

Miklos Bodanszky

ΠΕΠΤΙΔΟΧΗΜΕΙΑ

Ένα Πρακτικό Διδακτικό Βιβλίο

Δεύτερη Αναθεωρημένη Έκδοση

Με 2 Σχήματα και 5 Πίνακες

**ΑΠΟΔΟΣΗ ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ
ΑΠΟ ΤΟΥΣ**

**ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟ ΣΑΚΑΡΕΛΛΟ
ΚΑΘΗΓΗΤΗ**

**ΕΥΓΕΝΙΑ ΠΑΝΟΥ-ΠΟΜΩΝΗ
ΔΕΚΤΟΡΑ**

Γραφείο Εκτυπώσεων Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Κάθε γνήσιο αντίτυπο είναι υπογεγραμμένο από τούς:

Κωνσταντίνο Σακαρέλλο, Καθηγητή
Ευγενία Πάνου-Πομόνη, Λέκτορα

Copyright 1994. Γραφείο Εκτυπώσεων Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Ioannina, University, Press Office
Δόμπολη, Ιωάννινα 45110

Τα δικαιώματα της Ελληνικής έκδοσης του παρόντος βιβλίου ανήκουν στο Γραφείο Εκτυπώσεων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η δημοσίευση φωτογραφιών, η μερική ή ολική ανατύπωση καθώς και η λήψη φωτοαντιγράφων από το βιβλίο απαγορεύεται χωρίς την έγγραφη άδεια του Γραφείου Εκτυπώσεων του Παν/μίου Ιωαννίνων.

Τυπώθηκε στην Ελλάδα
στο Τυπογραφείο Γ. ΛΟΥΒΑΛΗΣ - Ε. ΑΠΟΣΤΟΛΟΥ Ο.Ε.
28ης Οκτωβρίου 41, Ιωάννινα

Στη μνήμη
του αδελφού μου *Dr. S. Bodanszky*

Πρόλογος της Δεύτερης Έκδοσης

Το συνεχιζόμενο ενδιαφέρον για την "Πεπτιδοχημεία" προκάλεσε τη διόρθωση της πρώτης έκδοσης αυτού του βιβλίου. Έτσι δόθηκε η ευκαιρία να βελτιώσουμε αρκετές λεπτομέρειες. Είμαι ευγνώμων στους συναδέλφους που είχαν την ευγένεια να μου υποδείξουν λάθη τυπογραφικά και άλλα που ανακάλυψαν στην πρώτη έκδοση. Αυτά τώρα έχουν διορθωθεί καθώς και ορισμένες ατέλειες στη γλώσσα και στο ύφος που υποδείχθηκαν από την κόρη μου Dr. Eva Bodanszky.

Το 1991 κυκλοφόρησε το εξαιρετικό βιβλίο *Η Χημική σύνθεση των Πεπτιδίων* από τον John Jones (Oxford University Press, 1991). Καλύπτει εν μέρει το ίδιο πεδίο, αλλά είναι αρκετά διαφορετικό από την "Πεπτιδοχημεία" ώστε να δικαιολογείται η διορθωμένη έκδοση αυτής.

Princeton, Ιούλιος 1993

M. Bodanszky

Πρόλογος της Πρώτης Έκδοσης

Η φύση χρησιμοποιεί πεπτίδια για μια μεγάλη ποικιλία ειδικών λειτουργιών. Η εξειδίκευση που προκύπτει από τον ιδιαίτερο χαρακτήρα κάθε αμινοξέος αυξάνεται περισσότερο από το συνδυασμό μερικών αμινοξέων σε μεγαλύτερα μόρια. Τα πεπτίδια έτσι μπορούν να δράσουν σαν μεταφορείς χημικών μηνυμάτων, νευροδιαβιβαστές, σαν υψηλής εξειδίκευσης ενεργοποιητές και αναστολείς ρυθμίζοντας ποικίλες λειτουργίες της ζωής. Ολόκληρες τάξεις βιολογικά δραστικών ουσιών, όπως τα οπιοειδή πεπτίδια ή οι ορμόνες του στομάχου και του εντέρου ανακαλύφθηκαν σε μικρό χρονικό διάστημα και είναι απίθανο ότι η γρήγορη διαδοχή των ανακαλύψεων σημαντικών νέων πεπτιδίων θα μπορούσε να σταματήσει ξαφνικά. Στην πραγματικότητα η γνώση μας σ' αυτό το πεδίο είναι πιθανόν ακόμη σε ένα πρώτο στάδιο ανάπτυξης. Τα πεπτίδια απέκτησαν επίσης σπουδαιότητα στην καθημερινή μας ζωή. Ένα παράγωγο διπεπτιδίου χρησιμοποιείται σαν γλυκαντικό, ένα άλλο για να ρυθμίσει την υψηλή πίεση του αίματος. Πεπτίδια μετρίου μεγέθους, όπως η οξυτοκίνη ή η βασοπρεσσίνη διατίθενται για φαρμακευτικούς σκοπούς για πολλά χρόνια και πιο πρόσφατα πεπτιδικές ορμόνες με αξιοσημείωτο μήκος αλυσίδας, για παράδειγμα η καλσιτονίνη και η σεκρετίνη

VIII Πρόλογος

παρασκευάζονται σε βιομηχανική κλίμακα για θεραπεία. Οι πρακτικές αυτές εφαρμογές μόνες τους θα μπορούσαν να δικαιολογήσουν τη διδασκαλία της πεπτιδικής χημείας σε ένα ιδιαίτερο μάθημα. Δεν είναι βέβαια λιγότερο σημαντικό το γεγονός ότι η χημεία των πεπτιδίων αντιμετωπίζεται σαν παραπαίδι στα βιβλία και της οργανικής χημείας και της βιοχημείας, ένα θέμα που εκτίθεται σε λίγες σελίδες. Υπάρχουν καλοί λόγοι γι' αυτό. Ενώ η βιοσύνθεση και ο μεταβολισμός των αμινοξέων και η βιοσύνθεση και η λειτουργία των πρωτεϊνών είναι στην κύρια γραμμή της βιοχημείας, η χημεία των πεπτιδίων και ιδιαιτέρως η σύνθεση των πεπτιδίων, είναι πολύ στενά δεμένα με την οργανική χημεία για να εξετασθούν με λεπτομέρεια στα βιβλία βιοχημείας. Μια περισσότερο απλή όμως παρουσίαση των πεπτιδίων, θα υπερέβαινε τα όρια ενός μονού τόμου βιβλίου οργανικής χημείας. Επίσης ο προσδιορισμός της αλληλουχίας είναι έξω από τις γενικές μεθόδους προσδιορισμού της δομής που εφαρμόζονται για την πλειοψηφία των οργανικών ενώσεων και η σύνθεση των πεπτιδίων σκοπεύει σε ενώσεις με μοριακά βάρη πέρα από αυτά που συναντώνται στη σύνθεση άλλων φυσικών προϊόντων, με την αξιοσημείωτη εξαίρεση των νουκλεϊνικών οξέων. Ιδιαίτερα προβλήματα που προκύπτουν στα πεπτίδια είναι ο ταυτόχρονος χειρισμός πολυάριθμων δραστικών ομάδων, η συνεχής ανάγκη για διατήρηση της οπτικής καθαρότητας και οι μη συνήθεις τρόποι ανάλυσης των ρετροπεπτιδίων. Η πεπτιδοχημεία είναι πράγματι ένα επιστημονικό πεδίο από μόνη της με τη δική της πρακτική σημασία και μια διανοητική πρόκληση. Αξίζει να διδάσκεται σαν ιδιαίτερο μάθημα.

Ο συγγραφέας αυτού του μικρού τόμου έχει διδάξει Πεπτιδική Χημεία σε μεταπτυχιακό επίπεδο για πολλά χρόνια. Ήταν όμως οδυνηρή η έλλειψη ενός κατάλληλου βιβλίου και για τους φοιτητές και για το δάσκαλο και οι διάφορες σημειώσεις ήταν ανεπαρκή υποκατάστατα. Αυτό το βιβλίο γράφτηκε με την υπόθεση ότι η ύπαρξή του θα ενεργοποιήσει τη διδασκαλία αυτού του θέματος. Το μέγεθος του τόμου περιορίστηκε με την επιθυμία να μην είναι ακριβό, αλλά η ύλη που παρουσιάζεται έγινε προσπάθεια να είναι αρκετή για ένα εξαμηνιαίο μάθημα τριών ωρών. Το πρώτο μέρος που ασχολείται με τον προσδιορισμό της δομής των πεπτιδίων θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί χωριστά για ένα μικρό μάθημα, ενώ το δεύτερο μέρος που ασχολείται με τη σύνθεση θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για ένα εξαμηνιαίο μάθημα δύο ωρών. Θα έδινε στο συγγραφέα μεγάλη ικανοποίηση αν οι δάσκαλοι παρακινούμενοι από τη χρησιμότητα αυτού του μικρού βιβλίου πρόσφεραν μια σειρά μαθημάτων στην Πεπτιδική Χημεία και αν οι φοιτητές έβρισκαν αυτό χρήσιμο για τις σπουδές τους.

Ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή G.T. Young (Oxford University) για τα σχόλια και τις προτάσεις του που αφορούν το βιβλίο μου "Αρχές της Πεπτιδικής Σύνθεσης" (Springer Verlag, 1984), τα οποία ήταν πολύ χρήσιμα στο γράψιμο αυτού του βιβλίου. Ευχαριστώ τη σύζυγό μου Agnes για τις πολλές διορθώσεις και βελτιώσεις κατά την παρασκευή αυτού του χειρογράφου.

Princeton, Μάιος 1988

M. Bodanszky

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I.	Εισαγωγή	1
	Αναφορές και Περαιτέρω Βιβλιογραφία	9

Μέρος Πρώτο: Προσδιορισμός της Δομής

II.	Ανάλυση Αμινοξέων	13
	Περαιτέρω Βιβλιογραφία	15

III.	Προσδιορισμός της Αλληλουχίας των Αμινοξέων	16
A.	Προσδιορισμός της Ακραίας Ομάδας	16
1.	Προσδιορισμός του N-τελικού Αμινοξέος	17
2.	Προσδιορισμός του C-τελικού Αμινοξέος	19
B.	Διαδοχική Αποικοδόμηση	20
1.	Υδρόλυση που καταλύεται από Εξωπεπτιδάσες	21
2.	Αποικοδόμηση Edman	22
	α) Διαδικασία Δύο Σταδίων	22
	β) Διαδικασία Τριών Σταδίων	23
	γ) Αυτόματος Προσδιορισμός της Αλληλουχίας	24
	δ) Η μέθοδος Edman-Dansyl	25
Γ.	Προσδιορισμός της Αλληλουχίας με τη βοήθεια Φασμάτων Μάζης	25
Δ.	Τεμαχισμός των Πεπτιδίων	28
1.	Υδρόλυση με Ειδικές Ενδοπεπτιδάσες	28
2.	Χημικές Μέθοδοι διάσπασης	31
3.	Διάσπαση των Δισουλφιδίων	34
	Αναφορές και Περαιτέρω Βιβλιογραφία	38

IV. Δευτεροταγής και Τριτοταγής Σύνταξη

A.	Αρχιτεκτονικά Χαρακτηριστικά των Πεπτιδίων	39
1.	Ο Πεπτιδικός Δεσμός	39
2.	Δευτεροταγής Σύνταξη	40
3.	Τριτοταγής Σύνταξη	42
4.	Τεταρτοταγής Σύνταξη	44

X Περιεχόμενα

B.	Μέθοδοι Ανάλυσης της Δομής των Πεπτιδίων	44
1.	Οπτική Στροφική Διασπορά και Κυκλικός Διχρωϊσμός	45
2.	Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού	48
3.	Κρυσταλλογραφία Ακτίνων Χ	49
Γ.	Πρόβλεψη της Δομής των Πεπτιδίων	50
	Αναφορές και Περαιτέρω Βιβλιογραφία	52

Μέρος Δεύτερο: Πεπτιδική Σύνθεση

V.	Σχηματισμός του Πεπτιδικού Δεσμού	55
A.	Μέθοδος των Χλωριδίων	55
B.	Μέθοδος των Αζιδίων	56
Γ.	Μέθοδος των Ανυδριτών	58
Δ.	Μέθοδος των Ενεργών Εστέρων	60
E.	Αντιδραστήρια Σύζευξης	63
ΣΤ.	Σχηματισμός Δεσμού που καταλύεται από ένζυμα	68
Z.	Μη Συμβατικές Μέθοδοι Σχηματισμού Πεπτιδικού Δεσμού	71
	Αναφορές	72
	Περαιτέρω Βιβλιογραφία	73
VI.	Προστασία των Δραστικών Ομάδων	74
A.	Προστασία των αμινομάδων	74
B.	Προστασία των Αμινομάδων της Παράπλευρης αλυσίδας	82
Γ.	Προστασία της Καρβοξυλικής Ομάδας	85
Δ.	Προστασία των Υδροξυλομάδων	88
E.	Προστασία της Σουλφυδρυλομάδας	90
ΣΤ.	Προστασία του θειοαιθέρα της Μεθειονίνης	94
Z.	Προστασία της Γουανιδινομάδας της Παράπλευρης Αλυσίδας της Αργινίνης	96
H.	Προστασία του Ιμιδαζόλιου της Ιστιδίνης	100
Θ.	Προστασία του Ινδολίου	103
I.	Καρβοξαμιδικές Προστατευτικές Ομάδες	103
	Αναφορές και Περαιτέρω Βιβλιογραφία	105
VI.	Ανεπιθύμητες Αντιδράσεις κατά τη Διάρκεια της Σύνθεσης ..	106
A.	Κλείσιμο Δακτυλίου με Κατάλυση από Βάση	106
B.	Κλείσιμο Δακτυλίου με Κατάλυση από Οξύ	110
Γ.	Μετάθεση Ακυλίου	111
Δ.	Αλκυλίωση	112

E.	Αντίδραση Friedel-Crafts	112
ΣΤ.	Κορεσμός των Αρωματικών Πυρήνων	113
Z.	Αναγωγική Διάσπαση της Πεπτιδικής Αλυσίδας	113
H.	Οξειδωτική Αποσύνθεση του Ινδολίου της Τρυπτοφάνης	114
Θ.	Παράπλευρες Αντιδράσεις που προκαλούνται από Στερική Παρεμπόδιση	114
I.	Πρόληψη και Αναίρεση των Παράπλευρων Αντιδράσεων	115
	Περαιτέρω Βιβλιογραφία	116
VI.	Ρακεμοποίηση	117
A.	Μηχανισμός Ρακεμοποίησης	117
B.	Προσδιορισμός της Ρακεμοποίησης	120
Γ.	Μελέτες Ρακεμοποίησης σε Πρότυπα Συστήματα	121
Δ.	Πρόληψη της Ρακεμοποίησης	125
	Αναφορές και Περαιτέρω Βιβλιογραφία	128
IX.	Σχεδιασμός της Τακτικής της Πεπτιδικής Σύνθεσης	129
A.	Συμπύκνωση Κλασμάτων	129
B.	Βήμα προς Βήμα Επιμήκυνση της Πεπτιδικής Αλυσίδας Αρχίζοντας από το C-τελικό Αμινοξύ	131
Γ.	Βήμα προς Βήμα Επιμήκυνση της Πεπτιδικής Αλυσίδας Αρχίζοντας από το N-τελικό Αμινοξύ	131
Δ.	Μελέτες Τακτικής των Συνθέσεων	134
E.	Σύνθεση Ειδικών Πεπτιδίων	135
	1. Πολυαμινο-οξέα και Πολυπεπτίδια με Επαναλαμβανόμενη Αλληλουχία	136
	2. Θειούχες Γέφυρες	138
	3. Κυκλικά Πεπτίδια	140
	4. Πεπτίδια που περιέχουν Συστατικά που δεν είναι Αμινοξέα	145
	5. Ημισύνθεση (Μερική Σύνθεση)	146
	Περαιτέρω Βιβλιογραφία	148
X.	Σύνθεση Πεπτιδίων σε Στερεά Φάση	149
A.	Το Αδιάλυτο Πολυμερές Υποστήριγμα και ο Δεσμός που Συνδέει το Πεπτίδιο στη Ρητίνη	153
B.	Απομάκρυνση των Προσωρινών Προστατευτικών Ομάδων	158
Γ.	Σύζευξη: Ακυλίωση του Συνδεδεμένου με τη Ρητίνη Αμινο- συστατικού	160
Δ.	Διαχωρισμός του Πεπτιδίου από το Πολυμερικό Υποστήριγμα και Τελική Αποπροστασία	164

XII	Περιεχόμενα	
E.	Μερικά Προβλήματα που Συναντώνται στην Πεπτιδική Σύνθεση Στερεάς Φάσης	166
1.	Πρόωρος Τερματισμός της Αλυσίδας	167
2.	Ελλιπής Αλληλουχία	168
	Αναφορές και Περαιτέρω Βιβλιογραφία	170
XI.	Ειδικές Μέθοδοι Σύνθεσης	171
A.	Αλυσίδες Προσκολημένες σε ένα Διαλυτό Πολυμερές (Μέθοδος Υγρής Φάσης)	171
B.	Μέθοδος των Πικολυλο-Εστέρων	172
Γ.	Γρήγορη σύνθεση	174
1.	Σύνθεση της Αλυσίδας Χωρίς Απομόνωση των Ενδιάμεσων Παραγώγων	174
2.	Σύνθεση της Αλυσίδας με Απομόνωση των Ενδιάμεσων Παραγώγων	174
Δ.	Σύνθεση "in situ"	175
E.	Ταυτόχρονη Σύνθεση Πεπτιδικών Αναλόγων	175
ΣΤ.	Αδιάλυτα Αντιδραστήρια	176
1.	Ενεργοί Εστέρες	176
2.	Πολυμερή Αντιδραστήρια Σύζευξης	179
3.	Αδιάλυτα Αντιδραστήρια Διάσπασης	179
	Αναφορές και Περαιτέρω Βιβλιογραφία	180
XII.	Ανάλυση και Χαρακτηρισμός Συνθετικών Πεπτιδίων	181
A.	Έλεγχος Ομοιογένειας	181
B.	Ανάλυση Αμινοξέων και Προσδιορισμός Αλληλουχίας	183
Γ.	Στοιχειακή Ανάλυση	185
Δ.	Μέτρηση της Οπτικής Ικανότητας	186
E.	Φάσματα Απορρόφησης Υπερύθρου και Υπεριώδους	187
ΣΤ.	Φάσματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού	187
Z.	Προσδιορισμός Μοριακού Βάρους	189
	Αναφορές και Περαιτέρω Βιβλιογραφία	190
	Ευρετήριο	191

I. Εισαγωγή

Η σημασία των πρωτεϊνών, ουσιών που είναι υπεύθυνες για τις πρωταρχικές λειτουργίες του ζωντανού κυττάρου, δε χρειάζεται να τονισθεί περισσότερο. Πρέπει να χρωστάμε ευγνωμοσύνη στον ονοματολόγο, ο οποίος από την Ελληνική λέξη *πρώτος* ή *πρωταρχικός* επινόησε τη λέξη *πρωτεΐνη*. Αυτή η πρόβλεψη ή το προαίσθημα, που συνήθως αποδίδεται στον Jac Berzelius δικαιώθηκε παρ'όλη την εντυπωσιακή πρόοδο της χημείας των νουκλεϊνικών οξέων, της ανάδειξης του DNA σα φορέα των γενετικών πληροφοριών και του RNA σαν εκμαγείου στη βιοσύνθεση των πρωτεϊνών. Τα νουκλεϊνικά οξέα αποτελούν τα εκμαγεία για την κατασκευή της πολύπλοκης μηχανής, ενώ οι μηχανές είναι οι πρωτεΐνες. Στην πραγματικότητα, οι πληροφορίες που κωδικοποιούνται στα DNA και RNA ενεργοποιούνται μόνον παρουσία των ενζύμων, που είναι πρωτεΐνες. Είναι φανερό περαιτέρω, ότι η χημεία των πρωτεϊνών είναι ένα από τα σπουδαιότερα κεφάλαια της βιοχημείας και μπορεί να αποτελέσει από μόνη της το θέμα ενός βιβλίου. Είναι ίσως λιγότερο προφανές γιατί η *πεπτιδοχημεία* θα έπρεπε να αντιμετωπισθεί ξεχωριστά. Ο όρος "πεπτίδιο" από τη λέξη πέψη ή πεπτόνη (πέψη προϊόντων των πρωτεϊνών) αναφέρεται σε μικρές ενώσεις, οι οποίες είναι αρκετά όμοιες με τις πρωτεΐνες, εκτός του ότι οι τελευταίες είναι ενώσεις με μεγαλύτερο μοριακό βάρος. Οι λόγοι γι'αυτή τη διάκριση δεν είναι προφανείς. Δεν υπάρχει σαφές όριο μεταξύ των δύο αυτών ομάδων ουσιών. Μόρια που αποτελούνται από 100 ή περισσότερα αμινοξέα θεωρούνται σαν πρωτεΐνες και εκείνα που περιέχουν μικρότερο αριθμό αμινοξέων σαν πεπτίδια. Η χημεία παραμένει βασικά η ίδια όταν ο αριθμός των αμινοξέων σε μια ένωση αυξάνεται ή ελαττώνεται. Επιπλέον τα περισσότερα πεπτίδια προκύπτουν από πρωτεΐνες οι οποίες διασπώνται με την επίδραση ειδικών ενζύμων σε συγκεκριμένα αμινοξέα που υπάρχουν στις αλυσίδες τους. Αυτοί θα μπορούσαν να είναι καλοί λόγοι για να συζητηθούν τα πεπτίδια στα πλαίσια της χημείας των πρωτεϊνών, αλλά τουλάχιστον εξίσου ισχυρά επιχειρήματα προτείνουν ότι ένα βιβλίο μόνο του θα έπρεπε να αφιερωθεί στην πεπτιδοχημεία.

Η χημεία των πρωτεϊνών είναι ένα απέραντο θέμα. Οι πολλές πλευρές του περιλαμβάνουν την περιγραφή διαφόρων ειδών πρωτεϊνών, ινωδών και σφαιρικών μορίων, ενζύμων, μεταφορέων οξυγόνου και μέσων μεταφοράς ηλεκτρονίων, γλυκοπρωτεϊνών, λιποπρωτεϊνών, φωσφοπρωτεϊνών, μεταφορέων θυροξίνης και χοληστερίνης, ορμονών, προδρόμων ορμονών και άλλων ρυθμιστών συμπεριλαμβανομένων των φυσικών ιδιοτήτων τους, όπως το μοριακό βάρος, η συσσωμάτωση και η δομή των υπομονάδων. Τελευταία ασχολείται και με τη βιοσύνθεση των πρωτεϊνών. Επομένως η χημεία των πρωτεϊνών είναι σαφώς μια μεγάλη υποπεριοχή της βιοχημείας. Αντίθετα, η πεπτιδοχημεία, λόγω του μικρότερου μοριακού βάρους των ενώσεων που ανήκουν στην περιοχή της, είναι πιο κοντά στην οργανική χημεία. Επίσης, τα μικροβιακά πεπτίδια, ως επί το πλείστον κυκλικά, περιέχουν μη συνήθη αμινοξέα, που δεν είναι