(OEt), ² Gly(tBut) ⁹]OT

Πίνακας1: Ανάλογα που συντέθηκαν ακολουθώντας τα προαναφερθέντα.

Οι παράμετροι που πρέπει να βελτιστοποιήσουμε αναλύονται παρακάτω:

In vitro

Συγγένεια με τον υποδοχέα

In Vitro & in vivo

1. Αντιωκυτόκειος δράση (πρόκληση μυϊκού τόνου στην μήτρα, απελευθέρωση προσταγλανδινών)
2. Αντιαγγειοσυσταλτική δράση (ανταγωνιστής της βασοπρεσίνης στον V_{1a})
3. Αντιδιουρητική δράση (ανταγωνιστής της βασοπρεσίνης στον V₂)

In vivo

1. Βιοδιαθεσιμότητα (παρεντερική και μη παρεντερική)
2. Σταθερότητα (χρόνος ημιζωής) έναντι ενζυμικής επίδρασης
3. Αποτελέσματα κλινικών δοκιμών
4. Παρενέργειες

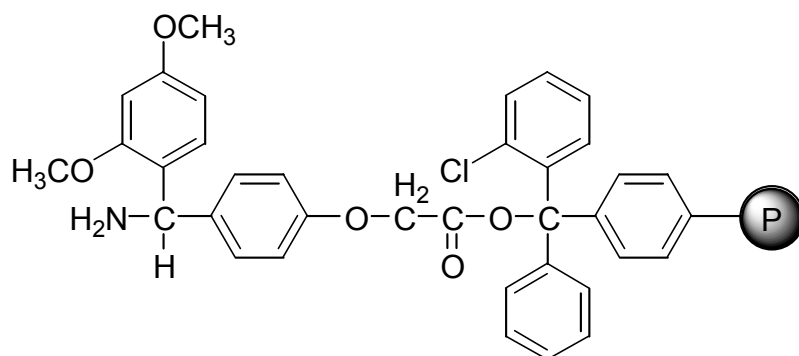
B.2 Στρατηγική της Σύνθεσης Νέων Αναλόγων.

Πεπτιδική Σύνθεση Επί της 2-Χλωρο-Τριφαινυλο Μέθυλο Ρητίνης με Συνδέτη Rink Bernatowitz

Στη συγκεκριμένη εργασία η ανοικοδόμηση της πεπτιδικής αλυσίδας πραγματοποιήθηκε με τη μεθοδολογία σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση με χρήση χημείας Fmoc/tBu.

Οι πλάγιες προστατευτικές ομάδες που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι Trt και tBu, οι οποίες είναι και συμβατές με την Fmoc/tBu μεθοδολογία και είναι ευαίσθητες σε όξινες συνθήκες. Το στερεό υπόστρωμα το οποίο χρησιμοποιήθηκε είναι η 2-χλωρο-τριφαινυλομεθυλο ρητίνης με συνδέτη Rink Bernatowitz. Η συγκεκριμένη ρητίνη χρησιμοποιείται γιατί η ωκυτοκίνη στο C-τελικό άκρο είναι αμίδιο, και μόνο με τη χρήση ρητίνης με συνδέτη *Rink Bernatowitz* (Σχήμα 1.) μπορούμε να πάρουμε το πεπτίδιο ως αμίδιο. Και εκτός αυτού επειδή στην αλληλουχία υπάρχει κυστεΐνη με τη χρήση της συγκεκριμένης ρητίνης αποφεύγεται η ρακεμίωση και επιπλέον λόγω του

+I επαγωγικού φαινομένου και της στερεοχημικής παρεμπόδισης, που είναι χαρακτηριστικά της τριφαινυλομάδας της ρητίνης, αποφεύγεται ο σχηματισμός δικετοπιπεραζινών ακόμα και εκεί που ευνοείται.



Σχήμα 1. Η 2-χλωρο-τριφαινυλομεθυλο ρητίνης με συνδέτη Rink Bernatowitz

Β.3. Αποτελέσματα των Βιολογικών Δοκιμών που Πραγματοποιήθηκαν στα Συντεθέντα Ανάλογα της Ωκυτοκίνης

Οι προκαταρκτικές δοκιμές όσον αφορά την ωκυτόκειο δράση *in vitro* πραγματοποιήθηκαν (από την καθηγήτρια Jirina Slaniniva) σε απομονωμένο ιστό μήτρας επίμυος σύμφωνα με τη μέθοδο των Holton και Munsick [208, 209].

Τα συντεθέντα ανάλογα και τα αποτελέσματα των βιολογικών δοκιμών παρουσιάζονται στον Πίνακα Β.5.

Πίνακας Β.5. Ωκυτόκειος δράση των συντεθέντων αναλόγων της ΟΤ.

Ανάλογα		Ωκυτόκειως δράση in vitro (I.U/mg)	Ανταγωνιστικ ή Δράση pA_2
1	Ωκυτοκίνη	546	-
2	[Gly(tBut) ⁸]OT	46,8 ± 7,2	-
3	[Gly(tBut) ⁹]OT	3,7 ± 0,9	-
4	[Mpa ¹ ,Gly(tBut) ⁹]OT	-	~5,6
5	[Mpa ¹ ,DTyr(OEt), ² Gly(tBut) ⁸]OT	-	8,1 ± 0,2
6	[Mpa ¹ , DTyr(OEt), ² Gly(tBut) ⁹]OT	-	8.1 ± 0,2
7	[Mpa ¹ , DTyr(OEt), ² Thr ⁴ , Arg ⁸]OT (Atosiban)	-	8,29

pA_2 : Αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος του ID_{50}

ID_{50} : Η δόση του ανταγωνιστή που χρειάζεται για να μειώσει στο μισό τη δράση του αγωνιστή.

B.3. Διαμορφωτική Μελέτη των Αναλόγων G₉,

MT_{1,9} και MT_{1,8}.

Τα φάσματα 1D και 2D ¹H NMR ελήφθησαν σε θερμοκρασία 298 K. Η αποτίμηση των φασμάτων TOCSY και NOESY και η ταυτοποίηση των σημάτων συντονισμού των πρωτονίων των αναλόγων G₉, MT_{1,9} και MT_{1,8} πραγματοποιήθηκε με τη μεθοδολογία γνωστή ως *Sequence specific resonance assignment* [XX]. Με την τεχνική αυτή αποτιμήθηκαν τα πρωτονιακά σήματα συντονισμού για κάθε ένα από τα αμινοξέα της αλληλουχίας κάθενός από τα τρία ανάλογα, αρχικά στα φάσματα TOCSY, τα οποία παρέχουν συζεύξεις μεταξύ γειτονικών πρωτονίων. Τα σήματα των πρωτονίων κάθε αμινοξέος συνιστούν μία χαρακτηριστική ομάδα σημάτων. Η αναγνώρισή της υποδεικνύει τον τύπο του αμινοξέος και κατά τον τρόπο αυτό αποτιμήθηκαν οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων και των 9 αμινοξέων, του κάθε αναλόγου και αναφέρονται στους Πίνακες 1.2.3.

Πίνακας.1. Χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του αναλόγου G₉ [Cys¹-Tyr²-Ile³-Gln⁴-Asn⁵-Cys⁶-Pro⁷-Leu⁸-(Bu^t)Gly⁹-NH₂] στους 298K (DMSO-*d*₆, 500 MHz).

Αμινοξέα	HN	Hα	Hβ	Άλλα
1 Cys	8.499	4.596	3.171, 2.671	-----
2 Tyr	8.323	4.041	3.461, 3.099	Hδ 7.128; Hε 7.028; OH 7.231
3 Ile	8.061	3.905	1.798	Hγ 1,459, 1.130; γCH ₃ 0.918; δCH ₃ 0.865
4 Gln		3.943	1.905, 1.848	Hγ 2.153 ;

		8.318			δNH_2 6.830, 7.299
5	Asn	7.863	4.452	2.633	δNH_2 6.954, 7.395
6	Cys	8.403	4.688	3.215, 3.031	-----
7	Pro	---- --	4.307	2.049, 1.921	H γ 1.842, 1.761 ; H δ 3.606, 3.541
8	Leu	7.979	4.370	1.559	H γ 1.485 ; δCH_3 0.863, 0.812
9	(Bu ^t)Gly	7.564	4.163	-----	Bu ^t CH ₃ 0.908
10	NH ₂	7.458 , 7.038			

Πίνακας.2. Χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του αναλόγου **MT_{1,8}**
[Mpa¹-DTyr(OEt)²-Ile³-Gln⁴-Asn⁵-Cys⁶-Pro⁷(Bu^t)Gly⁸-Gly⁹-NH₂]
στους 298K (DMSO-*d*₆, 500 MHz).

Αμινοξέα	HN	H α	H β	Άλλα
1 Mpa	-----	2.775	2.252	-----
2 DTyr(OEt)	8.441	4.548	2.843, 2.738	H δ 7.140; H ϵ 6.805; OEt 1.305
3 Ile	7.990	4.046	1.861	H γ 1.066, 1.199; γCH_3 0.766; δCH_3 0.658□
4 Gln	7.315	4.251	1.909, 1.764	H γ 2.096 ; δNH_2 6.763, 7.177
5 Asn	8.082	4.378	2.453, 2.385	δNH_2 6.943, 7.335
6 Cys	8.413	4.782	2.996, 2.777	-----
7 Pro		4.504	1.966, 1.890	H γ , ; H δ 3.650, 3.574

8	(Bu ^t)Gly	7.709	4.111	-----	Bu ^t CH ₃ 0.915
9	Gly	8.178	3.637, 3.593	-----	-----
10	NH ₂	7.189 7.022			

Πίνακας.3. Χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του αναλόγου **MT_{1,9}** [Mpa¹-DTyr(OEt)²-Ile³-Gln⁴-Asn⁵-Cys⁶-Pro⁷-Leu⁸-(Bu^t)Gly⁹-NH₂] στους 298K (DMSO-*d*₆, 500 MHz).

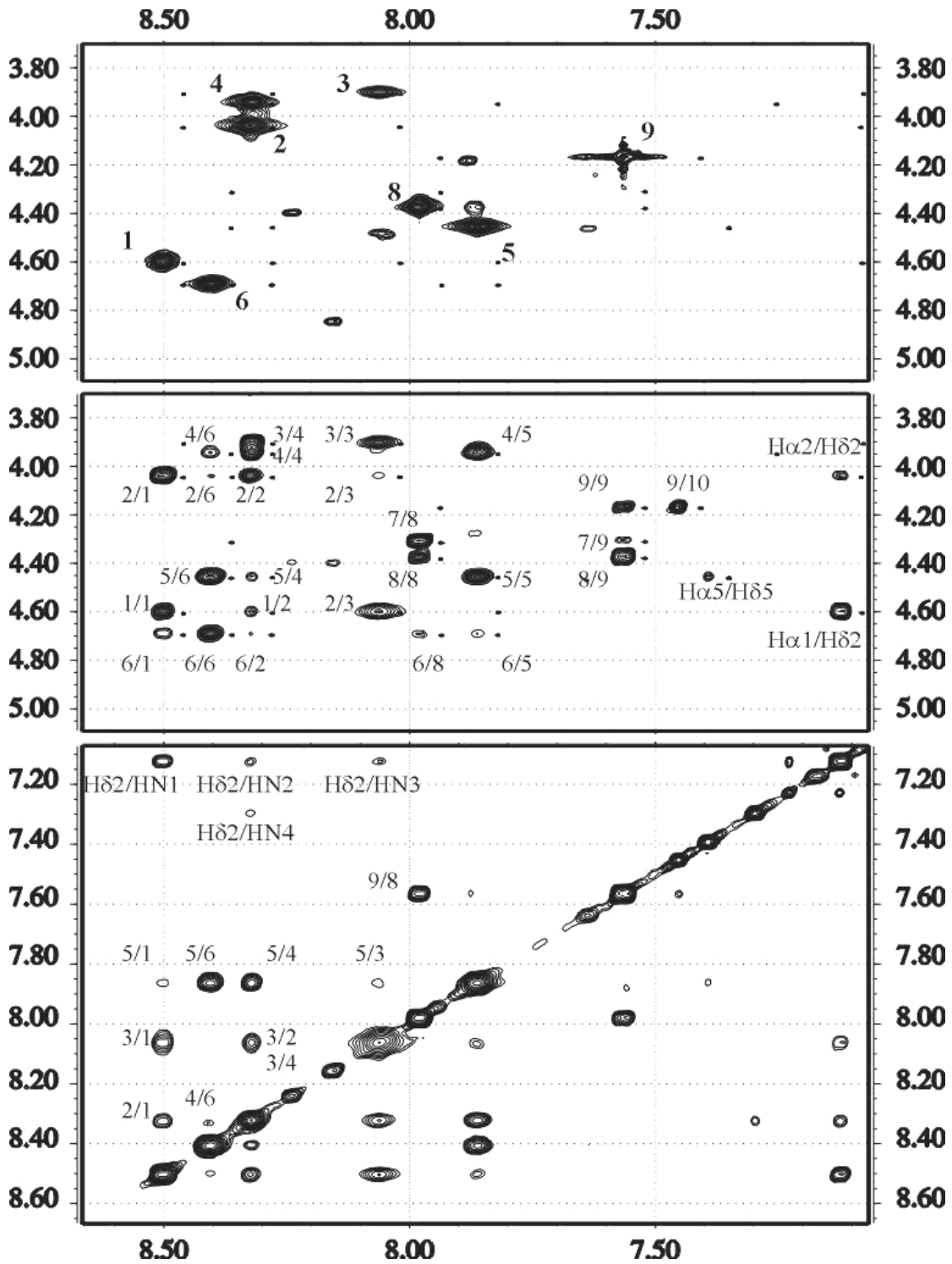
Αμινοξέα	HN	Hα	Hβ	Άλλα
1 Mpa	-----	2.775	2.262	-----
2 DTyr(OEt)	8.428	4.535	2.835, 2.737	Hδ 7.133; He 6.802; OEt
3 Ile	7.988	4.040	1.856	Hγ 1.062, 1.194; γCH ₃ 0.761; δCH ₃ 0.656
4 Gln	7.314	4.247	1.901, 1.765	Hγ 2.092 ; δNH ₂ 6.754, 7.168
5 Asn	8.072	4.384	2.440, 2.369	δNH ₂ 6.938, 7.315
6 Cys	8.380	4.757	3.007, 2.782	-----
7 Pro	-----	4.340	2.025, 1.892	Hγ 1.838; Hδ 3.633, 3.572
8 Leu	8.046	4.232	1.617	Hγ 1.483 ; δCH ₃ 0.889, 0.823
9 (Bu ^t)Gly	7.316	4.148	-----	Bu ^t CH ₃
10 NH ₂	7.068 7.418			

Από το φάσμα NOESY ανιχνεύονται NOE σήματα τα οποία αντιστοιχούν σε συζεύξεις μεταξύ πρωτονίων τα οποία βρίσκονται στον χώρο σε απόσταση έως 5,0-5,5 Å. Με την παραπάνω διαδικασία αναγνωρίζεται αρχικά η δευτεροταγής και στην συνέχεια υπολογίζεται η τριτοταγής δομή του πεπτιδίου καθώς εντοπίζονται τα τμήματα της πεπτιδικής αλυσίδας που βρίσκονται κοντά στο χώρο. Οι δομικές πληροφορίες που

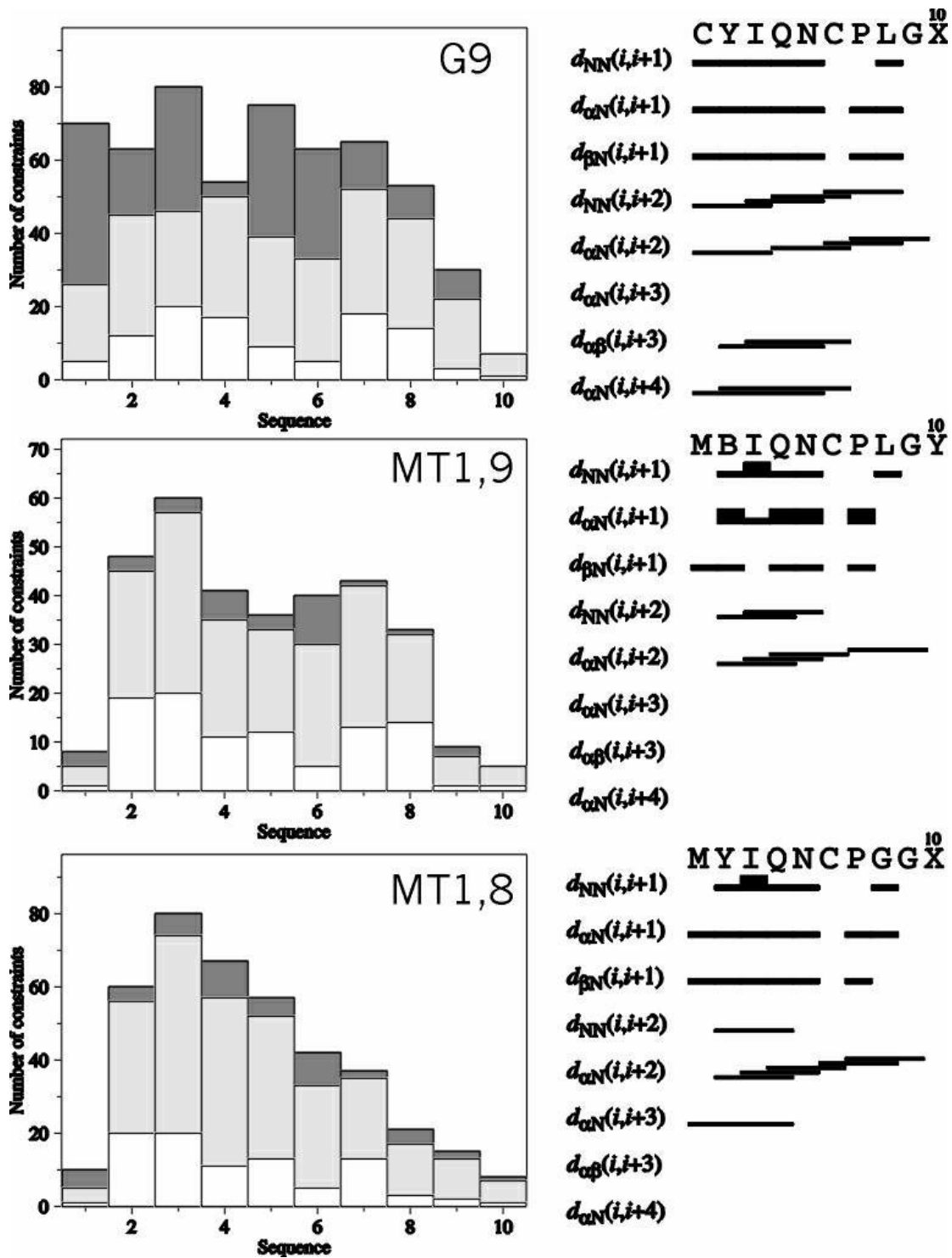
εξάγονται σχετίζονται άμεσα με την ένταση του σήματος που προκαλείται από την σύζευξη των δύο πρωτονίων ($\text{NOE}_{[H_i-H_j]} - 1/r_{[H_i-H_j]}^6$, όπου H_i , H_j δύο πρωτόνια, και $r_{[H_i-H_j]}$ η απόσταση μεταξύ των δύο πρωτονίων) και μετατροπή της έντασης των σημάτων αυτών σε όρια αποστάσεων επιτρέπει τον υπολογισμό της τρισδιάστατης δομής πολυπεπτιδίου ή πρωτεΐνης σε διάλυμα (Σχήμα 1).

Στο Σχήμα.2 παρουσιάζονται τα NOE μικρής και μέσης απόστασης για τα πρωτόνια της πεπτιδικής αλυσίδας και τα β -πρωτόνια που παρατηρήθηκαν στα φάσματα NOESY. Ακολουθιακές NH-NH συζεύξεις παρατηρούνται στην περιοχή 1 έως 6 για το ανάλογο G_9 και 2 έως 6 για τα ανάλογα $MT_{1,8}$ και $MT_{1,9}$. Επίσης NH-NH συζεύξεις παρατηρούνται σε όλα τα ανάλογα μεταξύ των αμινοξέων 8 και 9. Η διακοπή των NH-NH συζεύξεων στην θέση 7 οφείλεται όπως γίνεται αντιληπτό στην έλλειψη αμιδικών πρωτονίων της Pro. Για την ίδια περιοχή παρατηρούνται επιπλέον H_α -NH και H_β -NH συζεύξεις με μικρές διαφορές ανάμεσα στα τρία ανάλογα. Στα ανάλογα $MT_{1,8}$ και $MT_{1,9}$ παρατηρείται περιορισμένος αριθμός NH/NH συζεύξεων μεταξύ αμινοξέων που απέχουν μεταξύ τους κατά δύο θέσεις στην πεπτιδική αλυσίδα και επιπλέον παρατηρείται σημαντικός αριθμός H_α -NH($i,i+2$) συζεύξεων, ενώ δεν παρατηρούνται H_α - H_β ($i,i+3$) και H_α -HN($i,i+4$) συζεύξεις. Απεναντίας στο ανάλογο G_9 παρατηρείται σημαντικός αριθμός H_α -NH($i,i+2$) και NH-NH($i,i+2$), καθώς επίσης και H_α - H_β ($i,i+3$) και H_α -HN($i,i+4$) συζεύξεων. Τέλος αναφέρουμε ότι ανιχνεύθηκαν 332 μοναδικά (σε μία από τις διαστάσεις του φάσματος) NOE σήματα για το ανάλογο G_9 , 210 για το ανάλογο $MT_{1,9}$ και 243 για το ανάλογο $MT_{1,8}$. Η ένταση των σημάτων αυτών μετράπηκε σε όρια αποστάσεων τα οποία εισήχθησαν στους υπολογισμούς των δομών. Από αυτά βρέθηκαν χρήσιμα (αντιστοιχούν σε μεταβαλλόμενες και όχι

σταθères αποστάσεις μεταξύ δύο πρωτονίων) 276, 154 και 187
αντίστοιχα.



Σχήμα.1: 2D ¹H NMR φάσματα του αναλόγου G9. Στα (Α) και (Β) παρουσιάζεται η χαρακτηριστική περιοχή H_α-NH συζεύξεων στο φάσμα TOCSY και NOESY, αντίστοιχα, ενώ στο (Γ) παρουσιάζεται η περιοχή χαρακτηριστικών NH συζεύξεων, όπως NH-NH ποσά μεταξύ της Cys¹ και Asn⁵.



Σχήμα.2: Αριθμός κατά αμινοξύ όλων των NOE σημάτων για τα τρία ανάλογα G_9 , $MT_{1,8}$ και $MT_{1,9}$ (αριστερά). Σε άσπρο, γκρι και σκούρο γκρι παρουσιάζονται οι ενδο-αμινοξικές, ακολουθιακές και μέσης απόστασης πρωτονιακές συζεύξεις. Σχηματική αναπαράσταση των ακολουθιακών συζεύξεων.

B.4.1 Συγκριτική μελέτη των Δομών των αναλόγων G₉, MT_{1,9} και MT_{1,8} της Ωκυτοκίνης σε διάλυμα.

Για τα παραπάνω ανάλογα και για κάθε αμινοξύ αντιστοιχούν 32.9 NOE σήματα (δηλαδή όρια αποστάσεων εκ των οποίων 25.2 κατά μέσο όρο χρησιμοποιούνται στους δομικούς υπολογισμούς).

Τα διάφορα πρωτόνια κατατάσσονται σε 5 κύριες κατηγορίες ως εξής :

- 1 ... ενδο-αμινοξικές πρωτονιακές συζεύξεις, εκτός από HN, H_α, H_β
- 2 ... πρωτονιακές συζεύξεις γειτονικών (στην ακολουθία) και ενδο-αμινοξικές HN, H_α, H_β
- 3 ... πρωτονιακές συζεύξεις μέσης απόστασης
- 4 ... πρωτονιακές συζεύξεις μακρινής απόστασης μεταξύ πρωτονίων του σκελετού
- 5 ... πρωτονιακές συζεύξεις μακρινής απόστασης.

Μετά το τέλος των δομικών υπολογισμών με το πρόγραμμα DYANA (DYnamics Algorithm for Nmr Applications) συλλέγονται οι 20 καλύτερες δομές (σε επίπεδο ελάχιστης δυναμικής ενέργειας και συμφωνίας NOE απαστάσεων με τις ίδιες αποστάσεις που παρατηρούνται στις υπολογισθείσες δομές). Η τελική οικογένεια των 20 δομών χαρακτηρίζεται από υψηλή ακρίβεια γεγονός το οποίο πιστοποιείται από τις χαμηλές τιμές RMSD για όλα τα ανάλογα. Αναλυτικά οι τιμές αυτές που προκύπτουν από την σύγκριση κατά ζεύγη των 20 δομών καθώς επίσης και από την σύγκριση της μέσης δομής με καθένα από τα μέλη της οικογένειας, αναφέρονται στον Πίνακα .4.1.

RMSD (Å)	G ₉	MT _{1,9}	MT _{1,8} (243/187)
----------	----------------	-------------------	-----------------------------

		(332/276)	(210/154)	
Οικογένεια	ή Αλ.	0.29	0.13	0.14
20 δομών	Βαρέα Ατομα	1.13	0.85	0.51
Μέση	ή Αλ.	0.24	0.09	0.10
Δομή	Βαρέα Ατομα	0.84	0.59	0.36

Πίνακας.4.1: Τιμές RMSD μεταξύ των μελών της καθέ οικογένειας 20 δομών για τα ανάλογα G_9 , $MT_{1,8}$ και $MT_{1,9}$ και σε σχέση με την μέση δομή τους, για τα άτομα της πεπτιδικής αλυσίδας και για όλα τα άτομα πλην Η. Στην παρένθεση αναφέρεται ο αριθμός του συνόλου των ποε σημάτων και των χρήσιμων ποε για τους δομικούς υπολογισμούς.

Στον Πίνακα 4 αναφέρονται στατιστικά στοιχεία σχετικά με την ποιότητα των υπολογισθέντων 20 δομών αλλά και της μέσης δομής μετά την ελαχιστοποίηση της ενέργειας και αναφέρουν τυχών διαφορές (“distance constraints violations”) ανάμεσα στα όρια αποστάσεων μεταξύ πρωτονίων που προέρχονται από τα NOE σήματα και στις αποστάσεις των ίδιων πρωτονίων όπως αυτές διαμορφώνονται σε κάθε δομή μετά την ελαχιστοποίηση της ενέργειας.

Πίνακας.4.1: Στατιστική ανάλυση των τελικών 20 μοντέλων (μετά την ελαχιστοποίηση της ενέργειας) και της μέσης δομής για τα ανάλογα: G_9 , $MT_{1,8}$ και $MT_{1,9}$ (αντίστοιχα).

Ανάλογο G_9	REM ¹ (20 δομές)	<REM> ²
---------------	--------------------------------	--------------------

RMS Violations ανά κατηγορία πειραματικών δεδομένων (Αποστάσεις)
σε (Å)³

Ενδοαμινοξικές (intraresidue-39)	0.0010 ± 0.0042	0.000
Ακολουθιακές (sequential-126)	0.0166 ± 0.0032	0.0239
Μέσης απόστασης (medium range-111)	0.0228 ± 0.0000	0.0234
Μακρινής απόστασης (long range-0)	0.0000 ± 0.0000	0.0000
Σύνολο (274)	0.0184 ± 0.0007	0.0219
Μέσος Αριθμός Violations ανά μοντέλο		
Ενδοαμινοξικές	0,05 ± 0,218	0,00
Ακολουθιακές	2,05 ± 0,218	3.00
Μέσης απόστασης	2,70 ± 0,557	2.00
Μακρινής απόστασης	0.0 ± 0.0	0.00
Σύνολο	4,80 ± 0,678	5,00
Μέσος όρος NOE violations > 0.3 Å	0.000 ± 0.0	00.0
Μέγιστη τιμή για NOE violation (Å)	2,06	0.203
average distance penalty function (Å ²)	3,288 ± 0.2	4,567

Πίνακας 4.2

Ανάλογο M ₁ T ₂ G ₈	REM ¹ (20 δομές)	<REM> ²
--	--------------------------------	--------------------

RMS Violations ανά κατηγορία πειραματικών δεδομένων (Αποστάσεις)
σε (Å)³

Ενδοαμινοξικές (intraresidue-27)	0.0207 ±	0.0064	0.0244
Ακολουθιακές (sequential-134)	0.007 ±	0.0028	0.0095
Μέσης απόστασης (medium range-26)	0.0255 ±	0.0030	0.0244
Μακρινής απόστασης (long range-0)	0.0000 ±	0.0000	0.0000
Σύνολο (187)	0.0141 ±	0.0015	0.0153
Μέσος Αριθμός Violations ανά μοντέλο			
Ενδοαμινοξικές	1,50 ±	0,500	2,00
Ακολουθιακές	1,35 ±	0,792	1,00
Μέσης απόστασης	2,40 ±	0,583	3,00
Μακρινής απόστασης	0.0 ±	0.0	0.00
Σύνολο	5,25 ±	1,090	6,00
Μέσος όρος NOE violations > 0.3 Å	0.000 ±	0.0	00.0
Μέγιστη τιμή για NOE violation (Å)	0.131		0.114
average distance penalty function (Å ²)	1,561 ±	0,2	1,661

Πίνακας 4.3

Ανάλογο MT _{1,9}	REM ¹ (20 δομές)	<REM> ²
---------------------------	--------------------------------	--------------------

RMS Violations ανά κατηγορία πειραματικών δεδομένων (Αποστάσεις)
σε (Å)³

Ενδοαμινοξικές (intraresidue-41)	0.0332 ± 0.0028	0.0334
Ακολουθιακές (sequential-97)	0.0190 ± 0.0017	0.0187
Μέσης απόστασης (medium range-16)	0.0083 ± 0.0085	0.0000
Μακρινής απόστασης (long range-0)	0.0000 ± 0.0000	0.0000
Σύνολο (154)	0.0232 ± 0.0015	0.0228
Μέσος Αριθμός Violations ανά μοντέλο		
Ενδοαμινοξικές	2,15 ± 0,357	2,00
Ακολουθιακές	5,60 ± 1,158	6.00
Μέσης απόστασης	0,50 ± 0,500	0.00
Μακρινής απόστασης	0.00 ± 0.000	0.00
Σύνολο	8,25 ± 1,260	8,00
Μέσος όρος NOE violations > 0.3 Å	0.00 ± 0.000	0.00
Μέγιστη τιμή για NOE violation (Å)	0.213	0.190
average distance penalty function (Å ²)	3,089 ± 0.3	2,827

¹ REM : αναφέρεται στην οικογένεια των 20 δομών που προκύπτουν μετά την ελαχιστοποίηση της ενέργειας

² <REM> : αναφέρεται στην μέση δομή μετά την ελαχιστοποίηση της ενέργειας της και που προκύπτει από τις 20 δομές μετά την ελαχιστοποίηση της ενέργειας τους.

³ Εντός των παρενθέσεων αναγράφεται ο αριθμός των "χρήσιμων" ανωτάτων ορίων αποστάσεων ανά κατηγορία.

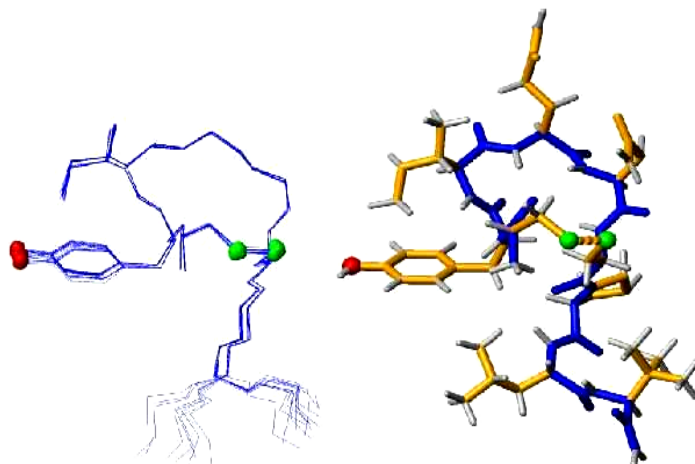
Μετά το τέλος των υπολογισμών των 20 καλύτερων δομών, πραγματοποιείται ο υπολογισμός της μέσης δομής των μορίων, μετά από ελαχιστοποίηση της ενέργειάς τους. Στο σχήμα 3 που ακολουθεί (Α) παρουσιάζονται οι οικογένειες των 20 καλύτερων δομών για καθένα από τα τρία ανάλογα (G₉, MT_{1,9} και MT_{1,8}). Καθώς επίσης και η ραχοκοκαλιά της μέσης δομής και των τριών αναλόγων(Β).Για το ανάλογο G₉ παρατηρούμε ότι το κυκλικό τμήμα του μορίου μεταξύ των αμινοξέων 1-6 (το οποίο δημιουργείται με τον σχηματισμό του δισουλφιδικού δεσμού στις θέσεις 1 και 6) ότι είναι καλά καθορισμένο, όπως επίσης και ο αρωματικός δακτύλιος Tyr στη θέση 2. Μια διαφοροποίηση παρατηρείται στο τελικό τριπεπτιδίο και το γεγονός αυτό οφείλεται στη μεγαλύτερη ευκινησία, αυτού του μέρους του μορίου. Για αυτόν το λόγο έχουμε και απώλεια σημαντικού αριθμού NOE σημάτων.

Στο ανάλογο MT_{1,9} παρατηρούμε επίσης τον καλά καθορισμένο δακτύλιο. Αντίθετα όμως με το προηγούμενο μόριο ο προσανατολισμός της DTyr(OEt) δεν είναι ο ίδιος για όλα τα μέλη της οικογένειας των δομών. Παρόλα αυτά όμως παρατηρούνται κυρίως δύο πιθανές διαμορφώσεις. Στο συγκεκριμένο ανάλογο, παρατηρούμαι να είναι καλά

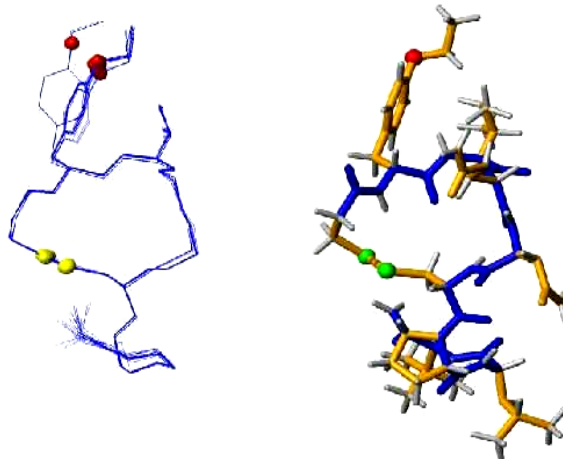
καθορισμένη η διαμόρφωση του τελικού τριπεπτιδίου, το οποίο φαίνεται να εμφανίζει μια β-στροφή. Η ύπαρξη της οποίας έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση NOE σημάτων, μεταξύ των αμινοξέων που τη συγκροτούν. Η παρουσία των NOE σημάτων στη β-στροφή παίζει καθοριστικό ρόλο στον υπολογισμό της δομής του τελικού τριπεπτιδίου και της συγκεκριμένης διαμόρφωσης που εμφανίζεται για όλα τα μοντέλα δομών.

Όσον αφορά το ανάλογο MT_{1,8} βλέπουμε έναν επίσης καλά καθορισμένο δακτύλιο. Ενώ το τριπεπτίδιο παρουσιάζει μια αλλαγή στον προσανατολισμό της πεπτιδικής αλυσίδας σε σχέση με το προηγούμενο ανάλογο (όπου η μόνη διαφορά τους είναι ότι το προηγούμενο έχει την τερτ-βουτυλ-γλυκίνη στη θέση 9 ενώ το συγκεκριμένο στη θέση 8). Η β-στροφή εμφανίζεται και πάλι στο τριπεπτίδιο του C-τελικού άκρου και είναι με σχετικά μεγάλη ακρίβεια καθορισμένη. Το γεγονός ότι ο προσανατολισμός των C-τελικών τριπεπτιδίων στα ανάλογα MT_{1,8} και MT_{1,9}, δεν υποδεικνύει απαραίτητα δομική διαφορά ανάμεσα στα δύο, καθώς η πεπτιδική αλυσίδα μπορεί να περιστρέφεται και οι υπολογισμοί της δομής να καταλήγουν στους δύο διαφορετικούς προσανατολισμούς. Η έλλειψη NOE σημάτων μεταξύ των αμινοξέων του τριπεπτιδίου και των αμινοξέων που προηγούνται στην ακολουθία ("πυρήνας" 1-6) δεν επιτρέπει τον υπολογισμό του προσανατολισμού της ραχοκοκαλιάς. Αυτό που πρέπει να αξιολογηθεί ως ενδιαφέρον δομικό χαρακτηριστικό στα δύο C-τελικά τριπεπτίδια είναι η ύπαρξη και διατήρηση της καλά καθορισμένης (σε επίπεδο NOE σημάτων) β-στροφής.

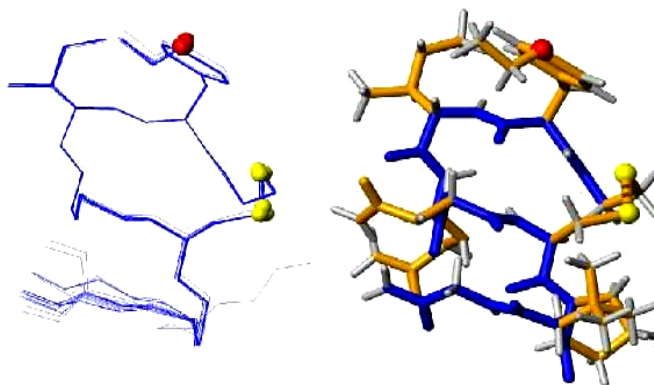
G9



MT1,9



MT1,8



Σχήμα.3: Πεπτιδικές αλυσίδες των 20 υπολογισθέντων δομών (αριστερά) και της μέσης δομής (δεξιά) για τα τρία ανάλογα G_9 , $MT_{1,8}$ και $MT_{1,9}$, μετά από ελαχιστοποίηση της ενέργειας των μορίων. Στις 20 δομές παρουσιάζονται και οι πλευρικές αλυσίδες των Tyr^2 ή $TyrOEt^2$ και Ile^3 ,

και τα άτομα 5 που σχηματίζουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ των αμινοξέων στις θέσεις 1 και 6.

B.5. Συμπεράσματα-Προοπτικές

B.5.1 Αποτίμηση των Βιολογικών Αποτελεσμάτων

Από την παρατήρηση των βιολογικών αποτελεσμάτων που παρατίθενται στον πίνακα B.5. προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

Η εισαγωγή του β-μερκάπτοπροπιονικού οξέος στη θέση 1 οδηγεί σε ανάλογα με ενισχυμένες αγωνιστικές και ανταγωνιστικές ιδιότητες γεγονός το οποίο ευρίσκεται σε συμφωνία με βιβλιογραφικές παρατηρήσεις [12,30].

Η εισαγωγή της D-Tyr(OEt) στη θέση 2 οδηγεί σε ανάλογα με ισχυρές ανταγωνιστικές ιδιότητες. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνει ανάλογες παρατηρήσεις εκ της βιβλιογραφίας σύμφωνα με τις οποίες η θέση 2 θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική για τη μορφή της βιολογικής δράσης (αγωνιστική ή ανταγωνιστική)

την οποία θα εμφανίσουν τα ανάλογα της ωκυτοκίνης. Έτσι με βάση του διαμορφωτικού προτύπου του Walter [31,32], η τοποχημεία του αρωματικού υδροξυλίου της τυροσίνης στη θέση 2 διαδραματίζει ιδιαίτερο ρόλο στη διέγερση του υποδοχέα. Έτσι αντικατάσταση της L-Tyr από D-αρωματικό αμινοξύ ιδιαίτερα όταν αυτό χαρακτηρίζεται από έλλειψη ελεύθερου φαινολικού υδροξυλίου, οδηγεί σε ανάλογα με ισχυρές ανταγωνιστικές ιδιότητες [211-213]. Η ανταγωνιστική δράση των αναλόγων με DTyr(OEt) στη θέση 2 φαίνεται να ενισχύεται *in vitro* τουλάχιστον με την εισαγωγή της Gly(tBu) στις θέσεις 8 και 9. Το γεγονός αυτό αποδίδεται σε πιθανό κατάλληλο προσανατολισμό, τόσο του τελικού καρβοξαμιδίου, όσο και ολόκληρου του τελικού τριπεπτιδίου. Όπως ήδη προαναφέραμε στην ανάλυση των αποτελεσμάτων από την μελέτη των 2D φασμάτων, πιθανότατα αλλάζει ο προσανατολισμός του τελικού τριπεπτιδίου με την εισαγωγή του αμινοξέος αυτού στην πεπτιδική αλυσίδα. Από αυτόν τον προσανατολισμό εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό η ικανότητα σύνδεσης της ωκυτοκίνης και των αναλόγων της με τον υποδοχέα. Το παράγωγο Gly(tBu) είναι ένα λιπόφιλο ογκώδες

παράγωγο (μικρότερη άρα διαμορφωτική ευκαμψία) το οποίο εισήχθη στη θέση 8 και 9 αντί της Leu. Σύμφωνα με τα δεδομένα των βιολογικών αποτελεσμάτων τα ανάλογα με Mpa1, DTyr(OEt) στη θέση 2 και Gly(tBu) στη θέση 8 και 9 παρουσιάζουν πολλή καλή ανταγωνιστική δράση (Πίνακας Β.5). Στα ανάλογα G₉ και G₈ (με μοναδική αλλαγή στη πεπτιδική αλυσίδα του προαναφερθέντος παραγώγου στις θέσεις 8 και 9) παρατηρούμε μικρή ωκυτόκιο δράση (σύμφωνα με τα δεδομένα των βιολογικών αποτελεσμάτων). Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται στο ότι το παράγωγο αυτό (Gly(tBu)) επηρεάζει τον προσανατολισμό των δραστικών πλευρικών ομάδων αμινοξέων τα οποία είναι καθοριστικά για τη σύζευξη και διέγερση του υποδοχέα. Το ανάλογο MG₉ εμφανίζει σχετικά μικρή ανταγωνιστική δράση, πράγμα που αποδεικνύει το πόσο σημαντική είναι η εισαγωγή του D-αρωματικού αμινοξέος με έλλειψη ελεύθερου φαινολικού υδροξυλίου, για την εμφάνιση ανταγωνιστικής δράσης, καθώς επίσης και τη σημασία που έχει η εισαγωγή του Mpa στη πεπτιδική αλληλουχία, αφού συγκρητικά με τα ανάλογα G₉ και G₈ το εν λόγω ανάλογο εμφανίζει ανταγωνιστική δράση. Οι προσπάθειες των σαράντα

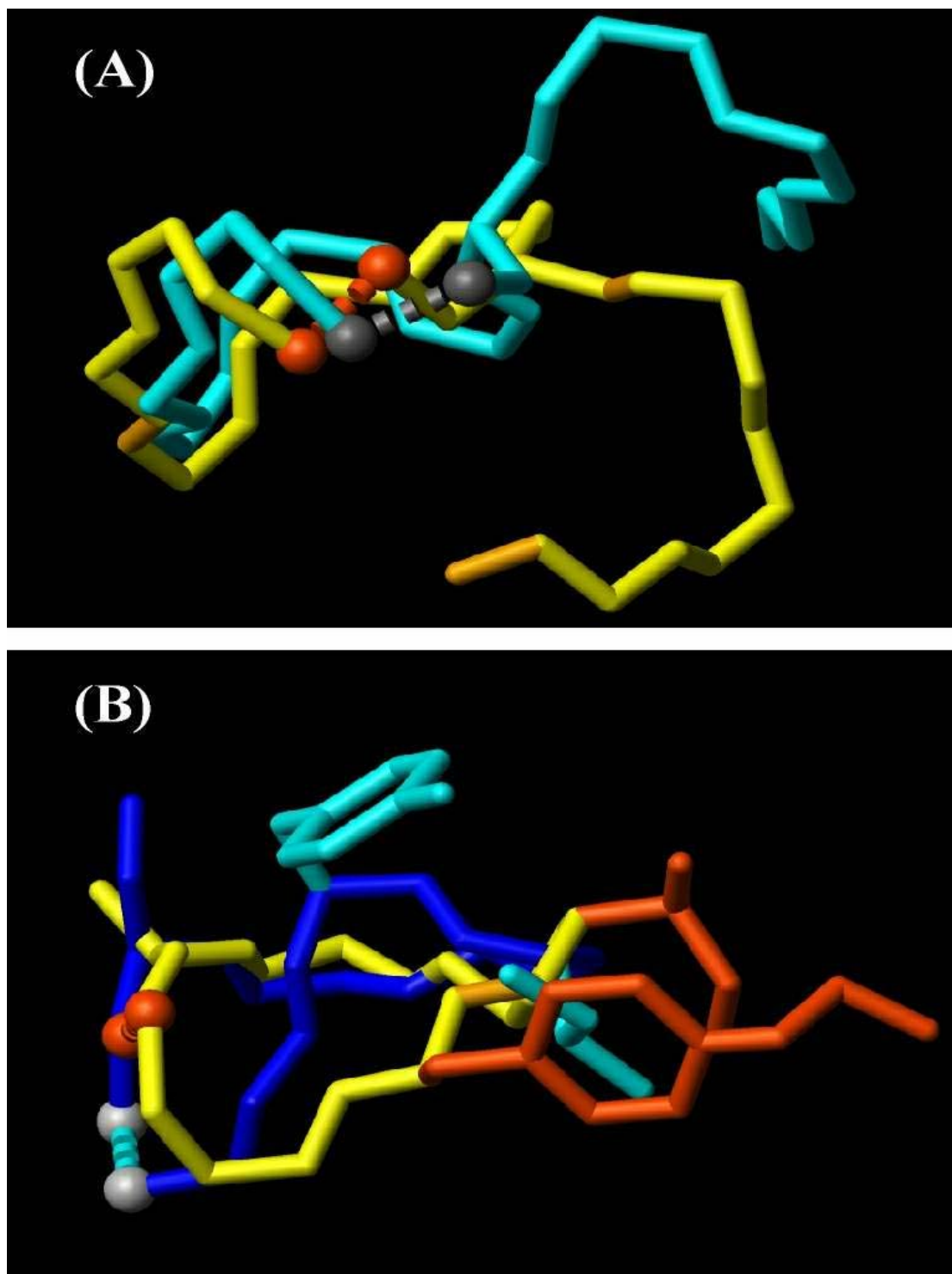
τελευταίων χρόνων για την εύρεση ενός ανταγωνιστή της ωκυτοκίνης, με σκοπό την αντιμετώπιση του πρόωρου τοκετού, έχουν αποβεί άκαρπες αν αναλογιστεί κανείς ότι μόνο ένας πεπτιδικός ανταγωνιστής της ωκυτοκίνης το Atosiban (Mpa¹, D-Tyr(Et)², Thr⁴, Orn⁸] OT) έχει φτάσει σε προχωρημένες κλινικές δοκιμές. Έτσι το ενδιαφέρον μερικών ερευνητών στράφηκε στους μη πεπτιδικούς ανταγωνιστές (π.χ. L-366,509, L-368,899) για τους οποίους υποστηρίχθηκε ότι εμφανίζουν εκλεκτικότητα, ισχυρή ανταγωνιστική δράση και ότι μπορούν να χορηγηθούν από το στόμα. Παρόλα αυτά κανείς από αυτούς δεν έχει φτάσει, για διάφορους λόγους σε κλινικές δοκιμές

Οι προσπάθειες αυτές στηρίζονται στην εμπειρία, όλα αυτά τα χρόνια ύστερα από μελέτη των σχέσεων δομής-δραστικότητας των διαφόρων αναλόγων που έχουν συντεθεί έως τώρα. Στο εργαστήριο μας συνεχίζοντας έρευνες χρόνων θα προχωρήσουμε στην Παρασκευή νέων πεπτιδικών αναλόγων της ωκυτοκίνης. Το ενδιαφέρον μας εστιάζεται κυρίως στην τροποποίηση των θέσεων 8 και 9 αναλόγων που περιέχουν στην

θέση 1 Μρα και στην θέση 2 ένα D-αρωματικό αμινοξύ, όπως επίσης και στην σύνθεση δικυκλικών αναλόγων της ωκυτοκίνης..

B.5.2 Αποτίμηση των Αποτελεσμάτων από τη Διαμορφωτική Μελέτη των Αναλόγων σε Διάλυμα

Στο σχήμα 1 (Α) κάνουμε μια σύγκριση των μέσων δομών των αναλόγων MT_{1,8} και MT_{1,9} (με το γαλάζιο χρώμα απεικονίζεται το MT_{1,8} και με το κίτρινο το MT_{1,9}) και παρατηρούμε μια σύγκλιση της διαμόρφωσης της πεπτιδικής αλυσίδας του κυκλικού τμήματος και στα δύο μόρια, μέχρι τη θέση 5 όπου υπάρχει η ασπαραγίνη. Μεταξύ της ασπαραγίνης και της κυστεΐνης, στη θέση 6 υπάρχει μια διαφοροποίηση στη δομή, η οποία όμως είναι πιθανότατα το αποτέλεσμα του διαφορετικού προσανατολισμού του τελικού τριπεπτιδίου στα δύο ανάλογα και του οποίου η στρέψη επηρεάζει και τη πεπτιδική αλυσίδα στις θέσεις 5 και 6. Όπως φαίνεται και από τα βιολογικά αποτελέσματα τα ανάλογα αυτά παρουσιάζουν ισχυρή ανταγωνιστική δράση, και αυτό ίσως έχει να κάνει με τον προσανατολισμό του τελικού τριπεπτιδίου. Στο (Β) του σχήματος απεικονίζονται τα ανάλογα G₉ και MT_{1,9}, (με μπλέ το G₉ και κίτρινο το MT_{1,9}) χωρίς να φαίνεται το τελικό τριπεπτίδιο. Παρατηρούμε τον διαφορετικό προσανατολισμό των δακτυλίων στη θέση δύο της τυροσίνης για το μόριο G₉ και της D-Tyr(OEt) στο μόριο MT_{1,9} και το αποτέλεσμα της D-διαμόρφωσης της υποκατεστημένης τυροσίνης έναντι της L-διαμόρφωσης του φυσικού αμινοξέως στη δομή της πεπτιδικής αλυσίδας. Ο διαφορετικός προσανατολισμός του φαινολικού δακτυλίου του D αμινοξέος όντως φαίνεται να ευθύνεται για την ανταγωνιστική δράση του αναλόγου αυτού σε σχέση με το ανάλογο με το φυσικό αμινοξύ στη θέση αυτή.



Σχήμα.1: Σύγκριση των μέσων δομών των αναλόγων $MT_{1,8}$ και $MT_{1,9}$ (A) καθώς επίσης των G_9 και $MT_{1,9}$ για το τμήμα των αμινοξέων 1 έως 6 (B). Και στις δύο περιπτώσεις παρουσιάζονται τα άτομα S και οι δισουλφιδικοί δεσμοί ενώ στο (B) παρουσιάζονται οι αρωματικοί δακτύλιοι της Tyr (G_9) DTyrOEt ($MT_{1,9}$) και οι πλευρικές αλυσίδες της Ile³

Γ. Πειραματικό Μέρος

Γ.1 Συσκευές - Όργανα - Υλικά

Η σύνθεση των αναλόγων της ωκυτοκίνης πραγματοποιήθηκε σε στερεή φάση χρησιμοποιώντας τη 2-χλωρο-τριφαινυλο-μεθυλο-ρητίνη (Cl-Trt) με συνδέτη Rink Bernatowitz και ακολουθώντας την Fmoc/*t*Bu μεθοδολογία σύνθεσης πεπτιδίων.

Η συσκευή στην οποία πραγματοποιήθηκε το μεγαλύτερο μέρος της σύνθεσης αποτελείτο από μία υάλινη φιάλη αντίδρασης (2 × 10 ή 3 × 15 cm) εφοδιασμένη στο πάνω μέρος με άνοιγμα και βιδωτό πώμα (κατασκευασμένο συνήθως από teflon) και στο κάτω μέρος με πορώδες φίλτρο (G-2), στρόφιγγα και ακροφύσιο για την απόρριψη των υγρών από τις διηθήσεις με εφαρμογή κενού (Σχήμα Β.1).



Σχήμα Γ.1. Φιάλη αντίδρασης για σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση (SPPS)

Ο καθαρισμός των crude πεπτιδίων έγινε σε πρώτη φάση με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (*size exclusion chromatography*) ή αλλιώς χρωματογραφία διηθήσεως πηκτής (*gel filtration chromatography*) χρησιμοποιώντας Sephadex G-15® και εκλούτη διάλυμα AcOH 25%. Η ροή του εκλούτη ρυθμίζεται με τη βοήθεια αντλίας (Pharmacia LKB-Pump P-1) στα 6 ml/hr.

Στη χρωματογραφία πηκτής απομακρύνονται τα μικρότερα πεπτιδικά μόρια, καθώς και οποιασδήποτε μορφής άλατα. Το Sephadex είναι ένα προϊόν ευρείας χρήσης, το οποίο παρασκευάζεται από τις δεξτράνες των πολυσακχαριτών με διασταυρώσεις από επιχλωρυδρίνη. Με κατάλληλες συνθήκες μπορεί να ελεγχθεί ο αριθμός των δεσμών διασταύρωσης και συνεπώς το μέγεθος των πόρων. Κάθε Sephadex τύπου G είναι κατάλληλο για τον διαχωρισμό ουσιών των οποίων τα μοριακά βάρη βρίσκονται σε μια ορισμένη περιοχή. Ο διαχωρισμός αυτός στηρίζεται στο γεγονός ότι ανάλογα με την έκταση των δεσμών διασταύρωσης υπάρχει και ένα οριακό μέγεθος για το μόριο που τού επιτρέπει να εισχωρεί στο εσωτερικό του. Τα μεγαλύτερα μόρια διέρχονται ταχύτερα μέσα από τη στήλη, ενώ τα μικρότερα, λόγω διαφορετικού βαθμού εισχώρησης στο εσωτερικό των πόρων, καθυστερούν σημαντικά. Για τη χρησιμοποίηση του Sephadex είναι αναγκαία η διόγκωσή του, η οποία πραγματοποιείται συνήθως με υδατικά διαλύματα (στην προκειμένη περίπτωση με οξικό οξύ 25%), οπότε και λαμβάνει τη μορφή gel. Ο τελικός καθαρισμός επιτυγχάνεται με τη βοήθεια υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.

Η συσκευή η οποία χρησιμοποιήθηκε είναι του οίκου Pharmacia (LKB-2250) εφοδιασμένη με ημιπαρασκευαστική χρωματογραφική στήλη ανάστροφης φάσης C-18 S100DS₂ της Phase Sep. Η καθαρότητα των πεπτιδίων πριν και μετά την ημιπαρασκευαστική χρωματογραφία ελεγχόταν με αναλυτική χρωματογραφία υψηλής απόδοσης σε συσκευή Pharmacia (LKB-2210) χρησιμοποιώντας στήλη Techosphere 50DS₂ (C-18, 250mm×4,6 mm) της HPLC Technology LTD. Το διάλυμα έκλουσης ήταν μίγμα ακετονιτριλίου/νερού γραμμικά διαβαθμιζόμενης συγκέντρωσης, στο οποίο η συγκέντρωση TFA ήταν 0,1%. Η μεταβολή της σύστασης του

συστήματος διαλυτών είχε ως εξής: από 5% CH₃CN έως 60% CH₃CN για 30 min, από 60% CH₃CN έως 100% CH₃CN σε 5 min, μένει στο 100% CH₃CN για 2 min και από εκεί στο 5% σε 3 min.

Η ροή στην περίπτωση της αναλυτικής χρωματογραφίας ήταν 1 ml/min, ενώ στην ημιπαρασκευαστική 2 ml/min. Για την ανίχνευση των προϊόντων μετρήθηκε η απορρόφηση στα 220 και 254 nm με φωτόμετρο Pharmacia VWM1. Τα κλάσματα, τα οποία περιέχουν το επιθυμητό πεπτιδίο μετά τη συλλογή τους, συμπυκνώνονται, σε ελαττωμένη πίεση, προκειμένου να απομακρυνθεί το ακετονιτρίλιο. Το εναπομένον υδατικό διάλυμα του πεπτιδίου υποβάλλεται σε λυοφιλοποίηση και το τελικό προϊόν αποθηκεύεται στους -20 °C. Για τη λυοφιλοποίηση των πεπτιδίων χρησιμοποιήθηκε συσκευή του οίκου Labconco και αντλία ελαίου (Edwards).

Οι χρωματογραφίες λεπτής στιβάδας έγιναν σε πλάκες silica gel 60 με δείκτη φθορισμού F254 (Merck). Για την ανάπτυξη των χρωματογραφημάτων χρησιμοποιήθηκαν τα συστήματα διαλυτών:

α) 1-Βουτανόλη/Οξικό οξύ/Νερό/Πυριδίνη (4:1:1:2, v/v)

β) Ακετονιτρίλιο/Νερό (5:1, v/v)

Η εμφάνιση των χρωματογραφημάτων έγινε: i) με υπεριώδη ακτινοβολία (UV) και ii) με ψεκασμό με διάλυμα νινυδρίνης (0,3 γρ. νινυδρίνης, 100 ml 1-βουτανόλης και 3 ml οξικού οξέος), για τα ανάλογα με κυστεΐνη στη θέση 6. Ενώ τα ανάλογα με μερκαπτο-προπιονικό οξύ γίνεται με το αντιδραστήριο Charring (20 γρ. θειικό αμμώνιο, σε 100 ml νερό και 5ml π. θειικό οξύ).

Τα αμινοξέα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από τις εταιρείες Bachem Inc., Nova-Biochem και Chemical and Biochemical Laboratories of

Patras SA. Η Cl-Trt ρητίνη με συνδέτη Ring Bernatowitz ήταν της εταιρείας Chemical and Biochemical Laboratories of Patras S.A.

Οι εταιρείες προέλευσης των οργανικών διαλυτών ήταν οι Merck, Aldrich, Carlo Erba και LabScan. Οι συμπυκνώσεις των διαλυμάτων έγιναν, σε ελαττωμένη πίεση, σε λουτρό θερμοκρασίας 35–45 °C με τη βοήθεια συσκευής Böchi (Rotavapor R/A)

Γ.2 Μέθοδοι

Η ανοικοδόμηση της πεπτιδικής αλυσίδας πραγματοποιήθηκε επί της 2-χλωροτριφαινυλομεθυλο ρητίνης με υποκατάσταση 0,55mmol/gr. Το πρωτόκολλο της πεπτιδικής σύνθεσης, το οποίο ακολουθείται παρουσιάζεται στον Πίνακα Γ.1. Η σύζευξη πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο των ενεργών εστέρων. Σε κάθε περίπτωση χρησιμοποιήθηκε περίσσεια Fmoc-αμινοξέος (3 ισοδύναμα), DIC (3,3 ισοδύναμα) και HOBt (4,5 ισοδύναμα). Η αντίδραση σύζευξης πραγματοποιήθηκε σε διαλύτη DMF. Η διάρκεια της αντίδρασης σύζευξης ήταν περίπου 2 h, ενώ ο έλεγχος γίνονταν με τη βοήθεια της δοκιμής Kaiser [210]. Η αποπροστασία από την Fmoc-ομάδα, πριν από κάθε σύζευξη, έγινε με διάλυμα πιπεριδίνης (20%, v/v) σε DMF. Η απόσπαση του πεπτιδίου από τη ρητίνη καθώς και η απομάκρυνση των πλάγιων προστατευτικών ομάδων πραγματοποιήθηκε με την επίδραση διαλύματος TFA/DCM (80:20, v/v) παρουσία ανισόλης (1,5%), 1,2-αιθανοδιθειόλης (2,5%) και νερού (1,5%) για 4 h σε θερμοκρασία δωματίου.

Πίνακας.Γ.1: Πρωτόκολλο πεπτιδικής σύνθεσης επί της Cl-Trt ρητίνης

	Στάδιο	Αριθμός επ/ψεων	Αντιδραστήρια Διαλύτες	Όγκος διαλ/τος (ml)	Διάρκεια (min)
1.	Έκπλυση	3	DMF	~3	1
2.	Αποπροστασία	-	20% Πιπεριδίνη/DMF	~3	10
3.	Αποπροστασία	-	20% Πιπεριδίνη/DMF	~3	30
4.	Έκπλυση	3	DMF	~3	1
5.	Έκπλυση	2	2-προπανόλη	~3	1
6.	Έκπλυση	3	DMF	~3	1
7.	Έκπλυση	2	2-προπανόλη	~3	1
8	Διόγκωση	1	DMF	~3	10
9.	Σύζευξη	-	Fmoc-AA-OH /DIC/HOBt σε DMF	1	120
10	Έκπλυση	3	DMF	~3	1
11	Έκπλυση	2	2-προπανόλη	~3	1
12	Έκπλυση	3	DMF	~3	1

.					
13	Έκπλυση	2	2-προπανόλη	~3	1
.					

Γ.2.1 Γενική Μέθοδος Σύζευξης με DIC/HOBt

Ποσότητα N^{α} -προστατευμένου αμινοξέος (1 mmol) και HOBt (1,5 mmol) διαλύονται σε DMF. Το διάλυμα ψύχεται στους 0 οC και ακολουθεί η προσθήκη DIC (1,1 mmol). Το μίγμα αναδεύεται 10 λεπτά στους 0 οC και 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το μίγμα προστίθεται στη φιάλη αντίδρασης της πεπτιδικής σύνθεσης. Ακολουθεί ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 τουλάχιστον ώρες και κατόπιν η ρητίνη διηθείται και πλένεται διαδοχικά με DMF/i-PrOH σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Πίνακα Β.1. Τέλος η αντίδραση σύζευξης ελέγχεται με τη δοκιμή Kaiser.

Γ.2.2 Έλεγχος της Αντίδρασης Σύζευξης με τη Δοκιμή KAISER (KAISER TEST)

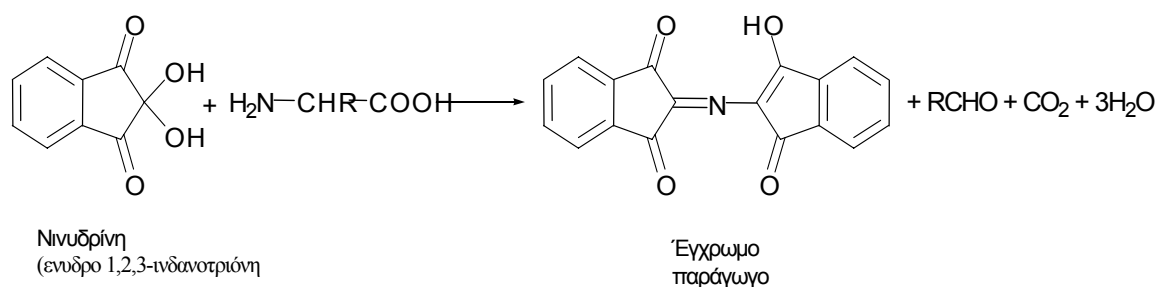
Ο έλεγχος της αντίδρασης σύζευξης γίνεται με τη μέθοδο Kaiser [210]. Με τη δοκιμή αυτή ανιχνεύονται ελεύθερες αμινομάδες (Σχήμα Γ.4.1). Έτσι, θετικό αποτέλεσμα δηλώνει ημιτελή αντίδραση, ενώ αρνητικό δηλώνει ότι η αντίδραση σύζευξης ήταν ποσοτική. Σύμφωνα με αυτή, σε ένα δείγμα πεπτιδίου-ρητίνης (3 έως 5 mg) προστίθενται κατά σειρά 2 - 3 σταγόνες από τα παρακάτω διαλύματα:

Διάλυμα 1: 500 mg νινυδρίνης σε 10 ml 1-βουτανόλης

Διάλυμα 2: 80 g φαινόλης σε 20 ml 1-βουτανόλης

Διάλυμα 3: 2 ml υδατικού διαλύματος 0,001 M KCN σε 98 ml πυριδίνης

Το μίγμα θερμαίνεται για 5 min σε 100 οC. Στην περίπτωση όπου το διάλυμα παραμένει κίτρινο και οι κόκκοι της ρητίνης λευκοί, η δοκιμή θεωρείται αρνητική ως προς την ύπαρξη ελεύθερης αμινομάδας. Αν το χρώμα των κόκκων, του διαλύματος ή και των δύο γίνεται μπλε προς μοβ, η δοκιμή κρίνεται θετική οπότε απαιτείται επανασύζευξη ή ακετυλίωση των ελεύθερων αμινομάδων της ρητίνης. Σημειώνεται ότι η δοκιμή Kaiser έχει απόλυτη ευαισθησία για την ανίχνευση πρωτοταγών αμινομάδων. Ο μηχανισμός της αντίδρασης δεν έχει πλήρως εξακριβωθεί.



Σχήμα Γ.4.1. Αντίδραση νινυδρίνης για την ανίχνευση ελεύθερων αμινομάδων (δοκιμή Kaiser)

Γ.2.3 Μεθοδολογία NMR

Προετοιμασία Δειγματος.

Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για τα 1D και τα 2D πειράματα NMR ήταν το DMSO- d_6 . Καθένα από τα ανάλογα που συντέθηκαν διαλύθηκαν σε DMSO για τη δημιουργία διαλύματος συγκέντρωσης 2,5 mM, για την καταγραφή των 1D και 2D φασμάτων. Τα πειράματα έγιναν σε θερμοκρασία 298K.

Φασματοσκοπία NMR.

Προκαταρκτικές μελέτες Φασματοσκοπίας NMR έγιναν σε μαγνητικό πεδίο των 400 MHz, (BRUKER Avance) στο Κέντρο Ενόργανης Ανάλυσης, στο Πανεπιστήμιο της Πάτρας. Ενώ 1D και 2D φάσματα ελήφθησαν στο Κέντρο Πυρηνικού Συντονισμού, του Πανεπιστημίου της Φλωρεντίας με χρήση 500 MHz NMR φασματογράφου (BRUKER Avance).

Ο κορεσμός του σήματος του νερού που υφίσταται στο DMSO γίνεται με την παλμική ακολουθία γνωστή ως "PRESATURATION" [214]. COSY [215] και TOCSY [216] πειράματα πραγματοποιήθηκαν για να επιτευχθεί η αποτίμηση των πρωτονιακών σημάτων συντονισμού που ανήκουν σε κάθε αμινοξύ της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. TOCSY πειράματα πραγματοποιήθηκαν με την MLEV-17 spin-lock παλμική ακολουθία και

χρόνους μίξης 80 και 100 ms. TPPI NOESY [217] φάσματα καταγράφηκαν με χρόνους μίξης 400 ms και 600 ms. Τα παραπάνω φάσματα αποτελούνται από 2K data points στην διάσταση F2 και από δεδομένα που προέρχονται από 800–1024 πειράματα στην διάσταση F1.

Τα δεδομένα NMR επεξεργάστηκαν και αναλύθηκαν με την χρήση κατάλληλων προγραμμάτων της εταιρίας Bruker σε υπολογιστικά συστήματα Silicon Graphics O2 και περιβάλλοντος Unix του Εργαστηρίου της Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, του Πανεπιστημίου Πατρών. Η αποτίμηση των δισδιάστατων πρωτονιακών φασμάτων πραγματοποιήθηκε επίσης σε σύστημα Silicon Graphics O2, με την βοήθεια κατάλληλων προγραμμάτων, όπως το πρόγραμμα XEASY (ETH, Zürich) [218].

Γ.3 Σύνθεσεις

Η σύνθεση όλων των αναλόγων της ωκυτοκίνης έγινε ακολουθώντας τη βήμα προς βήμα στρατηγική ανοικοδόμησης της πεπτιδικής αλυσίδας και χρησιμοποιώντας την Fmoc/*t*Bu μεθοδολογία σύνθεσης πεπτιδίων. Μετά τη σύζευξη με Pro ακολουθεί προληπτικά επανασύζευξη, δεδομένου ότι η δοκιμή Kaiser μπορεί να είναι ψευδώς αρνητική, γιατί η αμινομάδα των αμινοξέων είναι δευτεροταγής. Τα πεπτίδια που συντέθηκαν στην παρούσα εργασία αναγράφονται στον πίνακα Γ.2.4, η σύνθεση των συγκεκριμένων πεπτιδίων έγινε σύμφωνα με την προαναφερθείσα στρατηγική, και η πορεία σύνθεσης τους θα αναπτυχθεί στις παραγράφους που θα ακολουθήσουν.

Πίνακας Γ.3. Νεοσυντεθέντα ανάλογα.

<i>Ανάλογα</i>
<i>[Gly(tBu)⁸]OT (G₈)</i>
<i>[Gly(tBu)⁹]OT (G₉)</i>
<i>[Mpa¹,Gly(tBu)⁹]OT (MG_{1,9})</i>
<i>[Mpa¹,DTyr(OEt²),Gly(tBu)⁸]OT (MT_{1,8})</i>
<i>[Mpa¹,DTyr(OEt²),Gly(tBu)⁹]OT (MT_{1,9})</i>

Γ.3.1 Σύνθεση των Αναλόγων [Gly(tBu)⁸]OT (G₈) και [Mpa¹,DTyr(OEt)²,Gly(tBu)⁸]OT (MT_{1,8}).

Για τη σύνθεση των (G₈) και (MT_{1,8}) χρησιμοποιήθηκαν 500 mg 2-χλωροτριτυλο-ρητίνης με συνδέτη Rink Bernatowitz, η υποκατάσταση της οποίας ήταν 0,5 mmol/g..

Η σύζευξη του κάθε αμινοξέος πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του δικυκλοισοπροπυλοκαρβοδιιμιδίου\1υδρόξυ-βενζοτρίαζολίου. Σε κάθε σύζευξη, μέχρι το στάδιο του επταπεπτιδίου, χρησιμοποιήθηκαν 0,75 mmol προστιθέμενου αμινοξέος, 0,13ml (0,825mmol) DIC και 153mgr (1.125 mmol) HOBT. Στον Πίνακα Γ.3.1 παρουσιάζονται οι ποσότητες των προστιθέμενων αμινοξέων.

Πίνακας Γ.3.1: Ποσότητες προστιθέμενων Fmoc-αμινοξέων για τη σύνθεση των G₈ και MT_{1,8}.

Fmoc-αμινοξύ	Βάρος προστιθέμενου	Χρόνος αντίδρασης	Δοκιμή

	Fmoc-αμινοξέος (mg)	(h)	Σύζευξης
Fmoc-Gly-OH	223	2	(-)
Fmoc-(tBu)Gly-OH	265	2	(-)
Fmoc-Pro-OH	253	2	(-)
Fmoc-Cys(Trt)-OH	440	2	(+)
	220		(-)
Fmoc-Asn(Trt)-OH	447,5	2	(-)
Fmoc-Gln(Trt)-OH	458	2	(-)
Fmoc-Ile-OH	415	2	(-)

Μετά τη σύζευξη και απομάκρυνση της Nα-αμινομάδας του Fmoc-Ile-OH αμινοξέος το προστατευμένο επταπεπτίδιο, το οποίο είναι προσκολλημένο στη ρητίνη, χωρίζεται σε δύο ίσα μέρη.

Το ένα μέρος αντιδρά, αρχικά με 324 mg (0,75 mmol) Fmoc-Tyr(t-Bu)-OH ενώ η σύζευξη διαρκεί 2 ώρες και πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας 0,13 ml DIC και 153 mg HOBT. Ύστερα γίνεται η προσθήκη 440 mg (0,75mmol) Fmoc-Cys(Trt)-OH 0,13 ml DIC και 153 mg HOBT, για 2h οπότε παραλαμβάνεται το πεπτίδιο **G₈** προσκολλημένο στη ρητίνη.

Το άλλο μέρος αντιδρά αρχικά με 324 mg (0,75mmol) Fmoc-DTyr(OEt)-OH και ύστερα με 261 mg (0,75 mmol) Mpa(Trt). Η σύζευξη και στις δύο περιπτώσεις γίνεται με επίδραση 0,12 ml DIC και 134,24 mg HOBT , ενώ διαρκεί 2 ώρες. Έτσι παραλαμβάνεται το πεπτίδιο **MT_{1,8}** προσκολλημένο στη ρητίνη. Μετά την απομάκρυνση της Fmoc-ομάδας από τα προστατευμένα πεπτίδια, πραγματοποιείται η απομάκρυνση των

πλαγίων προστατευτικών ομάδων, από τα πεπτιδία καθώς και του πεπτιδίου της ρητίνης με διάλυμα TFA/DCM (80:20, v/v) παρουσία ανισόλης (1,5%) 1,2 αιθανοδιθειόλης (2,5%) και νερού (1,5%) για 4 ώρες. Ύστερα ακολουθεί διήθηση, και συμπύκνωση του διηθήματος, σε ελαττωμένη πίεση, μέχρι ξηρού.

Τα προϊόντα καταβυθίζονται μετά από κατεργασία με άνυδρο διαιθυλεθέρα. Κατόπιν ακολουθεί διήθηση και το απροστάτευτο πεπτιδίο που παραλαμβάνουμε το αφήνουμε από 36 έως 48 ώρες σε διάλυμα 20%DMSO/H₂O για να δημιουργηθεί ο δισουλφιδικός δεσμός. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) καθώς και με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) (Για κάθε mg του απροστάτευτου πεπτιδίου απαιτείται 1ml διαλύματος 20% DMSO σε H₂O). Ύστερα ακολουθεί νέα συμπύκνωση σε ελαττωμένη πίεση, μέχρι ξηρού, και καταβύθιση του πεπτιδίου με άνυδρο αιθέρα. Τα στερεά, τα οποία λαμβάνονται με αυτόν τον τρόπο, διηθούνται και εκπλένονται πάνω στον ηθμό με διαιθυλαιθέρα. Τα λαμβανόμενα πεπτιδία καθαρίζονται (ουσιαστικά πρόκειται για αφαλάτωση) με χρωματογραφία πηκτής σε Sephadex G-15® χρησιμοποιώντας σαν εκλούτη διάλυμα AcOH 25%. Σε αυτό το στάδιο, η καθαρότητα των συντεθέντων αναλόγων είναι μεγαλύτερη του 90%. Ο πλήρης καθαρισμός των πεπτιδίων επιτυγχάνεται με τη χρησιμοποίηση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης, σε ημιπαρασκευαστική κολώνα C18 και εκλούτη σύστημα διαλυτών AcCN/H₂O (0,1% TFA) μεταβαλλόμενης σύστασης 10-70% σε 45 λεπτά. Λαμβάνονται τελικά 140,5mg **G₈** (ολική απόδοση 92%) και 199,45mg **MT_{1,8}** (ολική απόδοση 74%)

Γ.3.2 [Gly(tBu)⁹OT (**G₉**)

Για τη σύνθεση του **G₉** χρησιμοποιήθηκαν 300 mg 2-χλωροτριτυλο-ρητίνης με συνδέτη Rink Bernatowitz, η υποκατάσταση της οποίας ήταν 0,5 mmol/g..

Η σύζευξη του κάθε αμινοξέος πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του δικυκλοισοπροπουλοκαρβοδιιμιδίου\1-υδρόξυ-βενζοτριαζολίου (DIC\HOBT) για 2 ώρες. Σε κάθε σύζευξη χρησιμοποιήθηκαν 0,45 mmol προστιθέμενου αμινοξέος, 0,077 ml (0,5 mmol) DIC και 91,2mg (0,68 mmol) HOBT.

Στον Πίνακα Γ.3.2 παρουσιάζονται οι ποσότητες των προστιθέμενων αμινοξέων.

Πίνακας Γ.3.2: Ποσότητες προστιθέμενων Fmoc-αμινοξέων για τη σύνθεση του G₉.

Fmoc-αμινοξύ	Βάρος προστιθέμενου Fmoc-αμινοξέος (mg)	Χρόνος αντίδρασης (h)	Δοκιμή Σύζευξης
Fmoc-Gly(tBu) ⁹ -OH	159	2	(-)
Fmoc-Leu-OH	159	2	(-)
Fmoc-Pro-OH	152	2	
	152	2	(-)
Fmoc-Cys(Trt)-OH	263,5	2	(-)
Fmoc-Asn(Trt)-OH	268,5	2	(-)
Fmoc-Gln(Trt)-OH	275	2	(-)
Fmoc-Ile-OH	159	2	(-)
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	207	2	(-)
Fmoc-Cys(Trt)-OH	263,5	2	(-)

Μετά την απομάκρυνση της Fmoc-ομάδας από το προστατευμένο πεπτιδίο, πραγματοποιείται η απομάκρυνση των πλάγιων προστατευτικών ομάδων, από το πεπτιδίο, το οποίο έχει απομακρυνθεί

πλέον από τη ρητίνη, με διάλυμα TFA\DCM (80:20, v/v) παρουσία ανισόλης (1.5%) 1,2 αιθανοδιθειόλης (2,5%) και νερού (1,5%) για 4 ώρες. Ύστερα ακολουθεί διήθηση, και συμπύκνωση του διηθήματος, σε ελαττωμένη πίεση, μέχρι ξηρού. Τα προϊόντα καταβυθίζονται μετά από κατεργασία με άνυδρο διαιθυλεθέρα. Κατόπιν ακολουθεί διήθηση και το απροστάτευτο πεπτιδίο που παραλαμβάνουμε το αφήνουμε από 36 έως 48 ώρες σε διάλυμα 20%DMSO\H₂O για να δημιουργηθεί ο δισουλφιδικός δεσμός. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) καθώς και με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) (Για κάθε mg του απροστάτευτου πεπτιδίου απαιτείται 1 ml διαλύματος 20% DMSO σε H₂O).

Ύστερα ακολουθεί νέα συμπύκνωση σε ελαττωμένη πίεση, μέχρι ξηρού, και καταβύθιση του πεπτιδίου με άνυδρο αιθέρα. Τα ανάλογα, τα οποία λαμβάνονται με αυτόν τον τρόπο, διηθούνται και εκπλένονται πάνω στον ηθμό με διαιθυλαιθέρα.

Τα λαμβανόμενα πεπτιδία καθαρίζονται με χρωματογραφία πηκτής σε Sephadex G-15[®] χρησιμοποιώντας σαν εκλούτη διάλυμα AcOH 25%. Σε αυτό το στάδιο, η καθαρότητα του G₉ είναι μεγαλύτερη του 90%. Ο πλήρης καθαρισμός των πεπτιδίων επιτυγχάνεται με τη χρησιμοποίηση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης, σε ημιπαρασκευαστική κολώνα C18 και εκλούτη σύστημα διαλυτών AcCN/H₂O (0,1% TFA) μεταβαλλόμενης σύστασης 10-70% σε 45 λεπτά. Λαμβάνονται τελικά 165mg [Gly(tBut)⁹]OT (ολική απόδοση 90%)

Γ.3.3. Σύνθεση των [Mpa¹,Gly(tBut)⁹]OT (MG_{1,9}) και [Mpa¹,DTyr(OEt²),Gly(tBut)⁹]OT (MT_{1,9})

Για τη σύνθεση των MG_{1,9} και MT_{1,9} χρησιμοποιήθηκαν 500 mg 2-χλωροτριτυλο-ρητίνης με συνδέτη Rink Bernatowitz, η υποκατάσταση της οποίας ήταν 0,5 mmol/g..

Η σύζευξη του κάθε αμινοξέος πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του δικυκλοισοπροπυλοκαρβοδιμιδίου\1-υδρόξυ-βενζοτριαζολίου (DIC\HOBt) για 2 ώρες.

Σε κάθε σύζευξη μέχρι το στάδιο του εξαπεπτιδίου χρησιμοποιήθηκαν 0,75 mmol προστιθέμενου αμινοξέος, 0,13 ml (0,825 mmol) DIC και 153mg (1,125 mmol) HOBt. Στον Πίνακα Γ.3.3 παρουσιάζονται οι ποσότητες των προστιθέμενων αμινοξέων.

Πίνακας Γ.3.3: Ποσότητες προστιθέμενων Fmoc-αμινοξέων για τη σύνθεση των **MG_{1,9}** και **MT_{1,9}**.

Fmoc-αμινοξύ	Βάρος προστιθέμενου Fmoc-αμινοξέος (mg)	Χρόνος αντίδρασης (h)	Δοκιμή Σύζευξης
Fmoc-Gly(tBu)-OH	265	2	(-)
Fmoc-Leu-OH	265	2	(-)
Fmoc-Pro-OH	253	2	(+)
	128	2	(-)
Fmoc-Cys(Trt)-OH	439	2	(-)
Fmoc-Asn(Trt)-OH	447,5	2	(-)
Fmoc-Gln(Trt)-OH	458	2	(-)
Fmoc-Ile-OH	415	2	(-)

Μετά την σύζευξη και αποπροστασία της Na αμινομάδας του Fmoc-Ile-OH, το προστατευμένο επταπεπτίδιο, το οποίο είναι προσκολλημένο στην ρητίνη χωρίζεται σε δύο μέρη. Το ένα μέρος αντιδρά με 303mg (0,66 mmol) Fmoc-Tyr(tBu)-OH και 230 mg (0,66 mmol) Mpa(Trt)-OH με τις ανάλογες ποσότητες κάθε φορά DIC (0,11 ml) και HOBt (135 mg. Έτσι παραλαμβάνεται το πεπτίδιο (**MG_{1,9}**) προσκολλημένο στην ρητίνη.

Το άλλο μέρος αντιδρά με 285 mg (0,66 mmol) Fmoc-DTyr(OEt)-OH.H σύζευξη διαρκεί 2 ώρες και πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας 0,11 ml DIC και 135 mg HOBt. Στην συνέχεια προστίθονται 230 mg Mpa-(Trt)-OH με τις ανάλογες κάθε φορά ποσότητες DIC (0,11ml) και HOBt (135 mg). Έτσι παραλαμβάνεται το πεπτιδίο (MT_{1,9}) προσκολλημένο στη ρητίνη.

Μετά την απομάκρυνση της Fmoc-ομάδας από τα προστατευμένα πεπτιδία, πραγματοποιείται η απομάκρυνση των πλαγίων προστατευτικών ομάδων, από τα πεπτιδία καθώς και του πεπτιδίου της ρητίνης με διάλυμα TFA\DCM (80:20, v/v) παρουσία ανισόλης (1.5%) 1,2, αιθανοδιθειόλης και νερού (1,5%) για 4 ώρες. Ύστερα ακολουθεί διήθηση, και συμπύκνωση του διηθήματος, σε ελαττωμένη πίεση, μέχρι ξηρού. Τα προϊόντα καταβυθίζονται μετά από κατεργασία με άνυδρο διαιθυλεθέρα. Κατόπιν ακολουθεί διήθηση και το απροστάτευτο πεπτιδίο που παραλαμβάνουμε το αφήνουμε από 36 έως 48 ώρες σε διάλυμα 20%DMSO\H₂O για να δημιουργηθεί ο δισουλφιδικός δεσμός. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) καθώς και με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) (Για κάθε mg του απροστάτευτου πεπτιδίου απαιτείται 1ml διαλύματος 20% DMSO σε H₂O). Ύστερα ακολουθεί νέα συμπύκνωση σε ελαττωμένη πίεση, μέχρι ξηρού, και καταβύθιση του πεπτιδίου με άνυδρο αιθέρα. Τα στερεά, τα οποία λαμβάνονται με αυτόν τον τρόπο, διηθούνται και εκπλένονται πάνω στον ηθμό με διαιθυλαιθέρα. Τα λαμβανόμενα πεπτιδία καθαρίζονται με χρωματογραφία πηκτής σε Sephadex G-15® χρησιμοποιώντας σαν εκλούτη διάλυμα AcOH 25%. Σε αυτό το στάδιο, η καθαρότητα των συντεθέντων αναλόγων είναι μεγαλύτερη του 90%. Ο πλήρης καθαρισμός των πεπτιδίων επιτυγχάνεται με τη χρησιμοποίηση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης, σε

ημιπαρασκευαστική κολώνα C18 και εκλούτη σύστημα διαλυτών AcCN/H₂O (0,1% TFA) μεταβαλλόμενης σύστασης 10–70% σε 45 λεπτά. Λαμβάνονται τελικά 203 mg του (MG_{1,9}) (ολική απόδοση 88%) και 210,6 mg από το (MT_{1,9}) (ολική απόδοση 88%).

Δ.2. ΕΙΔΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bergmann, M. and Zervas, L., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **65B** (1932) 1192.
2. a) Sifferd, R.H. and du Vigneaud, V., *J. Biol. Chem.*, **108** (1935) 753;
b) Loring, H.S. and du Vigneaud, V., *ibid.*, **111** (1935) 385.
3. Harington, C.R. and Mead, T.H., *Biochem. J.*, **29** (1935) 1602.
4. Merrifield, R.B., *J. Am. Chem. Soc.*, **85** (1963) 2149.
5. Folcigno, L., D' Auria, G. and Saviano, M., *Biopolymers*, **39(6)** (1996) 837.
6. Mitchell F. B, Fang, X. and Wong, S., *Reviews of Reproduction*, **3** (1998) 113.
7. Zing H.H., *Baillie's Clinical Endocrinology and Metabolism*, **10** (1996) 75.
8. Du Vigneaud, V., Recsler, C. and Trippett, S., *J. Biol. Chem.*, **205** (1953) 949.
9. Kimura, T., Tanizawa, O., Mori, K., et al: *Structure and expression of a human oxytocin receptor*, *Nature* (1992) 356.
10. Phaneuf, S., Europe-Finner, N., Varney, M., Mackenzie, IZ., Watson, FP. and Lopez-Bernal, A., *Journal of Endocrinology* **136** (1993) 497.
11. Hooper, KC. and Jessup, DC., *Journal of Physiology* **146** (1959) 539.
12. Burbach, JPH. and Le bouille, JLM., *Journal of Biological Chemistry*, **258** (1982) 1487.
13. Nestor, JJ., Ferger, M.F., and du Vigneaud, V., *Journal of Medicinal Chemistry*, **18** (1975) 284.
14. Grzonka, z., Kasprzykowski, F., Lubkowska, L., Darlak, K., Hahn, T.A., Spatola, AF., *Peptides Res*, **4** (1991) 270

15. (A)Lebl, M., Hill, P., Kazmierski, W., Kapaszova, L., Slaninova, I., Fric, I. and Hruby, V., *Int. J. Peptide Protein Res.*, **36** (1990) 321.(B) Lebl, M., Barth, T., Sertitova, I., Slaninova, J. and Jost, K., *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **50** (1985) 132.
16. Manning, M., Kruszynski, M., Bankowski, K., Olma, A., Lammek, Cheng, L.L., Klis, W.A., Seto, J., Haldar, J. and Sawger, W., *J.Med. Chem*, **32** (1989) 382.
17. Shenderovich, MD., Kover, K., Susanne, N., Collins, N., and Hruby, V.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **119** (1997) 5833.
18. Hruby, V.J., Mosberg, H.J., Hadley, ME., Chan, N.Y., and Powell, A.M., *Int. S. Peptide Protein Res.*, **16** (1980) 372.
19. Goodwin, T.M. and Zograbyan, A., *Clinics in Perinatology*, **25** (1998) 859.
20. Melin, P., Trojnar, J., Johansson, B., Vilhardt, H., Akerlund, M., *J.Endocrinol*, **111** (1986) 125.
21. Assimomytis, N., Magafa, B., Theodoropoulos, D., Cordopatis, P. and Slaninova, J., *letters in peptide Science*, **3** (1996) 127.
22. Flouret, G., Majewski, T., Briehar, W. ,Wilson, L., *J. Med. Chem.* **36** (1993) 747.
23. Moore, S., Felix, AM., Meienhofer, J., Smith, CW., Waltr, R., *J. med. Chem.*, **20** (1977) 495.
24. Pavo, I., Slaninova, J., Klein, U. and Fahrenholz, F., *J. Med. Chem.*, **37** (1994) 255.
25. Buregess, A.W. and Leach, S.J., *Biopolymers*, **12** (1973) 2599.
26. Cordopatis, P., Manessi-Zoupa, E., Theodoropoulos, D., Bossi, R., Bouley, R., Gagnon, S. and Escher, E., *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **44** (1994) 320.
27. Chini, B., Mouillac, B., Ala, Y., Balestre, M. N., Cotte, N., Kallmeyer, S.T., Holfack, J., Eldands, J., Hibert, M., Manning, M., Sand, S. and Barberis, C., *Oxytocin*, Plenum Press, New York (1995) 321.
28. Hlavacek, J., Pospisek, J., Slaninova, J., Chan, Y. W., and Hruby, J. V., *Collection Czechoslovak Chem. Commun.* **52** (1987) 2317-2325.

29. Hlavacek, J., and Fric, I., *Collection Czechoslovak Chem. Commun.* **54** (1989)2261.
30. Ting, Y.F., Smith, C.W., Stahl,G., Walter, R., Cordopatis, P., Theodoropoulos, D., *J. Med. Chem.*, **23** (1980) 693.
31. Ferrier, B.M., Jarris, D. and du Vigneaud, V., *J. Biol.Chem.*, **40** (1965) 4264
32. Hill, P.S., Smith, D.D., Slaninova, J. and Hruby, V.J., *J. Am. Chem. Soc.*,**112**(1990) 3110.
33. Walter, R., Schwartz, F.L., Darnell, J.H., Urry, D.W., *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, **68** (1971) 1355.
34. Walter, R., *Fed. Proc.* **36** (1977) 1972.
35. Hruby, V.J., Eberle, A., Geiger, R., Wieland, T., (Eds) *Perspectives in Peptide Chemistry*, S. Karger: Basel, Switzerland, p.207 (1981)
36. Turner, R.J., Matsoukas, J.M. and Moore, G.J., *Biocheminal and Biophysical Research Communications*, **171** (1990)996.
37. a)Nikiforovich, G.V., Leonova, V.I., Galaktinov, S.G. and Chipens, G.I., *Int. J. Peptide Protein Res.*, **13** (1979) 363.
38. Spasov, V.Z. and Popon, EM., *Soviet. J. Biorg. Chem.*, **7** (1981a) 19.
39. Spasov, v.,and Popov, E.M., *Soviet. J. Biorg. Chem.*, **7** (1981b) 263.
40. Liwo, A., Tempczyk, A. and Grzonka, Z., *J. Comput.-Aided Mol. Desing*, **2** (1988) 281.
41. Ward, D.J., Chen, Y., Platt, E. and Rebson, B., *J. Theor. Biol.*,**148** (1991) 193.
42. Wood, S.P., Tickle, I.S., Threharme, A.M., Pitts, J.E., Mascarenhas, Y., Li, J.Y., Husain, J., Cooper, S., Bluudell, T.L., Hruby, V.J., Buku, A., Fishman, A.J., Wyssbrod, H.R., *Science*, **232** (1986) 636.
43. Shenderovich, M., Wilke, S., Köver, K., Collins, N., Hruby, V., Liwo, A., Ciarkowski, J., *Polish J. Chem.*, **68** (1994) 921.
44. Bergmann, M. & Zervas, L., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **65B** (1932) 1192.
45. McKay, F.C. & Albertson, N.F., *J. Am. Chem. Soc.*, **79** (1957) 4686.
46. Sieber, P. & Iselin B., *Helv. Chim. Acta*, **51** (1968) 614; 622.
47. Carpino, L.A. & Han, G.Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **92** (1970) 5748.

48. Carpino, L.A. & Han, G.Y., *J. Org. Chem.*, **37** (1972) 3404.
49. Paquet, A., *Can. J. Chem.*, **60** (1982) 976.
50. Bolin, D.R., Sytwu I.I., Humier, F. & Meienhofer J., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **33** (1989) 359.
51. Haas, W.L., Krumkalns, E.V. & Gerzon, K., *J. Am. Chem. Soc.*, **88** (1966) 1988.
52. Birr, C., Lochinger, W., Stanke G. & Lang, P., *Justus Lieb. Ann. Chem.*, **763** (1972) 162.
53. Helferich, B., Moog, L. & Juenger, C., *Chem. Ber.*, **58** (1925) 883.
54. Zervas, L. & Theodoropoulos, D., *J. Am. Chem. Soc.*, **78** (1956) 1359.
55. Goerdeler, J. & Holst, A., *Angew Chem.*, **71** (1959) 775.
56. Zervas, L., Borovas, D. & Gazis, E., *J. Am. Chem. Soc.*, **85** (1963) 3660.
57. Ressler, C., *J. Am. Chem. Soc.*, **78** (1956) 5956.
58. Gausepohl, H., Kraft, M. & Frank, R.W., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **34** (1989) 287.
59. Mojsov, S., Mitchell, A. & Merrifield, R., *J. Org. Chem.*, **45** (1980) 555.
60. Bergmann, M. & Koster, H., *Z. Physiol. Chem.*, **159** (1926) 179.
61. Paul, R., Anderson, G.W. & Callahan, F.M., *J. Org. Chem.*, **26** (1961) 3447.
62. Schnabel, E., *Liebigs Ann. Chem.*, **702** (1967) 188.
63. Jager, G. & Geiger, R., *Chem. Ber.*, **103** (1970) 1727.
64. Zervas, L., Winitz, M. & Greenstein, J.P., *Arch. Biochem. Biophys.*, **65** (1956) 573.
65. Zervas, L., Winitz, M. & Greenstein, J.P., *J. Org. Chem.*, **22** (1957) 1515.
66. Zervas, L., Winitz, M. & Greenstein, J.P., *J. Am. Chem. Soc.*, **83** (1961) 3300.
67. Bamachandran, J. & Li, C.H., *J. Org. Chem.*, **27** (1962) 4006.
68. Fujina, M., Wakimasu, M. & Kitada, C., *Chem. Pharm. Bull.*, **29** (1981) 1060.

69. Atherton, E., Sheppard, R.C. & Wade, J.D., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, (1981) 2825.
70. Ramage, R. & Green, J., *Tetrahedron Lett.*, **28** (1987) 2287.
71. Green, J., Ogunjobi, O.M., Ramage, R. & Stewart, A.S.J., *Tetrahedron Lett.*, **29** (1988) 4341.
72. Carpino, L.A., Shroff, H., Triolo, S., Mansour, E.S., Wenschul, H. & Albericio, F., *Tetrahedron Lett.*, **34** (1993) 7829.
73. Shah, D., Schneider, A., Babler, S., Gandhi, R., Van Noord, E. & Chess, E., *Peptide Res.*, **5** (1992) 241.
74. Solé, N.A. & Barany, G., *J. Org. Chem.*, **57** (1992) 5399.
75. Gish, D.T., Katsoyannis, P.G., Hess, G.P. & Stedman, R.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **78** (1956) 5954.
76. Rovero, P., Pegorato, S., Bonelli, F. & Triolo, A., *Tetrahedron Lett.*, **34** (1993) 2199.
77. Bondanszky, M. & du Vigneaud, V., *J. Am. Chem. Soc.*, **81** (1959) 5688.
78. König, W. & Geiger, R., *Chem. Ber.*, **103** (1970) 2041.
79. Weygand, F., Steglich, W., Bjarnason, J., Akhtar, R. & Chytil, N., *Chem. Ber.*, **101** (1968) 3623.
80. Sieber, P. & Riniker, B., in Epton, R. (Ed.) *Solid Phase Synthesis*, (1990) 577.
81. Sieber, P. & Riniker, B., *Tetrahedron Lett.*, **32** (1991) 739.
82. Gutte, B. & Merrifield, R.B., *J. Biol. Chem.*, **246** (1971) 1922.
83. Chang, D.C., Waki, M., Ahmad, M., Meienhofer, J., Lundell, E.O. & Hauy, J.D., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **15** (1980) 59.
84. Tam, J.P., Wong, T.-W., Riemen, M.W., Tjoeng, F.-S. & Merrifield, R.B., *Tetrahedron Lett.*, **42** (1979) 4033.
85. Jones, J.H. & Ramage, W.I., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, (1978) 472.
86. Jones, J.H. & Stachulski, A.V., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1** (1979) 2261.

87. Kusunoki, M., Nakagawa, S., Seo, K., Hamana, T. & Fukuda, T., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **36** (1990) 381.
88. Losse, G. & Krychowski, U., *Tetrahedron Lett.*, (1971) 4121.
89. Brown, T. & Jones, J.H., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, (1981) 648.
90. Brown, T., Jones, J.H. & Richards, J.D., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, (1982) 1553.
91. Pipkorn, R. & Ekberg, B., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **27** (1986) 583.
92. Sieber, R. & Riniker, B., *Tetrahedron Lett.*, **28** (1987) 6031.
93. Barlos, K., Chatzi, O., Gatos, D., Stavropoulos, G. & Tsegenidis, T., *Tetrahedron Lett.*, **32** (1991) 475.
94. du Vigneaud, V., Audrieth, L.F. & Loring, H.S., *J. Am. Chem. Soc.*, **52** (1930) 4500.
95. Wood, J.L. & Du Vigneaud, V., *J. Biol. Chem.*, **130** (1939) 109.
96. Erickson, B.W. & Merrifield, R.B., *J. Am. Chem. Soc.*, **95** (1973) 3750.
97. Yamashiro, D., Noble, R.L. & Li, C.H., *J. Org. Chem.*, **38** (1973) 3561.
98. Brtnik, F., Krojildo, M., Barth, T. & Jost, K., *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **46** (1981) 286.
99. Nishimura, D., Kitada, C. & Fujino, M., *Chem. Pharm., Bull.*, **26** (1978) 1576.
100. Munson, M.C., Garcia-Echeverria, C., Albericio, F. & Barany, G., *J. Org. Chem.*, **57** (1992) 3013.
101. Barlos, K. Gatos, D., Hatzi, O., Koch, N. & Koutsogianni, S., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **47** (1996) 148.
102. Han, Y. & Barany, G., *J. Org. Chem.*, **62** (1997) 3841.
103. Erickson, B.W. & Merrifield, R.B., *J. Am. Chem. Soc.*, **95** (1973) 3757.
104. Kisfaludi, L. & Schon, I., *Synthesis*, (1983) 325.
105. Weygand, F. & Frauendorfer, E., *Chem. Ber.*, **103** (1970) 247.
106. Bycroft, B.W., Chan, W.C., Chhabra, S.R. & Hone, N.D., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, (1993) 778.
107. Aletras, A., Barlos, K., Gatos, D., Koutsogianni, S. & Mamos, P., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **45** (1995) 488.
108. Chaudhary, S.K. & Hernandez, O., *Tetrahedron Lett.*, (1979) 95.

109. Barlos, K., Gatos, D., Koutsogianni, S., Schäfer, W., Stavropoulos, G. & Wenqing, Y., *Tetrahedron Lett.*, **32** (1991) 471.
110. Curtius, T., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **35** (1902) 3226.
111. Smart, N.H., Young, G.T. & Williams, M.W., *J. Chem. Soc.*, (1960) 3902.
112. Katsoyannis, P.G., Zalut, C. & Tometsko, A.M., *J. Am. Chem. Soc.*, **89** (1967) 4502.
113. Schmaber, E., *Liebigs Ann. Chem.*, **695** (1962) 198.
114. Sheehan, J.C. & Hess, G.P., *J. Am. Chem. Soc.*, **77** (1955) 1067.
115. Sheehan, J.C. & Hlarka, J.J., *J. Org. Chem.*, **21** (1956) 439.
116. König, W. & Geiger, R., *Chem. Ber.*, **103** (1970) 788.
117. König, W. & Geiger, R., *Chem. Ber.*, **103** (1970) 2024.
118. König, W. & Geiger, R., *Chem. Ber.*, **103** (1970) 2034.
119. Blake, J. & Li, C.H., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **7** (1975) 495.
120. Wünsch & Dress, F., *Chem. Ber.*, **99** (1966) 110.
121. Carpino, L.A., *J. Am. Chem. Soc.*, **115** (1993) 4397.
122. Carpino, L.A., El-Faham, A., Minor, C. & Albericio, F., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, (1994) 201.
123. Sheehan, J.C., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **88** (1960) 665.
124. Sarantakis, D., Teichnan, J., Lien, E.L. & Fenichel, R.L., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **73** (1976) 336.
125. Izdebski, J., Bondaruk, J., Gumulka, S.W. & Krazascik, P., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **33** (1989) 77.
126. Schwyzer, R., *Helv. Chim. Acta*, **37** (1954) 647.
127. Benoiton, N.L. & Chen, F.M.F., *Can. J. Chem.*, **59** (1981) 384.
128. Weygand, F., Huber, P. & Weiss, K., *Z. Naturforsch.*, **B22** (1967) 1084.
129. Weygand, F. & DiBello, C., *Z. Naturforsch.*, **B24** (1969) 314.
130. Ramage, R., Hopton, D., Parrot, M.J., Richardson, R.S., Kenner, G.W. & Moore, G.A., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, (1985) 461.
131. Ramage, R., Ashton, C.P., Hopton, D. & Parrot, M.I., *Tetrahedron Lett.*, **25** (1984) 4825.

132. Poulos, C., Pasalimaniotou, P., Manolopoulou, A. & Tsegenidis, T., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **38** (1991) 308.
133. Bodanszky, M., *Nature (London)*, **175** (1955) 685.
134. Pless, J. & Boissonas, R.A., *Helv. Chim. Acta*, **46** (1963) 1609.
135. Kovacs, J. & Kappor, A., *J. Am. Chem. Soc.*, **87** (1965) 118.
136. Kisfaludy, L., Low, M., Nyeki, O., Szirtes, T. & Schon, I., *Annalen*, (1961) 1421.
137. Anderson, G. W., Zimmermann, J.E. & Gallahan, F.M., *J. Am. Chem. Soc.*, **86** (1964) 1839.
138. Breipohl, G., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **34** (1989) 262.
139. Castro, B., Dormoy, J.R., Evin, G. & Selve, C., *Tetrahedron Lett.*, **14** (1975) 1219.
140. Coste, J., Le Nguyen, D. & Castro, B., *Tetrahedron Lett.*, **31** (1990) 205.
141. Castro, B. & Coste, J., *French Patent 89-02-361*, (1989).
142. Knorr, R., Trzeciak, A., Bannwarth, W. & Gillessen, D., *Tetrahedron Lett.*, **30** (1989) 1927.
143. Hudson, D., *J. Org. Chem.*, **53** (1988) 617.
144. Merrifield, R.B., *J. Am. Chem. Soc.*, **85** (1963) 2149.
145. Merrifield, R.B., *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **21** (1962) 412.
146. Merrifield, R.B., *Biochemistry*, **3** (1964) 1385.
147. Merrifield, R.B., *J. Am. Chem. Soc.*, **86** (1964) 304.
148. Atherton, E., Fox, H., Harkiss, D. & Sheppard, R.C., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, (1978) 539.
149. Atherton, E., Clive, D.L.J. & Sheppard, R.C., *J. Am. Chem. Soc.*, **97** (1975) 6585.
150. Arshady, R., Atherton, E., Clive, D.L.J. & Sheppard, R.C., *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, (1981) 529.
151. Meyer, W.E. & Royer, G.P., *J. Am. Chem. Soc.*, **99** (1977) 6141.
152. Smith, C.W., Stahl, G.L. & Walter, R., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **13** (1979) 109.

153. Epton, R., Goodard, P., Marr, G., McLaren, J.V. & Morgan, G.J., *Polymer*, **20** (1979) 1444.
154. Rapp, W., Zhang, R., Häbich, R. & Bayer, E, in Jung, G. and Bayer, E. (Eds.) *Peptides 1988 (Proceedings of 20th European Peptide Symposium)*, Walter de Gruyter, Berlin, (1989) 199.
155. Bayer, E., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **30** (1991) 113.
156. Small, P.W. & Sherrington, D.C., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, (1989) 1589.
157. Meldal, E., Auzanneau, F.-I., Hindsgaul, O. & Palcic, M.M., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, (1994) 1849.
158. Meldal, M., *Tetrahedron Lett.*, **33** (1992) 3077.
159. Gamet, J.-P., Jacquier, R. & Verducci, J., *Tetrahedron*, **40** (1984) 1995.
160. Sieber, P., *Tetrahedron Lett.*, **28** (1987) 6147.
161. Mitchell, A.R., Erickson, B.W., Ryabtsev, M.N., Hodges, R.S. & Merrifield, R.B., *J. Am. Chem. Soc.*, **98** (1976) 7357.
162. Mitchell, A.R., Kent, S.B.H., Engelhard, M. & Merrifield, R.B., *J. Org. Chem.*, **43** (1978) 2845.
163. Wang, S.-S., *J. Am. Chem. Soc.*, **95** (1973) 1328.
164. Mergler, M., Nyfeler, R., Gosteli, J. & Grogg, P., in Marshall, G.R. (Ed.) *Peptides 1987 (Proceedings of the 10th American Peptide Symposium)*, Escom, Leiden, (1988) 259.
165. Mergler, M., Tanner, R., Gosteli, J. & Grogg, P., *Tetrahedron Lett.*, **29** (1988) 4005; 4009.
166. Rink, H., *Tetrahedron Lett.*, **28** (1987) 3787.
167. Barlos, K., Gatos, D., Kallitsis, J., Papaphotiou, G., Sotiriou, P., Wenqing, Y. & Schäfer, W., *Tetrahedron Lett.*, **30** (1989) 3943.
168. Barlos, K., Gatos, D., Kaposos, S., Papaphotiou, G., Schäfer, W. & Wenging, Y., *Tetrahedron Lett.*, **30** (1989) 3947.
169. Barlos, K., Chatzi, O., Gatos, D. & Stavropoulos, G., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **37** (1991) 513.

170. Steinauer, R., White, P., in Epton, R. (Ed.) *Innovations and Respectives in Solid Phase Synthesis, 3rd International Symposium*, Mayflower Worldwide Ltd., Bermingham, (1994) 689.
171. Barlos, K., Gatos, D. & Schäfer, W., *Angew Chem. Int. Ed. Eng.*, **30** (1991) 590.
172. Kunz, H., Dombo, B. & Kosch, W., in Jung, G. and Bayer, E. (Eds.) *Peptides 1982*, Walter and Co., Berlin, (1989) 154.
173. Kunz, H. & Dombo, B., *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, **27** (1988) 711.
174. Abraham, N.A., Fazal, G., Ferland, J.M., Rakhit, S. & Gauthier, J., *Tetrahedron Lett.*, **32** (1991) 577.
175. de Grado, W.F. & Kaiser, E.T., *J. Org. Chem.*, **45** (1980) 1295.
176. de Grado, W.F. & Kaiser, E.T., *J. Org. Chem.*, **47** (1982) 3258.
177. Pietta, P.G. & Marshall, P.R., *J. Chem. Soc. (C)*, (1970) 650.
178. Matsueda, G.R. & Stewart, J.M., *Peptides*, **2** (1981) 45.
179. Flörsheimer, A. & Riniker, B., in Giraldo, E. and Andreu, D., (Eds), *Peptides 1990 (Proceedings of the 21th European Peptide Symposium)*, (1991) 131.
180. Ben-Ishai, D. & Berger, A., *J. Org. Chem.*, **17** (1952) 1564.
181. Weygand, F. & Steglich, W., *Z. Naturforsch.*, **B14** (1959) 472.
182. Ondetti, M.A., Deer, A., Sheehan, J.T., Plušćec, J. & Kocy, O., *Biochemistry*, **7** (1968) 4069.
183. Sakakibara, S., Shimonishi, Y., Kiskida, Y., Okada, M. & Sugihara, H., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **40** (1967) 2164.
184. Yazima, H., Fujii, N., Ogawa, H. & Kawatani, H., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, (1974) 107.
185. Fujii, N., Otaka, A., Ikemura, O., Akaji, K., Funakoshi, S., Hayashi, Y., Kuroda, Y. & Yazima, H., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, (1987) 274.
186. Lundt, B.F., Johansen, N.L., Volund, A. & Markussen, J., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **12** (1978) 258.
187. Blake, J. & Li, C.H., *J. Am. Chem. Soc.*, **90** (1968) 5882.
188. Sharp, K.K., Robinson, A.B. & Kamen, M.D., *J. Am. Chem. Soc.*, **95** (1973) 6097.

189. Yamashiro, D., *Int. J. Peptide Protein Res.*, **20** (1982) 63.
190. Fields, C.G. & Fields, C.B., *Tetrahedron Lett.*, **34** (1993) 6661.
191. Pearson, D.A., Blanchette, M., Baker, M.L. & Guindon, C.A., *Tetrahedron Lett.*, **30** (1989) 2739.
192. Albericio, F., Kneib-Cordonier, N., Biancalana, S., Gera, L., Masada, R.I., Hudson, D. & Barany G., *J. Org. Chem.*, **55** (1990) 3730.
193. King, D.S., Fields, C.G. & Fields, G.B., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **36** (1990) 255.
194. Pereira, W., Close, V., Patton, W. & Halearn, B., *J. Org. Chem.*, **34** (1969) 2032.
195. Manning, M., *J. Am. Chem. Soc.*, **90** (1968) 1348.
196. Wang, S.-S., *J. Org. Chem.*, **41** (1976) 3258.
197. Kaiser, E., Colescott, R.L., Bossinger, C.D. & Cook, P.I., *Anal. Biochem.*, **34** (1970) 595.
198. Lukas, T.J., Prystowsky, M.B. & Erickson, B.W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78** (1981) 2791.
199. Rovero, P., Quartara, L. & Fabbri, G., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **37** (1991) 140.
200. Smith, A.J. et al., Poster 415 at 12th American Peptide Symposium, Cambridge, MA, (1991).
201. Atherton, E. & Sheppard, R.C., in "*Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*", IRL Press, Oxford, England, 1989.
202. Weygand, F., Prox, A. & König, W., *Chem. Ber.*, **99** (1966) 1451.
203. Jarrett, J.T. & Lansbury, P.T., *Tetrahedron Lett.*, **31** (1990) 4561.
204. Kemp, D.S. & Chien, S.W., *J. Am. Chem. Soc.*, **89** (1967) 2745.
205. Goodman, M. & Glaser, C., in Weinstein, B. and Lande, S. (Eds) *Peptides 1970*, Dekker, New York, (1971) 267.
206. Takashima, H., du Vigneaud, V. & Merrifield, R., *J. Am. Chem. Soc.*, **90** (1968) 1323.
207. Chan, W.Y., Berezin, I., Daniel E.E., Russell K.C. and Hruby, V.J., *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, **69** (1991) 1262.
208. Holton, D., *Br. J. Pharmacol.*, **5** (1948) 328.

209. Munsik, R.A., *Endocrinology*, **66** (1960) 451.
210. Kaiser, E., Colescott, R.L., Bossinger, C.D. & Cook, P.I., *Anal. Biochem.*, **34** (1970) 595.
211. Mager, D., Slaninova, J. and Lebl, M., *Int. J. Peptide Protein Res.*, **43** (1994) 62.
212. Lebl, M., Toth, G., Slaninova, J. and Hruby, J.V., *Ibid.*, **40** (1992) 48.
213. Grzonka, Z., Lammek, B., Kasprzykowski, F., Gazis, D. and Swartz, I.L., *J. Med. Chem.*, **26** (1983) 555.
214. Macura, S., Wüthrich, K. and Ernst, R.R., *J. Magn. Reson.*, **47** (1982) 315.
215. A) Aue, W.P., Bartholdi E. and Ernst R.R., *J. Chem. Phys.* **64** (1980) 2229
 B) Nagayamak. Et. Al. *J. Magn. Reson.* **40** (1980) 321
216. Bax, A. and Davis, D.G., *J. Magn. Reson.*, **65** (1985) 355.
217. Marion, D. and Wüthrich, K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **113** (1983) 967.
218. Eccles, C., Güntert, P., Billeter, M. and Wüthrich, K., *J. Biomol. NMR* **1** (1991) 111.
219. Tam, J.P., Heath, W.F & Merrifield, R.B., *J. Am. Chem. Soc.*, **105** (1983) 6442.
220. Nishiuchi, Y., Nishio, H., Inui, T., Kimura, T. & Sakakibara, S., *Tetrahedron Lett.*, **37** (1996) 7529
221. a) Hawkins, C.J. and Martin, J. ,*Inorg. Chem.* ,**22** (1983) 3879,
 b) Arena, G. , Bonomo, R.P. , Impellizzeri, G., Izatt, R.M. , Lamb, J.D and Rizzarelli, E. ,*Inorg. Chem.* ,**26** (1987) 795.
222. Kiso, Y., Yoshida, M., Kimura, T., Fugiwara, Y. and Simokura, M., *Tetrahedron Lett.*, **30** (1989) 1979.
223. Assimomytis, N., Manessi-Zoupa, E., Cordopatis, P., and Theodoropoulos, D., *Collection Czechoslovak Chem. Commun.*, **59** (1994) 718.

