

**ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ, ΣΥΝΘΕΣΗ, ΔΙΑΜΟΡΦΩΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ
ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΕΛΙΚΟΕΙΔΟΥΣ ΤΥΠΟΥ RGD
ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ**

**ΚΩΣΤΙΔΗΣ ΣΑΡΑΝΤΟΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΚΩΝ/ΝΟΣ ΣΑΚΑΡΕΛΛΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

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

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

2000/2002

*Στους γονείς μου, Αντώνιο και Μαργαρίτα
στο Γιώργο, στη Χρύσα
και στη Μαλού.*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Χημείας Πεπτιδίων του Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στα πλαίσια του προγράμματος Ε.Π.Ε.Α.Ε.Κ., κατά το χρονικό διάστημα Σεπτέμβριος 2000 – Μάρτιος 2002 υπό την επίβλεψη της τριμελούς επιτροπής αποτελούμενης από τον Καθηγητή κ. Κων/νο Σακαρέλλο ως επιβλέποντα, την κ. Ευγενία Πάνου-Πομόνη, Επίκουρη Καθηγήτρια και τον κ. Βασίλειο Τσίκαρη, Αναπληρωτή Καθηγητή, ως μέλη.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Σακαρέλλο, την Καθηγήτρια κ. Μαρία Σακαρέλλου-Δαίτσιώτου και την Επίκουρο Καθηγήτρια του τμήματος Χημείας κ. Ευγενία Πάνου-Πομόνη, για το ενδιαφέρον τους και τις πολύτιμες συμβουλές τους κατά την εκπόνηση της εργασίας.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Βασίλειο Τσίκαρη, για την άμεση επίβλεψη, καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές του.

Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δημόκριτο Τσουκάτο για την καθοδήγηση και τις συμβουλές του κατά την εκτέλεση των βιολογικών πειραμάτων, τα οποία έγιναν στο Ερευνητικό του Εργαστήριο.

Επίσης ευχαριστώ την Επίκουρο Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας κ. Βασιλική Θεοδώρου-Κασιούμη, για το ενδιαφέρον της κατά την εκπόνηση της εργασίας μου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες εκφράζονται στους συναδέλφους Αγγελική Κούκη, Νεκτάριο-Ιωάννη Χονδρογιάννη, και Νικόλαο Μπίρη, για την ουσιαστική συμβολή τους στα βιολογικά πειράματα, στην πεπτιδική σύνθεση και την λήψη φασμάτων NMR αντίστοιχα, ενώ επίσης ευχαριστώ θερμά για την ευχάριστη συνεργασία τους συναδέλφους μου Δημήτριο Κρικοριάν, Μόρφη Αμπατζή, Μακροπούλου Σεβαστή, Κεραμισάνου Δήμητρα, Κωνσταντίνο Στρογγύλη, Παρασκευή Παππά, Παναγιώτα Σοφού, Ruxandra-Maria Stanica, Παναγιώτη Σταθόπουλο, Δημήτριο Ροκκά, Χριστίνα

Μπαλαμάτσια, Αγγελική Κοσμοπούλου, Σπυρίδωνα Μαμμωνά, Κατερίνα Ρίζου και Γεώργιο Στάμο.

Ευχαριστίες εκφράζονται επίσης στην κ. Ελένη Ντάφλου, γραμματέα του Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιτροπή του προγράμματος Ε.Π.Ε.Α.Ε.Κ.

Σαράντος Κωστίδης
Ιωάννινα 2002

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	1
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	3
<hr/>	
2. Το μοτίβο RGD, Σχέση Διαμόρφωσης – Βιολογικής Δράσης. Ο φορέας Soc_n.	4
2.1. Εισαγωγή	5
2.2. Βιολογικός ρόλος της αλληλουχίας RGD	10
2.3. RGD ανάλογα, σχέση διαμόρφωσης – βιολογικής δράσης	14
2.4. Επαναλαμβανόμενοι ολιγοπεπτιδικοί φορείς SOC _n	21
3. Πεπτιδική Σύνθεση	24
3.1 Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού	25
3.2 Σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση	26
3.2.1 Το στερεό πολυμερές υποστήριγμα	27
3.2.2 Παροδική και ημιμόνιμη προστασία	29
3.2.3 Αντιδραστήρια σύζευξης	35
3.2.4 Απόσπαση πεπτιδίου από τη ρητίνη	40
4. Φασματοσκοπία NMR Πεπτιδίων	42
4.1 Το Παλμικό πείραμα μίας διάστασης του πρωτονιακού NMR	43
4.2 Φασματοσκοπία NMR δύο διαστάσεων (2D NMR)	46
4.2.1 Ομοπυρηνική Φασματοσκοπία Συσχέτισης (COSY)	48
4.2.2 Ομοπυρηνική Φασματοσκοπία Ολικής Συσχέτισης (TOCSY)	49
4.2.3 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Φαινομένου OVERHAUSER (NOESY)	49
4.3 Διαμορφωτική ανάλυση πεπτιδίων με φασματοσκοπία NMR	50

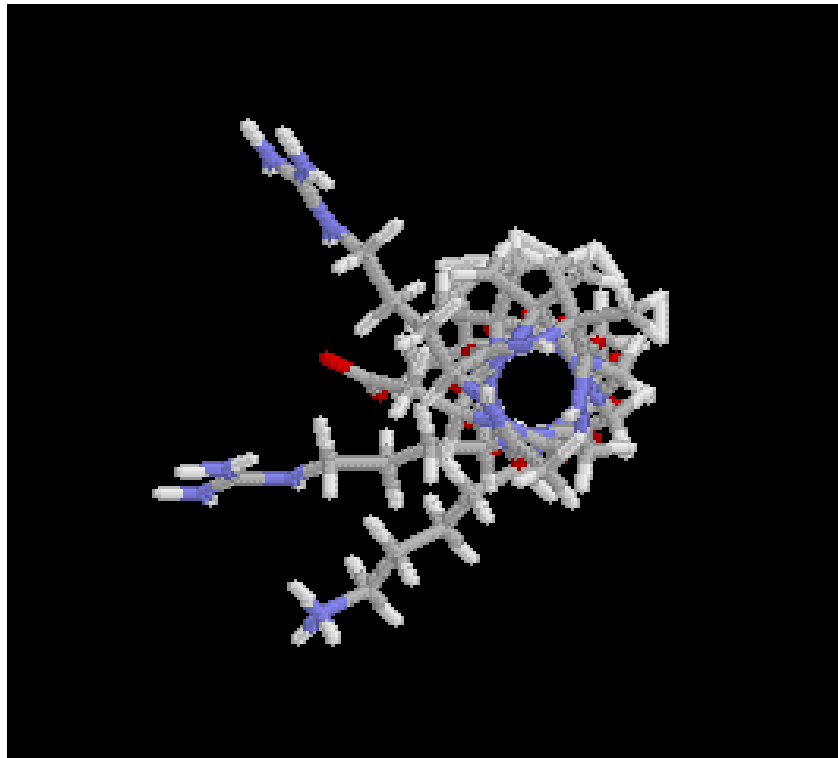
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 53

5. Σύνθεση, Καθαρισμός και Ταυτοποίηση των Πεπτιδίων	54
5.1 Αντιδραστήρια	55
5.2 Μεθοδολογία σύνθεσης	55
5.3 Καθαρισμός και ταυτοποίηση των πεπτιδίων	58
5.4.1 Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του πεπτιδίου 1	59
5.4.2 Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του πεπτιδίου 2	61
6. Ταυτοποίηση και Διαμορφωτική Ανάλυση με Φασματοσκοπία ¹H-NMR	63
6.1 Ανάλυση των ¹ H-NMR φασμάτων του πεπτιδίου 1	64
6.1.1 Χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του πεπτιδίου 1	73
6.1.2 Διαμορφωτική ανάλυση του πεπτιδίου 1	75
6.2 Ανάλυση των ¹ H-NMR φασμάτων του πεπτιδίου 2	85
6.2.1 Χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του πεπτιδίου 2	94
6.2.2 Διαμορφωτική ανάλυση του πεπτιδίου 2	96
7. Βιολογικά πειράματα – Αποτελέσματα	104
7.1 Επεξεργασία αίματος	105
7.2 Μέτρηση της αναστολής και προσδιορισμός της τιμής IC ₅₀	106
8. Συμπεράσματα	108
9. Βιβλιογραφία	111
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	125

I. Σύντομογραφίες	126
--------------------------	------------

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

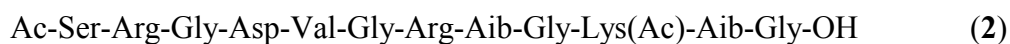
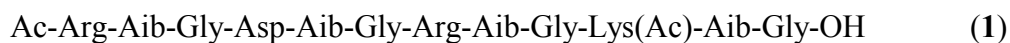
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ



1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της ερευνητικής αυτής προσπάθειας είναι η διερεύνηση της επίδρασης στην τοπική διαμόρφωση της RGD αλληλουχίας, γειτονικών αλληλουχιών οι οποίες μπορούν να προσλάβουν κανονικού τύπου δευτεροταγείς δομές. Η συσχέτιση των διαμορφώσεων αυτών με την ικανότητα αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, μπορεί να συμβάλλει στην κατανόηση των παραμέτρων εκείνων που είναι υπεύθυνες για την εξειδικευμένη αναγνώριση, από τους υποδοχείς της οικογένειας των ιντεγκρινών, της RGD αλληλουχίας ενός συγκεκριμένου προσδέτη, ανάμεσα από την πληθώρα των προσδετών που διαθέτουν την αλληλουχία αυτή.

Για την προσέγγιση του παραπάνω στόχου σχεδιάστηκαν τα ανάλογα:



των οποίων το C-τελικό τμήμα μπορεί να λειτουργήσει ως εκμαγείο επαγωγής 3_{10} έλικας. Η ενσωμάτωση των αμινοξέων Arg, Gly και Asp στον πεπτιδικό σκελετό έγινε κατά τέτοιο τρόπο ώστε, ο προσανατολισμός των παράπλευρων αλυσίδων της Arg και του Asp να διαφέρει στα δύο ανάλογα, στην περίπτωση σταθεροποίησης κανονικής 3_{10} έλικας.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

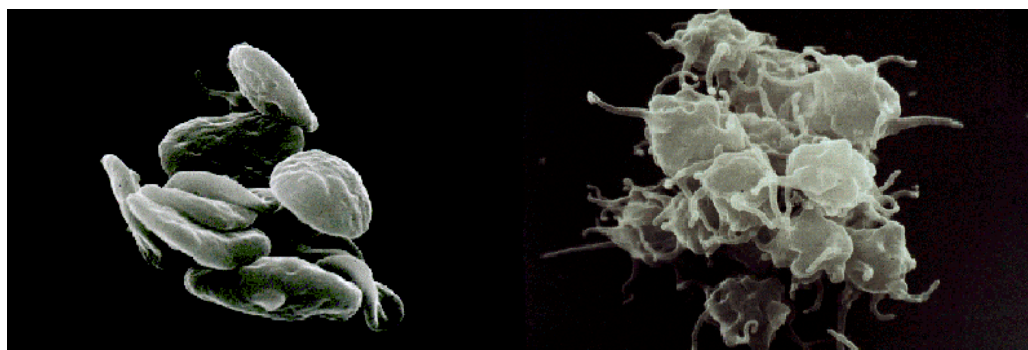
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

***ΤΟ ΜΟΤΙΒΟ RGD, ΣΧΕΣΗ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ –
ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ.
Ο ΦΟΡΕΑΣ SOC_n.***

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το αίμα επιτελεί την σημαντική λειτουργία μεταφοράς οξυγόνου και διαφόρων συστατικών σε κάθε κύτταρο του οργανισμού, μέσω αρτηριών και αγγείων. Το 60 % περίπου του συνολικού όγκου του αίματος αποτελεί το πλάσμα, ένα διαυγές υποκίτρινο υδατικό διάλυμα (~ 90 % περιεκτικότητα σε νερό), στο οποίο περιέχονται πρωτεΐνες, ανόργανα συστατικά κ.α. Το υπόλοιπο του όγκου του αίματος αποτελούν τα κυτταρικά συστατικά του, τα οποία χωρίζονται σε τρεις κύριες κατηγορίες, τα ερυθρά κύτταρα, τα λευκά κύτταρα και τα αιμοπετάλια. Μέσω αυτών των συστατικών λαμβάνουν χώρα ζωτικές βιοχημικές διεργασίες όπως, η μεταφορά οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα, η λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και ο σχηματισμός θρόμβων με σκοπό τον έλεγχο της αιματικής ροής.

Τα αιμοπετάλια αποτελούν τα μικρότερα κυτταρικά συστατικά του αίματος με διάμετρο 2-4μm και προέρχονται από τα μεγακαρυοκύτταρα του μυελού των οστών. Σε αντίθεση με τα ερυθρά και λευκά κύτταρα, δεν διαθέτουν πυρήνα και το σχήμα τους μεταβάλλεται από δισκοειδές σε σφαιρικό, ανάλογα με το αν είναι ενεργοποιημένα ή όχι, αντίστοιχα (σχήμα 2.1). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, υπάρχουν 150.000-400.000 αιμοπετάλια ανά μικρόλιτρο αίματος με μέσο χρόνο ζωής τις δέκα ημέρες. Χαρακτηριστικό της κυτταρικής τους μεμβράνης, είναι η ύπαρξη ενός μεγάλου αριθμού γλυκοπρωτεϊνών (GP), οι οποίες δρουν ως υποδοχείς κατά τις διάφορες λειτουργίες των αιμοπεταλίων. Στην πλειοψηφία τους οι υποδοχείς αυτοί ανήκουν στην οικογένεια των ιντεγκρινών¹⁻⁴ και τα υποστρώματά τους είναι κυρίως μόρια υπεύθυνα για τις διαδικασίες συγκόλλησης των κυττάρων.

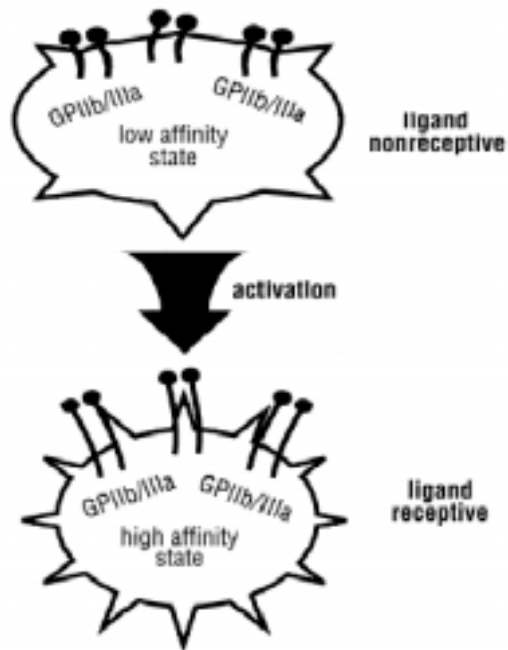


Σχήμα 2.1 Εικόνα αιμοπεταλίου από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, σε μη ενεργή και ενεργή μορφή.

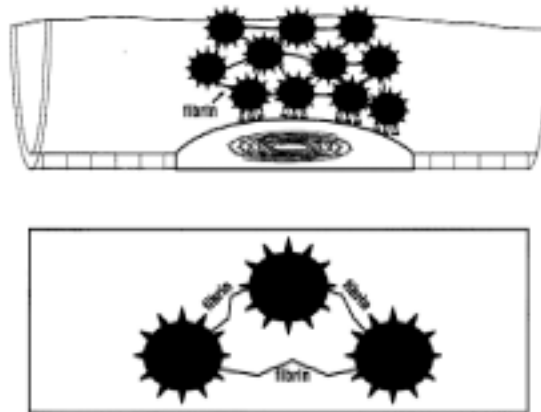
Ο φυσιολογικός ρόλος των αιμοπεταλίων είναι κυρίως η επισκευή του αρτηριακού τοιχώματος, όταν αυτό υποστεί βλάβη, όπως συμβαίνει στις περιπτώσεις τραύματος. Αυτό επιτυγχάνεται αρχικά, με την συσσώρευσή τους στο σημείο της βλάβης και την ενεργοποίησή τους. Στη συνέχεια, μια σειρά από αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες του πλάσματος, έχουν ως τελικό αποτέλεσμα το σχηματισμό ινώδους γύρω από την τραυματισμένη περιοχή και τον τερματισμό της απώλειας αίματος.

Κατά τη μη ενεργοποιημένη τους μορφή, τα αιμοπετάλια ρέουν στο πλάσμα χωρίς να προσκολλώνται στο αρτηριακό τοίχωμα. Ωστόσο σε περίπτωση τραυματισμού του αγγείου, στοιχεία που βρίσκονται στον υπενδοθηλιακό χώρο, εκτίθενται στο εσωτερικό του αγγείου, άρα και στα αιμοπετάλια. Τα στοιχεία αυτά είναι γλυκοπρωτεΐνες, όπως το κολλαγόνο, ο παράγοντας von Willebrand (vWF), η βιτρονεκτίνη και η ινοδεσίνη, οι οποίες αποτελούν υποστρώματα για τους υποδοχείς της οικογένειας των ιντεγκρινών που βρίσκονται στην μεμβράνη των αιμοπεταλίων. Ιδιαίτερα σημαντική θεωρείται η πρόσδεση του κολλαγόνου στον υποδοχέα GPIa/IIa^{5,6}, όπως και του vWF στον GPIb/IX^{7,8}, ωστόσο και η δέσμευση της ινοδεσίνης, της βιτρονεκτίνης και άλλων γλυκοπρωτεϊνών από τους υποδοχείς GPIc/IIa, $\alpha_v\beta_3$ κλπ., έχει κάποιο ρόλο⁵.

Τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων μέσω της προσδεσής τους σε διάφορους προσδέτες, ακολουθεί η ενεργοποίησή τους. Η δέσμευση τους στο κολλαγόνο θεωρείται ο κύριος παράγοντας για την έναρξη της διαδικασίας αυτής^{9,10}, η οποία ωστόσο επάγεται από την δράση και άλλων ειδικών αγωνιστών των γλυκοπρωτεϊνικών υποδοχέων της μεμβράνης των αιμοπεταλίων¹¹. Ενίσχυση της ενεργοποίησης προκαλείται από τα ίδια τα αιμοπετάλια, με την έκκριση αγωνιστών, όπως η θρομβίνη, η θρομβοξάνη A₂, το ADP, η επινεφρίνη και η σεροτονίνη, οι οποίοι βρίσκονται στα κοκκία του κυτταροπλάσματος τους. Παράλληλα, υφίσταται μεταβολή της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου Ca²⁺, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μιας σειράς πρωτεϊνών και κινασών, που προκαλούν την αλλαγή διαμόρφωσης του υποδοχέα GPIIb/IIIa^{4,12-14} (Σχήμα 2.2), επιτρέποντας του να αναγνωρίζει το ινωδογόνο και τον vWF του πλάσματος. Το ινωδογόνο είναι το κύριο μόριο συσσώρευσης των αιμοπεταλίων¹⁵⁻¹⁷, δρώντας σαν γέφυρα που μπορεί να συνδέει δύο αιμοπετάλια με τελικό αποτέλεσμα τη συσσωμάτωσή τους και το σχηματισμό θρόμβου (ινώδες) (Σχήμα 2.3).

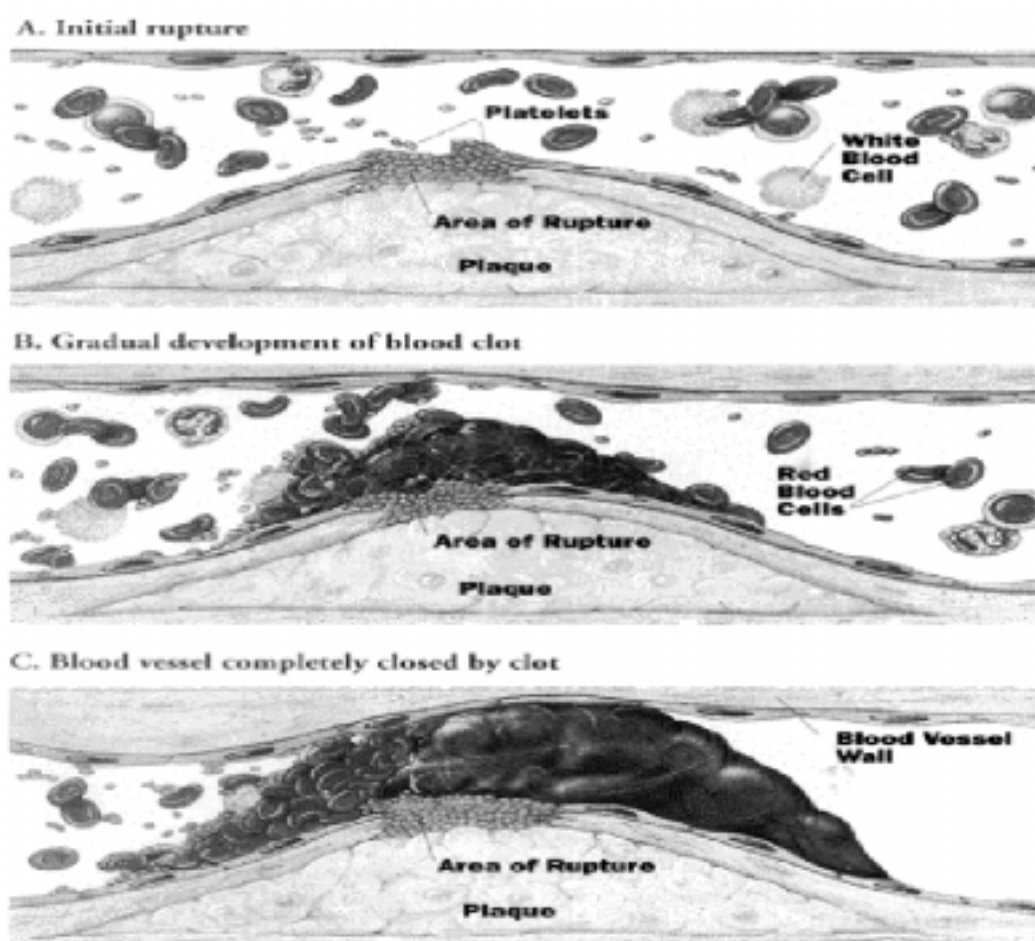


Σχήμα 2.2 Σχηματική αναπαράσταση του υποδοχέα GPIIb/IIIa της μεμβράνης των αιμοπεταλίων. Στο ενεργοποιημένο κύτταρο υφίσταται αλλαγή διαμόρφωσης αυξάνοντας τη συγγένεια του για το ινωδογόνο.



Σχήμα 2.3 Τα αιμοπετάλια συνδέονται μεταξύ τους με γέφυρες ινωδογόνου σχηματίζοντας το ινώδες στην περιοχή του τραυματισμένου ή ερεθισμένου αγγείου.

Η δημιουργία του αιμοπεταλιακού θρόμβου είναι το πρώτο στάδιο στον πολύπλοκο μηχανισμό πήξης του αίματος. Σε αυτόν συμμετέχουν μια σειρά από πρωτεΐνες (παράγοντες πήξης) οι οποίες είναι κυρίως σερινοπρωτεάσες. Σημαντικό ρόλο στη διαδικασία έχει η θρομβίνη¹⁸, η οποία αποτελεί ένα δυναμικό αγωνιστή των αιμοπεταλίων. Συντελεί στην αύξηση του αριθμού τους στο σημείο της θρόμβωσης, προάγοντας έτσι νέες φωσφολιπιδικές μεμβράνες για την δράση των αγωνιστών, ενώ επάγει παράλληλα τον σχηματισμό ινώδους¹⁸. Το ινώδες λόγω της δικτυακής του δομής, εγκλωβίζει τα κύτταρα του αίματος και συντελεί στην δημιουργία ενός μεγαλύτερου θρόμβου.



Σχήμα 2.4 Α. Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε περιοχή ερεθισμένης αθηροματικής πλάκας. Β. Σχηματισμός αιμοπεταλιακού θρόμβου. C. Αύξηση του μεγέθους του θρόμβου με τον εγκλωβισμό περισσότερων κυττάρων του αίματος με αποτέλεσμα το φράξιμο του αγγείου.

Σε φυσιολογικές συνθήκες ο μηχανισμός πήξης είναι ελεγχόμενος και βρίσκεται σε ισορροπία με το μηχανισμό θρομβόλυσης. Η διατάραξη αυτής της ισορροπίας σε παθολογικές καταστάσεις ωστόσο, μπορεί να προκαλέσει είτε τον ανεξέλεγκτο σχηματισμό θρόμβων, είτε την μη ελεγχόμενη αιμοραγία. Η αδυναμία των αιμοπεταλίων να διακρίνουν μεταξύ ενός τραυματισμένου αιμοφόρου αγγείου και μιας θρομβωγούς επιφάνειας, όπως μία ερεθισμένη αθηροματική πλάκα, μπορεί να προκαλέσει διάφορες καρδιαγγειακές παθήσεις. Ο σχηματισμός θρόμβου πλούσιου σε αιμοπετάλια σε περιοχές ερεθισμένων αθηρωματικών πλακών θεωρείται ως η κύρια αιτία της ασταθούς στηθάγχης και του εμφράγματος του μυοκαρδίου⁴ (Σχήμα 2.4). Στην περίπτωση της στεφανιαίας αθηροσκλήρωσης, έχουν προσδιοριστεί περισσότεροι από 100 βιοχημικοί αγωνιστές της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων¹⁹.

Ο σημαντικός ρόλος της συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων σε διάφορες ασθένειες, έχει οδηγήσει την έρευνα προς την κατεύθυνση της αποκρυπτογράφησης των μηχανισμών δράσης τους. Ο σχηματισμός του ινώδους και επιπλέον, η αλληλεπίδραση του ινωδογόνου με τον υποδοχέα GPIIb/IIIa, θεωρείται μείζονος σημασίας ερευνητικός στόχος στην προσπάθεια ανάπτυξης κλινικών μεθόδων για τον έλεγχο της θρόμβωσης.

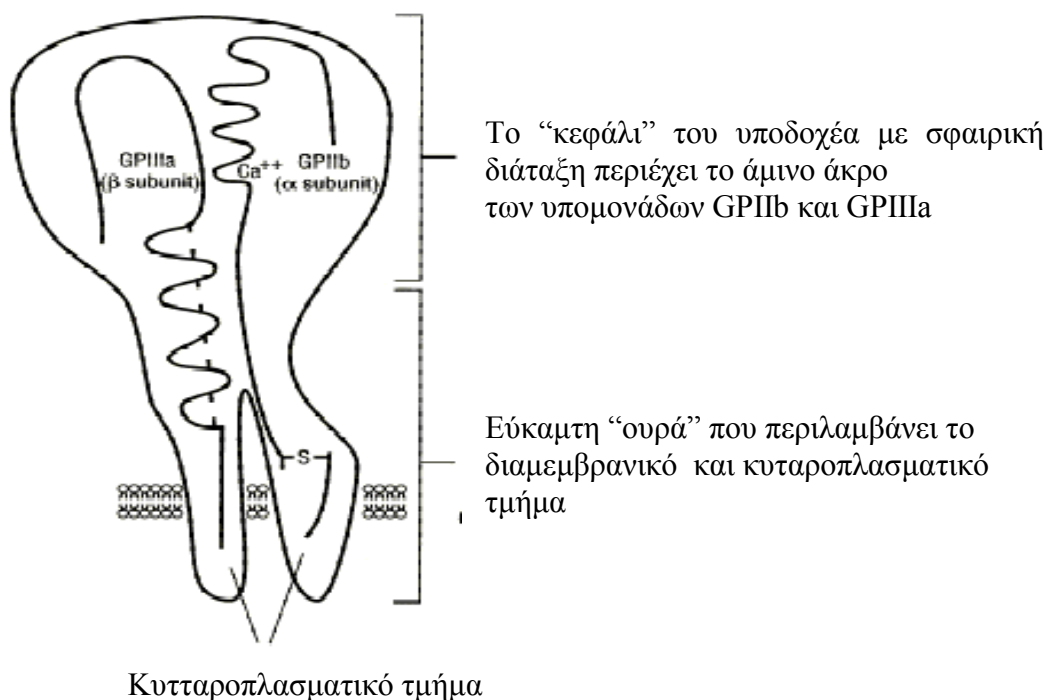
2.2 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ RGD

Η ενεργοποίηση και η συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων είναι υπεύθυνες για το σχηματισμό θρόμβων στα αιμοφόρα αγγεία. Η επέκταση του φαινομένου σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις⁴ οδηγεί σε μια σειρά από ασθένειες, όπως η ασταθής στηθάγχη, το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, η αθηροσκλήρωση κ.λ.π. Η αποσαφήνιση των μηχανισμών που προκαλούν την ενεργοποίηση^{5-11,19}, καθώς και αυτών που παρεμβάλλονται της συσσωμάτωσης¹²⁻¹⁸, αποτέλεσε ένα μεγάλο βήμα προς την αντιμετώπιση της θρόμβωσης. Επιπλέον, ο ορατός κίνδυνος ανεξέλεγκτης αιμοραγίας με τη χρήση θρομβωλυτικών μέσων²⁰, έστρεψε το ενδιαφέρον των ερευνητών προς την κατεύθυνση της αναστολής της συσσώρευσης και συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων^{21,22}.

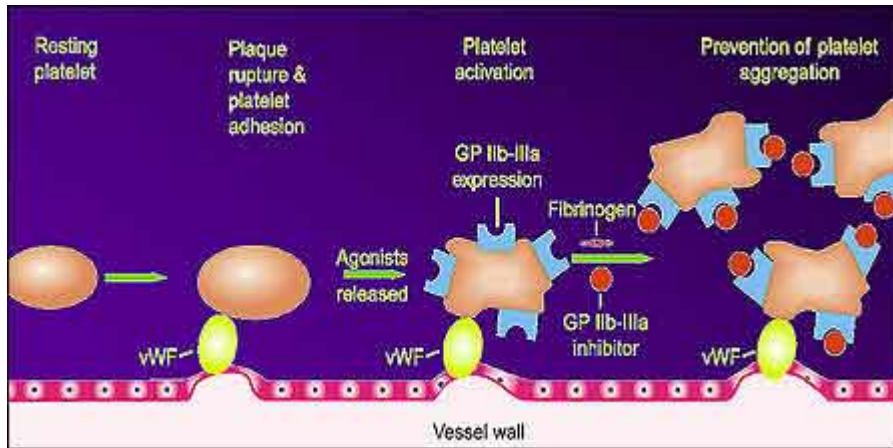
Μία πρώτη προσέγγιση στην αντιθρομβωτική θεραπεία είναι η αναστολή της πρωτογενούς ενεργοποίησης, που προκαλείται από διάφορους αγωνιστές, όπως η θρομβίνη, η επινεφρίνη, το ADP, το κολλαγόνο κ.α. Η ιρουδίνη, φυσικό συστατικό στην βδέλλα *Hirudo Medicinalis*, αποτελεί ισχυρό αναστολέα της θρομβίνης^{23,24}, ωστόσο η χρήση της θα πρέπει να συνοδεύεται από κάποιο αντίδοτο καθώς προκαλεί ισχυρό αντιθρομβωτικό αποτέλεσμα. Η τικλοπιδίνη²⁵ αναστέλλει την ενεργοποίηση μέσω του ADP, πιθανόν ως ανταγωνιστής για τον υποδοχέα του. Σε επίπεδο δευτερογενούς ενεργοποίησης, δηλαδή από αγωνιστές που εκκρίνονται από τα ίδια τα αιμοπετάλια, πολύ καλά μελετημένη είναι η οδός του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος προς θρομβοξάνη A₂ (TxA₂)²⁰. Η TxA₂ προκαλεί την έκκριση αγωνιστών που βρίσκονται στα πυκνά και α-κοκκία των αιμοπεταλίων. Έχει βρεθεί ότι η ασπιρίνη αναστέλλει το πρώτο στάδιο της βιοσύνθεσης της TxA₂ με ακετυλίωση της κυκλοξυγονάσης²⁶. Ωστόσο με την αναστολή του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος, αφενός αφήνονται ανοικτά τα υπόλοιπα μονοπάτια ενεργοποίησης και αφετέρου, αυτή η βιοσύνθεση είναι ζωτικής σημασίας και για άλλες βιοχημικές πορείες του οργανισμού.

Τα παραπάνω αποτελέσματα ερευνών οριοθετούν τις βάσεις, πάνω στις οποίες θα πρέπει να σχεδιαστεί ένα αντιθρομβωτικό μέσο. Προκύπτει ότι η αναστολή της συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων θα πρέπει να είναι αντιστρεπτή και εξειδικευμένη, ανεξάρτητα από την φύση του αγωνιστή, ενώ παράλληλα να μην επηρεάζει άλλες φυσιολογικές διεργασίες του οργανισμού.

Από τους υποδοχείς της μεμβράνης των αιμοπεταλίων, ο GPIIb/IIIa (Σχήμα 2.5) θεωρείται ως ο πλέον καθοριστικός στην πορεία της θρόμβωσης^{4,27}. Είναι ο υποδοχέας που αναγνωρίζει το ινωδογόνο και επιτρέπει την συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων²⁸⁻³¹, ενώ βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία από οποιονδήποτε άλλο στην κυτταρική τους μεμβράνη. Αποτελείται από τις υπομονάδες GPIIb και GPIIIa οι οποίες συνδέονται με δισουλφιδικές γέφυρες. Η αναστολή της πρόσδεσης του ινωδογόνου στον υποδοχέα GPIIb/IIIa, αποτελεί το σύγχρονο πεδίο έρευνας στην αντιθρομβωτική θεραπεία (Σχήμα 2.6). Ιδιαίτερα μετά τον προσδιορισμό των περιοχών της πεπτιδικής αλυσίδας του ινωδογόνου, οι οποίες αποτελούν το υπόστρωμα για τον υποδοχέα, έχει σχεδιαστεί και δοκιμαστεί, ένας μεγάλος αριθμός είτε πεπτιδικών, είτε πεπτιδομιμητικών μορίων για την επίτευξη ανασταλτικής δράσης.



Σχήμα 2.5 Σχηματική αναπαράσταση του υποδοχέα GPIIb/IIIa. Οι υπομονάδες GPIIb και GPIIIa συνδέονται με δισουλφικές γέφυρες.



Σχήμα 2.6 Σχηματική αναπαράσταση των διαδοχικών σταδίων της ενεργοποίησης και συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων. Η δημιουργία ανταγωνιστών του ινωδογόνου επεμβαίνει ανασταλτικά στην συσσωμάτωση.

Το ινωδογόνο, μία πρωτεΐνη του πλάσματος, είναι ένα διμερές από τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, την α, β και γ. Στην α-αλυσίδα βρίσκονται δύο πεπτιδικές αλληλουχίες, η RGDF στις θέσεις 95-98 και η RGDS στις θέσεις 572-575 της αμινοξικής αλληλουχίας, οι οποίες αποτελούν το υπόστρωμα^{29,30,32} για τον υποδοχέα GPIIb/IIIa. Μία ακόμα πεπτιδική αλληλουχία-υπόστρωμα εμπεριέχεται στο καρβοξυτελικό άκρο της γ-αλυσίδας, το δωδεκαπεπτίδιο HHLGGAKQAGDV^{16,17}. Οι έξι αυτές περιοχές του διμερούς ινωδογόνου, είναι υπεύθυνες για την πρόσδεσή του στα αιμοπετάλια και την συσσωμάτωση των τελευταίων. Η φύση της πρόσδεσης στον GPIIb/IIIa είναι αντικείμενο έρευνας και δεν έχει προσδιοριστεί απόλυτα μέχρι και σήμερα. Ωστόσο αποτελεί δεδομένο, ο ενεργός ρόλος της πεπτιδικής αλληλουχίας RGD, η οποία εμπεριέχεται και στις δύο περιοχές πρόσδεσης της α-αλυσίδας του ινωδογόνου, ενώ ο ρόλος του δωδεκαπεπτιδίου της γ-αλυσίδας θεωρείται καθοριστικός για την υψηλή συγγένεια της πρωτεΐνης με τον υποδοχέα³³⁻³⁵.

Η πεπτιδική αλληλουχία Arg-Gly-Asp (RGD) εμπεριέχεται σε πολλές πρωτεΐνες, που αποτελούν υποστρώματα των υποδοχέων της οικογένειας των ιντεγκρινών. Παρά το γεγονός της ύπαρξης ενός κοινού σημείου αναγνώρισης, οι ιντεγκρίνες είναι σχετικά εξειδικευμένα μόρια, στις αλληλεπιδράσεις τους με διάφορες γλυκοπρωτεΐνες. Κοινό τους δομικό γνώρισμα είναι η μη ομοιοπολική σύνδεση δύο υπομονάδων, των α και β, σχηματίζοντας ένα ετεροδιμερές.

Κατατάσσονται σε κατηγορίες με βάση τον τύπο της β υπομονάδας. Στον Πίνακα 2.1 αναφέρονται οι ιντεγκρίνες που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη των αιμοπεταλίων, καθώς και τα υποστρώματά τους⁴. Η αλληλεπίδραση της αλληλουχίας RGD με τους υποδοχείς της κατηγορίας εξυπηρετεί ένα μεγάλο αριθμό βιοχημικών πορειών, μεταξύ άλλων, τη συσσωμάτωση κυττάρων, την διαφοροποίησή τους, ενώ εμπλέκεται ακόμα και στην μετάσταση όγκου³⁶⁻³⁸.

Πίνακας 2.1 Οι υποδοχείς της οικογένειας των ιντεγκρινών που βρίσκονται στην μεμβράνη των αιμοπεταλίων και τα υποστρώματά τους⁴.

Υποδοχέας	Υπόστρωμα/τα
$\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa)	Ινωδογόνο, vWF, ινοδεσίνη, θρομβοσποντίνη, βιτρονεκτίνη
$\alpha_v\beta_3$	Βιτρονεκτίνη, vWF, ινοδεσίνη, ινωδογόνο, θρομβοσποντίνη
$\alpha_2\beta_1$ (GPIa/IIa)	Κολλαγόνο
$\alpha_5\beta_1$	Ινοδεσίνη
$\alpha_6\beta_1$	Λαμινίνη
GPIb/IX	vWF, θρομβίνη
GPV	Υπόστρωμα θρομβίνης
GPIV (GPIIb)	Θρομβοσποντίνη, κολλαγόνο

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.1, ο υποδοχέας GPIIb/IIIa δεν αναγνωρίζει εξειδικευμένα μόνο το ινωδογόνο¹⁵, αλλά και την ινοδεσίνη³⁹, τον παράγοντα von Willebrand⁴⁰ (vWF), κ.α. Ωστόσο υπό φυσιολογικές συνθήκες το ινωδογόνο έχει πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση στο πλάσμα και είναι αυτό που κυριαρχεί ως υπόστρωμα. Η αλληλουχία RGD που βρίσκεται στις δύο από τις τρεις περιοχές αναγνώρισης του ινωδογόνου, αποτελεί την στερεή βάση για την επιτυχή ανάπτυξη ανταγωνιστών, με στόχο την αντιμετώπιση της θρόμβωσης.

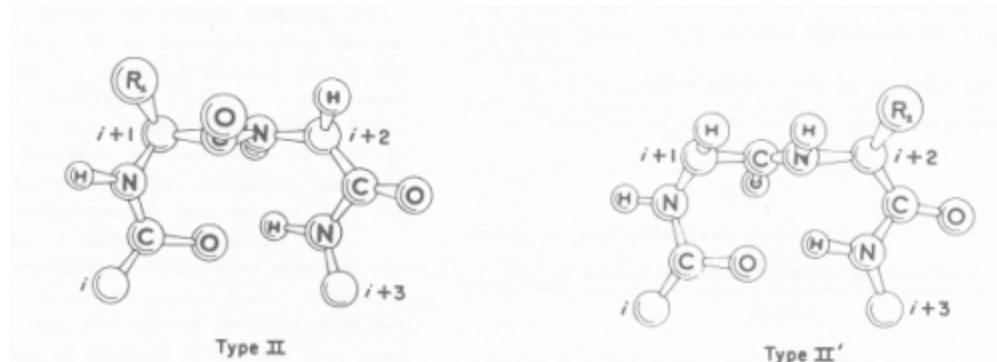
2.3 RGD ΑΝΑΛΟΓΑ, ΣΧΕΣΗ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ - ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

Οι πληροφορίες που προκύπτουν από τον σημαντικό ρόλο της πεπτιδικής αλληλουχίας RGD, στην δράση των ιντεγκρινών και η ύπαρξη της σε ένα μεγάλο αριθμό φυσικών πρωτεϊνών, αποτέλεσαν και αποτελούν τις βάσεις για την ανάπτυξη αναστολέων της πρόσδεσης του ινωδογόνου στον υποδοχέα GPIIb/IIIa.

Μία οικογένεια ομόλογων πεπτιδίων από δηλητήρια φιδιών και βδέλας, διαθέτουν την αλληλουχία RGD και αποτελούν αναστολείς της δράσης των ιντεγκρινών, εξού και η ονομασία τους ως ντισιντεγκρίνες. Η μελέτη της βιολογικής τους δράσης σε σχέση με την διαμόρφωση, έχει οδηγήσει σε σημαντικά συμπεράσματα σχετικά με τη φύση της αλληλεπίδρασης υποδοχέας-υπόστρωμα. Στην εχιστατίνη και την κιστρίνη (Σχήμα 2.7), μελέτες διαμόρφωσης σε διάλυμα, απέδειξαν, ότι η τριπλέτα RGD βρίσκεται σε υψηλά εκτεθειμένο τμήμα^{41,42}, δύο καλά καθορισμένων μοριακών δομών από δισουλφιδικούς δεσμούς και δεσμούς υδρογόνου. Η διαμόρφωση της τριπλέτας προσδιορίστηκε ότι είναι σχετικά εκτεταμένη⁴³. Περισσότερες πληροφορίες προκύπτουν από μία άλλη ντισιντεγκρίνη, την ντεκορσίνη⁴⁴ (Σχήμα 2.7). Η διαμόρφωση της αλληλουχίας RGD είναι πολύ καλά καθορισμένη, πιθανόν λόγω της παρουσίας δύο καταλοίπων προλίνης εκατέρωθεν. Οι πλευρικές αλυσίδες της Arg και του Asp κατευθύνονται προς σχεδόν αντίθετες κατευθύνσεις, ενώ η Gly και το Asp βρίσκονται στις θέσεις i+1 και i+2 μίας παραμορφωμένης β-στροφής τύπου II' (Σχήμα 2.8). Η διαμόρφωση αυτή ωστόσο, παρά το γεγονός ότι επάγει αναστολή της δράσης του GPIIb/IIIa, δεν συμβάλλει στην εξειδίκευση καθώς η ντεκορσίνη προσδένεται ισχυρά και στον υποδοχέα $\alpha_v\beta_3$.

Εχιστατίνη	ECESGPC CR NCKFLKEGTICKR ARGD DMDDYCNGKTCDCPRNPHKGPAT
Κιστρίνη	...QCGEGLC CE QCKFSRAGKICRIP RGD MPDDRCTGQADCPRYH
Ντεκορσίνη	...GDDQEK CL CNKDECPPGQCRFP RGD ADPYCE

Σχήμα 2.7 Τμήμα της αμινοξικής αλληλουχίας των τριών ντισιντεγκρινών και η ομολογία που παρατηρείται μεταξύ τους.

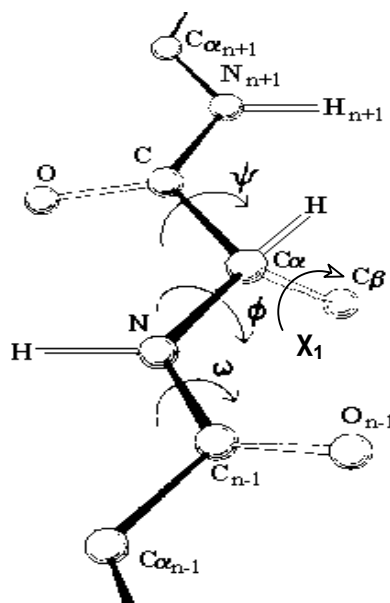


Σχήμα 2.8 β-στροφή τύπου II και II'

Η παρουσία της μικρής σε όγκο Gly, στην αλληλουχία RGD καθιστά σαφές ότι, η τελευταία μπορεί να λάβει ένα μεγάλο αριθμό πιθανών διαμορφώσεων. Αυτό προκύπτει και από το γεγονός ότι, αν και η συγκεκριμένη τριπλέτα βρίσκεται σε πολλές δραστικές ως προς τις ιντεγκρίνες πρωτεΐνες, κάθε μία από αυτές επιτελεί διαφορετικές βιοχημικές διεργασίες. Επομένως για τον σχεδιασμό ενός ισχυρού και εξειδικευμένου αναστολέα του υποδοχέα GPIIb/IIIa, απαιτείται η γνώση κάποιων παραγόντων. Ο ρόλος των αμινοξέων που βρίσκονται εκατέρωθεν της RGD αλληλουχίας και η επίδρασή τους στην διαμόρφωση. Επίσης ποια είναι αυτή η διαμόρφωση που θα επάγει εξειδικευμένη αναγνώριση του αναστολέα από τον υποδοχέα. Πιστεύεται ότι οι διαμορφώσεις που μπορεί να λάβει ένα RGD ανάλογο σε διάλυμα μειώνονται δραματικά όταν αλληλεπιδρά με τον προσδέτη.

Χαρακτηριστικό των RGD αναλόγων που σχεδιάζονται από τους ερευνητές, αποτελούν οι διάφοροι διαμορφωτικοί περιορισμοί που επιβάλλονται στα μόρια. Αφότου αποδείχθηκε η ελάχιστη αναγκαία συνθήκη, της παρουσίας της RGD τριπλέτας για ένα δραστικό ανάλογο, ακολουθήθηκαν τεχνικές όπως, η N^α αλκυλίωση της N-τελικής Arg, κυκλοποίηση, κ.λ.π. Με αυτό τον τρόπο επιχειρείται η επιβολή συγκεκριμένων προσανατολισμών στις πλευρικές αλυσίδες των Arg και Asp, των οποίων το φορτίο, αρνητικό και θετικό αντίστοιχα, θεωρείται βασικός παράγοντας στην αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα^{45,46}. Ενίσχυση των δομικών χαρακτηριστικών επίσης γίνεται με την προσθήκη κατάλληλων αμινοξέων εκατέρωθεν.

Μία από τις πιο ενδιαφέρουσες τροποποιήσεις, σε σχέση με το αρχικό RGD μόριο, είναι η N^α μεθυλίωση της Arg, ή η ακετυλίωσή της. Η προστιθέμενη μέθυλο- ή ακέτυλο-ομάδα συμβάλλει στον περιορισμό των επιτρεπτών τιμών των γωνιών φ και ψ του πεπτιδικού σκελετού^{46,47} (Σχήμα 2.9). Μία άλλη συνήθης τροποποίηση είναι η αμιδίωση του C-τελικού καρβοξυλίου του Asp. Το ανάλογο Ac-RGD-NH₂ παρουσίασε βελτιωμένη βιολογική δράση σε σχέση με το RGD. Το ίδιο συνέβη και με το Ac-RGDS-NH₂ ως προς το RGDS⁴⁷. Θεωρείται πιθανό να προτιμάται, η ιοντικού τύπου αλληλεπίδραση της γουανιδινομάδας της Arg με το C-τελικό καρβοξύλιο του Asp, παρά με το αντίστοιχο της πλευρικής αλυσίδας, στο RGD ανάλογο⁴⁸. Μελέτες σε μοντέλα του τύπου Ac-RXD-NH₂ (X: αμινοξύ) έδειξαν ότι, η γουανιδινομάδα αλληλεπιδρά με το β-καρβοξύλιο του Asp⁴⁹⁻⁵¹.

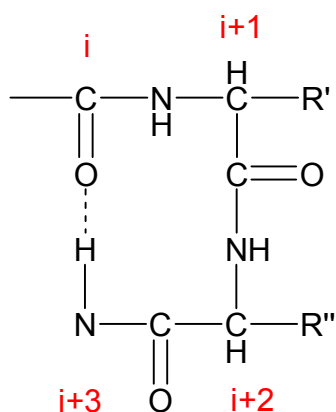


Σχήμα 1.9 Τμήμα πεπτιδικής αλυσίδας με δύο πεπτιδικούς δεσμούς όπου φαίνονται οι γωνίες φ, ψ, ω, χ₁.

Η ύπαρξη β-στροφής σε δραστικά RGD πεπτίδια, έχει ήδη αναφερθεί στην περίπτωση της ντεκορσίνης⁴⁴. Περαιτέρω μελέτες σχέσης διαμόρφωσης-βιολογικής δράσης, σε γραμμικά και κυκλικά συνθετικά πεπτίδια επέδειξαν παρόμοια αποτελέσματα^{44,52-55}. Η β-στροφή διαφόρων τύπων χαρακτηρίζεται από την δημιουργία ενός δεκαμελούς δακτυλίου, μέσω ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου μεταξύ του καρβονυλικού οξυγόνου του αμινοξέος της θέσης i, και του αμιδικού πρωτονίου του αμινοξέος της θέσης i+3 του πεπτιδικού σκελετού (Σχήμα 2.10). Τα περισσότερα δραστικά RGD,

πεπτιδικά ή μη, ανάλογα χαρακτηρίζονται από μία διαμόρφωση παραμορφωμένης β-στροφής τύπου II'. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το γραμμικό τετραπεπτίδιο RGDW, στο οποίο η β-στροφή σταθεροποιείται με δεσμό υδρογόνου μεταξύ του καρβονυλίου της Arg και του αμιδικού πρωτονίου της Trp⁵⁶. Σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της σχέσης διαμόρφωσης-βιολογικής δράσης, που προέκυψαν από ισχυρούς μη πεπτιδικούς αναστολείς⁵⁷ της πρόσδεσης του ινωδογόνου στον GPIIb/IIIa, έχει προταθεί ότι, το μοντέλο της β-στροφής αποτελεί γενικό χαρακτηριστικό, λειτουργώντας ως περιορισμός για την σχετική διεύθυνση των δραστικών πλευρικών αλυσίδων.

Μετά τον προσδιορισμό των περιοχών αναγνώρισης του ινωδογόνου από τον υποδοχέα του, έχει συντεθεί μεγάλος αριθμός RGD αναλόγων διαφόρων κατηγοριών, όπως γραμμικά και κυκλικά πεπτίδια, ή πεπτιδομιμητικά οργανικά μόρια. Ο βαθμός της δραστηριότητας αυτών των μορίων ως προς την αναστολή του ινωδογόνου προσδιορίζεται συνήθως σε ορούς αίματος πλούσιους σε αιμοπετάλια (Platelets Rich Plasma, PRP). Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων επιτυγχάνεται με επίδραση του



Σχήμα 2.10 Δεκαμελής δακτύλιος β-στροφής.

αγωνιστή ADP και κατόπιν μετριέται η αναστολή της συσσώρευσης. Η τελευταία εκφράζεται με την συγκέντρωση του αναστολέα που προκαλεί το 50% της αναστολής (IC₅₀).

Οι μελέτες σε γραμμικά ανάλογα οδήγησαν σε ένα σημαντικό συμπέρασμα ως προς τον τύπο του αμινοξέος, που ακολουθεί το Asp στην αλληλουχία RGD. Οι συγκρίσεις μεταξύ αναλόγων του τύπου RGD^X⁵⁸ με X: W, F, V και S, δείχνουν ότι όσο αυξάνει η υδροφοβικότητα του X, τόσο αυξάνει και η βιολογική δράση. Το ίδιο συμπέρασμα προκύπτει και από το κυκλο-S,S-[Ac-C(N^α-Me)RGD(β-Ph)C]-OH

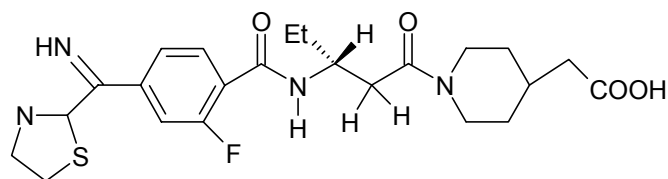
ανάλογο, το οποίο είναι ισχυρός ανταγωνιστής του ινωδογόνου⁵⁹. Η εισαγωγή της φαινυλο-ομάδας στον β-άνθρακα της πλευρικής αλυσίδας της κυστεΐνης αυξάνει κατά πολύ τη δράση του μορίου, σε σύγκριση με άλλα ανάλογα της ίδιας κατηγορίας. Με βάση τα παραπάνω έχει προταθεί η ύπαρξη μιας υδρόφοβης περιοχής στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα GPIIb/IIIa, σε αντιστοιχία με τις ιονικές περιοχές που αλληλεπιδρούν με το Asp και Arg⁵⁸⁻⁶⁰.

Στα παραπάνω προστίθενται τα αποτελέσματα έρευνας μεγαλύτερων στην αμινοξική αλληλουχία, κυκλοποιημένων αναλόγων. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η τεχνική της κυκλοποίησης αποδεικνύεται εξαιρετικά χρήσιμη για τον περιορισμό της διαμορφωτικής ελευθερίας των αναλόγων. Έτσι, ενώ η επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας σε γραμμικά ανάλογα οδήγησε σε μείωση της δραστηριότητάς τους, το αντίθετο συνέβη στα αντίστοιχα κυκλικά⁴⁷. Επιπλέον, σε RGD πεπτιδικά ανάλογα της κατηγορίας G-[κυκλο-S,S-{(Pen)GHRGDLXC}]A-OH, όπου X: Arg, Lys, Glu, Leu, και Pen: πενικιλλαμίνη, φανερώνεται ένα ακόμα σημαντικό στοιχείο για το κατάλοιπο της θέσης i+2, με i τη θέση του Asp. Το μόριο με την Arg έχει την υψηλότερη δραστηριότητα⁶¹ και βάση αυτού, θεωρείται πιθανή μία ακόμα ιοντική περιοχή στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα⁶².

Με τη χρήση σύγχρονων τεχνικών διαμορφωτικής ανάλυσης όπως, NMR, κρυσταλλογραφία ακτίνων X (X-Ray crystallography) και υπολογιστικών μεθόδων μοριακής δυναμικής, έχει βρεθεί η τρισδιάστατη δομή πολλών δραστικών RGD αναλόγων. Τα περισσότερα κυκλικά πεπτιδικά ανάλογα, τα οποία είναι και τα πιο ισχυρά ως προς την ανασταλτική τους δράση, υιοθετούν ένα συγκεκριμένο μοντέλο δομής⁶³. Μεταξύ των καταλοίπων, αργινίνης και ασπαρτικού, υπάρχει πάντα η γλυκίνη, σε μία μάλλον εκτεταμένη διαμόρφωση. Επίσης οι πλευρικές αλυσίδες των Arg και Asp, υποχρεώνονται να απέχουν μία ελάχιστη απόσταση που να επιτρέπει την επιδιάλυψή τους, αφού το θετικό και αρνητικό τους φορτίο αντίστοιχα, προκαλεί ισχυρή έλξη. Εκτεταμένη μελέτη της διαμόρφωσης του τετραπεπτιδίου RGDW σε διάλυμα⁶³, υποδεικνύει μία μέση απόσταση για τα C^α άτομα των Arg και Asp της τάξης των 6.8 Å, ενώ για τα C^ζ και C^γ αντίστοιχα των πλευρικών τους αλυσίδων, η μέση απόσταση είναι 9.9 Å. Σε αντίστοιχες μελέτες⁶⁴ δραστικών πεπτιδομιμητικών μορίων έχει υπολογιστεί ότι, η απόσταση των κεντρικών ατόμων άνθρακα της αμιδινο- και καρβόξυλο- ομάδας, πρέπει να είναι μεγαλύτερη των 12 Å.

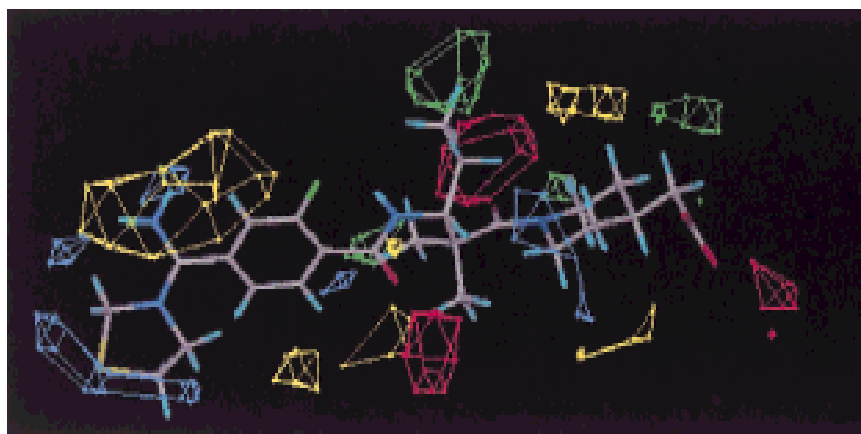
Ενδιαφέρον παρουσιάζει η ανάλυση δομής του πεπτιδομιμητικού αναστολέα του GPIIb/IIIa, (I)⁶⁴, με χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων μοριακής δυναμικής.

Στην ανάλυση αυτή χρησιμοποιούνται δεδομένα από μελέτες για το ενεργό κέντρο του υποδοχέα, όπως περιοχές που θεωρούνται ως ιοντικές ή υδρόφοβες και γίνεται



(I)

συσχέτιση με τις αντίστοιχες του αναστολέα. Στο σχήμα 2.11, με κόκκινο χρώμα παρουσιάζονται οι περιοχές του GPIIb/IIIa, όπου αλληλεπίδραση με ένα αρνητικό φορτίο ευνοεί τον βαθμό συγγένειας για το υπόστρωμα, ενώ με μπλε χρώμα αυτές που το ίδιο συμβαίνει με ένα θετικό φορτίο. Το πράσινο χρώμα αντιστοιχεί σε περιοχές που μπορούν να δεχθούν μία ογκώδη ομάδα και αυτό συμβαδίζει με μια αύξηση στην αναστολή πρόσδεσης του ινωδογόνου, ενώ εισαγωγή μίας τέτοιας ομάδας στις αντίστοιχες κίτρινες μειώνει την αναστολή.



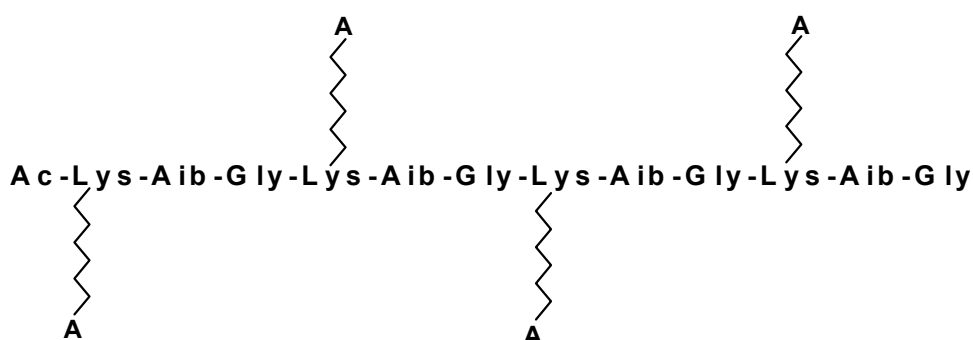
Σχήμα 2.11 Στερεοδιάταξη διαγραμμάτων για ηλεκτροστατικά ή στερικά πεδία της ένωσης (I).

Όπως φαίνεται στο παραπάνω σχήμα, υπάρχει πολύ καλή ταύτιση των ευνοϊκών για θετικού φορτίου αλληλεπίδραση περιοχών (μπλε), με την αμίδινο ομάδα της (I) και το ίδιο συμβαίνει με την αντίστοιχη του αρνητικού φορτίου (κόκκινο), η οποία περιβάλλει την καρβόξυλο ομάδα της (I). Επομένως ο κατιονικός και ανιονικός χαρακτήρας των πλευρικών αλυσίδων των Asp και Arg αντίστοιχα, στα RGD

ανάλογα, φαίνεται να παίζει πολύ σημαντικό ρόλο, όπως βέβαια και η θέση αυτών των ομάδων. Στην ένωση (**I**) η απόσταση των δύο αντίθετα φορτισμένων ομάδων είναι 15.3 Å. Οι καρβονυλικές ομάδες που συνδέονται με τους δακτύλιους βενζολίου και πιπεριδίνης, επίσης βρίσκονται μέσα σε πεδία ευνοϊκά για ιοντική αλληλεπίδραση και πιθανή συμμετοχή τους σε δεσμούς υδρογόνου, συμβάλλει σε αύξηση της δραστηριότητας του αναλόγου. Η μεγάλη περιοχή στερικών παρεμποδίσεων (κίτρινο) που βρίσκεται στη μία πλευρά της αμιδινό-NH-ομάδας, ενώ στην άλλη πλευρά ευνοούνται ιοντικές αλληλεπιδράσεις, υποδεικνύει πιθανά την κατεύθυνση της γουανιδινό-ομάδας σε ένα δραστικό RGD ανάλογο. Από την άλλη πλευρά, η περιοχή που ευνοεί την διευθέτηση μεγάλων ομάδων (πράσινο), βρίσκεται σε συμφωνία με τη θέση του αίθυλο-υποκαταστάτη της (**I**). Σε συγκριτική μελέτη των δομών του RGDW πεπτιδίου με την (**I**), υπάρχει πολύ καλή ταύτιση της θέσης της πλευρικής αλυσίδας της Trp, και της αίθυλο-ομάδας της (**I**). Το γεγονός αυτό στηρίζει το σημαντικό ρόλο μίας υδρόφοβης ομάδας στη θέση που ακολουθεί το Asp στην αλληλουχία RGD.

2.4 ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΟΙ ΟΛΙΓΟΠΕΠΤΙΔΙΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ SOC_n

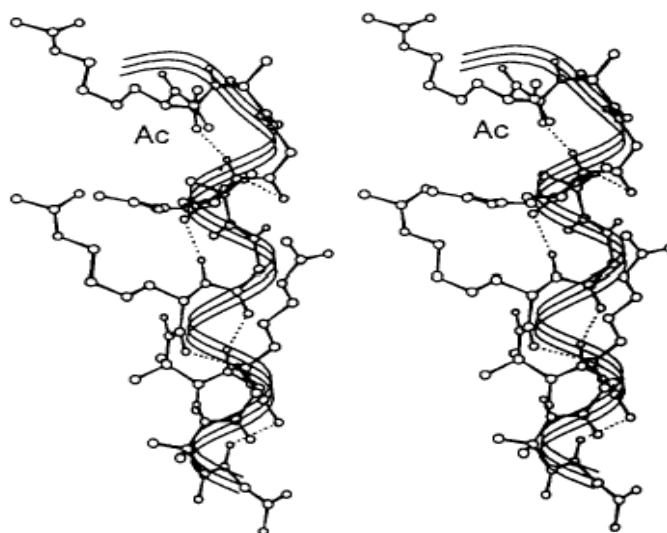
Ο φορέας SOC_n⁶⁵ (n=4,5,...) αποτελείται από την επαναλαμβανόμενη αλληλουχία αμινοξέων (τριπεπτίδια) Lys-Aib-Gly (Σχήμα 2.12). Η επιλογή των συγκεκριμένων αμινοξέων έγινε για να επιτευχθούν ορισμένα σημαντικά δομικά χαρακτηριστικά. Με διαμορφωτικές μελέτες στο τετραμερές και πενταμερές, έχει προκύψει μία δομική σταθερότητα και κανονικότητα και στις δύο περιπτώσεις. Πιο συγκεκριμένα, από τα δεδομένα της φασματοσκοπίας NMR και με υπολογισμούς μοριακής δυναμικής⁶⁶, έχει αποδειχθεί ότι η δομή του φορέα είναι κεκαμένη 3₁₀ έλικα (Σχήμα 2.13), είτε πρόκειται για το τετραμερές, είτε για το πενταμερές. Η μέση τετραγωνική απόκλιση (rms) μεταξύ των τιμών 3₁₀ έλικας και του φορέα SOC_n, υπολογίστηκε μικρότερη από 1.4 Å.



Σχήμα 2.12 Ο επαναλαμβανόμενος ολιγοπεπτιδικός φορέας SOC_n (Sequential oligopeptide carrier) Το A συμβολίζει προσδεμένα πεπτίδια στην πλευρική αλυσίδα της Lys.

Σημαντικό ρόλο στην ελικοειδή διαμόρφωση έχει το α-αμινοϊσοβουτυρικό οξύ (Aib). Το Aib φέρει δύο μεθύλια στον α-άνθρακα, γεγονός που επιφέρει διαμορφωτική ακαμψία (γωνίες φ και ψ) (Σχήμα 2.9) όταν εισαχθεί στον σκελετό ενός πεπτιδίου. Οι επιτρεπτές τιμές που λαμβάνουν οι γωνίες φ και ψ, ευνοούν τις ελικοειδείς διαμορφώσεις. Λαμβάνοντας υπόψη ότι το Aib επαναλαμβάνεται κάθε τρίτο κατάλοιπο στην αλληλουχία του SOC_n, συμπεραίνεται ότι είναι ουσιαστικά ο παράγοντας που επάγει την 3₁₀ έλικα.

Ο ρόλος της Gly είναι ακριβώς αντίθετος με αυτόν του Aib. Λόγω του μικρού της στερεοχημικού όγκου, επιτρέπει την ευκαμψία του πεπτιδικού σκελετού αφήνοντας ουσιαστικά τα γειτονικά αμινοξέα να καθορίσουν την διαμόρφωση. Η επαναλαμβανόμενη τριπλέτα αμινοξέων συμπληρώνεται με την Lys. Η ελεύθερη αμινομάδα της πλευρικής της αλυσίδας, επιτρέπει την ομοιοπολική πρόσδεση στο φορέα άλλων πεπτιδίων, κυρίως αντιγονικών επιτόπων. Το SOC_n , έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα ως φορέας επιτόπων⁶⁷⁻⁶⁹ και έχει αποδειχθεί ότι, διατηρεί τα δομικά του χαρακτηριστικά χωρίς να αλληλεπιδρά με τα προσδεμένα σε αυτόν πεπτιδία. Επιπλέον η κανονικότητα της δομής του και η απουσία διαμορφωτικών περιορισμών και στερικών παρεμποδίσεων, βελτιώνει τη βιολογική δράση των πεπτιδίων που φέρει, προσφέροντάς τους ουσιαστικά ένα σταθερό υπόστρωμα.



Σχήμα 2.13 Η ελαχιστοποιημένη δομή του φορέα SOC_n όπως βρέθηκε από μελέτες μοριακής δυναμικής.

Η δομή της κεκαμένης 3_{10} έλικας του SOC_n σταθεροποιείται με ένα σύνολο ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου⁶⁸. Αυτό διαπιστώνεται με πειράματα φασματοσκοπίας NMR και προσδιορισμό των συντελεστών θερμοκρασίας των αμιδικών πρωτονίων του πεπτιδικού σκελετού. Από τα ίδια πειράματα διαπιστώθηκε ότι η γωνία στρέψης ϕ για την Gly λαμβάνει τιμές $\pm 70^\circ$, κάτι που φανερώνει διαμορφωτική ακαμψία στο δεσμό N-C^α στο μόριο της γλυκίνης και κατά συνέπεια στο μόριο του φορέα⁶⁸. Αξιοσημείωτη είναι και η ομοιότητα μεταξύ των τιμών των

χημικών μετατοπίσεων, των αμιδικών πρωτονίων του ίδιου επαναλαμβανόμενου αμινοξέος, κατά την προοδευτική αύξηση του μήκους του φορέα. Αυτό δείχνει την κανονικότητα σε μία διαμόρφωση που ξεκινά από το καρβοξυ-τελικό άκρο του πεπτιδίου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

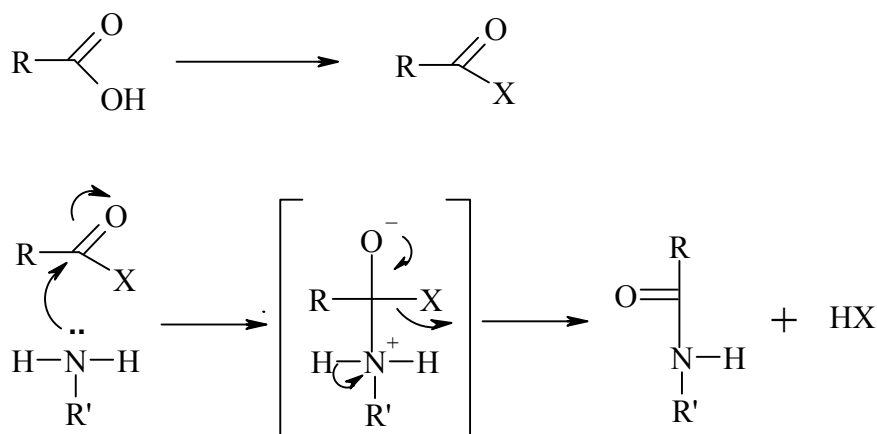
ΠΕΠΤΙΔΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ

3. ΠΕΠΤΙΔΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ

3.1 Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού

Ο σχηματισμός ενός πεπτιδικού δεσμού μεταξύ δύο αμινοξέων επιτυγχάνεται με πυρηνόφιλη προσβολή της αμινομάδας του ενός, στον καρβονυλικό άνθρακα του άλλου. Στην πεπτιδοχημεία, η ακυλίωση της αμινομάδας με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός αμιδικού δεσμού μεταξύ δύο αμινοξέων, καλείται σύζευξη (coupling).

Στο εργαστήριο, η επίτευξη της σύζευξης δεν είναι δυνατή με απλή ανάμιξη, καθώς απαιτείται κατανάλωση ελεύθερης ενέργειας. Το βήμα που καθορίζει την πορεία της αντίδρασης, ευνοώντας το σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού, είναι η ενεργοποίηση του καρβοξυλίου του ενός αμινοξέος, έτσι ώστε να είναι δυνατή η πυρηνόφιλη προσβολή, από την αμινομάδα ενός δεύτερου αμινοξέος, υπό ήπιες συνθήκες. Η ενεργοποίηση λαμβάνει χώρα με τη χρησιμοποίηση ενός δέκτη ηλεκτρονίων X, ο οποίος αντικαθιστώντας την ομάδα -OH, αυξάνει την πολικότητα του καρβonyλίου, διευκολύνοντας έτσι σε μεγάλο βαθμό την αντίδραση πυρηνόφιλης υποκατάστασης μεταξύ των δύο αμινοξέων (σχήμα 3.1).



Σχήμα 3.1 Σχηματισμός αμιδικού δεσμού με ενεργοποίηση του καρβοξυλίου από ομάδα δέκτη ηλεκτρονίων και πυρηνόφιλη προσβολή από την αμινομάδα.

Οι κυριότερες μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί για την ενεργοποίηση του καρβοξυλίου είναι των χλωριδίων⁷⁰, των αζιδίων⁷¹, των μικτών ανυδριτών⁷², των ενεργων εστέρων⁷¹ και των αντιδραστηρίων σύζευξης⁷³. Από αυτές, εκείνη που συγκεντρώνει τα περισσότερα πλεονεκτήματα και έχει επικρατήσει σήμερα έναντι των υπολοίπων, είναι η μέθοδος των αντιδραστηρίων σύζευξης.

Η ενεργοποίηση του καρβοξυλίου, από μόνη της, δεν είναι αρκετή, ώστε να σχηματισθεί ο επιθυμητός πεπτιδικός δεσμός. Η παρουσία περισσότερων από μία αμινομάδων, καρβοξυλομάδων, καθώς και άλλων δραστικών ομάδων στις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων, καθιστά την αντίδραση μη εκλεκτική. Το πρόβλημα αυτό ξεπερνιέται με την εισαγωγή κατάλληλων προστατευτικών ομάδων. Έτσι, σε μία αντίδραση σύζευξης, η α-αμινομάδα του ακυλιωτικού μέσου, η καρβοξυλομάδα του πυρηνόφιλου συστατικού, και τυχόν δραστικά τμήματα των πλευρικών αλυσίδων των δύο αντιδρώντων, προστατεύονται εκλεκτικά με ομάδες αδρανείς στις συνθήκες της αντίδρασης.

Μία συνοπτική περιγραφή των σταδίων της σύνθεσης ενός διπεπτιδίου από δύο αμινοξέα, είναι η ακόλουθη:

α) Παροδική προστασία, με κατάλληλη ομάδα Y, της α-αμινομάδας του συστατικού, του οποίου το καρβοξύλιο πρόκειται να ενεργοποιηθεί.

β) Παροδική προστασία, με κατάλληλη ομάδα Y', του α-καρβοξυλίου του πυρηνόφιλου συστατικού.

γ) Ημιμόνιμη προστασία των δραστικών ομάδων στις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων.

δ) Σχηματισμός του αμιδικού δεσμού κατόπιν ενεργοποίησης του ελεύθερου α-καρβοξυλίου με κατάλληλη ομάδα X.

ε) Απομάκρυνση εκλεκτικά και σε συνθήκες στις οποίες δεν επηρεάζεται ο πεπτιδικός δεσμός, των προστατευτικών ομάδων.

Το παραγόμενο διπεπτίδιο είναι δυνατόν να επιμηκυνθεί, με την εισαγωγή ενός τρίτου αμινοξέος και επανάληψη των παραπάνω σταδίων.

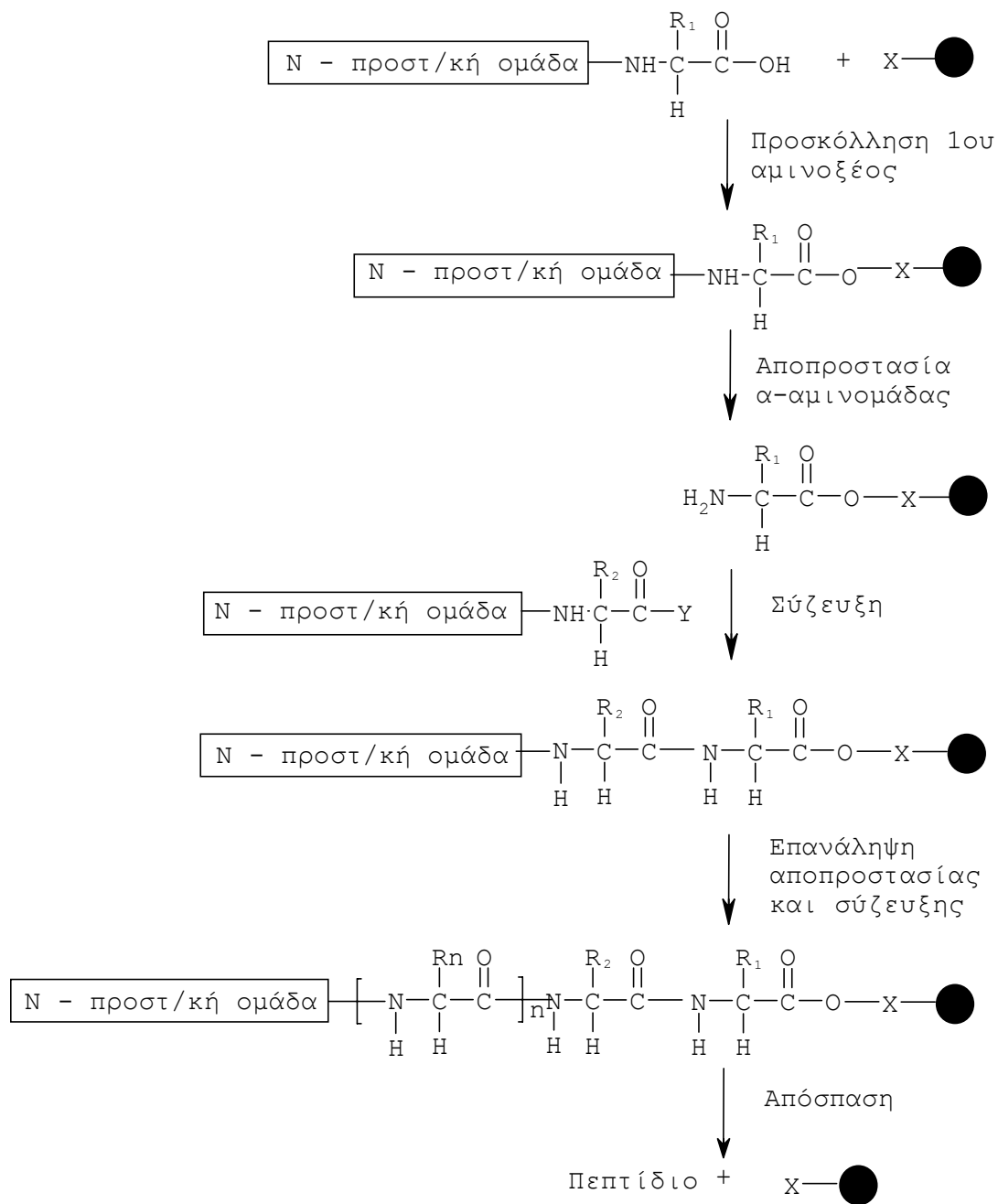
3.2 Σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση

Κατά την σύνθεση ενός διπεπτιδίου σε διάλυμα, το προϊόν πρέπει να απομονωθεί, να καθαριστεί από τα παραπροϊόντα και να ταυτοποιηθεί. Αυτή η διαδικασία πρέπει να επαναλαμβάνεται σε κάθε στάδιο προσθήκης νέου αμινοξέος

κατά την επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας, γεγονός που καθιστά τη σύνθεση πεπτιδίων μία επίπονη και χρονοβόρα διαδικασία. Σταθμό στην εξέλιξη της πεπτιδικής σύνθεσης αποτέλεσε η ανάπτυξη της μεθόδου σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεό υπόστρωμα (solid phase peptide synthesis, SPPS)⁷⁴⁻⁷⁶ από τον R. B. Merrifield (1963). Αρχή της μεθόδου είναι η πρόσδεση της καρβοξυλομάδας του N-προστατευμένου C-τελικού αμινοξέος, του πεπτιδίου που πρόκειται να συντεθεί, σε ένα αδιάλυτο πολυμερές (ρητίνη). Αποπροστασία της α-αμινομάδας και εισαγωγή του επόμενου N-προστατευμένου αμινοξέος με παράλληλη ενεργοποίηση του καρβοξυλίου του κάθε φορά, προάγει την επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας. Η περίσσεια των αντιδρώντων, καθώς και τα παραπροϊόντα σε κάθε στάδιο αποπροστασίας και σύζευξης απομακρύνονται με εκπλύσεις του στερεού από κατάλληλους οργανικούς διαλύτες, ενώ το πεπτίδιο παραμένει προσδεδεμένο στη ρητίνη, έως ότου ολοκληρωθεί η σύνθεση της αλληλουχίας του. Στο σημείο αυτό με επεξεργασία με κατάλληλο αντιδραστήριο (συνήθως ισχυρό οξύ) γίνεται η απόσπαση του πεπτιδίου από τη ρητίνη με παράλληλη απομάκρυνση τυχόν προστατευτικών ομάδων (ημιμόνιμη προστασία) των πλευρικών αλυσίδων. Η γενική πορεία της σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεά φάση παρουσιάζεται στο σχήμα 3.2

3.2.1 Το στερεό πολυμερές υποστήριγμα

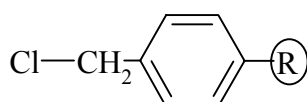
Η ρητίνη⁷⁷ που θα χρησιμοποιηθεί σε μια πεπτιδική σύνθεση, πρέπει να έχει ορισμένες φυσικές και χημικές ιδιότητες, ώστε να επιτευχθούν ποσοτικές αντιδράσεις με υψηλές αποδόσεις και όσο το δυνατό λιγότερες απώλειες⁷⁸. Η αρχή λειτουργίας της βασίζεται στην ομοιοπολική πρόσδεση της, με το πρώτο αμινοξύ της αλληλουχίας που πρόκειται να συντεθεί. Επομένως θα πρέπει να είναι δυνατή η χημική τροποποίηση του πολυμερούς με κατάλληλη ομάδα η οποία θα συνδεθεί με το καρβοξύλιο του αμινοξέος. Ο τύπος του δεσμού θα πρέπει, να είναι ανθεκτικός στις συνθήκες που θα πραγματοποιηθούν όλες οι αντιδράσεις κατά την σύνθεση. Η πρόσβαση του πρώτου αμινοξέος, καθώς και των υπολοίπων αντιδραστηρίων και διαλυτών στο εσωτερικό του πλέγματος του πολυμερούς είναι ένας άλλος βασικός παράγοντας. Έτσι η διάταξη και το μέγεθος του πλέγματος πρέπει να είναι τέτοια που να επιτρέπει την έκθεση των δραστικών ομάδων προς τα διαλυτά αντιδραστήρια, καθώς και την εύκολη απομάκρυνση των παραπροϊόντων από τους διαλύτες. Επιπλέον είναι απαραίτητο να είναι χημικά αδρανές



Σχήμα 3.2 Γενική πορεία σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεά φάση.

στις συνθήκες της σύνθεσης. Τέλος, αναγκαία προϋπόθεση είναι η μηχανική του σταθερότητα.

Η ρητίνη του Merrifield⁷⁴ αποτελείται από το συμπολυμερές στυρολίου – διβινυλοβενζολίου και την δραστική χλωρομέθυλο ομάδα (σχήμα 3.3). Η τελευταία σε αντίδραση με το άλας του N^α-προστατευμένου αμινοξέος οδηγεί στην ομοιοπολική πρόσδεση του με την ρητίνη με εστερικό δεσμό.



Σχήμα 3.3 Η ρητίνη Merrifield

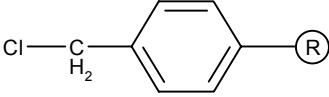
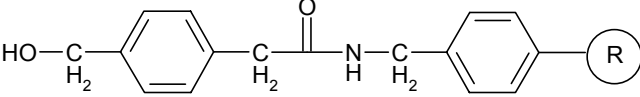
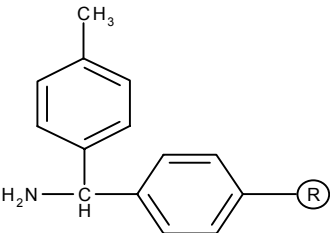
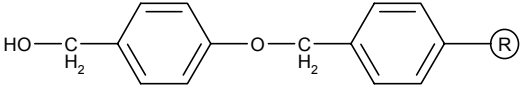
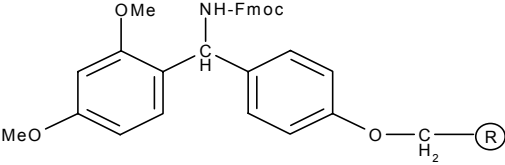
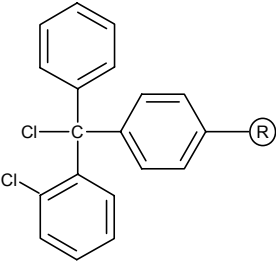
Οι προσπάθειες για βελτιώσεις στις φυσικοχημικές ιδιότητες των ρητινών, εστιάστηκαν στην σταθερότητα του δεσμού πρόσδεσης του πεπτιδίου με το πολυμερές, καθώς και την αύξηση του χώρου του πλέγματος, ιδιαίτερα για την σύνθεση πεπτιδίων με μεγάλες σε μήκος αλληλουχίες⁷⁹. Έτσι με διάφορες τροποποιήσεις παρασκευάστηκαν παράγωγα όπως η φαινυλακεταμιδομεθυλο ρητίνη (PAM resin)⁸⁰, η οποία λόγω της παρουσίας της φαινυλακεταμιδο ομάδας, παρέχει αυξημένη σταθερότητα στον εστερικό δεσμό με το C-τελικό αμινοξύ, ως προς τα οξέα, ενώ παράλληλα αυξάνει τον χώρο μεταξύ του πλέγματος και της πεπτιδικής αλυσίδας. Με άλλες αλλαγές, προέκυψαν ρητίνες που είναι σταθερές σε βασικές συνθήκες, ενώ το πεπτίδιο αποσπάται από το πολυμερές με επίδραση αραιού οξέος, όπως η p-αλκοξυβενζυλοξυβενζυλο-ρητίνη (Wang resin)⁷⁷. Επίσης με χρήση βενζυδρυλάμινο ομάδας στην ρητίνη έγινε δυνατή η απόσπαση του πεπτιδίου, με το C-τελικό κατάλοιπο τροποποιημένο ως αμίδιο (MBHA resin)⁸¹. Στον πίνακα 3.1 αναφέρονται μερικές από της ρητίνες που χρησιμοποιούνται ευρέως σήμερα από τους πεπτιδοχημικούς.

3.2.2 Παροδική και ημιμόνιμη προστασία

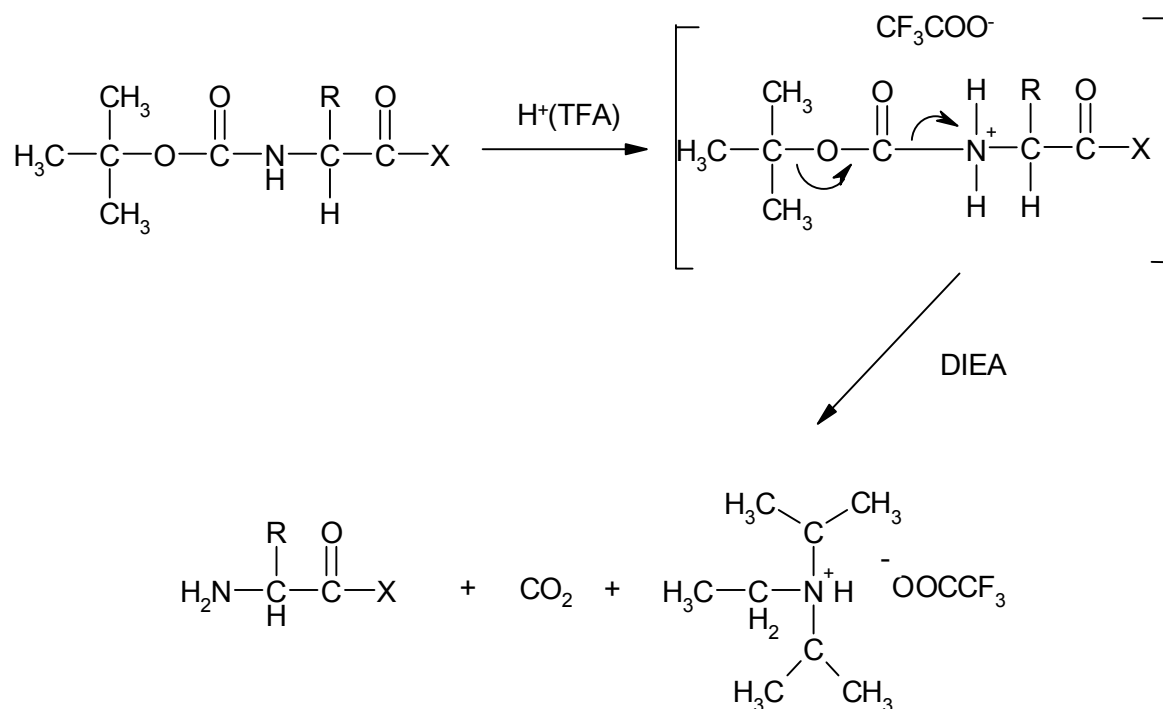
Κατά την σύνθεση της πεπτιδικής αλληλουχίας χρησιμοποιείται παροδική προστασία για την α-αμινομάδα του εκάστοτε προστιθέμενου αμινοξέος και ημιμόνιμη προστασία για τις δραστικές ομάδες των πλευρικών αλυσίδων. Η α-

αμινοπροστατευτικές ομάδες απομακρύνονται σε κάθε κύκλο σύζευξης, ενώ αυτές των πλευρικών αλυσίδων, συνήθως, κατά την απόσπαση του πεπτιδίου από την ρητίνη.

Πίνακας 3.1 Οι τύποι και οι εμπορικές ονομασίες διαφόρων ρητινών.

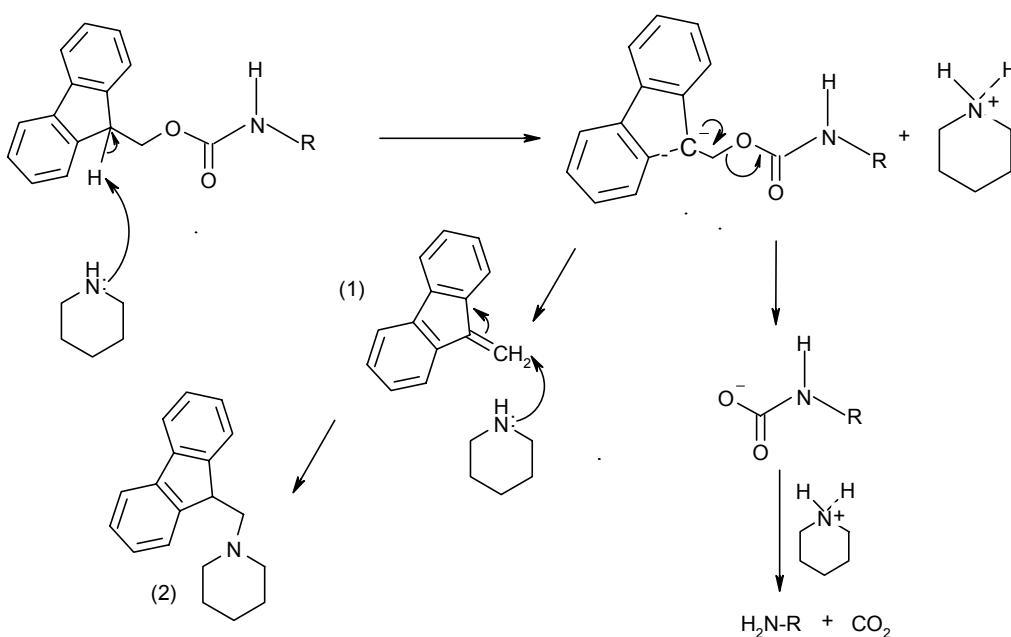
Όνομασία	Τύπος
Merrifield	
PAM	
MBHA	
Wang	
Ring Amide MBHA	
2-χλωροτριτυλο-χλωρίδιο	

Η βενζυλοξυκαρβόνυλο ομάδα (καρβοβενζοξύ, Cbz ή Z ομάδα)⁸², που προτάθηκε από τους Bergmann και Zervas, αποτέλεσε την πρώτη σπουδαία αμινοπροστατευτική ομάδα. Στην εξέλιξη, παρουσιάστηκαν διάφορες τροποποιήσεις, και τα τελευταία χρόνια οι πλέον κοινές είναι η tert-βουτυλοξυκαρβόνυλο ομάδα (Boc)⁸³ και η 9-φλουορενυλο- μεθυλοξυκαρβονυλο ομάδα (Fmoc)⁸⁴. Η Boc-ομάδα είναι ευαίσθητη στα οξέα και αποσπάται από την α-αμινομάδα με επίδραση τριφθοροξικού οξέος αραιωμένου σε διχλωρομεθάνιο (TFA/DCM), (σχήμα 3.4). Το παραγόμενο τριφθοροξικό άλας στη συνέχεια εξουδετερώνεται με μια τριτοταγή αμίνη. Συνήθως συνδυάζεται με τις πλευρικές προστασίες, βενζυλεστέρα (BzlO)⁷⁵ και p-τολουολο-σουλφονυλομαδες (Tosyl)⁷⁵, οι οποίες απομακρύνονται με επίδραση ισχυρού οξέος (ανυδρο HF)⁷⁵, κατά την απόσπαση του πεπτιδίου από την ρητίνη.



Σχήμα 3.4 Η απομάκρυνση της Boc ομάδας με τριφθοροξικό οξύ, και εξουδετέρωση του παραγόμενου άλατος με διισοπροπυλο αιθυλαμίνη

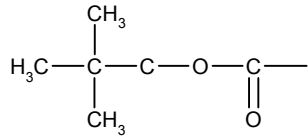
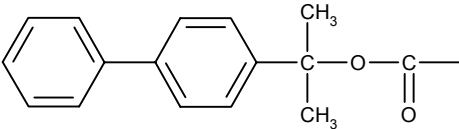
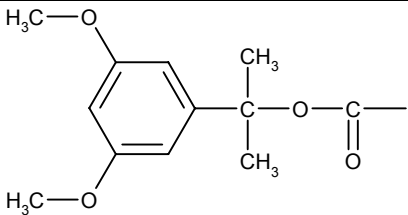
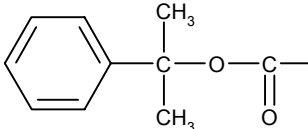
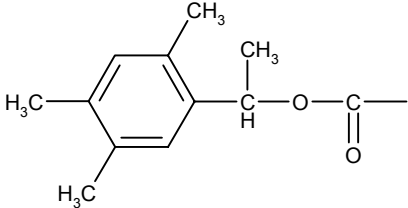
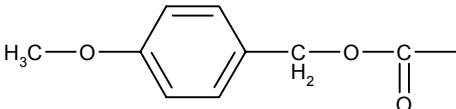
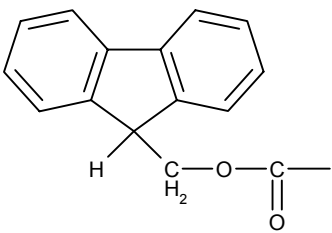
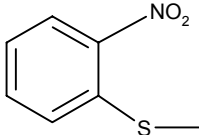
Σε αντίθεση με την Boc-, η Fmoc-ομάδα είναι ευαίσθητη σε βασικές συνθήκες⁸⁴ και απομακρύνεται από την α-αμινομάδα με επίδραση διαλύματος πιπεριδίνης σε N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF), με αντίδραση απόσπασης E1cB (σχήμα 3.5). Ως πλευρική προστατευτική ομάδα κατά την σύνθεση με Fmoc-N^α προστασία χρησιμοποιείται η tert-βουτυλο (tBu)⁸⁵ ομάδα ευαίσθητη σε οξέα.

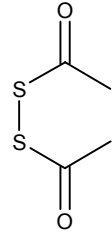
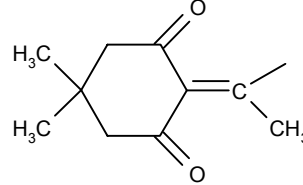
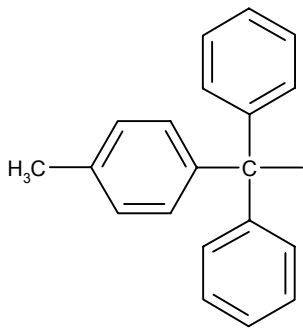
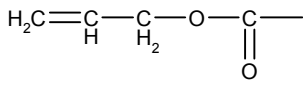


Σχήμα 3.5 Απομάκρυνση της Fmoc ομάδας με πιπεριδίνη.

Εκτός από τις παραπάνω προστατευτικές ομάδες, υπάρχει μια πληθώρα άλλων προστασιών, ιδιαίτερα για τις δραστικές πλευρικές αλυσίδες και χρησιμοποιούνται ανάλογα με το εκάστοτε αμινοξύ και την N^α-προστασία του. Ως παραδείγματα αναφέρονται, η 4-μεθοξυ-2,3,6-τριμέθυλοβενζινο-σουλφονυλομάδα (Mtr)⁸⁶, η οποία βρίσκει εφαρμογή στην προστασία της γουανιδινομάδας της αργινίνης, η αλλυλοξυ-καρβονυλομάδα (Alloc)⁸⁷ για την πλευρική αμινομάδα της λυσίνης και η ακεταμιδομεθυλομάδα (AcM)⁸⁸, για την σουλφυδρυλομάδα της κυστεΐνης. Μία συνοπτική παρουσίαση των προστατευτικών ομάδων που χρησιμοποιούνται σήμερα, με τις συντομογραφίες και τους τύπους τους, παρουσιάζεται στον πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2 Οι προστατευτικές ομάδες

Προστατευτική Ομάδα	Συντομογραφία	Τύπος
<i>Tert</i> -Butyloxycarbonyl 4-βουτυλοξυ-καρβονυλο	Boc	
2-(4- Biphenyl) propyl(2)oxycarbonyl 2-(4-διφαινυλο)προπυλ(2)οξυ- καρβονυλο	Bpoc	
2-(3,5-Dimethoxyphenyl) propyl(2)oxycarbonyl 2-(3,5- διμεθυλοοξυφαινυλο)προπυλ(2) οξυ-καρβονυλο	Ddz	
2-Phenyl-2-propyloxycarbonyl 2-φαινυλο-2-προπυλοξυ- καρβονυλο	Poc	
2,4,5- Tetramethylbenzyloxycarbonyl 2,4,5-τετραμεθυλο-βενζυλοξυ- καρβονυλο	Tmz	
4-Methoxybenzyloxycarbonyl 4-μεθοξυ-βενζυλοξυ-καρβονυλο	Moz	
9-Fluorenylmethyloxycarbonyl 9-φλουορενυλο-μεθυλοξυ- καρβονυλο	Fmoc	
2-Nitrophenylsulfenyl 2-νιτροφαινυλο-σουλφενυλο	Nps	

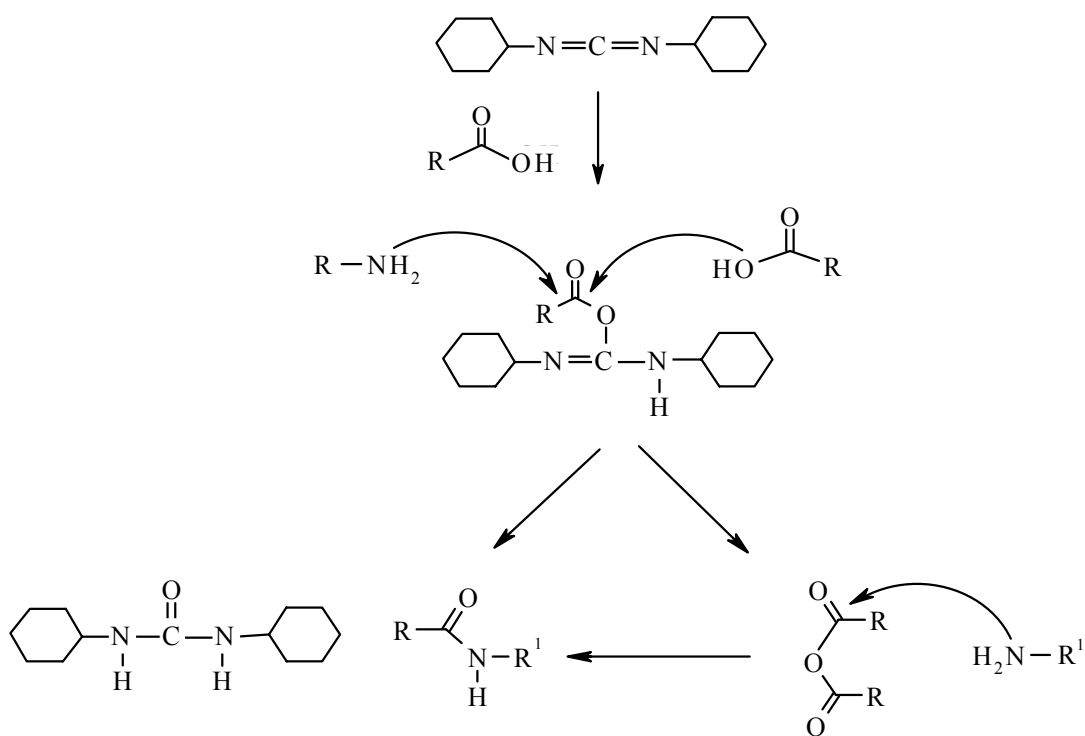
<p>N-dithiasuccinoyl</p> <p>N-διθειο-ηλεκτροϋλο</p>	<p>Dts</p>	
<p>1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)ethyl</p> <p>1-(4,4-διμεθυλο-2,6-διοξο-κυκλο-εξυλ-1-ιδενιο-αιθυλο</p>	<p>Dde</p>	
<p>4-Methyltrityl</p> <p>4-μεθυλο-τριτυλο</p>	<p>Mtt</p>	
<p>Allyloxycarbonyl</p> <p>Αλλυλοξυ-καρβονυλο</p>	<p>Alloc</p>	

3.2.3 Αντιδραστήρια σύζευξης

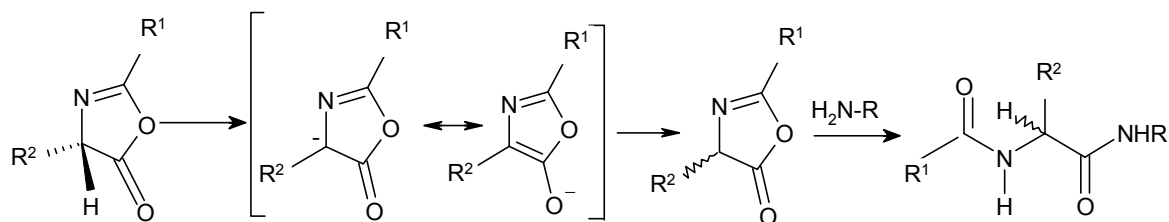
Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη παράγραφο, η μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρύτατα σήμερα, για την πραγματοποίηση μιας αντίδρασης σύζευξης μεταξύ δύο αμινοξέων, είναι αυτή των αντιδραστηρίων σύζευξης. Το δικυκλοεξυλοκαρβοδιμίδιο (DCC)⁷³ αποτελεί το πλέον αντιπροσωπευτικό αντιδραστήριο αυτής της κατηγορίας. Κύριο χαρακτηριστικό του είναι, η δυνατότητα πραγματοποίησης της *in situ* ενεργοποίησης του καρβοξυλίου και της σύζευξης του τελευταίου με το αμινο-συστατικό. Η αντίδραση αρχικά περιλαμβάνει την προσθήκη της καρβόξυλο ομάδας σε έναν από τους διπλούς δεσμούς του καρβοδιμιδίου, δίνοντας ως ενδιάμεσο την Ο-ακυλο-ισοουρία⁸⁹. Στη συνέχεια με μια αντίδραση αμινόλυσης από το άμινο-συστατικό, σχηματίζεται ο αμιδικός δεσμός μεταξύ των δύο αμινοξέων καθώς και διακυλοουρία. Είναι δυνατόν, κατά το σχηματισμό της Ο-ακυλο-ισοουρίας, ένα δεύτερο μόριο καρβοξυλικού οξέος να οδηγήσει μέρος της αντίδρασης στο σχηματισμό ενός συμμετρικού ανυδρίτη. Ωστόσο και αυτή η παράπλευρη αντίδραση καταλήγει στο επιθυμητό προϊόν, την σύζευξη των δύο αμινοξέων⁷³ (σχήμα 3.6).

Τα μειονεκτήματα της μεθόδου σχετίζονται άμεσα, με την υψηλή δραστηριότητα της Ο-ακυλοϊσοουρίας, λόγω της μεγάλης ενεργοποίησης που παρέχει ο διπλός δεσμός μεταξύ άνθρακα και αζώτου. Το σημαντικότερο είναι αυτό της ρακεμοποίησης και οφείλεται στην επέκταση της έλξης ηλεκτρονίων, που προκαλείται στον καρβονυλικό άνθρακα μέσω της ενεργοποίησής του από το καρβοδιμίδιο, προς το οπτικά ενεργό κέντρο άνθρακα. Το αποτέλεσμα είναι η εύκολη απόσπαση πρωτονίου από το τελευταίο και τελικά ο σχηματισμός οπτικά ισομερών προϊόντων^{90,91} (σχήμα 3.7). Επίσης ένα εξίσου σημαντικό πρόβλημα είναι η Ο→N ακυλο-μετάθεση όπου σχηματίζεται το λιγότερο δραστικό ενδιάμεσο N-ακυλοουρία μέσω μια μεταβατικής κατάστασης τεσσάρων ενεργών κέντρων⁹² (σχήμα 3.8).

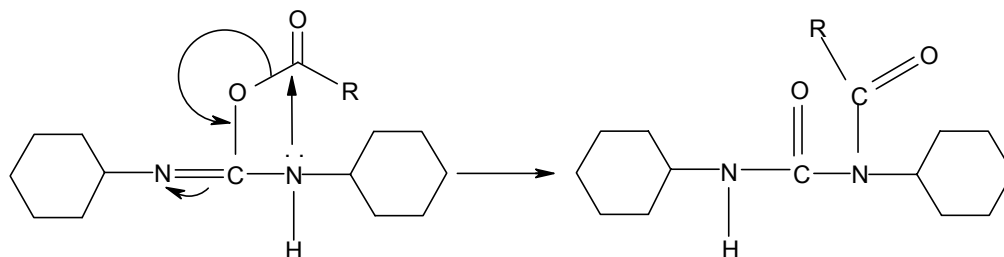
Τα παραπάνω προβλήματα αντιμετωπίζονται επιτυχώς με χρήση ενός βοηθητικού πυρηνόφιλου. Το τελευταίο δρα σε συνδυασμό με τα ενδιάμεσα Ο-ακυλοϊσοουρία και συμμετρικό ανυδρίτη, παρέχοντας ένα νέο ακυλιωτικό μέσο, χαμηλότερης δραστηριότητας μεν, ικανό δε, για το γρήγορο σχηματισμό του επιθυμητού αμιδικού δεσμού.



Σχήμα 3.6 Μηχανισμός αντίδρασης σύζευξης με DCC.

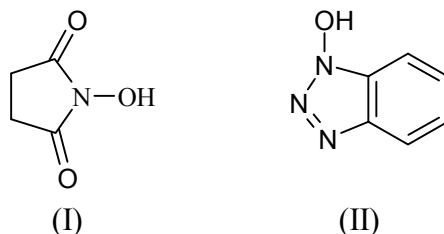


Σχήμα 3.7 Ρακεμοποίηση ως συνέπεια της απόσπασης πρωτονίου από οπτικά ενεργό άτομο άνθρακα.

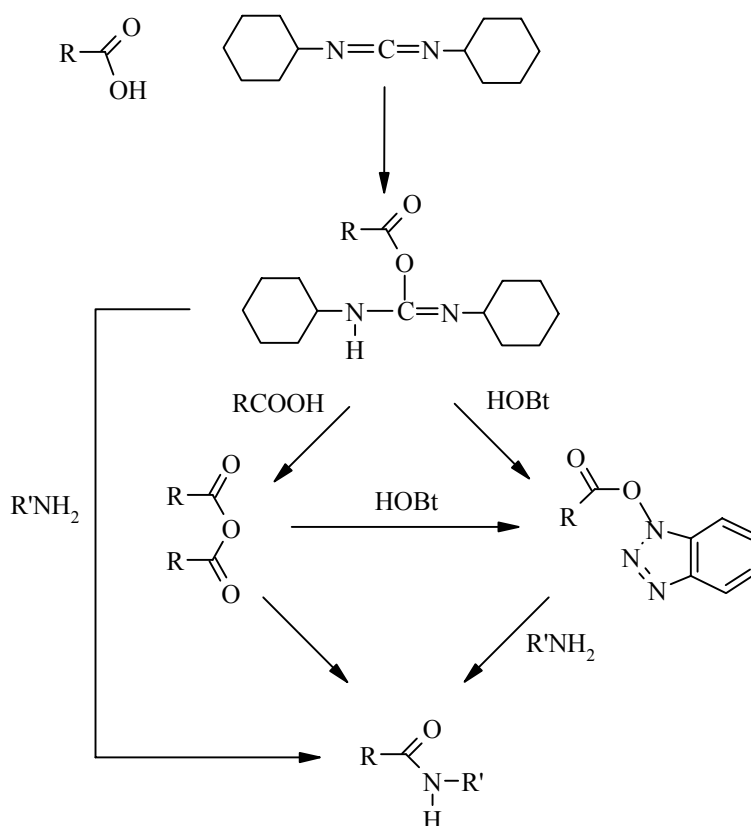


Σχήμα 3.8 N-ακυλο μετάθεση και σχηματισμός N-ακυλο-ισοουρίας.

Το πρώτο αντιδραστήριο αυτής της κατηγορίας ήταν το N-υδροξυηλεκτριμίδιο⁹³ (I), ωστόσο το πλέον διαδεδομένο σήμερα είναι το 1-υδροξυβενζοτριάζολιο (HOBT)^{94,95} (II).

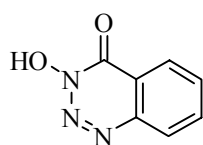


Το ενεργό ενδιάμεσο, O-ακυλοϊσοουρία, παρουσία του HOBT μετατρέπεται στο O-ακυλο-1-υδροξυβενζοτριάζολιο (σχήμα 3.9), το οποίο είναι λιγότερο δραστικό. Με αυτό τον τρόπο μειώνεται η συγκέντρωση καθώς και ο χρόνος ζωής του αρχικού ενδιαμέσου και επομένως το ποσοστό της ρακεμοποίησης και της O→N ακυλομετάθεσης. Επιπλέον το HOBT, ως ασθενές οξύ, εμποδίζει την απόσπαση πρωτονίου από τον οπτικά ενεργό άνθρακα, δηλαδή συμβάλλει με ένα δεύτερο τρόπο στην μείωση της απώλειας οπτικής καθαρότητας.

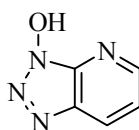


Σχήμα 3.9 Μηχανισμός αντίδρασης σύζευξης με DCC παρουσία HOBT.

Παρόμοιες ιδιότητες με αυτές του 1-υδροξυ-βενζοτριαζολίου έχουν εμφανίσει και μια σειρά άλλων αντιδραστηρίων. Η 3-υδροξυ-4-οξο-3,4-διυδρο-1,2,3-βενζοτριαζίνη (HODhbt)⁹³, (III), είναι πιο αποτελεσματική ως προς τη μείωση της ρακεμοποίησης, ωστόσο δίνει ως παραπροϊόν ένα αζίδιο το οποίο αντιδρά μη αντιστρεπτά με τις ελεύθερες αμινομάδες. Αντίθετα το 1-υδροξυ-7-αζαβενζοτριαζόλιο (HOAt)⁹⁶, (IV), σε συνδυασμό με ένα εύρος αντιδραστηρίων σύζευξης, παρέχει γρήγορες αντιδράσεις, με υψηλές αποδόσεις και μειωμένο ποσοστό ρακεμοποίησης.

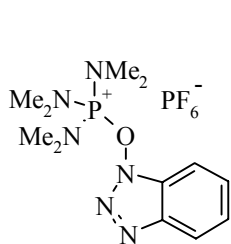


(III)

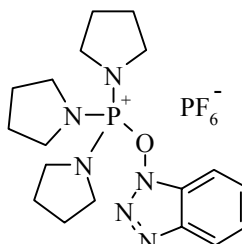


(IV)

Η χρήση του δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμιδίου στην πεπτιδική σύνθεση παραμένει διαδεδομένη μέχρι και σήμερα⁹⁷. Τα τελευταία χρόνια ωστόσο, μεγάλης αναγνώρισης τυγχάνουν τα φωσφορικά και ουρονικά παράγωγα. Το 1*H*-βενζοτριαζολυλο N-οξυτρι(διμεθυλαμινο) φωσφορικό εξαφθοροφωσφορικό άλας (BOP)^{98,99}, (V), αποτελεί το πρώτο σπουδαίο αντιδραστήριο της κατηγορίας, ενώ μία βελτιωμένη έκδοση του είναι το 1*H*-βενζοτριαζολυλο N-οξυτρι(πυρρολιδινο) φωσφορικό εξαφθοροφωσφορικό άλας (PyBOP)^{100,101}, (VI).



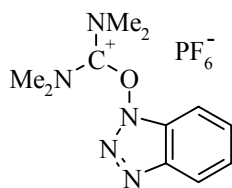
(V)



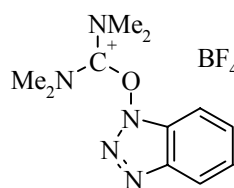
(VI)

Από την κατηγορία των ουρονικών παραγώγων, ξεχωρίζει το O-βενζοτριαζολυλο-τετραμεθυλο-ισουρονικό εξαφθοροφωσφορικό παράγωγο της ουρίας (HBTU)^{102,103}, (VII), το οποίο διακρίνεται για το χαμηλό βαθμό ρακεμοποίησης. Ένα

άλλο αρκετά δημοφιλές αντιδραστήριο σήμερα, είναι το Ο-βενζοτριαζολυλο-τετραμεθυλο-ισουρονικό τετραβοροφωσφορικό άλας (TBTU)¹⁰⁴, (VIII).



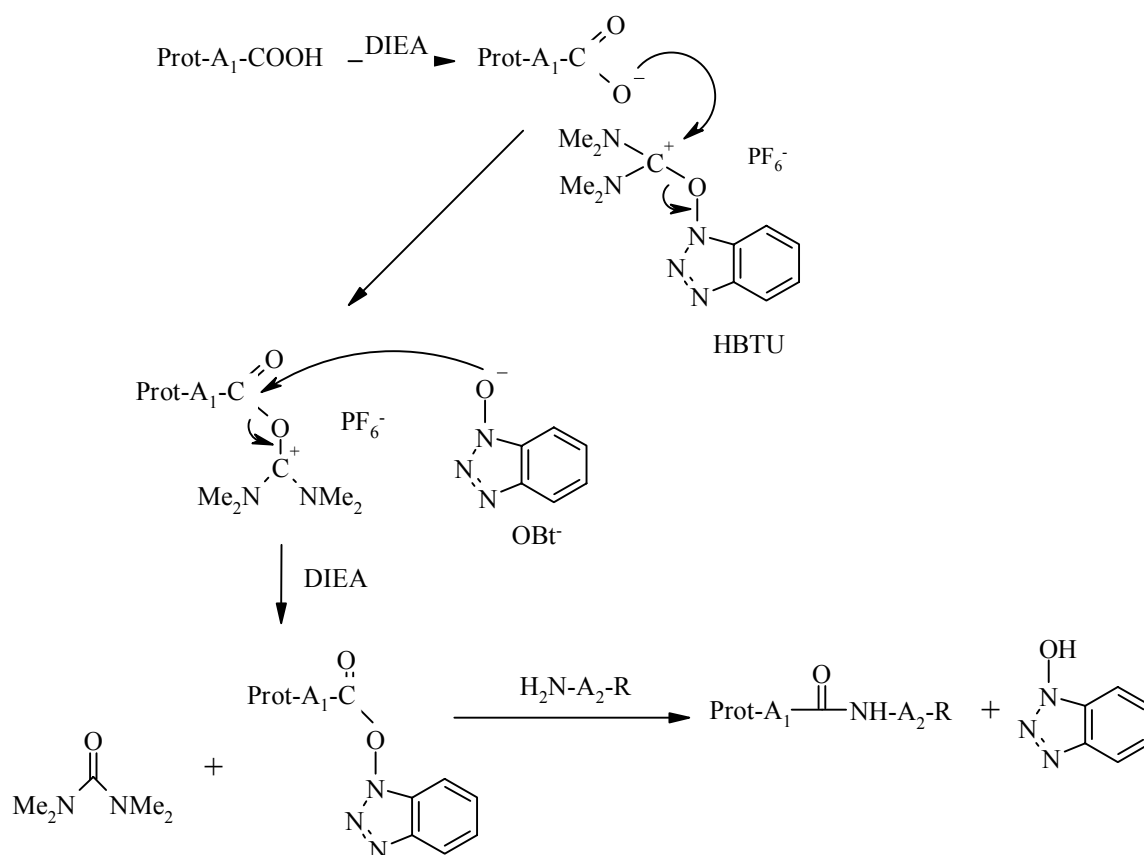
(VII)



(VIII)

Οι πορείες που ακολουθούν τα παραπάνω αντιδραστήρια σε μία αντίδραση σύζευξης, είναι σχεδόν παρόμοιες ως προς το μηχανισμό (σχήμα 3.10). Τα φωσφορικά παράγωγα δεν αντιδρούν με τις α-αμινομάδες των αμινοξέων και έτσι προστίθενται απευθείαν στο μίγμα με το καρβόξυλο- και αμινο-συστατικό. Απαραίτητη είναι η παρουσία μιας τριτοταγούς βάσης, η οποία συνήθως είναι η δισοπροπυλο-αιθυλαμίνη (DIEA ή DIPEA), για την απόσπαση πρωτονίου και τον ιονισμό του καρβοξυλίου. Το παραγώμενο ενδιάμεσο είναι πολυ δραστικό και προσβάλλεται από το οξυανιόν του 1-υδροξυβενζοτριαζολίου, σχηματίζοντας ένα βενζοτριαζολυλο εστέρα, ο οποίος υφίσταται αμινόλυση προς το επιθυμητό προϊόν. Στην περίπτωση των ουρονικών παραγώγων η σημαντική διαφορά έγκειται στο ότι αντιδρούν μη αντιστρεπτά με την αμινομάδα του αμινο-συστατικού¹⁰⁵. Ως εκ τούτου το καρβοξύλιο του αμινοξέως που πρόκειται να συζευχθεί, ενεργοποιείται με το ουρονικό παράγωγο, πριν προστεθεί στο μίγμα με το αμινοξύ που διαθέτει την ελεύθερη αμινομάδα.

Τα φωσφορικά και ουρονικά άλατα προτιμούνται σήμερα στην πεπτιδική σύνθεση, έναντι του δικυκλοεξυλο-καρβοδιιμιδίου, στις περισσότερες των περιπτώσεων. Ιδιαίτερα, όταν πρόκειται για σύζευξη αμινοξέων με υψηλή στεreoχημική παρεμπόδιση λόγω μεγάλων πλευρικών αλυσίδων¹⁰⁶⁻¹⁰⁹, ή κατα τη σύνθεση με τη βοήθεια αυτόματων μηχανημάτων (synthesizers) όπου μειώνουν σε μεγάλο βαθμό την χρονική διάρκεια των συζεύξεων.



Σχήμα 3.10 Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού παρουσία HBTU και HOBT.

3.2.4 Απόσπαση του πεπτιδίου από τη ρητίνη

Το τελικό βήμα, μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης της πεπτιδικής αλληλουχίας, είναι η απόσπαση του πεπτιδίου από την ρητίνη. Θεωρείται ως το σημαντικότερο σημείο της πορείας, καθώς θα πρέπει να επιλεγθούν συνθήκες αρκετά δραστικές για την απόσπαση, αλλά και ήπιες παράλληλα, για την διατήρηση των δομικών στοιχείων του πεπτιδίου^{110,111}.

Κατά την σύνθεση πεπτιδίων με χρήση της Boc αμινοπροστατευτικής ομάδας (βλ. παράγραφο 3.2.2), τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την αποκοπή του πεπτιδίου από το στερεό υπόστρωμα, είναι το άνυδρο υδροφθορικό οξύ¹¹² (HF) και το TFMSA¹¹³. Εκτός από την απόσπαση από την ρητίνη, απομακρύνονται και οι προστατευτικές ομάδες των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων, οι οποίες έχουν

διατηρηθεί κατά την σύνθεση. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε ειδική συσκευή¹¹¹, καθώς είναι ιδιαίτερα τοξική, ενώ το άνυδρο υδροφθορικό οξύ διαβρώνει και το γυαλί. Ο σχηματισμός ηλεκτρόφιλων αλκυλιωτικών ενδιάμεσων από την απομάκρυνση των ημιμόνιμων προστασιών, κάνει αναγκαία την παρουσία ειδικών αντιδραστηρίων που δεσμεύουν καρβοκατιόντα (scavengers), όπως η ανισόλη. Έτσι αποφεύγονται παράπλευρες αντιδράσεις σε πυρηνόφιλα κέντρα των αμινοξέων της πεπτιδικής αλυσίδας.

Στην περίπτωση που η σύνθεση πραγματοποιείται με την Fmoc-στρατηγική, η απόσπαση του πεπτιδίου από τη ρητίνη είναι εφικτή με το λιγότερο ισχυρό τριφθοροξικό οξύ¹¹⁴ (TFA). Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε ηπιότερες συνθήκες και χωρίς την χρήση ειδικής συσκευής, ωστόσο και σε αυτή την περίπτωση είναι απαραίτητη η παρουσία πυρηνόφιλων για την απομάκρυνση των σχηματιζόμενων καρβοκατιόντων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ NMR ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ

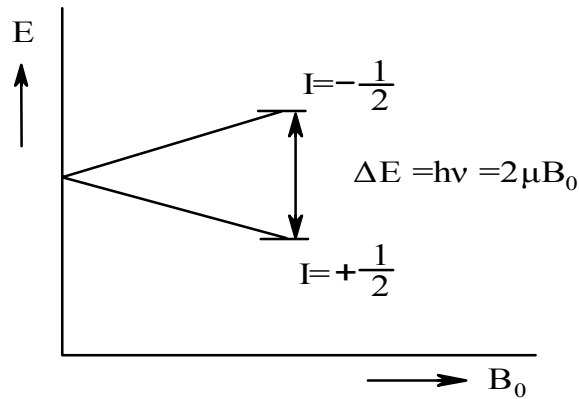
4. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ NMR ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ

Η βασική αρχή της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR), είναι η ανίχνευση της αλληλεπίδρασης ραδιοκυμάτων με πυρήνες σε ισχυρό μαγνητικό πεδίο. Η μαθηματική επεξεργασία αυτής της αλληλεπίδρασης, αποτελεί ένα από τα σπουδαιότερα εργαλεία στη μελέτη της μοριακής δομής.

Τα πεπτίδια είναι ιδιαίτερα σημαντικά μόρια στις διάφορες λειτουργίες των ζωντανών οργανισμών και η δράση τους εξαρτάται άμεσα από την διαμόρφωση τους. Οι πληροφορίες που προσφέρει η φασματοσκοπία NMR για την δομή ενός πεπτιδίου, είναι ένα από τα βασικά μέσα που διαθέτει ο πεπτιδοχημικός για την κατανόηση του μηχανισμού δράσης του. Είναι γεγονός ότι ένα πεπτίδιο σε διάλυμα μπορεί να λάβει ένα σύνολο διαμορφώσεων, ανάλογα και με την πρωτοταγή δομή του, οι οποίες βρίσκονται σε ισορροπία μεταξύ τους^{115,116}. Επίσης σημαντικό ρόλο στην έκφραση αυτής της ισορροπίας έχουν διάφοροι παράγοντες όπως ο διαλύτης, η θερμοκρασία, το ιξώδες και το pH του διαλύματος. Ωστόσο, η φασματοσκοπία NMR θεωρείται αρκετά ευαίσθητη μέθοδος, είτε για την εξαγωγή μίας μέσης δομής, είτε ακόμα και για την ανίχνευση διαφορετικών διαμορφώσεων σε ισορροπία σε μερικές περιπτώσεις. Ιδιαίτερα με την ανάπτυξη της πολυδιάστατης και πολυπαλμικής φασματοσκοπίας και ενός μεγάλου αριθμού διαφορετικών πειραματικών τεχνικών, είναι εφικτό σήμερα να γίνει πλήρης προσδιορισμός της πρωτοταγούς, δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής ενός πεπτιδίου και να συντελέσει τα μέγιστα στη μελέτη της σχέσης διαμόρφωση-βιολογική δράση.

4.1 Το παλμικό πείραμα μίας διάστασης του πρωτονιακού NMR (1D ¹H-NMR)

Τα πρωτόνια, όπως και τα ηλεκτρόνια, έχουν την ιδιότητα της αυτοστροφής και σπινκβαντικό αριθμό $I=1/2$. Όταν ο πυρήνας υδρογόνου βρεθεί σε εξωτερικό μαγνητικό πεδίο έντασης B_0 , η μαγνητική του ροπή προσανατολίζεται είτε παράλληλα (κατάσταση χαμηλής ενέργειας), είτε αντιπαράλληλα (κατάσταση υψηλής ενέργειας) προς αυτό¹¹⁷. Το αποτέλεσμα της απορρόφησης ενός κβάντου ενέργειας ($h\nu$) από το πρωτόνιο, είναι η μετάπτωση του από τη μία κατάσταση ενέργειας στην άλλη (Σχήμα 4.1). Η συχνότητα του κβάντου ενέργειας (ν), εξαρτάται από το



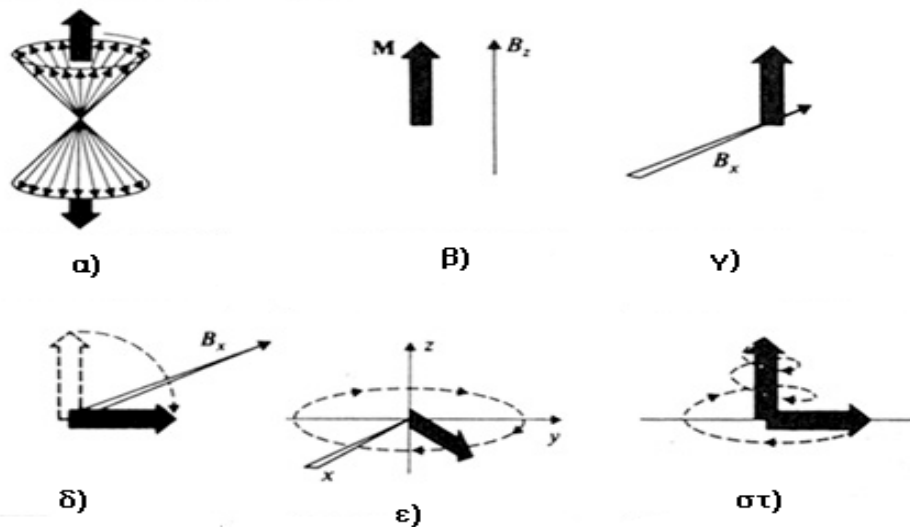
Σχήμα 4.1 Οι ενεργειακές στάθμες του πυρήνα ($I=\pm 1/2$) σε μαγνητικό πεδίο.

γυρομαγνητικό λόγο (γ) του πρωτονίου και το πεδίο B_0 ($\nu=\gamma B_0$) και ως εκ τούτου η ενέργεια που χρειάζεται να απορροφήσει το πρωτόνιο προκειμένου να μεταβεί από τη μία ενεργειακή κατάσταση στην άλλη, είναι $\Delta E=h\gamma B_0$.

Όταν μία ομάδα από πυρήνες βρεθεί σε εξωτερικό μαγνητικό πεδίο, η στατιστική κατανομή των spin στις δύο ενεργειακές καταστάσεις ορίζεται από το νόμο του Boltzmann $N^\beta/N^\alpha=\exp(\Delta E/KT)$, όπου N^α και N^β οι πληθυσμοί των spin στην κατάσταση χαμηλής και υψηλής ενέργειας αντίστοιχα, ΔE η ενεργειακή διαφορά μεταξύ των δύο, K η σταθερά του Boltzmann και T η θερμοκρασία. Το σήμα που ανιχνεύεται στη φασματοσκοπία NMR είναι το αποτέλεσμα της μετάβασης των spin από τη μία κατάσταση στην άλλη και οφείλεται στην διαφορά των πληθυσμών μεταξύ τους.

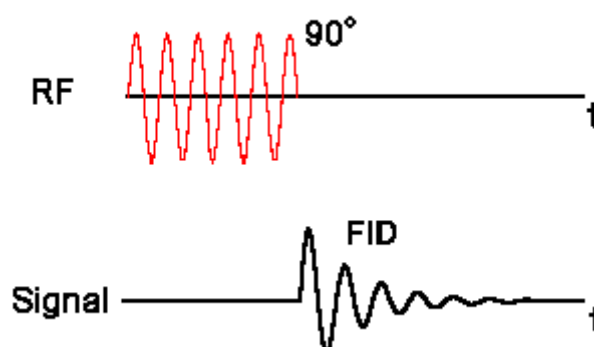
Η συνισταμένη μαγνητική ροπή (μαγνήτιση M_0) των επιμέρους ρομών των spin των πυρήνων, υπό την επίδραση του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου B_0 , κείται στον άξονα z, ενός συστήματος καρτεσιανών συντεταγμένων, με μέγεθος ανάλογο της τιμής $(N^\alpha-N^\beta)$. Αν σε αυτό το σύστημα επιδράσει ένας παλμός (της τάξης των μsec) από ένα ταλαντευόμενο μαγνητικό πεδίο B_1 κάθετο στο B_0 , η μαγνήτιση M αλλάζει διεύθυνση, ανάλογα με την ένταση, τη φορά, και το χρόνο εφαρμογής του B_1 . Ο παλμός που θα αναγκάσει την M να αποκλίνει κατά 90° από τον άξονα z, καλείται παλμός 90° . Μετά την εφαρμογή του, η μαγνήτιση περιστρέφεται στο επίπεδο xy, με συχνότητα ίση με εκείνη που απαιτείται για την μετάβαση των spin μεταξύ των δύο ενεργειακών καταστάσεων (συχνότητα Larmor) (Σχήμα 4.2).

Στο σημείο αυτό λαμβάνουν χώρα οι μηχανισμοί αποδιέγερσης, δηλαδή η επιστροφή του διανύσματος M στην κατάσταση ισορροπίας. Η αποδιέγερση



Σχήμα 4.2 (α) Μεταπτωτική τροχιά πυρήνων, (β) Το άνυσμα της συνολικής πυρηνικής μαγνήτισης M , (γ) Εφαρμογή παλμού 90° στον άξονα x , (δ) Η μετάπτωση της μαγνήτισης M στον άξονα y μετά την εφαρμογή του παλμού, (ε) Η μεταπτωτική κίνηση της μαγνήτισης M στο επίπεδο xy (στ) Η συνολική σπειροειδής μεταπτωτική κίνηση της μαγνήτισης M προς τον άξονα z .

συμβαίνει με δύο παράλληλες διαδικασίες, την εκθετική αύξηση της συνιστώσας z της M (M_z) και την μείωση της συνιστώσας xy (M_{xy}), έως ότου πάρουν τις αρχικές τιμές $M_z=M_0$ και $M_{xy}=0$ (κατάσταση ισορροπίας). Η αποδιέγερση κατά τον άξονα z ή spin-πλέγμα αποδιέγερση, περιγράφεται από τη χρονική σταθερά T_1 , ενώ η αντίστοιχη στο επίπεδο xy ή spin-spin αποδιέγερση, από τη χρονική σταθερά T_2 . Εώς ότου επανέλθει το σύστημα στην κατάσταση ισορροπίας η περιστροφή της M στο επίπεδο xy , δημιουργεί ένα μεταβαλλόμενο μαγνητικό πεδίο το οποίο με τη σειρά του, επάγει ηλεκτρικό πεδίο σε ένα πηνίο (ανιχνευτή) που βρίσκεται στον άξονα x ή y . Το ηλεκτρικό σήμα που ανιχνεύεται, φθίνει σε συνάρτηση με το χρόνο, λόγω της φθοράς του M_{xy} και αποτελεί το σήμα ελεύθερης επαγωγικής φθοράς (Free Induction Decay, FID) (Σχήμα 4.3). Για τη βελτίωση του λόγου του καταγραφόμενου σήματος προς το θόρυβο, το πείραμα με την εφαρμογή του παλμού επαναλαμβάνεται αρκετές φορές και οι FID που καταγράφονται προστίθενται. Η τελική εικόνα ενός φάσματος NMR προκύπτει με μετασχηματισμό Fourier του χρονοεξαρτώμενου σήματος σε συνάρτηση της συχνότητας ν .



Σχήμα 4.3 Η εφαρμογή ενός παλμού 90° και η παραγωγή της ελεύθερης επαγωγικής φθοράς (FID), η οποία και καταγράφεται συναρτήσει του χρόνου.

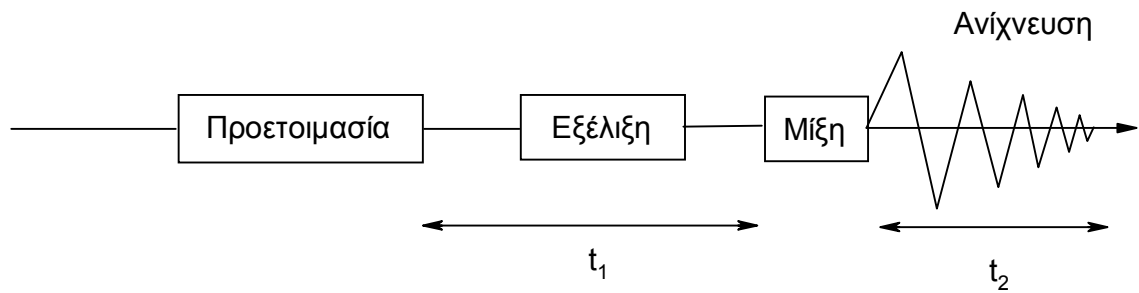
Βάση του διαφορετικού χημικού περιβάλλοντος του κάθε πυρήνα υδρογόνου σε ένα μόριο, αναμένεται και διαφορετική συχνότητα περιστροφής στο επίπεδο xy . Σε αυτό το γεγονός οφείλεται και η διαφοροποίηση των συχνοτήτων συντονισμού που παρατηρούνται σε ένα NMR φάσμα, μεταξύ όμοιων πυρήνων. Στην κλίμακα των συχνοτήτων ορίζεται η τιμή μηδέν για μία ένωση αναφοράς και βάση αυτής, ορίζεται η συχνότητα συντονισμού δ (χημική μετατόπιση) του κάθε πρωτονίου από τη σχέση:

$$\delta = \left[\frac{\nu_{\text{δείγματος}} - \nu_{\text{αναφοράς}}}{\nu_{\text{αναφοράς}}} \right] \times 10^6 \text{ ppm}$$

4.2 Φασματοσκοπία NMR δύο διαστάσεων (2D NMR)

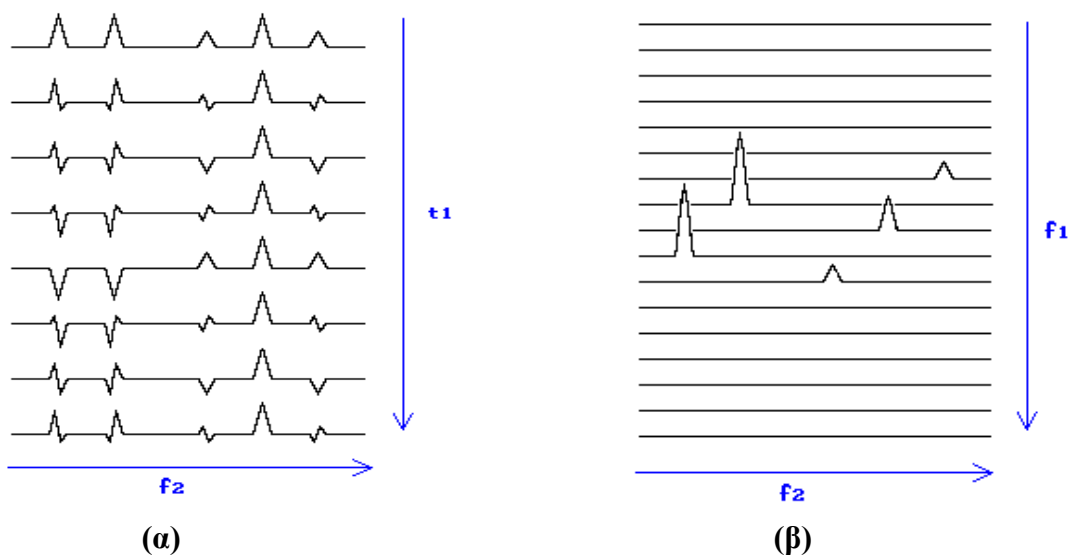
Με την εξέλιξη της οργανολογίας και των πειραματικών μεθόδων στη φασματοσκοπία NMR, αναπτύχθηκε η πολυπαλμική και πολυδιάστατη φασματοσκοπία. Σε ένα πείραμα NMR δύο διαστάσεων, οι FID καταγράφονται ως συνάρτηση δύο χρονικών μεταβλητών, t_1 και t_2 (Σχήμα 4.4). Εν συνεχεία λαμβάνει χώρα διπλός μετασχηματισμός Fourier, με αποτέλεσμα το τελικό φάσμα να καταγράφεται συναρτήσει δύο συχνοτήτων¹¹⁸.

Η περίοδος της προετοιμασίας αντιστοιχεί στην διέγερση των πυρήνων με κάποια παλμική ακολουθία. Εν συνεχεία στην περίοδο της εξέλιξης για χρόνο t_1 , λαμβάνει χώρα αλληλεπίδραση των πυρήνων. Στην περίοδο μίξης εφαρμόζεται μία νέα παλμική ακολουθία και τέλος καταγράφεται η FID, συναρτήσει του



Σχήμα 4.4 Γενική ακολουθία για ένα πείραμα 2D NMR

χρόνου t_2 . Ο πρώτος μετασχηματισμός Fourier εφαρμόζεται στο σήμα που καταγράφηκε για το χρόνο t_2 (Σχήμα 4.5α) και δίνει πληροφορίες για την χημική μετατόπιση των πρωτονίων (άξονας f_2). Εν συνεχεία με τον δεύτερο μετασχηματισμό για το χρόνο t_1 (Σχήμα 4.5β), λαμβάνονται πληροφορίες για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτονίων (άξονας f_1), δηλαδή το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης γειτονικών τοπικών μαγνητικών πεδίων, που δημιουργούνται από μη ισοδύναμα πρωτόνια.



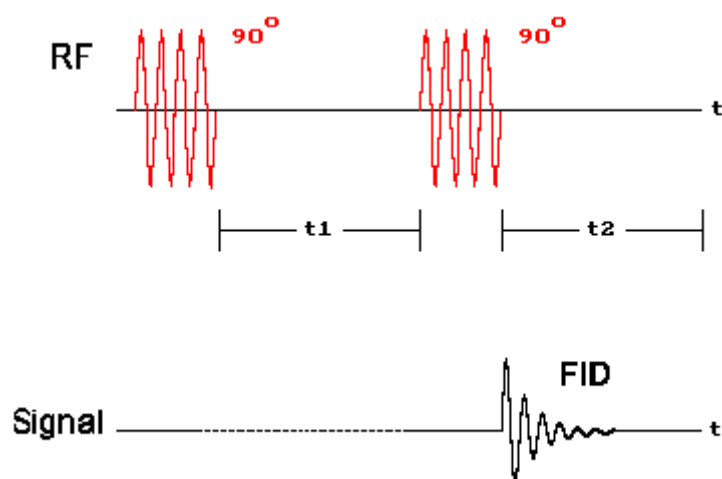
Σχήμα 4.5 Μετατροπή της συνάρτησης του χρόνου t_2 σε συχνότητα f_2 (α) και του t_1 σε f_1 (β) αντίστοιχα, με μετασχηματισμό Fourier.

Η παλμική ακολουθία που εφαρμόζεται, εξαρτάται από τον τύπο του πειράματος και καθορίζει τον μηχανισμό μεταφοράς της μαγνήτισης μεταξύ των πυρήνων (μίξη). Οι πιο σημαντικές και συνηθισμένες είναι για τα πειράματα συσχέτισης (COSY, TOCSY, κ.α) και αυτά που βασίζονται στο φαινόμενο Overhauser (NOESY, ROESY).

Χαρακτηριστικά ενός φάσματος δύο διαστάσεων αποτελούν, η διαγώνιος και τα σημεία διασταύρωσης. Η πρώτη αντιστοιχεί στο φάσμα μίας διάστασης, δηλαδή το σήμα που παράγει η μαγνήτιση ενός πυρήνα, χωρίς να λάβει χώρα μεταφορά της σε ένα άλλο πυρήνα. Τα σημεία διασταύρωσης αντίθετα οφείλονται σε μεταφορά μαγνήτισης μεταξύ των πυρήνων που συντονίζονται στις συχνότητες-συντεταγμένες της κορυφής διασταύρωσης.

4.2.1 Ομοπυρηνική φασματοσκοπία συσχέτισης (COSY)

Το πείραμα COSY¹¹⁸ αποτέλεσε μία από τις πρώτες εφαρμογές της δισδιάστατης φασματοσκοπίας NMR, και στηρίζεται στην εφαρμογή δύο παλμών 90° (Σχήμα 4.6). Η αρχή λειτουργίας του είναι, η μεταφορά της μαγνήτισης μετά την εφαρμογή του πρώτου παλμού, από ένα spin προς αυτά που συζεύγνεται, δηλαδή τα γειτονικά του πρωτόνια (coherence transfer).



Σχήμα 4.6 Η παλμική ακολουθία του COSY πειράματος.

Η μορφή ενός COSY φάσματος αποτελείται από τα σημεία στην διαγώνιο, χαρακτηριστικά για κάθε πυρήνα χωρίς να λαμβάνεται υπόψη η αλληλεπίδρασή του με άλλους γειτονικούς, καθώς και τα σημεία διασταύρωσης που αντιστοιχούν στην σύζευξη μεταξύ των πυρήνων.

4.2.2 Ομοπυρηνική φασματοσκοπία ολικής συσχέτισης (TOCSY)

Το TOCSY^{119,120} πείραμα είναι σε μερικώς όμοιο με το COSY που περιγράφηκε παραπάνω. Η διαφορά τους έγκειται στην περίοδο μίξης όπου, στο TOCSY εφαρμόζεται μία σύνθετη παλμική ακολουθία, γνωστή ως ιστροπική ακολουθία μίξης (spin lock), σε αντίθεση με τον απλό παλμό 90° του COSY. Η βασική αρχή του spin lock είναι ένας συνεχής, χαμηλής ισχύος παλμός, σταθερής φάσης, ο οποίος εφαρμόζεται για μία περίοδο μερικών δεκάδων χιλιοστών του δευτερολέπτου. Ως αποτέλεσμα αυτού, οι συζεύξεις μεταξύ των γειτονικών spin διατηρούνται ενεργές, σε μία φάση, ενώ παράλληλα λαμβάνει χώρα μεταφορά της μαγνήτισης μεταξύ τους. Επομένως στο TOCSY, παρατηρείται σύζευξη πρωτονίων που απέχουν περισσότερο από τρεις δεσμούς, σε αντίθεση με το COSY, με την προϋπόθεση, να υπάρχει έμμεση σύζευξη μεταξύ τους. Για παράδειγμα στο σύστημα $-C^1H_2-C^2H_2-C^3H_2-$, στο TOCSY φάσμα θα παρατηρηθούν σημεία διασταύρωσης ανάμεσα στα πρωτόνια του C^1 και του C^3 καθώς η πληροφορία μεταφέρεται μέσω των πρωτονίων του C^2 . Η μορφή του φάσματος είναι ίδια με αυτές που έχουν περιγραφεί, με την διαφορά της εμφάνισης περισσότερων σημείων διασταύρωσης, ανάλογα με τον αριθμό των συζεύξεων.

Το πείραμα TOCSY βρίσκει ιδιαίτερη εφαρμογή στην ανάλυση πεπτιδίων. Το γεγονός ότι η πληροφορία δεν μεταφέρεται μεταξύ πρωτονίων διαφορετικών αμινοξέων λόγω παρουσίας του πεπτιδικού δεσμού, συμβάλλει σημαντικά στην ταυτοποίηση των spin συστημάτων των διαφορετικών αμινοξέων τα οποία στο 1D φάσμα αλληλεπικαλύπτονται.

4.2.3 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Φαινομένου OVERHAUSER (NOESY)

Το πείραμα NOESY^{121,122} βασίζεται σε διαφορετικού τύπου μαγνητική αλληλεπίδραση μεταξύ των πυρήνων, η οποία συμβαίνει μέσω χώρου και οφείλεται στο πυρηνικό φαινόμενο Overhauser (NOE). Η βασική αρχή του NOE είναι η αλλαγή

της έντασης της απορρόφησης ενός πυρήνα, όταν ένας γειτονικός του στο χώρο ακτινοβολείται με συχνότητα ικανή, να διαταράξει την ισορροπία των πληθυσμών των spin στις ενεργειακές του καταστάσεις. Αυτή η αλλαγή της έντασης αποτυπώνεται σε ένα NOESY φάσμα και είναι ανάλογη της απόστασης μεταξύ των αλληλεπιδρώντων πυρήνων. Η απόσταση που πρέπει να βρίσκονται οι τελευταίοι ώστε να παρουσιάσουν NOE αλληλεπίδραση είναι μέχρι 5Å. Το πείραμα NOESY αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα στάδια στην ανάλυση ενός πεπτιδίου με φασματοσκοπία NMR και είναι αυτό που θα δώσει τις πληροφορίες για την γεωμετρία της τρισδιάστατης δομής.

4.3 Διαμορφωτική ανάλυση πεπτιδίων με φασματοσκοπία NMR

Η δομή ενός πεπτιδίου σε διάλυμα αποτελεί ένα δύσκολο πρόβλημα για τους πεπτιδοχημικούς, καθώς λόγω του μικρού μεγέθους του, είναι εύκαμπτο μόριο και αρκετές φορές με ακανόνιστη διαμόρφωση. Η χρήση της φασματοσκοπίας NMR έχει συμβάλλει σε μεγάλο βαθμό στον προσδιορισμό της πρωτοταγούς και δευτεροταγούς δομής πεπτιδίων και για το σκοπό αυτό έχουν αναπτυχθεί πολυάριθμες τεχνικές.

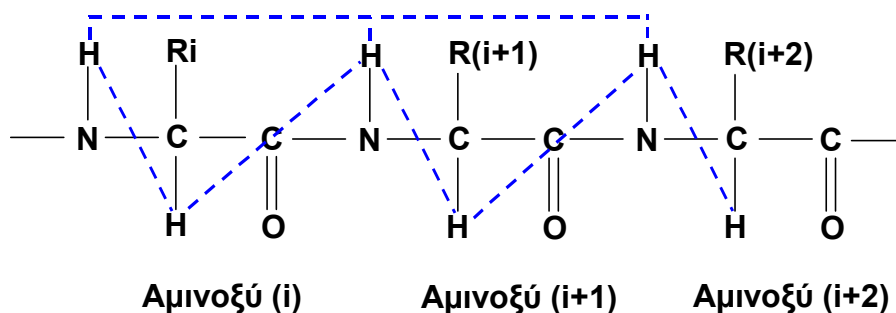
Στη διαμορφωτική ανάλυση πεπτιδίων με NMR, προσδιορίζεται αρχικά η αμινοξική αλληλουχία (πρωτοταγής δομή), (sequential assignment). Η πορεία αυτή περιλαμβάνει αρχικά τον προσδιορισμό κάθε ξεχωριστού spin συστήματος, δηλαδή των αμινοξέων που αποτελούν το πεπτίδιο. Αυτό συμβαίνει με χρήση των πειραμάτων COSY^{123,124} και TOCSY^{119,120}. Στη συνέχεια γίνεται ο προσδιορισμός της αλληλουχίας με συνδυασμό των παραπάνω και του NOESY^{121,122,125} ή ROESY¹²⁶ φάσματος. Με δεδομένο ότι τα NOE σήματα που παρατηρούνται (Σχήμα 4.7), όπως μεταξύ αμιδικών και αλειφατικών πρωτονίων, αντιστοιχούν σε μικρές αποστάσεις, προσδιορίζονται τα αμινοξέα που είναι γειτονικά στην αλληλουχία.

Μετά τον προσδιορισμό της πρωτοταγούς δομής και την ταυτοποίηση όλων των πρωτονίων του μορίου, ακολουθεί η ανάλυση της διαμόρφωσης. Για το σκοπό αυτό εξετάζονται μια σειρά από παραμέτρους:

- Η επίδραση του pH. Δραστικές ομάδες όπως ελεύθερες αμινομάδες και καρβοξύλια, έχουν διαφορετική συμπεριφορά σε διαφορετικά pH.
- Η επίδραση της θερμοκρασίας. Εξαιρετικά σημαντικά είναι τα πειράματα 1D σε διαφορετικές θερμοκρασίες καθώς, υπολογίζονται οι συντελεστές θερμοκρασίας

των αμιδικών πρωτονίων¹¹⁵. Αυτό γίνεται βάση της σχέσης $\Delta\delta/\Delta T$ (ppb/K), με $\Delta\delta$ την διαφορά στην χημική μετατόπιση στις δύο θερμοκρασίες και ΔT τη διαφορά θερμοκρασίας. Σε διάλυμα DMSO απόλυτες τιμές μικρότερες από 3 ppb/K, υποδηλώνουν είτε τη συμμετοχή του αμιδικού πρωτονίου σε ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου, είτε ότι λόγω διαμόρφωσης παρεμποδίζεται η πρόσβαση του στο διαλύτη. Αντίστοιχα, απόλυτες τιμές μεγαλύτερες από 6 ppb/K, φανερώνουν την συμμετοχή του σε διαμοριακό δεσμό υδρογόνου με μόρια διαλύτη, ενώ δεν είναι εφικτή η εξαγωγή συμπερασμάτων για τιμές μεταξύ 3 και 6 ppb/K

- Το μέγεθος των σταθερών σύζευξης $^3J_{\text{Na}}$ και $^3J_{\alpha\beta}$. Από τον προσδιορισμό των σταθερών σύζευξης¹¹⁵ ανάμεσα στα πρωτόνια $\text{NH}/\text{C}^\alpha\text{H}$ και $\text{C}^\alpha\text{H}/\text{C}^\beta\text{H}$ αντίστοιχα, υπολογίζονται με τη βοήθεια της εξίσωσης Karplus¹²⁷, οι επιτρεπτές τιμές των γωνιών ϕ και χ_1 του πεπτιδικού σκελετού και της παράπλευρης αλυσίδας.
- Η ένταση των NOE φαινομένων¹¹⁵, η οποία είναι ανάλογη της απόστασης μεταξύ των πρωτονίων. Εμπειρικά έχει βρεθεί ότι ασθενή NOE φαινόμενα αντιστοιχούν σε διαπρωτονιακές αποστάσεις 3-5 Å, ενώ ισχυρά NOE σε μικρότερες αποστάσεις, 1.8-2.5 Å. Στο σχήμα 4.7 απεικονίζονται τα NOE του τύπου $d_{\alpha\text{N}}(i,i)$, $d_{\alpha\text{N}}(i,i+1)$ και $d_{\text{NN}}(i,i+1)$, που ανιχνεύονται σε ένα NOESY φάσμα. Υπάρχουν μία σειρά από δεδομένα^{115,128} ως προς την ένταση των NOE, τα οποία χαρακτηρίζουν διάφορες γνωστές δομές, όπως α-έλικα, β-στροφή κ.λ.π. Μία ελικοειδής διαμόρφωση για παράδειγμα, διακρίνεται από μέσης έντασης κυρίως NOE φαινόμενα του τύπου, $d_{\alpha\text{N}}$ και $d_{\text{NN}}(i, i+2)$, $d_{\alpha\text{N}}(i,i+3)$. Στον πίνακα 4.1 δίδονται τα γενικά NMR χαρακτηριστικά που αναμένονται για διάφορους τύπους κανονικών δευτεροταγών διαμορφώσεων των πεπτιδίων.



Σχήμα 4.7 NOE φαινόμενα του τύπου $d_{\alpha\text{N}}(i,i)$, $d_{\alpha\text{N}}(i,i+1)$ και $d_{\text{NN}}(i,i+1)$ που μπορούν να ανιχνευθούν σε ένα NOESY φάσμα ενός πεπτιδίου.

Πίνακας 4.1 Χαρακτηριστικές $^1\text{H-NMR}$ παράμετροι για τις πιο κοινές δευτεροταγείς δομές πεπτιδίων.

Παράμετρος	α -έλικα	3_{10} έλικα	β -αντιπαράλληλο φύλο	β -παράλληλο φύλο	Στροφή I	Στροφή II
$d_{\alpha\text{N}}(i,i)^a$	s	s	s	s	s	s
$d_{\alpha\text{N}}(i,i+1)$	m	m	s	s	w	w
$d_{\alpha\text{N}}(i,i+2)$	w	m				
$d_{\alpha\text{N}}(i,i+3)$	m	m				
$d_{\alpha\text{N}}(i,i+4)$	w	w				
$d_{\alpha\text{N}}(i+1, i+2)$					m	m
$d_{\alpha\text{N}}(i+1, i+3)$					w	w
$d_{\text{NN}}(i,i+1)$	s	s	w	w		
$d_{\text{NN}}(i,i+2)$	w	w				
$d_{\text{NN}}(i+1, i+2)$					s	w
$d_{\text{NN}}(i+2, i+3)$					s	s
$d_{\beta\text{N}}(i,i+1)$	s-m	s-w	m-w	m-w		
$d_{\alpha\beta}(i,i+3)$	s-w	m-w				
$d_{\alpha\alpha}(i,j)$			s	w		
$d_{\text{NN}}(i,j)$			s	w		
$^3J_{\text{N}\alpha}$	<5	<5	>9	>9		
$^3J_{\text{N}\alpha}(i, i+1)$					<5	<5
$^3J_{\text{N}\alpha}(i, i+2)$					9	<5

Με έντονη γραφή αναφέρονται τα χαρακτηριστικά για κάθε δομή NOEs.

s: Ισχυρής έντασης NOE.

m: Μέτριας έντασης NOE.

w: Ασθενούς έντασης NOE.

a: Για τις β -στροφές I και II, ως i ορίζεται το πρώτο αμινοξύ της στροφής.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΝΘΕΣΗ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ

5. ΣΥΝΘΕΣΗ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ

5.1 Αντιδραστήρια

Η σύνθεση των πεπτιδίων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις αρχές της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεά φάση κατά Merrifield. Ως στερεό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το 4-υδροξυμεθυλο-φαινυλακεταμιδο-μεθυλιωμένο πολυστυρόλιο (PAM ρητίνη), το οποίο έφερε το αμινοξύ Boc-Gly, με υποκατάσταση 0.79 mmol αμινοξέος/gr στερεού (Neosystem).

Ως αντιδραστήριο σύζευξης χρησιμοποιήθηκε, το βενζοτρίαζολυλο-τετραμέθυλο-ουρονικό εξαφωσφορικό άλας (HBTU) (Bachem, Neosystem Laboratoire), και ως βοηθητικό πυρηνόφιλο το 1-υδροξυ-βενζοτρίαζόλιο (HOBT) (Novabiochem). Η δισοπροπυλαιθυλαμίνη (DIEA) (Merk-Schuchard), χρησιμοποιήθηκε για την εξουδετέρωση των αλάτων του τριφθοροξικού οξέος μετά την αποπροστασία από την Boc προστατευτική ομάδα, καθώς και ως τριτοταγής βάση κατά την σύζευξη. Για την αντίδραση ακετυλίωσης χρησιμοποιήθηκε οξικός ανυδρίτης (Ac₂O) και πυριδίνη (py), ενώ τέλος η αποπροστασία των Boc και Mtt ομάδων, έγινε με τριφθοροξικό οξύ (TFA) (Merk-Schuchard) και της Fmoc ομάδας με πιπεριδίνη (Fluka).

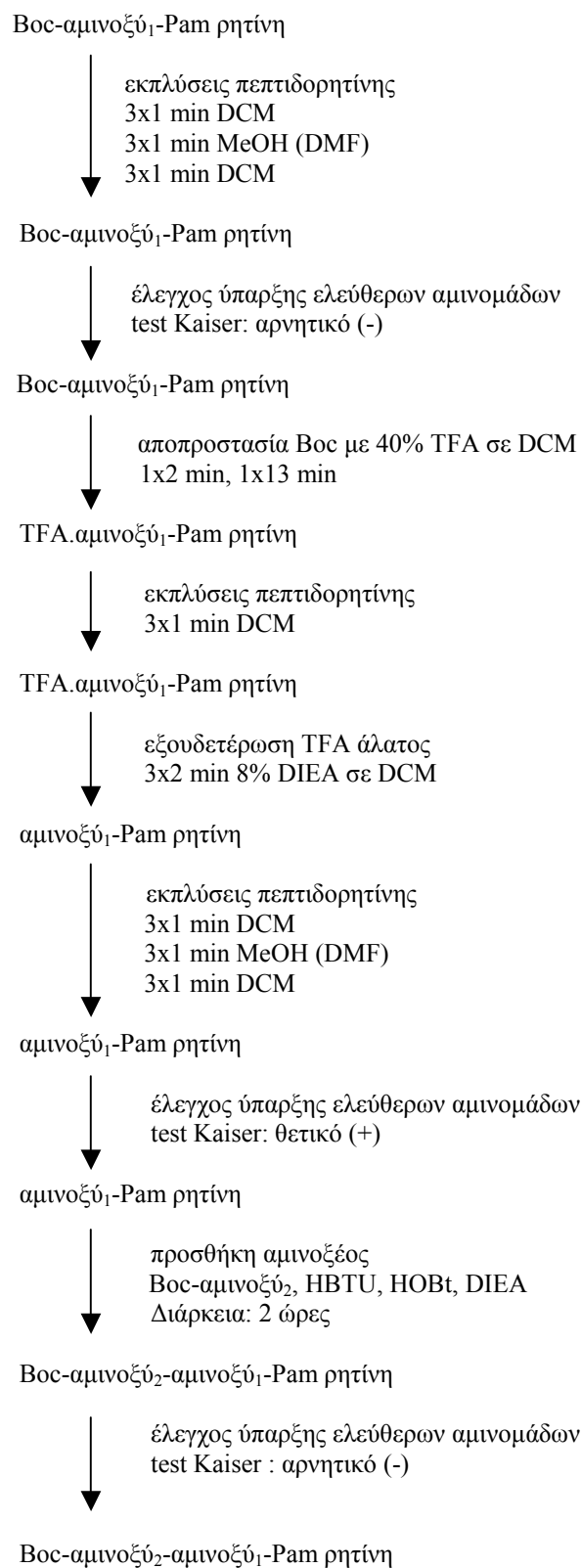
Για την ολοκλήρωση της σύνθεσης των δύο πεπτιδίων χρησιμοποιήθηκαν τα προστατευμένα αμινοξέα, Boc-Gly, Boc-Aib, Boc-Lys(Fmoc), Boc-Arg(Tosyl), Boc-Asp(OBzl), Boc-Val, Boc-Ser (Neosystem).

Η διάλυση των αντιδραστηρίων, έγινε σε μίγμα διχλωρομεθανίου (DCM) / διμεθυλοφορμαμίδιου (DMF), ενώ οι εκπλύσεις της πεπτιδορητίνης έγιναν με DCM, DMF και μεθανόλη (MeOH) (Labscan).

Τέλος, ο έλεγχος ύπαρξης ελεύθερων αμινομάδων στα βήματα αποπροστασίας και σύζευξης πραγματοποιήθηκε με το test Kaiser¹²⁹.

5.2 Μεθοδολογία σύνθεσης

Η σύνθεση των πεπτιδίων έγινε σύμφωνα με την Boc στρατηγική. Ένα γενικό σχήμα της πορείας που ακολουθήθηκε, μέχρι και την σύζευξη του δεύτερου



Σχήμα 5.1 Γενικό συνθετικό σχήμα για τα δύο πρώτα αμινοξέα.

αμινοξέος παρατίθεται στο σχήμα 5.1, ενώ ανάλογα είναι και τα επόμενα στάδια επιμήκυνσης της πεπτιδικής αλυσίδας.

Η αποπροστασία από την Boc ομάδα, της α-αμινομάδας του N-τελικού αμινοξέος, γίνεται με επίδραση διαλύματος 40% τριφθοροξικού οξέος σε διχλωρομεθάνιο. Αρχικά λαμβάνει χώρα η απομάκρυνση του μεγαλύτερου ποσοστού των καρβοκατιόντων που σχηματίζονται (1x2 min), ενώ στη συνέχεια ποσοτική απομάκρυνση της Boc ομάδας. Με επίδραση διαλύματος 8% DIEA σε DCM, γίνεται η εξουδετέρωση του άλατος τριφθοροξικού οξέος (βλ. τμήμα 2.2.2, σχήμα 2.4).

Αφού γίνει η απομάκρυνση των παραπροϊόντων με τους κατάλληλους διαλύτες, όπως φαίνεται στο σχήμα, η αποπροστασία της α-αμινομάδας διαπιστώνεται με test Kaiser¹²⁹. Το test βασίζεται στην αντίδραση της νινυδρίνης με πρωτοταγείς αμίνες, η οποία δίνει ένα μπλε χρώμα (Ruhemann's purple). Πραγματοποιείται με προσθήκη μερικών σταγόνων από τα διαλύματα α) 2ml KCN 0.001 M σε 100ml πυριδίνη, β) 5gr νινυδρίνης σε 100 ml αιθανόλης και γ) 400mg φαινόλης σε 100ml αιθανόλης, σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει μερικούς κόκκους πεπτιδορητίνης. Θέρμανση στους 100 °C για 30 sec προκαλεί χρωματισμό των κόκκων, όταν υπάρχουν ελεύθερες αμινομάδες. Αξίζει να σημειωθεί ότι μερικά αμινοξέα, όπως η γλυκίνη και η προλίνη, εμφανίζουν καφέ χρώμα, ενώ το αμινοϊσοβουτυρικό στις περισσότερες των περιπτώσεων δεν εμφανίζει χρώμα.

Το επόμενο αμινοξύ προστίθεται στην πεπτιδορητίνη, αφού πρώτα ενεργοποιηθεί με το αντιδραστήριο σύζευξης HBTU, παρουσία του βοηθητικού πυρηνόφιλου HOBt και της τριτοταγούς βάσης DIEA (βλ. τμήμα 2.2.3). Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση για δύο ώρες, και ελέγχεται στο τέλος με test Kaiser. Με ανάλογα βήματα αποπροστασίας-σύζευξης, επιμηκύνεται η πεπτιδική αλυσίδα έως ότου ολοκληρωθεί.

Το τελικό προϊόν αποσπάται από την ρητίνη όπως περιγράφηκε παραπάνω (βλ. τμήμα 2.2.4), με επίδραση 10ml άνυδρου HF για κάθε γραμμάριο πεπτιδορητίνης, παρουσία 1ml ανισόλης και 0.5gr φαινόλης ως παγίδες (scavengers). Αρχικά η πεπτιδορητίνη αναδεύεται για 20min στους -10 °C με σκοπό την αργή αποπροστασία των παράπλευρων αλυσίδων και τη δέσμευση των καρβοκατιόντων που σχηματίζονται, από τις παγίδες, ενώ στη συνέχεια λαμβάνει χώρα η ποσοτική απόσπαση του πεπτιδίου από τη ρητίνη, με ανάδευση για 1 και ½ ώρα, στους 0 °C. Μετά την απομάκρυνση του HF, ακολουθεί διήθηση με παγωμένο

αιθέρα, για την απομάκρυνση των υδρόφοβων παραπροϊόντων. Το πεπτίδιο λαμβάνεται με διάλυμα οξικού οξέος 2N με διήθηση, και λυοφιλοποίηση.

5.3 Καθαρισμός και Ταυτοποίηση των Πεπτιδίων

Για τον καθαρισμό των προϊόντων χρησιμοποιήθηκε η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης¹³⁰ (Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC). Οι βέλτιστες συνθήκες για το σύστημα των διαλυτών έκλουσης, καθορίστηκαν σε αναλυτική RP-HPLC, σε συσκευή Waters 600s, και στήλη Hypersil C₁₈, ενώ ο καθαρισμός έγινε σε ημιπαρασκευαστική RP-HPLC, Waters PrepLC 4000 System. Οι διαλύτες έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν δισαπασταγμένο νερό, μεθανόλη και ακετονιτρίλιο, φιλτραρισμένοι από ειδικούς ηθμούς (Millipore).

Η ταυτοποίηση και ο έλεγχος της καθαρότητας των προϊόντων πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία μάζας, τεχνικής ιονισμού Electronspray (ESI-MS) σε συσκευή Micromass Platform LC Quadrupole.

Η ταυτοποίηση της πρωτοταγούς δομής των πεπτιδίων έγινε με φασματοσκοπία πρωτονιακού πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (¹H-NMR). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές μονοδιάστατης ¹H-NMR φασματοσκοπίας και δύο διαστάσεων με πειράματα NOESY και TOCSY. Η λήψη των φασμάτων έγινε σε φασματόμετρο Bruker AMX 400. Τα δείγματα διαλύθηκαν σε δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO-d₆).

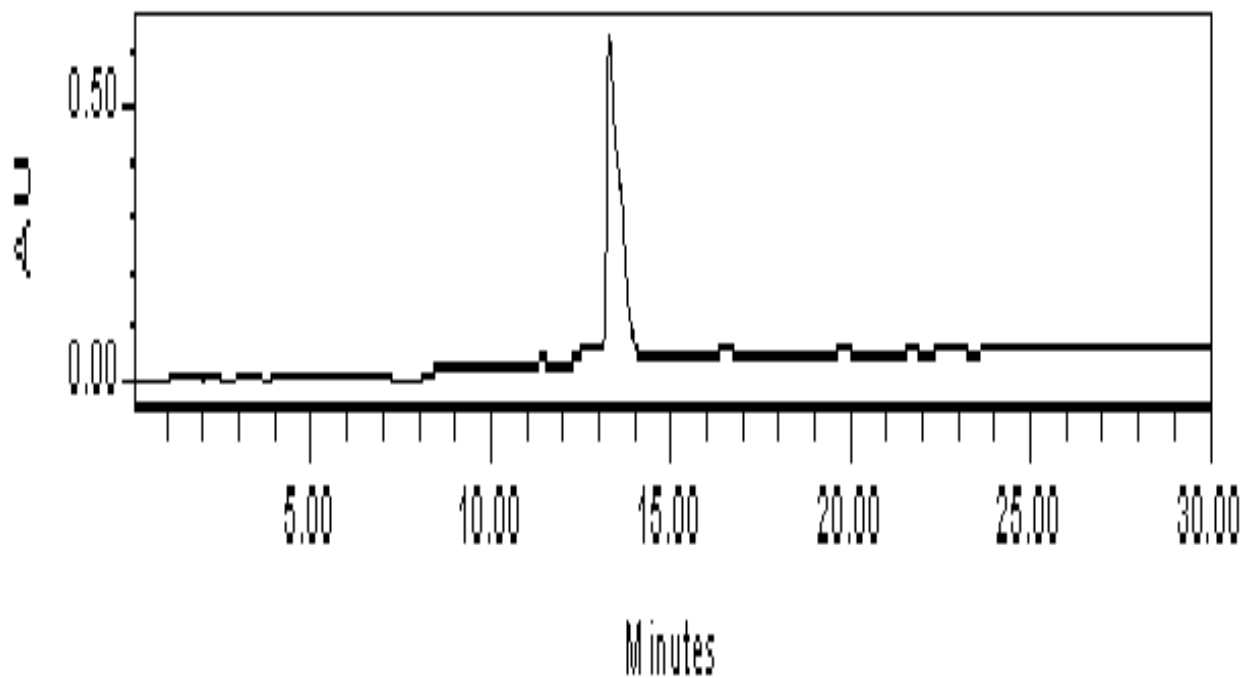
5.4 Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση των πεπτιδίων

5.4.1 Ac-Arg-Aib-Gly-Asp-Aib-Gly-Arg-Aib-Gly-Lys(Ac)-Aib-Gly-OH (1)

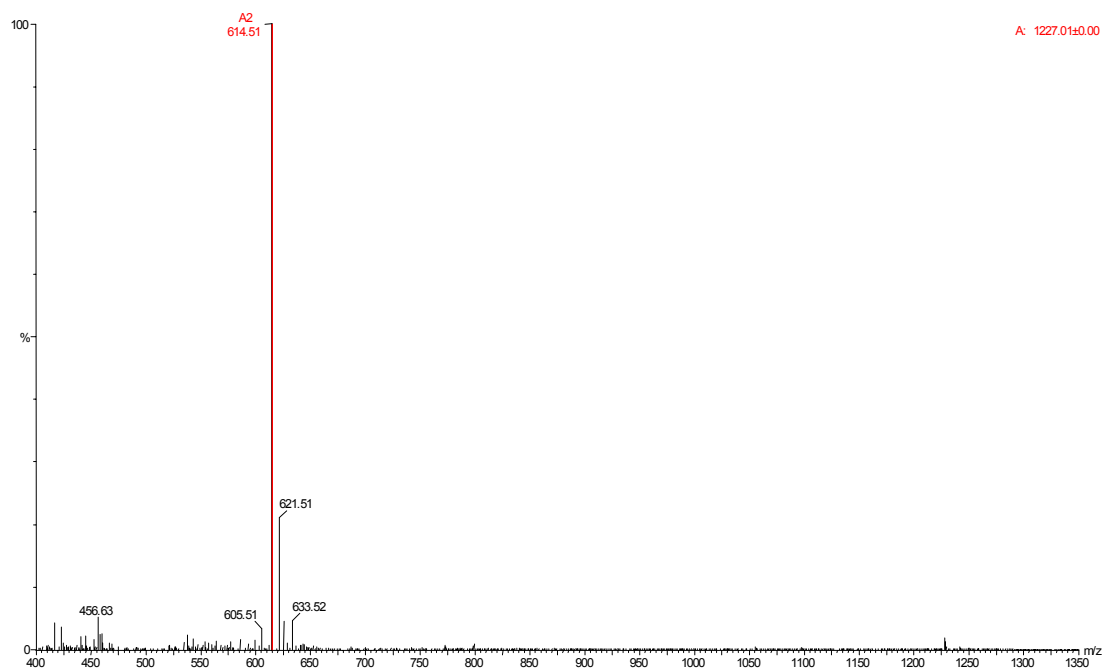
M.T. : C₅₀H₈₇O₁₇N₁₉

M.B. : 1226

Για την σύνθεση του πεπτιδίου **1** χρησιμοποιήθηκαν 417mgr N^α-t-βουτυλοξυκαρβόνυλο-γλυκίνο-PAM ρητίνης (Boc-Gly-PAM) με υποκατάσταση 0.79 mmol Boc-Gly/gr ρητίνης. Όλα τα αμινοξέα εισήχθησαν ως N^α-Boc παράγωγα, ενώ η πλευρικές προστασίες ήταν, για την Lys η Fmoc ομάδα, για το Asp η OBzl ομάδα και για την Arg η Tosyl ομάδα. Οι συζεύξεις έγιναν με χρήση HBTU, παρουσία HOBt και DIEA σε αναλογίες: Boc-αμινοξύ/HBTU/HOBt/DIEA : 1/1/1/3. Μετά την σύζευξη της Boc-Lys(Fmoc), απομακρύνθηκε η Fmoc ομάδα και η αμινομάδα της πλευρικής αλυσίδας ακετυλιώθηκε με 1.5 ml οξικού ανυδρίτη, σε πυριδίνη. Ομοίως, έγινε η ακετυλίωση της α-αμινομάδας της N-τελικής αργινίνης, μετά την απομάκρυνση της Boc ομάδας. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης και την ξήρανση της πεπτιδορητίνης, ελήφθησαν 559.6 mgr (απόδοση 56%). Η απόσπαση του πεπτιδίου από την ρητίνη έγινε με άνυδρο HF και απομονώθηκαν 181.1mgr ακάθαρτου πεπτιδίου (απόδοση 86%). Με αναλυτική RP-HPLC βρέθηκε ως καταλληλότερο σύστημα διαλυτών έκλουσης το H₂O(0.1% TFA)/CH₃CN(0.1% TFA) σε αναλογία, από 95/5 έως 60/40 αντίστοιχα και χρόνο έκλουσης 30min. Με αυτό το σύστημα διαλυτών έγινε ο καθαρισμός του πεπτιδίου σε ημιπαρασκευαστική RP-HPLC, με χρήση βαθμιδωτού προγράμματος έκλουσης (gradient), ροής 4.7ml/min και συνολικού χρόνου έκλουσης 30min. Απομονώθηκαν 73.3mgr καθαρού προϊόντος (απόδοση 40.5%). Ο έλεγχος της καθαρότητας και η ταυτοποίηση έγιναν με αναλυτική RP-HPLC (σχήμα 5.2) και φασματοσκοπία μάζας (ESI-MS) (σχήμα 5.3) αντίστοιχα.



Σχήμα 5.2 Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του πεπτιδίου 1.



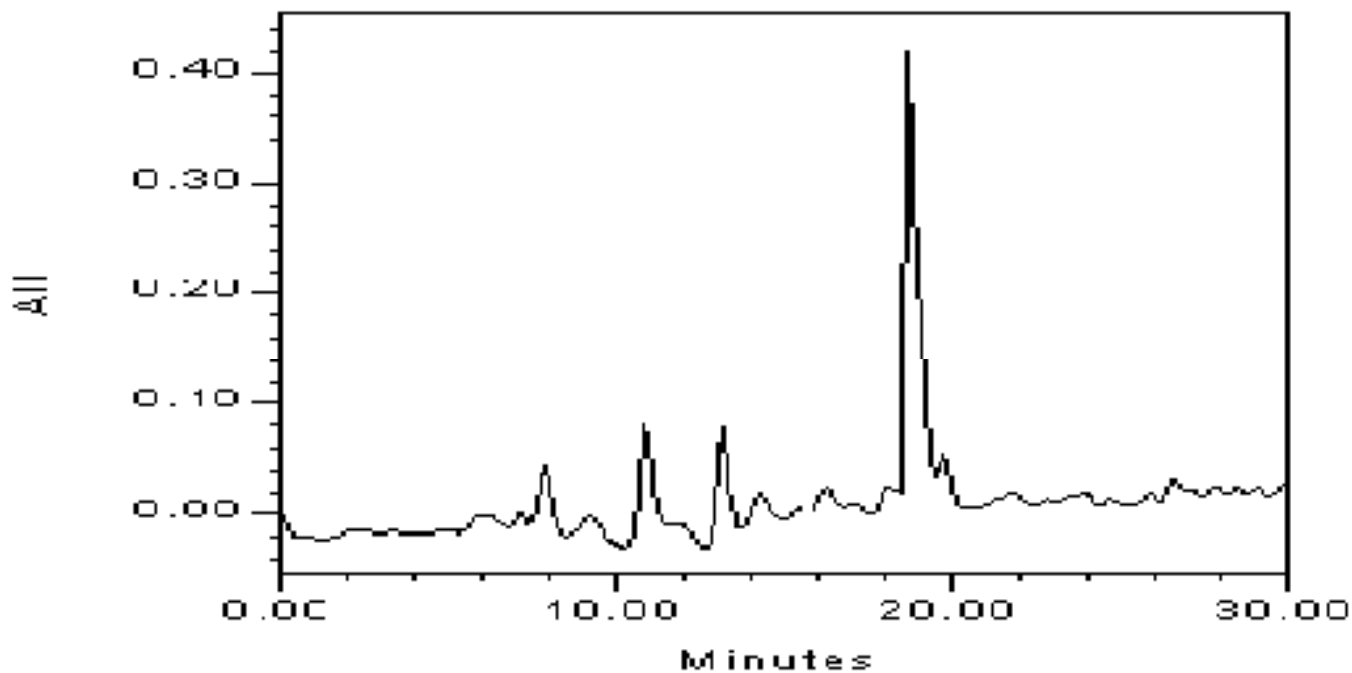
Σχήμα 5.3 Φάσμα μάζας (ESI) του πεπτιδίου 1 όπου η κορυφή σε $m/z=614$ αντιστοιχεί στο μοριακό του ιόν $[M+H]^+$.

5.4.2 Ac-Ser-Arg-Gly-Asp-Val-Gly-Arg-Aib-Gly-Lys(Ac)-Aib-Gly-OH (2)

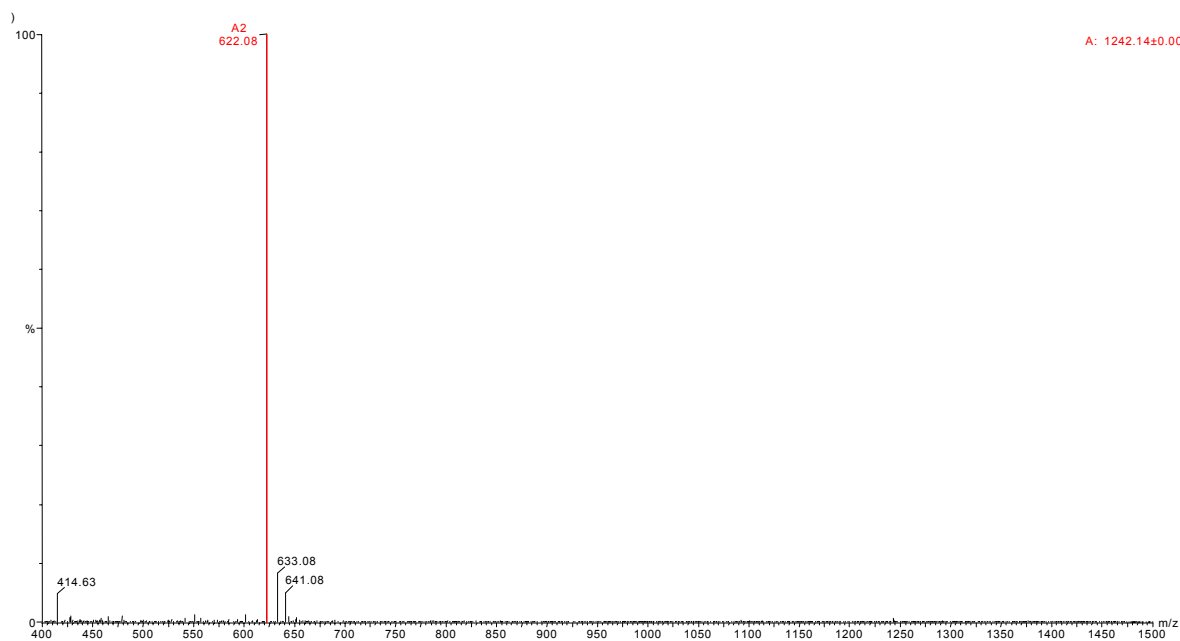
M.T. : C₅₀H₈₉O₁₈N₁₉

M.B. : 1242

Για την σύνθεση του πεπτιδίου **2** χρησιμοποιήθηκαν 0.30 gr N^α-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-γλύκινιο-PAM ρητίνης (Boc-Gly-PAM) με υποκατάσταση 0.79 mmol Boc-Gly/gr ρητίνης. Τα αμινοξέα εισήχθησαν ως N^α-Boc παράγωγα, ενώ οι πλευρικές προστασίες ήταν, η Fmoc ομάδα για την λυσίνη, η OBzl ομάδα για το ασπαρτικό και η Tosyl ομάδα για την αργινίνη. Οι αντιδράσεις σύζευξης πραγματοποιήθηκαν με τα αντιδραστήρια HBTU, HOBt και DIEA σε αναλογίες 1/1/3 ως προς το αμινοξύ. Για τις εκπλύσεις της πεπτιδορητίνης, η μεθανόλη (MeOH) αντικαταστάθηκε από το διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF), για να αποφευχθεί παράπλευρη αντίδραση μετεστεροποίησης στην πλευρική αλυσίδα του ασπαρτικού οξέος. Αφού συζεύχθηκε η Boc-Lys(Fmoc) πραγματοποιήθηκε αποπροστασία της N^η ομάδας της πλευρικής αλυσίδας και ακετυλίωση της με οξικό ανυδρίτη σε πυριδίνη, ενώ αντίδραση ακετυλίωσης έγινε και στην N^α ομάδα της σερίνης. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης και την ξήρανση της πεπτιδορητίνης, ελήφθησαν 0.902 gr στερεού (απόδοση 83.5%). Ακολούθησε απόσπαση του πεπτιδίου από την ρητίνη και απομάκρυνση των πλευρικών προστασιών με άνυδρο HF και απομονώθηκαν 0.301 gr ακάθαρτου προϊόντος (απόδοση 95%). Οι βέλτιστες συνθήκες καθαρισμού του πεπτιδίου καθορίστηκαν με αναλυτική RP-HPLC, ως H₂O(0.1%TFA)/CH₃-CN(0.1%TFA) σε αναλογία 100/0 έως 70/30 αντίστοιχα, με χρόνο έκλουσης 30min. Με χρήση του παραπάνω βαθμιδωτού προγράμματος έκλουσης έγινε ο καθαρισμός του προϊόντος σε ημιπαρασκευαστική RP-HPLC. Απομονώθηκαν 153 mgr πεπτιδίου (απόδοση 51%). Στα σχήματα 5.4 και 5.5 παρατίθενται, το γράφημα της αναλυτικής RP-HPLC και το φάσμα μάζας αντίστοιχα, που έγιναν σε δείγμα του τελικού πεπτιδίου και τα οποία πιστοποιούν την καθαρότητα και την ταυτότητα του προϊόντος.



Σχήμα 5.4 Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του πεπτιδίου 2.



Σχήμα 5.5 Φάσμα μάζας (ESI) του πεπτιδίου 2 όπου η κορυφή σε $m/z=622$ αντιστοιχεί στο μοριακό του ιόν $[M+H]^+$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΜΟΡΦΩΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ¹H-NMR

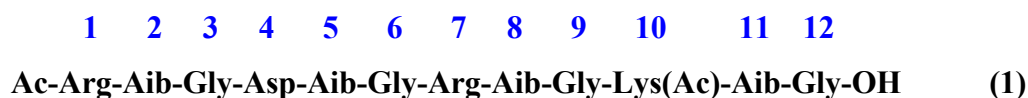
6. Ταυτοποίηση και διαμορφωτική ανάλυση με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$

Πέρα από τις αναλυτικές τεχνικές που αναφέρθηκαν παραπάνω, στα πεπτίδια έγινε ταυτοποίηση της αλληλουχίας (πρωτοταγής δομή) καθώς επίσης και ανάλυση των άλλων δομικών τους χαρακτηριστικών (δευτεροταγής δομή) με πειράματα $^1\text{H-NMR}$, μίας και δύο διαστάσεων.

Πιο συγκεκριμένα, έγιναν πειράματα 1D $^1\text{H-NMR}$ σε θερμοκρασίες, από 300 έως και 350 K. Τα δεδομένα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των συντελεστών θερμοκρασίας των αμιδικών πρωτονίων, προκειμένου να εκτιμηθεί η ύπαρξη ενδομοριακών ή διαμοριακών δεσμών υδρογόνου (βλ. Κεφάλαιο 3). Φάσματα 2D $^1\text{H-NMR}$ ελήφθησαν με πειράματα TOCSY και NOESY. Σε συνδυασμό με τα 1D φάσματα προσδιορίστηκαν οι χημικές μετατοπίσεις όλων των πρωτονίων, η πεπτιδική αλληλουχία των μορίων και οι τιμές των σταθερών σύζευξης. Ο συνδυασμός των παραπάνω δεδομένων, με την ποιοτική αποτίμηση των φαινομένων NOE, συνέβαλε στην εξαγωγή συμπερασμάτων για την τρισδιάστατη δομή των πεπτιδίων.

Τα δείγματα των πεπτιδίων Ac-Arg-Aib-Gly-Asp-Aib-Gly-Arg-Aib-Gly-Lys(Ac)-Aib-Gly-OH **1** και Ac-Ser-Arg-Gly-Asp-Val-Gly-Arg-Aib-Gly-Lys(Ac)-Aib-Gly-OH **2** που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα, είχαν συγκέντρωση 8mM σε διαλύτη DMSO- d_6 , ενώ πριν τη διάλυσή τους είχαν λυοφιλοποιηθεί από υδατικό διάλυμα σε pH 4.93 και 4.96 αντίστοιχα. Όλα τα δείγματα περιείχαν μοριακά κόσκια (molecular shifts) για την δέσμευση της υγρασίας. Τα 1D πειράματα έγιναν σε πεδίο 400.13 MHz, με αριθμό σαρώσεων 256. Τα 2D πραγματοποιήθηκαν επίσης σε πεδίο 400.13 MHz, με αριθμό σαρώσεων 64, εκτός από το TOCSY πείραμα για το πεπτίδιο **2** που έγινε με 48 σαρώσεις. Για κάθε φάσμα 2D ελήφθησαν 2048 σημεία με 512 πειράματα.

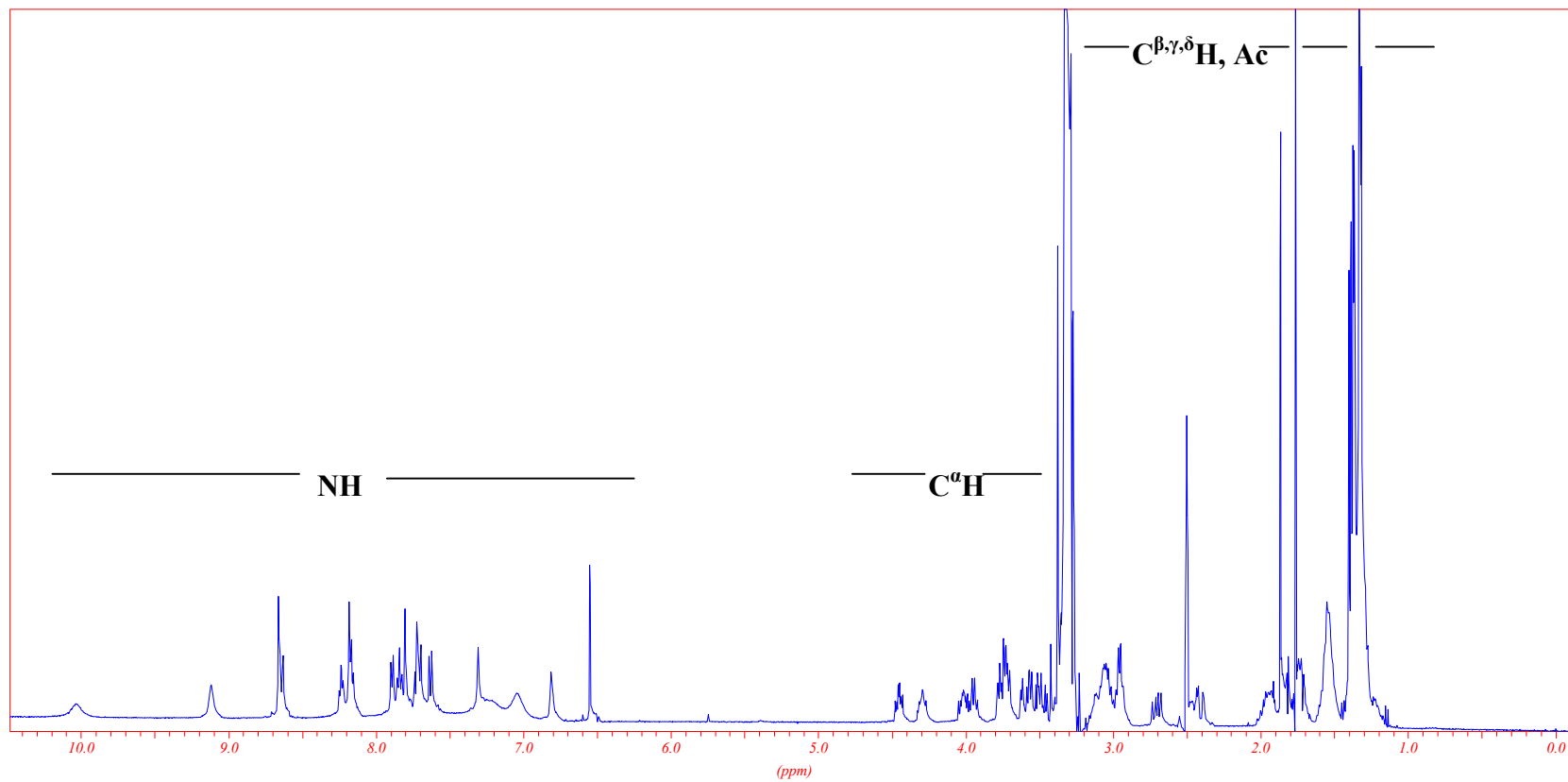
6.1 Ανάλυση των $^1\text{H-NMR}$ φασμάτων του πεπτιδίου



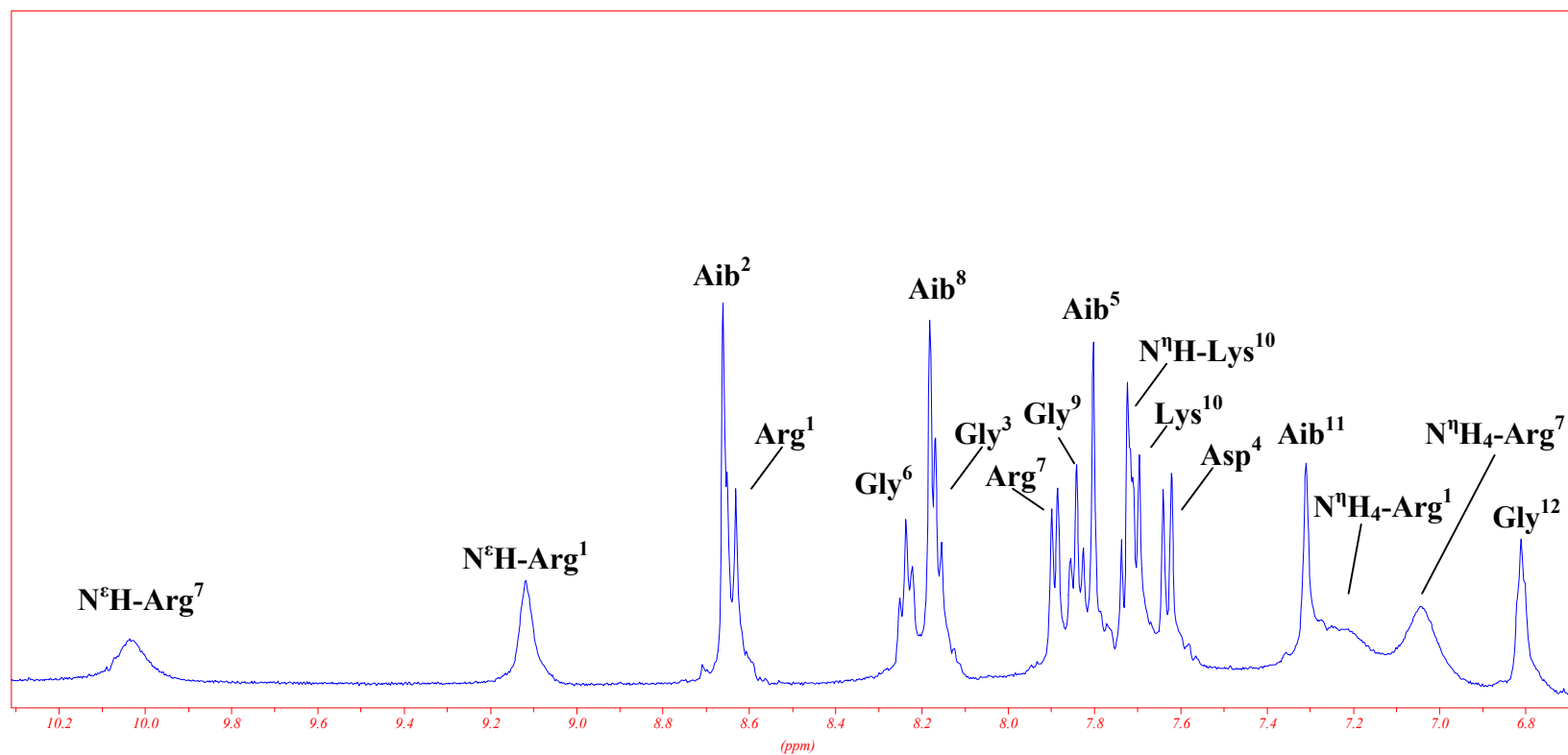
Στο φάσμα 1D $^1\text{H-NMR}$ στους 300 K (σχήμα 6.1) μπορούμε να διακρίνουμε τρεις περιοχές. Μεταξύ 6.5 και 10 ppm βρίσκονται οι απορροφήσεις των

αμιδικών πρωτονίων του πεπτιδικού σκελετού, καθώς και των δύο $N^{\epsilon}H$ των αργινινών. Στην περιοχή μεταξύ 4.5 και 3.2 ppm συντονίζονται τα $C^{\alpha}H$ όλων των αμινοξέων, ενώ περίπου στα 3 ppm βρίσκονται τα $C^{\delta}H$ των δύο αργινινών. Τέλος, μεταξύ 3 και 1 ppm παρατηρούμε τα πρωτόνια των πλευρικών αλυσίδων, C^{β} , C^{γ} , C^{δ} και C^{ϵ} , όπως και αυτά της ακέτυλο ομάδας. Πρέπει να σημειωθεί, ότι δεν υπάρχει σήμα για το πρωτόνιο του καρβοξυλίου της γλυκίνης, όπως και γ' αυτό της πλευρικής αλυσίδας του ασπαρτικού, καθώς αμφότερα τα καρβοξύλια είναι αποπρωτονιωμένα σε pH 4.9.

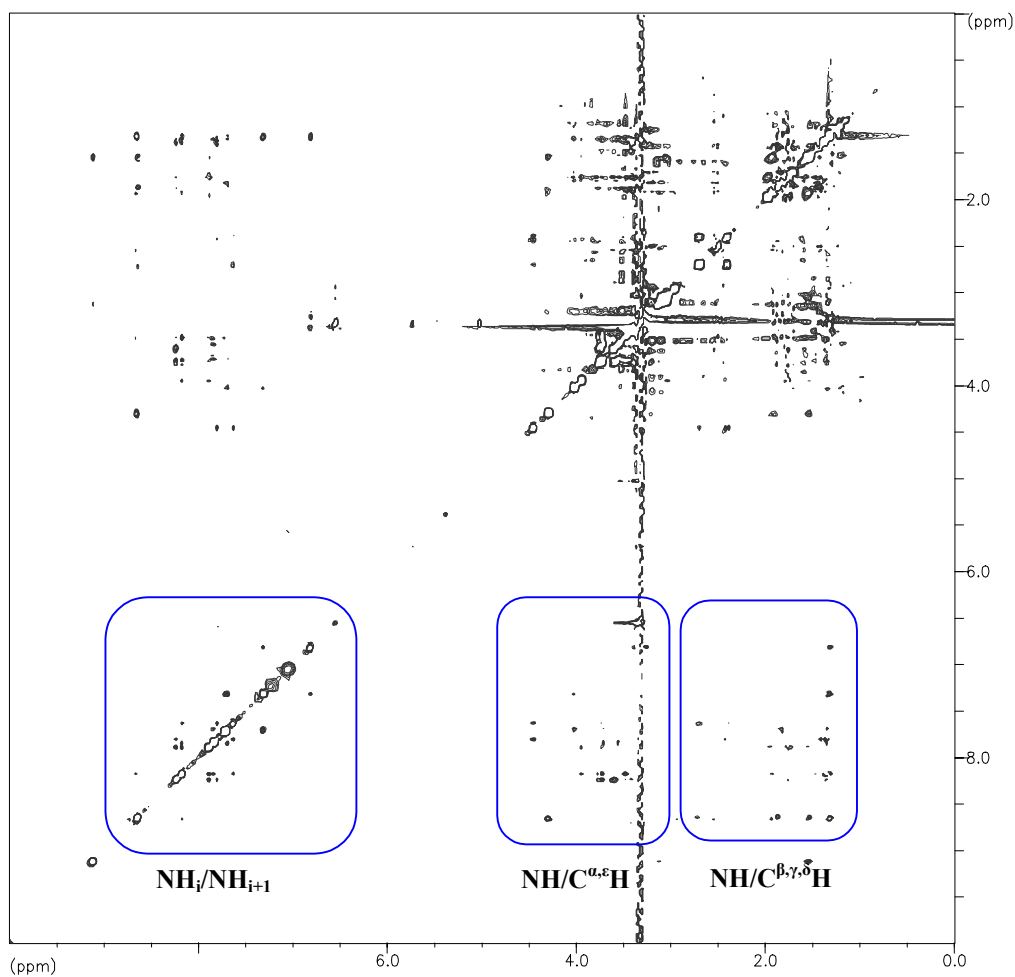
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων προσδιορίστηκαν με συνδυασμό των δεδομένων από τα 1D και 2D φάσματα (Πίνακας 6.1). Στο σχήμα 6.2 φαίνεται η περιοχή μεταξύ 6.5 και 10.5 ppm του 1D φάσματος στους 300 K, και ο χαρακτηρισμός των σημάτων που αποδίδονται στα NH και $N^{\epsilon}H$ πρωτόνια. Στα σχήματα 6.3, 6.4 και 6.5 φαίνονται, ολόκληρο το NOESY φάσμα, η NH-NH και η NH/ $C^{\alpha}H$ περιοχή, αντίστοιχα, του πεπτιδίου **1**. Από τον προσδιορισμό των σημείων διασταύρωσης, τα οποία προκύπτουν από τις NH_i/NH_{i+1} και $C^{\alpha}H_i/NH_{i+1}$ NOE αλληλεπιδράσεις, προέκυψε η αμινοξική αλληλουχία του πεπτιδίου. Στα σχήματα 6.6 και 6.7 φαίνονται το TOCSY φάσμα και η μεγενθυμένη NH/ $C^{\alpha}H$ περιοχή αντίστοιχα. Με τη βοήθεια του TOCSY φάσματος έγινε ο προσδιορισμός των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων κάθε αμινοξέος ξεχωριστά.



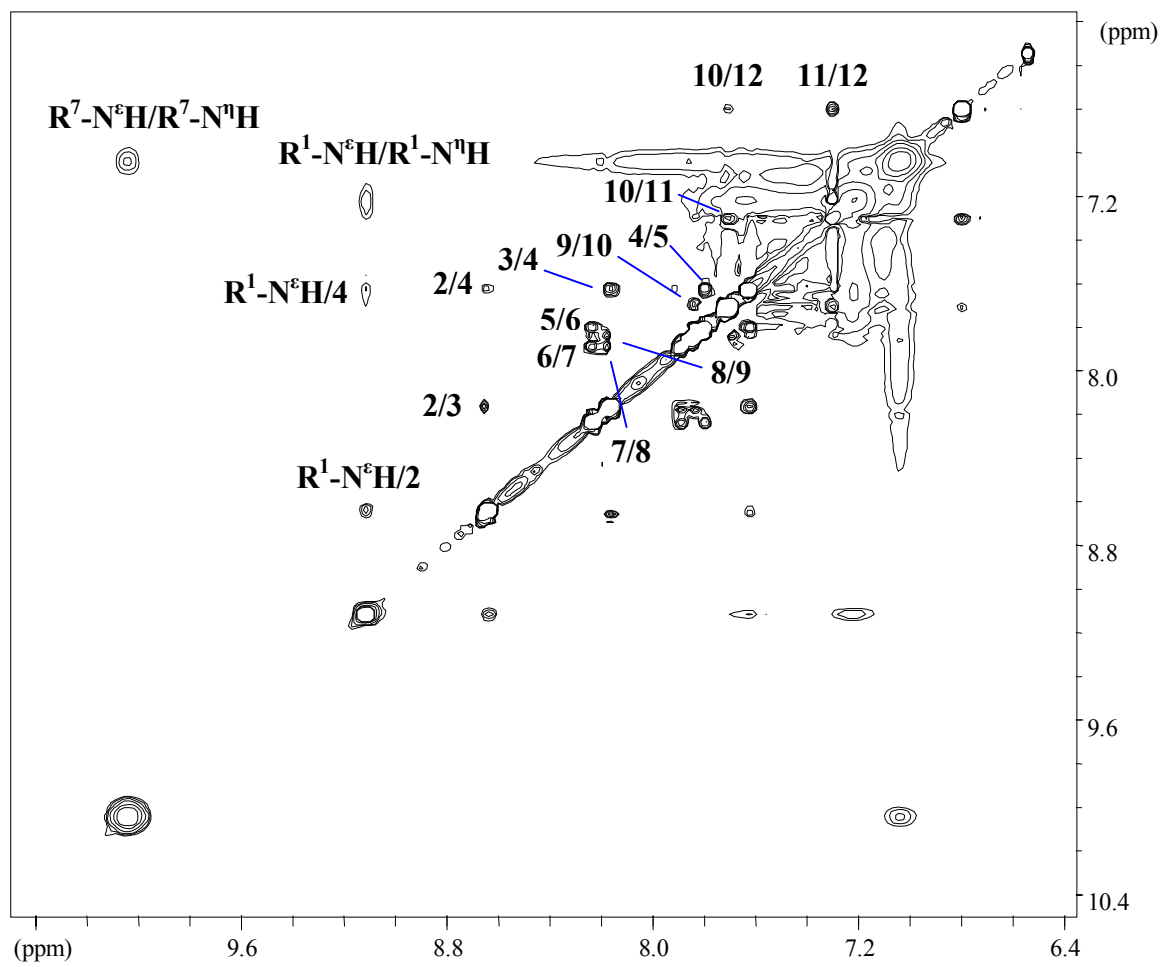
Σχήμα 6.1 1D ¹H-NMR φάσμα στα 400 MHz του πεπτιδίου **1**, σε διαλύτη DMSO-d₆, συγκέντρωσης 8mM και θερμοκρασία 300 K. Το δείγμα είχε λυοφιλοποιηθεί από υδατικό διάλυμα σε pH 4.93.



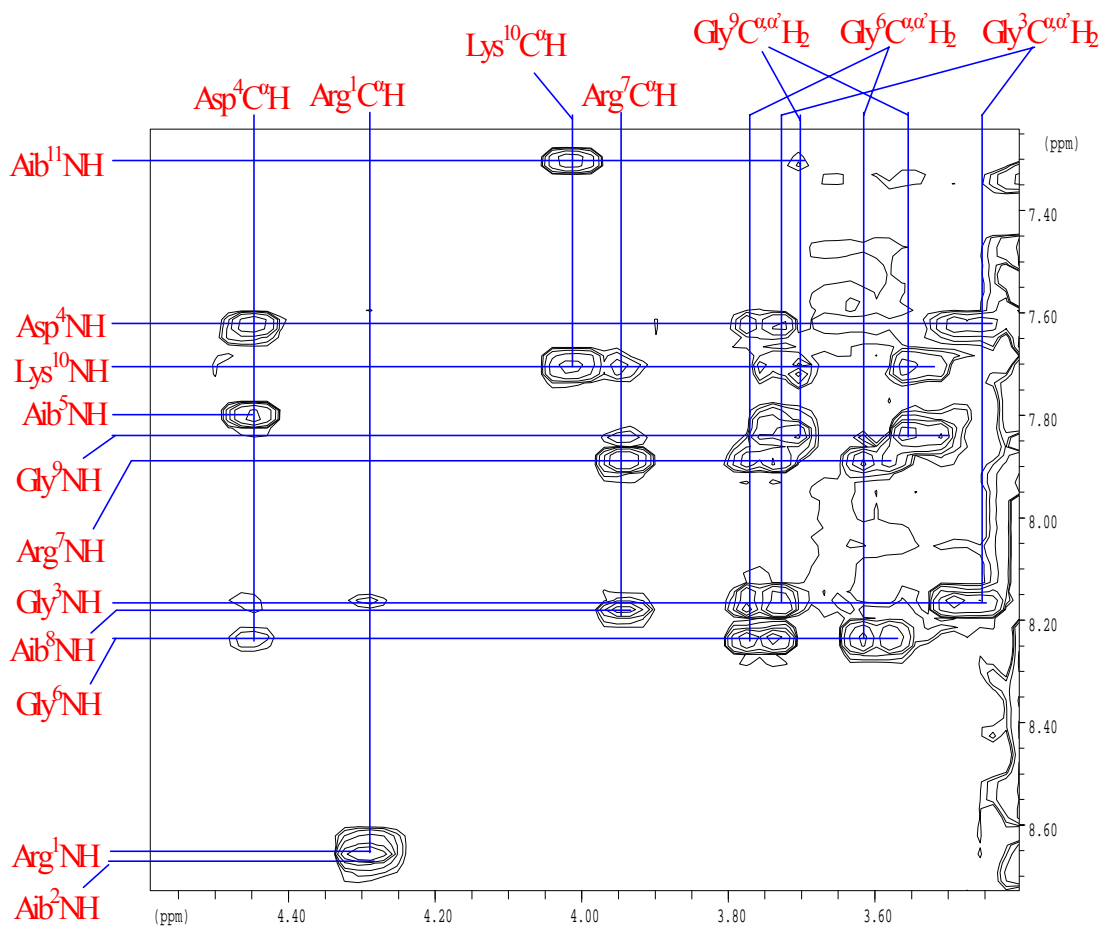
Σχήμα 6.2 1D $^1\text{H-NMR}$ φάσμα στα 400 MHz του πεπτιδίου **1** για την περιοχή συντονισμού των αμιδικών πρωτονίων. Το δείγμα είναι συγκέντρωσης 8mM σε διαλύτη DMSO-d_6 και το πείραμα έγινε στους 300 K. Προηγήθηκε λυοφιλοποίηση του πεπτιδίου από υδατικό διάλυμα σε pH 4.93.



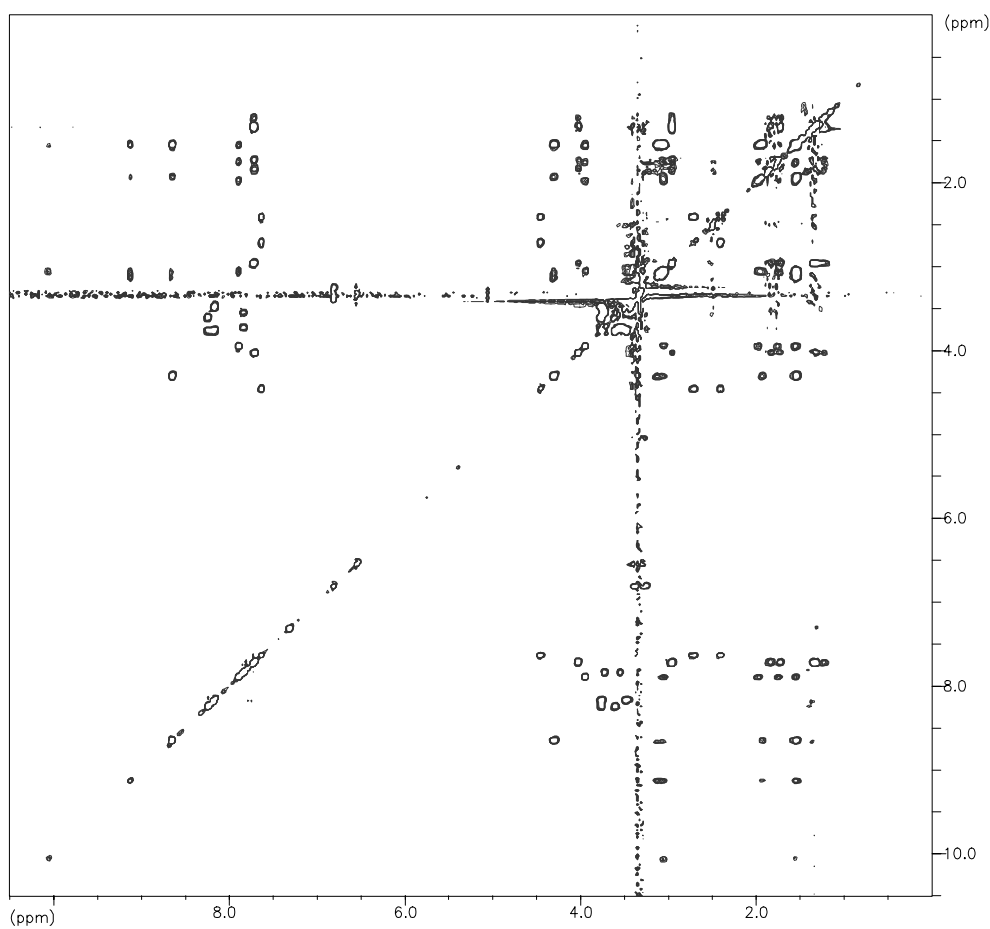
Σχήμα 6.3 ¹H-NMR NOESY φάσμα στα 400 MHz του πεπτιδίου **1** σε διαλύτη DMSO-d₆, συγκέντρωσης 8mM, σε θερμοκρασία 300 K. Ελήφθησαν 2048 σημεία από 512 πειράματα με 64 σαρώσεις και χρόνο μίξης 350ms. Το δείγμα περιείχε μοριακά κόσκινα, ενώ είχε προηγηθεί ρύθμιση του pH υδατικού διαλύματός του, στα 4.93.



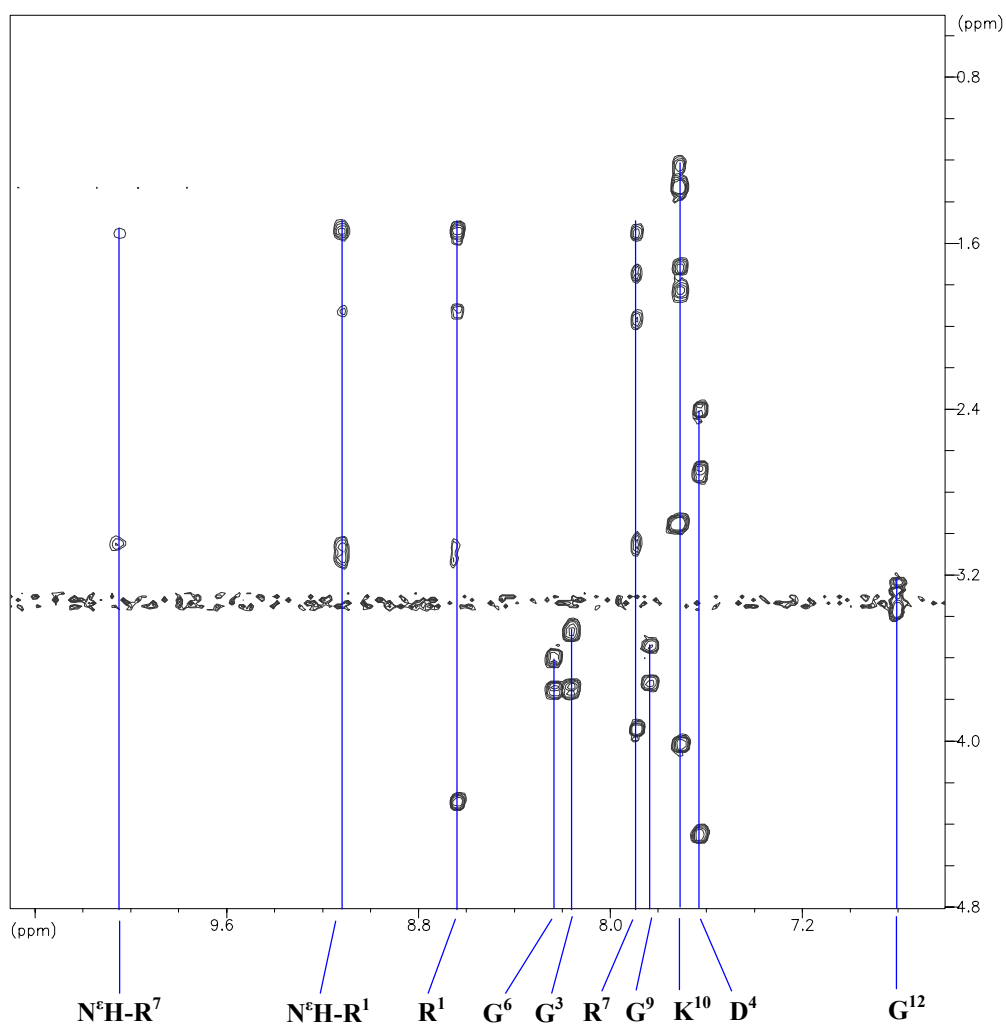
Σχήμα 6.4 Περιοχή NH/NH του φάσματος NOESY του πεπτιδίου **1** στα 400 MHz.



Σχήμα 6.5 Περιοχή NH/C^αH του NOESY φάσματος του πεπτιδίου 1 στα 400 MHz



Σχήμα 6.6 ^1H -NMR φάσμα TOCSY στα 400 MHz του πεπτιδίου **1**, σε διαλύτη DMSO-d_6 , συγκέντρωσης 8mM, σε θερμοκρασία 300 K. Πραγματοποιήθηκαν 512 πειράματα και ελήφθησαν 2048 σημεία, με αριθμό σαρώσεων 64 και χρόνο μίξης 100ms. Προηγήθηκε ρύθμιση του pH, σε υδατικό διάλυμα του πεπτιδίου, στα 4.93 και λυοφιλοποίηση. Στο δείγμα χρησιμοποιήθηκαν μοριακά κόσκινα.



Σχήμα 6.7 Περιοχή NH/C^αH του ¹H-NMR φάσματος TOCSY του πεπτιδίου **1** στα 400 MHz. Τα σημεία τομής των συνεχών γραμμών, που ενώνουν τα σημεία διασταύρωσης, με τον οριζόντιο άξονα, αντιστοιχούν στις συχνότητες συντονισμού των αμιδικών πρωτονίων κάθε αμινοξέος.

6.1.1. Χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του πεπτιδίου 1

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Ac-Arg-Aib-Gly-Asp-Aib-Gly-Arg-Aib-Gly-Lys(Ac)-Aib-Gly-OH

Το αμιδικό πρωτόνιο της Arg¹ δίνει μία διπλή κορυφή στο 1D φάσμα, στα 8.62 ppm, το οποίο αποδεικνύεται και από το TOCSY φάσμα. Υπάρχουν δύο χαρακτηριστικές, για τα πρωτόνια της Arg, σειρές σημείων διασταύρωσης στο TOCSY (σχήμα 6.7), ωστόσο, όπως προκύπτει από την ανάλυση του NOESY φάσματος στην περιοχή NH/NH, αυτή στα 7.89 ppm αντιστοιχεί στο NH της Arg⁷. Ακολουθώντας με συνδυασμό των TOCSY και 1D φασμάτων, το C^αH της Arg¹ ταυτοποιείται στα 4.29 ppm, ενώ τα δύο C^βH πρωτόνια είναι μαγνητικά μη ισοδύναμα και συντονίζονται στα 1.75 και 1.91 ppm, αντίστοιχα. Τα C^γH₂ δεν διαχωρίζονται και δίνουν ένα σήμα στα 1.53 ppm, σε αντίθεση με τα C^δH₂, τα οποία λόγω της γουανιδινομάδας συντονίζονται στα 3.05 και 3.12 ppm. Το N^ε πρωτόνιο είναι αρκετά αποπροστατευμένο και δίνει μία κορυφή στα 9.11 ppm, ενώ τα N^ηH βρίσκονται στα 7.04 ppm. Η απόδοση της κορυφής αυτής στα N^ηH πρωτόνια της Arg¹ έγινε με βάση το NOE φαινόμενο που παρατηρείται με το N^εH (Σχήμα 6.4). Ολοκλήρωση της κορυφής στο 1D φάσμα δείχνει την παρουσία δύο πρωτονίων, ενώ δεν είναι εφικτή η ταυτοποίηση των άλλων δύο.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το NH της δεύτερης αργινίνης του πεπτιδίου, που βρίσκεται στη θέση 7, έχει χημική μετατόπιση στα 7.89 ppm. Ακολουθώντας την ίδια στρατηγική, αποδόθηκαν οι χημικές μετατοπίσεις για τα υπόλοιπα υδρογόνα της Arg⁷. Έτσι έχουμε το C^αH στα 3.95 ppm, τα C^βH₂ στα 1.97 και 1.75 ppm, τα C^γH₂ στα 1.55 ppm, τα C^δH₂ στα 3.05 και 3.16 ppm και το N^εH στα 10.05 ppm. Όπως και για την Arg¹, τα N^ηH πρωτόνια ταυτοποιήθηκαν στα 7.22 ppm με βάση το NOE φαινόμενο με το N^εH πρωτόνιο. Η ολοκλήρωση της κορυφής στο 1D φάσμα έδειξε την παρουσία δύο πρωτονίων σε αυτή τη συχνότητα συντονισμού, όπως και στην περίπτωση της Arg¹. Μία ευρεία συμβολή στην περιοχή 7.5-8 ppm είναι πιθανόν να οφείλεται στα άλλα δύο N^ηH πρωτόνια, δεν είναι όμως εφικτό να αξιολογηθεί.

Το αμιδικό πρωτόνιο του ασπαρτικού οξέος της θέσης 4 της πεπτιδικής αλληλουχίας ταυτοποιήθηκε από το TOCSY φάσμα (σχήμα 6.7), όπου συζεύγνυται με το C^αH και τα C^βH₂ και επιπλέον, είναι το μοναδικό αμινοξύ του πεπτιδίου με τέτοιο σύστημα πρωτονίων. Η χημική του μετατόπιση (7.60 ppm) επιβεβαιώθηκε από τα

σημεία διασταύρωσης στο NOESY φάσμα με τα γειτονικά του, στον πεπτιδικό σκελετό, αμιδικά πρωτόνια των Gly³ και Aib⁵ (σχήμα 6.4), και από την διπλή κορυφή στο 1D φάσμα, στην παραπάνω συχνότητα. Το C^αH συντονίζεται στα 4.44 ppm, ενώ τα C^βH₂, δίνουν ένα χαρακτηριστικό ABX σύστημα κορυφών συντονισμού στα 2.41 και 2.69 ppm, όπως φαίνεται στο φάσμα μίας διάστασης.

Το NH της Lys¹⁰, προσδιορίστηκε από το TOCSY φάσμα, όπου συζεύγνται με έξι διαφορετικές ομάδες πρωτονίων και έχει χημική μετατόπιση στα 7.70 ppm. Με βάση τα σημεία διασταύρωσης στο TOCSY, αποδόθηκαν οι χημικές μετατοπίσεις, του C^αH στα 4.07 ppm, των C^{β,β'}H₂ στα 1.72 και 1.82 ppm, των C^γH₂ στα 1.22 ppm, των C^δH₂ στα 1.35 ppm και των C^εH₂ στα 2.94 ppm. Το N^ηH δίνει μία χαρακτηριστική τριπλή κορυφή στο 1D φάσμα από τη σύζευξη του με τα δύο C^εH πρωτόνια και σε συνδυασμό με τα δεδομένα από το TOCSY, η χημική του μετατόπιση αποδόθηκε στα 7.72 ppm.

Τα NH των τεσσάρων Gly δίνουν χαρακτηριστικές τριπλές κορυφές συντονισμού στο μονοδιάστατο φάσμα. Επίσης παρουσιάζουν ένα ή δύο σημεία διασταύρωσης στο TOCSY, από την σύζευξή τους με τα C^αH₂, ανάλογα με το αν είναι μαγνητικά ισοδύναμα ή όχι. Το NH της Gly¹², λόγω του ελεύθερου C-τελικού καρβοξυλίου, συντονίζεται σε ισχυρότερο πεδίο. Από το 1D φάσμα διακρίνεται μία τριπλή κορυφή στα 6.79 ppm, η οποία και αποδίδεται σε αυτό. Αυτή η χημική μετατόπιση επιβεβαιώνεται και από τα δύο σημεία διασταύρωσης στο TOCSY στην περιοχή των C^α πρωτονίων. Στα τελευταία αποδόθηκαν οι χημικές μετατοπίσεις στα 3.26 και 3.36 ppm. Με βάση τις τριπλές κορυφές συντονισμού στο 1D φάσμα, τα δεδομένα από το TOCSY, και τον προσδιορισμό της αμινοξικής αλληλουχίας από το NOESY φάσμα, ταυτοποιήθηκαν όλα τα πρωτόνια των υπολοίπων τριών Gly, και οι χημικές τους μετατοπίσεις φαίνονται στον πίνακα 6.1.

Το NH του Aib δεν δίνει σημείο διασταύρωσης στην περιοχή των C^αH στο TOCSY, καθώς δεν υπάρχει α-πρωτόνιο σε αυτό το μη φυσικό αμινοξύ. Ωστόσο παρουσιάζει μία χαρακτηριστική απλή κορυφή συντονισμού, στο φάσμα μίας διάστασης. Με ταυτοποίηση των NH_i/NH_{i+1} σημείων διασταύρωσης από τα NOE φαινόμενα στο NOESY και με ανάλυση του 1D φάσματος, αποδόθηκαν οι χημικές μετατοπίσεις που παρουσιάζονται στον πίνακα 6.1 για τα NHs πρωτόνια των τεσσάρων Aib. Τέλος έγινε ταυτοποίηση των C^βH πρωτονίων με βάση το NOESY φάσμα και τις NOE αλληλεπιδράσεις με τα NH τους, καθώς και με γειτονικά πρωτόνια που είχαν ήδη ταυτοποιηθεί.

Πίνακας 6.1 Οι χημικές μετατοπίσεις (σε ppm) των πρωτονίων του πεπτιδίου **1**

A.A	NH	C ^α H	C ^β H	C ^γ H	C ^δ H	C ^ε H	Άλλα πρωτόνια
Arg ¹	8.62	4.29	1.75/1.91	1.53	3.05/3.12		N ^ε H 9.11 N ^η H 7.04 Ac 1.83
Aib ²	8.66		1.32				
Gly ³	8.15	3.74/3.48					
Asp ⁴	7.60	4.44	2.41/2.69				
Aib ⁵	7.80		1.36				
Gly ⁶	8.23	3.72/3.61					
Arg ⁷	7.89	3.95	1.75/1.97	1.55	3.05/3.16		N ^ε H 10.05 N ^η H 7.22
Aib ⁸	8.18		1.33				
Gly ⁹	7.83	3.53/3.70					
Lys ¹⁰	7.70	4.07	1.72/1.82	1.22	1.35	2.94	N ^η H 7.72 Ac 1.83
Aib ¹¹	7.31		1.32				
Gly ¹²	6.79	3.26/3.36					

6.1.2 Διαμορφωτική ανάλυση του πεπτιδίου **1**

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Ac-Arg-Aib-Gly-Asp-Aib-Gly-Arg-Aib-Gly-Lys(Ac)-Aib-Gly-OH

Η ταυτοποίηση των πρωτονίων του πεπτιδίου έγινε κυρίως με βάση τα δεδομένα των TOCSY και 1D φασμάτων, ενώ από το NOESY χρησιμοποιήθηκαν πληροφορίες σχετικά με την αμινοξική αλληλουχία του πεπτιδίου. Το φάσμα NOESY είναι το κύριο εργαλείο για την διαμορφωτική ανάλυση του μορίου. Αξιολόγηση των NOE φαινομένων που παρατηρούνται σε αυτό, όπως σημεία διασταύρωσης που οφείλονται σε μακρινά στην πεπτιδική αλληλουχία πρωτόνια (long range NOEs), η ένταση των σημείων, αλλά και η μη εμφάνιση σημείων, οδηγεί σε κάποια γενικά

συμπεράσματα για την δομή του πεπτιδίου. Επίσης από τις μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων στα 1D $^1\text{H-NMR}$ πειράματα, σε πέντε διαφορετικές θερμοκρασίες και τις τιμές των συντελεστών θερμοκρασίας για τα αμιδικά πρωτόνια, εξάγονται συμπεράσματα για το βαθμό έκθεσής τους στο διαλύτη. Συνδυασμός όλων των παραπάνω δεδομένων οδηγεί σε μία γενική εικόνα της διαμόρφωσης του πεπτιδίου.

Στον πίνακα 6.2 φαίνονται οι εντάσεις των NOE φαινομένων, ενώ στον πίνακα 6.3 δίδονται οι τιμές των συντελεστών θερμοκρασίας και σταθερών σύζευξης $^3J_{\text{Na}}$, για τα αμιδικά πρωτόνια του πεπτιδίου **1**.

Από τα δεδομένα του πίνακα 6.2, τα μέσης έντασης και ισχυρά NOE φαινόμενα του τύπου $\text{NH}_i/\text{NH}_{i+1}$, χαρακτηρίζουν ελικοειδείς ή τυχαίες διαμορφώσεις και αποκλείουν την δομή β-πτυχωτού φύλου¹¹⁵. Τα ασθενή NOE φαινόμενα του τύπου $d_{\text{NN}(i,i+2)}$ για τα αμιδικά πρωτόνια 10/12, 2/4, όπως και τα ασθενή του τύπου $d_{\text{aN}(i,i+2)}$ ανάμεσα στα αμινοξέα 9/11, 7/9, 4/6 και 1/3, φανερώνουν ότι σε αυτές τις συνθήκες το πεπτίδιο προσλαμβάνει ελικοειδή διαμόρφωση και πιθανά 3₁₀ έλικας. Την εκτίμηση αυτή ενισχύουν και οι μικρές απόλυτες τιμές συντελεστών θερμοκρασίας που παρατηρήθηκαν για το τμήμα του πεπτιδίου από το Asp⁴ έως την Gly¹² (Πίνακας 6.3). Οι χαμηλές τιμές των συντελεστών θερμοκρασίας υποδεικνύουν ότι αυτά τα αμιδικά πρωτόνια δεν είναι εκτεθειμένα στο διαλύτη και πιθανά συμμετέχουν σε ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου. Ένα επιπλέον στοιχείο που ενισχύει την ελικοειδή διάταξη του πεπτιδίου **1**, είναι οι χαμηλές τιμές των σταθερών σύζευξης $^3J_{\text{Na}}$ των Arg⁷ (5.5 Hz) και Lys¹⁰ (5.5 Hz), χαρακτηριστικές ελικοειδών διαμορφώσεων.

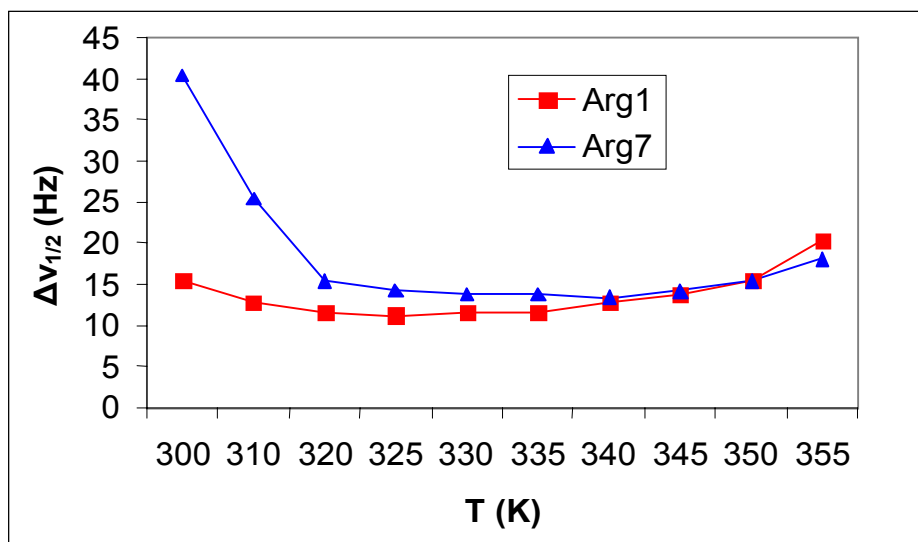
Πίνακας 6.2 Τα NOE φαινόμενα και οι εντάσεις τους που παρατηρούνται μεταξύ πρωτονίων διαφορετικών καταλοίπων για το πεπτίδιο Ac-R-Aib-G-D-Aib-G-R-Aib-G-K(Ac)-Aib-G-OH. Τα μακρινής απόστασης NOE είναι με έντονη γραφή, ενώ δεν περιλαμβάνονται αυτά μεταξύ πρωτονίων του ίδιου αμινοξέος.

NOE	Ένταση	NOE	Ένταση
Arg ¹ -NH/Asp ⁴ C ^{β,β'} H ₂	Μέση	Asp ⁴ -C ^{β,β'} H ₂ /Aib ⁵ -NH	Ισχυρή
Arg ¹ -C ^α H/Aib ² -NH	Ισχυρή	Asp ⁴ -C ^{β,β'} H ₂ /Gly ⁶ -NH	Ασθενής
Arg ¹ -C ^α H/Gly ³ -NH	Ασθενής	Asp ⁴ -C ^{β,β'} H ₂ / Arg ⁷ -NH	Ασθενής
Arg ¹ -C ^{β,β'} H ₂ /Gly ³ -NH	Ασθενής	Aib ⁵ -NH/Gly ⁶ -NH	Μέση
Arg ¹ -C ^{β,β'} H ₂ /Asp ⁴ -NH	Ασθενής	Gly ⁶ -NH/Arg ⁷ -NH	Ισχυρή
Arg ¹ -C ^{β,β'} H ₂ /Aib ² -NH	Μέση	Gly ⁶ -NH/Aib ⁸ -C ^{β,β'} H ₆	Ασθενής
Arg ¹ -C ^{γ,γ'} H ₂ /Asp ⁴ -NH	Μέση	Gly ⁶ -C ^{α,α'} H ₂ /Arg ⁷ -NH	Μέση
Arg ¹ -C ^{γ,γ'} H ₂ /Gly ³ -NH	Μέση	Arg ⁷ -NH/Aib ⁸ -NH	Μέση
Arg ¹ -N ^ε H/Aib ² -NH	Μέση	Arg ⁷ -C ^α H/Aib ⁸ -NH	Μέση
Arg ¹ -N ^ε H/Asp ⁴ -NH	Ασθενής	Arg ⁷ -C ^α H/Lys ¹⁰ -NH	Ασθενής
Arg ¹ -N ^ε H/Asp ⁴ -C ^{β,β'} H ₂	Ασθενής	Arg ⁷ -C ^α H/Gly ⁹ -NH	Ασθενής
Aib ² -NH/Gly ³ -NH	Μέση	Aib ⁸ -NH/Gly ⁹ -NH	Μέση
Aib ² -NH/Asp ⁴ -NH	Ασθενής	Gly ⁹ -NH/Lys ¹⁰ -NH	Μέση
Gly ³ -NH/Asp ⁴ -NH	Μέση	Gly ⁹ -C ^{α,α'} H ₂ /Lys ¹⁰ -NH	Μέση
Gly ³ -NH/ Asp ⁴ -C ^{β,β'} H ₂	Ασθενής	Gly ⁹ -C ^{α,α'} H ₂ /Aib ¹¹ -NH	Ασθενής
Gly ³ -NH/ Asp ⁴ -C ^α H	Ασθενής	Lys ¹⁰ -NH/ Aib ¹¹ -NH	Ισχυρή
Gly ³ -C ^{α,α'} H ₂ /Asp ⁴ -NH	Μέση	Lys ¹⁰ -NH/Gly ¹² -NH	Ασθενής
Gly ³ -C ^{α,α'} H ₂ /Aib ⁵ -NH	Ασθενής	Lys ¹⁰ -C ^α H/Aib ¹¹ -NH	Μέση
Asp ⁴ -NH/Aib ⁵ -NH	Ισχυρή	Lys ¹⁰ -C ^{β,β'} H ₂ /Gly ¹² -NH	Μέση
Asp ⁴ -C ^α H/Aib ⁵ -NH	Ισχυρή	Lys ¹⁰ -C ^{δ,δ'} H ₂ /Gly ¹² -NH	Μέση
Asp ⁴ -C ^α H/Gly ⁶ -NH	Ασθενής	Lys ¹⁰ -C ^{β,β'} H ₂ /Aib ¹¹ -NH	Μέση
Asp ⁴ -C ^α H/Arg ⁷ -NH	Ασθενής	Lys ¹⁰ -C ^{δ,δ'} H ₂ /Aib ¹¹ -NH	Μέση
Asp ⁴ -C ^{β,β'} H ₂ /Aib ⁸ -NH	Ασθενής	Aib ¹¹ -NH/Gly ¹² -NH	Μέση

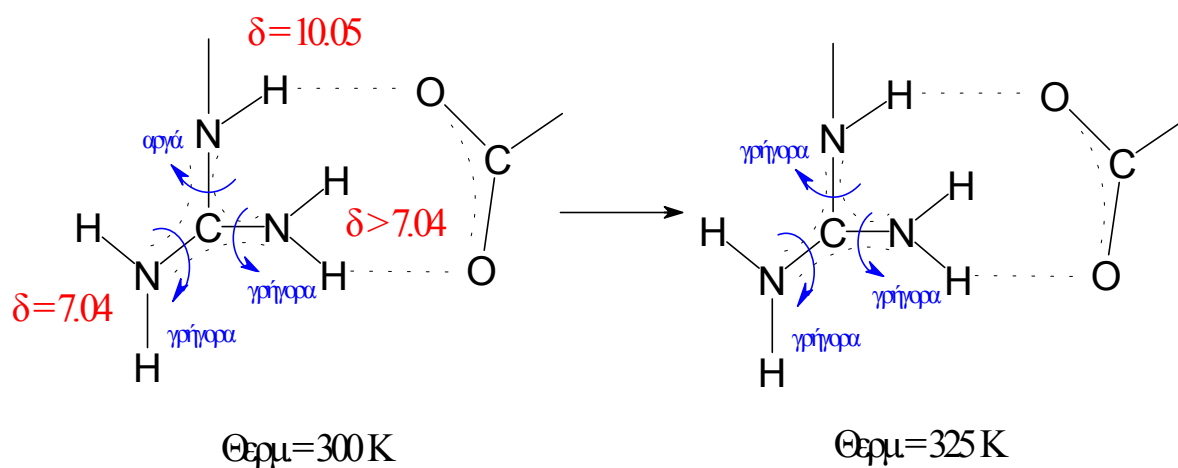
Πίνακας 6.3 Οι τιμές των συντελεστών θερμοκρασίας και οι σταθερές σύζευξης των αμιδικών πρωτονίων του πεπτιδίου **1**.

	Arg ¹	Aib ²	Gly ³	Asp ⁴	Aib ⁵	Gly ⁶	Arg ⁷	Aib ⁸	Gly ⁹	Lys ¹⁰	Aib ¹¹	Gly ¹²
δ (ppm)	8.62	8.66	8.15	7.61	7.80	8.23	7.89	8.18	7.82	7.71	7.31	6.79
Δδ/ΔT (ppb/K)	-8.4	-8.0	-3.7	~ 0	-2.7	-1.7	-1.1	-1.7	-2.1	-5.2	-1.7	-0.3
³ J _{Na}	8.08		6.20/5.76	7.72		4.88/4.88	5.52		6.13/6.03	5.52		4.00/3.08

Ένα άλλο σημείο που αξίζει αναφοράς, είναι η εμφάνιση των N^εH των δύο Arg σε αρκετά ασθενή πεδία. Η συμπεριφορά αυτή πιθανά να οφείλεται σε συμμετοχή τους σε δεσμούς υδρογόνου, ως δότες πρωτονίου, είτε με το καρβονυλικό οξυγόνο ενός αμιδικού δεσμού, είτε με αυτό της πλευρικής αλυσίδας του Asp. Ιδιαίτερα η τελευταία πιθανότητα, έχει κάποια βάση στην περίπτωση του N^εH της Arg⁷, καθώς συντονίζεται σε πιο ασθενές πεδίο (10.05 ppm) από το αντίστοιχο της Arg¹. Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, η μεγάλη μετατόπιση του N^εH πρωτονίου της αργινίνης σε χαμηλό πεδίο αποδίδεται στη συμμετοχή του σε δεσμό υδρογόνου¹¹⁵. Η σημαντική διεύρυνση που παρουσιάζει η κορυφή που αποδίδεται στο N^εH της Arg⁷ (Σχήμα 6.7), η οποία μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας, σε σύγκριση με το N^εH της Arg¹, πιθανά υποδηλώνει ότι αυτό συμμετέχει σ' ένα φαινόμενο ανταλλαγής. Το τελευταίο πιθανά συμβαίνει ανάμεσα σε καταστάσεις δεσμού υδρογόνου και μη. Την ίδια στιγμή τα N^ηH₂ πρωτόνια της Arg⁷ συντονίζονται στα 7.04 ppm, συχνότητα η οποία παρατηρείται στην περίπτωση μη συμμετοχής τους σε δεσμό υδρογόνου. Αύξηση της θερμοκρασίας (Σχήμα 6.10) επιφέρει σημαντική διεύρυνση της παραπάνω κορυφής, ενώ αρχίζει να γίνεται εμφανής η συμβολή μιας ευρείας κορυφής σε υψηλότερο πεδίο (7.9-7.4 ppm), η οποία φαίνεται να συγκλίνει βαθμιαία στην ολοένα διευρυνόμενη κορυφή στα 7.04 ppm (Σχήμα 6.10, φάσμα 310K). Μία τέτοια συμπεριφορά της γουανιδινομάδας της Arg⁷ θα μπορούσε να εξηγηθεί με βάση το Σχήμα 6.9.

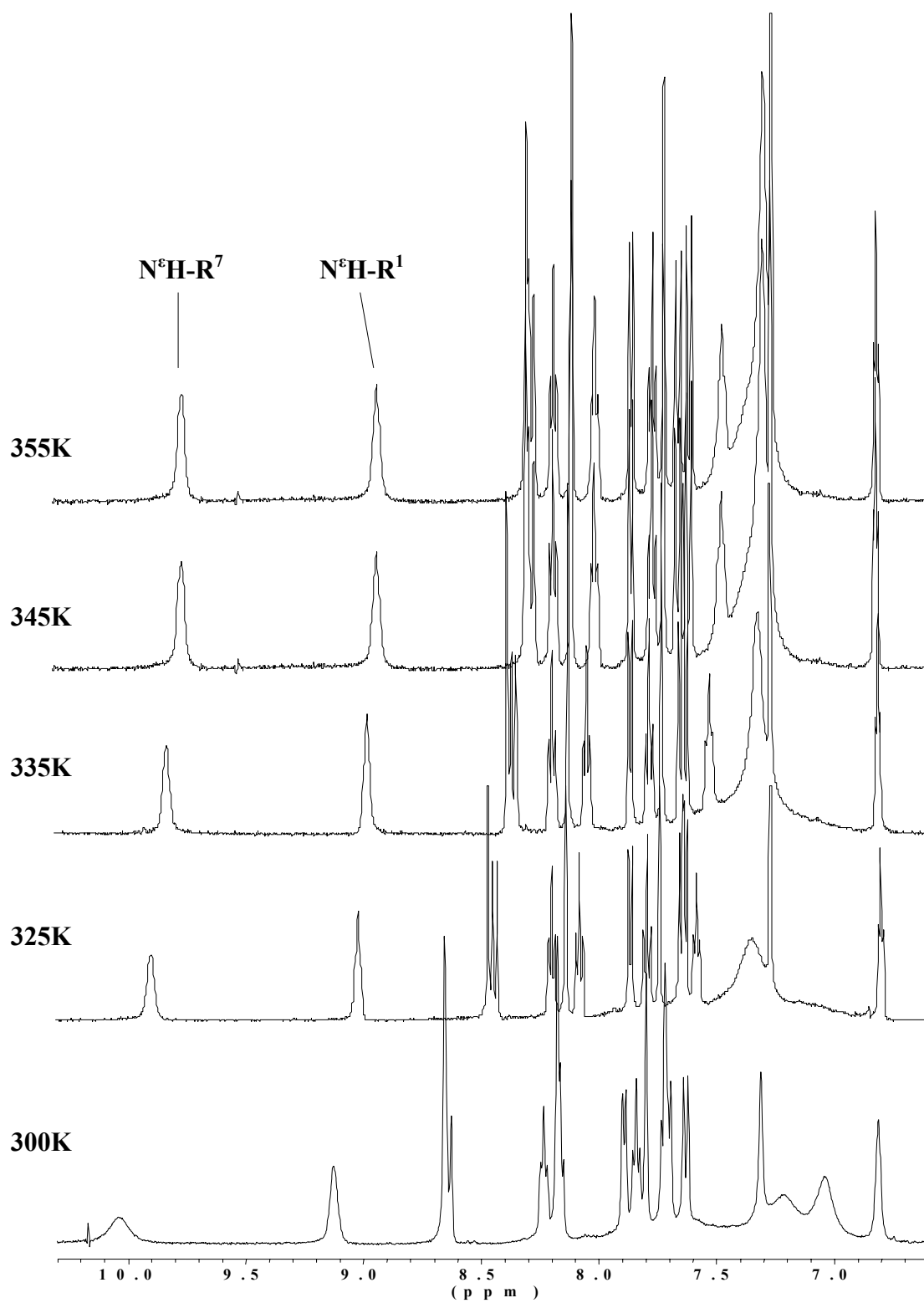


Σχήμα 6.8 Η μεταβολή του εύρους των κορυφών συντονισμού των $N^{\epsilon}H$ πρωτονίων των Arg¹ και Arg⁷ συναρτήσει της θερμοκρασίας.



Σχήμα 6.9 Η συμπεριφορά της γουανιδινομάδας της Arg⁷.

Όπως προκύπτει από την ανάλυση των φασμάτων στην περιοχή των NH_{ϵ} πρωτονίων, τα τέσσερα $N^{\epsilon}H$ πρωτόνια της γουανιδινομάδας της Arg⁷ γίνονται ταυτόσημα λόγω γρήγορης περιστροφής γύρω από όλους τους δεσμούς στους 330 K και συντονίζονται στα 7.30 ppm.

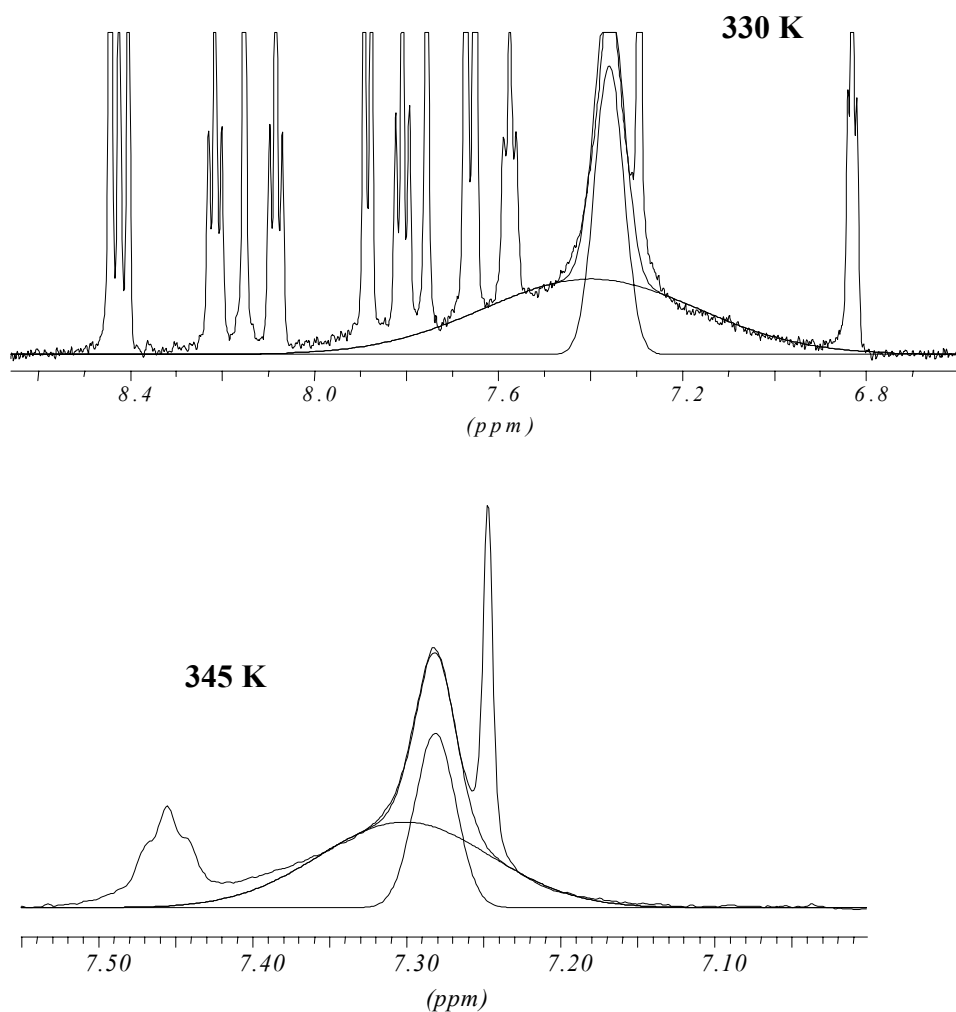


Σχήμα 6.10 $^1\text{H-NMR}$ φάσματα στα 400 MHz του πεπτιδίου **1** στην περιοχή συντονισμού των αμιδικών πρωτονίων, σε διαλύτη DMSO-d_6 , σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Προηγήθηκε λυοφιλοποίηση υδατικού διαλύματος σε $\text{pH}=4.9$.

Σε αντίθεση με την Arg⁷, το N^εH της Arg¹ συντονίζεται σε υψηλότερο πεδίο (9.11 ppm), συχνότητα η οποία επίσης δείχνει ότι μπορεί να συμμετέχει σε δεσμό υδρογόνου (συχνότητα συντονισμού N^εH πρωτονίου σε DMSO-d₆ διάλυμα και σε κατάσταση ελεύθερη ~7.67 ppm^{131,135}). Παράλληλα τα N^ηH πρωτόνια της Arg¹ συντονίζονται σε χαμηλότερο πεδίο (7.22 ppm), τόσο σε σύγκριση με τα αντίστοιχα πρωτόνια της Arg⁷ όσο και με βιβλιογραφικά δεδομένα για τα N^ηH πρωτόνια σε DMSO-d₆ διάλυμα και σε ελεύθερη κατάσταση.

Η αύξηση της θερμοκρασίας δεν προκαλεί ιδιαίτερη μεταβολή στο εύρος της κορυφής του N^εH της Arg¹, σε αντίθεση με το αντίστοιχο της Arg⁷, ενώ υψηλότερες θερμοκρασίες οδηγούν έως και διπλασιασμό του εύρους της (Σχήμα 6.8) Δεν συμβαίνει το ίδιο ωστόσο και για τα N^ηH πρωτόνια. Η κορυφή στα 7.22 ppm που αποδίδεται σε αυτά, εμφανίζεται ήδη πιο ευρεία σε σχέση με τα αντίστοιχα της Arg⁷ στους 300 K, ενώ στους 310 K λόγω τους εύρους της και των αλληλοεπικαλύψεων δεν ταυτοποιείται (Σχήμα 6.10, 310 K). Στους 315 K έχουμε την εμφάνιση μιας νέας κορυφής στα 7.28 ppm (Σχήμα 6.10, 315 K), η οποία γίνεται πιο οξεία με την αύξηση της θερμοκρασίας (Σχήμα 6.10, 325-355 K). Η εμφάνιση αυτής της κορυφής θα πρέπει να αποδοθεί στη σύγκλιση και των τεσσάρων N^ηH πρωτονίων της Arg¹ σε μία συχνότητα συντονισμού στα 7.28 ppm.

Στο Σχήμα 6.11 δίδονται τα αναλυμένα φάσματα στην περιοχή των N^ηH πρωτονίων. Όπως προκύπτει από αυτά, ήδη στη θερμοκρασία 330 K όλα τα N^ηH πρωτόνια και των δύο αργινινών, έχουν γίνει ταυτόσημα λόγω της γρήγορης περιστροφής γύρω από όλους τους δεσμούς της γουανιδινομάδας. Είναι όμως προφανές, ότι η περιστροφή γύρω από το δεσμό N^ε-C^δ είναι πολύ πιο γρήγορη στην περίπτωση της Arg¹, προφανώς ως αποτέλεσμα της ασθενέστερης ισχύος του δεσμού υδρογόνου, στον οποίο συμμετέχουν τα N^ηH πρωτόνια.



Σχήμα 6.11 Ανάλυση της κορυφής συντονισμού των N^H πρωτονίων των Arg¹ και Arg⁷ του πεπτιδίου **1**, στο 1D 1H -NMR φάσμα στα 400 MHz σε διαλύτη DMSO- d_6 , στις θερμοκρασίες 330 και 345 K.

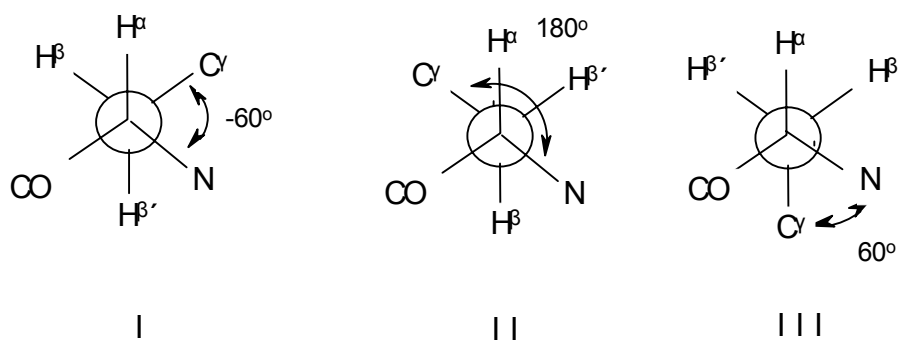
Προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος της παράπλευρης αλυσίδας του Asp⁴ ως υποψήφιας ομάδας για αλληλεπίδραση, λόγω αντίθετου φορτίου, με τις παράπλευρες αλυσίδες των αργινινών 1 και 7, υπολογίστηκε η κατανομή των στροφομερών I ($\chi_1 = -60^\circ$), II ($\chi_1 = 180^\circ$) και III ($\chi_1 = +60^\circ$) (Σχήμα 6.12). Ισχύουν οι σχέσεις :

$${}^3J_{\alpha\beta} = P_I J_t + P_{II} J_g + P_{III} J_g \qquad {}^3J_{\alpha\beta'} = P_I J_t + P_{II} J_t + P_{III} J_g$$

όπου $P_I + P_{II} + P_{III} = 1$ (P: το ποσοστό του κάθε στροφομερούς) οπότε,

$$P_I = ({}^3J_{\alpha\beta} - J_g) / (J_t - J_g) \qquad P_{II} = ({}^3J_{\alpha\beta'} - J_g) / (J_t - J_g) \qquad P_{III} = 1 - P_I - P_{II}$$

Χρησιμοποιώντας ως $J_{\text{trans}}=13.70$ Hz και $J_{\text{gauche}}=2.32$ Hz, όπως προτάθηκε από τους Abraham *et. al.*^{132,133} και με την βοήθεια των σταθερών σύζευξης ${}^3J_{\alpha\beta}=7.54$ Hz και ${}^3J_{\alpha\beta'}=4.41$ Hz, που προέκυψαν από την επίλυση του ABX συστήματος του Asp-C^βH₂, υπολογίστηκαν τα ποσοστά των στροφομερών P_I = 45%, P_{II} = 18% και P_{III} = 37%. Παρ' όλο που το P_{III} δεν ευνοείται ενεργειακά έναντι των άλλων στροφομερών, λόγω στερεοχημικών παρεμποδίσεων, εν τούτοις το ποσοστό 37% θεωρείται αρκετά υψηλό και πιθανά επιβάλλεται από διαμορφωτικούς λόγους. Η εκτίμηση ότι η παράπλευρη αλυσίδα του Asp⁴ είναι η ομάδα που αλληλεπιδρά και με τις δύο γουανιδινομάδες (Arg¹ και Arg⁷), επιβεβαιώνεται από το NOESY φάσμα, στο οποίο ανιχνεύονται τα ασθενή και μέσης έντασης NOE φαινόμενα, ανάμεσα στα Arg¹-N^εH/Asp⁴-NH, Arg¹-C^γH /Asp⁴-NH, Arg¹-N^εH/Asp⁴-C^βH και Asp⁴-C^βH/Arg⁷-NH (Πίνακας 6.2). Η ανίχνευση αυτών των NOE φαινομένων, σαφώς υποδηλώνει ότι οι παράπλευρες αλυσίδες των Arg¹ και Arg⁷ προσεγγίζουν την αντίστοιχη αλυσίδα του Asp⁴. Αυτό είναι πολύ πιθανό, καθώς στην περίπτωση της 3₁₀ έλικας (περίπτωση που σαφώς αποδεικνύεται για το πεπτίδιο **1**), οι παράπλευρες αλυσίδες και των τριών αυτών αμινοξέων αναμένεται να βρίσκονται στην ίδια πλευρά της έλικας.



Σχήμα 6.12 Τα στροφομερή I, II και III.

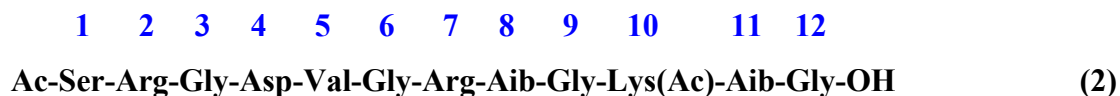
Εκτός όλων όσων αναφέρθηκαν έως τώρα για το πεπτίδιο **1**, ενδιαφέρον παρουσιάζει και το γεγονός ότι, επιβεβαιώνεται πειραματικά η υπόθεση πάνω στην οποία στηρίχθηκε ο σχεδιασμός των ελικοειδούς τύπου RGD αναλόγων. Ποιο συγκεκριμένα, η υπόθεση ότι όταν η αλληλουχία -Lys(Ac)-Aib-Gly- ενσωματωθεί στο C-τελικό άκρο ενός πεπτιδίου, που ικανοποιεί την προϋπόθεση του ελάχιστου απαιτούμενου μήκους, επάγει 3₁₀ έλικα, επιβεβαιώνεται και σε αυτή την περίπτωση. Η αλληλουχία αυτή λειτουργεί σαν εκμαγείο 3₁₀ έλικας, λόγω της αλληλεπίδρασης

του Ac-CO της πλευρικής αλυσίδας της Lys, με το NH της Gly. Η παρουσία αυτής της αλληλεπίδρασης αποδεικνύεται από το συνδυασμό των πειραματικών αποτελεσμάτων και συγκεκριμένα, από τα μέτριας έντασης NOE φαινόμενα που παρατηρούνται ανάμεσα στα $\text{Lys}^{10}\text{-C}^\beta\text{H/Gly}^{12}\text{-NH}$ και $\text{Lys}^{10}\text{-C}^\gamma\text{H/Gly}^{12}\text{-NH}$ πρωτόνια, καθώς και το χαμηλό συντελεστή θερμοκρασίας του $\text{Gly}^{12}\text{-NH}$ (Πίνακες 6.2 και 6.3).

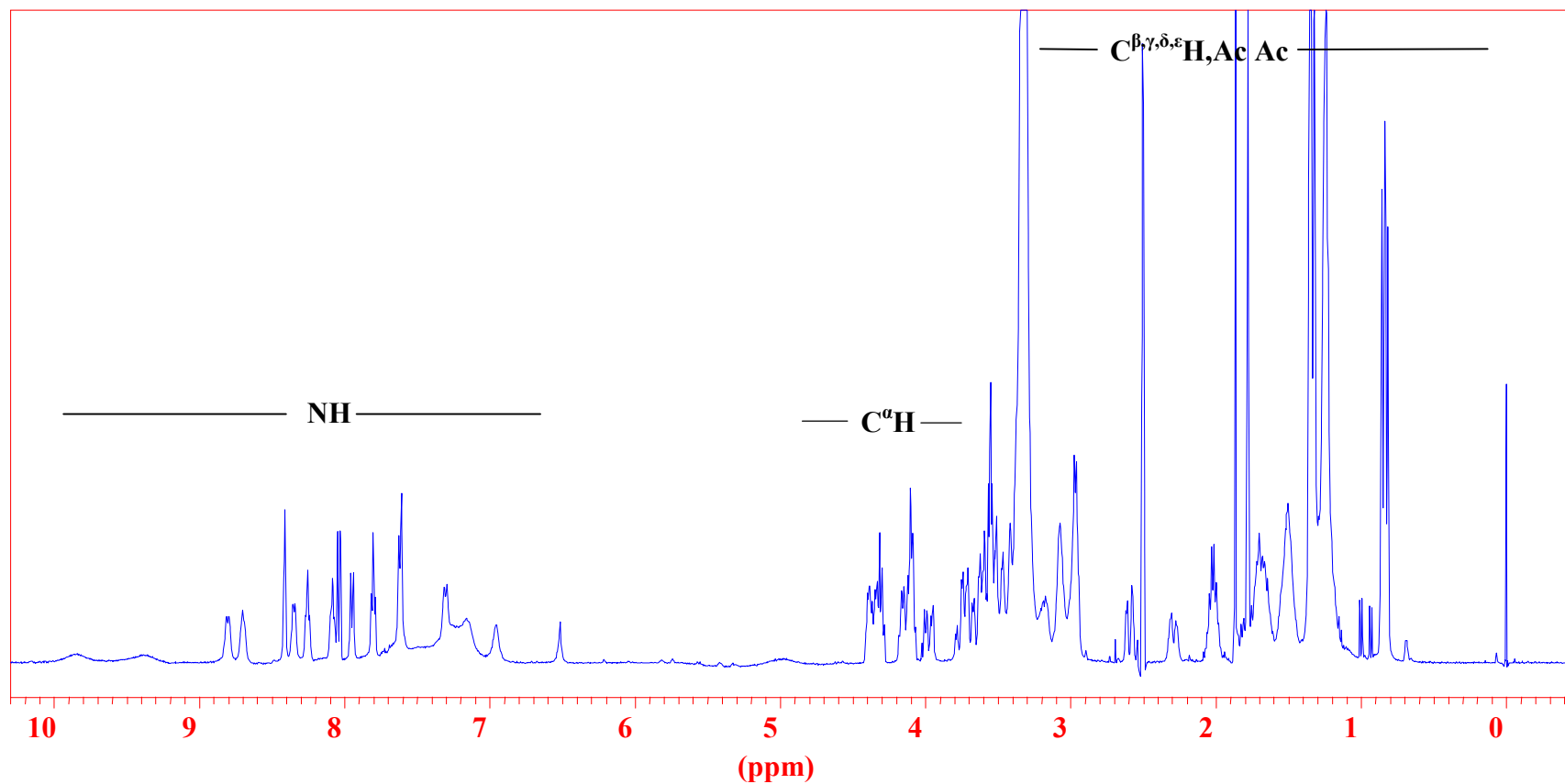
Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα της διαμορφωτικής ανάλυσης του πεπτιδίου **1** καταλήγουμε στα παρακάτω συμπεράσματα :

- Ο πεπτιδικός σκελετός του πεπτιδίου **1** προσλαμβάνει διαμόρφωση 3_{10} έλικας.
- Η αλληλουχία $\text{-Lys(Ac)-Aib-Gly-OH}$ στο C-τελικό άκρο του πεπτιδίου λειτουργεί ως εκμαγείο ελικοειδούς δομής¹³⁴ μέσω της αλληλεπίδρασης των ομάδων $\text{Ac-CO} \dots \text{HN-Gly}^{12}$.
- Οι γουανιδινομάδες των Arg^1 και Arg^7 αλληλεπιδρούν με την παράπλευρη αλυσίδα του Asp^4 μέσω των $\text{N}^\epsilon\text{H}$ και N^ηH πρωτονίων.
- Η αλληλεπίδραση της γουανιδινομάδας της Arg^7 είναι αρκετά ισχυρότερη σε σύγκριση με αυτή της γουανιδινομάδας της Arg^1 .

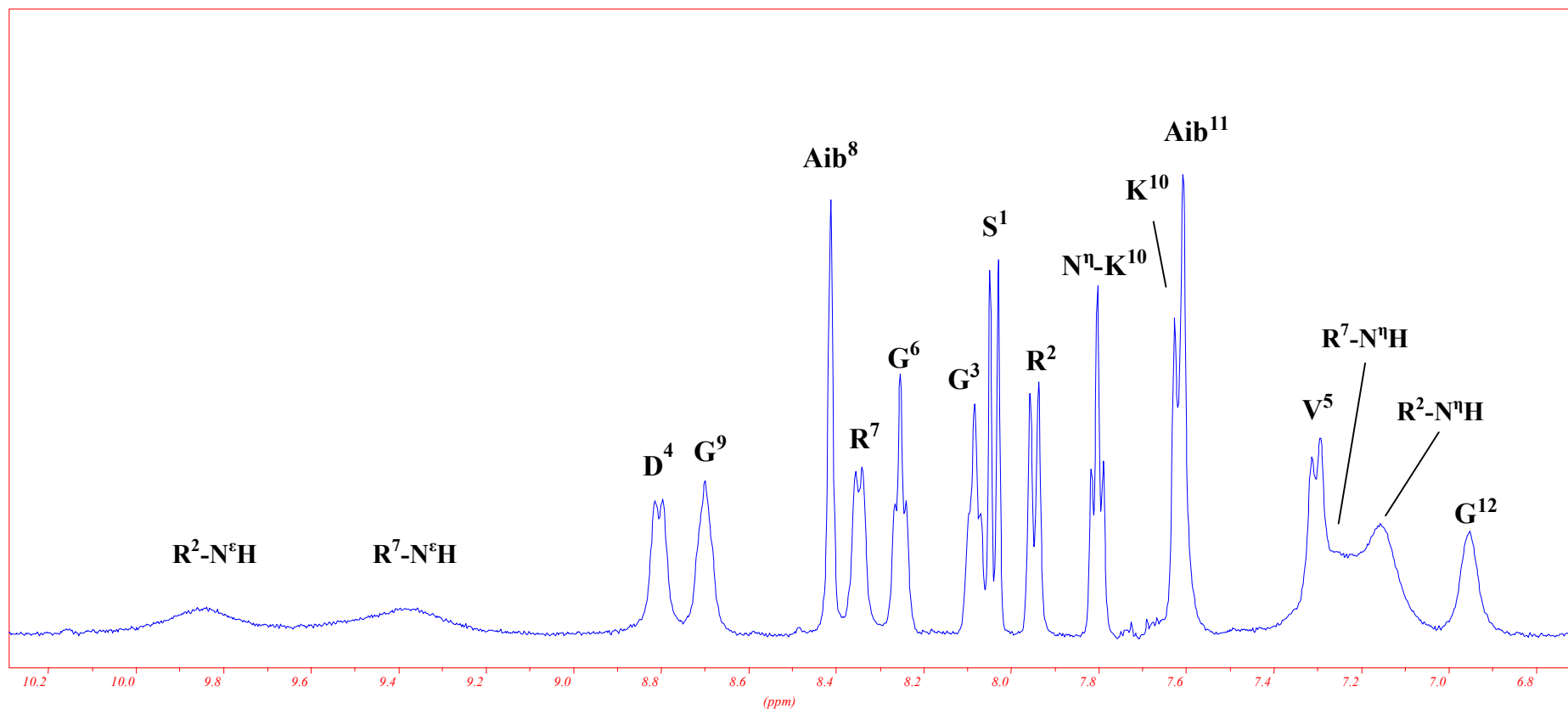
6.2 Ανάλυση των $^1\text{H-NMR}$ φασμάτων του πεπτιδίου



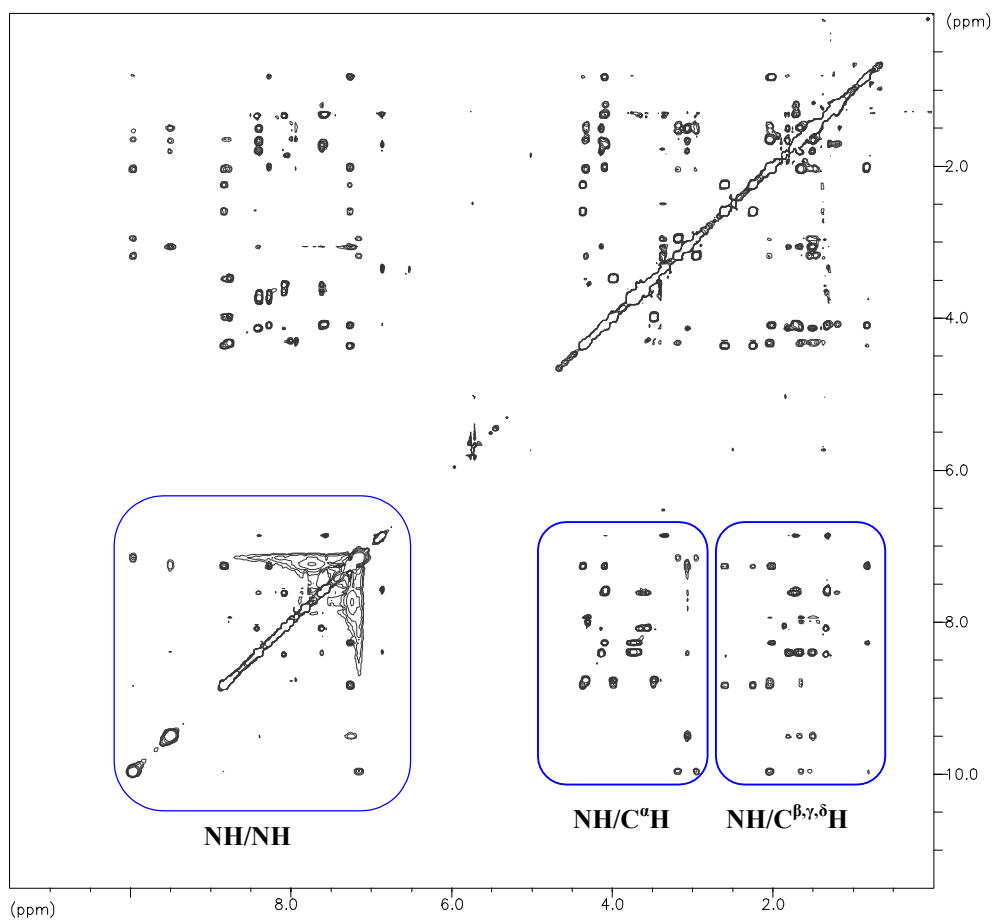
Στο σχήμα 6.13 παρουσιάζεται το 1D $^1\text{H-NMR}$ στα 400MHz του πεπτιδίου **2** στους 300 K σε διάλυμα DMSO-d_6 . Το φάσμα χωρίζεται σε τρεις περιοχές, αυτή μεταξύ 6.5 και 10.0 ppm για τα αμιδικά πρωτόνια του πεπτιδικού σκελετού και τα $\text{N}^\epsilon\text{H}$ των δύο αργινινών, την περιοχή μεταξύ 3.2 και 4.5 ppm για τα C^αH , και αυτή από 3.2 έως 0.5 για τα υπόλοιπα πρωτόνια του πεπτιδίου. Στο σχήμα 6.14 διακρίνεται η περιοχή του 1D $^1\text{H-NMR}$ για τις κορυφές συντονισμού των NH, όπως και ο χαρακτηρισμός των κορυφών. Όπως και στην περίπτωση του πεπτιδίου **1**, δεν παρατηρούνται σήματα για το πρωτόνιο του C-τελικού καρβοξυλίου και του αντίστοιχου της πλευρικής αλυσίδας του Asp, αφού αμφότερα είναι αποπρωτονιωμένα στο pH 4.9. Παρουσιάζονται επίσης, το NOESY $^1\text{H-NMR}$ φάσμα στα 400 MHz (σχήμα 6.15) και μεγενθυμένα τμήματά του, που αντιστοιχούν στην περιοχή NH-NH, όπου σημειώνονται οι $\text{NH}_{(i,i+1)}$ NOE αλληλεπιδράσεις (σχήμα 6.16), την περιοχή NH/ C^αH (Σχήμα 6.17) και την αντίστοιχη NH/ C^βH (Σχήμα 6.18) Τέλος παρατίθεται το TOCSY $^1\text{H-NMR}$ φάσμα στα 400 MHz (σχήμα 6.19), καθώς και η μεγενθυμένη NH/ C^αH περιοχή του (σχήμα 6.20).



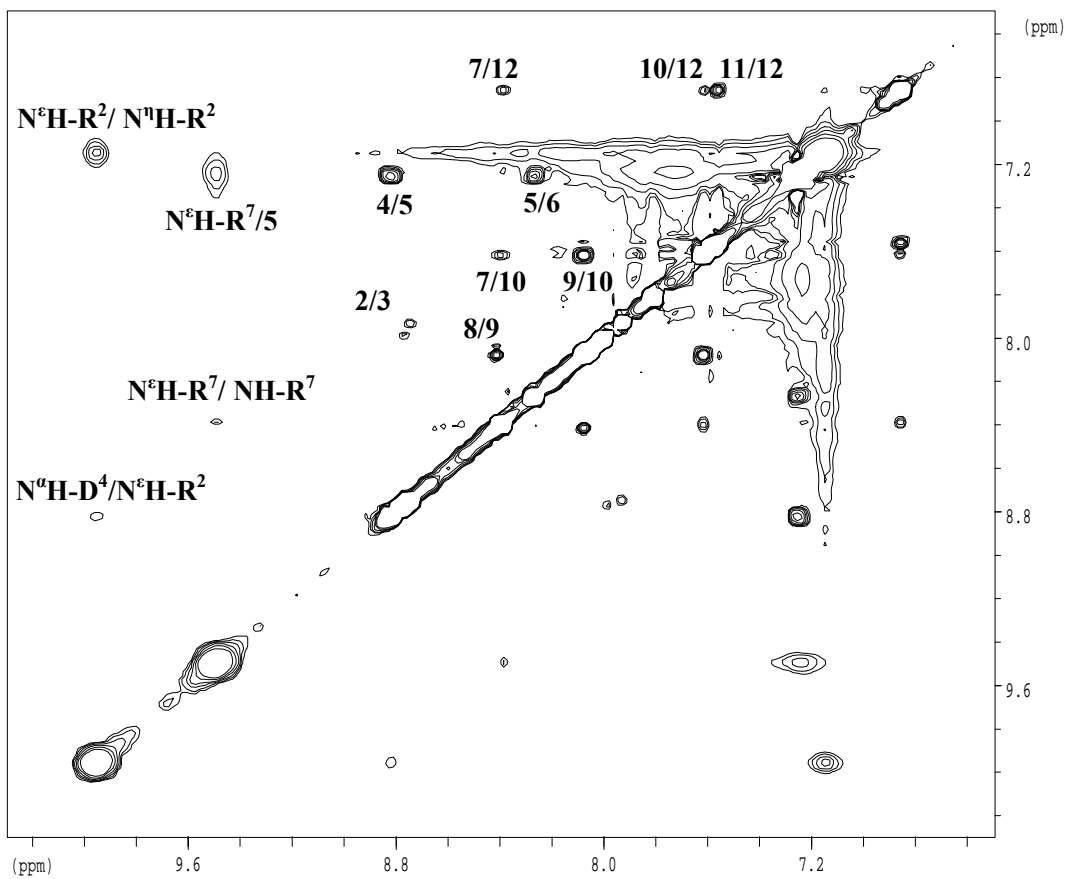
Σχήμα 6.13 1D ¹H-NMR φάσμα στα 400 MHz του πεπτιδίου **2**, συγκέντρωσης 8mM σε διαλύτη DMSO-d₆, θερμοκρασίας 300 K. Προηγήθηκε λυοφιλοποίηση υδατικού διαλύματος του δείγματος, pH 4.96. Χρησιμοποιήθηκαν μοριακά κόσκινα.



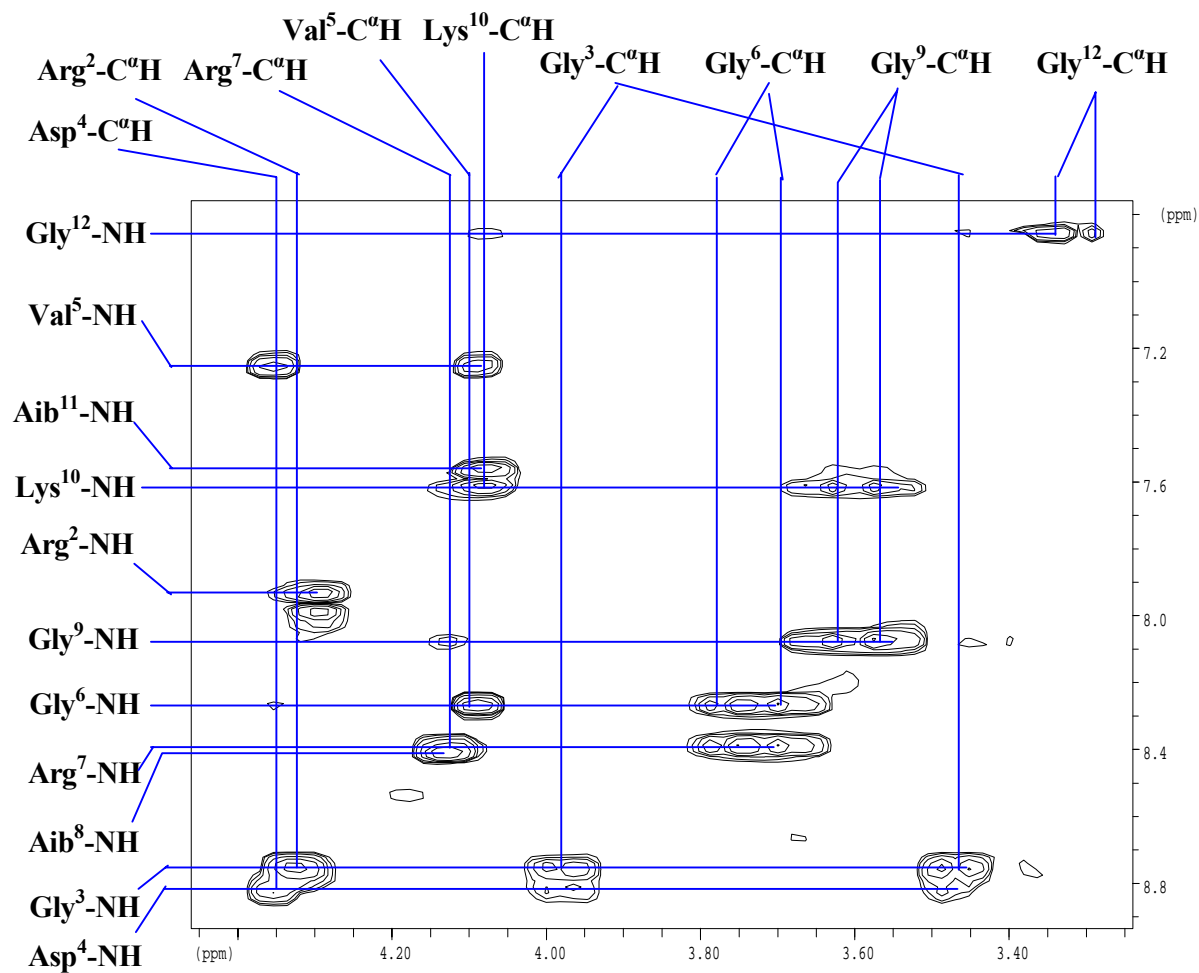
Σχήμα 6.14 1D $^1\text{H-NMR}$ φάσμα στα 400 MHz του πεπτιδίου **2** για την περιοχή συντονισμού των αμιδικών πρωτονίων. Το δείγμα είναι συγκέντρωσης 8mM σε διαλύτη DMSO-d_6 και θερμοκρασία 300 K. Προηγήθηκε λυοφιλοποίηση του πεπτιδίου από υδατικό διάλυμα σε $\text{pH}=4.96$.



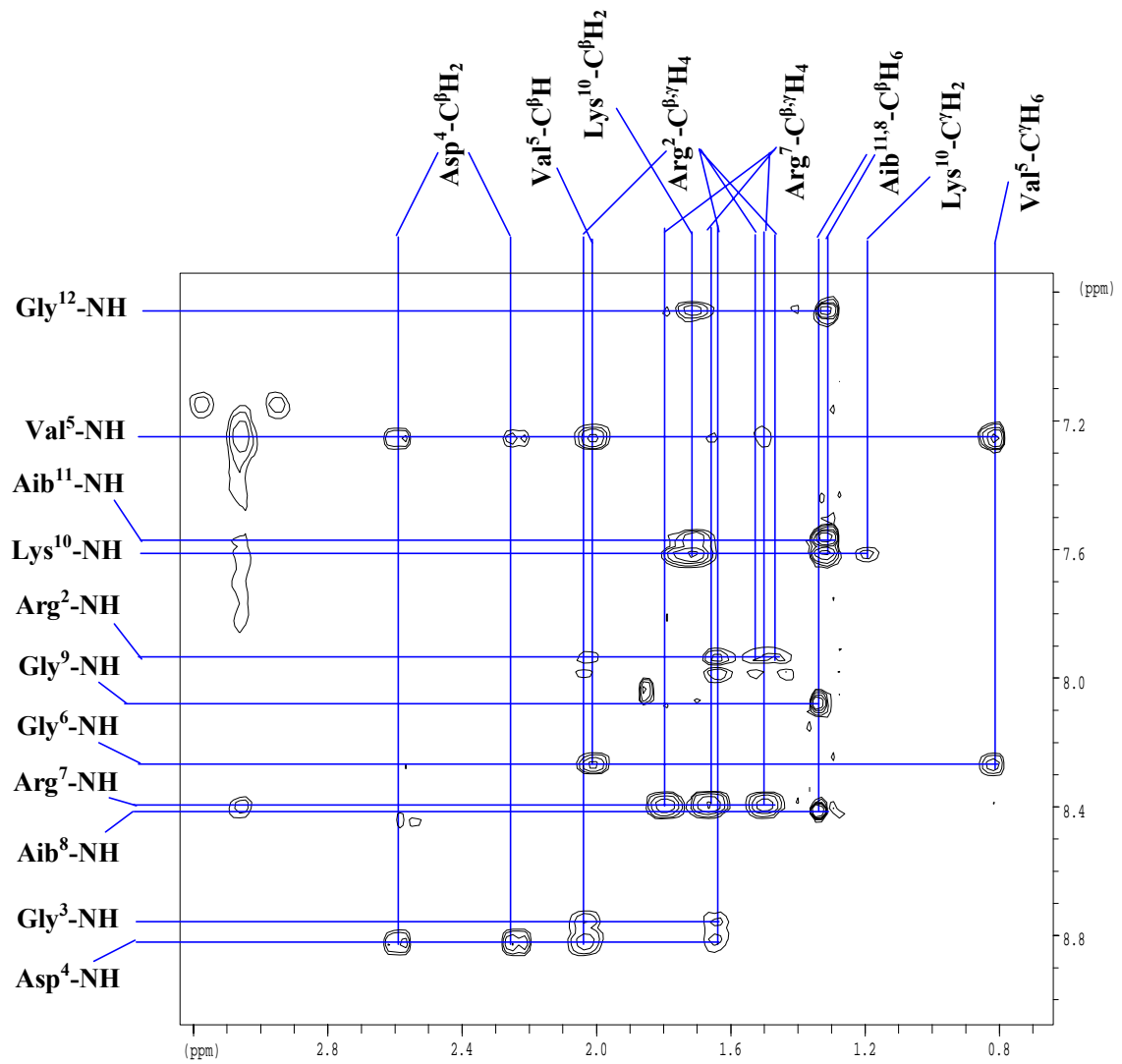
Σχήμα 6.15 $^1\text{H-NMR}$ NOESY φάσμα στα 400 MHz του πεπτιδίου **2** σε διαλύτη DMSO-d_6 , συγκέντρωσης 8mM, σε θερμοκρασία 300 K. Ελήφθησαν 2048 σημεία από 512 πειράματα με 64 σαρώσεις με χρόνο μίξης 350ms. Το δείγμα περιείχε μοριακά κόσκινα, ενώ είχε προηγηθεί ρύθμιση του pH υδατικού διαλύματός του, στα 4.96.



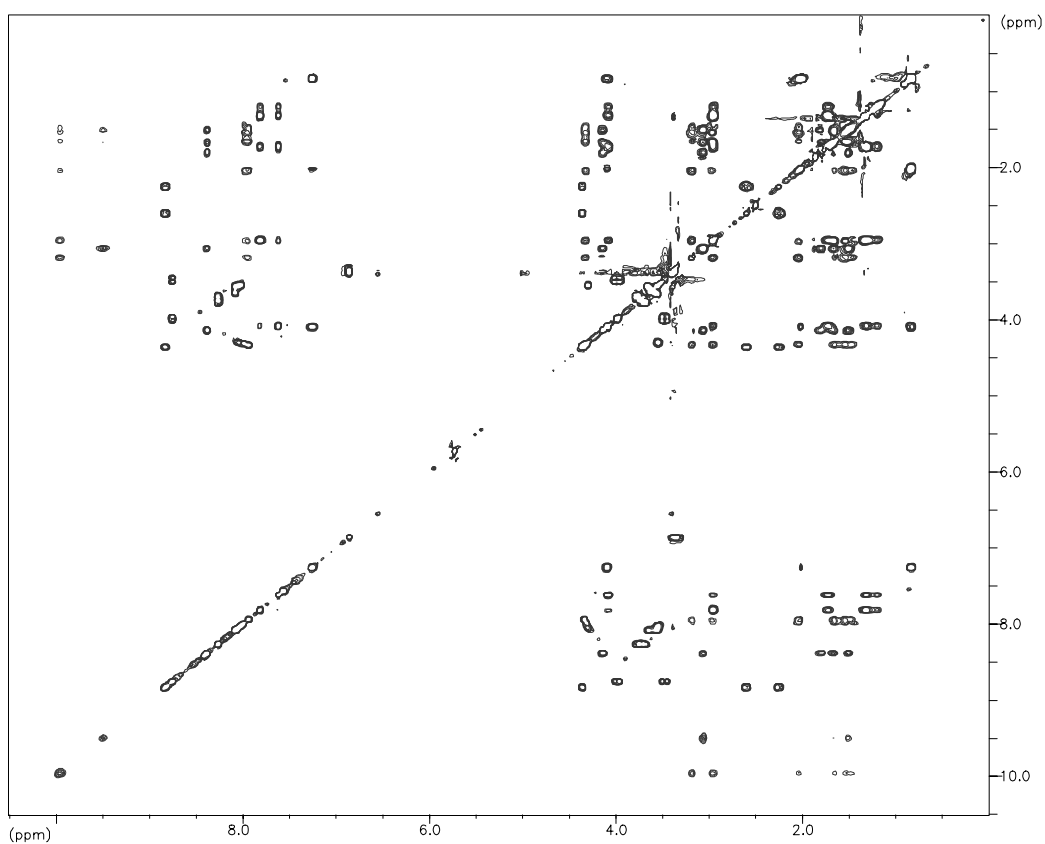
Σχήμα 6.16 Περιοχή NH/NH του φάσματος NOESY στα 400 MHz του πεπτιδίου 2.



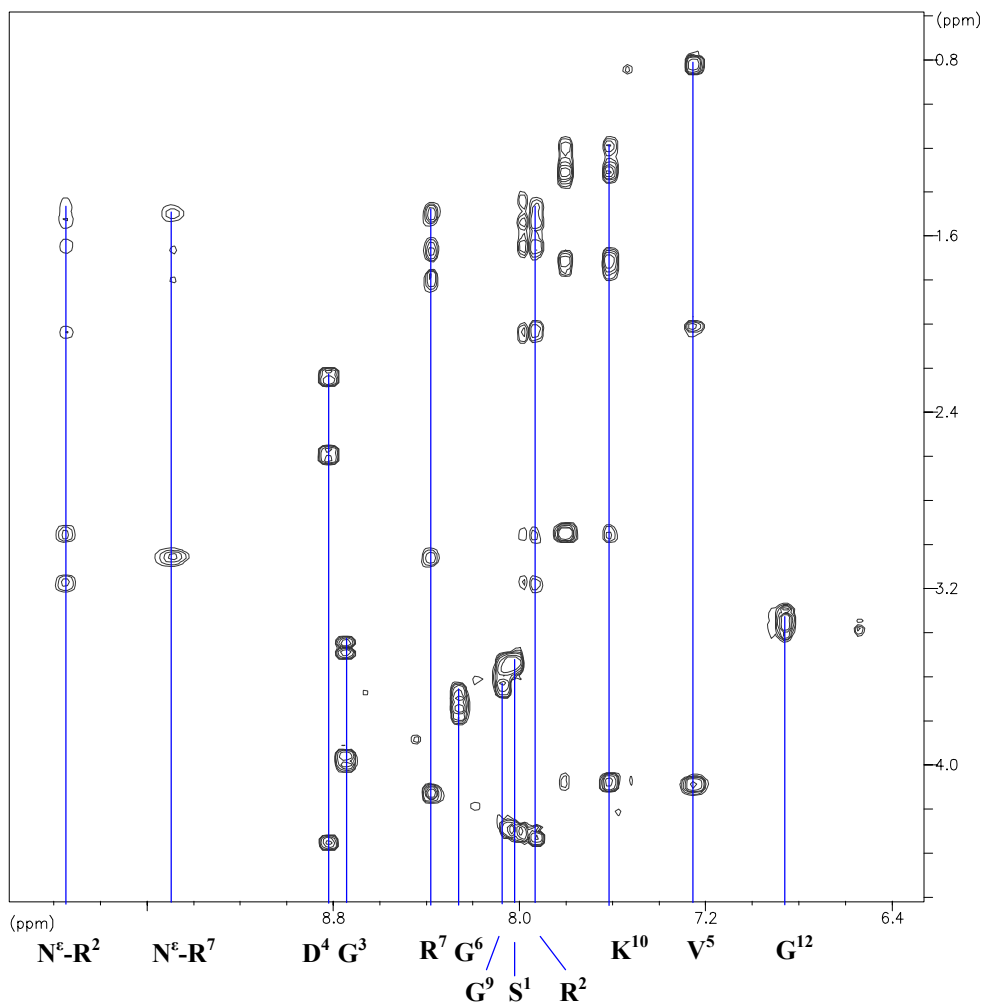
Σχήμα 6.17 Περιοχή NH/C^αH του NOESY φάσματος στα 400 MHz του πεπτιδίου 2



Σχήμα 6.18 Περιοχή NH/C^{β,γ}H του NOESY φάσματος στα 400 MHz του πεπτιδίου 2

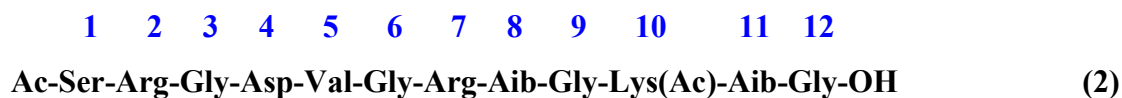


Σχήμα 6.19 ^1H -NMR φάσμα TOCSY στα 400 MHz του πεπτιδίου **2**, σε διαλύτη DMSO- d_6 , συγκέντρωσης 8mM, σε θερμοκρασία 300 K. Πραγματοποιήθηκαν 512 πειράματα και ελήφθησαν 2048 σημεία, με αριθμό σαρώσεων 48 και χρόνο μίξης 100ms. Προηγήθηκε ρύθμιση του pH σε υδατικό διάλυμα του πεπτιδίου στα 4.96 και λυοφιλοποίηση. Στο δείγμα χρησιμοποιήθηκαν μοριακά κόσκινα.



Σχήμα 6.20 Περιοχή NH/C^αH του ¹H-NMR φάσματος TOCSY του πεπτιδίου **2** στα 400 MHz. Τα σημεία τομής των συνεχών γραμμών, που ενώνουν τα σημεία διασταύρωσης, με τον οριζόντιο άξονα, αντιστοιχούν στις συχνότητες συντονισμού των αμιδικών πρωτονίων κάθε αμινοξέος.

6.2.1 Χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του πεπτιδίου



Από το 1D $^1\text{H-NMR}$ φάσμα στην περιοχή συντονισμού των αμιδικών πρωτονίων (σχήμα 6.14), διακρίνουμε δύο απλές κορυφές συντονισμού, στα 7.60 και 8.41 ppm. Στο TOCSY φάσμα (Σχήμα 6.20) και την περιοχή των C^αH πρωτονίων, παρατηρούμε την απουσία σημείων διασταύρωσης που θα οφειλόταν στην σύζευξη των παραπάνω NH και C^αH . Άρα μπορούμε να αποδώσουμε τις κορυφές στα 7.60 και 8.41 ppm στα αμιδικά πρωτόνια των δύο Aib, τα οποία δεν διαθέτουν $\alpha\text{-H}$ πρωτόνια. Επιπλέον, λόγω της παρουσίας του ελεύθερου καρβοξυλίου, το αμιδικό πρωτόνιο της C-τελικής Gly¹² είναι επιπλέον προστατευμένο και συντονίζεται σε πιο ισχυρό πεδίο, σε σχέση με τα αμιδικά πρωτόνια των υπολοίπων γλυκινών. Πράγματι, στο 1D $^1\text{H-NMR}$ φάσμα παρατηρούμε μία τριπλή κορυφή στα 6.95 ppm, η οποία πρέπει να αντιστοιχεί στο NH της Gly¹². Το τελευταίο δίνει σημεία διασταύρωσης στα 3.29 και 3.33 ppm ως αποτέλεσμα της σύζευξης με τα δύο C^αH πρωτόνια της. Στο NOESY και την περιοχή των NH, υπάρχει σημείο διασταύρωσης μεταξύ του NH της Gly¹² και του NH του Aib στα 7.60 ppm (Σχήμα 6.16), επομένως το τελευταίο είναι το NH του Aib¹¹, ενώ το NH στα 8.41 ppm ανήκει στο Aib⁸.

Το επόμενο $\text{NH}_i/\text{NH}_{i+1}$ σημείο διασταύρωσης στο NOESY, όπου $i+1$ το Aib¹¹, θα πρέπει να οφείλεται στην αλληλεπίδρασή του με το NH της Lys¹⁰. Η υπόθεση αυτή επαληθεύεται από το TOCSY, όπου παρατηρούμε χαρακτηριστικά σημεία διασταύρωσης για το σύστημα πρωτονίων της Lys, δηλαδή την σύζευξη του NH με τα C^αH , C^βH , C^γH , C^δH , και $\text{C}^\epsilon\text{H}$ πρωτόνια. Με συνδυασμό των παραπάνω, αποδίδουμε στο αμιδικό πρωτόνιο της Lys¹⁰, τη χημική μετατόπιση στα 7.61 ppm, ενώ η ταυτοποίηση των υπολοίπων πρωτονίων γίνεται από το TOCSY. Οι χημικές μετατοπίσεις τους φαίνονται στον πίνακα 6.4. Η τριπλή κορυφή στα 7.80 ppm, όπως φαίνεται στο 1D φάσμα, θα μπορούσε να είναι είτε το N^{η}H της Lys, είτε το NH κάποιας Gly. Και πάλι από το TOCSY, επιβεβαιώνεται ότι ανήκει στην Lys, αφού δίνει σημεία διασταύρωσης με τα υπόλοιπα πρωτόνια της.

Το NH της Gly⁹, μπορεί να ταυτοποιηθεί από το NOE φαινόμενο με το NH της Lys¹⁰ και από το γεγονός ότι δίνει σημείο διασταύρωσης μόνο με C^αH στο

TOCSY. Έτσι αποδίδουμε στα NH και C^αH₂ της Gly⁹ τις χημικές μετατοπίσεις 8.08 και 3.54/3.66 ppm αντίστοιχα.

Το Asp⁴, διαθέτει μόνο τα β,β' πρωτόνια στην πλευρική του αλυσίδα και έτσι ταυτοποιείται εύκολα από το TOCSY φάσμα, όπου δίνει τις συζεύξεις NH/C^αH και NH/C^{β,β'}H₂. Το ίδιο συμβαίνει και με τη Ser¹, ωστόσο μπορούμε να διακρίνουμε το Asp, διότι τα β,β' πρωτόνια του είναι περισσότερο προστατευμένα από αυτά της Ser, λόγω της παρουσίας του ελεύθερου καρβοξυλίου, με αποτέλεσμα να συντονίζονται σε ισχυρότερο πεδίο. Έτσι στο NH του Asp⁴, αποδίδουμε την χημική μετατόπιση στα 8.80 ppm, με το C^αH στα 4.35 ppm και τα C^{β,β'}H₂ στα 2.23 και 2.64 ppm. Το NH της Ser¹ ταυτοποιείται στα 8.03 ppm, το C^αH στα 4.28 ppm και τα C^{β,β'}H₂ στα 3.55 ppm. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, θα αναμέναμε διαφοροποίηση μεταξύ των δύο βH της Ser, ωστόσο πιθανά λόγω αλληλοεπικάλυψης των σημάτων, δεν κατέστη δυνατή η ταυτοποίηση και των δύο πρωτονίων.

Με βάση τη γνωστή χημική μετατόπιση του NH του Asp⁴, μπορούμε να ταυτοποιήσουμε τις αντίστοιχες μετατοπίσεις των γειτονικών αμιδικών πρωτονίων της Gly³ και Val⁵, από το NOESY φάσμα. Με τη βοήθεια του TOCSY, όπου η Gly εμφανίζει σημείο διασταύρωσης μόνο στην περιοχή των C^αH, αποδίδουμε τις συχνότητες συντονισμού, 8.70 ppm στο NH της Gly³ και 7.30 ppm στο NH της Val⁵. Από το TOCSY ταυτοποιούνται και τα υπόλοιπα πρωτόνια των δύο αμινοξέων. Το NH της τέταρτης Gly του πεπτιδίου της θέσης έξι στην αλληλουχία και επομένως θα πρέπει να είναι αυτό στα 8.25 ppm.

Στο TOCSY φαίνονται τα σημεία διασταύρωσης που είναι χαρακτηριστικά για το σύστημα πρωτονίων της Arg (πέντε ή έξι συνολικά, λόγω διαφοροποίησης των C^{β,β'}H₂ και C^{δ,δ'}H₂) στην περιοχή των C^α, C^β, C^γ και C^δH πρωτονίων. Η διάκριση μεταξύ των δύο Arg μπορεί να γίνει από το NOESY, στην περιοχή των NH/NH, όπου παρατηρούμε το σημείο διασταύρωσης από την αλληλεπίδραση του NH της Gly³ και του NH της Arg². Στη συνέχεια ταυτοποιούνται όλα τα πρωτόνια των δύο Arg, με παράλληλη ανάλυση των NOESY και TOCSY φασμάτων. Όπως και στην περίπτωση του πεπτιδίου **1**, τα N^εH βρίσκονται σε αρκετά ασθενές πεδίο, στα 9.50 ppm για αυτό της Arg⁷ και στα 9.94 ppm για το αντίστοιχο της Arg², ενώ τα N^ηH πρωτόνια ταυτοποιούνται στα 7.24 και 7.14 ppm, αντίστοιχα. Οι χημικές μετατοπίσεις όλων των πρωτονίων του μορίου παρουσιάζονται στον πίνακα 6.4.

Πίνακας 6.4 Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του πεπτιδίου **2**

A.A	NH	C ^α H	C ^β H	C ^γ H	C ^δ H	Άλλα πρωτόνια
Ser ¹	8.03	4.28	3.55			Ac 1.83
Arg ²	7.92	4.28	1.66/2.01	1.50	2.95/3.18	N ^ε H 9.94 N ^η H 7.14
Gly ³	8.70	3.47/3.98				
Asp ⁴	8.80	4.35	2.23/2.68			
Val ⁵	7.30	4.08	1.96/2.00	0.81		
Gly ⁶	8.25	3.69/3.75				
Arg ⁷	8.38	4.12	1.66/1.77	1.50	3.06	N ^ε H 9.50 N ^η H 7.24
Aib ⁸	8.41		1.34			
Gly ⁹	8.08	3.54/3.66				
Lys ¹⁰	7.61	4.07	1.70	1.19	1.31	N ^η H 7.80 Ac 1.83
Aib ¹¹	7.60		1.31			
Gly ¹²	6.95	3.29/3.33				

6.2.2 Διαμορφωτική ανάλυση του πεπτιδίου

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Ac-Ser-Arg-Gly-Asp-Val-Gly-Arg-Aib-Gly-Lys(Ac)-Aib-Gly-OH (2)

Οι εντάσεις των NOE φαινομένων που παρατηρούνται στο NOESY φάσμα, αξιολογήθηκαν ποιοτικά και παρουσιάζονται σχηματικά στον πίνακα 6.5. Ο μεγάλος αριθμός NOE φαινομένων, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το μόριο παρουσιάζει μειωμένο βαθμό ευκαμψίας και πρέπει να έχει μία κανονική δομή. Χαρακτηριστικά είναι τα πολλά, ισχυρά και μέσης έντασης, NOEs του τύπου $d_{NN(i,i+1)}$ και $d_{aN(i,i+1)}$, σύμφωνα με τα οποία, μπορούμε να αποκλείσουμε την πιθανότητα δομής β-πτυχωτού φύλλου. Στο C-τελικό τμήμα του πεπτιδίου **2**, όπως και στην περίπτωση του **1**, παρατηρούμε αρκετά NOE φαινόμενα μακρινής απόστασης. Πιο συγκεκριμένα, ασθενούς έντασης NOE του τύπου $d_{NN(i,i+2)}$ υφίστανται μεταξύ των αμινοξέων 10/12 και 9/11, ενώ ασθενούς και μέτριας έντασης NOE του τύπου $d_{aN(i,i+2)}$ παρατηρούνται ανάμεσα στα 10/12, 9/11 και 7/9 (Σχήματα 6.16, 6.17, Πίνακας 6.5). Το γεγονός αυτό

Πίνακας 6.5 Τα NOE φαινόμενα και οι εντάσεις τους που παρατηρούνται μεταξύ πρωτονίων διαφορετικών καταλοίπων για το πεπτίδιο Ac-S-R-G-D-V-G-R-Aib-G-K(Ac)-Aib-G-OH. Τα μακρινής απόστασης NOE είναι με έντονη γραφή, ενώ δεν περιλαμβάνονται αυτά μεταξύ πρωτονίων του ίδιου αμινοξέος.

NOE	Ένταση	NOE	Ένταση
Arg ² -NH/Gly ³ -NH	Ασθενής	Gly ⁶ -C ^{α,α'} H ₂ /Arg ⁷ -NH	Ισχυρή
Arg ² -C ^{β,β'} H ₂ /Gly ³ -NH	Ασθενής	Arg ⁷ -NH/Lys ¹⁰ -NH	Ασθενής
Arg²-C^{β,β'}H₂/Asp⁴-NH	Ασθενής	Arg⁷-NH/Gly¹²-NH	Ασθενής
Arg ² -N ^ε H/Val ⁵ -C ^{γ,γ'} H ₆	Ασθενής	Arg ⁷ -C ^α H/ Gly ⁹ -NH	Ασθενής
Arg ² -N ^ε H/Asp ⁴ -NH	Ασθενής	Aib ⁸ -NH/Gly ⁹ -NH	Μέτρια
Gly ³ -C ^{α,α'} H ₂ /Asp ⁴ -NH	Μέτρια	Gly ⁹ -NH/Lys ¹⁰ -NH	Ισχυρή
Asp ⁴ -NH/Val ⁵ -NH	Ισχυρή	Gly⁹-NH/Aib¹¹-NH	Ασθενής
Asp ⁴ -C ^α H/Val ⁵ -NH	Ισχυρή	Gly ⁹ -C ^{α,α'} H ₂ /Lys ¹⁰ -NH	Μέτρια
Asp ⁴ -C ^{β,β'} H ₂ /Val ⁵ -NH	Ασθενής	Gly⁹-C^{α,α'}H₂/Aib¹¹-NH	Μέτρια
Val ⁵ -NH/Gly ⁶ -NH	Ισχυρή	Lys¹⁰-NH/Gly¹²-NH	Ασθενής
Val⁵-NH/Arg⁷-N^εH	Ασθενής	Lys¹⁰-C^αH/Gly¹²-NH	Ασθενής
Val ⁵ -C ^α H/Gly ⁶ -NH	Ισχυρή	Lys ¹⁰ -C ^α H/Aib ¹¹ -NH	Ισχυρή
Val ⁵ -C ^β H/Gly ⁶ -NH	Μέτρια	Lys ¹⁰ -C ^{β,β'} H ₂ /Aib ¹¹ -NH	Μέτρια
Val ⁵ -C ^{γ,γ'} H ₆ /Gly ⁶ -NH	Ασθενής	Lys¹⁰-C^{β,β'}H₂/Gly¹²-NH	Μέτρια
Val⁵-NH/Arg⁷-C^{β,β'}H₂	Ασθενής	Aib ¹¹ -NH/Gly ¹² -NH	Μέτρια
Val⁵-NH/Arg⁷-C^{γ,γ'}H₂	Ασθενής	Aib ¹¹ -C ^{β,β'} H ₆ /Gly ¹² -NH	Μέτρια

υποδηλώνει ότι, σε αυτές τις συνθήκες το C-τελικό τμήμα του πεπτιδικού σκελετού προσλαμβάνει μία διαμορφωτικά περιορισμένη δομή. Το γεγονός αυτό ενισχύεται και από τις μικρές απόλυτες τιμές των συντελεστών θερμοκρασίας των αμιδικών πρωτονίων των αμινοξέων Gly⁹, Lys¹⁰, Aib¹¹ και Gly¹² (Πίνακας 6.6). Ιδιαίτερα το NH πρωτόνιο της Gly¹² φαίνεται να συμμετέχει σε ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου και σε συνδυασμό με τα πειραματικά δεδομένα για το πεπτίδιο **1**, αυτός ο δεσμός πιθανά συμβαίνει με το CO της ακετυλο-ομάδας της παράπλευρης αλυσίδας της Lys¹⁰. Η εκτίμηση αυτή ενισχύεται και από τη μέτριας έντασης NOE αλληλεπίδραση μεταξύ των C^βH₂ πρωτονίων της Lys¹⁰ και του αμιδικού πρωτονίου της Gly¹².

Λαμβάνοντας υπόψη τα $d_{\alpha N(i,i+2)}$ NOE φαινόμενα που αναφέρθηκαν παραπάνω, την ύπαρξη NOE αλληλεπίδρασης $d_{NN(i,i+3)}$ μεταξύ των Arg⁷ και Lys¹⁰,

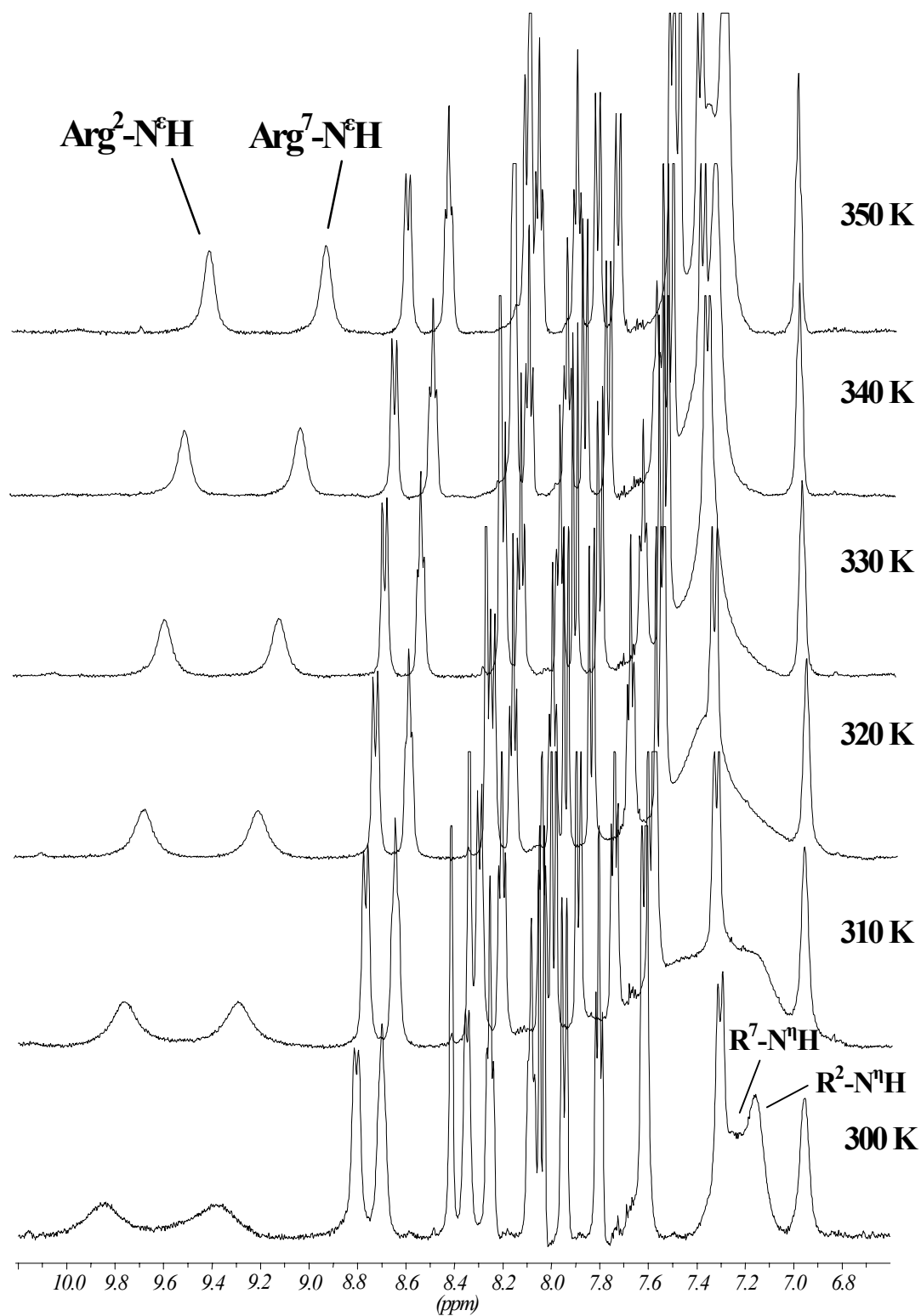
Πίνακας 6.6 Οι τιμές των συντελεστών θερμοκρασίας και οι σταθερές σύζευξης των αμιδικών πρωτονίων του πεπτιδίου **2**.

	Ser ¹	Arg ²	Gly ³	Asp ⁴	Val ⁵	Gly ⁶	Arg ⁷	Aib ⁸	Gly ⁹	Lys ¹⁰	Aib ¹¹	Gly ¹²
δ (ppm)	8.03	7.92	8.70	8.80	7.30	8.25	8.38	8.41	8.08	7.61	7.60	6.95
Δδ/ΔT (ppb/K)	-4.5	-4.9	-5.6	-4.4	+2.0	-4.0	-4.3	-6.4	-3.7	-2.0	-2.6	~ 0
³ J _{Nα} (Hz)	7.52	6.64	4.01/6.61	7.52	7.96	4.84/5.32	7.52		6.17/4.61	8.40		

αλλά και την απουσία NOE του τύπου $d_{\alpha N(i,i+4)}$, τα οποία είναι χαρακτηριστικά α-έλικας, η επαγωγή 3_{10} έλικας από το C-τελικό άκρο είναι πιθανή για το πεπτίδιο **2**. Συγκρίνοντας την αλληλουχία του τελευταίου με αυτή του πεπτιδίου **1**, παρατηρούμε ότι, τα αμινοξέα Aib² και Aib⁵ του δεύτερου έχουν αντικατασταθεί από την Arg² και Val⁵ στο πεπτίδιο **2**. Το γεγονός αυτό φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τη διαμόρφωση του πεπτιδικού σκελετού στο N-τελικό τμήμα καθώς, είναι χαρακτηριστική η απουσία NOE φαινομένων του τύπου $d_{\alpha N(i,i+2)}$ και $d_{NN(i,i+2)}$, σε αντίθεση με το C-τελικό τμήμα του πεπτιδίου. Ιδιαίτερα η Arg², η οποία φέρει θετικό φορτίο στη γουανιδινομάδα της πλευρικής της αλυσίδας, έχει σημαντικό ρόλο στην διαμόρφωση. Αυτό διαπιστώνεται και από τις NOE αλληλεπιδράσεις μεταξύ των C^βH₂ και N^ε πρωτονίων της Arg² και του αμιδικού πρωτονίου του Asp⁴ (βλ. Σχήματα 6.16 και 6.18).

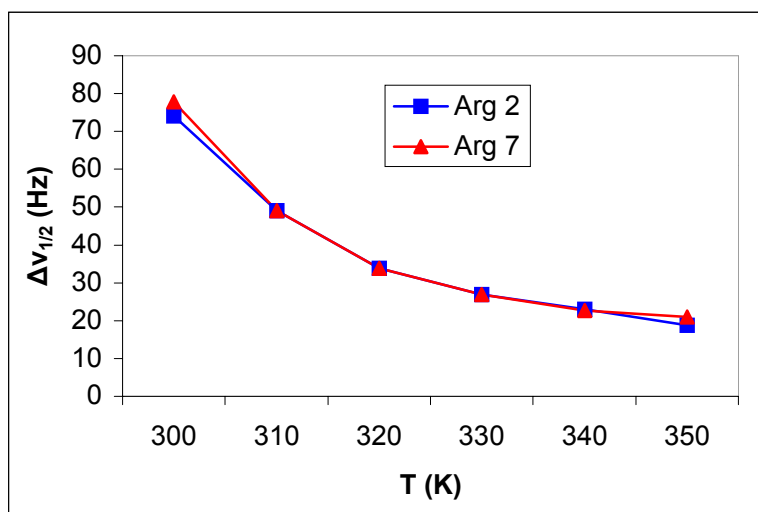
Τα N^εH πρωτόνια και των δύο αργινινών εμφανίζονται σε ασθενή πεδία (Arg²-N^εH στα 9.94 ppm και Arg⁷-N^εH στα 9.50 ppm) και όπως στην περίπτωση του πεπτιδίου **1**, η συμπεριφορά αυτή εξηγείται με την συμμετοχή τους σε δεσμό υδρογόνου. Όπως προαναφέρθηκε, οι δεσμοί αυτοί πιθανά συμβαίνουν λόγω της παρουσίας της παράπλευρης αλυσίδας του Asp⁴. Αξίζει να σημειωθεί ότι, παρατηρείται μία αντιστροφή όσον αφορά τις χημικές μετατοπίσεις των N^εH των δύο Arg στα δύο πεπτίδια. Έτσι το N^εH πρωτόνιο της Arg⁷, ενώ στην περίπτωση του πεπτιδίου **1** εμφανίζεται στα 10.05 ppm, το αντίστοιχο πρωτόνιο στο πεπτίδιο **2** ταυτοποιείται στα 9.50 ppm. Αντίθετα, το N^εH πρωτόνιο της Arg της θέσης i-2 ως προς το Asp⁴ εμφανίζεται σε ασθενέστερο πεδίο (9.94 ppm), παρόμοια δηλαδή χημική μετατόπιση με το N^εH της Arg⁷ του πεπτιδίου **1**.

Ένα δεύτερο σημαντικό στοιχείο που προκύπτει από την ταυτοποίηση των N^εH πρωτονίων του πεπτιδίου **2** είναι ότι, η μεταξύ τους διαφορά στις χημικές τους μετατοπίσεις (9.50 και 9.94 ppm) είναι σαφώς μικρότερη από την αντίστοιχη στο



Σχήμα 6.21 ¹H-NMR φάσματα στα 400 MHz του πεπτιδίου **2** στην περιοχή συντονισμού των αμιδικών πρωτονίων, σε διαλύτη DMSO-d₆, σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Προηγήθηκε λυοφιλοποίηση υδατικού διαλύματος σε pH=4.9.

πεπτίδιο **1** (9.11 και 10.05 ppm). Επίσης, ενώ στο τελευταίο υπάρχει διαφοροποίηση στο εύρος των κορυφών συντονισμού των $N^{\epsilon}H$ πρωτονίων στους 300 K (Σχήμα 6.8), στο πεπτίδιο **2** διακρίνουμε δύο ευρείες κορυφές για τα δύο $N^{\epsilon}H$ πρωτόνια στους 300 K, οι οποίες μετατρέπονται σταδιακά σε οξείες με την αύξηση της θερμοκρασίας (Σχήματα 6.21, 6.22). Από τα δεδομένα αυτά συμπεραίνουμε ότι και στο πεπτίδιο **2** τα δύο $N^{\epsilon}H$ πρωτόνια συμμετέχουν σε ένα φαινόμενο ανταλλαγής ανάμεσα σε καταστάσεις δεσμού υδρογόνου και μη. Ωστόσο, σε αντίθεση με το πεπτίδιο **1** όπου η συμμετοχή της γουανιδινομάδας της Arg⁷ αποδεικνύεται αρκετά πιο ισχυρή σε σχέση με την αντίστοιχη της Arg¹, στο πεπτίδιο **2** η διαφοροποίηση μεταξύ των δύο Arg είναι σαφώς μικρότερη, με ελάχιστα ισχυρότερη αυτή της Arg².



Σχήμα 6.22 Η μεταβολή του εύρους των κορυφών συντονισμού των $N^{\epsilon}H$ πρωτονίων των Arg² και Arg⁷ συναρτήσει της θερμοκρασίας.

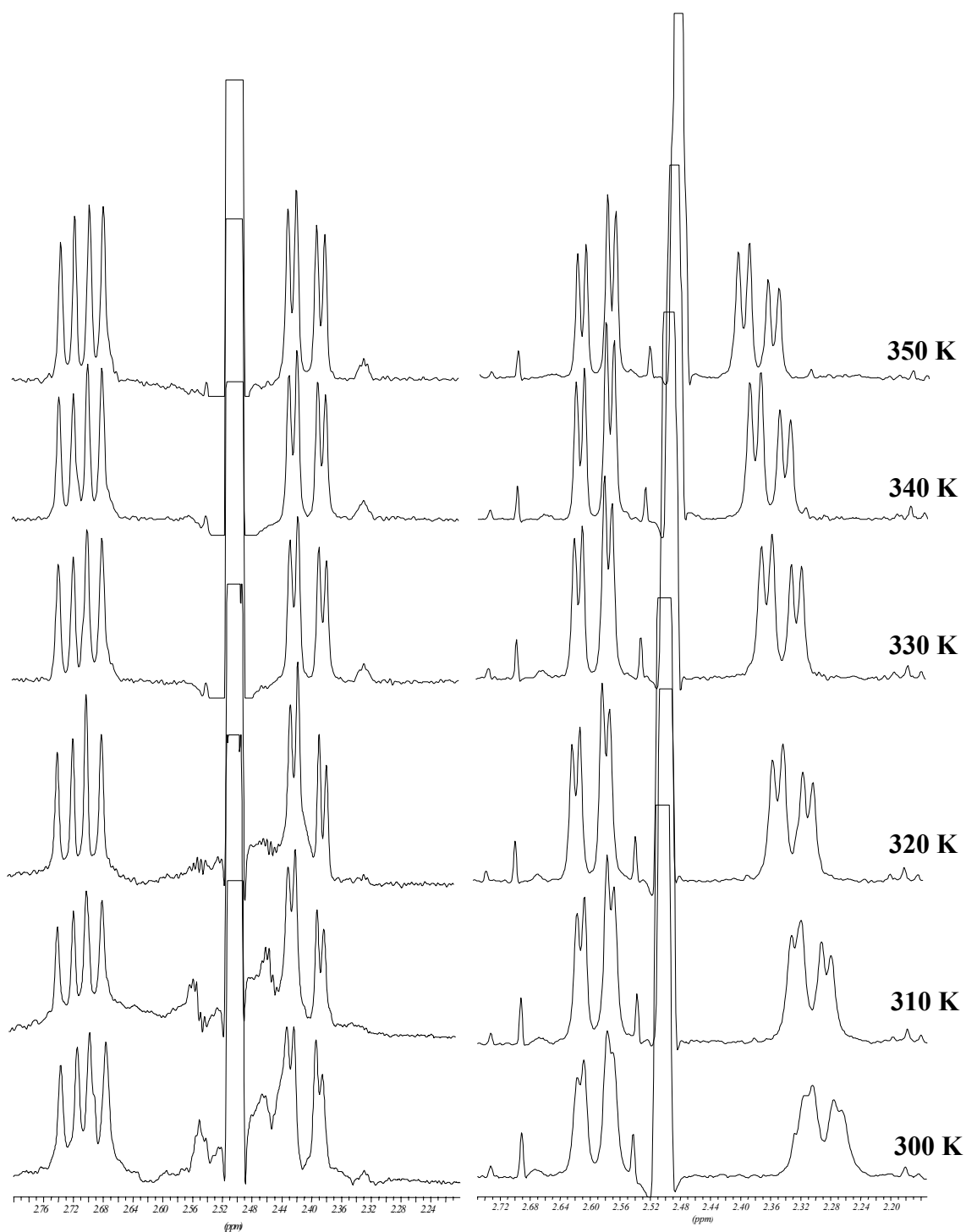
Η συμπεριφορά των $N^{\eta}H_{\epsilon}$ πρωτονίων της γουανιδινομάδας των δύο Arg, μοιάζει σε μεγάλο βαθμό με την αντίστοιχη στο πεπτίδιο **1**. Στο 1D φάσμα στους 300 K (Σχήμα 6.21) διακρίνουμε μία κορυφή συντονισμού στα 7.14 ppm η οποία αποδόθηκε στα $N^{\eta}H$ πρωτόνια της Arg² ενώ τα αντίστοιχα της Arg⁷ βρίσκονται στα 7.24 ppm σύμφωνα με το NOESY φάσμα. Με την αύξηση της θερμοκρασίας παρατηρούμε την διεύρυνση της οξείας κορυφής στα 7.14 ppm ενώ παράλληλα συγκλίνει με την ευρεία κορυφή στην οποία θα πρέπει να βρίσκονται τα υπόλοιπα $N^{\eta}H$ πρωτόνια. Στους 320 K (Σχήμα 6.21, φάσμα 320 K) εμφανίζεται μία νέα κορυφή στα 7.35 ppm, η οποία στους 330 K (Σχήμα 6.21, φάσμα 330 K) ενώνεται με την μετατοπισμένη κορυφή που εμφανιζόταν στα 7.14 ppm στους 300 K, σχηματίζοντας

μία ολοένα και περισσότερο οξεία κορυφή στα 7.30 ppm (Σχήμα 6.21, φάσματα 330, 340 και 350 K), η οποία αντιστοιχεί σε όλα τα N¹H πρωτόνια της γουανιδινομάδας των δύο Arg. Από τα παραπάνω, αλλά και τις παρατηρήσεις που έγιναν για τα N^εH πρωτόνια, η συμπεριφορά των δύο γουανιδινομάδων μπορεί όπως και στην περίπτωση του πεπτιδίου **1**, να εξηγηθεί με βάση το σχήμα 6.9.

Από την διερεύνηση του ρόλου της παράπλευρης αλυσίδας του Asp⁴ με τον υπολογισμό τις κατανομής των στροφομερών, προκύπτει ένα επιπλέον σημαντικό στοιχείο. Με βάση τις τιμές που υπολογίστηκαν για τις σταθερές σύζευξης ³J_{ab}= 3.26 Hz και ³J_{ab}'= 5.37 Hz και χρησιμοποιώντας τις εξισώσεις που αναφέρθηκαν κατά την διαμορφωτική ανάλυση του πεπτιδίου **1**, τα ποσοστά των στροφομερών που προκύπτουν είναι P_I= 8%, P_{II}= 27% και P_{III}= 65%. Παρατηρούμε δηλαδή ότι υπερισχύει σημαντικά το λιγότερο ευνοούμενο ενεργειακά, υπό κανονικές συνθήκες, στροφομερές III (Σχήμα 6.12). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι υφίστανται διαμορφωτικοί περιορισμοί στην παράπλευρη αλυσίδα του Asp⁴, οι οποίοι μειώνουν την δυνατότητα περιστροφής γύρω από το δεσμό C^α-C^β (γωνία χ¹). Σε συνδυασμό με όσα αναφέρθηκαν για τα πρωτόνια της γουανιδινομάδας των δύο Arg, σε θέσεις i-2 και i+3 ως προς το Asp⁴, ενισχύεται η εκτίμηση της αλληλεπίδρασης των τριών αυτών αμινοξέων μέσω των παράπλευρων τους αλυσίδων, γεγονός που παίζει σημαντικό ρόλο στην διαμόρφωση του πεπτιδίου **2**. Στο Σχήμα 6.23 δίδονται οι κορυφές συντονισμού των C^βH₂ πρωτονίων του Asp της θέσης τέσσερα στα πεπτίδια **1** και **2**. Οι κορυφές αποτελούν ένα ABX σύστημα, ως αποτέλεσμα της σύζευξης με το C^αH πρωτόνιο και ο βαθμός που διαχωρίζονται, όπως και η μεταβολή τους με την αύξηση της θερμοκρασίας, είναι ακόμα μία ένδειξη της αλληλεπίδρασης της παράπλευρης αλυσίδας του Asp με τις αντίστοιχες αλυσίδες των Arg και στα δύο πεπτίδια.

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα της διαμορφωτικής ανάλυσης του πεπτιδίου **2** καταλήγουμε στα παρακάτω συμπεράσματα:

- Το C-τελικό τμήμα του πεπτιδίου **2** (-Val⁵-Gly⁶-Arg⁷-Aib⁸-Gly⁹-Lys¹⁰-Aib¹¹-Gly¹²) προσλαμβάνει διαμόρφωση 3₁₀ έλικας.



C^βH₂-Asp του 1

C^βH₂-Asp του 2

Σχήμα 6.23 ¹H-NMR φάσμα στα 400 MHz των πεπτιδίων 1 και 2 στην περιοχή συντονισμού των C^βH₂ πρωτονίων του Asp⁴.

- Η αλληλεπίδραση ανάμεσα στο Ac-CO της παράπλευρης αλυσίδας της Lys¹⁰ και το NH της Gly¹² υφίσταται και στην περίπτωση του πεπτιδίου **2** και φαίνεται να μην επηρεάζεται από τη φύση της υπόλοιπης αλληλουχίας του πεπτιδίου. Η αλληλεπίδραση αυτή λειτουργώντας ως εκμαγείο επάγει διαμόρφωση 3₁₀ έλικας.
- Η διαμόρφωση του πεπτιδικού σκελετού στο N-τελικό άκρο φαίνεται να καθορίζεται από την αλληλεπίδραση ανάμεσα στις παράπλευρες αλυσίδες της Arg² και του Asp⁴.
- Η αλληλεπίδραση των παράπλευρων αλυσίδων της Arg⁷ και Asp⁴ είναι ασθενέστερη στην περίπτωση του πεπτιδίου **2** σε σύγκριση με την αντίστοιχη αλληλεπίδραση στο πεπτίδιο **1**.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

7. ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι μελέτες για τον προσδιορισμό της βιολογικής δράσης των πεπτιδίων **1** και **2** πραγματοποιήθηκαν σε ανθρώπινο ορό πλούσιο σε αιμοπετάλια¹³⁶ (platelet rich plasma, PRP). Ο βαθμός δραστηρότητας εκφράζεται με την συγκέντρωση του πεπτιδίου η οποία προκαλεί 50% αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων (IC₅₀).

7.1 Επεξεργασία αίματος

Το αίμα συλλέγεται σε πλαστικούς φυγοκεντρικούς σωλήνες των 12 ml, στους οποίους προτίθεται διάλυμα ACD σε αναλογία 9:1 (αίμα:ACD). Το τελευταίο αποτελείται από 0.8% κιτρικό οξύ, 2.2% κιτρικό νάτριο και 2.5% γλυκόζη και λειτουργεί δεσμεύοντας τα ιόντα ασβεστίου ώστε να αποφευχθεί η πήξη του αίματος στον σωλήνα. Ακολουθεί ήπια φυγοκέντρωση του μίγματος στις 800 στροφές ανά λεπτό, για 15-20 λεπτά και συλλέγεται η υπερκείμενη στοιβάδα, η οποία είναι πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP). Η υπόλοιπη ποσότητα αίματος φυγοκεντρείται εκ νέου στις 2000 στροφές ανά λεπτό για 20 λεπτά περίπου, ώστε να συλλεχθεί η υπόλοιπη ποσότητα αιμοπεταλίων (platelet poor plasma, PPP).

Ένα τμήμα του PRP, χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του αριθμού των αιμοπεταλίων. Συγκεκριμένα 10 μl PRP αραιώνονται σε 190 μl διαλύματος οξαλικού αμωνίου 1%. Το τελευταίο καταστρέφει τα ερυθρά και λευκά κύτταρα που τυχόν υπάρχουν στο δείγμα, ενώ παράλληλα διογκώνει τα αιμοπετάλια. 10 μl του παραπάνω αιωρήματος τοποθετούνται με πιπέτα σε πέντε θέσεις πλάκας new-bawer, ειδική για την καταμέτρηση κυττάρων, η οποία στη συνέχεια τοποθετείται σε κλειστό θάλαμο για 15 λεπτά ώστε να καθιζάνουν τα κύτταρα. Η καταμέτρηση των αιμοπεταλίων στις πέντε θέσεις τις πλάκας γίνεται με μικροσκόπιο και η συγκέντρωσή τους ανά κυβικό χιλιοστό υπολογίζεται από τη σχέση: *5 θέσεις της πλάκας new-bawer x μέσος όρος κυττάρων ανά θέση x 1000*. Τα τελικά δείγματα όπου θα λάβει χώρα η μέτρηση της αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, παρασκευάζονται έτσι ώστε να έχουν συγκέντρωση 250.000/mm³. Αυτό επιτυγχάνεται με κατάλληλη αραιώση του αρχικού όγκου PRP με PPP όγκου V_{PPP}, όπως προκύπτει από τη σχέση:

$$AA \times V_{PRP} = 250.000 \times (V_{PRP} + V_{PPP})$$

όπου AA ο αριθμός των αιμοπεταλίων ανά mm³ στο αρχικό PRP, ενώ V_{PRP} και V_{PPP} οι όγκοι των PRP και PPP αντίστοιχα.

7.2 Μέτρηση της αναστολής και προσδιορισμός της τιμής IC₅₀

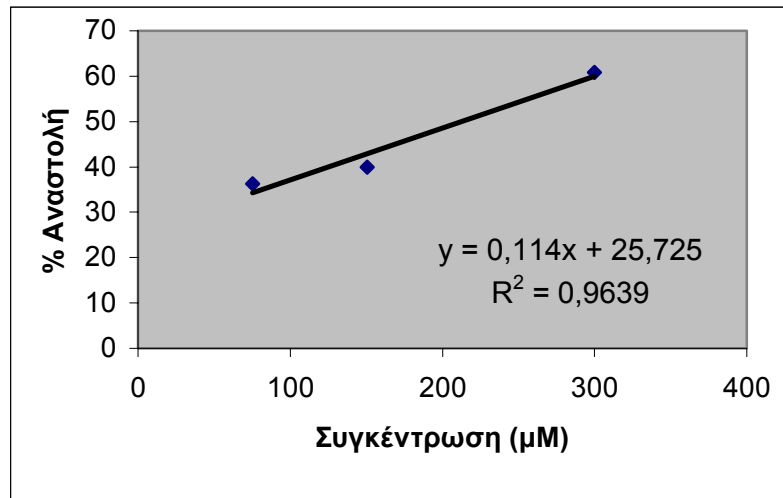
Συγκεκριμένη μάζα κάθε αναλόγου διαλύεται σε 250 μl TBS (Tris Buffer Saline, pH=7.4) έτσι ώστε η συγκέντρωση των αναλόγων σε κάθε διάλυμα να είναι 25 mM. Ως ενεργοποιητής για την συσσώρευση των αιμοπεταλίων χρησιμοποιείται διάλυμα ADP συγκέντρωσης 1 mM σε φυσιολογικό ορό. Οι μετρήσεις γίνονται σε συσσωρευόμετρο (Aggregometer) Chronolog Corporation (Model 330) σε θερμοκρασία 37 °C. Αρχικά εκτελείται το τυφλό πείραμα το οποίο περιλαμβάνει την προσθήκη 500 μl από το αραιωμένο PRP σε κυψελίδα και μέτρηση της απορρόφησης από το όργανο για 1 λεπτό, ενώ στη συνέχεια προστίθενται 10 μl ADP και καταγράφεται η καμπύλη συσσώρευσης για 3 λεπτά. Ακολουθεί η μέτρηση των δειγμάτων με προσθήκη 500 μl αραιωμένου PRP και συγκεκριμένου όγκου διαλύματος του πεπτιδικού αναλόγου στην κυψελίδα. Η τελευταία τοποθετείται στο συσσωρευόμετρο και αφήνεται για 1 λεπτό σε θερμοκρασία 37 °C. Αμέσως μετά προστίθενται 10 μl ADP και καταγράφεται η μεταβολή της οπτικής διαπερατότητας για 3 λεπτά. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται για διάφορες συγκεντρώσεις των πεπτιδικών αναλόγων στο υπό μέτρηση διάλυμα και καταγράφονται οι αντίστοιχες συσσωρεύσεις. Η τελική συγκέντρωση C (mM) ενός πεπτιδίου μέσα στα 500 μl PRP, η οποία αντιστοιχεί σε συγκεκριμένη % αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, δίνεται από την εξίσωση:

$$C=(C_a \times V)/(500 + V)$$

όπου, C_a είναι η αρχική συγκέντρωση (mM) του πεπτιδίου στο TBS (εδώ 25 mM) ενώ V είναι ο όγκος του δείγματος (μl) που χρησιμοποιείται για κάθε μέτρηση. Ο προσδιορισμός της τιμής IC₅₀ για κάθε πεπτίδιο υπολογίζεται από τη γραφική παράσταση της % αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που προκαλεί συναρτήσει της συγκέντρωσής του στο δείγμα (Σχήμα 7.1).

Εξετάστηκαν τα πεπτίδια 1 και 2 ως προς την ανασταλτική τους δράση. Το πεπτίδιο 1 δεν προκάλεσε αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων ενώ το πεπτίδιο 2 έχει IC₅₀=219 μM. Παρατηρείται δηλαδή μία βελτίωση της ανασταλτικής

δράσης κατά τρεις φορές, όταν χρησιμοποιείται το πεπτιδίο **2** σε σύγκριση με το Ac-RGD-NH₂.



Σχήμα 7.1 Γραφική παράσταση της αναστολής της συσσώρευσης ανθρώπινων αιμοπεταλίων, ενεργοποιημένων με ADP, συναρτήσει της συγκέντρωσης του πεπτιδίου Ac-Ser-Arg-Gly-Asp-Val-Gly-Arg-Aib-Gly-Lys(Ac)-Aib-Gly-OH.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Στην εργασία αυτή έγινε προσπάθεια συσχέτισης της ικανότητας αναστολής της συσσώρευσης των ανθρώπινων αιμοπεταλίων από RGD ανάλογα, ενσωματωμένα σε αλληλουχίες κανονικών διαμορφώσεων.
- Για την επαγωγή ελικοειδών διαμορφώσεων χρησιμοποιήθηκε η αλληλουχία –Lys(Ac)-Aib-Gly-OH ως C-τελικό άκρο των πεπτιδίων.
- Η αλληλουχία –Lys(Ac)-Aib-Gly-OH λειτουργεί ως εκμαγείο επαγωγής 3_{10} έλικας πιθανά λόγω αλληλεπίδρασης μέσω δεσμού υδρογόνου ανάμεσα στο NH της Gly και το καρβονύλιο της ακέτυλο ομάδας στην παράπλευρη αλυσίδα της Lys.
- Ο πεπτιδικός σκελετός του αναλόγου Ac-Arg-Aib-Gly-Asp-Aib-Gly-Arg-Aib-Gly-Lys(Ac)-Aib-Gly-OH (**1**) προσλαμβάνει διαμόρφωση κανονικής 3_{10} έλικας σε διάλυμα DMSO- d_6 .
- Οι παράπλευρες αλυσίδες των Arg¹ και Arg⁷ φαίνεται να αλληλεπιδρούν με την παράπλευρη αλυσίδα του Asp⁴. Η αλληλεπίδραση αυτή αποδεικνύεται αρκετά ισχυρότερη ανάμεσα στη γουανιδινομάδα της Arg⁷ και του Asp⁴ απ' ότι ανάμεσα σε αυτή της Arg¹ και του Asp⁴.
- Ο πεπτιδικός σκελετός του αναλόγου Ac-Ser-Arg-Gly-Asp-Val-Gly-Arg-Aib-Gly-Lys(Ac)-Aib-Gly-OH (**2**) προσλαμβάνει διαμόρφωση 3_{10} έλικας στο C-τελικό τμήμα –Val⁵-Gly⁶-Arg⁷-Aib⁸-Gly⁹-Lys(Ac)¹⁰-Aib¹¹-Gly¹², ενώ η διαμόρφωση του N-τελικού άκρου φαίνεται να καθορίζεται από την ισχυρή αλληλεπίδραση ανάμεσα στις παράπλευρες αλυσίδες των Arg² και Asp⁴.
- Η αλληλεπίδραση της γουανιδινομάδας της Arg⁷ με την παράπλευρη αλυσίδα του Asp⁴ φαίνεται να είναι αρκετά πιο ασθενής στην περίπτωση του πεπτιδίου **2**, σε σύγκριση με αυτή στο ανάλογο **1**.

- Η ικανότητα αναστολής της συσσώρευσης των ανθρώπινων αιμοπεταλίων του αναλόγου **2** είναι τρεις φορές πιο βελτιωμένη σε σύγκριση με το Ac-RGD-NH₂.
- Η απώλεια της ανασταλτικής δράσης του αναλόγου **1**, αναδεικνύει το σημαντικό ρόλο τόσο της τοπικής διαμόρφωσης του RGD τμήματος, όσο και της συνολικής διαμόρφωσης της αλληλουχίας στην οποία έχει ενσωματωθεί.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Hynes, R. O.**, (1987) Integrins – A family of cell-surface receptors. *Cell*, 48, 549-550.
2. **Smyth, S. S., Joneckis, C. C., and Parise, L. V.**, (1993) Regulation of vascular integrins. *Blood*, 81, 2827-2843.
3. **Shattil, S. J.**, (1995) Function and regulation of the beta(3) integrins in hemostasis and vascular biology. *Thromb. Haemostasis*, 74, 149-155.
4. **Price, D. T., and Loscalzo, J.**, (1999) Cellular adhesion molecules and atherogenesis. *Am. J. Med.*, 107, 85-97.
5. **Hawiger, J.**, (1991) Adhesive interactions of platelets and their blockage. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 614, 270-278.
6. **Kirchhofer, D., Tschopp, T. B., Steiner B., Baumgartner, H. R.**, (1995) Role of collagen-adherent platelets in mediating fibrin formation in flowing whole blood, *Blood*. 86, 3815-3822.
7. **Ruggeri, Z. M.**, (1995) The role of von Willebrand factor and fibrinogen in the initiation of platelet adhesion to thrombogenic surfaces [Review]. *Thromb. Haemost.*, 74, 460-463.
8. **Sakariassen, K. S., Fressinaud, E., Girma, J. P., Meyer, D., Baumgartner, H. R.**, (1987) Role of platelet membrane glycoproteins and von Willebrand factor in adhesion of platelets to subendothelium and collagen. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 516, 52-65.
9. **Saelman, EUM., Nienwenhuis, H. K., Hese, K. M.**, (1994) Platelet adhesion to collagen type-I through type-VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIa/IIa (Alpha(2)Beta(1)-Integrin). *Blood*, 83, 1244-1250.
10. **Kunicki, T. J., Nugent, D. J., Staats, S. J.**, (1988) The human fibroblast class-II extracellular-matrix receptor mediates platelet-adhesion to collagen and is identical to the platelet glycoprotein-Ia-IIa complex. *J. Biol. Chem.*, 263(10), 4516-4519.
11. **Coller, B. S.**, (1995) The role of platelets in arterial thrombosis and the rationale for blockage of platelets GPIIb/IIIa receptors as antithrombotic therapy. *Eur. Heart J.*, 16, 11-15.

12. **Sims, P. J., Ginsberg, M. H., Plow, E. F., and Shattil, S. J.**, (1991) Effect of platelet activation on the conformation of the plasma-membrane glycoprotein-IIb-IIIa complex. *J. Biol. Chem.*, 266, 7345-7352.
13. **Schwartz, M. A., Schaller, M. D., and Ginsberg, M. H.**, (1995) Integrins: Emerging paradigms of signal transduction. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 11, 549-599.
14. **Shattil, S. J., and Ginsberg, M. H.**, (1997) Integrin signalling in vascular biology. *J. Clin. Invest.*, 100, 91-95.
15. **Plow, E. F., McEver, R. P., Collier, B. S., Woods, V. L., Marguerie, G. A., and Ginsberg, M. H.**, (1985) Related binding mechanisms for fibrinogen, fibronectin, von Willebrand-factor, and thrombospondin on thrombin-stimulated human platelets. *Blood*, 66 724-727.
16. **Plow, E. F., Srouji, A. H., Meyer, D., Marguerie, G. A., and Ginsberg, M. H.**, (1984) Evidence that 3 adhesive proteins interact with a common recognition site on activated platelets. *J. Biol. Chem.*, 259(9), 5388-5391.
17. **Timmons, S., Kloczewiak, M., and Hawiger, J.**, (1984) ADP-Dependent common receptor mechanism for binding of von Willebrand factor and fibrinogen to human-platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci-Biol.*, 81(15), 4935-4939.
18. **Eisenberg, P. R., Ghigliotti, G.**, (1999) Platelet-dependent and procoagulant mechanisms in arterial thrombosis. *Int. J. Cardiology*, 68, 3-10.
19. **Spencer, F., and Becker, R.**, (1997) Platelets: Structure, function and their fundamental contribution to hemostasis and pathologic thrombosis. In Becker RC. Ed., *Textbook of Coronary Thrombosis and Thrombolysis*, Boston, MA: Kluwer Academic Publishers.
20. **Coller, B. S.**, (1990) Platelets and thrombolytic therapy. *New Engl. J. Med.*, 322, 33-42.
21. **Ruoslahti, E., Pierschbacher, M. D.**, (1986) Arg-Gly-Asp – A versatile cell recognition signal, *Cell*, 44, 517-518.
22. **Ruoslahti, E., Pierschbacher, M. D.**, (1987) New perspectives in cell-adhesion – RGD and integrins. *Science*, 238(4826), 491-497.
23. **Chesebro, J. H., and Fuster, V.**, (1991) Dynamic thrombosis and thrombolysis – role of antithrombins. *Circulation*, 83(5), 1815-1817.

24. **Dodt, J., Muller, H. P., Seemuller, U., Chang, J. Y.,** (1984) The complete amino-acid-sequence of hirudin, a thrombin specific inhibitor – application of color carboxymethylation. *FEBS Lett.*, 165(2), 180-184.
25. **Defreyn, G., Bernat, A., Delebasse, D., Maffrand, J. P.,** (1989) Pharmacology of Ticlopidine – A review. *Semin. Thromb. Hemost.*, 15(2), 159-166.
26. **Fozzard, H. A., Haber, E., Jennings, R. B., Katz, A. M., Morgan, H. E., and Coller, B. S.,** (1991) in: *The heart of cardiovascular system.*, 2nd Edn., Eds., Raven Press, N.Y.
27. **Becker, R. C.,** (1999) Thrombosis and the role of platelets. *The American journal of Cardiology*, 83, 3-6.
28. **Ginsberg, M. H., Pierschbacher, M. D., Ruoslahti, E., Marguerie, G., Plow, E. F.,** (1985) Inhibition of fibronectin binding to platelets by proteolytic fragments and synthetic peptides which support fibroblast adhesion. *J. Biol. Chem.*, 260, 3931-3936.
29. **Plow, E. F., Pierschbacher, M. D., Ruoslahti, E., Marguerie, G., and Ginsberg, M. H.,** (1985) The effect of Arg-Gly-Asp-containing peptides on fibrinogen and von Willebrand factor binding to platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82(23), 8057-8061.
30. **Gartner, T. K., Bennet, J. S.,** (1985) The tetrapeptide analog of the cell attachment site of fibronectin inhibits platelet-aggregation and fibrinogen binding to activated platelets. *J. Biol. Chem.*, 260(22), 1891-1894.
31. **Haverstick, D. M., Cowan, J. F., Yamada, K. M., Santoro, S. A.,** (1985) Inhibition of platelet-adhesion to fibronectin, fibrinogen, and von Willebrand factor substrates by a synthetic tetrapeptide derived from the cell-binding domain of fibronectin. *Blood*, 66(4), 946-952.
32. **Plow, E. F., D'Sousa, S. E., Ginsberg, M. H.,** (1992) Ligand-binding to GPIIb-IIIa – A status-report. *Semin. Thromb. Hemost.* 18(3), 324-332.
33. **Farrell, D. H., Thiagarajan, P.,** Binding of recombinant fibrinogen mutants to platelets. *J. Biol. Chem.* (1994) 269, 226-231.
34. **Hawiger, J., Kloczewiak, M., Bednarec, M. A., Timmons, S.,** (1989) Platelet receptor recognition domains on the alpha chain of human-fibrinogen – Structure-function analysis. *Biochemistry*, 28(7), 2909-2914.

35. **Farrell, D. H., Thiagarajan, P., Chung, D. W., Davie, E. W.**, (1992) Role of fibrinogen alpha-chain and gamma-chain sites in platelet-aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89(22), 10729-10732.
36. **Ali, I. V., Hynes, R. O.**, (1978) Effects of lets glycoprotein on cell motility. *Cell*, 14, 439-446.
37. **Thiery, J. P., Duband, J. L., Tucker, G. C.**, (1985) Cell migration in the vertebrate embryo: role of cell adhesion and tissue environment in pattern formation. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1, 91-113.
38. **Basara, M. L., McCarthy, J. B., Barnes, D. W., Furcht, L. T.**, (1985) Stimulation of haptotaxis and migration of tumor-cells by serum spreading factor. *Cancer Res.*, 45(6), 2487-2494.
39. **Marguerie, G. A., Plow, E. F., Edgington, T. S.**, (1979) Human-platelets possess an inducible and saturable receptor specific for fibrinogen. *J. Biol. Chem.*, 254(12), 5357-5363.
40. **Pytela, R., Pierschbacher, M. D., Ginsberg, M. H., Plow, E. F., Rouslahti, E.**, (1986) Platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa – member of a family of Arg-Gly-Asp specific adhesion receptors. *Science*, 231(4745), 1559-1562.
41. **Atkinson, R. A., Saudek, V., Pelton, J. T.**, (1994) Echistatin – The refined structure of a disintegrin in solution by ¹H-NMR and restrained molecular-dynamics. *Int. J. Peptide Protein Res.*, 43(6), 563-572.
42. **Adler, M., Lazarus, R. A., Dennis M. S., Wagner, G.**, Solution structure of kirstin, a potent platelet-aggregation inhibitor and GPIIb/IIIa antagonist. *Science*, (1991) 253(5018), 445-448.
43. **Adler, M., Wagner, G.**, (1992) Sequential ¹H-NMR assignments of kirstin, a potent platelet-aggregation inhibitor and glycoprotein-IIb-IIIa antagonist. *Biochemistry*, 31(4) 1031-1039.
44. **Krezel, A. M., Wagner, G., Seymour-Ulmer, J., Lazarus, R. A.**, (1994) Structure of the RGD protein Decorsin – conserved motif and distinct function in leech proteins that affect blood-clotting. *Science*, 264(5167), 1944-1947.
45. **Hirschmann, R.**, (1991) Medicinal chemistry in the golden-age of biology-lessons from steroid and peptide research. *Angew Chem. Int. Edit.*, 30(10), 1278-1301.

46. **Bach, A. C., Eyermann, C. J., Gross, J. D.,** (1994) Structural studies of a family of high-affinity ligands for GPIIb/IIIa. *J. Am. Chem. Soc.*, 116(8), 3207- 3219.
47. **Samanen, J., Ali, F., Romoff, T., Calvo, R., Sorenson, E., Vasko, J., Storer, B., Berry, D., Bennett, D., Strohsacker, M., Powers, D., Stabel, J., and Nichols, A.,** (1991) Development of a small RGD peptide fibrinogen receptor antagonist with potent antiaggregatory activity in vitro. *J. Med. Chem.*, 34(10), 3114-3125.
48. **Tsikaris, V., Sakarellos-Daitsiotis, M., Tzovaras, D., Sakarellos, C., Orlewski, P., Cung, M. T., Marraud, M.,** (1996) Isomerization of the Xaa-Pro peptide bond induced by ionic interactions of arginine. *Biopolymers*, 38(6), 673-682.
49. **Tsikaris, V., Cung, M. T., Panou-Pomonis, E., Sakarellos, C., and Sakarellos-Daitsiotis, M.,** (1993) ¹H-NMR studies on the preferred Interactions of guanidinium and C-terminal carboxylate groups in arginine-containing peptides. *J. Chem. Soc. Perkins Trans. 2*, 321-326.
50. **Sakarellos-Daitsiotis, M., Panou-Pomonis, E., Sakarellos, C., Cung, M. T., Marraud, M., Tzinia, A. K., Soteriadou, K., and Tsikaris, V.,** (1996) Conformational and antigenic properties of SRYD-containing peptide analogues of Leishmania gp63 adhesion site. *Letters in Peptide Science*,) 3, 200-208.
51. **Orlewski, P., Tsikaris, V., Sakarellos-Daitsiotis, M., Sakarellos, C., Cung, M. T., Marraud, M.,** (1996) Solution structure of an SRYD-containing sequence (250-257) of the fibronectin-like Leishmania gp63 protein by restrained molecular dynamics. *Letters in Peptide Science*, 3(5), 317-326.
52. **Leahy, D. J., Hendrickson, W. A., Aukhil, I., and Erickson, H. P.,** (1992) Structure of a fibronectin type III domain from tenascin phased by MAD analysis of the selenomethionyl protein. *Science*, 258, 987-991.
53. **Leahy, D. J., Aukhil, I., and Erickson, H. P.,** (1996) 2.0 Å crystal structure of four-domain segment of human fibronectin encompassing the RGD loop and synergy region. *Cell*, 84, 155-164.
54. **Verdaguer, N., Mateu, M. G., Andreu, D., Giralt, E., Domingo, E., and Fita, I.,** (1995) Structure of the major antigenic loop of foot-and-mouth disease virus complexed with a neutralizing antibody: direct involvement of the RGD motif in the interaction. *EMBO J.*, 14, 1690-1696.
55. **Lasz, E. C., McLane, M. A., Trybulec, M., Kowalska, A., Khan, S., Budzynski, A. Z., and Niewiarowski, S.,** (1993) β_3 integrin derived peptide 217-230 inhibits fibrinogen binding and platelet aggregation: significance of RGD

- sequences and fibrinogen A α chain. *Biochemical and Biophysical Res. Communications*, 190, 118-124.
56. **Kieffer, B., Mer, G., Mann, A.**, (1994) Structural studies of antiaggregant RGDW peptides by $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 44(1), 70-79.
57. **McDowell, R. S., Blackburn, B. K., Gadek, T. R., McGee, L. R., Rawson, T., Reynolds, M. E., Robage, K. D., Somers, T. C., Thorsett, E. D., Tischler, M., Webb, R. R., and Venuti, M. C.**, (1994) From peptide to non-peptide. 2. The *de novo* design of potent, non-peptidal inhibitors of platelet aggregation based on a benzodiazepinedione scaffold. *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 5077-5083.
58. **Charon, M. H., Poggi, A., Donati, M. B., Marguerie, G.**, in: Peptides: Chemistry, Structure and Biology. *Proc. Of the 11th Am. Peptide Symposium*, (1990) ESCOM, Leiden, pp:82-83.
59. **Ali, F. E., Bennett, D. B., Calvo, R. R., Elliott, J. D., Hwang, S. M., Ku, T. W., Lago, M. A., Nichols, A. J., Romoff, T. T., Shah, D. H., Vasko, J. A., Wong, A. S., Yellin, T. O., Yuan, C. K., and Samanen, J. M.**, (1994) Conformationally constrained peptides and semipeptides derived from RGD as potent inhibitors of the platelet fibrinogen receptor and platelet-aggregation. *J. Med. Chem.*, 37, 769-780.
60. **Dong, Q., Chakravarty, S., Ojima, S.**, 208th American Chemical Society National Meeting, *Abstracts*, (1994) MEDI 60.
61. **Kirchhofer, D., Gailit, J., Ruoslahti, E., Grzesiak, J., Pierschbacher, M. D.**, (1990) Cation-dependent changes in the binding-specificity of the platelet receptor GPIIb/IIIa. *J. Biol. Chem.*, 265(30), 18525-18530
62. **Cheng, S., Craig, W. S., Mullen, D., Tschopp, J. F., Dixon, D., Pierschbacher, M. D.**, (1994) Design and synthesis of novel cyclic RGD-containing peptides as highly potent and selective integrin $\alpha(\text{IIb})\beta(3)$ antagonists. *J. Med. Chem.*, 37, 1-8.
63. **Bartels, C., Stote, R. H., Karplus, M.**, (1998) Characterization of flexible molecules in solution: the RGDW peptide. *J. Mol. Biol.*, 284, 1641-1660.
64. **Miyashita, M., Akamatsu, M., Hayashi, Y., and Ueno, T.**, (2000) Three-dimensional quantitative structure-activity relationship analyses of RGD mimetics as fibrinogen receptor antagonists. *Biorganic and Medicinal Chem. Letters*, 10, 859-863.

65. **Sakarellos-Daitsiotis, M., Tsikaris, V., Sakarellos, C., Vlachoyiannopoulos, P. G., Tzioufas, A. G., Moutsopoulos, H. M.**, (2000) A new helicoid-type sequential oligopeptide carrier (SOC_n) for developing potent antigens and immunogens. *Vaccine*, 18, 302-310.
66. **Tsikaris, V., Sakarellos, C., Cung, M. T., Marraud, M., Sakarellos-Daitsiotis, M.**, (1996) Concept and design of a new class of Sequential Oligopeptide Carrier (SOC) for covalent attachment of multiple antigenic peptides. *Biopolymers*, 38, 291-293.
67. **Sakarellos-Daitsiotis, M., Tsikaris, V., Vlachoyiannopoulos, P. G., Tzioufas, A. G., Moutsopoulos, H. M., and Sakarellos, C.**, (1999) Peptide carriers: A helicoid-type Sequential Oligopeptide Carrier (SOC_n) for multiple anchoring of antigenic/immunogenic peptides. *Methods*, 19, 133-141.
68. **Sakarellos, C., Tsikaris, V., Panou-Pomonis, E., Alexopoulos, C., Sakarellos-Daitsiotis, M., Petrovas, P., Vlachoyiannopoulos, P. G., and Moutsopoulos, H. M.**, (1997) The PPGMRPP repetitive epitope of the Sm autoantigen: Antigenic specificity induced by conformational changes. Application of the Sequential Oligopeptide Carrier (SOCs). *Letters in Peptide Science*, 4, 447-454.
69. **Tsikaris, V., Sakarellos, C., Sakarellos-Daitsiotis, M., Orlewski, P., Marraud, M., Cung, M. T., Vatzaki, E., Tzartos, S.**, (1996) Construction and application of a new class of sequential oligopeptide carriers (SOC_n) for multiple anchoring of antigenic peptides – application to the acetylcholine receptor (AChR) main immunogenic region. *Int. J. Biol. Macromolecules.*, 19, 195-205.
70. **Carpino, L. A., Chao, H. G., Beyermann, M., and Bienert, M.**, (1991) ((9-Fluorenylmethyl)oxy)carbonyl amino-acid chlorides in solid-phase peptide-synthesis. *J. Org. Chem.*, 56(8), 2635-2642.
71. **Bodanzsky, M.**, in: *The peptides. Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 1, *Major Methods of peptide bond formation*. Gross, E., and Meyenhofer, J., Eds., Academic Press, New York, (1979) 105.
72. **Meyenhofer, J.**, in: *The peptides. Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 1, *Major Methods of peptide bond formation*. Gross, E., and Meyenhofer, J., Eds., Academic Press, New York, (1979) 263.
73. **Rich, D. H., and Singh, J.**, in: *The peptides. Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 1, *Major Methods of peptide bond formation*. Gross, E., and Meyenhofer, J., Eds., Academic Press, New York, (1979) 241.

74. **Bodanzsky, M.**, "*Peptide Chemistry: A Practical Textbook*", (1993) 2nd Rev. Edition. Springer Verlag, New York.
75. **Barany, G., and Merrifield, R. B.**, in: *Peptides. Analysis, Synthesis, Biology*. Vol. 2, *Special Methods in Peptide Synthesis*, Part A, Gross, E., and Meienhofer, J., Eds., Academic Press, New York, (1979) 1.
76. **Merrifield, R. B.**, in: *Peptides. Synthesis, Structures and Applications*, Gutte, B., Ed., Academic Press, New York, (1995) 93.
77. **Meldal, M.**, in: *Methods in Enzymology*, Vol. 289, *Solid-Phase Peptide Synthesis*, Fields, G. B., Eds, Academic Press, San Diego, (1997) 83.
78. **Erickson, W., Merrifield, R. B.**, in: *The Proteins*, Vol. 2, Neurath, H., Hill, R. L., Eds, 3rd Edn, Academic Press, New York, (1979) 255.
79. **Sarin, V. K., Kent, S. B. H., Mitchell, A. R., et al.**, (1984) A general-approach to the quantitation of synthetic efficiency in solid-phase peptide-synthesis as a function of chain-length. *J. Am. Chem. Soc.*, 106(25), 7845-7850.
80. **Mitchell, A. R., Kent, S. B. H., Engelhard, M., et al.**, (1978) New synthetic route to tert-butyloxycarbonylaminoacyl-4-(oxymethyl)phenylacetamidomethyl-resin, an improved support for solid-phase peptide-synthesis. *J. Org. Chem.*, 43(14), 2845-2852.
81. **Matsueda, G. R., Stewart, J. M.**, (1981) A p-methylbenzhydrylamine resin for improved solid-phase synthesis of peptide amides. *Peptides*, 2, 45-50.
82. **Bergmann, M., and Zervas, L.**, (1932) Max Bergmann and Leonidas Zervas: Uber ein allgemeines Verfahren der Peptid-Synthese. *Ber. Deutsch. Chem. Ges.*, 65, 1192-1201.
83. **Anderson, G. W., and McCregor, A. C.**, (1957) t-Butyloxycarbonylamino acids and their use in peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 6180-6183.
84. **Carpino, L. A., and Han, G. A.**, (1970) The 9-fluorenylmethoxycarbonyl function, a new base-sensitive amino-protecting group. *J. Org. Chem.*, 92, 5748-5756.
85. **Guy, C.A., Fields, G. B.**, in: *Methods in Enzymology*, Vol. 289, *Solid-Phase Peptide Synthesis*, Fields, G. B., Eds, Academic Press, San Diego, (1997) 29.
86. **Fujino, M., Wakimasu, M., Kitada, C.**, (1982) 4-methoxy-2,3,4-trimethylbenzenesulphonyl (Mtr) – A new amino-protecting group in peptide-synthesis. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 8, 445-446.

87. **Kunz, H., and Unversagt, C.**, (1984) The allyloxycarbonyl (Alloc) moiety-conversion of an unsuitable into a valuable amino protecting group for peptide synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 23, 436-437.
88. **Hiskey, R. G.**, in: *The Peptides*, Vol. 3, Gross, E., and Meienhofer, J., Eds., Academic Press, New York, (1981) pp:137-167.
89. **Merrifield, R. B., Gisin, B. F., Bach, A. N.**, (1977) Limits of reaction of radioactive dicyclohexylcarbodiimide with amino-groups during solid-phase peptide-synthesis. *J. Org. Chem.*, 42, 1291-1295.
90. **Benoiton, N. L.**, (1996) 2-alkoxy-5(4H)-oxazolones and the enantiomerization of N-alkoxycarbonylamino-acids. *Biopolymers*, 40, 245-254.
91. **Hudson, D.**, (1988) Methodological implications of simultaneous solid-phase peptide-synthesis. 1. Comparison of different coupling procedures. *J. Org. Chem.*, 53, 617-624.
92. **Balcom, B. J., and Petersen, N. O.**, (1989) Solvent dependence of carboxylic-acid condensations with dicyclohexylcarbodiimide. *J. Org. Chem.*, 54, 1922-1927.
93. **Lloyd-Williams, P., Albericio, F., and Giralt, E.**, (1997) *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*, CRC Press, New York, pp: 51.
94. **Konig, W., and Geiger, R.**, (1970) Eine neue methode zur synthese von peptiden: Aktivierung der carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter zusatz von 1-Hydroxy-benzotriazol. *Chem. Ber.*, 103, 788-798.
95. **Prasad, K. U., Iqbal, M. A., and Urry, D. W.**, (1985) Utilization of 1-Hydroxybenzotriazole in mixed anhydride coupling reactions. *Int. J. Pep. Protein. Res.*, 25, 408-413.
96. **Carpino, L. A.**, (1993) 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive. *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 4397-4398.
97. **Izdebski, J., Pachulska, M., and Orlowska, A.**, (1994) N-cyclohexyl-N'-isopropylcarbodiimide: a hybrid that combines the structural features of DCC and DIC. *Int. J. Pept. Protein. Res.*, 45, 414-419.
98. **Castro, B., Dormoy, J. R., Evin, G., and Selve, C.**, (1975) Reactifs de couplage peptidique I(1)- l' hexafluorophosphate de benzotriazolyl N-oxytrisdimethylamino phosphonium (B.O.P). *Tetrahedron Lett.*, 16, 1219-1222.
99. **Castro, B., Dourtoglou, B., Dormay, J. R., Evin, G., Serve, C., and Ziegler, J. C.**, (1976) Peptide coupling reagents. VI. A novel, cheaper preparation of

- benzotriazolyl-oxytris [dimethylamino] phosphonium hexafluorophosphate (BOP reagent). *Synthesis.*, 18, 751-752.
100. **Coste, J., Le Nguyen, D., and Castro, B.**, (1990) PyBOP: A new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product. *Tetrahedron Lett.*, 31, 205-208.
 101. **Hoeg-Jensen, T., Jakobsen, M. H., Olsen, C. E., and Holm, A.**, (1991) Formation of peptide thioamides by use of Fmoc amino monothioacids and PyBOP. *Tetrahedron Lett.*, 32, 7617-7620.
 102. **Dourtoglou, V., Ziegler, J. C., and Gross, B.**, (1978) Hexafluorophosphate of O-Benzotriazole-N,N-tetramethyurea – New and effective reagent of coupling peptide. *Tetrahedron Lett.*, 15, 1269-1272.
 103. **Dourtoglou, V., Gross, B., Lambropoulou, V., and Ziodrou, C.**, (1984) O-Benzotriazolyl-N, N, N', N'-tetramethyloronium hexafluorophosphate as coupling reagent for the synthesis of peptides of biological interest. *Synthesis.* 572-574.
 104. **Knorr, R., Trzeciak, A., Bannawarth, W., and Gillsen, D.**, (1989) New coupling reagents in peptide chemistry. *Tetrahedron Lett.*, 30, 1927-1930.
 105. **Story, S. C., and Aldrich, J. V.**, (1994) Side-product formation during cyclization with HBTU on a solid support. *Int. J. Pept. Res.* 43, 292-296.
 106. **Coste, J., Dufour, M. N., Pantaloni, A., and Castro, B.**, (1990) Brop – A new reagent for coupling N-methylated amino-acids. *Tetrahedron Lett.*, 31, 669-672.
 107. **Frerot, E., Coste, J., Pantalini, A., Dufour, M. N., and Jouin, P.**, (1991) PyBop and PyBrop – 2 reagents for the difficult coupling of the alpha,alpha-dialkyl amino-acid, Aib. *Tetrahedron*, 47, 259-270.
 108. **Schnolzer, M., Alewood, P., Jones, A., Alewood, D., and Kent, S. B. H.**, (1992) Insitu neutralization in Boc-chemistry solid-phase peptide-synthesis – rapid, high yield assembly of difficult sequences. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 40, 180-193.
 109. **Wijkmans, J. C. H. M., Blok, F. A. A., van der Marel, G. A., van Boom, J. H., and Bloemhof, W.**, (1995) CF₃-NO₂-PyBop(1) – A new and highly efficient coupling reagent for N-methyl amino-acids. *Tetrahedron Lett.*, 36(26), 4643-4646.
 110. **Tam, J. P., and Merrifield, R. B.**, in: *The Peptides. Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 9, *Special Methods in Peptide Synthesis*, Part C, Undenfriend, S., and Meienhofer, J., Eds., Academic Press, New York, 1987, 185.

111. **Stewart, J. M.**, in: *Methods in Enzymology*, Vol. 289, *Solid-Phase Peptide Synthesis*, Fields, G. B., Eds., Academic Press, San Diego, (1997) 29.
112. **Tam, J. P., Heath, W. F., and Merrifield, R. B.**, (1983) SN₂ deprotection of synthetic peptides with low concentration of HF in dimethyl sulfide evidence and application in peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 105, 6442-6445.
113. **Tam, J. P., Heath, W. F., and Merrifield, R. B.**, (1986) Mechanisms for the removal of benzyl protecting groups in synthetic peptides by trifluoromethanesulfonic acid trifluoroacetic-acid dimethyl sulfide. *J. Am. Chem. Soc.*, 108(17), 5242-5251.
114. **Atherton, E., and Sheppard, R. C.**, *Solid Phase Peptide Synthesis. A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, (1989) 1.
115. **Wuthrich, K.**, *NMR of proteins and nucleic acids*, (1986), John Wiley and Sons, New York, USA.
116. **Roberts, G. C. K.**, *NMR of macromolecules: A practical approach.*, (1993) Oxford University Press, Oxford, UK.
117. **Banwell C. N., and McCash E. M.**, *Fundamentals of Molecular Spectroscopy*, (1994) McGraw-Hill International Ltd, UK.
118. **Kessler, H., Gehrke, M., and Griesinger C.**, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, (1988) 27, pp: 490-536.
119. **Braunschweiler, L., and Ernst, R. R.**, (1983) Coherence Transfer by isotropic mixing – application to proton correlation spectroscopy. *J. Magn. Reson.*, 53, 521-528.
120. **Bax, A., and Davis, D. G.**, (1985) MLEV-17-Based two-dimensional homonuclear magnetization transfer. *J. Magn. Reson.*, 65, 355-360.
121. **Jeener J., Meier, B. H., Bachmann, P., and Ernst, R. R.**, (1979) Investigation of exchange processes by 2-dimensional nmr-spectroscopy, *J. Chem. Phys.*, 71 4546-4553.
122. **Macura, S., and Ernst R. R.**, (1980) Elucidation of cross relaxation in liquids by two-dimensional nmr-spectroscopy. *Mol. phys.*, 41, 95-117.
123. **Piantini, U., Sorensen, O. W., and Ernst, R. R.**, (1982) Multiple quantum filters for elucidating NMR coupling networks. *J. Am. Chem Soc.*, 104(24), 6800-6801.

124. **Rance, M., Sorensen, O. W., Bodenhausen, G., Wagner, G., Ernst, R. R., Wuthrich, K.**, (1983) Improved spectral resolution in Cosy H-1-nmr spectra of proteins via double quantum filtering. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 117 (2), 479-485.
125. **Neuhaus, D., Williamson, M.**, (1989) *The Nuclear Overhauser Effect in Structural Conformational Analysis.*, VCH Publishers, New York.
126. **Kessler, H., Griesinger, C., Wagner, K., Kerssebaum, R., and Ernst, R. R.**, (1987) Peptide conformations .42. Conformation of side-chains in peptides using heteronuclear coupling-constants obtained by two-dimensional nmr-spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 109(23) 6927-6933.
127. **Karplus, M.**, (1963) Vicinal proton coupling in Nuclear Magnetic Resonance. *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 2870.
128. **Wuthrich, K., Billeter, M., and Braun, W.**, (1984) Polypeptide secondary structure determination by nuclear magnetic resonance observation of short proton-proton distances. *J. Mol. Biol.*, 180, 715-740.
129. **Sarin, V. K., Kent, S. B.H., Tam, J. P., et al.**, (1981) Quantitative monitoring of solid-phase peptide-synthesis by the ninhydrin reaction. *Anal. Biochem.*, 117, 147-157.
130. **Hearn, M. T. W., Grego, B.**, (1984) High-Performance Liquid-Chromatography of amino-acids, Peptides and Proteins .56. Detergent-mediated Reversed-Phase High-Performance Liquid-Chromatography of polypeptides and proteins. *J. Chromatogr.*, 296, 309-319.
131. **Flocco, M. M., and Mowbray, S. L.**, (1994) Planar stacking interactions of Arginine and Aromatic side-chains in Proteins. *J. Mol. Biol.*, 235, 709-717.
132. **Abraham, R. J., and MacLauchlam, K. A.**, (1962) *Mol. Phys.*, 5, 195-203.
133. **Cung, M. T., and Marraud, M.**, (1982) Conformational dependence of the vicinal proton coupling constant for the C^α-C^β bond in peptides. *Biopolymers*, 21, 953-967.
134. **Mammonas, S., Sakarellos-Daitsiotis, M., Sakarellos, C., and Tsikaris, V.**, (2001) The peptide sequence -Lys(Ac)-Aib-Gly as a scaffold for inducing helicoid structures. Applications to the main immunogenic region of the Acetylcholine receptor. in *18^o Hellenic Symposium of Chemistry.*, pp: 278-281.
135. **Tsikaris, V., Sakarellos-Daitsiotis, M., Panou-Pomonis, E., Detsikas, E., Sakarellos, C., Cung, M. T., and Marraud, M.**, (1992) ¹H-NMR studies on

Arginine tripeptides: Evidence for Guanidinium – C-terminal Carboxylate interactions. *Peptide Research.*, 5, 110-114.

136. **Tselepis A. D., Tsoukatos, D., Droudes, C, Donas, A., and Evangelou, A.,** (1991) Platelet response to the aggregatory effect of platelet-activating-factor (PAF) exvivo in patients with acute myocardial-infarction. *Eur. J. Clin. Invest.*, 21, 490-496.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

I. ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

2-Cl-Z:	(2-Chlorobenzyloxycarbonyl), 2-Χλωροβενζυλοξυκαρβονυλο
2D-NMR:	(Two-Dimensional NMR), NMR Δύο διαστάσεων
Acm:	(Acetamidomethyl), Ακεταμιδομάδα
Aib:	(Aminoisobutyric acid), Αμινοϊσοβουτυρικό οξύ
Alloc:	(Allyloxycarbonyl), Αλλυλοξυκαρβονυλο.
Arg (R):	(Arginine), Αργινίνη
Asp (D):	(Aspartate), Ασπαρτικό
Boc:	(tert-Butoxycarbonyl), τερτ-Βουτυλοξυκαρβόνυλο.
Bom:	(Benzyloxymethyl), Βενζυλοξυμεθυλο
BOP:	[Benzotriazole-1-yl-oxy-tris(dimethylamino)-phosphonium hexafluorophosphate], εξαφθοροφωσφορικό αλας του βενζοτριαζολυλ-τρις(διμεθυλαμινο) φωσφονίου.
Bzl:	(Benzyl), Βενζυλο
COSY:	(Correlated Spectroscopy), Ομοπυρηνική Φασματοσκοπία Συσχέτισης δύο διαστάσεων.
Cys (C):	(Cysteine), Κυστεΐνη
DCC:	(N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide), N,N'-Δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμίδιο
DCM:	(Dichloromethane), Διχλωρομεθάνιο
DIEA:	(Diisopropylamine), Δισοπροπυλοαμίνη
DMF:	(Dimethylformamide), Διμεθυλοφορμαμίδιο
DMSO:	(Dimethylsulfoxide), Διμεθυλοσουλφοξείδιο
Dnp:	(Dinitrophenyl), Δινιτροφαινυλομάδα
FID:	(Free Induction Decay), Ελεύθερη Επαγωγική Φθορά
Fmoc:	(9-Fluorenylmethoxycarbonyl), 9-Φλουορενελμεθοξυκαρβονυλο.
Gly (G):	(Glycine), Γλυκίνη
HBTU:	[2-(1H-Benzotriazole-1-yl)1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate], βενζοτριαζολ-τετραμεθυλο-ουρονικο-εξαφωσφορικό αλας.
HF:	(Hydrogen Fluoride), Υγρό Υδροφθόριο
HOBT:	(N-Hydroxybenzotriazole), N-Υδροξυβενζοτριαζόλιο

Lys (K):	(Lysine), Λυσίνη
Mtr:	(4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzenesulfonyl), 4-μεθοξυ-2,3,6-τριμεθυλο-βενζενοςουλφονυλο.
Mts:	(Mesitylene-2-sulfonyl), Μεσιτυλενο-2-σουλφονυλο.
NMR:	(Nuclear Magnetic Resonance), Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός
NOE:	(Nuclear Overhauser Effect), Φαινόμενο Overhauser.
NOESY:	(Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy), Φασματοσκοπία Πυρηνικού Φαινομένου Overhauser.
Pbf:	(2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl), 2,2,4,6,7-πενταμεθυλοδιυδροβενζοφουρανο-5-σουλφονυλο.
Pmc:	(2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl), 2,2,5,7,8-πενταμεθυλοχρωmano-6-σουλφονυλο
PyBOP:	(Benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate), εξαφθοροφωσφορικό αλας του βενζοτριαζολυλ-τρις-πυρρολικιδινο φωσφονίου.
ROESY:	(Rotating Frame NOESY), Φασματοσκοπία NOESY Περιστρεφόμενου Πλαισίου.
Ser (S):	(Serine), Σερίνη
TBTU:	[2-(1H-Benzotriazole-1-yl)1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate], βενζοτριαζολ-τετραμεθυλο-ουρονικο-τετραφθοροβορικό αλας.
tBu:	(tert-Butyl), τερτ-Βουτυλο
TFA:	(Trifluoroacetic acid), Τριφθοροξικό οξύ
Tfa:	(Trifluoroacetyl), Τριφλουροοακετυλο
TFE:	(Trifluoroethanol), Τριφλουροοεθανόλη
TMS:	(Tetramethylsilane), Τετραμεθυλοσιλάνιο
Tos:	(Tosyl), Τοζυλ.
TOSCY:	(Total Correlated Spectroscopy), Φασματοσκοπία Συνολικής Συσχέτισης
Trt:	(Trityl), Τριτυλο.
Val (V):	(Valine), Βαλίνη
Z:	(Benzyloxycarbonyl), Βενζυλοξυκαρβονυλο.