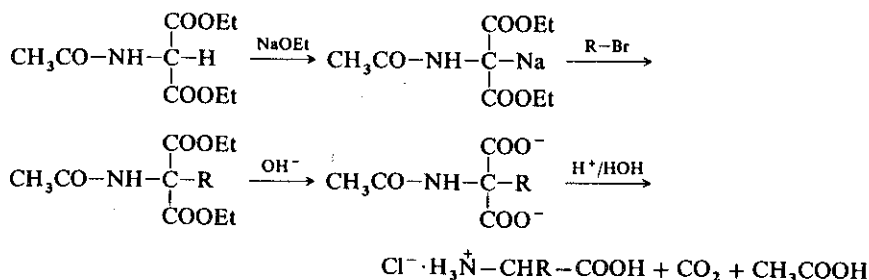


2 Εισαγωγή

συστατικά των πρωτεϊνών. Η δυνατότητα της σύνθεσης πεπτιδίων με τη βοήθεια των μέσων της οργανικής χημείας φαίνεται να είναι επαρκής δικαιολογία για τη ξεχωριστή αντιμετώπιση που επιχειρείται στα επόμενα κεφάλαια.

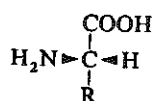
Τα αμινοξέα, συστατικά των πεπτιδίων και των πρωτεϊνών είναι ένα ευρύ θέμα από μόνα τους, τόσο ευρύ που δεν μπορεί να συμπεριληφθεί σ' αυτόν τον τόμο. Ο αναγνώστης που ενδιαφέρεται μπορεί να στραφεί στη σειρά των τριών τόμων των J.P. Greenstein και M. Winitz (δημοσιεύτηκε το 1961, αλλά είναι ακόμη επίκαιρο) ή στην πιο πρόσφατη δουλειά του Bartlett (1983). Εδώ θα περιορίσουμε τη συζήτηση στην ονοματολογία και τις γενικές μεθόδους σύνθεσης. Ο πίνακας 1 δείχνει τα είκοσι αμινοξέα από τα οποία αποτελούνται οι πρωτεΐνες. Μόνο γι' αυτά τα συστατικά είναι οι πληροφορίες κωδικοποιημένες στο DNA και RNA. Στις πρωτεΐνες συναντώνται επίσης τα κυριότερα παράγωγα των αμινοξέων, όπως υδροξυπρωλίνη, υδροξυλυσίνη, φωσφορικοί και θειικοί εστέρες της σερίνης και τυροσίνης, αλλά αυτά παράγονται μετά τη μετάφραση μέσω αλλαγών στις ήδη σχηματισμένες αλυσίδες με τη μεσολάβηση ειδικών ενζύμων. Εκτός από τα κοινά τους ονόματα ο πίνακας 1 περιέχει τις συντομεύσεις τριών γραμμάτων που ισχύουν γενικά γι' αυτά και επίσης τις συντομεύσεις με ένα γράμμα που απομνημονεύονται πιο δύσκολα αλλά είναι εντούτοις αρκετά πρακτικές στη σύγκριση των αναλόγων και στην απόδειξη της ομολογίας μεταξύ των πεπτιδίων. Ο πίνακας 2 απεικονίζει την πολύ μεγαλύτερη τάξη των αμινοξέων που βρίσκονται στα μικροβιακά πεπτίδια.

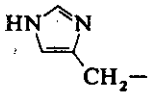
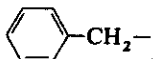
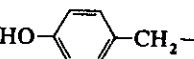
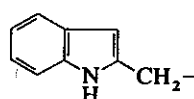
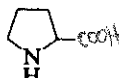
Η σύνθεση των αμινοξέων είναι μια δουλειά που σπανίως επιχειρείται από τους πεπτιδοχημικούς. Τα κοινά αμινοξέα διατίθενται στο εμπόριο. Παρασκευάζονται σε μεγάλη βιομηχανική κλίμακα συνήθως μέσω διαδικασιών ζύμωσης. Μερικές φορές, εντούτοις, χρειάζεται ένα αμινοξύ το οποίο δεν περιέχεται στους επιστημονικούς καταλόγους πώλησης. Για παράδειγμα η μελέτη του ρόλου της αμινομάδας της παράπλευρης αλυσίδας της λυσίνης απαιτεί ένα ανάλογο στο οποίο αυτή η αμινομάδα έχει αντικατασταθεί από μια μεθυλομάδα. Το προκύπτον αμινοξύ, το 2-αμινοεπτανοϊκό οξύ ή η ομοιορλευκίνη πρέπει να παρασκευασθεί γι' αυτό το σκοπό. Μια γενική μέθοδος σύνθεσης αμινοξέων που βασίζεται σ' ένα φτηνό αρχικό υλικό, τον διαιθυλεστέρα του ακετυλαμινομηλονικού οξέος, μπορεί να εφαρμοσθεί στις περισσότερες απ' αυτές τις περιπτώσεις. Την αλκυλίωση του παραγώγου του νατρίου ακολουθεί σαπωνοποίηση με άλαλι των εστερικών ομάδων και μετά υδρόλυση με οξύ, που συνοδεύεται από αποκαρβοξυλίωση.



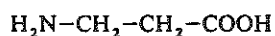
Πίνακας 1. Τα αμινοξέα συστατικά των πρωτεϊνών

Γενική σύνταξη των L-αμινοξέων (προβολή κατά Fischer)

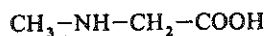


	όνομα	παράπλευρη αλυσίδα R	συντομο-μογραφία	συμβολισμός ενός γράμματος
μονοαμινο μονοκαρβο- ξυλικά οξέα	γλυκίνη	H—	Gly	G
	αλανίνη	CH ₃ —	Ala	A
	βαλίνη	(CH ₃) ₂ CH—	Val	V
	λευκίνη	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ —	Leu	L
	ισολευκίνη	CH ₃ CH ₂ (CH ₃)CH—	Ile	I
όξινα αμινοξέα και τα αμίδια τους	ασπαραγινικό οξύ	HOOC—CH ₂ —	Asp	D
	ασπαραγίνη	H ₂ NCO—CH ₂ —	Asn	N
	γλουταμινικό οξύ	HOOC—CH ₂ CH ₂ —	Glu	E
	γλουταμίνη	H ₂ NCO—CH ₂ CH ₂ —	Gln	Q
βασικά αμινοξέα	λυσίνη	H ₂ NCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ —	Lys	K
	αργινίνη	H ₂ NC(NH)NH—CH ₂ CH ₂ CH ₂ —	Arg	R
	ιστιδίνη	 —	His	H
υδροξύ αμινοξέα	σερίνη	HO—CH ₂ —	Ser	S
	θρεονίνη	CH ₃ CH(OH)—	Thr	T
αρωματικά αμινοξέα	φαινυλαλανίνη	 —	Phe	F
	τυροσίνη	 —	Tyr	Y
	τρυπτοφάνη	 —	Trp	W
θειούχα αμινοξέα	κυστεΐνη	HS—CH ₂ —	Cys	C
	μεθειονίνη	CH ₃ —S—CH ₂ CH ₂ —	Met	M
ένα αμινο οξύ	προλίνη		Pro	P

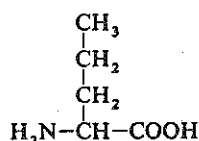
Πίνακας 2. Μερικά αμινοξέα συστατικά μικροβιακών πεπτιδίων (αμινοξέα που δε βρίσκονται στις πρωτεΐνες)



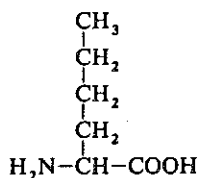
β-αλανίνη



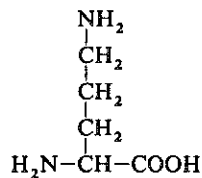
σαρκοσίνη



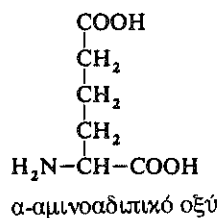
νορβαλίνη



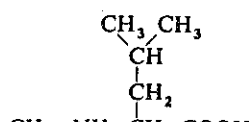
νορλευκίνη



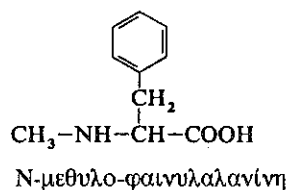
ορνιθίνη



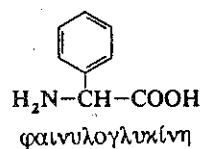
α-αμινοαδιπικό οξύ



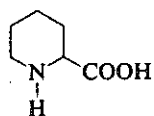
N-μεθυλο-λευκίνη



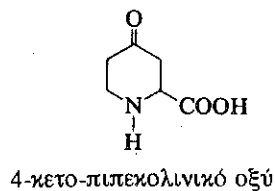
N-μεθυλο-φαινυλαλανίνη



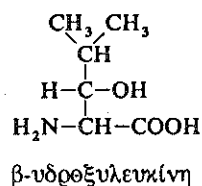
φαινυλογλυκίνη



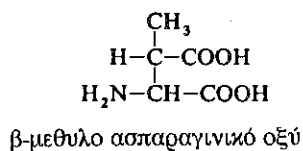
πιτεκολινικό οξύ



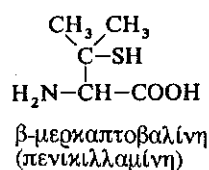
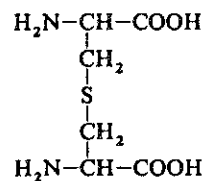
4-κετο-πιτεκολινικό οξύ



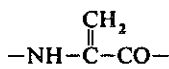
β-υδροξυλευκίνη



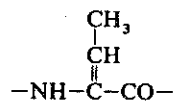
β-μεθυλο ασπαραγινικό οξύ

β-μερκαπτοβαλίνη
(πεντικιλλαμίνη)

λανθιονίνη



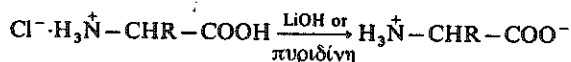
διυδροαλανίνη



διυδροβουτυρίνη

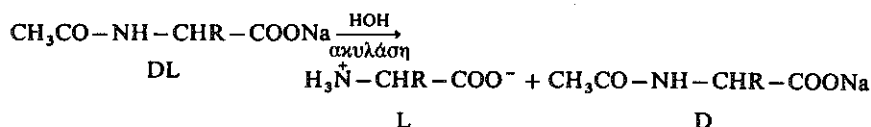
(δεν είναι σταθερά σαν ελεύθερα αμινοξέα)

Το υδροχλωρικό άλας που προκύπτει έτσι μετατρέπεται στη διπολική ιονική μορφή με εξουδετέρωση με υδροξείδιο του λιθίου ή με πυριδίνη και αραίωση με αιθανόλη. Το παραπροϊόν, LiCl ή χλωρίδιο της πυριδίνης παραμένει στο διάλυμα, ενώ το ελεύθερο αμινοξύ, ως διπολικό ιόν, ξεχωρίζει συνήθως σε κρυσταλλική μορφή:



Εναλλακτικά το υδροχλωρικό άλας του αμινοξέος περνά από μια κολώνα ισχυρής κατιοντο-ανταλλακτικής ρητίνης και εκλύεται με αραιή αμμωνία.

Δε χρειάζεται να ληφθεί ότι το προϊόν της σύνθεσης είναι ένα ρακεμικό μίγμα, από το οποίο πρέπει να διαχωρισθούν τα L και D εναντιομερή. Από τις πολυάριθμες μεθόδους διαχωρισμού πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή σε μια πολύ γενική προσέγγιση που είναι η ενζυμική υδρόλυση των ακετυλαμινοξέων. Η ακυλάση αυξάνει πολύ την ταχύτητα απομάκρυνσης με υδρόλυση της ακετυλομάδας των L-αμινοξέων και αφήνει ανεπηρέαστα τα ακετυλο-D-αμινοξέα. Έτσι μετά τη συμπλήρωση της υδρόλυσης συμπύκνωση του ουδέτερου διαλύματος και αραίωση με απόλυτη αιθανόλη δίνει το L-αμινοξύ, ένα διπολικό ιόν αδιάλυτο στην αλκοόλη, ενώ το άλας του αναλλοίωτου ακετυλο παραγώγου του D-εναντιομερούς παραμένει στο διάλυμα.



Υπάρχουν αξιοσημείωτες διαφορές στην ταχύτητα υδρόλυσης των διαφόρων αμινοξέων. Εάν η ταχύτητα είναι πολύ χαμηλή για πρακτικούς σκοπούς, τότε μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν υποστρώματα τα χλωροακετυλο παράγωγα του ρακεμικού μίγματος αντί των ακετυλο παραγώγων. Φυσικά, αξίζει συχνά να επανακτήσουμε το αναλλοίωτο D-ακυλαμινο οξύ και να το υδrolύσουμε με υδατικά οξέα ώστε να παράγουμε το D-εναντιομερές του αμινοξέος. Τα μη φυσικά D-ισομερή χρησιμοποιούνται συχνά σε δομικά συστατικά σε μελέτες σχέσης δομής-δραστικότητας για την παρασκευή αναλόγων ορμονών που αντιστέκονται στη δράση των πρωτεολυτικών ενζύμων και για την παρασκευή μικροβιακών πεπτιδίων.

Τα αμινοξέα απομονώθηκαν από φυσικές πηγές, η ασπαραγίνη από φυτά, η κυστίνη από πέτρες του ουροποιητικού συστήματος κατά την πρώτη δεκαετία του περασμένου αιώνα και έγιναν γνωστά αργότερα σαν συστατικά των πρωτεϊνών. Ο πεπτιδικός δεσμός όμως, σαν το χαρακτηριστικό γνώρισμα της δομής των πρωτεϊνών αναγνωρίστηκε μόνο σ'αυτόν τον αιώνα (Hofmeister 1902; E. Fischer 1906). Πέρασαν αρκετές δεκαετίες μέχρι να φθάσει η διευκρίνιση της σειράς των αμινοξέων σε πρακτικό σημείο. Το σημείο καμπής σημειώθηκε με τον προσδιορισμό της δομής της ινσουλίνης (Sanger et al. 1953). Η επακόλουθη ανάπτυξη της αυτόματης ανάλυσης αμινοξέων (Spackmann, Stein και Moore 1958) και της αυτόματης εύρεσης της σειράς των αμινο-ξέων (Edman και Begg 1967) μετέτρεψαν τον προσδιορισμό της πρωτοταγούς δομής των πεπτιδίων και πρωτεϊνών σε μια απλή ρουτίνα και μόνο η εύρεση της τριτοδιάστατης σύνταξης

Πίνακας 3. Παραδείγματα βιολογικώς ενεργών πεπτιδίων

ταφταίνη ριξίνη	Thr-Lys-Pro-Arg Gly-Gln-Pro-Arg	(ανοσοενεργά πεπτίδια)
βραδυκινίνη καλλιιδίνη	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg	
ουσία P	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂	
αγγειοτενσίνη (ανθρώπινη) και οι πρόδρομες ουσίες της		
	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Val-Ile-His-Asn	
	υπόστρωμα ρενίνης	
	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu + Val-Ile-His-Asn	
	αγγειοτενσίνη I	(μετατρέπον ένζυμο)
	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe + His-Leu	
	αγγειοτενσίνη II	
οπιοειδή πεπτίδια		
Leu-εγκεφαλίνη	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	
Met-εγκεφαλίνη	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met	
β-ενδορφίνη (ανθρώπινη):	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser- Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn- Ala-Ile-Ile-Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys-Lys-Gly-Glu	
ορμόνη ενεργοποίησης μελανοκυττάρων (α-MSH)		
	Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His- Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH ₂	
οξυτοκίνη	Cys-Tyr-Ile	αργινινο-βασοπρεσσίνη
	Cys-Asn-Gln	
	Pro-Leu-Gly-NH ₂	
	Cys-Tyr-Phe	
	Cys-Asn-Gln	
	Pro-Arg-Gly-NH ₂	
καλιτονίνη (ανθρώπινη)		
	Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly- Thr-Thr-Thr-Gln-Asp-Phe-Asn-Lys-Phe-His- Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala- Pro-NH ₂	
κορτικοτροπίνη		
	Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro- Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro- Asn-Gly-Ala-Glu-Asp-Glu-Ser-Ala-Glu-Ala-Phe- Pro-Leu-Glu-Phe	
γαστρίνη (ανθρώπινη)		
	Pyr-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu- Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂	
	(Pyr = πυρογλουταμυλο)	

Πίνακας 3 (συνέχεια)

γλυκαγόνο και σεκρετίνη
(από χοίρο)

His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-
His-Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Glu-Leu-Ser-Arg-Leu-Arg-
Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr
Asp-Ser-Ala-Arg-Leu-Gln-Arg-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂

ινσουλίνη (ανθρώπινη)

GIVEQCCTSI¹CSLYQLENYCN
FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT

ινσουλίνη (από χοίρο)

GIVEQCCTSI¹CSLYQLENYCN
FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKA

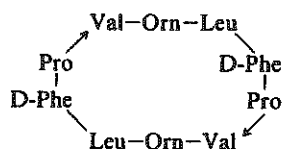
ινσουλίνη (από βόδι)

GIVEQC¹CA²SVCSLYQLENYCN
FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKA

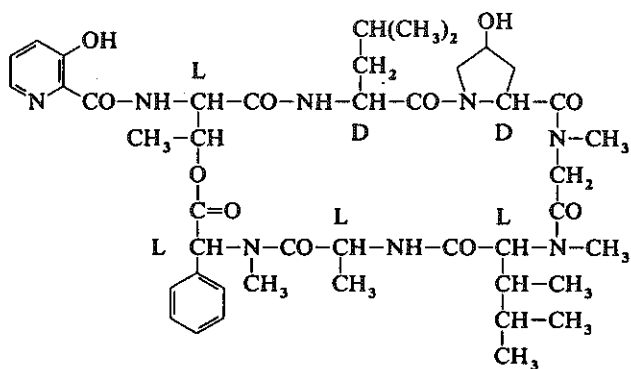
(δομή, γεωμετρία, αρχιτεκτονική) θεωρείται σήμερα σαν ένα αληθινό αντικείμενο έρευνας. Καταρχήν πιο γρήγορα προόδευσε η μεθοδολογία της πεπτιδικής σύνθεσης απ'ότι ο προσδιορισμός της δομής. Οι πρώτοι τρόποι σχηματισμού πεπτιδικού δεσμού που βρέθηκαν από τους Curtius (1881) και Fischer (1902) στα τέλη του περασμένου αιώνα έδωσαν εντυπωσιακά, αλλά όχι ακόμη πρακτικά αποτελέσματα. Η εισαγωγή της αμινοπροστατευτικής βενζυλοξυκαρβονυλοομάδας (Bergmann και Zervas 1932) οδήγησε σε μια νέα εποχή της πεπτιδικής σύνθεσης. Βελτιώσεις στις μεθόδους σχηματισμού του πεπτιδικού δεσμού, ιδιαίτερα η ανακάλυψη των μικτών ανυδριτών με ένα καρβονικό οξύ (Wieland και Bernhard 1951, Boissonnas 1951) έδωσαν νέα ώθηση στην πεπτιδική σύνθεση και το 1953 η μεθοδολογία έφθασε σε βαθμό τελειότητας, η οποία επέτρεψε τη σύνθεση μιας πεπτιδικής ορμόνης, της οξυτοκίνης, από τον V. du Vigneaud και τους βοηθούς του. Από εκεί και πέρα η πεπτιδική σύνθεση προχώρησε με άλματα και εμπόδια. Η εισαγωγή του δικυκλοεξυλκαρβοδιΐμιδίου, ενός αναντικατάστατου ακόμη και σήμερα αντιδραστήριου σύζευξης (Sheehan και Hess 1955) είχε μεγάλη επίδραση στη μεθοδολογία σχηματισμού του πεπτιδικού δεσμού, ενώ περαιτέρω βελτίωση προέκυψε με την ανάπτυξη των ενεργών εστέρων (Schwyzer 1953, Bodanszky 1955). Εξίσου σημαντικές βελτιώσεις σημειώθηκαν στις μεθόδους προστασίας. Προστατευτικές ομάδες ευαίσθητες σε οξέα βασίζονται στη σταθερότητα και επομένως στον εύκολο σχηματισμό του tert.βουτυλοκατιόντος (Carpino 1957) και ειδικά η tert.βουτυλοξυκαρβονυλο ομάδα παραμένει το εργαλείο με τη μεγαλύτερη σπουδαιότητα ακόμη και μετά την εισαγωγή της ευαίσθητης σε βάσεις προστατευτικής ομάδας του τύπου 9-φλουορενυλομεθυλοξυκαρβονυλο ομάδας (Fmoc) (Carpino και Han 1972). Εντούτοις το μεγαλύτερο ορόσημο στην ιστορία της πεπτιδικής σύνθεσης είναι η ανακάλυψη της πεπτιδικής σύνθεσης σε

Πίνακας 4. Μικροβιακά πεπτίδια

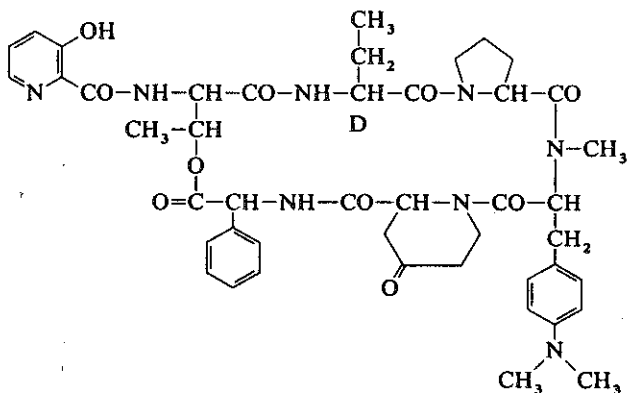
γραμισιδίνη S:



εταμισίνη:

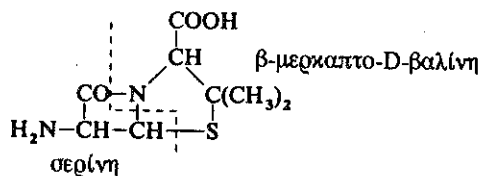


μικαμισίνη B:

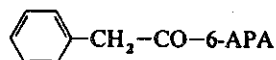


6-αμινοπενικιλανικό οξύ:

(6-APA)

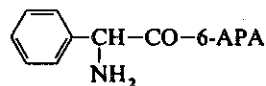


πενικιλίνη G:



αμπικιλίνη:

(ημιπαράσκευαστική πενικιλίνη)



στερεή φάση από τον R.B. Merrifield (1963). Λόγω της αυτοματοποίησης έγινε δυνατό με αυτή την τεχνική ένας μεγάλος αριθμός πρόσφατα ανακαλυφθέντων βιολογικά ενεργών πεπτιδίων να διατίθενται σύντομα μετά την απομόνωσή τους και τον προσδιορισμό της σειράς των αμινοξέων. Με σκοπό να απεικονίσουμε τη γρήγορη ανάπτυξη αυτού του πεδίου μια συλλογή τέτοιων ενώσεων φαίνεται στον πίνακα 3. Στον πίνακα 4 φαίνονται μερικά μικροβιακά πεπτίδια. Μια απλή μελέτη της δομής τους αποκαλύπτει ότι η σύνθεση των πεπτιδίων παραμένει μια πρόκληση για τον οργανικό χημικό. Εντούτοις, ακόμη και η παρασκευή πεπτιδίων που περιέχουν μόνο τα κοινά αμινοξέα είναι πολύπλοκη με ανεπιθύμητες παράπλευρες αντιδράσεις. Είναι τόσο πολυάριθμες ώστε έχουν γραφτεί πολλά σχετικά μ'αυτές (π.χ. Bodanszky και Martinez 1983). Γι'αυτό δεν είναι σοφό να ξεκινήσουμε το σπουδαίο έργο της πεπτιδικής σύνθεσης χωρίς μια ουσιαστική γνώση της χημείας που εμπλέκεται σ'αυτό. Τα επόμενα κεφάλαια θα δώσουν το υπόβαθρο στους φοιτητές που ζητούν ένα βαθμό επάρκειας στην πεπτιδική χημεία.

Αναφορές

- Bodanszky, M.: *Nature* 175, 685 (1955)
 Bodanszky, M., Martinez, J.: In the Peptides, vol. 5 (Gross, E., Meienhofer, J. eds.) pp. 111-216, New York, Academic Press 1983
 Boissonnas, R.A.: *Helv. Chim. Acta* 34, 874 (1951)
 Carpino, L.A.: *J. Amer. Chem. Soc.* 79, 4427 (1957)
 Carpino, L.A.: Han, G.Y.: *J. Org. Chem.* 37, 3404 (1972)
 Curtius, T.: *J. Prakt. Chem.* 24, 239 (1881)
 du Vigneaud, V., Ressler, C., Swan, J. M., Roberts, C.W., Katsoyannis P.G., Gordon, S.: *J. Amer. Chem. Soc.* 75, 4879 (1953).
 Edman, P., Begg, G.: *Eur. J. Biochem.* 1, 80 (1967)
 Fischer, E.: *Ber. dtsh. Chem. Ges.* 35, 1095 (1902)
 Fischer, E.: *Ber. dtsh. Chem. Ges.* 39, 530 (1906)
 Hofmeister, F.: *Ergeb. Physiol. Chem. Pharmacol.* 1, 759 (1902)
 Merrifield, R.B.: *J. Amer. Chem. Soc.* 85, 2149 (1963)
 Sanger, F.: *Nature* 171, 1025 (1953)
 Schwyzler, R.: *Helv. Chim. Acta* 36, 414 (1953)
 Sheehan, J.C., Hess, G.P.: *J. Amer. Chem. Soc.* 77, 1067 (1955)
 Spackman, D.H., Stein, W.H., Moore, S.: *Anal. Chem.* 30, 1190 (1958)
 Wieland, T., Bernhard, H.: *Liebigs Ann. Chem.* 572, 190 (1951)

Περαιτέρω βιβλιογραφία

- Barrett, G.C.: *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids*. Chapman & Hall, London, 1983
 Greenstein, J.P., Winitz, M.: *Chemistry of the Amino Acids*. Wiley & Sons, New York, 1961
 Roberts, D.C., Vellacio, F.: *Unusual Amino Acids in Peptide Synthesis*, in *The Peptides*, vol. 5, Gross, E., Meienhofer, J. eds. pp. 341-449. Academic Press, New York, 1983

Μέρος Πρώτο : Προσδιορισμός της Δομής

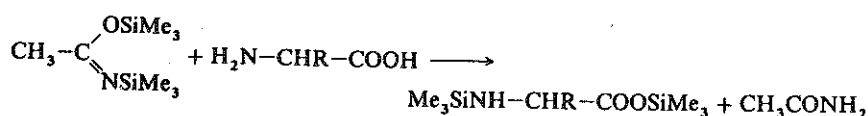
II. Ανάλυση Αμινοξέων

Η πιο αποκαλυπτική πληροφορία που μπορεί εύκολα να αποκτηθεί για ένα πεπτίδιο είναι η σύσταση των αμινοξέων του. Εντούτοις, τα αποτελέσματα της ανάλυσης αμινοξέων έχουν πραγματική σημασία εάν το δείγμα αποτελείται από ένα μόνο πεπτίδιο. Η ανάλυση μιγμάτων είναι συνήθως μια προσπάθεια χωρίς ανταμοιβή. Επομένως ο καθαρισμός προηγείται της ανάλυσης και αυτή η γενίκευση ισχύει επίσης για τις περισσότερες άλλες μεθόδους του προσδιορισμού της δομής. Η ομοιογένεια σαν ένα προαπαιτούμενο της ανάλυσης δεν πρέπει να υπερτονισθεί. Ο καθαρισμός γίνεται μερικές φορές με κρυστάλλωση, αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις χρειάζεται χρωματογραφία, ηλεκτροφόρηση ή κατανομή κατ'αντιροή ή συνδυασμός αυτών των τεχνικών.

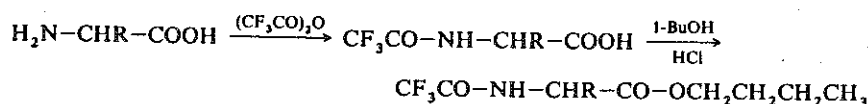
Τα αμινοξέα ενός πεπτιδίου μπορούν να ταυτοποιηθούν και να προσδιορισθούν ποσοτικά με μεθόδους που δεν τα καταστρέφουν, για παράδειγμα με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, αλλά συνήθως τα πεπτίδια υδρολύονται και τα αμινοξέα που περιέχουν προσδιορίζονται με ανάλυση του υδρολύματος. Η υδρόλυτική διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού δεν καταναλώνει ενέργεια, εντούτοις δε γίνεται αυθόρμητα. Ένα ενεργειακό φράγμα πρέπει να υπερπηδηθεί με κατάλυση. Τα πρωτεολυτικά ένζυμα είναι ικανά να επιτελέσουν πλήρη υδρόλυση των πεπτιδίων σε θερμοκρασία δωματίου, ουδέτερο διάλυμα και συνήθως σε μερικές ώρες. Παρ'όλα αυτά μόνον σε ειδικές περιπτώσεις χρησιμοποιούνται τα ένζυμα για το σκοπό της ανάλυσης αμινοξέων. Μια τέτοια περίπτωση είναι η ανίχνευση της ρακεμίσωσης κατά την πεπτιδική σύνθεση (βλ. κεφάλαιο VIII). Γενικά στην πράξη ένα μικρό δείγμα του πεπτιδίου υδρόλύεται με υδροχλωρικό οξύ σταθερού σημείου ξέσεως (αξιοτροπικό μίγμα, περίπου 5,7 N) στους 110°C για 16-24 ώρες. Ο χρόνος της υδρόλυσης ποικίλει από εργαστήριο σε εργαστήριο και εξαρτάται επίσης από το πεπτίδιο που εξετάζουμε. Οι πεπτιδικοί δεσμοί μεταξύ αμινοξέων με ογκώδεις αλυσίδες όπως η βαλίνη ή η ισολευκίνη αντιστέκονται ασυνήθιστα στην υδρόλυση και απαιτούν 48 ή και περισσότερες ώρες για πλήρη διάσπαση. Δυστυχώς η σερίνη και η θρεονίνη καταστρέφονται βαθμιαία στην πορεία της υδρόλυσης. Τα προβλήματα που προκύπτουν μπορεί να λυθούν με παράλληλες αναλύσεις με μικρότερες και μεγαλύτερες περιόδους υδρόλυσης. Οι ακριβείς τιμές για τη σερίνη και τη θρεονίνη αποδείχθηκαν με γραφική προέκταση σε χρόνο μηδέν, ενώ οι διορθωμένες τιμές για τα αμινοξέα με ογκώδεις παράπλευρες αλυσίδες λαμβάνονται με προέκταση για ένα πολύ μεγάλο χρόνο υδρόλυσης. Είναι κάπως πιο δύσκολο να ασχοληθούμε με την αποσύνθεση της τρυπτοφάνης. Είναι πιθανό να την αποφύγουμε χρησιμοποιώντας υψηλής καθαρότητας υδροχλωρικό οξύ, το οποίο δεν περιέχει μεταλλικά στοιχεία ή αντικαθιστώντας το HCl με μεθανοσουλφονικό οξύ και ιδιαίτερα χρησιμοποιώντας ένα διάλυμα 2-μερχαπτοιαιθανοσουλφονικού οξέος για την υδρόλυση.

Γενικά βοηθάει και ο αποκλεισμός του αέρα. Λαμβάνονται καλλίτερα αποτελέσματα όταν η υδρόλυση γίνεται υπό κενό σε σφραγισμένες αμπούλες. Το πρόβλημα της τρυπτοφάνης μπορεί επίσης να λυθεί με την καταγραφή του υπεριώδους φάσματος απορρόφησης του άθικτου πεπτιδίου. Ο μεγάλος μοριακός συντελεστής απορρόφησης του ινδολικού συστήματος επιτρέπει τον ακριβή προσδιορισμό της τρυπτοφάνης που περιέχεται και αυτό παραμένει δυνατόν ακόμη και σε πεπτίδια που περιέχουν τυροσίνη γιατί με προσθήκη αλκάλειας το μέγιστο απορρόφησης του φαινολικού δακτυλίου μετατοπίζεται προς το ορατό, ενώ το μέγιστο της τρυπτοφάνης παραμένει πρακτικά αναλλοίωτο.

Ο πρακτικός προσδιορισμός των αμινοξέων του υδρολύματος βασίζονταν καταρχήν στην εστεροποίηση και το διαχωρισμό των εστέρων με κλασματική απόσταξη. Η μέθοδος αυτή που καταναλώνει χρόνο και υλικά έγινε πιο πρακτική με την ανάπτυξη της αέριας χρωματογραφίας. Η απαραίτητη πτητικότητα επιτυγχάνεται με τριμεθυλοπυριτίωση

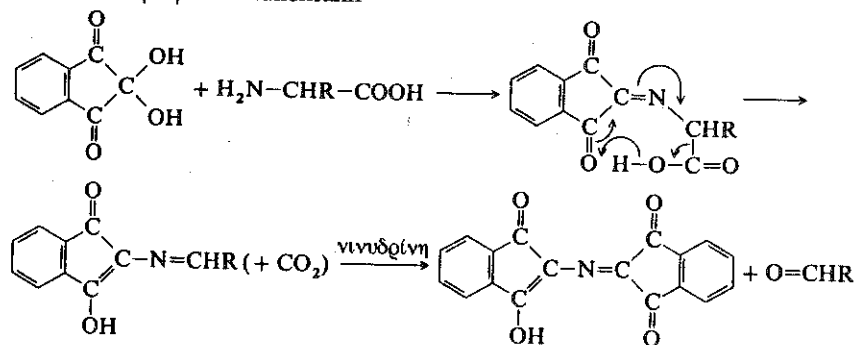


ή τριφθοροακετυλίωση που ακολουθείται από εστεροποίηση, π.χ. με 1-βουτανόλη



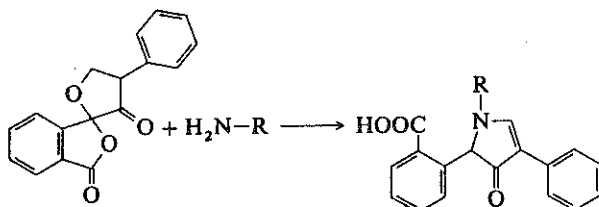
Η γενική πρακτική εντούτοις βασίζεται σήμερα σε διαχωρισμό των αμινοξέων μεταξύ τους με ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία ή με χρωματογραφία κατανομής. Η τελευταία εκτελείται σε ειδικές κολόνες σε υψηλή πίεση (υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης, HPLC). Αυτόματα όργανα επιτρέπουν την εκτέλεση μιας πλήρους ανάλυσης σε λίγο χρόνο, συχνά λιγότερο από μια ώρα.

Παραμένει να συζητηθεί εδώ μια κύρια ερώτηση, ο έλεγχος του υγρού έκλουσης από τη στήλη. Μικρά ποσά των διαφόρων αμινοξέων που εμφανίζονται στη σειρά κατά την έκλουση τους πρέπει να ανιχνευθούν και να προσδιορισθούν ποσοτικά. Με παλιότερες μεθόδους τα ποσά αυτά ήταν της τάξεως 10 με 100 nmoles, αλλά με βελτιώσεις στη μεθοδολογία μπορούν τώρα να χρησιμοποιηθούν πολύ μικρότερα δείγματα. Το κλασικό αντιδραστήριο χρώματος για την ανίχνευση ποσοτήτων nmoles είναι η νινυδρίνη, η οποία αντιδρά με τα αμινοξέα με μια αντίδραση τρανσαμίνωσης-αποκαρβοξυλίωσης και δίνει το μωβ του Ruhemann

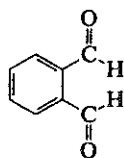


Για τον προσδιορισμό του αμινοξέος που εκλύεται από την κολόνα χρησιμοποιείται η απορρόφηση στα 560 nm. Η προλίνη, μια δευτεροταγής αμίνη, δίνει μια κίτρινη ένωση και αυτό επιβάλλει ένα δεύτερο μήκος κύματος ελέγχου (440 nm). Συνεχής καταγραφή της απορρόφησης έχει σαν αποτέλεσμα ένα διάγραμμα έκλυσης, το οποίο μετά συγκρίνεται με μια πρότυπη καμπύλη για εκτίμηση. Σύγχρονα όργανα εκτυπώνουν τα αποτελέσματα της ανάλυσης.

Έγινε δυνατή περαιτέρω ελάττωση των ποσοτήτων που απαιτούνται για ανάλυση αμινοξέων με αλλαγή του προσδιορισμού της απορρόφησης με μετρήσεις της έντασης του εκπνευόμενου φωτός με φθορισμό. Μια εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδος βασίζεται στην φλουροεσκαμίνη και την αντίδρασή της με πρωτοταγείς αμίνες:



Ο φθορισμός που δημιουργείται έτσι επιτρέπει τον προσδιορισμό ποσοτήτων pmole των αμινοξέων. Ένα λιγότερο ευαίσθητο αλλά επίσης πιο φθηνό αντιδραστήριο φθορισμού είναι η ο-φθαλαλδεΐδη



το οποίο, παρουσία μερκαπτοαιθανόλης, ανιχνεύει μικρά ποσά πρωτοταγών αμινών, αλλά δεν αντιδρά με προλίνη.

Σε συνδυασμό με την εφαρμογή μεθόδων ανίχνευσης υψηλής ευαισθησίας και πολύ μικρών ποσοτήτων πεπτιδίων που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση αμινοξέων πρέπει να αναφερθεί μια γενική δυσκολία. Το περιβάλλον μας είναι γεμάτο από ίχνη ποσοτήτων αμινοξέων. Εκτός άλλου, τα δακτυλικά αποτυπώματά μας μολύνουν τα γυαλικά και τα άλλα τμήματα της συσκευής στο εργαστήριο. Η γλυκίνη, η σερίνη και το ασπαραγινικό οξύ είναι ιδιαίτερος πανταχού παρόντα και μπορούν να μπερδέψουν τα αποτελέσματα της ανάλυσης αμινοξέων. Επιπλέον, όταν χρησιμοποιούνται μικρά δείγματα και ευαίσθητες μέθοδοι, πρέπει να λαμβάνεται εξαιρετική φροντίδα στο πλύσιμο των γυαλικών και στην καθαρότητα των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο.

Περαιτέρω βιβλιογραφία

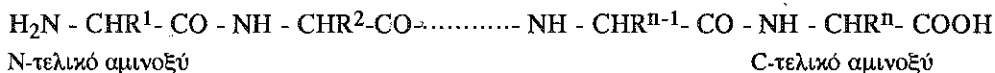
- Benson, J.R., Louie, P.C., Bradshaw, R.A.: Amino Acid Analysis of Peptides, in *The Peptides*, Vol.4 (Gross, E., Meienhofer, J. eds.) pp. 217-260, New York: Academic Press 1981.
- Brenner, M., Niederwieser, A.: Thin Layer Chromatography of Amino Acids in *Methods of Enzymology*, Vol. 11 (Hirs, C.H. ed.) pp. 39-59, New York: Academic Press 1967

III. Προσδιορισμός της Αλληλουχίας των Αμινοξέων

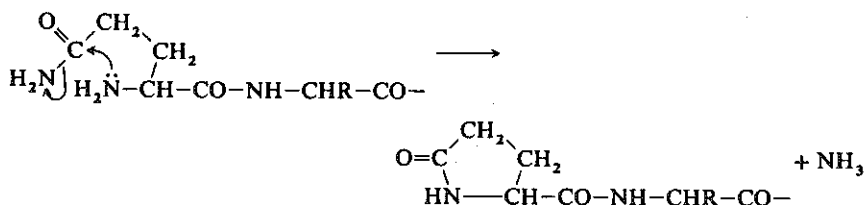
Η σειρά ή η αλληλουχία των διαφόρων αμινοξέων κατά μήκος της πεπτιδικής αλυσίδας καθορίζει την ομοιοπολική δομή του μορίου. Καλείται επίσης *πρωτοταγής δομή* ώστε να διακρίνεται από την τριδιάστατη γεωμετρία των πεπτιδίων και πρωτεϊνών. Η τελευταία δημιουργείται από μη ομοιοπολικές δυνάμεις όπως δεσμούς υδρογόνου μεταξύ αμιδικών ομάδων (*δευτεροταγής δομή*) και συνδυασμό πολικών και μη πολικών αλληλεπιδράσεων και δισουλφιδικών γεφυρών που έχουν σαν αποτέλεσμα το δίπλωμα της αλυσίδας (*τριτοταγής δομή*)

A. Προσδιορισμός της Ακραίας Ομάδας

Στο ένα άκρο της πεπτιδικής αλυσίδας υπάρχει ένα αμινοξύ με ελεύθερη, δηλαδή μη ακυλιωμένη αμινομάδα. Αυτό το αμινοξύ ονομάζεται αμινοτελικό ή πιο συχνά N-τελικό αμινοξύ. Στο αντίθετο άκρο της αλυσίδας ένα αμινοξύ με ελεύθερη καρβοξυλομάδα είναι το καρβοξυλοτελικό ή το C-τελικό αμινοξύ:



Η ονοματολογία αυτή χρησιμοποιείται με ευρεία έννοια, κυρίως για να δείξει την κατεύθυνση της πεπτιδικής αλυσίδας. Έτσι σε πεπτίδια στα οποία το N-τελικό αμινοξύ γλουταμίνη κυκλοποιείται



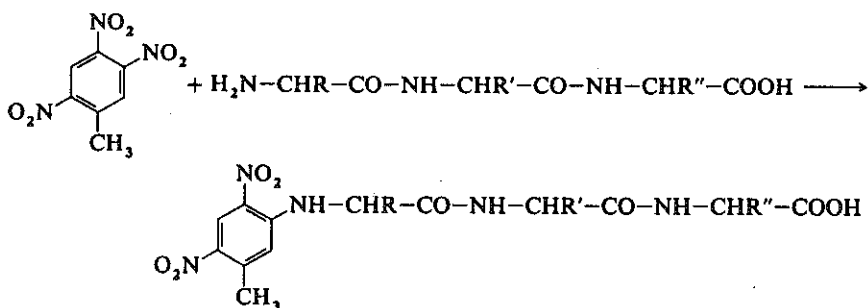
το πυρογλουταμυλο-αμινοξύ θεωρείται σαν N-τελικό παρ'όλη την απουσία ελεύθερης αμινομάδας. Με έναν ανάλογο τρόπο το N-τελικό αμινοξύ διατηρεί αυτόν τον ορισμό όταν η αμινομάδα του είναι ακυλιωμένη με μια ομάδα που δεν είναι αμινοξύ, όπως η ακετυλομάδα. Ομοίως, στα πεπτιδικά αμίδια το C-τελικό αμινοξύ δεν έχει ελεύθερη καρβοξυλομάδα και όμως καλείται C-τελικό. Η ανάλυση της ακραίας ομάδας που

συζητείται στα επόμενα κεφάλαια είναι δυνατή εντούτοις μόνον όταν τα τελικά αμινοξέα έχουν πράγματι μια ελεύθερη αμινομάδα ή μια ελεύθερη καρβοξυλομάδα.

Η σπουδαιότητα της ανάλυσης των ακραίων ομάδων ελαττώθηκε με την ανάπτυξη των μεθόδων διαδοχικής αποικοδόμησης, οι οποίες αναφέρονται με αρκετές λεπτομέρειες παρακάτω σ' αυτό το κεφάλαιο. Παλιότερα ο προσδιορισμός των ακραίων ομάδων αποτελούσε ένα ολόκληρο μέρος της ανάλυσης της σειράς των αμινοξέων. Μεγάλα πεπτίδια διασπώνταν σε μικρότερα τμήματα με μερική όξινη υδρόλυση, τα τμήματα διαχωρίζονταν με χρωματογραφία και εξετάζονταν. Η δομή ενός διπεπτιδίου βρισκόνταν κατευθείαν από τη σύσταση των αμινοξέων του και από τον προσδιορισμό μιας από τις ακραίες ομάδες. Για τα τριπεπτίδια και οι δύο ακραίες ομάδες έπρεπε να βρεθούν. Οι πληροφορίες που συλλέγονταν από την ανάλυση των πεπτιδικών τμημάτων συγκεντρώνονταν με τον τρόπο επίλυσης παιδικού παγνιδιού (puzzle), ώστε να αποδείξουν τη σειρά των αμινοξέων του αρχικού υλικού, του μεγάλου πεπτιδίου. Αυτή η προσέγγιση χρησίμευσε εντυπωσιακά στη διευκρίνιση της δομής της ινσουλίνης, της οξυτοκίνης και της βασοπρεσίνης, αλλά τώρα έχει εγκαταληφθεί. Παρ'όλα αυτά παρουσιάζουμε εδώ μια σύντομη συζήτηση αυτού του θέματος και όχι απλώς για ιστορικούς λόγους, αλλά γιατί αυτές οι απλές μέθοδοι εφαρμόζονται σε ειδικές περιπτώσεις, για παράδειγμα στον προσδιορισμό της δομής μικρών πεπτιδίων που περιέχουν μη συνήθη αμινοξέα.

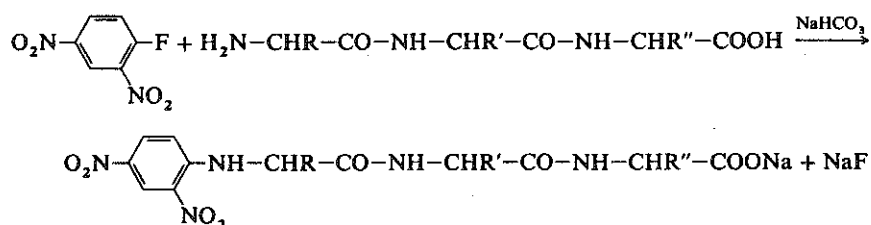
1. Προσδιορισμός του N-τελικού Αμινοξέος

Η υποκατάσταση της ελεύθερης αμινομάδας από μια ομάδα που ανιχνεύεται εύκολα παρέχει μια "επισήμανση" για το N-τελικό αμινοξύ. Ο δεσμός μεταξύ του υποκαταστάτη και του αζώτου της αμινομάδας πρέπει να παραμείνει άθικτος κατά την υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών ώστε να επιτραπεί η απομόνωση και η ταυτοποίηση του επισημασμένου αμινοξέος, του N-τελικού αμινοξέος. Η πυρηνόφιλη υποκατάσταση στον αρωματικό πυρήνα είναι ένας προφανής δρόμος προς αυτόν το σκοπό, αλλά απαιτείται ενεργοποίηση με ομάδες δέκτες ηλεκτρονίων. Για παράδειγμα μια από τις νιτρο-ομάδες του τρινιτροτολουόλιου υποκαθίσταται εύκολα από την αμινομάδα των πεπτιδίων

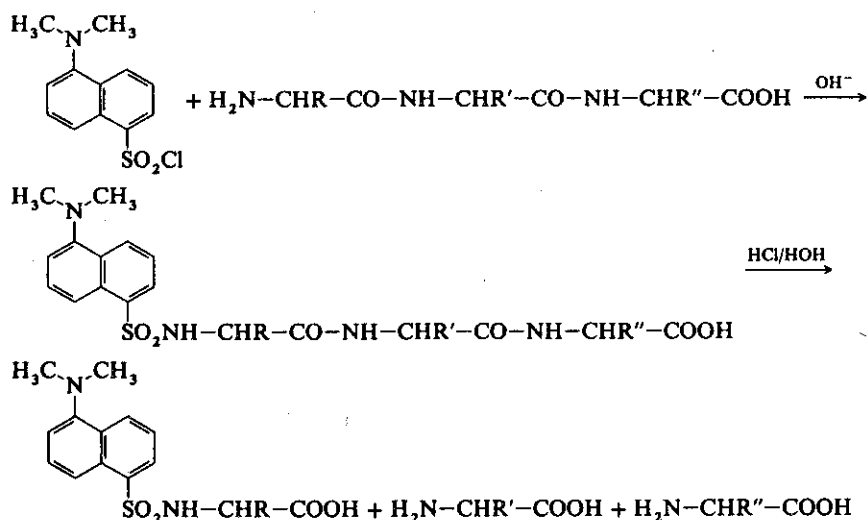


αλλά ακόμα πιο κατάλληλο είναι το αντιδραστήριο Sanger: 2-4-δινιτροφθοροβενζόλιο (1945). Παρουσία υδατικού διαλύματος όξινου ανθρακικού νατρίου αντιδρά σε θερμο-

κрасία δωματίου και μετατρέπει το πεπτίδιο στο 2-4-δινιτροφαινυλο (DNP) παράγωγο:



Η υδρόλυση του DNP-πεπτιδίου με υδροχλωρικό οξύ σταθερού σημείου ζέσεως δίνει τα αμινοξέα που περιέχονται εκτός από το N-τελικό, το οποίο βρίσκεται σαν DNP-αμινοξύ. Μετά την οξίνιση μπορεί αυτό να εκχυλισθεί με έναν οργανικό διαλύτη και να ταυτοποιηθεί χρωματογραφικά με σύγκριση με πρότυπα δείγματα DNP-αμινοξέων. Το κίτρινο χρώμα των DNP-αμινοξέων διευκολύνει την ανίχνευσή τους, αλλά η ευαισθησία αυξάνεται εάν τα χρωματογραφήματα εκτεθούν σε υπεριώδες φως. Μια πιο σημαντική αύξηση της ευαισθησίας είναι απαραίτητη όταν το ποσόν του αμινοξέος που εκτίθεται για την ανάλυση της αλληλουχίας είναι πολύ περιορισμένο. Η εκπομπή φωτός από φθορίζουσες ομάδες παρέχει σημαντικές δυνατότητες. Έτσι, η ακυλίωση της ελεύθερης αμινομάδας του N-τελικού αμινοξέος με 5-διμεθυλαμινο-ναφθαλινο-1-σουλφονυλοχλωρίδιο ("dansyl χλωρίδιου") παρέχει κατάλληλη επισήμανση (Gray και Hartley 1963), επειδή ο σουλφοναμιδικός δεσμός αντιστέκεται πολύ περισσότερο στην όξινη υδρόλυση απ' ό,τι ο πεπτιδικός δεσμός.



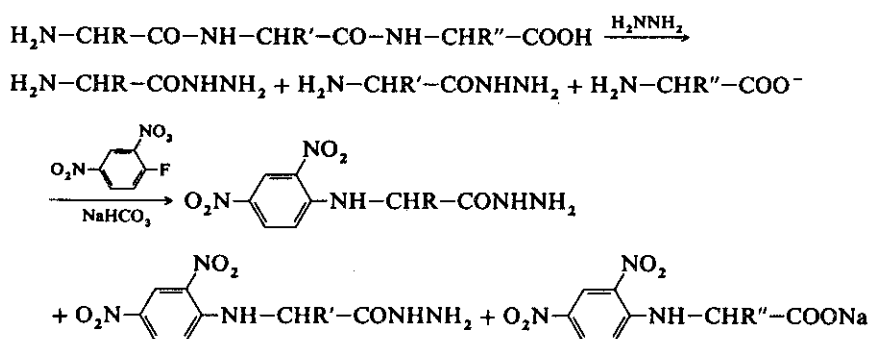
Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας του dansyl-αμινοξέος που αποκτάται από το υδρόλυμα μαζί με μια σειρά δειγμάτων προτύπων dansyl-αμινοξέων και ανίχνευση των

κηλίδων που φθορίζουν με υπεριώδες φως είναι μια πολύ επαρκής μέθοδος για την ταυτοποίηση του N-τελικού αμινοξέος των πεπτιδίων.

Τέλος, θα έπρεπε να αναφερθεί η σπουδαία αρχή της *αφαιρετικής ανάλυσης*. Είναι πιθανή η εκλεκτική αποσύνθεση του N-τελικού αμινοξέος, για παράδειγμα με απαμίνωση με νιτρώδες οξύ ή μέσω οξειδωτικής απαμίνωσης με νινυδρίνη. Ποσοτική ανάλυση αμινοξέων πριν και μετά την αντίδραση θα δείξει την απουσία ενός αμινοξέος στο υδρόλυμα του κατεργασμένου δείγματος. Προφανώς αυτό είναι το αμινοξύ που έχει ελεύθερη αμινομάδα, άρα αυτό πρέπει να κατέχει την N-τελική θέση της αλληλουχίας.

2. Προσδιορισμός του C-τελικού Αμινοξέος

Πολλές μέθοδοι προτάθηκαν γι' αυτόν το σκοπό, αλλά μόνον λίγες άντεξαν στο χρόνο. Μια αξιόπιστη μέθοδος είναι η υδραζινόλυση (Akabori et al. 1952) που περιλαμβάνει θέρμανση διαλύματος του πεπτιδίου σε 97% υδραζίνη σ' έναν σφραγισμένο σωλήνα στους 100°C για 12 ώρες. Οι πεπτιδικοί δεσμοί διασπώνται με την υδραζίνη και τα αμινοξέα που περιέχονται μετατρέπονται έτσι στα υδραζιδια τους εκτός από το C-τελικό αμινοξύ το οποίο απλώς ελευθερώνεται κατά την πορεία. Ο διαχωρισμός τους διευκολύνεται με δινιτροφαινυλίωση του μίγματος με 2-4-δινιτροφθοροβενζόλιο. Τα υδραζιδια των DNP-αμινοξέων σαν ουδέτερες ουσίες εκχυλίζονται από το υδατικό διάλυμα, που περιέχει όξινο ανθρακικό νάτριο με έναν οργανικό διαλύτη, ενώ το άλας του νατρίου του DNP-παραγώγου του C-τελικού αμινοξέος παραμένει διαλυμένο:

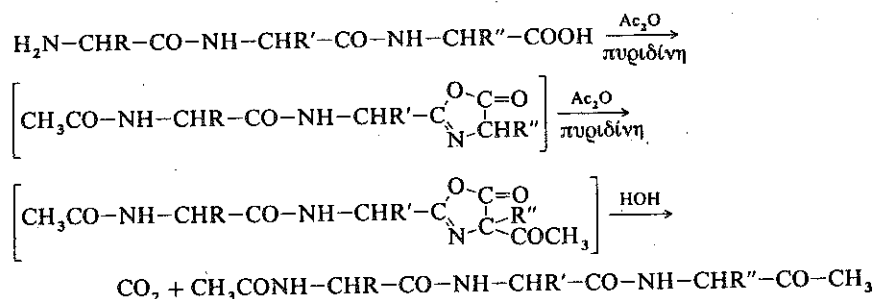


Φυσικά, τα DNP-παραγώγα των μονοϋδραζιδίων των δικαρβοξυλικών οξέων παραμένουν επίσης στην υδατική φάση.

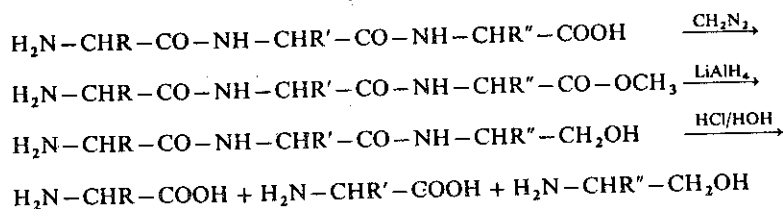
Αφαιρετικές μέθοδοι έχουν εφαρμοσθεί για τον προσδιορισμό του C-τελικού αμινοξέος με διάφορους τρόπους. Για παράδειγμα, κατεργασία του πεπτιδίου μ' ένα μίγμα οξικού ανυδρίτη και πυριδίνης σε υψηλή θερμοκρασία (Dakin και West 1928)

20 Προσδιορισμός της Αλληλουχίας των Αμινοξέων

μετατρέπει το C-τελικό αμινοξύ σε μια μεθυλοκετόνη, πιθανώς μέσω ενός μικτού ανυδρίτη και μιας αζλακτόνης



Η υδρόλυση δειγμάτων και του αρχικού υλικού και του προϊόντος ακολουθούμενη από ανάλυση αμινοξέων των υδρόλυμάτων αποκαλύπτει το C-τελικό αμινοξύ, λόγω της απουσίας του από το υδρόλυμα του κατεργασμένου πεπτιδίου. Με έναν ανάλογο τρόπο το C-τελικό αμινοξύ μπορεί να μετατραπεί με αναγωγή με LiAlH_4 LiBH_4 (Fromageot et al. 1950) σε ένα παράγωγο που δεν είναι αμινοξύ. Πιο αξιόπιστα αποτελέσματα προκύπτουν εάν η καρβοξυλική ομάδα εστεροποιηθεί πριν από την αναγωγή με τη βοήθεια του διαζωμεθανίου. Εκτός από την αφαιρετική μέθοδο το C-τελικό αμινοξύ μπορεί να ταυτοποιηθεί επίσης με τη μορφή της προκύπτουσας αμινοαλκοόλης

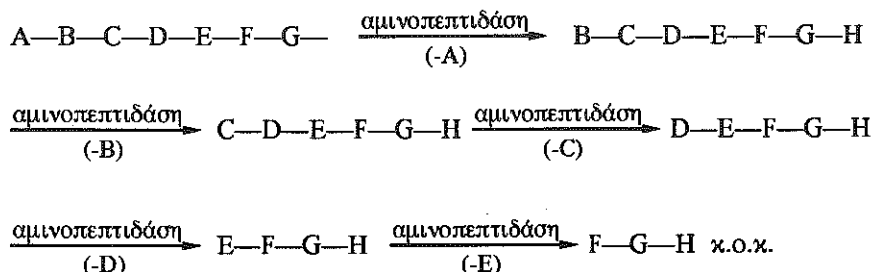


B. Διαδοχική Αποικοδόμηση

Σε μικρά πεπτίδια ο προσδιορισμός των δύο ακραίων ομάδων μπορεί να έχει αρκετή σημασία, αλλά οι πληροφορίες που αποκτώνται μ'αυτόν τον τρόπο είναι μικρότερης αξίας για την ανάλυση της αλληλουχίας μεγαλύτερων αλυσίδων. Μέθοδοι που επιτρέπουν τη βήμα προς βήμα απομάκρυνση των διαφόρων αμινοξέων αποδείχθηκαν πιο παραγωγικές και επομένως προσήλκυσαν περισσότερη προσοχή. Ένας αξιοσημείωτος αριθμός προτάσεων μπορεί να βρεθεί στη βιβλιογραφία, αλλά μόνο λίγες έφθασαν στο στάδιο της πρακτικής εφαρμογής και την εποχή που γράφονταν αυτό το βιβλίο μόνον η αποικοδόμηση Edman (1950) εφαρμόζονταν ευρέως. Παρ'όλα αυτά, μια από τις περισσότερες ή λιγότερο εγκατελειμμένες προσεγγίσεις, η βαθμιαία υδρόλυση με ειδικά πρωτεολυτικά ένζυμα αξίζει μια σύντομη συζήτηση.

1. Υδρόλυση που καταλύεται από Εξωπεπτιδάσες

Οι αμινοπεπτιδάσες καταλύουν την υδρόλυση του πεπτιδικού δεσμού που ακολουθεί το Ν-τελικό αμινοξύ (Α). Σα συνέπεια, το δεύτερο αμινοξύ (Β) γίνεται Ν-τελικό και κόβεται

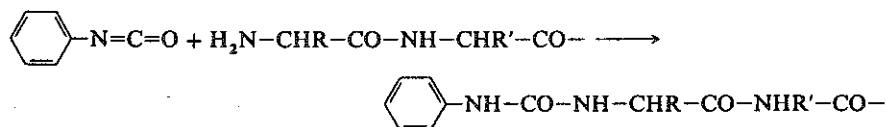


Επομένως, τουλάχιστον θεωρητικά, ολόκληρη η αλυσίδα αποικοδομείται με ένα βήμα προς βήμα τρόπο. Εφόσον τα ελεύθερα αμινοξέα εμφανίζονται με τη σειρά της θέσης τους στην αλληλουχία θα φαινόταν πιθανό να προσδιορίζεται η αλληλουχία των αμινοξέων ενός πεπτιδίου παίρνοντας δείγματα από το μίγμα της αντίδρασης σε κανονικά χρονικά διαστήματα και υποβάλλοντας αυτά σε ποσοτική ανάλυση αμινοξέων. Κατά την πρακτική εφαρμογή όμως του πειράματος μόνον η θέση μερικών από τα πρώτα αμινοξέα μπορεί να αποδειχθεί. Αυτό οφείλεται στις διαφορές των ταχυτήτων υδρόλυσης που αναφέρονται στα διάφορα αμινοξέα. Όταν η L-λευκίνη κατέχει την Ν-τελική θέση ο δεσμός που τη συνδέει με το επόμενο αμινοξύ διασπάται τόσο εύκολα από ένα ένζυμο των νεφρών ώστε ονομάστηκε κακώς "λευκίνο αμινοπεπτιδάση" εάν και δεν είναι ειδικό για τη λευκίνη. Καταλύει τη διάσπαση της Ν-τελικής μεθειονίνης περίπου στον ίδιο βαθμό, αλλά απομακρύνει την προλίνη με ταχύτητα τάξεις μεγέθους χαμηλότερη από εκείνη που παρατηρήθηκε για τη λευκίνη ή τη μεθειονίνη. Η γλυκίνη διασπάται ακόμη πιο αργά. Επομένως η διαδοχική αποικοδόμηση δεν ακολουθεί ένα απλό πρότυπο και οδηγείται σε ένα πρακτικό σταμάτημα στα αμινοξέα προλίνη και γλυκίνη. Ένα ένζυμο γνωστό σαν αμινοπεπτιδάση Μ δείχνει μια μικρότερη διαφορά στις ταχύτητες υδρόλυσης των δεσμών που ακολουθούν τα διάφορα αμινοξέα και είναι επομένως πιο κατάλληλο για την πλήρη αποικοδόμηση ενός πεπτιδίου. Παρ'όλα αυτά η κύρια χρήση του δεν είναι στον προσδιορισμό της αλληλουχίας, αλλά μάλλον στην εξέταση της οπτικής καθαρότητας των συνθετικών πεπτιδίων. Εφόσον το ένζυμο δεν καταλύει τη διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού μεταξύ ενός D αμινοξέος και του επομένου του, πλήρης διάσπαση αποδεικνύει ότι δε συμβαίνει ρακεμίσωση κατά τη σύνθεση.

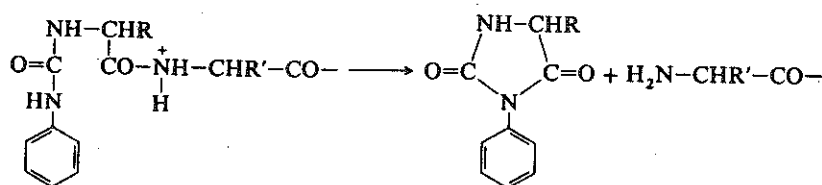
Οι περιορισμοί που σημειώθηκαν για τις αμινοπεπτιδάσες ισχύουν επίσης και για την ανάλογη βήμα προς βήμα αποικοδόμηση από το C-τελικό άκρο με τις καρβοξυπεπτιδάσες. Το παγκρεατικό ένζυμο καρβοξυπεπτιδάση Α δείχνει χαμηλές ταχύτητες κατά την υδρόλυση πεπτιδίων με ένα βασικό αμινοξύ (αργινίνη ή λυσίνη) σαν C-τελικό αμινοξύ. Η καρβοξυπεπτιδάση Β είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική όταν τα ίδια βασικά αμινοξέα κατέχουν την C-τελική θέση. Το ένζυμο από μαγιά καρβοξυπεπτιδάση Υ είναι λιγότερο ειδικό και επομένως γενικά πιο εφαρμόσιμο, αλλά πιθανώς ακόμη ακατάλληλο για τη διευκρίνιση μιας μεγαλύτερης αλληλουχίας αμινοξέων.

2. Αποικοδόμηση Edman

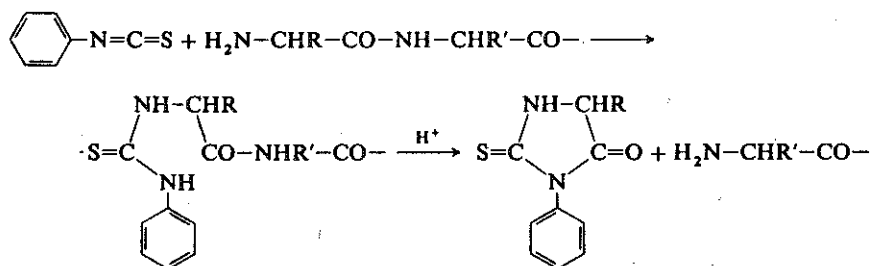
α) Διαδικασία δύο σταδίων. Ο φαινυλοϊσοκυανικός εστέρας αντιδρά με την ελεύθερη αμινομάδα του N-τελικού αμινοξέος των πεπτιδίων και δίνει ένα φαινυλοκαρβαμικό παράγωγο,



το οποίο όταν κατεργάζεται με ένα ισχυρό οξύ όπως το HCl παρέχει την φαινυλοϋδαντοΐνη με διάσπαση του δεσμού μεταξύ του πρώτου και του δεύτερου αμινοξέος:



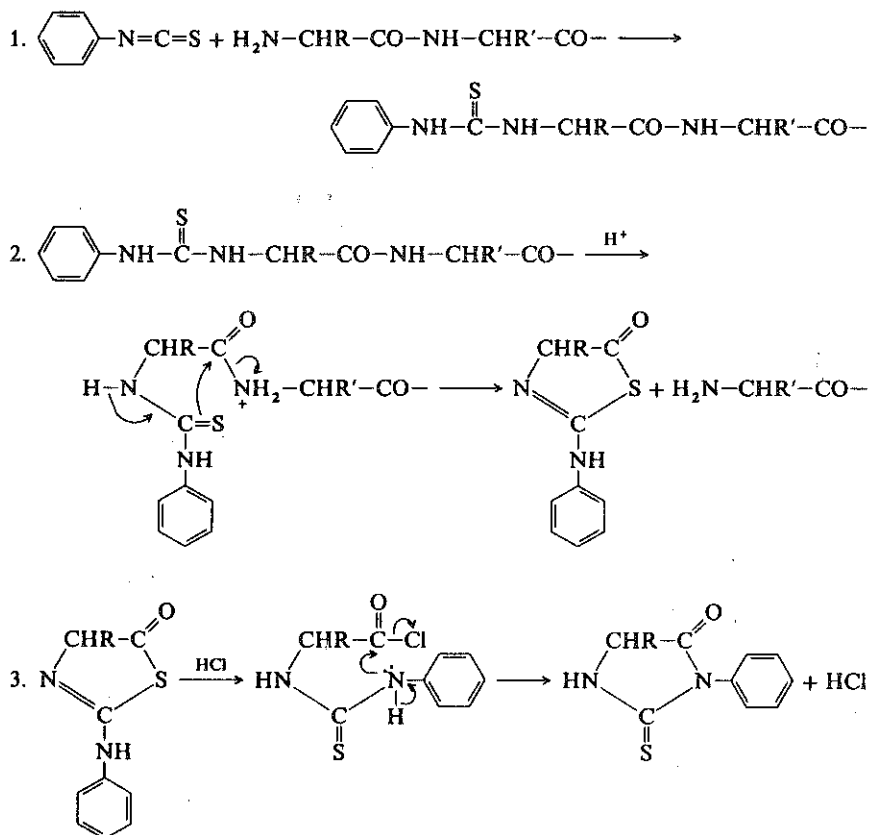
Το νέο N-τελικό αμινοξύ μπορεί έπειτα να απομακρυνθεί σαν μια φαινυλοϋδαντοΐνη σε ένα δεύτερο κύκλο φαινυλοκαρβαμίδωσης και κυκλοποίησης. Η μέθοδος αυτή της βήμα προς βήμα αποικοδόμησης ενώ ανακαλύφθηκε αρκετές δεκαετίες πριν (Bergmann et al. 1927) έδωσε πρακτικά αποτελέσματα μόνο το 1950 όταν ο Edman τροποποίησε το αντιδραστήριο και εφάρμοσε χρωματογραφικές μεθόδους για την ταυτοποίηση των κυκλικών προϊόντων. Το βελτιωμένο αντιδραστήριο, ο φαινυλοϊσοθειοκυανικός εστέρας, μετατρέπει σε ήπιες συνθήκες το πεπτίδιο σε φαινυλοθειοκαρβαμικό παράγωγο το οποίο κυκλοποιείται και διασπάται με την επίδραση υδροχλωρικού οξέος (διαλυμένου σ'έναν οργανικό διαλύτη όπως η διοξάνη):



Οι φαινυλοθειοϋδαντοΐνες που σχηματίζονται κατά τη μέθοδο της αποικοδόμησης Edman συγκρίθηκαν με πρότυπες φαινυλοθειοϋδαντοΐνες που παρασκευάστηκαν από αμινοξέα και έτσι ταυτοποιήθηκαν. Εντούτοις παρά τις πολυάριθμες περαιτέρω βελτιώσεις, όπως εφαρμογή χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας, αέρια χρωματογραφία και

ακόμη και χρωματογραφία μάζας για την ταυτοποίηση των φαινυλοθειοιδαντοϊνών, η μέθοδος είχε σοβαρούς περιορισμούς. Επειδή τα πεπτιδικά δείγματα κρατούν μικρές ποσότητες νερού, γίνεται μια μικρή υδρόλυση της αλυσίδας κατά την κυκλοποίηση με HCl. Δημιουργούνται κομμάτια με νέο N-τελικό αμινοξύ, τα οποία αποικοδομούνται ταυτόχρονα με το μητρικό πεπτίδιο. Γι' αυτό ύστερα από μερικούς κύκλους τα αποτελέσματα γίνονται όλο και λιγότερο καθαρά και ο προσδιορισμός της αλληλουχίας δεν μπορεί πλέον να κατορθωθεί.

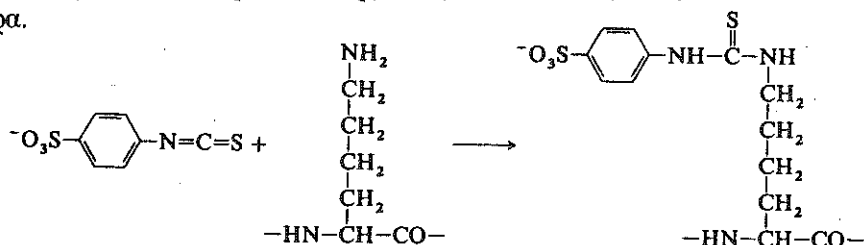
β) Διαδικασία τριών σταδίων. Η μεγαλύτερη ανακάλυψη στην ανάλυση της αλληλουχίας έγινε με την πλήρη μελέτη του μηχανισμού της αποικοδόμησης Edman, η οποία αποκάλυψε ότι ο σχηματισμός της φαινυλοθειοιδαντοϊνης γίνεται σε δύο ξεχωριστά στάδια. Στο πρώτο το άτομο του θείου στο φαινυλοθειοκαρβαμιδικό πεπτίδιο προσβάλλει τον καρβονυλικό άνθρακα του N-τελικού αμινοξέος και προκύπτει ένα παράγωγο θειαζολιδινόνης. Η κυκλοποίηση αυτή συνεπάγεται τη διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού μεταξύ των δύο πρώτων αμινοξέων της αλυσίδας. Ο κύκλος τελειώνει με το καταλυόμενο από οξύ άνοιγμα της θειαζολιδινόνης και το κλείσιμο του δακτυλίου προς φαινυλοθειοιδαντοϊνη. Επομένως, τα τρία στάδια της αποικοδόμησης Edman μπορούν να περιγραφούν με τον εξής τρόπο:



Το δεύτερο στάδιο, ενώ καταλύεται από οξύ, δε χρειάζεται HCl. Ισχυρά οργανικά οξέα, όπως το τριφθοροξικό οξύ, είναι ικανά να προκαλέσουν το σχηματισμό της θειαζολιδινόνης με εκλεκτική διάσπαση του δεσμού και τέτοια οξέα είναι λιγότερο επικίνδυνα να προκαλέσουν υδρόλυση της αλυσίδας. Έτσι δε συμβαίνει ανεπιθύμητος σχηματισμός πεπτιδικών τμημάτων, ούτε δημιουργία παραπειστικών νέων N-τελικών αμινοξέων. Είναι αλήθεια ότι το HCl χρειάζεται στο τρίτο στάδιο, για τη μετατροπή της φαινυλοθιαζολιδινόνης σε φαινυλοϋδαντοΐνη, αλλά ο χειρισμός αυτός γίνεται με τη θιαζολιδινόνη ήδη διαχωρισμένη (με εκχύλιση με έναν οργανικό διαλύτη) από το υπόλοιπο πεπτίδιο και έτσι αυτό δεν εκτίθεται στην επίδραση του HCl. Επομένως η τροποποιημένη ("τρίτο στάδιο") αποικοδόμηση Edman μπορεί να επιτευχθεί μέσω πολλών κύκλων. Θα φαινόταν ότι το τρίτο στάδιο δεν είναι πραγματικά απαραίτητο, αλλά στην πράξη η ταυτοποίηση των μάλλον ασταθών θιαζολιδινονών αποδείχθηκε ότι δεν είναι αξιόπιστη. Οι φαινυλοθειοϋδαντοΐνες είναι πιο κατάλληλες γι' αυτό το σκοπό. Με τη βελτιωμένη μέθοδο επιτεύχθηκε ο προσδιορισμός της αλληλουχίας σαράντα ή ακόμα και πενήντα αμινοξέων και η μέθοδος απέκτησε σχεδόν αποκλειστική εφαρμογή.

γ) Αυτόματος Προσδιορισμός της Αλληλουχίας. Το 1967 οι Edman και Begg περιέγραψαν μια συσκευή η οποία εκτελεί την τριών σταδίων αποικοδόμηση μέσω πολυάριθμων κύκλων με αυτόματο τρόπο χειρισμού. Σήμερα διατίθενται στο εμπόριο αρκετά είδη αυτής της συσκευής (sequenator), όλα βασισμένα στις ίδιες αρχές, αλλά κατασκευασμένα σύμφωνα με τροποποιημένες μεθόδους λειτουργίας. Στην αρχική συσκευή "περιστρεφόμενου δοχείου" το διάλυμα του πεπτιδίου σχηματίζει ένα λεπτό φιλμ στο τοίχωμα ενός μικρού ταχέως περιστρεφόμενου γυάλινου δοχείου. Τα απαραίτητα αντιδραστήρια διοχετεύονται και απομακρύνονται αυτομάτως, οι εκχυλιζόμενες θιαζολιδινόνες συλλέγονται με ένα συλλέκτη κλασμάτων και ακολούθως μετατρέπονται στις πιο σταθερές φαινυλοθειοϋδαντοΐνες για ταυτοποίηση, κυρίως με γρήγη χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC). Στην τροποποιημένη μέθοδο "στερεής φάσης" το πεπτίδιο προσκολλάται μέσω ομοιοπολικού δεσμού σ' ένα αδιάλυτο υπόστρωμα που μπορεί να είναι πολυμερές ή γυαλί με δραστικές ομάδες (aminoglass). Στις μεθόδους "αέριας φάσεως" (ή πιο σωστά φάσεως ατμού) τα αντιδραστήρια συμπυκνώνονται επάνω στο δείγμα και απομακρύνονται με εξάτμιση. Κατά την ανάπτυξη των συσκευών προσδιορισμού της αλληλουχίας έγινε μια σειρά επιπρόσθετων βελτιώσεων. Για παράδειγμα χρησιμοποιήθηκαν τετρακίς-υδροξυπροπυλο-προπυλενοδιαμίνη ή πιο πρόσφατα τετρακίς-υδροξυαιθυλο-αιθυλενοδιαμίνη για δημιουργία βασικών συνθηκών κατά τη φαινυλοθειοκαρβαμιδλίωση και πενταφθοροπροπιονικό οξύ που παρέχει επαρκή οξύτητα για την κυκλοποίηση των φαινυλοθειοκαρβαμικών παραγώγων προς θιαζολιδινόνη. Η τελευταία εκχυλίζεται μ'ένα μίγμα διχλωρομεθανίου και βενζολίου. Η εκλογή του διαλύτη οδηγείται από την επιθυμία να ελαττωθούν οι απώλειες κατά τη διαδικασία προσδιορισμού της αλληλουχίας. Ακόμη και μια μικρή διαλυτότητα του πεπτιδίου σε οργανικούς διαλύτες έχει σαν αποτέλεσμα βαθμιαία ελάττωση της απόδοσης και ύστερα από κάποιον αριθμό κύκλων η μέθοδος γίνεται πρακτικά ασύμφορη. Η μέθοδος αέριας φάσης αντιπροσωπεύει μια βέβαιη βελτίωση σ' αυτό το πρόβλημα. Φυσικά απαιτούνται πτητικά ρυθμιστικά διαλύματα. Για παράδειγμα η διμεθυλοβενζυλαμίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί σα βάση κατά την φαινυλοκαρβαμιδλίωση. Οι απώλειες μπορούν να μειωθούν περισσότερο καθιστώντας το πεπτίδιο πιο πολικό. Μπο-

ρεί να εφαρμοσθεί μια αρχική κατεργασία με υποκατεστημένο φαινυλοϊσοθειοκυανικό εστέρα.



με σκοπό να τροποποιηθούν οι παράπλευρες αλυσίδες της λυσίνης και επομένως να ελαττωθεί η διαλυτότητα του πεπτιδίου σε οργανικούς διαλύτες.

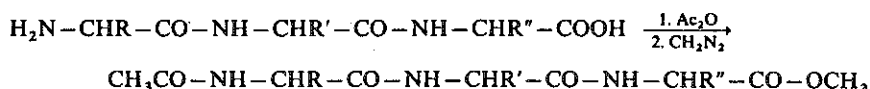
Ο αυτόματος προσδιορισμός της αλληλουχίας με τις πολυάριθμες βελτιώσεις του είναι σήμερα μια διαδικασία ρουτίνας. Ένας κύκλος απαιτεί μια ώρα ή και λιγότερο και το ποσό του πεπτιδίου που χρειάζεται είναι πολύ κάτω από το 1mmol που χρησιμοποιούνταν πριν. Δεν είναι εντούτοις σπάνια τα σφάλματα κατά την εξήγηση των αποτελεσμάτων και η αλληλουχία ενός πεπτιδίου θεωρείται σίγουρα αποδειγμένη μόνον εάν επιβεβαιωθεί με μια δεύτερη, ανεξάρτητη μέθοδο.

δ) Η μέθοδος Edman-Dansyl. Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας μπορεί επίσης να γίνει με το χέρι χωρίς αυτόματη συσκευή και χωρίς ταυτοποίηση των φαινυλοθειοϊδαντοϊνών. Μια απλή προσέγγιση είναι μετά από κάθε κύκλο Edman να γίνεται ποσοτική ανάλυση αμινοξέων και ταυτοποίηση του κάθε αμινοξέος που απομακρύνεται από τη διαφορά μεταξύ των δύο αναλύσεων. Αυτή είναι μια αξιόπιστη μέθοδος, αλλά απαιτεί έναν αναλυτή αμινοξέων και μια αρκετά μεγάλη ποσότητα πεπτιδικού δείγματος που να επαρκεί για τη λήψη μιάς πλήρους σειράς δειγμάτων για τις αναλύσεις αμινοξέων. Μια λιγότερο απαιτητική μέθοδος βασίζεται στην ανάλυση της ακραίας ομάδας με τη μέθοδο dansyl (βλ. σελίδα 18) Το N-τελικό αμινοξύ ταυτοποιείται με επίδραση του "dansyl" αντιδραστηρίου και υδρόλυση μιας μικρής ποσότητας, ενώ η κύρια ποσότητα του πεπτιδίου υποβάλλεται σ'έναν κύκλο Edman. Το νέο N-τελικό αμινοξύ προσδιορίζεται πάλι με μια μικρή ποσότητα και η υπόλοιπη ποσότητα υποβάλλεται σ'έναν δεύτερο κύκλο Edman κ.ο.κ. Όλα αυτά είναι δυνατά με τον συνήθως χρησιμοποιούμενο εξοπλισμό του εργαστηρίου και την ταυτοποίηση των dansyl-αμινοξέων με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.

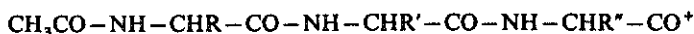
Γ. Προσδιορισμός της Αλληλουχίας με τη βοήθεια Φασμάτων Μάζης

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας με καταγραφή ενός απλού φάσματος είναι μια πολύ ελκυστική ιδέα, η οποία ενεργοποίησε αξιοσημείωτη έρευνα. Η κλασική μέθοδος της φασματομετρίας μάζης απαιτεί ένα πτητικό δείγμα, το οποίο όταν τίθεται μέσα σε ένα θάλαμο κενού εξατμίζεται. Οι ατμοί τότε εκτίθενται σε μια δέσμη ηλεκτρονίων. Με το βομβαρδισμό των ηλεκτρονίων παράγονται το μοριακό ιόν και ιόντα θραυσμάτων. Τα περισσότερα πεπτίδια δεν είναι επαρκώς πτητικά γι'αυτή τη μέθοδο. Η υποκατάσταση

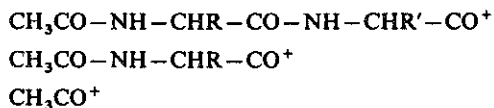
των πολικών ομάδων έχει σαν αποτέλεσμα ένα μικρότερης πολικότητας και επομένως μεγαλύτερης πτητικότητας υλικό. Η ακετυλίωση με οξικό ανυδρίτη τροποποιεί την τελική αμινομάδα, την παράπλευρη αμινομάδα της λυσίνης και επίσης τις υδροξυλομάδες των παράπλευρων αλυσίδων της σερίνης και της θρεονίνης προς την επιθυμητή κατεύθυνση. Η πτητικότητα μπορεί επιπλέον να αυξηθεί με εστεροποίηση των ελεύθερων καρβοξυλίων με κατεργασία του διαλύματος του ακετυλοπαραγώγου με διαζωμεθάνιο σε μεθανόλη:



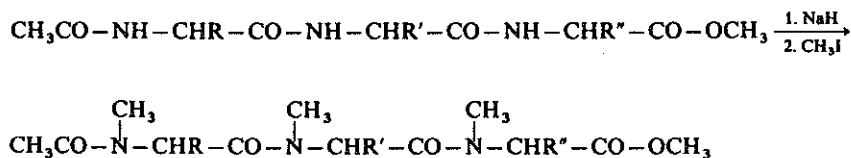
Το μοριακό ιόν του λαμβανόμενου πεπτιδίου δείχνει μόνον το μοριακό του βάρος και γ'αυτό έχει περιορισμένη σημασία. Το φορτίο όμως διαδίδεται κατά μήκος της αλυσίδας και επιφέρει διάσπαση. Σχάση του C-τελικού εστερικού δεσμού δίνει ένα ιόν με τη μάζα του μοριακού ιόντος μείον 31 (μεθοξυ ομάδα). Το θραύσμα αυτό, που συνήθως παράγεται σε μεγάλες ποσότητες,



θα ήταν μόνο του ακόμη ανεπαρκές να δώσει πληροφορίες για την αλληλουχία, αλλά γίνεται περαιτέρω τεμαχισμός καταρχήν στους πεπτιδικούς δεσμούς και οι μάζες των ιόντων που προκύπτουν



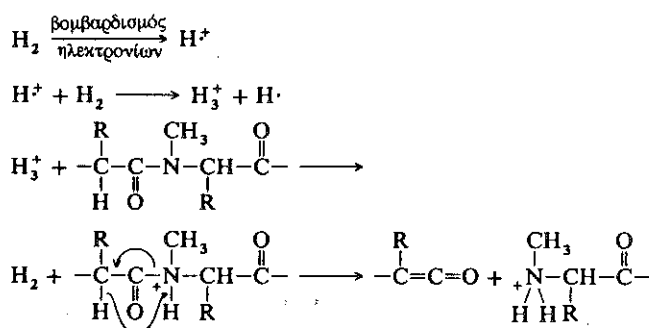
παρέχουν τις ζητούμενες πληροφορίες του πειράματος. Η διαφορά μεταξύ δύο ιόντων αντιστοιχεί στο βάρος του αμινοξέος που χάθηκε κατά την πορεία και αφού αυτά τα βάρη είναι χαρακτηριστικά για τα διάφορα αμινοξέα είναι δυνατόν να διευκρινισθεί η αλληλουχία από τις διαφορές μάζας της σειρά των ιόντων. Μια σημαντική εξαίρεση είναι τα ταυτόσημα μοριακά βάρη της λευκίνης και της ισολευκίνης, τα οποία δεν μπορούν να διακριθούν το ένα από το άλλο μ'αυτόν τον απλό τρόπο. Δυστυχώς η πραγματική εικόνα είναι συνήθως πιο περίπλοκη από αυτή που περιγράψαμε παραπάνω. Εκτός από την κύρια σχάση στους πεπτιδικούς δεσμούς συμβαίνει και κάποια δευτερεύουσα σχάση μεταξύ των καρβονυλικών ομάδων και του παρακείμενου α-ατόμου άνθρακα και οι παράπλευρες αλυσίδες, ιδιαίτερα οι πιο ογκώδεις, μπορεί να αποχωρισθούν από τον πεπτιδικό σκελετό. Η σύγχυση που δημιουργείται από τέτοιες ανεπιθύμητες σχάσεις μπορεί να ελαττωθεί με διάφορες μεθόδους, για παράδειγμα με υπερμεθυλίωση. Ο μεθυλεστέρας του ακετυλοπεπτιδίου κατεργάζεται με νάτριο υδρίδιο και μετά με μέθυλο ιωδίδιο



ώστε να μειωθεί ακόμη περισσότερο η πολικότητα του μορίου και να αυξηθεί η θερμική του σταθερότητα. Φυσικά η αλκυλίωση εκτείνεται και σε άλλα άτομα αζώτου και αλκυλιώνονται επίσης ο ιμιδαζολικός πυρήνας της ιστιδίνης και το ινδόλιο της τρυπτοφάνης. Παρ'όλο που εξασφαλίζονται πράγματι απλούστερα φάσματα από υπερμεθυλιωμένα δείγματα, μπορεί να προκύψουν κάποιες περιπλοκές από την ίδια την υπερμεθυλίωση. Για παράδειγμα γίνεται C-μεθυλίωση των αμινοξέων της γλυκίνης με αποτέλεσμα τη δημιουργία αμινοξέων αλανίνης. Η χρήση του CD_3I αντί του CH_3I επιτρέπει την ανίχνευση ανεπιθύμητων εισαγομένων μεθυλομάδων.

Μια εναλλακτική βελτίωση γίνεται εφαρμόζοντας "χημικό ιονισμό" αντί του απευθείας βομβαρδισμού ηλεκτρονίων. Αυτό σημαίνει τη μεταφορά ενός πρωτονίου από ιόντα όπως H_3^+ ή CH_5^+ στο μόριο του παραγόμενου πεπτιδίου. Οι μάζες του μοριακού ιόντος και των ιόντων των θραυσμάτων αυξάνονται κατά ένα dalton και αυτό πρέπει να ληφθεί υπόψη. Σ'αυτή την τεχνική υπάρχει μικρότερη δευτερεύουσα σχάση.

Σχήμα 1. Χημικός ιονισμός του υπερμεθυλιωμένου πεπτιδίου και διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού



Περαιτέρω πρόοδος στον προσδιορισμό της αλληλουχίας με φάσματα μάζης έγινε με την εισαγωγή νέων τρόπων ιονισμού, όπως εκρόφηση πεδίου και βομβαρδισμός με ταχεία άτομα. Όργανα διπλού εστιασμού με μεγάλη διαχωριστική ικανότητα και πολύπλοκοι υπολογισμοί με κομπιούτερ αυξήσαν πολύ τον αριθμό των πεπτιδίων που θα μπορούσε να βρεθεί η αλληλουχία τους με φασματοσκοπία μάζης. Τα φάσματα μάζης μπορεί να είναι ο πιο πρακτικός τρόπος προσδιορισμού της αλληλουχίας ενώσεων που δεν είναι κατάλληλες για αποικοδόμηση Edman, όπως κυκλικά πεπτίδια ή πεπτίδια με μια ακυλομάδα στο N-τελικό τους άκρο.

Μια ενδιαφέρουσα πιθανότητα προκύπτει από το συνδυασμό ενζυμικής αποικοδόμησης με φασματομετρία μάζης. Διπεπτιδυλο-αμινο-πεπτιδάσες και διπεπτιδυλοκαρβοξυπεπτιδάσες διασπούν δύο αμινοξέα τη φορά, που απομακρύνονται με μορφή διπεπτιδίων. Συνέχιση της μεθόδου καταλυτικής υδρόλυσης δίνει έτσι μια σειρά διπεπτιδίων με εξαίρεση τα πεπτίδια με μονό αριθμό αμινοξέων όπου το τελευταίο αμινοξύ εμφανίζεται μόνο του. Για παράδειγμα η υδρόλυση του δεκαπεπτιδίου ABCDEFGHIJ με διπεπτιδυλο-αμινοπεπτιδάση δίνει πέντε διπεπτίδια, AB, CD, EF, GH και IJ. Ένα δεύτερο δείγμα του ίδιου δεκαπεπτιδίου εισάγεται τότε σ'έναν απλό κύκλο αποικοδό-

μησης Edman και το εννεαπεπτιδίο που προκύπτει BCDEFGHIJ υδρολύεται με διπεπτιδυλο-αμινοπεπτιδάση. Προκύπτουν τέσσερα διπεπτίδια BC, DE, FG και HI μαζί με το αμινοξύ J. Η ταυτοποίηση των διπεπτιδίων και του ελεύθερου αμινοξέος μπορεί να γίνει με φασματοσκοπία μάζης, ιδιαιτέρως με τη μέθοδο χημικού ιονισμού και μπορούμε έτσι να μην προχωρήσουμε στο διαχωρισμό των θραυσμάτων. Οι πληροφορίες που εξασφαλίζονται μ'αυτά τα πειράματα είναι επαρκείς για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του δεκαπεπτιδίου.

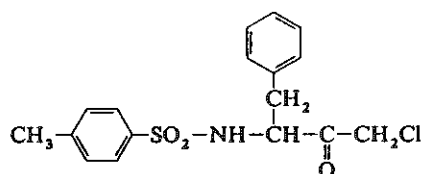
Δ. Τεμαχισμός των Πεπτιδίων

Εφόσον η λέξη "πεπτιδίο" συνήθως σημαίνει μια σχετικά μικρή αλυσίδα αμινοξέων δεν είναι προφανές γιατί τα πεπτίδια θα πρέπει να κοπούν σε ακόμη μικρότερα κομμάτια πριν τον προσδιορισμό της αλληλουχίας. Ο τεμαχισμός δεν είναι πράγματι πάντοτε απαραίτητος. Για παράδειγμα η φασματομετρία μάζης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας δεκαπεπτιδίων ή μερικές φορές ακόμη και μεγαλύτερων πεπτιδίων και μπορεί να ακολουθήσει αποικοδόμηση Edman μέσω πολυάριθμων κύκλων. Ακόμη ο τεμαχισμός θα ήταν επιθυμητός σαν αρχή μιας δεύτερης σειράς πειραμάτων με σκοπό την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων ενός πρώτου προσδιορισμού της αλληλουχίας που έγινε σε ολόκληρη την αλυσίδα. Επίσης, όταν δεν υπάρχει ελεύθερη αμινομάδα στο N-άκρο, όπως στην περίπτωση των κυκλικών πεπτιδίων ή σε αλυσίδες που έχουν ένα N-τελικό πυρογλουταμινικό αμινοξύ ή ένα ακετυλάμινο οξύ, η κατεργασία με φαινυλοϋσοθειοκυανικό εστέρα είναι χωρίς αποτέλεσμα γιατί οδηγεί απλώς στη φαινυλοθειοκαρβαμιδυλίωση των αμινομάδων των παράπλευρων αλυσίδων. Σε τέτοιες περιπτώσεις χρειάζεται ο τεμαχισμός, γιατί μπορεί να δημιουργήσει νέα πιο χρήσιμα πεπτίδια, τα οποία να έχουν ελεύθερες αμινομάδες στο N-άκρο τους.

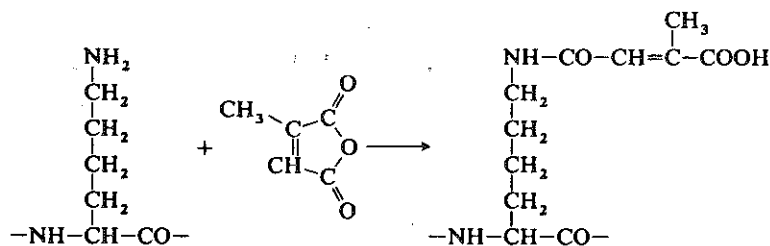
1. Υδρόλυση με Ειδικές Ενδοπεπτιδάσες

Οι εξωπεπτιδάσες, ένζυμα που καταλύουν την υδρολυτική διάσπαση ακραίων αμινοξέων, έχουν ήδη αναφερθεί σ'αυτό το κεφάλαιο. Εδώ θα συζητήσουμε τη χρήση ενζύμων, τα οποία διασπούν πεπτίδια στο μέσον της αλυσίδας και τα οποία είναι αρκετά εκλεκτικά ώστε να υδρολύουν έναν πεπτιδικό δεσμό μόνον όταν αυτός ακολουθεί συγκεκριμένα αμινοξέα. Το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο ένζυμο για υδρόλυση είναι η θρυψίνη. Η χρησιμότητά του οφείλεται μόνον εν μέρει στη μεγάλη αύξηση της ταχύτητας υδρόλυσης. Πιο σημαντικός είναι ο υψηλός βαθμός εξειδίκευσης της καταλυτικής του δράσης. Η θρυψίνη επηρεάζει αποκλειστικά τους δεσμούς που ακολουθούν τα δύο βασικά αμινοξέα λυσίνη και αργινίνη. Μερικές φορές παρατηρείται επίσης κάποια διάσπαση μετά από αρωματικά αμινοξέα, αλλά αυτό δεν είναι συνέπεια της πρακτικώς αμελητέας συνυπάρχουσας δράσης της θρυψίνης σαν της χυμοθρυψίνης, αλλά μάλλον της μόλυνσης του ενζύμου κατά την παρασκευή του από χυμοθρυψίνη. Η σύγχιση που δημιουργείται από τέτοιες ανεπιθύμητες διασπάσεις

μπορεί να αποφευχθεί εάν προστεθεί στο μίγμα υδρόλυσης ένας μη αντιστρεπτός αναστολέας της χυμοθρυψίνης, όπως η χλωρομεθυλοκετόνη που παρασκευάζεται από την L-φαινυλαλανίνη

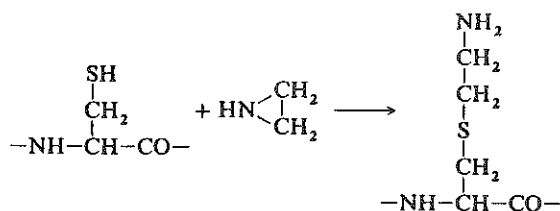


Η ταχύτητα υδρόλυσης επηρεάζεται από το αμινοξύ που ακολουθεί το βασικό αμινοξύ στην αλληλουχία. Έτσι ο δεσμός Arg-Asp διασπάται πιο αργά από τους περισσότερους άλλους πεπτιδικούς δεσμούς στη δεξιά πλευρά της αργινίνης. Ομοίως, ο δεσμός μεταξύ αργινίνης και κυστεϊκού οξέος (η οξειδωμένη μορφή της κυστεΐνης) αντιστέκεται σχετικά στην υδρόλυση με θρυψίνη. Όπως θα δειχθεί παρακάτω τέτοιες διαφορές μπορούμε να τις εκμεταλευθούμε στις μελέτες αλληλουχίας, αλλά είναι δυνατόν να δημιουργηθούν ακόμη πιο ουσιαστικές διαφορές με κατάλληλες τροποποιήσεις του πεπτιδικού μορίου. Για παράδειγμα, κατεργασία ενός πεπτιδίου που περιέχει και τα δύο αμινοξέα λυσίνη και αργινίνη με ανυδρίτη του μηλεϊνικού οξέος ή κατά προτίμηση με ανυδρίτη του μεθυλο-μηλεϊνικού οξέος δίνει παράγωγα στα οποία τα αμινοξέα της λυσίνης δεν έχουν ελεύθερη αμινομάδα στις παράπλευρες αλυσίδες τους



και επομένως δεν είναι πλέον υποστρώματα της θρυψίνης. Στα μηλεϊνικά ή μεθυλο-μηλεϊνικά παράγωγα η υδρόλυση συμβαίνει αποκλειστικά στα αμινοξέα της αργινίνης. Τα μικρότερα πεπτίδια που προκύπτουν μπορούν να διαχωρισθούν και οι μηλεϊνικές ή μεθυλο-μηλεϊνικές ομάδες απομακρύνονται με ήπιες συνθήκες. Ακολουθεί νέα υδρόλυση με θρυψίνη που δίνει μια νέα ομάδα πεπτιδικών τμημάτων. Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας διευκολύνεται από τις πληροφορίες που έχουμε για τα νέο δημιουργημένα C-τελικά αμινοξέα, συγκεκριμένα της αργινίνης στην πρώτη ομάδα και της λυσίνης στη δεύτερη ομάδα πεπτιδίων.

Η θρυψίνη μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί σε πεπτίδια που περιέχουν κυστεΐνη, γιατί η αμινοαιθυλίωση των σουλφυδρυλομάδων μετατρέπει την παράπλευρη αλυσίδα της κυστεΐνης στην αντίστοιχη της θειολυσίνης η οποία επειδή είναι παρόμοια με την παράπλευρη αλυσίδα της λυσίνης προσεαρμόζεται στην ενεργό περιοχή της θρυψίνης.



Συνεπώς μπορεί να γίνει διάσπαση της αλυσίδας στο τροποποιημένο αμινοξύ της κυστεΐνης.

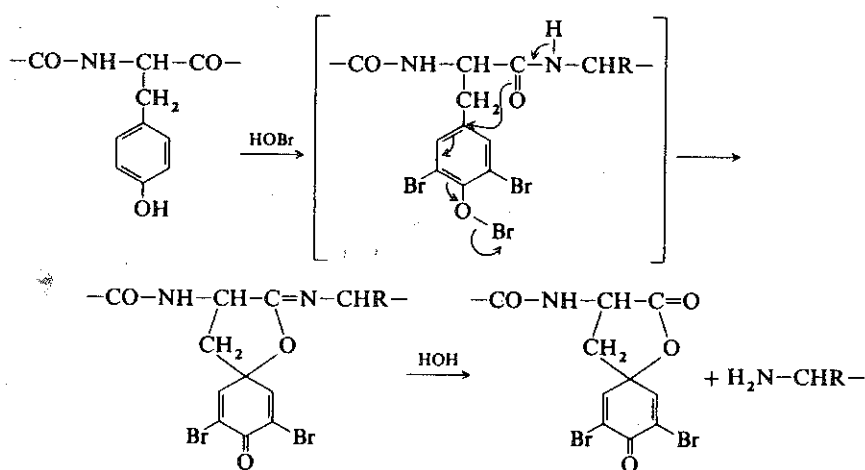
Μετά τη θρυψίνη η *χυμοθρυψίνη* είναι το πρωτεολυτικό ένζυμο που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας. Η εξειδίκευσή της είναι λιγότερο απόλυτη από αυτή της θρυψίνης. Αρχικά διασπώνται οι δεσμοί που ακολουθούν την φαινυλαλανίνη, την τυροσίνη και την τρυπτοφάνη, αλλά γίνεται επίσης μικρή υδρόλυση και μετά τα αμινοξέα λευκίνη και μεθειονίνη. Γι'αυτό πρέπει να προσδιορισθούν με προκαταρκτικά πειράματα οι συνθήκες (αναλογία ενζύμου-υποστρώματος, χρόνος, θερμοκρασία) που ταιριάζουν καλλίτερα για το σχηματισμό λίγων και καλά διαχωρισμένων πεπτιδικών τμημάτων. Σε ορισμένες περιπτώσεις λιγότερο εξειδικευμένα ένζυμα, όπως η πεψίνη, η παπαΐνη ή η θερμολυσίνη βρίσκουν εφαρμογή στη διευκρίνιση της δομής. Για την υδρόλυση ειδικών δεσμών μπορούν να απομονωθούν νέες μικροβιακές πρωτεάσες. Υπάρχουν γνωστές προλιδάσες και επίσης ένζυμα που υδρολύουν μόνον το δεσμό που ακολουθεί ένα πυρογλουταμινικό αμινοξύ κόκ.

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των αμινοξέων της γαστροεντερικής ορμόνης σεκρετίνης (Mutt et al. 1970) είναι ένα καλό παράδειγμα εφαρμογής της εκλεκτικής διάσπασης των πεπτιδικών αλυσίδων με τη βοήθεια των πρωτεολυτικών ενζύμων. Η ανάλυση αμινοξέων έδειξε μια αλυσίδα 27 αμινοξέων μεταξύ των οποίων υπάρχουν τέσσερις αργινίνες. Δεν υπήρχε καμιά λυσίνη στο υδρόλυμα. Η ανάλυση των ακραίων ομάδων έδειξε ότι το μοναδικό αμινοξύ της ιστιδίνης βρίσκεται στην N-τελική θέση. Δε βρέθηκε κανένα C-τελικό αμινοξύ με ελεύθερη καρβοξυλομάδα. Η πέψη με θρυψίνη έδωσε τα αναμενόμενα πέντε πεπτιδικά τμήματα. Το μεγαλύτερο από αυτά, ένα 12-πεπτίδιο περιείχε και ιστιδίνη και αργινίνη. Επομένως αυτό πρέπει να προέρχεται από το N-τελικό τμήμα της αλυσίδας της σεκρετίνης και από τον τρόπο που αποκτήθηκε φαίνεται ότι η αργινίνη είναι το C-τελικό αμινοξύ αυτού του τμήματος. Εφόσον περιέχει φαινυλαλανίνη χρησιμοποιήθηκε η χυμοθρυψίνη για περαιτέρω διάσπαση και τα δύο μικρότερα από τα σχηματισθέντα πεπτίδια υποβλήθηκαν σε αποικοδόμηση Edman. Τα πειράματα αυτά απέδειξαν ότι η αλληλουχία των πρώτων 12 αμινοξέων της σεκρετίνης είναι His-Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Glu-Leu-Ser-Arg. Το δεύτερο πεπτίδιο που προέκυψε από την επίδραση της θρυψίνης δεν περιείχε καμιά αργινίνη, επομένως προέρχεται από το C-τελικό άκρο του μητρικού μορίου. Η αλληλουχία του που προσδιορίστηκε με αποικοδόμηση Edman, Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂, με βαλιναμίδιο στο C-άκρο, εξήγησε γιατί δε βρέθηκε κανένα C-τελικό αμινοξύ κατά την ανάλυση της ακραίας ομάδας στη σεκρετίνη. Από τα υπόλοιπα τρία πεπτίδια το μικρότερο, ένα διπεπτίδιο, χρειάστηκε μόνον ανάλυση αμινοξέων για τον προσδιορισμό της μικρής του αλληλουχίας. Η αργινίνη πρέπει να είναι το C-τελικό αμινοξύ αφού αποκτήθηκε μέσω υδρόλυσης καταλυόμενης από θρυψίνη και γι'αυτό δε θα μπορούσε να έχει άλλη σειρά

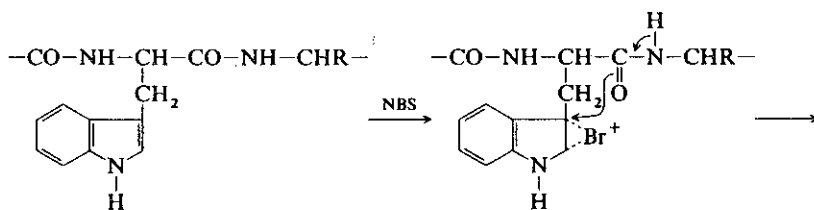
32 Προσδιορισμός της Αλληλουχίας των Αμινοξέων

HCl ή 0,25 M οξικό οξύ είναι ικανά να προκαλέσουν υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών και στις δύο πλευρές των ασπαραγινικών αμινοξέων. Για παράδειγμα το εξαπεπτίδιο Val-Leu-Gly-Asp-Phe-Pro δίνει το τριπεπτίδιο Val-Leu-Gly, το διπεπτίδιο Phe-Pro και ελεύθερο ασπαραγινικό οξύ. Η ελευθέρωση του ασπαραγινικού οξέος είναι συνήθως πλήρης ύστερα από μια μέρα υδρόλυσης στους 100°C με 0,25 M AcOH, ενώ η υδρολυτική διάσπαση άλλων πεπτιδικών δεσμών είναι αμελητέα. Η ασπαραγίνη αποτελεί μια αξιοσημείωτη εξαίρεση επειδή η καρβοξαμινική ομάδα στην παράπλευρη αλυσίδα της είναι αρκετά ευαίσθητη στην όξινη υδρόλυση και η ελεύθερη καρβοξυλική ομάδα του βαθμιαίως σχηματιζόμενου ασπαραγινικού οξέος δίνει το φαινόμενο της γειτονικής ομάδας, το οποίο οδηγεί στην απόσπαση του ασπαραγινικού οξέος από την αλυσίδα.

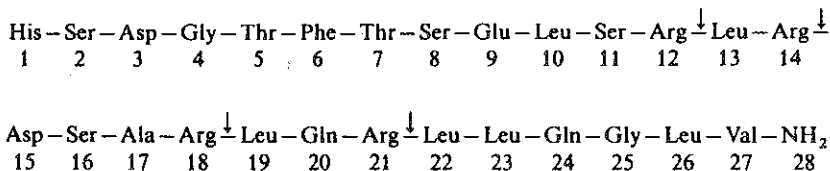
Μια πιο συχνά εφαρμοζόμενη μέθοδος εκλεκτικής διάσπασης βασίζεται στην αντίδραση των παράπλευρων αλυσίδων της τυροσίνης και της τρυπτοφάνης με θετικά φορτισμένο ιόν βρωμίου. Οι πρώτες παρατηρήσεις περιλαμβάνουν κατεργασία πεπτιδίων που περιέχουν τυροσίνη με βρωμιούχο ύδωρ. Το υποβρωμιώδες οξύ που περιέχεται σ' αυτό δημιουργεί ένα τριβρωμοπαράγωγο της φαινολικής παράπλευρης αλυσίδας της τυροσίνης, το οποίο μετά μετατρέπεται σε μια σπιρολακτόνη με ταυτόχρονη διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού:



Η αντίδραση ελέγχεται εύκολα από τις χαρακτηριστικές αλλαγές του UV φάσματος. Μια πιο αξιόπιστη πηγή θετικά φορτισμένου ιόντος βρωμίου είναι το N-βρωμοηλεκτρίμιδιο, το οποίο χρησιμοποιείται συχνά για τη διάσπαση της τρυπτοφάνης:



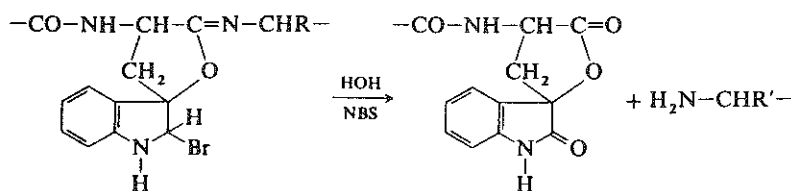
από την Leu-Arg. Ένα τριπεπτιδικό τμήμα βρέθηκε να είναι Leu-GIX-Arg με ανάλυση αμινοξέων και προσδιορισμό του N-τελικού αμινοξέος. Το γράμμα "X" στο GIX δείχνει την αβεβαιότητα των αποτελεσμάτων, γιατί η ανάλυση αμινοξέων του όξινου υδρολύματος (ακόμη και αν βρέθηκε ένα mole αμμωνίας) αποτυγχάνει στο να διακρίνει σίγουρα μεταξύ γλουταμινικού οξέος και γλουταμίνης. Αποικοδόμηση με λευκινο-αμινοπεπτιδάση, όμως, αφήνει άθικτες τις καρβοξαμιδικές παράπλευρες αλυσίδες και αυτό θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τον τελικό σχεδιασμό του Leu-Gln-Arg. Το τελευταίο πεπτίδιο, Asp-Ser-Ala-Arg προσδιορίστηκε με αποικοδόμηση Edman. Το μεγάλο πρόβλημα που παρέμεινε, ο προσδιορισμός της θέσης των διπεπτιδικών, τριπεπτιδικών και τετραπεπτιδικών τμημάτων στην αλυσίδα του μητρικού μορίου, λύθηκε με την έμπειρη χρήση της εκλεκτικής διάσπασης με πρωτεολυτικά ένζυμα. Όταν η πέψη με θρυψίνη διακόπηκε ύστερα από δέκα λεπτά, η υδρόλυση ενός από τους δεσμούς που ακολουθούν τα αμινοξέα της αργινίνης δεν ήταν πλήρης. Ο δεσμός μεταξύ Arg και Asp αντιστέκεται σχετικά στη δράση της θρυψίνης και γι' αυτό θα μπορούσε να απομονωθεί από την πέψη το εξαπεπτίδιο Leu-Arg-Asp-Ser-Ala-Arg. Εν τούτοις, η πληροφορία αυτή ήταν ακόμη ανεπαρκής για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας ολόκληρης της αλυσίδας και χρειάστηκε επιπλέον υδρόλυση για να δώσει τις αποδείξεις που έλειπαν για τη σειρά των πεπτιδικών τμημάτων που προέκυψαν από την επίδραση της θρυψίνης. Η υδρόλυση καταλύθηκε από τη θρομβίνη, ένα πρωτεολυτικό ένζυμο που διέσπασε εκλεκτικά έναν απλό δεσμό της σεκρετίνης, τον ίδιο δεσμό που αντιστάθηκε στη δράση της θρυψίνης. Μια σύντομη μελέτη των πεπτιδίων που προκύπτουν από τη δράση της θρομβίνης (ανάλυση ακραίων ομάδων και αναλύσεις αμινοξέων) απέδειξε την πλήρη σειρά αμινοξέων της σεκρετίνης από χοίρο



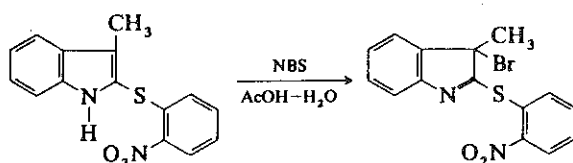
Οι δεσμοί που διασπάστηκαν από τη θρυψίνη δείχνονται με βέλη. Ο δεσμός μεταξύ των αμινοξέων 14 και 15 είναι αυτός που αντιστέκεται στη δράση της θρυψίνης, αλλά υδρολύθηκε από τη θρομβίνη. Η ορθότητα της δομής που διευκρινίστηκε με αποικοδόμηση επιβεβαιώθηκε με σύνθεση (Bodanszky et al. 1967). Το συνθετικό υλικό δε διακρίθηκε από τη φυσική ορμόνη σε μια σειρά πειραμάτων προσδιορισμού της βιολογικής δραστηριότητας. Η μελέτη συμπληρώθηκε με παράλληλη αποικοδόμηση των φυσικών και συνθετικών δειγμάτων με θρυψίνη και χυμοθρυψίνη ακολουθούμενη από σύγκριση των πεπτιδίων με χρωματογραφία και ηλεκτροφόρηση

2. Χημικές Μέθοδοι Διάσπασης

Η μερική όξινη υδρόλυση είναι γενικά μη εξειδικευμένη, αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού των ασπαραγινικών αμινοξέων. Ο δεσμός Asp-Pro είναι εξαιρετικά ευαίσθητος σε οξέα και διασπάται με αραιό υδροχλωρικό οξύ σε θερμοκρασία δωματίου. Σε υψηλές θερμοκρασίες πολύ ασθενή οξέα, όπως 0,03 M

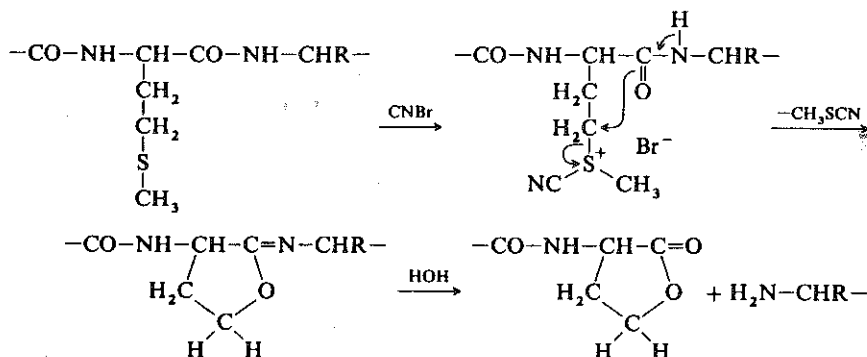


Φυσικά η παράπλευρη αλυσίδα της τυροσίνης δεν είναι αδρανής ως προς το Ν-βρωμο-ηλεκτριμίδιο και επηρεάζονται επίσης σε κάποιο βαθμό και τα αμινοξέα της ιστιδίνης. Ένα πιο εκλεκτικό αντιδραστήριο για τη διάσπαση της τρυπτοφάνης ερευνήθηκε και βρέθηκε στο παράγωγο του σκατολίου



σαν άλλη πηγή του θετικά φορτισμένου ιόντος βρωμίου. Προτάθηκε επίσης οξειδωτική διάσπαση π.χ. με ο-ιωδοξοβενζοϊκό οξύ (Fontana et al. 1983).

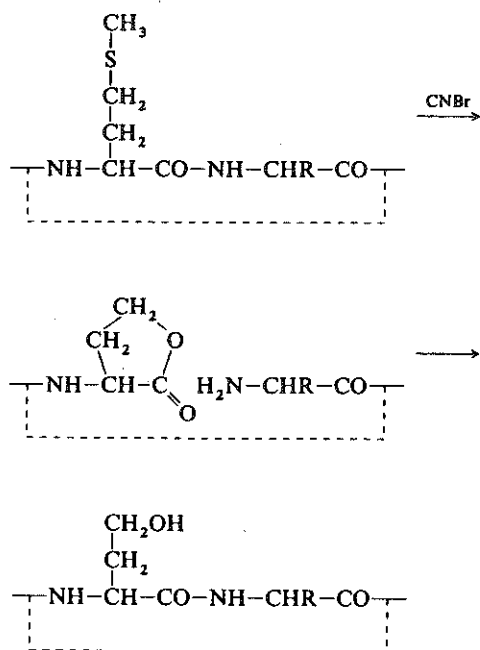
Μια ανάλογη διάσπαση της πεπτιδικής αλυσίδας συμβαίνει όταν πεπτίδια που περιέχουν μεθειονίνη εκτίθενται στη δράση του βρωμιούχου κυανίου:



Η διάσπαση που προκαλείται από το βρωμιούχο κυάνιο είναι εξαιρετικά εκλεκτική (Gross και Witkop 1962) και ασήμαντες μόνον παράπλευρες αντιδράσεις συνοδεύουν την αντίδραση. Γι'αυτό είναι κατανοητό ότι όταν βρεθεί από την ανάλυση μεθειονίνη, είναι δυνατόν να εφαρμοσθεί η παραπάνω μέθοδος. Πρέπει εντούτοις να διατυπωθεί η εξής επιφύλαξη. Η λακτόνη της ομοσερίνης που σχηματίστηκε κατά την αντίδραση δεν είναι αδρανής ως προς τα πυρηνόφιλα και μπορεί να δράσει σαν ακυλιωτικό μέσον εάν υπάρχουν αμίνες. Μια επανασύνθεση του πεπτιδικού δεσμού που διασπάστηκε με βρωμιούχο κυάνιο είναι ως επί το πλείστον αμελητέα, αλλά εάν τα δύο νεοδημιουργηθέντα πεπτιδικά τμήματα συγκρατούνται μαζί με ένα δισουλφιδικό δεσμό ή με ένα συνδυασμό δυνάμεων όπως ιονικές δυνάμεις, δεσμούς υδρογόνου ή μη πολικές αλληλεπιδράσεις, τότε μπορεί να συμβεί μια διαμοριακή ή σχεδόν διαμοριακή

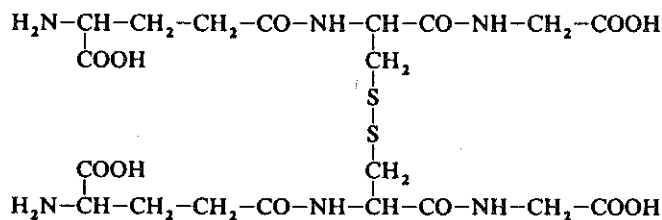
34 Προσδιορισμός της Αλληλουχίας των Αμινοξέων

αντίδραση που θα δώσει μια αλυσίδα, στην οποία το αμινοξύ της μεθειονίνης του μητρικού μορίου έχει αντικατασταθεί από ομοσερίνη

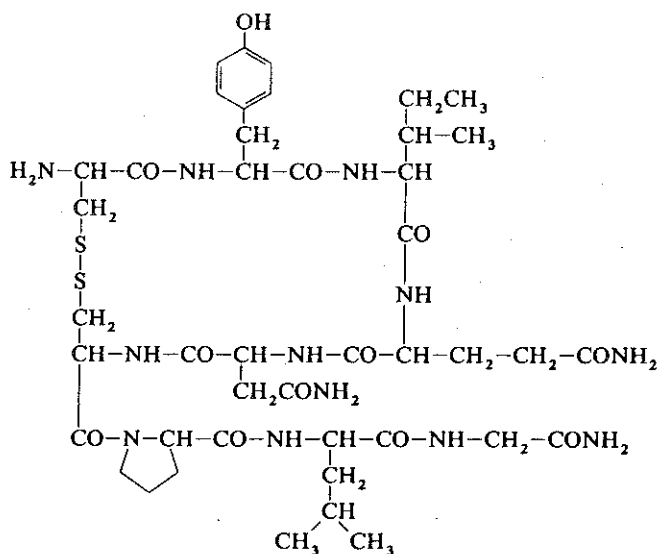


3. Διάσπαση των Δισουλφιδίων

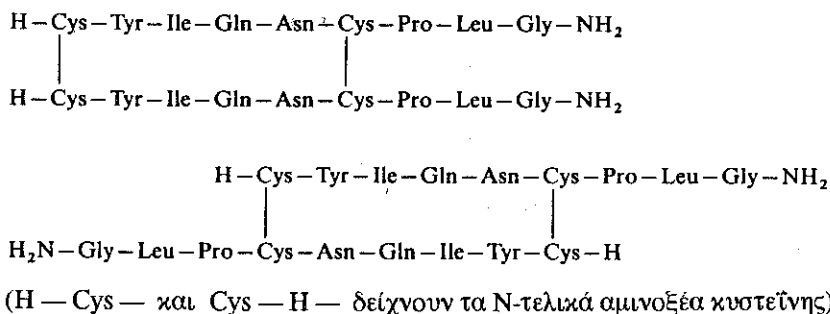
Τα πεπτίδια που περιέχουν κυστεΐνη χρειάζονται έναν ιδιαίτερο χειρισμό πριν από τον προσδιορισμό της αλληλουχίας. Ακόμη και αν αρχικά υπήρχαν ελεύθερες σουλφυδρικές ομάδες, έκθεση στον αέρα τις μετατρέπει σε δισουλφίδια, τα οποία στη συνέχεια περιπλέκουν την εξήγηση των αποτελεσμάτων κατά τον προσδιορισμό της αλληλουχίας. Εάν ένα μόνον αμινοξύ κυστεΐνης υπάρχει σε ένα μόριο, όπως για παράδειγμα στην οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης, τότε συνδέονται δύο όμοιες αλυσίδες μέσω μιας δισουλφιδικής γέφυρας



Σε πεπτίδια που περιέχουν δύο κυστεΐνες σχηματίζεται με ενδομοριακή αντίδραση ένα κυκλικό δισουλφίδιο, σαν αυτό που βρέθηκε στην οξυτοκίνη



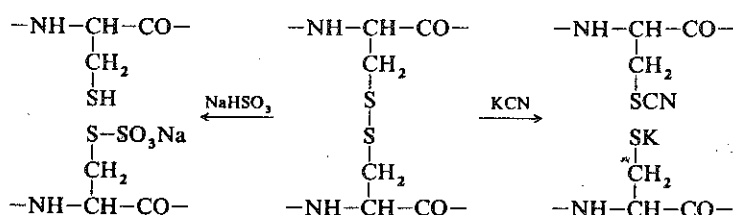
Οξείδωση εντούτοις της αλυσίδας σε διαλύματα υψηλότερης συγκέντρωσης παράγει μέσω διαμοριακής αντίδρασης δύο διμερή, ένα παράλληλο και ένα αντιπαράλληλο



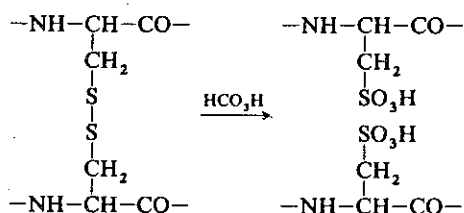
και επίσης ολιγομερή, στα οποία τρεις ή περισσότερες αλυσίδες συνδέονται μαζί μέσω δισουλφιδικών γεφυρών.

Στην ινσουλίνη υπάρχουν (βλ. Πίνακας 3, σελ.7) δισουλφιδικές γέφυρες και μεταξύ των διαφορετικών αλυσίδων και στην ίδια αλυσίδα και είναι προφανές ότι για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των δύο αλυσίδων πρέπει να προηγηθεί ο διαχωρισμός τους.

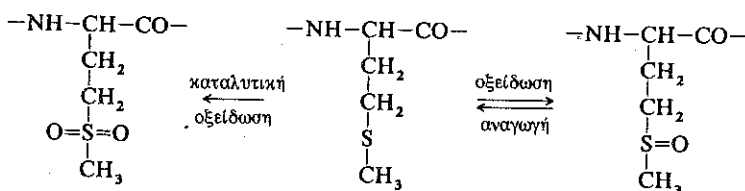
Υπάρχει μια εκπληκτικά πλούσια επιλογή μεθόδων, με τις οποίες μπορούν να διασπασθούν τα δισουλφίδια, για παράδειγμα με μια ήπια αντίδραση με κυανιούχο κάλιο ή με όξινο θειώδες νάτριο,



αλλά κατά τον προσδιορισμό της δομής εφαρμόζονται μόνον η οξείδωση και η αναγωγή. Κατεργασία του μυρμηκικού οξέος με υπεροξείδιο του υδρογόνου εν ψυχρώ δημιουργεί υπερμυρμηκικό οξύ, το οποίο διασπά το δισουλφιδικό δεσμό της κυστίνης των πεπτιδίων με σχηματισμό δύο παραγώγων κυστεϊκού οξέος:



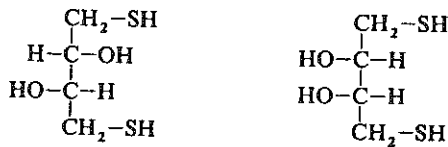
Ένα σοβαρό μειονέκτημα της κατά τα άλλα απλής και κατευθείαν μεθόδου διαχωρισμού των αλυσίδων είναι η καταστροφή των παράπλευρων αλυσίδων της τυροσίνης και της τρυπτοφάνης κατά την πορεία. Συμβαίνει επίσης οξείδωση των αμινοξέων της μεθειονίνης προς τα αντίστοιχα σουλφοξείδια, αλλά είναι αντιστρεπτή. Παρουσία όμως προσμίξεων βαρέων μετάλλων μπορεί να συμβεί μη αντιστρεπτή οξείδωση προς σουλφόνες



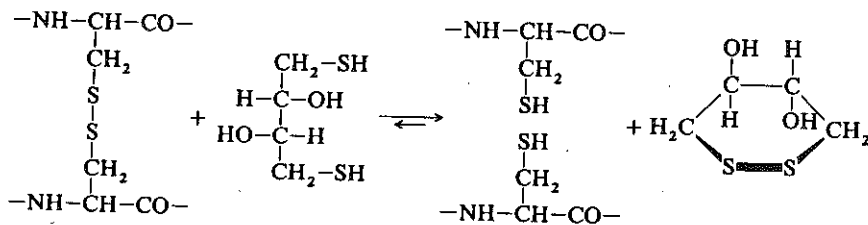
Οι πολύπλοκοι αυτοί παράγοντες δεν καθιστούν τη μέθοδο του υπερμυρμηκικού οξέος μη εφαρμόσιμη στην πράξη, αλλά πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την εξήγηση των αποτελεσμάτων της αποικοδόμησης που ακολουθεί.

Πολύαριθμα αναγωγικά μέσα έχουν εφαρμοσθεί για τη διάσπαση των δισουλφιδίων των πεπτιδίων. Χρησιμοποιήθηκαν για αναγωγή νάτριο σε υγρή αμμωνία, κυστεΐνη, 2-μερκαπτοαιθυλαμίνη (κυστεαμίνη), υδρίδια του βορίου και τριαλκυλοφωσφίνες και για παρασκευαστικούς και για αναλυτικούς σκοπούς. Στις μελέτες αποικοδόμησης είναι

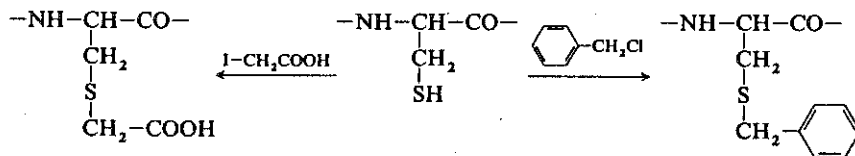
αρκετά χρήσιμα τα δύο αντιδραστήρια του Cheland (1964), διθειοθρεϊτόλη και διθειοερυθρίτολη



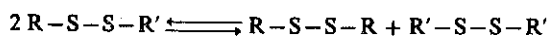
Η χρησιμότητά τους προκύπτει από τη μετατόπιση της ισορροπίας που οφείλεται στη σταθερότητα των κυκλικών δισουλφιδίων που σχηματίζονται από τα αντιδραστήρια



Εφόσον η έκθεση στον αέρα μετατρέπει ξανά τις σουλφυδρυλικές ομάδες σε δισουλφίδια, οι ανοιγμένοι τύποι συνήθως σταθεροποιούνται με αλκυλίωση με βενζυλοχλωρίδιο ή με ιωδοοξικό οξύ



Τελικά, για τον πλήρη προσδιορισμό της δομής χρειάζεται επίσης να βρεθούν οι θέσεις των δισουλφιδικών γεφυρών, εάν υπάρχουν περισσότερες από μία. Η μερική υδρόλυση μπορεί να δώσει κομμάτια με μια άθικτη δισουλφιδική γέφυρα. Κατά την πορεία δε θα έπρεπε να παραβλεφθεί η πιθανότητα της δισουλφιδικής μετάθεσης



η οποία καταλύεται από ίχνη μερκαπτανών και επίσης από κυανιούχα και όξινα ανθρακικά ιόντα. Η δισουλφιδική αντίδραση εναλλαγής έχει μια τάση για σχηματισμό συμμετρικών δισουλφιδίων.

Αναφορές

- Akabori, S., Ohno, K., Narita, K.: *Bull. Chem. Soc. Japan* 25, 214 (1952)
 Bergmann, M., Miekeley, A., Kann, E.: *Liebigs Ann. Chem.* 458, 30 (1927)
 Bodanszky, M., Ondetti, M.A., Levine, S.D., Williams, N.J.: *J. Amer. Chem. Soc.* 89, 6753 (1967)
 Cleland, W.W.: *Biochemistry* 3, 480 (1964)
 Dakin, H.D., West, R.: *J. Biol. Chem.* 78, 91, 745, 757 (1928)
 Edman, P.: *Acta Chem. Scand.* 4, 283 (1950)
 Edman, P., Begg, G.: *Eur. J. Biochem.* 1, 80 (1967)
 Fromageot, C., Jutisz, M., Mayer, D., Penasse, L.: *Biochem. Biophys. Acta* 6, 283 (1950)
 Fontana, A., Dalzoppo, D., Grandi, C., Zamboni, M. in *Methods in Enzymology*, Vol. 91 (Hirs, C.W.H. and Timasheff, S.N. eds.) Academic Press, New York 1963, p. 311
 Gray, W.R., Hartley, B.S.: *Biochem. J.* 89, 59P, 379 (1963)
 Gross, E., Witkop, B.: *J. Biol. Chem.* 237, 1856 (1962)
 Mutt, V., Jorpes, J.E., Magnusson, S.: *Eur. J. Biochem.* 15, 513 (1970)
 Sanger, F.: *Biochem. J.* 39, 507 (1945)

Περαιτέρω βιβλιογραφία

- Greenstein, J.P. and Winitz, M., *Sequential Analysis of Peptides in Chemistry of the Amino Acids*, pp. 1512-1687 New York, J. Wiley and Sons 1961
 Gray, W.R., Dansyl Chloride Procedure in *Methods of Enzymology*, Vol. 11 (Hirs, C.H.E., ed) pp. 139-151, New York, Acad. Press 1967
 Ambler, R.A.: *Enzymic Hydrolysis with Carboxypeptidase*, *ibid.* pp. 155-156

Αναφορές

- Akabori, S., Ohno, K., Narita, K.: *Bull. Chem. Soc. Japan* 25, 214 (1952)
Bergmann, M., Miekeley, A., Kann, E.: *Liebigs Ann. Chem.* 458, 40 (1927)
Bodanszky, M., Ondetti, M.A., Levine, S.D., Williams, N.J.: *J. Amer. Chem. Soc.* 89, 6753 (1967)
Cleland, W.W.: *Biochemistry* 3, 480 (1964)
Dakin, H.D., West, R.: *J. Biol. Chem.* 78, 91, 745, 757 (1928)
Edman, P.: *Acta Chem. Scand.* 4, 283 (1950)
Edman, P., Begg, G.: *Eur. J. Biochem.* 1, 80 (1967)
Fromageot, C., Jutisz, M., Mayer, D., Penasse, L.: *Biochem. Biophys. Acta* 6, 283 (1950)
Fontana, A., Dalzoppo, D., Grandi, C., Zamboni, M. in *Methods in Enzymology*, Vol. 91 (Hirs, C.W.H. and Timasheff, S.N. eds.) Academic Press, New York 1983, p. 311
Gray, W.R., Hartley, B.S.: *Biochem. J.* 89, 59P, 379 (1963)
Gross, E., Witkop, B.: *J. Biol. Chem.* 237, 1856 (1962)
Mutt, V., Jorpes, J.E., Magnusson, S.: *Eur. J. Biochem.* 15, 513 (1970)
Sanger, F.: *Biochem. J.* 39, 507 (1945)

Περαιτέρω βιβλιογραφία

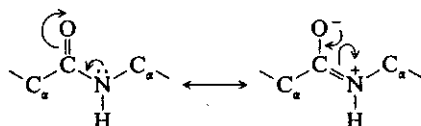
- Greenstein, J.P. and Winitz, M., *Sequential Analysis of Peptides in Chemistry of the Amino Acids*, pp. 1512-1687 New York, J. Wiley and Sons 1961
Gray, W.R., Dansyl Chloride Procedure in *Methods of Enzymology*, Vol. 11 (Hirs, C.H.E., ed) pp. 139-151, New York, Acad. Press 1967
Ambler, R.A.: *Enzymic Hydrolysis with Carboxypeptidase*, *ibid.* pp. 155-156

IV. Δευτεροταγής και τριτοταγής Σύνταξη

A. Αρχιτεκτονικά Χαρακτηριστικά των Πεπτιδίων

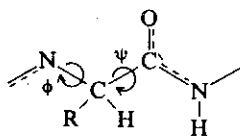
1. Ο Πεπτιδικός Δεσμός

Ο δεσμός μεταξύ του ατόμου άνθρακα της καρβονυλικής ομάδας και του αμιδικού αζώτου έχει εν μέρει χαρακτήρα διπλού δεσμού, που μπορεί να αποδοθεί στο συντονισμό:



Επομένως, τα καρβονυλικά άτομα άνθρακα και οξυγόνου, το αμιδικό άζωτο και το υδρογόνο και τα δύο παρακείμενα α -άτομα άνθρακα κείνται κατά προσέγγιση στο ίδιο επίπεδο. Πειραματικές αποδείξεις, κυρίως από κρυσταλλογραφία ακτίνων X, υποστηρίζουν το γεγονός αυτό για τα έξι άτομα του πεπτιδικού σκελετού και δείχνουν επίσης μια σχετικά μικρή απόσταση μεταξύ του καρβονυλικού άνθρακα και του αζώτου. Το καρβονυλικό οξυγόνο και το αμιδικό υδρογόνο βρίσκονται σε αντίθετες θέσεις ως προς τον (εν μέρει) διπλό δεσμό, τουλάχιστον στους περισσότερους πεπτιδικούς δεσμούς. Η *cis* διάταξη είναι λιγότερο σταθερή και αφού υπάρχει ένα αξιοσημείωτο φράγμα ενέργειας μεταξύ των *cis* και *trans* μορφών, γενικά επικρατεί η *trans* μορφή.

Ο εν μέρει χαρακτήρας διπλού δεσμού κάθε τρίτου δεσμού του πεπτιδικού σκελετού θα μπορούσε να προκαλέσει κάποιο περιορισμό των πιθανών γεωμετριών της αλυσίδας, αλλά αυτός μόνος του δεν είναι ικανός να προσδιορίζει την πιθανή διαμόρφωση. Μια πλήρως καθορισμένη αρχιτεκτονική χρειάζεται περαιτέρω περιοριστικούς παράγοντες και τέτοιοι μπορούν να βρεθούν με τον περιορισμό της περιστροφής γύρω από τους δεσμούς N—C α και C α —C. Αρνητικές (απωθητικές) αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παράπλευρων αλυσίδων των γειτονικών αμινοξέων εμποδίζουν την ελεύθερη περιστροφή γύρω από αυτούς τους δεσμούς και οι διέδρες γωνίες Φ και Ψ , που αντιστοιχούν στην περιστροφή εκτός του επιπέδου γύρω από τους δεσμούς N—C α και C α —C αντιστοίχως



μπορούν να πάρουν μόνον ορισμένες τιμές. Οι επιτρεπόμενες γωνίες υπολογίσθηκαν (Ramachandran et al. 1963) και παρουσιάζονται σε "διαγράμματα Ramachandran". Οι προβλέψεις αυτές και τα αντίστοιχα διαγράμματα επιβεβαιώθηκαν με πολλές μελέτες πεπτιδίων και πρωτεϊνών με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ.

2. Δευτεροταγής Σύνταξη.

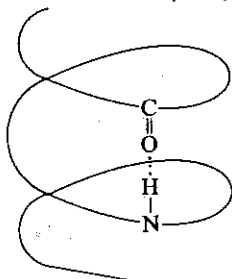
Η πολικότητα της καρβονυλικής ομάδας έχει σαν αποτέλεσμα την ύπαρξη κλασματικού αρνητικού φορτίου στο άτομο του οξυγόνου, γιατί αυτό είναι πιο ηλεκτραρνητικό από το άτομο άνθρακα. Στο δεσμό N-H της αμιδικής ομάδας το άζωτο είναι το πιο ηλεκτραρνητικό άτομο, έτσι ένα κλασματικό θετικό φορτίο υπάρχει στο υδρογόνο. Εάν οι ομάδες CO και NH βρίσκονται σε επαρκή προσέγγιση, μια θετική (ελκτική) αλληλεπίδραση έχει σαν αποτέλεσμα έναν "δεσμό υδρογόνου", στον οποίο ένα από τα ασύζευκτα ζεύγη ηλεκτρονίων του ατόμου οξυγόνου προκαλεί τη δημιουργία ενός ασθενούς δεσμού



της τάξεως λίγων Kcal ανά mole. Στο δεσμό υδρογόνου το άτομο υδρογόνου ανήκει, σε κάποιο βαθμό, και στα δύο ηλεκτραρνητικά άτομα. Εκτός από το οξυγόνο και το άζωτο επίσης τα άτομα του θείου και του φθορίου μπορούν να δώσουν δεσμούς υδρογόνου. Οι δεσμοί υδρογόνου έχουν μεγάλη σημασία για την τρισδιάστατη δομή πεπτιδίων και πρωτεϊνών. Το συσσωρευμένο αποτέλεσμα πολλών ασθενών ελκτικών δυνάμεων κατά μήκος του πεπτιδικού σκελετού δημιουργεί καλώς καθορισμένες γεωμετρίες και οι δομές που σταθεροποιούνται από δεσμούς υδρογόνου καλούνται "δευτεροταγής σύνταξη".

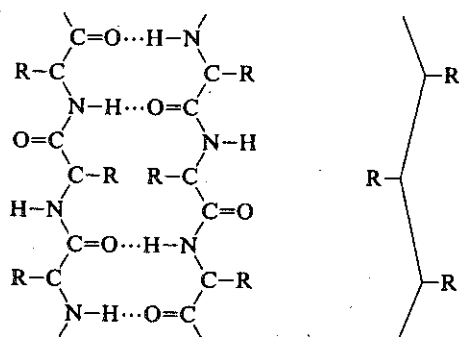
Παλιότερες μελέτες των Pauling, Corey και Branson (1951) που περιλαμβάνουν μελέτες δομής με ακτίνες Χ μικρών πεπτιδίων και πειραματισμοί με μοριακά μοντέλα είχαν σαν αποτέλεσμα την πρόβλεψη αρκετών γεωμετρικών μοντέλων των πρωτεϊνών. Από αυτά η α-έλικα και τα β-φύλλα βρέθηκαν ακολούθως σαν κύρια αρχιτεκτονικά χαρακτηριστικά σε πολυάριθμες πρωτεΐνες. Πιο πρόσφατα αναφέρθηκαν επίσης οι λεγόμενες δομές "στροφών" (στροφές "φουρκέτας", γ-στροφές) (Venkatachalam 1968), οι οποίες αναγνωρίσθηκε μετά ότι συνεισφέρουν στη διαμόρφωση πεπτιδίων και πρωτεϊνών.

Η α-έλικα έχει μια σπειροειδή δομή που σταθεροποιείται με ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των καρβονυλικών οξυγόνων και των αμιδικών αζώτων που βρίσκονται κατά τέσσερα αμινοξέα μακριά:

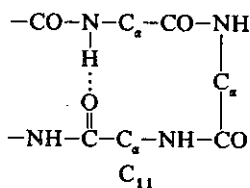
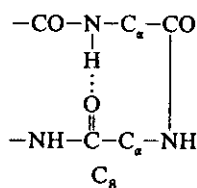
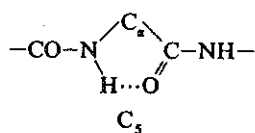


Οι δεσμοί υδρογόνου είναι παράλληλοι ως προς τον άξονα της έλικας και κλείνουν ένα δακτύλιο 14 ατόμων συμπεριλαμβανομένου και του υδρογόνου. Υπάρχουν έτσι 3,6 αμινοξέα σε κάθε στροφή της έλικας, της οποίας το βήμα (απόσταση μεταξύ των στροφών) είναι 5,4 Å. Επομένως μια απόσταση $5,4:3,6 = 1,5$ Å παρατηρήθηκε με μεθόδους περιθλάσεων ακτίνων Χ κόνεων ορισμένων ελικοειδών πολυαμινοξέων και επίσης πρωτεϊνών με υψηλό ποσοστό έλικας. Αυτό σημαίνει ότι οι ίδιες ομάδες (CO, NH) υπάρχουν κατ'επανάληψη με μια απόσταση 1,5 Å μεταξύ ομοίων ομάδων. Θα έπρεπε όμως να αναφερθεί ότι υπάρχουν και αρκετές άλλες, λιγότερο συχνά συναντώμενες έλικες, με διαφορετικές διαστάσεις. Για παράδειγμα υπάρχει μια επιμηκυσμένη έλικα στην πολυπρολίνη και στην πλούσια σε προλίνη πρωτεΐνη, το κολλαγόνο.

Πεπτιδικές αλυσίδες (ή δύο τμήματα από την ίδια αλυσίδα) που συνδέονται μεταξύ τους με πολλαπλούς δεσμούς υδρογόνου σχηματίζουν τα λεγόμενα β -φύλλα. Οι αλυσίδες που συμμετέχουν μπορεί να είναι παράλληλες ή αντιπαράλληλες μεταξύ τους. Το σχήμα περιλαμβάνει ένα αντιπαράλληλο φύλλο και μια τομή κατά μήκος του επιπέδου του φύλλου, που δείχνει τον πτυχωτό του χαρακτήρα



Στις στροφές η απότομη αλλαγή της κατεύθυνσης του πεπτιδικού σκελετού σταθεροποιείται με έναν ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου μεταξύ ενός καρβονυλικού οξυγόνου και ενός γειτονικού αμιδικού αζώτου. Ο δακτύλιος που σχηματίζεται έτσι μπορεί να περιέχει 5 ή 8 ή 11 κλπ. άτομα και επομένως η δομή υποδηλώνεται σαν C_5 ή C_8 ή C_{11} κλπ.:



Εάν ένα από τα αμινοξέα σε μια στροφή έχει διαφορετική διαμόρφωση από εκείνη των άλλων αμινοξέων, τότε ο σχηματιζόμενος δεσμός υδρογόνου είναι πιο σταθερός. Στις πρωτεΐνες και στα περισσότερα βιολογικώς ενεργά πεπτίδια (τα οποία είναι συνήθως υδρολυτικά παράγωγα των πρωτεϊνών) υπάρχουν μόνον L-αμινοξέα, αλλά σε μικροβιακά πεπτίδια υπάρχουν και D-αμινοξέα αρκετά συχνά. Γι'αυτό δεν είναι παράξενο που τα περισσότερα από αυτά έχουν κυκλική σύνταξη, επειδή το κλείσιμο του δακτυλίου εννοείται πολύ από τις στροφές.

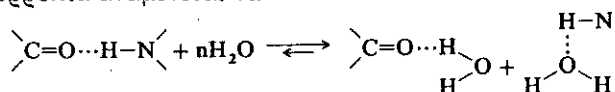
Η σταθεροποίηση της δομής με πολλαπλούς δεσμούς υδρογόνου είναι ένα *συνεργατικό φαινόμενο*. Η διάσπαση ενός μόνο δεσμού υδρογόνου δεν είναι αρκετή για να προκαλέσει αποσταθεροποίηση, αλλά η δευτεροταγής δομή καταστρέφεται εάν διασπασθεί ένα μεγάλο μέρος των δεσμών υδρογόνου. Εάν προστεθούν στο υδατικό διάλυμα των πεπτιδίων ή πρωτεϊνών ενώσεις όπως η ουρία ή άλατα γουανιδίνης, τα οποία είναι ικανά να ανταγωνισθούν για τους ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου η δευτεροταγής δομή καταστρέφεται. Η αλλαγή δε συμβαίνει βαθμιαία, αλλά σε μια συγκεκριμένη συγκέντρωση π.χ. της ουρίας γίνεται μια ξαφνική καταστροφή, η δομή "τήκεται".

3. Τριτοταγής Σύνταξη.

Το δίπλωμα μιας πεπτιδικής αλυσίδας καλείται τριτοταγής σύνταξη. Οι σταθεροποιούμενες με δεσμό υδρογόνου στροφές μπορεί να συνεισφέρουν στο δίπλωμα, αλλά δεν είναι η πρωτεύουσα αιτία του. Ένας πιο σημαντικός παράγοντας διπλώματος αναγνωρίστηκε στις *μη πολικές αλληλεπιδράσεις*, που συχνά περιγράφεται σαν "*υδρόφοβος δεσμός*" (Kauzmann 1959).

Όταν πλησιάζουν μεταξύ τους ογκώδεις παράπλευρες αλυσίδες αλειφατικών ή αρωματικών αμινοξέων θα περιμέναμε μια αρνητική αλληλεπίδραση (άπωση) μεταξύ τους. Σε υδατικά διαλύματα, εντούτοις, παρατηρείται μια θετική αλληλεπίδραση (έλξη), η οποία μπορεί να εξηγηθεί με την απομάκρυνση μορίων νερού από τον κλωβό που σχηματίζεται από τις μη πολικές περιοχές. Μέσα σε έναν τέτοιον κλωβό τα μόρια του νερού συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ τους, αλλά προφανώς όχι με τις περιβάλλουσες μη πολικές παράπλευρες αλυσίδες των αμινοξέων. Τα μόρια αυτά του νερού βρίσκονται ως εκ τούτου, σε μια πολύ οργανωμένη κατάσταση και η οργάνωση μπορεί να αυξηθεί εάν εξέλθουν από τον κλωβό για να ενωθούν με τα άλλα μόρια του νερού που βρίσκονται έξω. Αφού το τελικό αποτέλεσμα είναι η μείωση της τάξεως (αύξηση της εντροπίας) οι μη πολικές παράπλευρες αλυσίδες συγκατοούνται μεταξύ τους με έναν "υδρόφοβο δεσμό".

Η σημασία των μη πολικών αλληλεπιδράσεων δεν πρέπει να υπερτονισθεί. Οι δεσμοί υδρογόνου που σταθεροποιούν τις δευτεροταγείς συντάξεις δε θα υπήρχαν σε υδατικά διαλύματα πεπτιδίων και πρωτεϊνών. Παρουσία μεγάλου αριθμού μορίων νερού η ισορροπία αναμένεται να

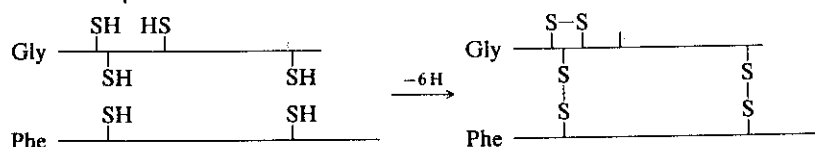


μετατοπισθεί προς τα δεξιά και οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ καρβονυλικών ανθράκων και αμιδικών αζώτων να διασπασθούν. Ακόμη, οι μη πολικές αλληλεπιδράσεις δημιουργούν "υδρόφοβα θυλάκια", στα οποία δεν υπάρχει ανταγωνισμός μορίων νερού

για τους δεσμούς υδρογόνου.

Στη μια πλευρά της έλικας βρίσκονται τυπικά μη πολικά αμινοξέα με τις παρά-πλευρες αλυσίδες τους σε επαφή με άλλα υδρόφοβα αμινοξέα που βρίσκονται παρακάτω κατά μήκος του πεπτιδικού σκελετού. Οι ελκτικές δυνάμεις μεταξύ τέτοιων μη πολικών ομάδων οδηγούν σ'ένα γενικό δίπλωμα της αλυσίδας που αποτελεί την "τριτοταγή της σύνταξη". Η υδρόφοβη περιοχή που δημιουργήθηκε από τις μη πολικές αλληλεπιδράσεις μέσα στο δίπλωμα συνεισφέρει στη σταθερότητα της έλικας. Έτσι οι εκφράσεις "δευτεροταγής σύνταξη" και "τριτοταγής σύνταξη" θα μπορούσαν να αντικατασταθούν από τον όρο "δευτεροταγής-τριτοταγής σύνταξη". Αυτή η αλληλεξάρτηση των δύο ειδών συντάξεων εκτείνεται και σε άλλες σταθεροποιούμενες από δεσμούς υδρογόνου συντάξεις, τα β-φύλλα καθώς και στις στροφές. Εντούτοις σταθεροποίηση της δευτεροταγούς δομής με μη πολικές αλληλεπιδράσεις μπορεί να γίνει επίσης και χωρίς δίπλωμα. Έτσι, οι υδρόφοβοι δεσμοί βρίσκονται όχι μόνον μεταξύ δύο τμημάτων της ίδιας αλυσίδας, αλλά επίσης μεταξύ δύο ξεχωριστών αλυσίδων. Περαιτέρω η ενδομοριακή σταθεροποίηση μπορεί να επηρεασθεί και από άλλα μόρια εκτός των πεπτιδίων. Σε πολυάριθμα πεπτίδια οι έλικες δημιουργούνται με προσθήκη αναμιγνύμενων με το νερό αλκοολών, όπως μεθανόλης, αιθανόλης, ισοπροπανόλης, τετ-βουτανόλης, χλωροαιθανόλης και ιδιαίτερα τριφθοροαιθανόλης ή εξαφθοροϊσοπροπανόλης σε υδατικά τους διαλύματα. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν με προσθήκη απορρυπαντικών. Αυτά τα φαινόμενα μπορούν να εξηγηθούν με την αντικατάσταση του νερού από την περιοχή των αμιδικών ομάδων και την εξάλειψη επομένως του ανταγωνισμού για τους δεσμούς υδρογόνου.

Ο ρόλος των δισουλφιδίων στον προσδιορισμό της τριτοταγούς σύνταξης είναι λιγότερο σημαντικός από ότι φαίνεται αρχικά. Η αρχιτεκτονική των πεπτιδίων και πρωτεϊνών προσδιορίστηκε αρχικά από τις αλληλεπιδράσεις των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων που είναι γειτονικά στον πεπτιδικό σκελετό και από τα μακρινής απόστασης συνεργατικά φαινόμενα των μη πολικών αλληλεπιδράσεων. Τα δισουλφίδια σχηματίζονται απλώς μεταξύ των σουλφυδρυλικών ομάδων, οι οποίες ήδη πλησιάζουν μεταξύ τους. Αυτό αποδείχθηκε εντυπωσιακά κατά την αναγωγή και επανοξείδωση των ριβονουκλεασών (White 1961). Αντί για το σχηματισμό πολυάριθμων δισουλφιδίων διαφορετικών από αυτά που υπάρχουν στο μητρικό μόριο, αποκαταστάθηκαν τα αρχικά δισουλφίδια και το ένζυμο αναγεννήθηκε με πλήρη βιολογική δραστικότητα. Επίσης, τυχαία οξείδωση των έξι σουλφυδρυλικών ομάδων στις δύο ξεχωριστές αλυσίδες της ινσουλίνης θα παρήγαγε ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών μορίων, αλλά εάν πριν από την οξείδωση οι δύο αλυσίδες αφεθούν πρώτα να αλληλεπιδράσουν σε υδατικό διάλυμα, τότε σχηματίζονται κυρίως οι τρεις δισουλφιδικές γέφυρες που είναι χαρακτηριστικές για την ινσουλίνη



και το κύριο προϊόν είναι η ινσουλίνη

Ένας παρόμοιος περιοριστικός ρόλος μπορεί να αποδοθεί στις πολικές (coulombic) αλληλεπιδράσεις. Ο σχηματισμός ζεύγους ιόντων μεταξύ βασικών και όξινων

παράπλευρων αλυσίδων παρατηρείται αρκετά συχνά στα πεπτίδια και τις πρωτεΐνες. Αυτές οι "γέφυρες αλάτων" όμως δεν είναι οι πρωταρχικοί παράγοντες που προσδιορίζουν την αρχιτεκτονική. Για παράδειγμα στη σεκρετίνη (βλ. σελ. 7) μπορούν να διακριθούν δύο ζεύγη ιόντων, αλλά σε συνθετικά ανάλογα με μόνον ένα ή και κανένα ζεύγος δε μεταβάλλεται χονδρικά ή αρχική γεωμετρία του μορίου. Επομένως, η συνεισφορά των δισουλφιδικών γεφυρών και των ζευγών ιόντων στον τελικό προσδιορισμό της δομής των πεπτιδίων συνίσταται κυρίως στην παροχή στερεότητας της ήδη υπάρχουσας αρχιτεκτονικής.

4. Τεταρτοταγής Σύνταξη

Η έκφραση "τεταρτοταγής σύνταξη" χρησιμοποιείται συνήθως μόνον για πρωτεΐνες. Τα μεγάλα τους μόρια που περιέχουν εκατοντάδες ή και περισσότερα ομοιοπολικώς συνδεδεμένα αμινοξέα μπορούν να συσσωματωθούν σε ακόμη μεγαλύτερες συντάξεις, στις οποίες δύο ή περισσότερες "υπομονάδες" συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου και πολικές ή μη πολικές αλληλεπιδράσεις. Αυτό το είδος της συσσωμάτωσης είναι γνωστό στη μυογλοβίνη, την αιμογλοβίνη και σε πολυάριθμα ένζυμα όλα σφαιρικές πρωτεΐνες. Φαίνεται ότι τουλάχιστον μερικά πεπτίδια έχουν ομοίως τάση για αυτο-συσσωμάτωση. Έτσι η ινσουλίνη κρυσταλλώνει με μορφή ενός εξαμερούς που αποτελείται από ομοιοπολικώς προκύπτοντα μόρια, ενώ βρέθηκε ένα τριμερές με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ στο γλυκαγόνο (Η πρωτοταγής σύνταξη της ινσουλίνης και του γλυκαγόνου φαίνονται στη σελ. 7). Και στις δύο ορμόνες η αυτο-συσσωμάτωση συνοδεύεται από μεγάλες δομικές αλλαγές. Σε αραιά υδατικά διαλύματα ούτε η ινσουλίνη ούτε το γλυκαγόνο δείχνουν μεγάλο ελικοειδή χαρακτήρα, αλλά μόρια με υψηλό ποσοστό έλικας υπάρχουν στους κρυστάλλους. Οι νεοσχηματισμένες ελικοειδείς δομές είναι συνέπεια των υδρόφοβων δεσμών μεταξύ των υπομονάδων και της προκύπτουσας εκτόπισης του νερού. Το γλυκαγόνο έχει μια γενική τάση αυτο-συσσωμάτωσης. Κάτω από ορισμένες συνθήκες εμφανίζονται β-συντάξεις σε διάλυμα και η συσσωμάτωση μπορεί να γίνει στο σημείο όπου ξεχωρίζουν αδιάλυτες λεπτές ίνες. Ο σχηματισμός λεπτών ινών είναι επίσης γνωστός και για την ινσουλίνη.

Η αυτοσυσσωμάτωση φαίνεται ότι έχει σχέση με το βαθμό της δομικής ελευθερίας. Μικρότερα πεπτίδια με καλώς καθορισμένη αρχιτεκτονική, όπως η οξυτοκίνη δεν έχουν παρατηρηθεί σε συσσωματωμένες μορφές. Από την άλλη πλευρά πολλά ογκώδη ενδιάμεσα παράγωγα της πεπτιδικής σύνθεσης παρουσιάζουν μεγάλη δυσδιαλυτότητα σε οργανικούς διαλύτες, εξαιτίας της τάσης τους για συσσωμάτωση με τη μορφή των β-φύλλων (Tonolo et al, 1985).

B. Μέθοδοι Ανάλυσης της Δομής των Πεπτιδίων

Τα ηλεκτρονικά φάσματα δίνουν αξιόπιστες πληροφορίες για την παρουσία ή απουσία χρωμοφόρων και δραστικών ομάδων, αλλά έχουν μάλλον περιορισμένη εφαρμογή για τη διευκρίνηση της τρισδιάστατης δομής των πεπτιδίων. Η φασματοσκοπία υπερύθρου έχει εφαρμοσθεί για την ανίχνευση ελίκων και β-φύλλων, όμως τα φάσματα έχουν συνήθως σημασία μόνον όταν τα μόρια είναι οργανωμένα, όπως για παράδειγμα σε εκτεταμένα φίλμς των πολυαμινοξέων. Η έκταση των ερευνών διευρύνθηκε με την

ανακάλυψη της φασματοσκοπίας laser-Raman. Η απορρόφηση στο υπεριώδες είναι ομοίως μια περιορισμένη πηγή πληροφοριών για την αρχιτεκτονική των πεπτιδίων. Τα φάσματα διαφοράς μπορούν να αποκαλύψουν μικρές μετατοπίσεις του μέγιστου απορρόφησης της τυροσίνης σε πρωτεΐνες στις οποίες τα χρωμοφόρα διαταράσσονται από την προσέγγιση αμινοξέων που βρίσκονται μακριά κατά μήκος της πεπτιδικής αλυσίδας, αλλά πλησιάζουν με δίπλωμα της αλυσίδας. Τα φάσματα διαφοράς δεν εφαρμόζονται συνήθως για μικρά μόρια πεπτιδίων. Μια πιο παραγωγική προσέγγιση στην ανάλυση της δομής των πεπτιδίων είναι η φασματοσκοπία φθορισμού. Μεταξύ των είκοσι αμινοξέων που είναι συστατικά των πρωτεϊνών μόνον τρία η φαινυλαλανίνη, η τυροσίνη και η τρυπτοφάνη εκπέμπουν φθορίζον φως, αλλά τα πεπτίδια που στερούνται "εγγενούς φθορισμού" (intrinsic fluorescence) μπορούν να τον αποκτήσουν με "εξωγενή φθορισμό" (extrinsic fluorescence) με υποκατάσταση με κατάλληλες ομάδες, για παράδειγμα με κατεργασία με φλουορεσκαμίνη (βλ. σελ. 15) ή με το χλωρίδιο του 5-διμεθυλαμινοναφθαλινο-2-σουλφονικού οξέος (βλ. σελ. 18). Η μέτρηση της κβαντικής απόδοσης φθορισμού επιτρέπει την εξαγωγή συμπερασμάτων για τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις και οι μελέτες ελάττωσης του φθορισμού μπορεί να αποκαλύψουν δομική ετερογένεια των παράπλευρων αλυσίδων. Πιο εντυπωσιακός είναι ο προσδιορισμός των ενδομοριακών αποστάσεων με πειράματα μεταφοράς ενέργειας, (Förster 1948), στα οποία προσδιορίζονται η ελάττωση του φθορισμού ενός δότη (όπως η φαινολική ομάδα της παράπλευρης αλυσίδας της τυροσίνης) και η αύξηση του φθορισμού σ'έναν δέκτη (όπως το ινδολικό σύστημα της τρυπτοφάνης) και από τα αποτελέσματα υπολογίζεται η πραγματική φυσική απόσταση μεταξύ των δύο ομάδων. Η πρακτική εφαρμογή των τεχνικών φθορισμού στο πεδίο των πεπτιδίων περιγράφηκε πλήρως από τον Schiller (1985).

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται περισσότερο για την ανάλυση της δομής στην πεπτιδοχημεία είναι η καταγραφή των φασμάτων κυκλικού διχρωϊσμού και οπτικής στροφικής διασποράς. Η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ απλών κρυστάλλων, όταν μπορεί να εφαρμοσθεί, δίνει πιο λεπτομερείς πληροφορίες και πρόσφατα η φασματοσκοπία nmr φαίνεται σαν ο πιο σημαντικός ανταγωνιστής της. Οι μέθοδοι αυτές θα συζητηθούν στα επόμενα κεφάλαια. Σ' αυτό το σημείο επιθυμούμε να τονίσουμε τις ατέλειες όλων αυτών των μεθόδων. Αυτές οι μέθοδοι ή δίνουν μόνον κατά προσέγγιση περιγραφή της τρισδιάστατης σύνταξης του μορίου ή περιγράφουν τη γεωμετρία του με λεπτομέρειες, αλλά αυτά ισχύουν απλώς σε ορισμένες συνθήκες, για παράδειγμα σε στερεή κατάσταση ή παρουσία απορρυπαντικών. Ο γενικός αυτός περιορισμός οφείλεται σ'ένα βαθμό δομικής ελευθερίας που ενυπάρχει στα περισσότερα πεπτίδια. Ως εκ τούτου μπορεί να είναι υπεραισιόδοξο να περιμένουμε ότι περαιτέρω βελτίωση της υπάρχουσας μεθοδολογίας μπορεί να υπερπηδήσει πλήρως αυτή τη δυσκολία. Μια εν μέρει λύση είναι η εφαρμογή όχι μόνον μιας αλλά αρκετών μεθόδων δομικής ανάλυσης και η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων με επιπρόσθετες μελέτες όπως η ιξοδομετρία ή η διάχυση μέσω μεμβρανών και επίσης μέσω της "πρόβλεψης" της δομής με τη βοήθεια εμπειρικών παραμέτρων.

1. Οπτική Στροφική Διασπορά και Κυκλικός Διχρωϊσμός

Ο προσδιορισμός της ειδικής στροφής της D-γραμμής του νατρίου (589 nm) είναι

πολύτιμος για το χαρακτηρισμό των πεπτιδίων και των ενδιάμεσων παραγώγων της πεπτιδικής σύνθεσης. Εφαρμόζεται συνήθως για τη σύγκριση συνθετικών πεπτιδίων με τις αντίστοιχες φυσικές ουσίες και επίσης για την εκτίμηση της καθαρότητας, αλλά δεν παρέχει καμμία ένδειξη για την τρισδιάστατη σύνταξη. Η κατάσταση γίνεται τελείως διαφορετική εάν αντί για τον προσδιορισμό της ειδικής στροφής σ' ένα μόνο μήκος κύματος καταγράφεται η στροφή σε συνάρτηση του μήκους κύματος σε μια ευρεία περιοχή του φάσματος, κυρίως στο υπεριώδες. Το φάσμα οπτικής στροφικής διασποράς (ord) που λαμβάνεται έτσι είναι ένα από τα πιο πολύτιμα εργαλεία ανάλυσης της δομής των πεπτιδίων. Τα σχετικώς παρόμοια φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού (cd) βασίζονται στη διαφορά απορρόφησης μεταξύ του αριστερόστροφου και δεξιόστροφου συστατικού του κυκλικά πολωμένου φωτός.

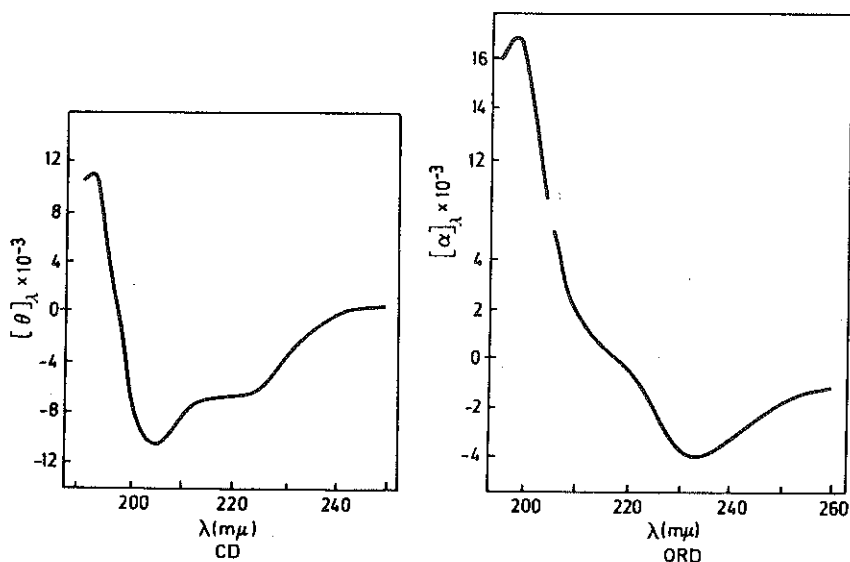
$$\Delta D = D_I - D_T$$

Αυτή η διαφορά (ΔD), όταν υπολογισθεί για ένα μοριακό διάλυμα και για μήκος διαδρομής ενός εκατοστού αποτελεί το *μοριακό κυκλικό διχρωϊσμό*: Δε. Αρκετά συχνά αντί για το ΔD στις γραφικές παραστάσεις των φασμάτων cd χρησιμοποιείται η *μοριακή ελλειπτικότητα*, $[\Theta]_M$. Αυτή αντιστοιχεί με το λόγο μεταξύ του μικρού και του μεγάλου άξονα της έλλειψης που διαγράφεται από το (αρχικά κυκλικά) πολωμένο φως και είναι απευθείας ανάλογη προς το μοριακό κυκλικό διχρωϊσμό

$$[\Theta] = 3.300 \Delta \epsilon$$

Οι δύο μέθοδοι δίνουν αποτελέσματα τα οποία είναι αλληλομετατρέπτά, έτσι μπορούν να επιλεγούν φάσματα ord ή cd ανάλογα με τη διαθεσιμότητα των καταλλήλων οργάνων. Επίσης κάποιο όργανο προτιμάται μερικές φορές έναντι του άλλου όταν η οπτική πυκνότητα του διαλύματος σε ορισμένες περιοχές του φάσματος παρεμβαίνει στον προσδιορισμό της στροφής ή του διχρωϊσμού. Και στις δύο μεθόδους πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ο δείκτης διαθλάσεως του διαλύματος στον υπολογισμό των αποτελεσμάτων, αλλά η προκύπτουσα μικρή διόρθωση συνήθως παραλείπεται.

Η οπτική ενεργότητα των πεπτιδίων προκύπτει από δύο διαφορετικά είδη ασυμμετρίας. Η ασυμμετρία των διαφόρων αμινοξέων που περιέχονται συνεισφέρει λιγότερο, ενώ η αρχιτεκτονική ασυμμετρία, για παράδειγμα η ασυμμετρία των ελίκων, έχει μεγάλη επίδραση στην οπτική στροφική ικανότητα ενός πεπτιδικού μορίου. Γι' αυτό είναι δυνατόν από την οπτική στροφή να καταλήξουμε σε συμπεράσματα για τη δομή. Τα οπτικώς ενεργά φάσματα (ord και cd) είναι σχεδόν γραμμικά σε εκείνες τις περιοχές του φάσματος όπου δεν υπάρχει σημαντική απορρόφηση από χρωμοφόρα και είναι πιθανόν να υπολογισθεί η τιμή της στροφής σ' ένα μήκος κύματος από την τιμή που βρέθηκε σε ένα άλλο μήκος κύματος. Τα φάσματα όμως δείχνουν μια ανωμαλία στην περιοχή των κορυφών απορρόφησης. Στα ανώμαλα φάσματα ord εμφανίζεται το "φαινόμενο Cotton", μια αρνητική κορυφή ακολουθούμενη από μια θετική κορυφή σε χαμηλότερο μήκος κύματος είναι το αρνητικό φαινόμενο Cotton. Το μέγιστο και το ελάχιστο κείται περίπου 25 nm πάνω και κάτω από το μέγιστο απορρόφησης του χρωμοφόρου, το οποίο επειδή βρίσκεται σε ασύμμετρο περιβάλλον είναι η αιτία της ανωμαλίας. Στα φάσματα cd εμφανίζεται μια θετική κορυφή στο μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης του χρωμοφόρου, εάν το φαινόμενο cotton είναι αρνητικό και μια αρνητική κορυφή εάν είναι θετικό. Εφόσον η κορυφή απορρόφησης της αμιδικής ομάδας είναι περίπου στα 200 nm, μόνον όργανα που επιτρέπουν την καταγραφή των



Σχήμα. 1. Τα φάσματα CD και ORD της σεκρετίνης σε νερό.

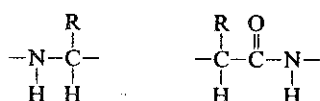
φασμάτων ακόμη και κάτω από αυτό το μήκος κύματος είναι χρήσιμα για τη μελέτη των πεπτιδίων

Στα φάσματα ord πολυπεπτιδίων με αποδεδειγμένη σύνταξη δεξιόστροφης α -έλικας παρατηρείται ένα αρνητικό φαινόμενο Cotton με μια αρνητική κορυφή στα 233nm και μια θετική κορυφή στα 199nm. Η τιμή της μοριακής στροφής στα 233nm χρησιμοποιείται σα μέτρο του ποσοστού έλικας των πεπτιδίων, ενώ η μεγάλη κορυφή στα 199nm καταγράφεται πιο δύσκολα. Πεπτιδικές αλυσίδες με διαφορετικούς τύπους ελίκων δείχνουν διαφορετικά φάσματα ord. Για παράδειγμα η επιμηκυσμένη έλικα της πολυπρολίνης II έχει ένα μέγιστο περίπου στα 205nm. Το φάσμα ord των συντάξεων β -φύλλων έχει μια αρνητική κορυφή στα 205nm και μια θετική κορυφή στα 190nm. Αυτές οι σχετικά απλές σχέσεις περιπλέκονται όμως από την ταυτόχρονη παρουσία περισσότερων του ενός ειδών γεωμετρίας σε διαφορετικά τμήματα του ίδιου μορίου και επίσης χρωμοφόρων άλλων εκτός από την αμιδική ομάδα. Τα αμινοξέα τυροσίνη, τρυπτοφάνη και σε κάποιο βαθμό και η φαινυλαλανίνη τροποποιούν τα φάσματα. Επομένως η εξήγηση των φασμάτων ord και cd δεν είναι πάντοτε σαφής και δεν επιτρέπει οπωσδήποτε τον προσδιορισμό μιας συγκεκριμένης αρχιτεκτονικής. Χωρίς αμφιβολία, τα οπτικώς ενεργά φάσματα είναι μεγάλης αξίας, γιατί μπορούν να αποδείξουν την παρουσία ή απουσία μιας δομής και μπορούν να αποκαλύψουν την επίδραση οργανικών διαλυτών, απορρυπαντικών, αλλαγών στη συγκέντρωση ή τη θερμοκρασία στην αρχιτεκτονική του πεπτιδίου. Είναι επίσης δυνατόν με τη βοήθειά τους να συγκρίνουμε την επίδραση των διαφόρων αμινοξέων στη γεωμετρία με μελέτες συνθετικών αναλόγων. Τα αποτελέσματα τέτοιων ερευνών πρέπει φυσικά να εκτιμηθούν κριτικά. Για παράδειγμα, λόγω της αξιοσημείωτης αύξησης του ποσοστού έλικας με προσθήκη οργανικών διαλυτών ή απορρυπαντικών σε υδατικά διαλύματα των πεπτι-

δίων, υποστηρίζεται συχνά ότι η ελικοειδής μορφή είναι ή βιολογικώς ενεργή δομή μιας ορισμένης ουσίας και αυτή η άποψη στηρίζεται από το επιχείρημα ότι μια παρόμοια δομική αλλαγή αναμένεται κατά την προσαρμογή της ουσίας με τον ειδικό της υποδοχέα, που είναι συνήθως μια πλούσια σε λιποειδή μεμβράνη. Είναι δύσκολο να αποδειχθούν ή όχι τέτοιες υποθέσεις, εκτός εάν διατεθούν απομονωμένοι υποδοχείς για μια απειθείας μελέτη των αλληλεπιδράσεων πεπτιδίων-υποδοχέων. Εντούτοις παρόλες τις επιφυλάξεις η χρησιμότητα των οπτικώς ενεργών φασμάτων παραμένει αδιαμφισβήτητη. Μπορούν να καταγραφούν σε αραιά υδατικά διαλύματα, ενώ τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού απαιτούν συνήθως υψηλότερες συγκεντρώσεις και η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ εκτελείται στην ακόμη λιγότερο "φυσιολογική" στερεή κατάσταση.

2. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (nmr)

Οι παραδοσιακές μέθοδοι της φασματοσκοπίας nmr έχουν αξιοσημείωτη αξία για τον προσδιορισμό της δομής και χρησιμοποιήθηκαν ευρέως για την επιβεβαίωση της ταυτότητας ενδιάμεσων παραγώγων της πεπτιδικής σύνθεσης. Ανοίχθηκε όμως μια νέα περίοδος με την ανάπτυξη της φασματοσκοπίας nmr δύο διαστάσεων. Η μέθοδος αυτή είναι ικανή να κάνει τον προσδιορισμό των σημάτων των πεπτιδίων πιο παραγωγική. Έτσι ο προσδιορισμός της αλληλεπίδρασης μεταξύ των συστημάτων spin μέσα στο ίδιο αμινοξύ επιτρέπει την ταυτοποίηση των διαφόρων αμινοξέων, ενώ οι ομοπυρηνικές και ετεροπυρηνικές συζεύξεις κατά μήκος του πεπτιδικού δεσμού



χρησιμοποιούνται για τη διευκρίνιση της αλληλουχίας. Η σπουδαιότητα της φασματοσκοπίας nmr αυξήθηκε με εντυπωσιακό τρόπο με τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μακρινής απόστασης με τη βοήθεια διαφόρων τεχνικών nmr, όπως τα ενισχυμένα φάσματα του πυρηνικού φαινομένου Overhauser, τα οποία βοηθούν τον προσδιορισμό των αλληλεπιδράσεων μέσω του χώρου (Kessler 1982). Δεν είναι λιγότερο σημαντική η επέκταση των ερευνών nmr σε πυρήνες όπως C^{13} , O^{17} και N^{15} . Με τη βοήθεια προηγμένων τεχνικών η φασματοσκοπία nmr είναι σήμερα ίσως το πιο σπουδαίο εργαλείο για την ανάλυση της δομής των πεπτιδίων. Τα αποτελέσματα της κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ παραμένουν σημαντικά, αλλά μπορούν να αποκτηθούν μόνον όταν διατίθενται κατάλληλοι κρύσταλλοι και αυτό γίνεται λιγότερο συχνά από ότι θα περίμενε κανείς. Επίσης η γεωμετρία που προσδιορίζεται με μεθόδους περιθλάσεως ακτίνων Χ ισχύει μόνον για τη στερεή κατάσταση ή για κρυστάλλους ειδικής μορφής και όχι για τη δομή σε διάλυμα. Το κύριο πλεονέκτημα της φασματοσκοπίας nmr έγκειται στο γεγονός ότι τα φάσματα που καταγράφονται είναι εκείνα των πεπτιδίων σε διάλυμα. Επομένως οι αλληλεπιδράσεις που σταθεροποιούν την αρχιτεκτονική είναι κυρίως ενδομοριακές. Οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις οι οποίες θα μπορούσαν να αλλάξουν τη δομή μπορεί να ελαττωθούν με μείωση της συγκέντρωσης του διαλυμένου πεπτιδικού μορίου.

Το εντυπωσιακό αυτό πεδίο ανάλυσης της δομής αναπτύσσεται ακόμη ταχέως και δεν μπορεί να αποδοθεί σ'αυτόν τον τόμο. Ένα βιβλίο που γράφθηκε από τον Wüthrich και ένα άρθρο από τον Kessler και τους βοηθούς του, που αναφέρονται και τα δύο στο τέλος αυτού του κεφαλαίου, θα ικανοποιήσουν τον ενδιαφερόμενο αναγνώστη.

3. Κρυσταλλογραφία Ακτίνων X

Το θεωρητικό υπόβαθρο της κρυσταλλογραφίας ακτίνων X και οι εφαρμογές της για τη διευκρίνιση της τρισδιάστατης σύνταξης των πεπτιδίων ξεπέρασαν τα σύνορα της πεπτιδικής χημείας. Ορισμένα ειδικά άρθρα που γράφτηκαν γι'αυτό το θέμα βρίσκονται στο τέλος αυτού του κεφαλαίου για να προμηθεύσουν πηγές σ'εκείνους που επιθυμούν να παρακολουθήσουν αυτό το θέμα με περισσότερες λεπτομέρειες. Εδώ μπορούμε απλώς να σχολιάσουμε το σκοπό και τη σημασία της μεθόδου.

Επί του παρόντος καμιά άλλη πειραματική μέθοδος δε δίνει τόσο λεπτομερείς και ακριβείς πληροφορίες για την τακτοποίηση στο χώρο των ατόμων ενός πεπτιδικού μορίου όπως η μεθοδολογία διαγραμμάτων ακτίνων X σε μονοκρυστάλλους. Η δύο διαστάσεων φασματοσκοπία nmr, που συζητήθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, συμπληρώνει μάλλον παρά αντικαθιστά την κρυσταλλογραφία ακτίνων X, γιατί εφαρμόζεται σε διάλυμα και μπορεί γι'αυτό να χρησιμοποιηθεί για ενώσεις που δεν παρέχουν καλούς μονοκρυστάλλους. Ένας εκπληκτικά μεγάλος αριθμός πεπτιδίων απέτυχε να κρυσταλλωθεί προς το παρόν. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στη δομική ελευθερία, η οποία παρά τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις μπορεί ακόμη να βρεθεί στα μόρια των πεπτιδίων. Οι πρωτεΐνες δείχνουν μια μεγαλύτερη τάση για κρυστάλλωση, πιθανώς γιατί πολυάριθμες ενδομοριακές δυνάμεις συνεισφέρουν σε μια καλώς καθορισμένη αρχιτεκτονική. Έτσι μια σφαιρική πρωτεΐνη μπορεί να γίνει δομικό συστατικό ενός κρυσταλλικού πλέγματος χωρίς να υποστεί μεγάλη δομική αλλαγή. Αυτό δεν είναι αλήθεια για ορισμένα πεπτίδια που παρουσιάζουν ουσιαστικά διαφορετικές γεωμετρίες σε διάλυμα και σε στερεή κατάσταση. Επίσης, οι κρύσταλλοι που σχηματίζονται μερικές φορές είναι συχνά πολύ μικροί. Είναι κατάλληλοι για διαγράμματα ακτίνων X τύπου κόνεως (μέθοδος Debye), αλλά όχι για μελέτες μονοκρυστάλλων. Οι τελευταίες απαιτούν κρυστάλλους με μέγεθος 0,1 mm και στις τρεις διαστάσεις. Τα διαγράμματα κόνεως δεν είναι χωρίς αξία, αλλά επιτρέπουν μόνον μια μάλλον γενική περιγραφή της αρχιτεκτονικής, όπως η σύνταξη "α-έλικας" ή "β-φύλλου". Μόνον με μονοκρυστάλλους μπορούν να εξασφαλισθούν τα διαγράμματα ηλεκτρονικής πυκνότητας, τα οποία έπειτα επιτρέπουν τον υπολογισμό της μοριακής γεωμετρίας με πολλές λεπτομέρειες. Πρόσφατες εξελίξεις στους υπολογισμούς με κομπιούτερ επέκτειναν πολύ το σκοπό τέτοιων μελετών, γιατί έγινε δυνατό να δουλεύουμε χωρίς το άλλοτε υποχρεωτικό συστατικό ενός βαρέος ατόμου και της ισομορφικής υποκατάστασης. Σε αρκετές περιπτώσεις η σύνταξη των πεπτιδίων μπορεί να βρεθεί με τέτοια λεπτομέρεια και διαύγεια ώστε να φαίνεται ότι η κρυσταλλογραφία ακτίνων X είναι η τελευταία λέξη στην ανάλυση δομής των πεπτιδίων. Στην πραγματικότητα όμως οι εναλλακτικές μέθοδοι διατηρούν αρκετή από την αξία τους. Αφού η γεωμετρία ενός πεπτιδίου στον κρύσταλλο επηρεάζεται συνήθως από τις δυνάμεις συνοχής οι οποίες συμπεριλαμβάνουν επίσης διαμοριακές αλληλεπιδράσεις όπως δεσμούς υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου, υδροφοβους δεσμούς ή ιονικές δυνάμεις οι δομικές αλλαγές που γίνονται

κατά την κρυστάλλωση μπορεί να είναι αρκετά δραστικές. Δεν είναι απίθανο να βρεθούν δύο διαφορετικές γεωμετρίες σε δύο κρυσταλλικές μορφές του ίδιου πεπτιδίου ή ακόμη και στους ίδιους κρυστάλλους. Έτσι φαίνεται να είναι επιτακτική ανάγκη να εξετασθεί η γενική ισχύς της σύνταξης που προσδιορίζεται μ' αυτό τον τρόπο με την εφαρμογή εναλλακτικών μεθόδων, κυρίως φασμάτων cd ή σπd και φασματοσκοπίας pmr δύο διαστάσεων.

Γ. Πρόβλεψη της Δομής των Πεπτιδίων

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παράπλευρων αλυσίδων γειτονικών αμινοξέων μπορούν να υπολογισθούν με αρκετές μεθόδους (Scheraga 1979) και είναι ως εκ τούτου πιθανόν να προβλέψουμε από τη σειρά των αμινοξέων τη γεωμετρία του πεπτιδίου. Ακόμη εκτεταμένες μελέτες που βασίζονται για παράδειγμα σε υπολογισμούς της κατανομής του δυναμικού της ενέργειας του μορίου είχαν μόνον μέτρια επιτυχία προς το παρόν, γιατί η γεωμετρία που βρέθηκε διαψεύσθηκε σε αρκετές περιπτώσεις από πειραματικές μαρτυρίες που αποδείχθηκαν ακολούθως. Τέτοιες ασυμφωνίες θα ήταν λιγότερο συχνές, εάν μπορούσε να συμπεριληφθεί στους υπολογισμούς η επίδραση των διαλυτών και των αλληλεπιδράσεων μακρινής απόστασης. Όπως συζητήθηκε σε προηγούμενα κεφάλαια η δομή των πεπτιδίων εξαρτάται ως επί το πλείστον από το διαλύτη και μπορεί επίσης να αλλάξει με τη συγκέντρωση, γιατί σε μεγάλη αραιώση οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις έχουν μικρότερη επιρροή. Επίσης, αμινοξέα που βρίσκονται μακριά κατά μήκος του πεπτιδικού σκελετού, όταν πλησιάσουν με δίπλωμα έχουν ένα σημαντικό ρόλο στη σταθεροποίηση της δευτεροταγούς δομής¹. Αυτοί οι πολύπλοκοι παράγοντες αγνοούνται κατά τον υπολογισμό της γεωμετρίας και θα ήταν πιο ρεαλιστικό αυτή τη στιγμή να χρησιμοποιηθούν αλγόριθμοι (Lim 1974) βασισμένοι στα καλά αποδειγμένα αρχιτεκτονικά χαρακτηριστικά των σφαιρικών πρωτεϊνών, όπως η παρουσία υδρόφοβων αμινοξέων σε θύλακες μεγάλης πυκνότητας, υδρόφιλων παράπλευρων αλυσίδων στην επιφάνεια του μορίου κ.λ.π.

Μια απλή και δημοφιλής μέθοδος για την πρόβλεψη της δομής είναι η εφαρμογή εμπειρικών δομικών παραμέτρων. Από τη μελέτη πολυάριθμων πρωτεϊνικών δομών που προσδιορίστηκαν με κρυσταλλογραφία ακτίνων X έγινε φανερό ότι ορισμένα αμινοξέα είναι συχνά συστατικά ελικοειδών δομών, ενώ άλλα είναι πιο πιθανό να υπάρχουν σε β-φύλλα και ακόμη άλλα βρίσκονται συχνά σε στροφές. Για παράδειγμα η στατιστική επεξεργασία τέτοιων συχνοτήτων (Chou και Fasman 1978) παρήγαγε ομάδες δομικών παραμέτρων (Πίνακας 5) που εφαρμόστηκαν για την πρόβλεψη της δομής των πρωτεϊνών με αξιοσημείωτη επιτυχία. Ένα συγκρότημα τεσσάρων ελικοειδών αμινοξέων ($P_\alpha > 1.00$) σε μια έκταση έξι αμινοξέων της αλυσίδας προβλέπει την ύπαρξη μιας ελικοειδούς περιοχής, η οποία μπορεί να εκτείνεται προς τις δύο κατευθύνσεις μέχρι να συμβεί διακοπή της έλικας ($P_\alpha < 1.00$)

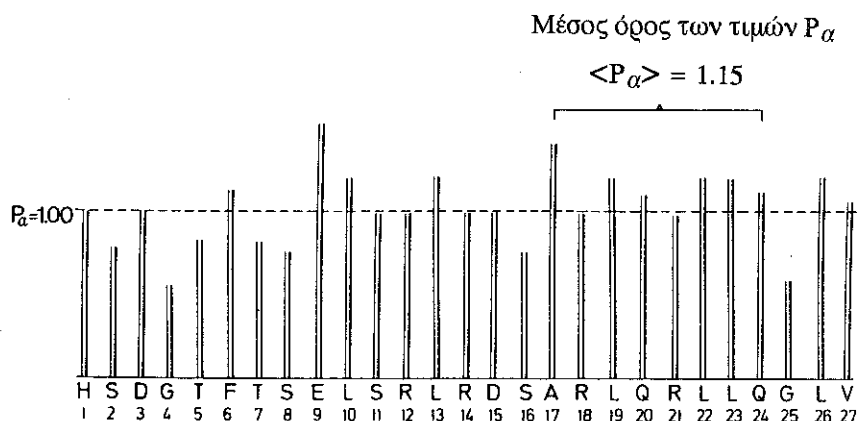
1. Οι ίδιοι περιορισμοί ισχύουν για τις ελκυστικές, έγχρωμες εικόνες των πεπτιδικών μορίων που εμφανίζονται σε οθόνες υπολογιστών σαν αποτέλεσμα ενεργειακών υπολογισμών, καθώς επίσης και για την ταχέως αναπτυσσόμενη τεχνική της "μοριακής δυναμικής", η οποία δείχνει μεταπτώσεις μεταξύ διαφόρων υπολογισθέντων δομών. Τέτοιες ατέλειες πιθανόν να είναι η αιτία για την έλλειψη προς το παρόν σημαντικής προόδου μέσω αυτής της προσέγγισης σε σχεδιασμό φαρμάκων, η οποία αναμένονταν να έχει καλλίτερα αποτελέσματα.

Πίνακας 5. Chou-Fasman δομικοί παράμετροι

	Ala	Arg	Asn	Asp	Cys	Gln	Glu	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val
P_α	1.42	0.98	0.67	1.01	0.70	1.11	1.51	0.57	1.00	1.08	1.21	1.16	1.45	1.13	0.57	0.77	0.83	1.08	0.69	1.06
P_β	0.83	0.93	0.89	0.54	1.19	1.10	0.37	0.75	0.87	1.60	1.30	0.74	1.05	1.38	0.55	0.75	1.19	1.37	1.47	1.70

P_α είναι η στατιστική πιθανότητα για ένα αμινοξύ να βρίσκεται σε μια α -ελικοειδή περιοχή

P_β είναι η στατιστική πιθανότητα για ένα αμινοξύ να βρίσκεται σε μια περιοχή β -φύλλου

Σχήμα 2. Τιμές P_α για τη σεκρετίνη

Η πρόβλεψη μιας α -έλικας απαιτεί ότι ο μέσος όρος $\langle P_\alpha \rangle$ των τιμών P_α πρέπει να είναι μεγαλύτερος από 1,03 και υψηλότερος από τον μέσο όρο $\langle P_\beta \rangle$ των παραμέτρων β -φύλλου. Για τα β -φύλλα ο μέσος όρος $\langle P_\beta \rangle$ των παραμέτρων P_β πρέπει να είναι μεγαλύτερος από 1,05. Οι στροφές προβλέπονται πιο δύσκολα γιατί πρέπει να ληφθούν υπόψη τα αμινοξέα που προηγούνται και ακολουθούν τη στροφή. Είναι ενδιαφέρον να σημειώσουμε ότι η προλίνη είναι ένα συχνό συστατικό των στροφών ($P_T=1,52$) και επίσης και η γλυκίνη ($P_T=1,56$), ενώ αυτά σπανίως βρίσκονται σε ελικοειδείς περιοχές ή β -φύλλα. Για περαιτέρω λεπτομέρειες των κανόνων πρόβλεψης θα έπρεπε να συμβουλευτούμε τα πολύ επεξηγηματικά άρθρα των Chou και Fasman.

Αφού (με εξαίρεση τα μικροβιακά προϊόντα τα βιολογικώς ενεργά πεπτίδια σχηματίζονται με εξειδικευμένη υδρόλυση των πρωτεϊνών, φαίνεται σωστό να προσαρμόσουμε τις εμπειρικές δομικές παραμέτρους για την πρόβλεψη επίσης και των πεπτιδίων. Ένα ιστόγραμμα για το γαστροεντερικό πεπτίδιο σεκρετίνη (Σχ. 2) προτείνει μια α -ελικοειδή περιοχή στο C-τελικό τμήμα της αλυσίδας που περιλαμβάνει τα αμινοξέα από 17 μέχρι 24. Οι υπολογισμοί πρότειναν δύο στροφές, μια κοντά στο N-τελικό άκρο και η άλλη στο μέσον της αλυσίδας. Δεν υπήρχε καμιά ένδειξη για την παρουσία β -φύλλου. Πειραματικά αποτελέσματα υποστηρίζουν αυτήν την πρόβλεψη και δείχνουν επίσης τη σταθεροποίηση της ελικοειδούς περιοχής με δίπλωμα της αλυσίδας (Bodanszky και Bodanszky 1986).

Αναφορές

- Bodanszky, M., Bodanszky, A.: *Peptides* 7, Suppl. 1, 43 (1986)
 Chou, P., Fasman, G.D.: *Ann. Review Biochem.* 1978, 251
 Förster, T.: *Ann. Phys.* 2, 55 (1948)
 Kauzmann, W.: *Adv. Prot. Chem.* 14, 1 (1959)
 Kessler, H.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 21, 512 (1982)
 Lim, V.T.: *J. Mol. Biol.* 88, 857, 873 (1974)
 Pauling, L., Corey, R.B., Branson, H.R.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 37, 205 (1951)
 Ramachandran, G. N., Ramakrishnan, C., Sasisekharan, V.: *J. Mol. Biol.* 7, 95 (1963)
 Scheraga, H.A.: *Acc. Chem. Res.* 12, 7 (1979)
 Schiller, P. W.: in : *The Peptides Vol. 7* (Udenfriend, S., Meienhofer, J. eds.) Academic Press, Orlando, Fla 1985, p. 115
 Toniolo, C., Bonora, C.M., Moretto, V., Bodanszky, M.: *Int. J. Peptide Protein Res.* 25, 425 (1985)
 Venkatachalam, C.M.: *Biopolymers* 6, 1425 (1968)
 White, F.H.: *J. Biol. Chem.* 236, 1353 (1961)

Περαιτέρω βιβλιογραφία

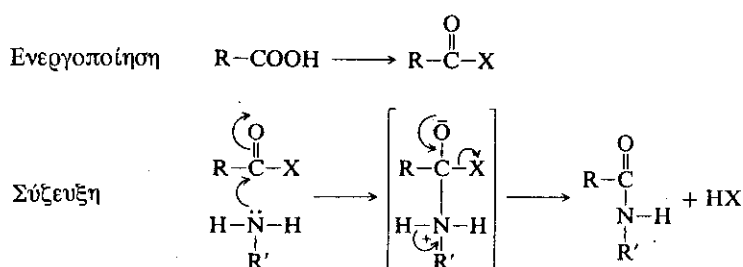
- Ramachandran, G. N., Sasisekharan, V.: *Conformation of Polypeptides and Proteins in Adv. Prot. Chem.* 23, 283-437 (1968)
 Schulz, G.E., Schirmer, R.H.: *Principles of Protein Structure*, Springer Verlag, New York 1979
 Herskovits, T.T.: *Difference Spectroscopy*, in *Methods of Enzymology*, Vol. 11 (Hirs, C.H.W. ed) Academic Press, New York 1967, pp. 870-905
 White, F.H.: *Reduction and Reoxidation of Disulfide bonds*, in *Methods of Enzymology*, Vol. 11 (Hirs, C.H.W. ed) Academic Press, New York 1967, pp. 481-485
 Craig, L.C.: *Techniques for the Study of Peptides and Proteins by Dialysis and Diffusion*, in *Methods of Enzymology*, Vol. 11 (Hirs, C.H.W. ed) Academic Press, New York 1967, pp. 870-895
 Jirgenson, B.: *Optical Rotatory Dispersion of Proteins and Other Macromolecules*, Springer Verlag, New York 1969
 Woody, R.W.: *Circular Dichroism of Peptides*, in *The Peptides*, Vol. 7 (Udenfriend, S., Meienhofer, J. eds) Academic Press, Orlando, Fla. 1985, pp. 15-114
 Wüthrich, K.: *NMR in Biological Research, Peptides and Proteins*. North Holland. Publ. Amsterdam 1976
 Kessler, H., Bermea, W., Müller, H., Pook, K.H.: *Modern Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, in *The Peptides*, Vol. 7 (Udenfriend, S., Meienhofer, J. eds) Academic Press, Orlando, Fla. 1985, pp. 437-473
 Karle, I.: *X-Ray Analysis: Conformation of Peptides in the Crystalline State in The Peptides*, Vol. 4 (Gross, E., Meienhofer, J., eds) Academic Press, New York 1981, pp. 1-54
 Benedetti, E.: *Structure and Conformation of Peptides as Determined by x-Ray Crystallography*, in *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins*, Vol. 6 (Weinstein, B. ed) M. Dekker, New York 1982, pp. 105-184
 Gunnin, J., Blundell, T.: *Crystal Structure Analysis of Larger Peptide Hormones*, in *The Peptides*, Vol. 4 (Gross, E., Meienhofer, J. eds) Academic Press, New York 1981, pp. 55-84
 Zimmerman, S.S.: *Theoretical Methods in the Analysis of Peptide Conformation*, in *The Peptides*, Vol. 7 (Udenfriend, S., Meienhofer, J. eds) Academic Press, Orlando, Fla. 1985, pp. 165-212

Δεύτερο Μέρος: Πεπτιδική Σύνθεση

Η σύνθεση ενός πεπτιδίου με καλά καθορισμένη σειρά αμινοξέων είναι μια αρκετά πολύπλοκη διαδικασία, η οποία φαίνεται απλή μόνο σε εκείνους που δεν έχουν ποτέ ασχοληθεί μ'αυτήν. Η πολυπλοκότητα αυτή δεν προκύπτει από τη σύνθεση του πεπτιδικού δεσμού, γιατί διατίθενται πολλές μέθοδοι γι'αυτόν το σκοπό, οι περισσότερες απ'αυτές αρκετά καλές και το μόνο πρόβλημα είναι η εκλογή της πιο κατάλληλης για το δεσμό που πρόκειται να συνθέσουμε. Το πιο απαιτητικό τμήμα του πεδίου της πεπτιδικής σύνθεσης είναι η ανάγκη να προστατεύσουμε εκείνες τις δραστικές ομάδες που δε συμμετέχουν στην αντίδραση σχηματισμού του πεπτιδικού δεσμού ή όπως συχνά ονομάζεται στη "σύζευξη". Εύκολα απομακρυνόμενες προστατευτικές ομάδες χρειάζονται για την αμινομάδα του αμινοξέος που δίνει την ενεργοποιημένη καρβοξυλομάδα του στην αντίδραση σύζευξης ("καρβοξύλο συστατικό") και επίσης για την καρβοξύλομάδα του αμινοξέος του οποίου η αμινομάδα πρόκειται να ακυλωθεί ("αμινο συστατικό"). Για να επιμηκυνθεί το προκύπτον διπεπτιδικό παράγωγο πρέπει να απομακρυνθεί μια από τις προστατευτικές ομάδες χωρίς να καταστραφεί ο πεπτιδικός δεσμός ή η "ημιμόνιμη" προστατευτική ομάδα η οποία πρέπει να παραμείνει στη θέση της μέχρι κάποιο επόμενο στάδιο όταν η διάσπασή της γίνει απαραίτητη. Μεγάλη σημασία έχει επίσης και η προστασία των διαφόρων δραστικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων. Μερικές από αυτές τις προστασίες είναι απαραίτητες, άλλες μόνο προαιρετικές. Απόψεις για τη σύζευξη και τη προστασία θα συζητηθούν στα κεφάλαια V και VI αντιστοίχως και ακολουθεί ένα κεφάλαιο που παρουσιάζει πολυάριθμες ανεπιθύμητες παράπλευρες αντιδράσεις που μπορεί να συμβούν κατά τη διάρκεια αυτών των διαδικασιών. Το κεφάλαιο VIII ασχολείται με μια ειδική παράπλευρη αντίδραση, βασική για τη μεθοδολογία της πεπτιδικής σύνθεσης, που ονομάζεται ρακεμίωση. Οι τακτικές και οι στρατηγικές που σχεδιάστηκαν για τη διατήρηση της οπτικής καθαρότητας και η σύνθεση ειδικών ουσιών, όπως πολυ-αμινοξέα, πεπτίδια με επαναλαμβανόμενη σειρά αμινοξέων (sequential peptides), κυκλικά πεπτίδια κλπ. συζητούνται στο κεφάλαιο IX. Η μελέτη της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση στο κεφάλαιο X ακολουθείται από τη σύντομη παρουσίαση διαφόρων άλλων πρακτικών τεχνικών σύνθεσης (κεφάλαιο XI). Το δεύτερο μέρος του βιβλίου τελειώνει με μια ανασκόπηση της ανάλυσης και του χαρακτηρισμού των συνθετικών πεπτιδίων, κυρίως χάριν εκείνων που επιθυμούν να ασχοληθούν πραγματικά με την πεπτιδική σύνθεση.

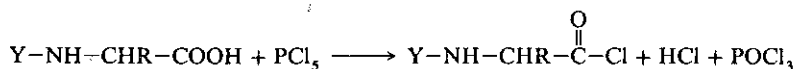
V. Σχηματισμός του Πεπτιδικού Δεσμού

Για να μετατραπούν τα καρβοξυλικά οξέα σε ακυλιωτικά μέσα πρέπει οι καρβοξυλικές τους ομάδες να αντικατασταθούν από έναν υποκαταστάτη (X) δέκτη ηλεκτρονίων ώστε να αυξηθεί η πολικότητα της καρβονυλικής ομάδας και επομένως ο ηλεκτρονιόφιλος χαρακτήρας του ατόμου άνθρακα. Έτσι διευκολύνεται πολύ η πυρηνόφιλη προσβολή της αμινομάδας (του αμινοξέος που πρόκειται να ακυλιωθεί):



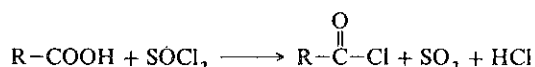
A. Μέθοδος των Χλωριδίων

Το άτομο του χλωρίου είναι μια προφανής εκλογή για το ρόλο του υποκαταστάτη (X) που έλκει ηλεκτρόνια. Η ισχυρή ενεργοποίηση που υπάρχει στα χλωρίδια των οξέων ήταν καλά γνωστή από τις αρχές του αιώνα όταν γίνονταν οι πρώτες προσπάθειες σχηματισμού του πεπτιδικού δεσμού. Εντούτοις η παρασκευή και η εφαρμογή των χλωριδίων των οξέων δεν είναι σαφείς και η επιτυχία που κατορθώθηκε με τη μέθοδο των χλωριδίων των οξέων (Emil Fischer 1903) παρέμεινε αρκετά περιορισμένη. Η μετατροπή της καρβοξυλομάδας του αμινοξέος (μερικώς προστατευμένου με την αμινοπροστατευτική ομάδα Y) σε χλωρίδιο έγινε με πενταχλωρίδιο του φωσφόρου με ψύξη:

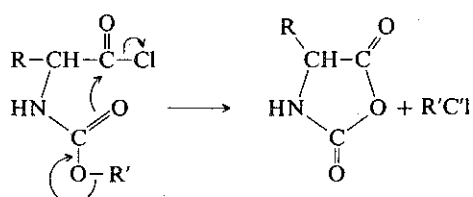


Ενώ το HCl που δημιουργήθηκε κατά την αντίδραση απομακρύνεται εύκολα, το χλωρίδιο του οξέος παραμένει προσμεμειγμένο με το λιγότερο πτητικό οξυχλωρίδιο του φωσφόρου. Η χρήση του θειονυλοχλωριδίου για το σχηματισμό του χλωριδίου του οξέος

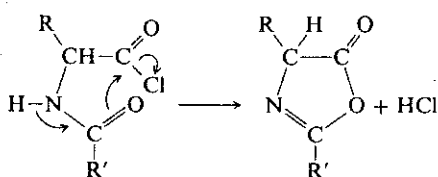
θα φαινόταν να είναι μια αποτελεσματική μέθοδος αφού και τα δύο παραπροϊόντα το HCl και το SO₂ είναι πτητικά:



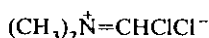
Στις συνθήκες όμως της αντίδρασης οι συχνά χρησιμοποιούμενες αλκυλοξυκαρβονυλοπροστατευτικές ομάδες εμπλέκονται στην πορεία και προκαλούν το σχηματισμό N-καρβοξυανυδριτών (ανυδρίτες Leuchs, Leuchs 1906)



οι οποίοι είναι δραστικά παράγωγα των αμινοξέων κατάλληλα για ακυλίωση, αλλά όχι για τη γενική σύνθεση καλώς καθορισμένων αλληλουχιών. Επίσης ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσβολή των ακυλαμινο χλωριδίων δίνει "αζλακτόνες"



παράγωγα των διϋδρο-οξαζολόνων, οι οποίες είναι καλά ακυλιωτικά μέσα, αλλά εμπλέκονται συχνά σε ρακεμοποίηση. Έγιναν αρκετές προσπάθειες για τη βελτίωση της μεθόδου των χλωριδίων οξέων, για παράδειγμα με την εφαρμογή πιο κατάλληλων αντιδραστηρίων όπως οξαλικό χλωρίδιο ή N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο χλωρίδιο (από διμεθυλοφορμαμίδιο και φωσγένιο),

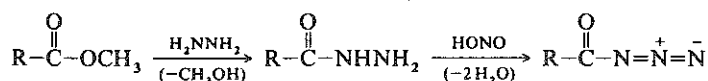


αλλά χωρίς μεγάλη επιτυχία. Καλά αποτελέσματα ελήφθησαν μόνον όταν η προστατευτική ομάδα δεν επηρεάστηκε από το θειονυλοχλωρίδιο, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση των p-τολουολοσουλφονυλαμινοξέων. Αμινοξέα προστατευμένα με την 9-φλουορενυλομεθυλοξυκαρβονυλομάδα (Fmoc) που δεν είναι ευαίσθητη στα οξέα, μετατρέπονται εύκολα στα υψηλής δραστηρότητας χλωρίδια τους ή φθορίδια τους.

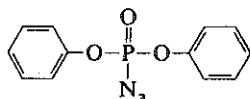
B. Μέθοδος των Αζιδίων

Είναι ενδιαφέρον να σημειώσουμε ότι η ενεργοποίηση με τη μορφή αζιδίων των οξέων (Curtius 1902), των μοναδικών ανταγωνιστών της μεθόδου των χλωριδίων των οξέων

την εποχή της ανακάλυψής τους παραμένει ακόμη και σήμερα μια σημαντική και πρακτική προσέγγιση για τη σύνθεση πεπτιδίων. Τα αρχικά στάδια της ενεργοποίησης, δηλαδή η υδραζινολύση των αλκυλεστέρων και η μετατροπή των υδραζιδίων σε αζίδια με τη βοήθεια νιτρώδους οξέος χρησιμοποιούνται ακόμη



αν και η απευθείας μετατροπή των καρβοξυλικών οξέων σε αζίδια με τη βοήθεια του διφαινυλοφωσφορνυλο αζιδίου



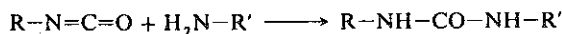
εφαρμόζεται σαν εναλλακτική μέθοδος τα τελευταία χρόνια. Επίσης αντί του νιτρώδους οξέος μπορούν να χρησιμοποιηθούν αλκυλονιτρώδη παράγωγα για τη μετατροπή των υδραζιδίων σε αζίδια με πραγματικά βελτιωμένα αποτελέσματα μερικές φορές



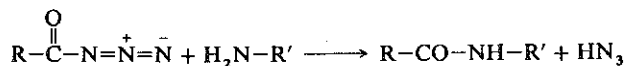
Αυτές οι βελτιώσεις όμως δεν επηρεάζουν το μειονέκτημα της μεθόδου των αζιδίων, δηλαδή την καλώς μελετημένη μετάθεση Curtius των αζιδίων προς ισοκυανικούς εστέρες:



Οι τελευταίοι αντιδρούν με το αμινο-συστατικό και δίνουν παράγωγα της ουρίας

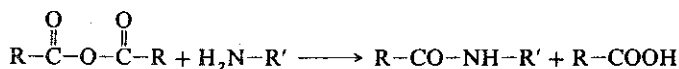


τα οποία έχουν παρόμοιες ιδιότητες με τα επιθυμητά πεπτιδία και μπορούν δύσκολα να διαχωρισθούν από αυτά. Λόγω της σημαντικής αυτής παράπλευρης αντίδρασης είναι επιτακτική η χρήση όλων των πιθανών προφυλάξεων κατά την εκτέλεση της μεθόδου των αζιδίων, όπως χαμηλή θερμοκρασία και υψηλή συγκέντρωση των αντιδρώντων. Παρόλα αυτά τα προβλήματα, η μέθοδος των αζιδίων παραμένει ένα από τα πραγματικά πολύτιμα εργαλεία των πεπτιδοχημικών, κυρίως γιατί σε πολλές περιπτώσεις η σύζευξη μέσω των αζιδίων συνοδεύεται από αμελητέα μόνον ρακεμοποίηση. Ακόμη και αυτή η σύντομη αναφορά της μεθόδου των αζιδίων δεν μπορεί να τελειώσει χωρίς μια λέξη προειδοποίησης για τον τοξικό χαρακτήρα του υδραζωτικού οξέος που παράγεται κατά την ακυλίωση

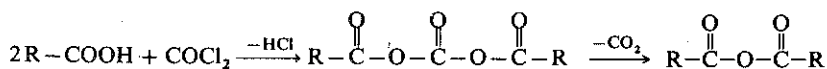


Γ. Μέθοδος των Ανυδριτών

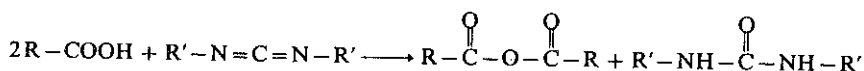
Μια από τις απλούστερες και πιο ικανές μεθόδους ακυλίωσης είναι η κατεργασία των αμινών (ή άλλων πυρηνόφιλων) με ανυδρίτες καρβοξυλικών οξέων. Συνήθως χρησιμοποιείται η ακετυλίωση με οξικό ανυδρίτη και φαίνεται μάλλον παράξενο το γεγονός ότι δε χρησιμοποιήθηκε η ανάλογη αντίδραση για σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού από τις πρώτες μέρες της πεπτιδικής σύνθεσης. Μια πιθανή εξήγηση γι' αυτήν την καθυστέρηση αποδοχής των ανυδριτών είναι η σπατάλη της μεθόδου. Από τα δύο μόρια του καρβοξυλικού οξέος που συμπεριλαμβάνονται στο μόριο του ανυδρίτη μόνον το ένα ενσωματώνεται στο προϊόν, ενώ το άλλο ελευθερώνεται αλλά συνήθως δεν ανακτάται:



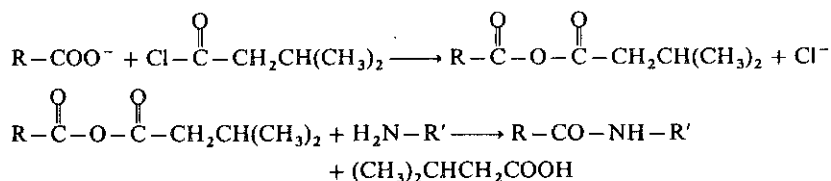
Η απώλεια του μισού καρβοξυλικού οξέος δεν είναι αιτία ανησυχίας στις ακετυλιώσεις με οξικό ανυδρίτη, αλλά φαινόταν να είναι απαγορευτική όταν έπρεπε να θυσιάσθούν προστατευμένα αμινοξέα που αποκτήθηκαν μερικές φορές με αξιοσημείωτη προσπάθεια. Η κατάσταση αυτή άλλαξε με τον καιρό. Τα προστατευμένα αμινοξέα παρασκευάζονται τώρα με μεγάλη ευκολία και μικρό κόστος και οι ανυδρίτες τους χρησιμοποιούνται συχνά. Μια ενδιαφέρουσα αλλά όχι ευρείας χρήσεως προσέγγιση των *συμμετρικών ανυδριτών* είναι η χρήση φωσγενίου:



Μια πιο ελκυστική μέθοδος, η εφαρμογή μέσων συμπίκνωσης κυρίως καρβοδιϊμιδίων,



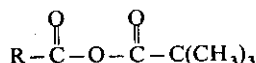
θα συζητηθεί με περισσότερες λεπτομέρειες σε σχέση με τα αντιδραστήρια σύζευξης. Ο σχηματισμός του πεπτιδικού δεσμού μέσω *μικτών* ή *ασύμμετρων ανυδριτών* απέκτησε αξιοσημείωτη δημοτικότητα μετά την εισαγωγή τους (Chantrenne, 1941). Τα ενδιάμεσα αυτά παράγωγα παρασκευάστηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε το προστατευμένο αμινοξύ είναι πρακτικά το μόνο ακυλιωτικό μέσο, ενώ το οξύ που παίζει το ρόλο του ενεργοποιητή αποσπάται. Το οξικό ή το βενζοϊκό οξύ δεν είναι κατάλληλο γι' αυτόν το ρόλο. Μια έρευνα για καλλίτερες λύσεις οδήγησε σε διακλαδισμένα μεγάλης αλυσίδας λιπαρά οξέα, όπως το ισοβαλερικό οξύ (Vaughan και Osato 1951). Σ' αυτούς τους μικτούς ανυδρίτες (που παρασκευάζονται μέσω των χλωριδίων του οξέος) η δραστηρότητα του ενεργοποιημένου τμήματος του μορίου του ανυδρίτη μειώνεται με ελευθέρωση ηλεκτρονίων και με στερεοχημική παρεμπόδιση:



Επομένως η προσβολή από το πυρηνόφιλο αμινοσυστατικό γίνεται κυρίως στην καρβονυλική ομάδα του προστατευμένου αμινοξέος και το δεύτερο πιθανό ακυλιωμένο προϊόν, μια ισοβαλερυλαμίνη



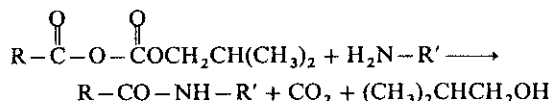
παράγεται σε πολύ μικρά, συχνά αμελητέα ποσά. Μια περαιτέρω αύξηση αυτού του συνδυασμού στερεοχημικού-ηλεκτρονιακού φαινομένου βρέθηκε στους μικτούς ανυδρίτες με τριμεθυλοξικό οξύ (πιβαλικό οξύ):



Η πιο επιτυχής όμως πραγματοποίηση της ιδέας των μικτών ανυδριτών είναι η δημιουργία δραστικών ενδιάμεσων παραγώγων με τη βοήθεια χλωροκαρβονικών αλκυλεστέρων (που καλούνται επίσης χλωρομυρμηκικοί αλκυλεστέρες).



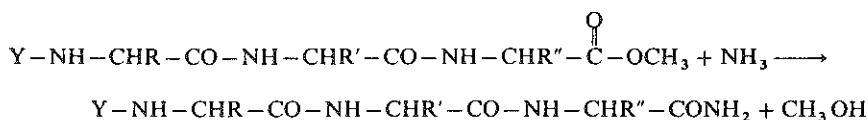
Οι μικτοί ανυδρίτες με αιθυλοκαρβονικά οξέα (Boissonnas 1951, Wieland and Bernhard 1951) έγιναν γρήγορα αποδεκτοί στην εκτέλεση της πεπτιδικής σύνθεσης και μαζί με τη βελτιωμένη τους έκδοση, τους μικτούς ανυδρίτες με ισοβουτυλοκαρβονικά οξέα (Vaughan 1951) παραμένουν τα μεγαλύτερης αξίας εργαλεία των πεπτιδοχημικών. Ένα ιδιαίτερο πλεονέκτημα των μικτών ανυδριτών με αλκυλοκαρβονικά οξέα είναι ότι τα παραπροϊόντα της αντίδρασης ακυλίωσης, το διοξείδιο του άνθρακα και η προκύπτουσα αλκοόλη απομακρύνονται εύκολα από το μίγμα:



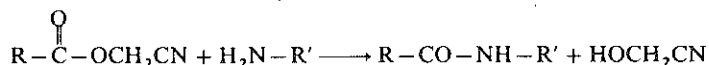
Κατά την εφαρμογή των μικτών ανυδριτών πρέπει να αναμένεται ένα μικρό ποσό του δεύτερου ακυλιωμένου προϊόντος. Τέτοια περιπλοκή δεν προκύπτει με τη χρήση συμμετρικών ανυδριτών. Επομένως παρά το μεγάλο πειραματισμό με διάφορους μικτούς ανυδρίτες, αυτή τη στιγμή μόνον η μέθοδος μικτών ανυδριτών με ισοβουτυλοκαρβονικά οξέα παραμένει ένας σοβαρός ανταγωνιστής της μεθόδου των συμμετρικών ανυδριτών. Πρόσφατα εντούτοις επιτεύχθηκαν βελτιωμένα αποτελέσματα με ισοπροπυλοκαρβονικούς μικτούς ανυδρίτες.

Δ. Μέθοδος των Ενεργών Εστέρων

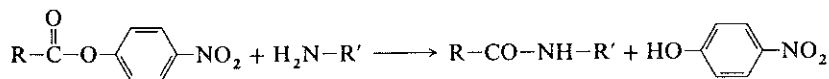
Η ασάφεια που υπάρχει κατά τη σύζευξη μέσω των μικτών ανυδριτών μπορεί να αποφευχθεί εάν χρησιμοποιηθεί αμινόλυση εστέρων για σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού. Μια καλά καθιερωμένη τακτική είναι να παρασκευάζονται αμίδια προστατευμένων αμινοξέων ή πεπτιδίων με κατεργασία των αλκυλεστέρων τους με αμμωνία:

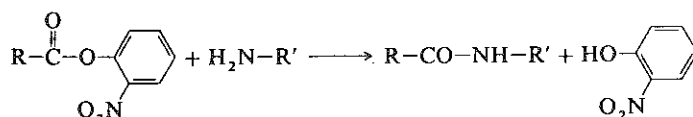


Αφού στον εστέρα υπάρχει μόνον ένα ηλεκτρονιόφιλο κέντρο δεν μπορεί να δημιουργηθεί δεύτερο προϊόν ακυλίωσης. Η μέτρια δραστικότητα των μεθυλεστέρων ισοφαρίζεται με τη χρήση αμμωνίας σε μεγάλη περίσσεια, αλλά η συμπλήρωση της αντίδρασης αμμωνιόλυσης χρειάζεται ακόμη αρκετό χρόνο. Επειδή δε συμφέρει να χρησιμοποιούνται τα αμινοσυστατικά σε μεγάλη περίσσεια, η προσέγγιση αυτή δεν μπορεί να εφαρμοσθεί για το σχηματισμό αμιδικού δεσμού μεταξύ δύο αμινοξέων, τουλάχιστον όχι χωρίς σημαντικές βελτιώσεις. Ενώ η δραστικότητα της αμινομάδας δε θα μπορούσε να αυξηθεί άλλο, η εστερική ομάδα είναι αρκετά κατάλληλη για τροποποιήσεις. Ένα αρνητικό επαγωγικό φαινόμενο του αλκοολικού συστατικού του εστέρα καθιστά το άτομο άνθρακα της καρβονυλικής ομάδας πιο ηλεκτρονιόφιλο και έτσι αυτό γίνεται πιο έτοιμο να δεχθεί την προσβολή των πυρηνόφιλων, όπως η αμινομάδα του αμινο-συστατικού. Επομένως οι μεθυλεστέρες θα μπορούσαν να ενεργοποιηθούν με υποκατάσταση από ομάδες που έλκουν ισχυρά ηλεκτρόνια, για παράδειγμα από κυανοομάδα. Η αμινόλυση των κυανομεθυλεστέρων (Schwyzer et al. 1955) βρέθηκε πραγματικά κατάλληλη για την παρασκευή πεπτιδίων

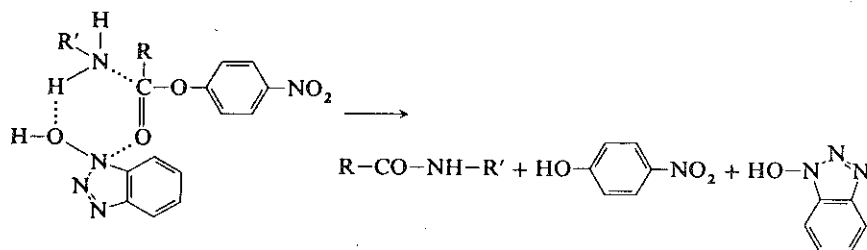


αλλά παρατηρήθηκαν ικανοποιητικές ταχύτητες μόνον όταν τα αντιδρώντα χρησιμοποιήθηκαν σε υψηλή συγκέντρωση. Γι'αυτό η μέθοδος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση διπεπτιδίων και σε κάποιο βαθμό για την παρασκευή επίσης μικρών πεπτιδικών αλυσίδων, αλλά για μια πιο γενική προσέγγιση στο σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού ήταν αναγκαία προφανώς μια περαιτέρω αύξηση της δραστικότητας της εστερικής ομάδας. Οι φαινυλεστέρες φάνηκαν να έχουν περισσότερα πλεονεκτήματα και η αύξηση της δραστικότητάς τους με υποκαταστάτες που έλκουν ηλεκτρόνια έδωσε μια ολόκληρη σειρά χρήσιμων μέσων ακυλίωσης. Έτσι οι p-νιτροφαινυλεστέρες (Bodanszky 1955) είναι ακόμη μεταξύ των εργαλείων των πεπτιδοχημικών. Η ακόμη μεγαλύτερη ενεργοποίηση που υπάρχει στους ο-νιτροφαινυλεστέρες

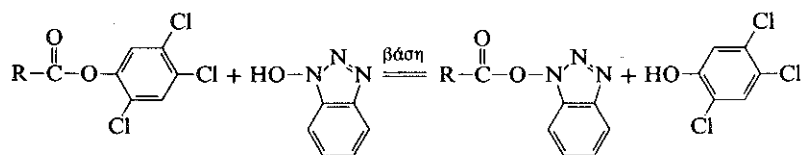




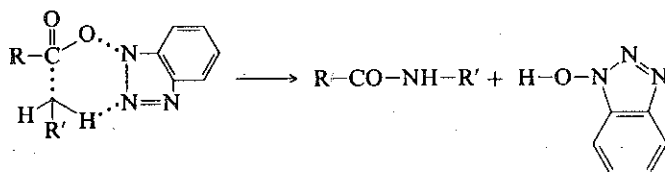
(Bodanszky et al. 1969) συνοδεύεται από ελαττωμένη ευαισθησία σε στερεοχημική παρεμπόδιση και επίσης από ελαττωμένη εξάρτηση της ταχύτητας της αντίδρασης από τη φύση του διαλύτη που χρησιμοποιείται στο στάδιο της σύζευξης. Οι p-νιτροφαινυλεστέρες είναι πιο δραστικοί σε πολύ πολικά μέσα, όπως το διμεθυλοφορμαμίδιο ή το διμεθυλοσουλφοξείδιο, λιγότερο δραστικοί σε οξικό αιθυλεστέρα, διοξάνη ή τετραϋδροφουράνιο και μάλλον αδρανείς σε μεθυλενοχλωρίδιο ή χλωροφόρμιο. Παρ'όλα τα πλεονεκτήματα κυρίως χρησιμοποιούνται τα p-παράγωγα, πιθανώς γιατί μια μεγάλη βελτίωση στην πεπτιδική σύνθεση κατέστησε αυτές τις διαφορές λιγότερο σημαντικές, δηλαδή η ανακάλυψη της καταλυτικής επίδρασης του 1-υδροξυβενζοτρίαζόλιου (Köpnig και Geiger 1973) στην αμινόλυση των ενεργών εστέρων. Η επίδραση αυτή θα μπορούσε να εξηγηθεί με την υπόθεση ενός τριτοταγούς συμπλόκου μεταξύ του ενεργού εστέρα, της αμίνης και του καταλύτη



αλλά η περαιτέρω αύξηση της ταχύτητας με προσθήκη τριτοταγών αμινών προτείνει ότι, τουλάχιστον εν μέρει, συμβαίνει τρανσεστεροποίηση που καταλύεται από βάσεις

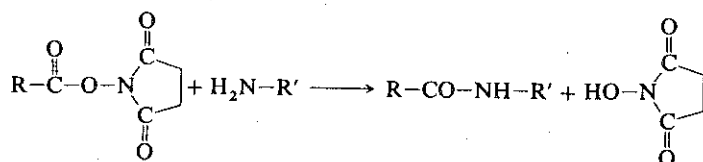


Οι εστέρες του 1-υδροξυβενζοτρίαζόλιου (HOBt) είναι πολύ ισχυρά ακυλιωτικά μέσα.



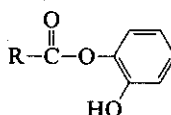
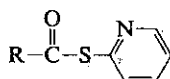
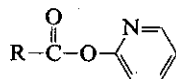
Παρόμοια κατάλυση επιτυγχάνεται με αρκετές άλλες N-υδροξυενώσεις, για παράδειγμα με 1-υδροξυ-2-πυριδόνη.

Η ικανοποιητική σύνθεση βιολογικώς ενεργών πεπτιδίων, όπως η οξυτοκίνη ή η σεκρετίνη πλήρως με τη μέθοδο των νιτροφαινυλεστέρων ενεργοποίησε περαιτέρω προσπάθειες για την ανάπτυξη ακόμη πιο ενεργών εστέρων, αλλά από τα πολλά ενεργοποιημένα ενδιάμεσα παράγωγα που προτάθηκαν μόνον οι εστέρες του Ν-υδροξυηλεκτριμιδίου (Anderson et al. 1963) διατίθενται στο εμπόριο αυτή τη στιγμή. Οι Ν-υδροξυηλεκτριμιδεστέρες είναι πολύ ενεργοί και δίνουν τα επιθυμητά πεπτίδια με την αναμενόμενη ευκολία



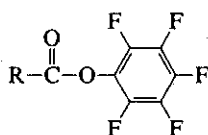
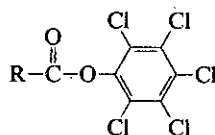
αλλά η εφαρμογή τους μερικές φορές δεν είναι σαφής, γιατί τα καρβονύλια του ηλεκτριμιδίου δεν είναι τελείως αδρανή ως προς το αμινοσυστατικό. Η ευκολία απομάκρυνσης του υδατοδιαλυτού παραπροϊόντος Ν-υδροξυηλεκτριμιδίου είναι ένα ελκυστικό χαρακτηριστικό της μεθόδου.

Η εξαιρετική δραστηριότητα των εστέρων του Ν-υδροξυηλεκτριμιδίου και του 1-υδροξυυβενζοτριάζολιου οφείλεται στην επίδραση του γειτονικού ατόμου αζώτου. Παρόμοιο είδος ενεργοποίησης μπορεί να αναγνωρισθεί στους εστέρες της 2-υδροξυπυριδίνης και της 2-μερκαπτοπυριδίνης. Το πλησιέστερο άτομο οξυγόνου, όπως στους κατεχολικούς εστέρες

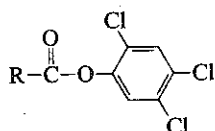


είναι λιγότερο αποτελεσματικό σ'αυτή την περίπτωση.

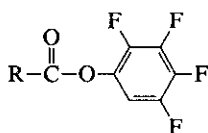
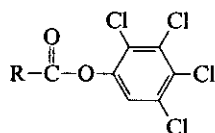
Για την παρασκευή πολυμερών αμινοξέων χρησιμοποιήθηκαν οι πενταχλωροφαινυλεστέρες (Kurpyszewski 1961), επειδή τα υλικά υψηλού μοριακού βάρους σχηματίζονται κατά προτίμηση μ'αυτούς. Στις πιο γενικές όμως συνθήκες της βήμα προς βήμα επιμήκυνσης της αλυσίδας ο όγκος της ενεργής ομάδας θα μπορούσε να εξισορροπήσει τον υψηλό βαθμό ενεργοποίησης που παρέχεται από τους πενταχλωροφαινυλεστέρες. Αυτό είναι αληθινό ιδιαίτερα όταν η στερεοχημική παρεμπόδιση είναι ήδη ένας περιοριστικός παράγοντας, όπως κατά την ενσωμάτωση της βαλίνης ή της ισολευκίνης ή κατά τη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση (βλ. Κεφάλ. Χ), όπου η αμινομάδα περιβάλλεται από το υλικό του πολυμερικού υποστρώματος. Το πρόβλημα αυτό προβάλλεται λιγότερο στους δραστικούς πενταφθοροφαινυλεστέρες (Kovacs et al. 1967).



Μια λεπτομερής μελέτη (Pless και Boissonnas 1963) της επίδρασης των αλογονούχων συστατικών στη δραστηριότητα των φαινυλεστέρων οδήγησε στην εκλογή των 2,4,5-τριχλωροφαινυλεστέρων



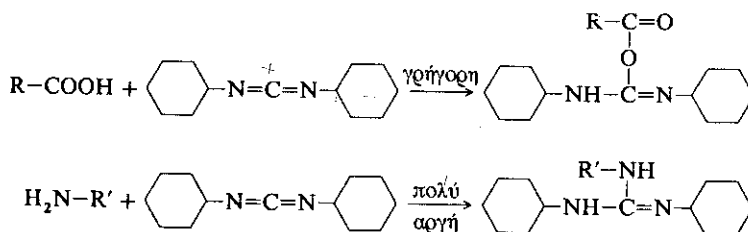
Η ίδια μελέτη αποκάλυψε το ανεπιθύμητο φαινόμενο της υποκατάστασης και στα δύο άτομα άνθρακα, τα οποία είναι σε ο-θέση ως προς το φαινολικό υδροξύλιο. Έτσι οι 2,3,4,5-τετραχλωροφαινυλο και οι 2,3,4,5-τετραφθοροφαινυλεστέρες που δεν έχουν ακόμη ελεγχθεί θα μπορούσαν να προκαλέσουν περαιτέρω



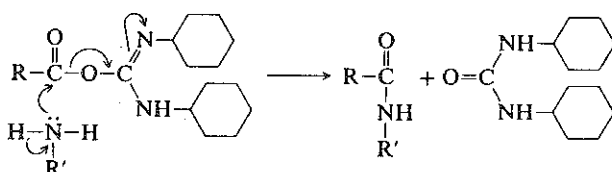
βελτίωση της ανάπτυξης της ιδέας των ενεργών εστέρων.

Ε. Αντιδραστήρια Σύζευξης

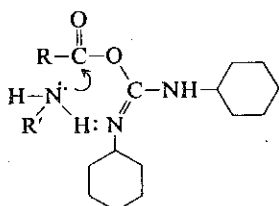
Η εισαγωγή των καρβοδιϊμιδίων (Sheehan and Hess 1955), ιδιαίτερα του δικυκλοεξυλο-καρβοδιϊμιδίου (DCC, DCCI) σαν αντιδραστήρια για το σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού ήταν ένα σημαντικό γεγονός στην ιστορία της πεπτιδικής σύνθεσης. Το νέο χαρακτηριστικό των αντιδραστηρίων σύζευξης ήταν ότι μπορούσαν να προστεθούν στο μίγμα του καρβοξυλο-συστατικού και του αμινο-συστατικού. Έτσι η ενεργοποίηση και η σύζευξη προχωρούν ταυτόχρονα. Ενώ οι αμίνες ως γνωστόν αντιδρούν με καρβοδιϊμίδια (δίνοντας παράγωγα της γουανιδίνης) η ταχύτητα αυτής της αντίδρασης είναι αμελητέα όταν συγκρίνεται με τη γρήγορη ταχύτητα που παρατηρήθηκε κατά την προσθήκη των καρβοξυλικών οξέων σε έναν από τους διπλούς δεσμούς του καρβοδιϊμιδίου



Στην Ο-ακυλο-ισοουρία, το ενδιάμεσο παράγωγο που σχηματίστηκε κατά την προσθήκη των καρβοξυλικών οξέων στα καρβοδιϋμίδια, ο δεσμός $N=C$ παρέχει ισχυρή ενεργοποίηση, η οποία οδηγεί σε σύζευξη:



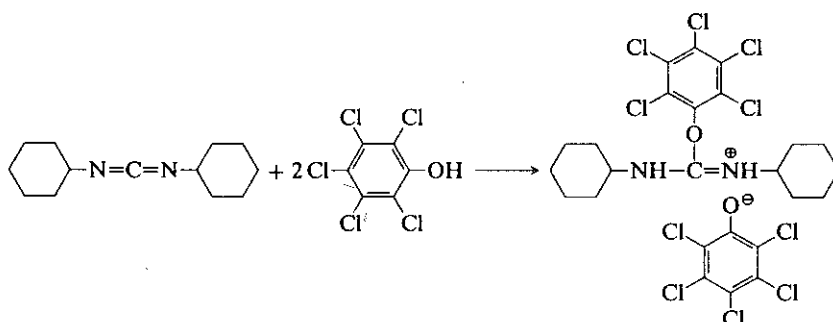
Φαίνεται να είναι λογικό να αποδώσουμε κάποιο βασικό χαρακτήρα¹ στα παράγωγα της Ο-ακυλοϊσοουρίας και ως εκ τούτου σαν εξήγηση της εκπληκτικά υψηλής



δραστικότητας που παρατηρήθηκε κατά την αμνόλυση μπορούμε να επικαλεσθούμε την κατάλυση από την παραπάνω βάση.

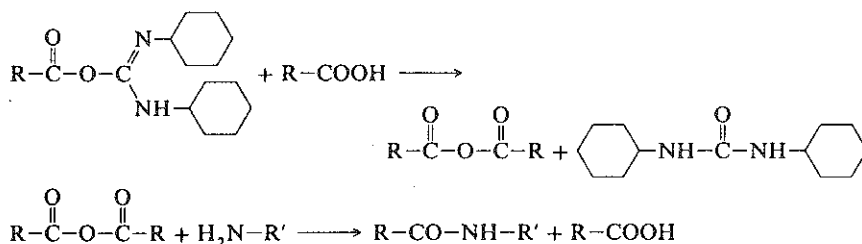
Ένας δεύτερος δρόμος εξίσου σημαντικός της αντίδρασης σχηματισμού πεπτιδικού δεσμού προχωρεί μέσω συμμετρικών ανυδριτών που παράγονται κατά την προσβολή

¹ Η υπόθεση αυτή βασίζεται στις αναλογίες. Για παράδειγμα παράγονται άλατα της Ο-φαινυλο-ισοουρίας κατά την αντίδραση των όξινων φαινολών με καρβοδιϋμίδια:

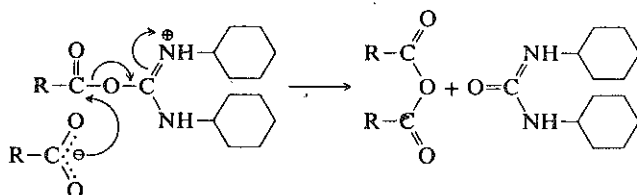


Επίσης είναι καλά γνωστό ότι τα παράγωγα της Ο-ακυλοϊσοουρίας είναι ισχυρές βάσεις και ακόμη και η ουρία σχηματίζει άλατα με ισχυρά οξέα.

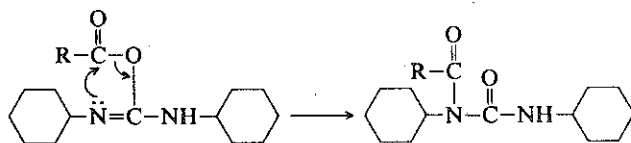
ενός μη αντιδράσαντος ακόμη μορίου του καρβοξυλο-συστατικού επί του ενδιάμεσου παραγώγου της Ο-ακυλο-ισοουρίας:



Η εξαιρετικά γρήγορη δημιουργία των συμμετρικών ανυδριτών μπορεί να εξηγηθεί με την υπόθεση μιας σχεδόν ενδομοριακής προσβολής του καρβοξυλικού ανιόντος επί του ενεργού καρβονυλίου εντός του ζεύγους ιόντων των δύο συστατικών:

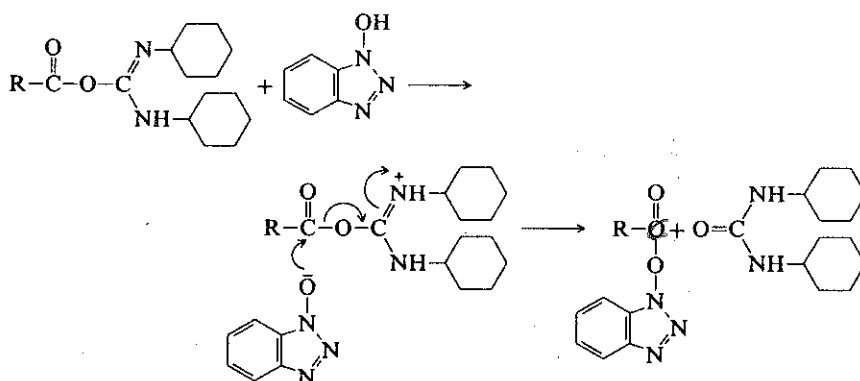


Η γρήγορη εκτέλεση της ενεργοποίησης και της σύζευξης σε ένα στάδιο και η εύκολη απομάκρυνση του αδιάλυτου παραπροϊόντος, της N,N'-δικυκλοεξυλουρίας (DCU), με διήθηση συμβάλλουν όλα στη μεγάλη δημοτικότητα της μεθόδου του DCC. Δεν είναι περιεργό ότι ένα ορισμένο κόστος πρέπει να πληρωθεί γι' αυτό το σκοπό. Έτσι η μεγάλη ενεργοποίηση του δραστήριου ενδιάμεσου παραγώγου έχει σαν αποτέλεσμα κάποια απώλεια της οπτικής καθαρότητας, όταν γίνεται σύζευξη πεπτιδικών κλασμάτων. Περαιτέρω το πυρηνόφιλο κέντρο στο παράγωγο της Ο-ακυλο-ισοουρίας ανταγωνίζεται με το αμινο-συστατικό για το ακυλο-αμινοξύ και ο ανταγωνισμός αυτός οδηγεί στο σχηματισμό μη δραστήριων παραπροϊόντων, παραγώγων της Ν-ακυλοουρίας:



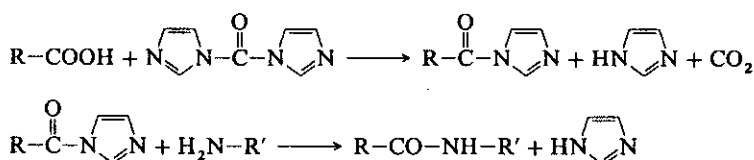
Η ρακεμοποίηση και ο σχηματισμός της Ν-ακυλοουρίας μπορούν να ελαττωθούν με την προσθήκη βοηθητικών πυρηνόφιλων, όπως το 1-υδροξυβενζοτριάζολιο (HOBt) που προτάθηκε από τους König και Geiger (1970). Η προσβολή της πρόσθετης αυτής ουσίας επί του ενεργού ενδιάμεσου παραγώγου δίνει Ο-ακυλο-1-υδροξυβενζοτριάζολιο, που

είναι ισχυρό ακυλιωτικό μέσο:

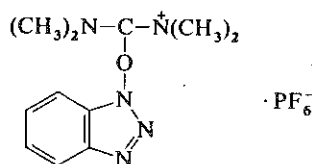


Η παρουσία ενός δεύτερου πυρηνόφιλου στο μίγμα της αντίδρασης μειώνει τη συγκέντρωση της Ο-ακυλοΐσοουρίας και ως εκ τούτου την έκταση της ρακεμοποίησης. Επίσης το HOBt σαν ασθενές οξύ εμποδίζει την αφαίρεση πρωτονίου από το οπτικώς ενεργό άτομο άνθρακα και έτσι συμβάλλει μ'ένα δεύτερο τρόπο στη διατήρηση της οπτικής καθαρότητας. Τέλος είναι επίσης σημαντικό το γεγονός ότι η χρησιμοποίηση του βοηθητικού πυρηνόφιλου (HOBt) μικραίνει αρκετά το χρόνο ζωής του πολύ εργοποιημένου ενδιάμεσου παραγώγου της Ο-ακυλοΐσοουρίας και επομένως την έκταση της $O \rightarrow N$ ακυλο-μετατόπισης που οδηγεί σε σχηματισμό των παραγώγων της Ν-ακυλοουρίας. Πρέπει να σημειωθεί ότι το HOBt αναγεννάται κατά τη διάρκεια της ακυλίωσης και έτσι η συγκέντρωσή του παραμένει σχεδόν σταθερή κατά τη διάρκεια της σύζευξης.

Η επιτυχία που κατορθώθηκε με το δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμίδιο ενεργοποίησε μια μεγάλη έρευνα για ακόμη καλλίτερα αντιδραστήρια σύζευξης. Μερικές πραγματικά αποτελεσματικές ενώσεις θα μπορούσαν να βρεθούν, για παράδειγμα το καρβονυλοδιϊμιδαζόλιο (Staab 1957), το οποίο μεσολαβεί στη σύζευξη με ένα νέο τρόπο, μέσω ενεργών Ν-ακυλοενδιάμεσων παραγώγων:



Δυστυχώς κατά την παρασκευή του αντιδραστήριου και κατά την εφαρμογή του για σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού πρέπει να διατηρηθούν αυστηρά άνυδρες συνθήκες και αυτό φαίνεται να είναι πολύ απαιτητικό για γενική χρήση. Ένα πιο εύχρηστο αντιδραστήριο, η 1-αιθυλοεξυλοκαρβονυλο-2-αιθυλοεξυ-1,2-διϋδροκινολίνη (EEDQ, Belleau και Malek 1968) και η βελτιωμένη του παραλλαγή 1-ισοβουτυλοεξυλοκαρβονυλο-2-ισοβουτυλο-1,2-διϋδροκινολίνη (IBDQ) σχηματίζει τους ήδη συζητημένους μικτούς ανυδρίτες των αλκυλοεξυλοκαρβονικών οξέων.

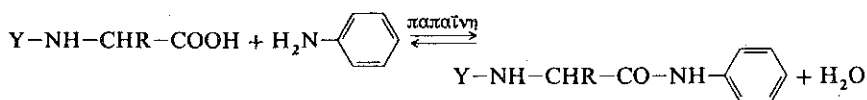


διακρίνεται από το χαμηλό βαθμό ρακεμοποίησης που σημειώθηκε κατά τη χρήση του.

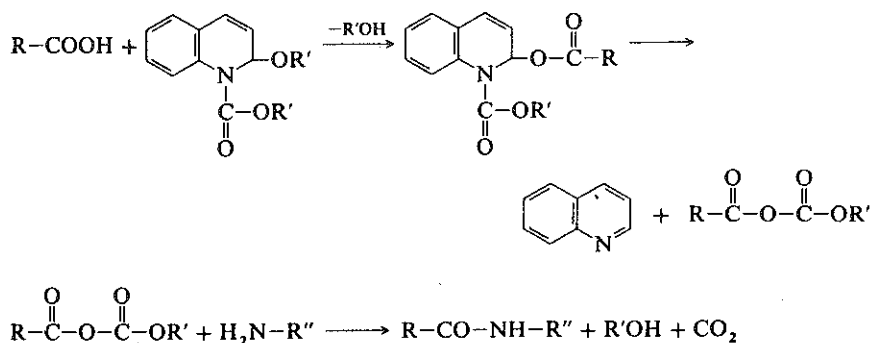
Σ' αυτό το σημείο πρέπει κανείς να ρωτήσει ποια είναι τα κριτήρια εκλογής των αντιδραστηρίων σύζευξης. Τα κριτήρια του τέλειου αντιδραστηρίου είναι μάλλον αυστηρά. Πρέπει να είναι αδρανές ως προς το αμινο-συστατικό (το οποίο υπάρχει ήδη στο μίγμα της αντίδρασης κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης), δεν πρέπει να δημιουργεί ένα δραστικό ενδιάμεσο παράγωγο που να περιέχει ένα πυρηνόφιλο κέντρο (γιατί αυτό μπορεί να ανταγωνισθεί με το αμινο-συστατικό για την ακυλομάδα) και δεν πρέπει να προκαλεί ισχυρή ενεργοποίηση, η οποία θα οδηγήσει σε παράπλευρες αντιδράσεις και επομένως σε παραπροϊόντα. Στην πραγματικότητα ακόμη και το πιο επιτυχημένο αντιδραστήριο, το DCC, δεν είναι πλήρως ελεύθερο από ατέλειες και δίνει καλλίτερα αποτελέσματα όταν χρησιμοποιείται με ενεργοποιημένη μορφή και οι συμμετρικοί ανυδρίτες ή οι ενεργοί εστέρες που παράγονται έτσι εφαρμόζονται για την επιθυμητή ακυλίωση.

ΣΤ. Σχηματισμός Δεσμού που καταλύεται από Ένζυμα

Απουσία οξέων ή βάσεων οι πεπτιδικοί δεσμοί δεν υδρολύονται εύκολα, αλλά η υδρολυτική τους διάσπαση επιταχύνεται πολύ παρουσία πρωτεολυτικών ενζύμων. Η αξιοσημείωτη καταλυτική δράση αυτών των ενζύμων δέλεασε πολλούς ερευνητές για μεγάλο χρονικό διάστημα (Fruton 1982) να τα υιοθετήσουν για τη σύνθεση μάλλον παρά για την υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών. Αφού τα ένζυμα είναι καταλύτες και απλώς επιταχύνουν την αποκατάσταση της ισορροπίας, είναι δυνατό να χρησιμοποιήσουμε τα πρωτεολυτικά ένζυμα για σχηματισμό αμιδικού δεσμού, εάν η ισορροπία της αντίδρασης μπορεί να τροποποιηθεί. Έτσι τα ανιλίδια προστατευμένων αμινοξέων θα μπορούσαν να παρασκευασθούν με τη βοήθεια της παπαΐνης:

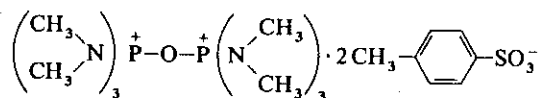


Η ανιλίνη χρησιμοποιήθηκε σε μεγάλη περίσσεια και το ανιλίδιο επειδή είναι αδιάλυτο στο νερό ξεχωρίζει από το μίγμα της αντίδρασης. Και οι δύο παράγοντες μετατοπίζουν την ισορροπία προς τα δεξιά και γι' αυτό το ανιλίδιο θα μπορούσε να ληφθεί σε μεγάλη απόδοση. Μια πρακτική εφαρμογή αυτής της προσέγγισης είναι ο διαχωρισμός ενός μίγματος εναντιομερών, γιατί μόνον το L-παράγωγο (ενός N-ακυλο-αμινοξέος)

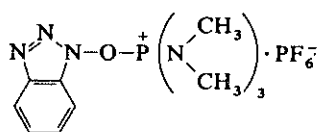


και ακόμη προσφέρει μερικά πλεονεκτήματα στην εκτέλεση της σύζευξης. Για παράδειγμα δε χρειάζεται τριτοταγής αμίνη για εξουδετέρωση του HCl που σχηματίζεται όταν οι μικτοί ανυδρίτες παρασκευάζονται μέσω των χλωροκαρβονικών οξέων και η κινολίνη που ελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης είναι μια εξαιρετικά ασθενής βάση που δεν προκαλεί ρακεμοποίηση ή άλλες παράπλευρες αντιδράσεις με αφαίρεση πρωτονίου.

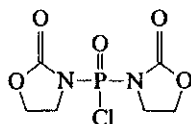
Τα τελευταία χρόνια τα φωσφονικά παράγωγα όπως το αντιδραστήριο Bates (Bates et al. 1975)



ή το αντιδραστήριο BOP, εξαφθοροφωσφορικό άλας του βενζοτρίαζολυλο N-οξυτρι-διμεθυλαμινο-φωσφονικού οξέος (Castro et al. 1975)



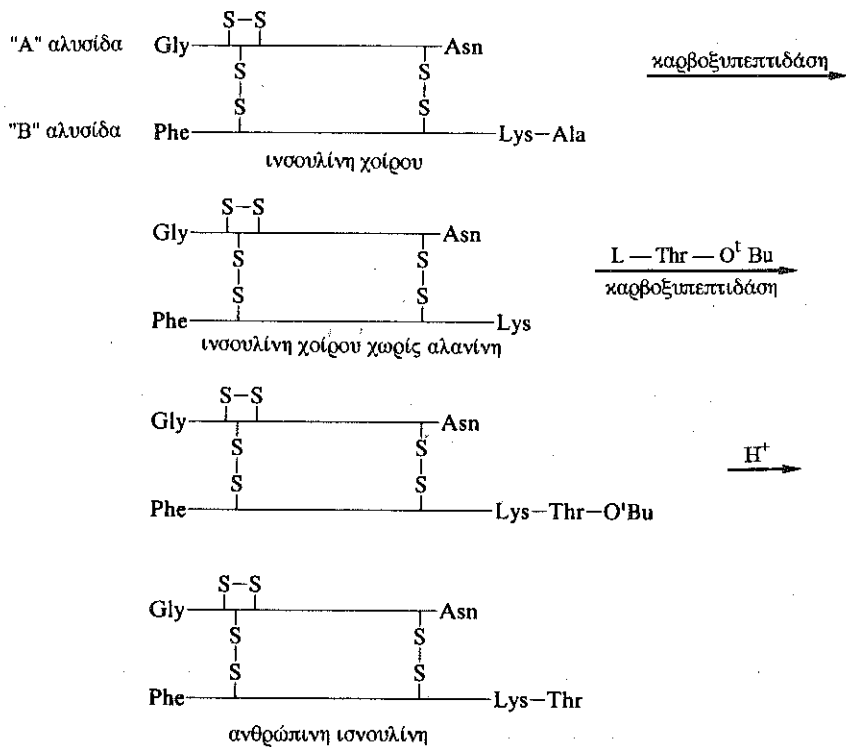
βρήκαν εφαρμογή στη σύνθεση αρκετά πολύπλοκων πεπτιδίων. Το φωσφονικό χλωρίδιο "BOP-Cl" (Diazo-Meseguer et al. 1980).



χρησιμοποιείται με επιτυχία σε μερικές δύσκολες αντιδράσεις σύζευξης. Το O-βενζο-τριαζολυλο-τετραμεθυλο-ισοουρονικό εξαφθοροφωσφορικό παράγωγο της σειράς ("HBTU", Dourtoglou et al. 1978)

μετατρέπεται, το παράγωγο του D-αμινοξέος παραμένει αναλλοίωτο και μπορεί εύκολα να διαχωριστεί από το αδιάλυτο ανιλίδιο της L-ένωσης.

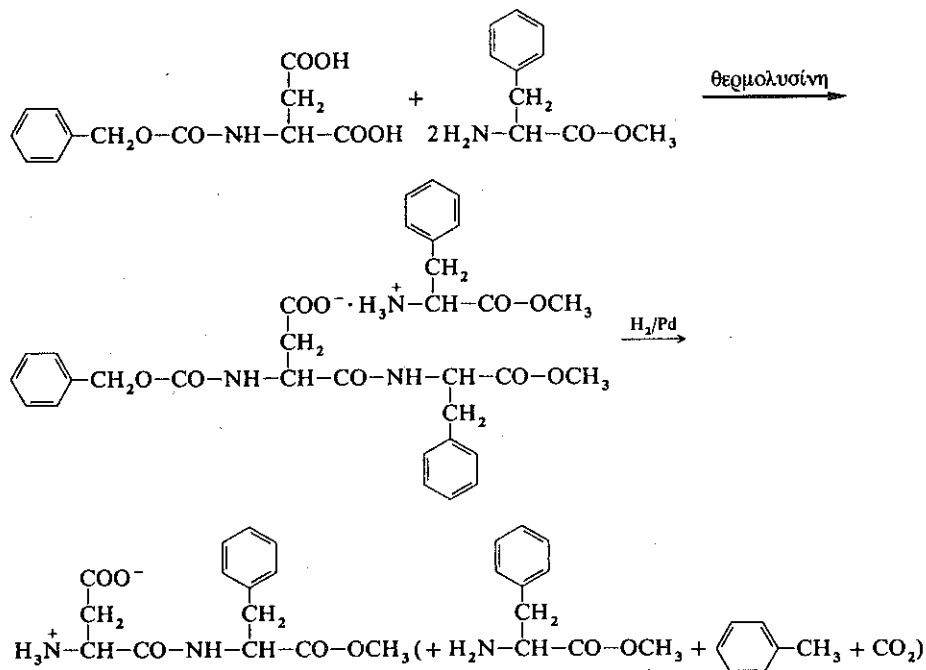
Μια πιο γενική χρήση των πρωτεολυτικών ενζύμων στην πεπτιδική σύνθεση έγινε δυνατή με την ανακάλυψη (Sealock and Laskowsky 1969) της επίδρασης αναμιγνυόμενων με το νερό οργανικών διαλυτών επί της ισορροπίας της υδρόλυσης και σύνθεσης πεπτιδικών δεσμών που καταλύονται από ένζυμα. Παρουσία της ισοπροπανόλης (ή του διμεθυλοφορμαμίδιου κλπ.) η διάσπαση της καρβοξυλικής ομάδας περιορίζεται και τουλάχιστον σε μια ορισμένη περιοχή pH η ισορροπία μετατοπίζεται προς τη σύνθεση. Μια αξιοσημείωτη περίπτωση είναι η μετατροπή της ινσουλίνης από χοίρο σε ανθρώπινη ινσουλίνη. Η ενζυμική διάσπαση του C-τελικού αμινοξέος της B-αλυσίδας (αλανίνη) με καρβοξυπεπτιδάση δίνει την ινσουλίνη του χοίρου που δεν έχει αλανίνη. Η διάσπαση αυτή ακολουθείται από την ενσωμάτωση της L-θρεονίνης, με τη μορφή του τριτοταγούς βουτυλεστέρα της, που χρησιμοποιείται σε μεγάλη περίσσεια και παρουσία ισοπροπανόλης:



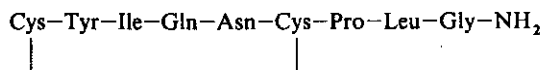
Η απομάκρυνση με όξινη υδρόλυση της τριτοταγούς βουτυλομάδας συμπληρώνει τη μετατροπή. Αυτός ο μετασχηματισμός γίνεται σε βιομηχανική κλίμακα.

Τα τελευταία χρόνια έγιναν πολλές προσπάθειες να χρησιμοποιηθούν ένζυμα για τη συστηματική παρασκευή πεπτιδικών αλυσίδων και μερικές από αυτές τις συνθέσεις

ήταν αρκετά επιτυχείς. Για παράδειγμα η τεχνητή γλυκαντική ύλη ασπαρτάμη θα μπορούσε να παρασκευασθεί χωρίς προστασία της β-καρβοξυλομάδας του ασπαραγινικού οξέος. Στην αντίδραση που καταλύεται από τη θερμολύση μεταξύ του βενζυλοξυκαρβονυλο-L-ασπαραγινικού οξέος και του μεθυλεστέρα της L-φαινυλαλανίνης σε περίσσεια, σε pH 7 η ισορροπία μετατοπίζεται προς τα δεξιά



γιατί το προϊόν διαχωρίζεται από το μίγμα της αντίδρασης σαν αδιάλυτο άλας. Η παρασκευή της τελικής ένωσης συμπληρώνεται με την απομάκρυνση της βενζυλοξυκαρβονυλομάδας με υδρογόνωση. Μια πιο φιλόδοξη προσπάθεια, η σύνθεση του αμιδίου του εννεαπεπτιδίου της οξυτοκίνης



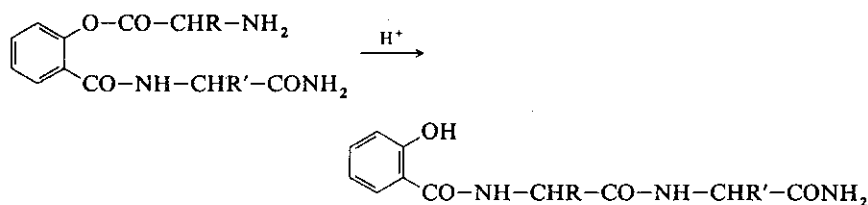
απαίτησε τη χρήση αρκετών πρωτεολυτικών ενζύμων της καρβοξυπεπτιδάσης Υ, της χυμοθρυψίνης, της χυμοπαπαΐνης, της θρυψίνης και της ειδικής ενδοπεπτιδάσης που διασπά το δεσμό μετά την προλίνη. Ο συνδυασμός της ενζυμικής σύζευξης με χημικές μεθόδους σχηματισμού πεπτιδικού δεσμού φάνηκε να είναι πιο πρακτικός. Σε γενικούς όρους θα μπορούσε να αναφερθεί ότι η εξειδίκευση των ενζύμων οδηγεί σε μεγάλες διακυμάνσεις των ταχυτήτων σύζευξης σε αντιδράσεις όπου εμπλέκονται διαφορετικά αμινοξέα. Έτσι φαίνεται να είναι πιθανόν ότι για τη σύνθεση διαφόρων πεπτιδικών δεσμών πρέπει να τηρηθούν ιδιαίτερες βέλτιστες συνθήκες και ακόμη και το ένζυμο πρέπει ίσως να επιλεγεί με προσοχή. Περαιτέρω πρέπει να εξετασθούν προσεκτικά, η υδρολυτική ικανότητα και του ενζύμου και των συνθηκών που εφαρμόζονται γιατί θα

ήταν μάλλον ατυχία να σχηματισθεί ένας νέος πεπτιδικός δεσμός με τη δαπάνη της διάσπασης ενός άλλου. Φαίνεται αυτή τη στιγμή ότι η σύνθεση που καταλύεται από ένζυμο θα παίξει ένα σημαντικό ρόλο στην παρασκευή ορισμένων επιλεγμένων ενώσεων, αλλά είναι λιγότερο πιθανόν ότι θα αντικαταστήσει τις μεθόδους της οργανικής χημείας στη γενική τακτική της πεπτιδικής σύνθεσης.

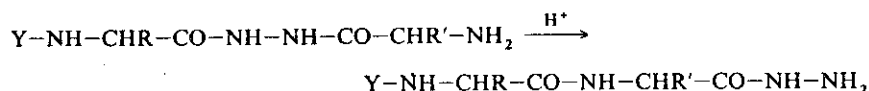
Z. Μη Συμβατικές Μέθοδοι Σχηματισμού Πεπτιδικού Δεσμού

Η αξιοσημείωτα εύκολη σύνθεση των πρωτεϊνών στα ριβοσώματα των κυττάρων φαίνεται να δρα σαν κίνητρο για τους οργανικούς χημικούς να στραφούν σε νέες επιλογές στην πεπτιδική σύνθεση. Δύο παραδείγματα αναφέρονται εδώ σαν παραδείγματα εφευρετικότητας αν και οι δύο μέθοδοι υστερούν σε πρακτική εφαρμογή αυτή τη στιγμή.

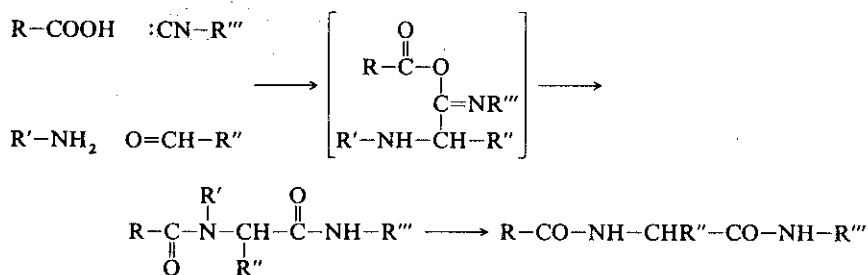
Η καταλυόμενη από οξέα μετάθεση των Ο-αμινοακυλο σαλικυλαμιδίων (Brenner et al. 1955)



και η κάπως ανάλογη αντίδραση των ακυλαμινοακυλο-αμινοακυλο-υδραζινών (Brenner και Hofer 1961)

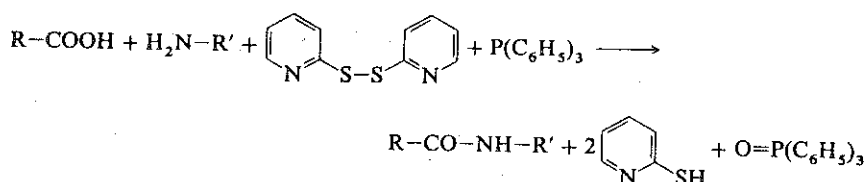


συνεπάγονται την παρεμβολή ενός αμινοξέος σε έναν πεπτιδικό δεσμό. Στην ίσως ακόμη πιο περίεργη μέθοδο (Ugi 1980) των τεσσάρων κέντρων συμπύκνωσης (4CC) ένα νέο αμινοξύ δημιουργείται από μια αλδεΐδη

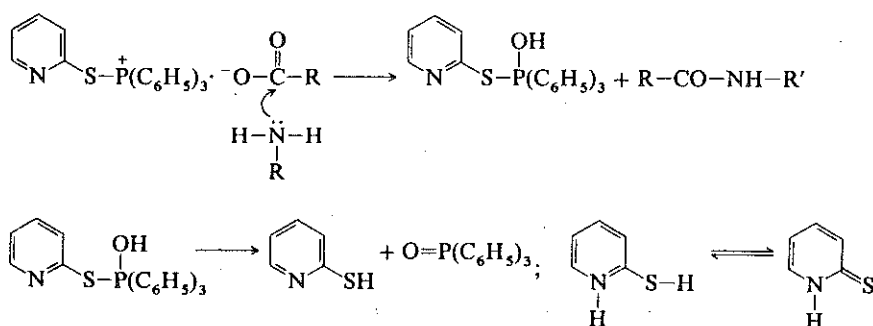


Με τη χρησιμοποίηση οπτικής ενεργών αρχικών υλικών έγινε δυνατό να επιτευχθεί επαγωγικώς ασύμμετρη σύνθεση και να ληφθούν πεπτίδια σε εναντιομερώς καθαρή μορφή.

Μια εξίσου ενδιαφέρονσα και ίσως πιο πρακτική προσέγγιση στη σύζευξη είναι η μέθοδος οξειδωσης-αναγωγής, (Mukaiyama et al. 1968)



κατά την οποία σχηματίζεται πιθανώς ένα ενδιάμεσο ακυλοξυφωσφονικό παράγωγο:



Αυτές οι μέθοδοι αποδεικνύουν ότι για τους εφευρετικούς ανθρώπους ο σχηματισμός του πεπτιδικού δεσμού δεν είναι ένα τελειωμένο κεφάλαιο.

Αναφορές

- Anderson, G.W., Zimmerman, J.E., Callahan, F.M.: *J. Amer. Chem. Soc.* 85, 3039 (1963)
 Bates, A.J., Galpin, I.J., Hallett, A., Hudson, D. Kenner, G.W., Ramage, R.: *Helv. Chim. Acta* 58, 688 (1975)
 Belleau, D., Malek, G.: *J. Amer. Chem. Soc.* 90, 1651 (1968)
 Bodanszky, M: *Nature* 175, 685 (1955)
 Boissonnas, R.A.: *Helv. Chim. Acta* 34, 874 (1951)
 Brenner, M., Hofer, W.: *Helv. Chim. Acta* 44, 1794, 1798 (1961)
 Brenner, M., Zimmermann, J.P., Wehrmüller, J., Quitt, P., Photaki, I.: *Helv. Chim. Acta* 40, 1497 (1957)
 Castro, B., Dormoy, J.R., Evin G., Selve, C.: *Tetrahedron Lett.* 1975, 1219
 Chantrenne, H.: *Nature* 160, 603 (1947)
 Curtius, T.: *Ber. dtsh Chem. Ges.* 35, 3226 (1902)
 Diago-Meseguer, J., Palomo-Coll, A.L., Fernandez-Lizarbe, J.R. Zugaza-Bilbao, A.: *Synthesis* 541 (1980)
 Dourtoglou, J., Ziegler, J.Z., Gross, B.: *Tetrahedron Lett.* 1209 (1978)
 Fischer, E.: *Ber. dtsh Chem. Ges.* 36, 2094 (1903)
 Fruton, J.S. in *Advances in Enzymology*, vol. 53 Meister, A. ed. p. 239, New York, Wiley 1982

- König, W., Geiger, R.: *Chem. Ber.* 103, 788, 2024, 2034 (1970)
 König, W., Geiger, R.: *Chem. Ber.* 186, 3626 (1973)
 Kovacs, J., Kisfaludy, L., Ceprini, M. Q.: *J. Amer. Chem. Soc.* 89, 183 (1967)
 Kuprizewski, G.: *Rocz. Chem.* 35, 595 (1961); *Chem. Abstr.* 55, 27121i (1961)
 Leuchs, H.: *Ber. dtsh. Chem. Ges.* 69, 857 (1906)
 Mukaiyama, T., Ueki, M., Maruyama, H., Matsueda, R.: *J. Amer. Chem. Soc.* 90, 4490 (1968); *ibid.* 91, 1554 (1969)
 Pless, J., Boissonnas, R.A.: *Helv. Chim. Acta* 46, 1609 (1963)
 Sealock, R.W., Laskowski, M., Jr.: *Biochemistry* 8, 3703 (1969); cf. also Laskowski, M. in *Semisynthetic Peptides and Proteins*, Offord, R.E., DiBello, C., eds. p. 263, London, Acad. Press 1978
 Schwyzer, R., Iselin, B., Feurer, M.: *Helv. Chim. Acta* 38, 69 (1955); Schwyzer, R., Feurer, M., Iselin, B., Kägi, H. *Ibid.* 38, 80 (1955); Schwyzer, R., Feurer, M., Iselin, B.: *Ibid.* 38, 1067 (1955)
 Sheehan, J.C., Hess, G.P.: *J. Amer. Chem. Soc.* 77, 1067 (1955)
 Staab, H.A.: *Liebigs Ann. Chem.* 609, 75 (1957)
 Ugi, I. in *The Peptides*, vol. 2 (Gross, E., Meienhofer, J., eds.) p. 365, New York, Academic Press 1986
 Vaughan, J.R., Jr.: *J. Amer. Chem. Soc.* 73, 3547 (1951)
 Vaughan, J.R., Osato, R.L.: *J. Amer. Chem. Soc.* 73, 5553 (1951)
 Wieland, T., Bernhard, H.: *Liebigs Ann. Chem.* 572, 190 (1951)

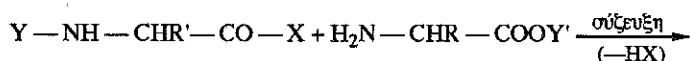
Περαιτέρω βιβλιογραφία

- Bodanszky, M.: *Active Esters in Peptide Synthesis*, in *The Peptides*, vol. 1, Gross, E., Meienhofer, J. eds., pp. 105-196, New York, Academic Press 1979
 Meienhofer, J.: *The Azide Method in Peptide Synthesis*, in *The Peptides*, vol. 1, Gross, E., Meienhofer, J. eds., pp. 197-239, New York Academic Press 1979
 Meienhofer, J.: *The Mixed Anhydride Method of Peptide Synthesis*, in *The Peptides* vol. 1, Gross, E., Meienhofer, J. eds., pp. 263-314, New York, Academic Press 1979
 Mukaiyama, T., Matsueda, R., Ueki, M.: *The Oxidation-Reduction Condensation*, in *The Peptides*, vol. 2, Gross, E., Meienhofer, J. eds, pp. 383-416, New York, Academic Press 1980

VI. Προστασία των Δραστικών Ομάδων

A. Προστασία των α-Αμινομάδων

Ενώ είναι απαραίτητο να προστατευθεί η αμινομάδα ενός αμινοξέος ή πεπτιδίου κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης της καρβοξυλομάδας που συμμετέχει στην επόμενη σύζευξη, είναι εξίσου σημαντικό να επιλεγθούν προστατευτικές ομάδες, οι οποίες να μπορούν εύκολα να απομακρυνθούν. Διαφορετικά η ακεραιότητα των ήδη σχηματισθέντων πεπτιδικών δεσμών θα τεθεί σε κίνδυνο. Εάν το πεπτίδιο που ελήφθηκε με μια αντίδραση σύζευξης πρέπει να επιμηκυνθεί από το N-άκρο του, τότε μια επιπλέον απαίτηση περιορίζει την εκλογή της αμινοπροστατευτικής ομάδας, γιατί πρέπει αυτή να απομακρύνεται σε συνθήκες, οι οποίες αφήνουν άθικτες τις προστασίες της καρβοξυλομάδας και των παράπλευρων δραστικών ομάδων. Επομένως η προστασία της α-αμινομάδας είναι γενικά *παροδική*, ενώ των άλλων δραστικών ομάδων ως επί το πλείστον *ημιμόνιμη*



X = ομάδα ενεργοποίησης

Y = παροδική αμινοπροστατευτική ομάδα

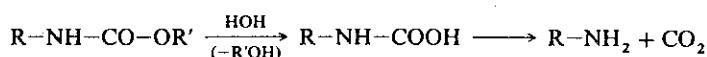
Y' = ημιμόνιμη καρβοξυλοπροστατευτική ομάδα

Αρκετές απλές αμινοπροστατευτικές ομάδες που παράγονται από καρβοξυλικά οξέα και χρησιμοποιούνται συχνά στην οργανική σύνθεση προφανώς δεν είναι κατάλληλες για την πεπτιδική σύνθεση. Για παράδειγμα η ακετυλίωση ή βενζοϋλίωση των αμινομάδων δεν είναι πρακτική, γιατί η δραστική υδρόλυση που χρειάζεται για την αποακυλίωση διασπά επίσης και τους πεπτιδικούς δεσμούς. Οι φορμυλο- και οι τριφθοροακετυλο-ομάδες βρέθηκαν να είναι χρήσιμες, αλλά ακόμη και αυτές χρησιμοποιού-

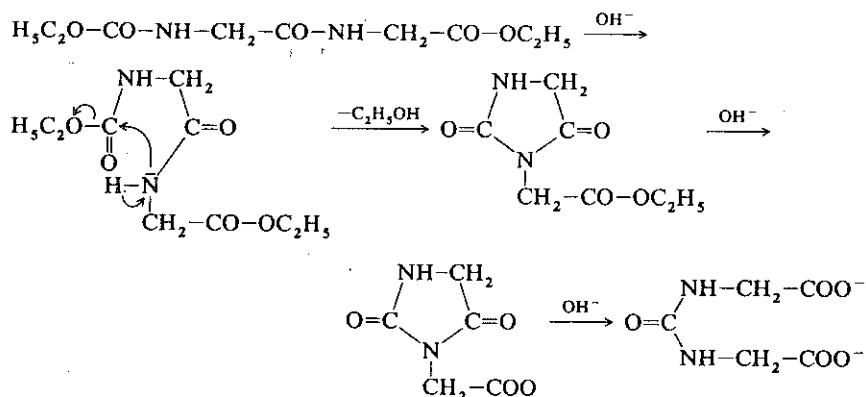
νται κυρίως για την προστασία αμινομάδων της παράπλευρης αλυσίδας και θα συζητηθούν σε σχέση μ'αυτές. Από την άλλη πλευρά τα παράγωγα του καρβονικού οξέος απέκτησαν βαθμιαία μια μονοπωλιακή θέση. Η αποτελεσματικότητά τους βασίζεται στην τάση των καρβαμιδικών οξέων να χάνουν αυθόρμητα διοξείδιο του άνθρακα:



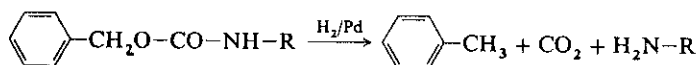
Έτσι προέκυψε η ελκυστική πιθανότητα της ενσωμάτωσης της αμινομάδας σ'έναν εστέρα του καρβαμιδικού οξέος. Στην ουρεθάνη που προκύπτει η υδρόλυση του εστέρα και η επακόλουθη αποκαρβοξυλίωση αναγεννούν την ελεύθερη αμίνη



Νεώτερες εντούτοις προσπάθειες σ'αυτήν την κατεύθυνση (Emil Fischer 1902) απέτυχαν. Οι ουρεθάνες, στις οποίες η πολικότητα της καρβονυλικής ομάδας ισοσταθμίζεται από τη διαθεσιμότητα των ηλεκτρονίων των γειτονικών ατόμων οξυγόνου και αζώτου, αντιστέκονται αξιοσημείωτα στη δράση των πυρηνόφιλων, συμπεριλαμβανομένου του καρβοξυλικού ιόντος. Έτσι κατά την κατεργασία του αιθυλοξυκαρβονυλο-γλυκυλο-γλυκίνο αιθυλεστέρα με άλκαλι μόνον η εστερική ομάδα του C-τελικού καρβοξυλίου σαπωνοποιήθηκε, ενώ η ουρεθανική ομάδα έχασε την αιθυλοξυ ομάδα της με ενδομοριακή μετάθεση με αποτέλεσμα την κυκλοποίηση προς μια υδαντοΐνη, η οποία στη συνέχεια άνοιξε και έδωσε ένα παράγωγο της ουρίας

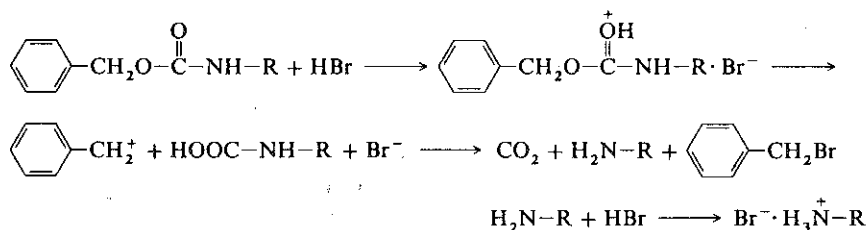


Ως εκ τούτου ήταν μια ανακάλυψη μεγάλης σπουδαιότητας όταν το 1932 οι Bergmann και Zervas πρότειναν την αντικατάσταση της αιθυλοξυκαρβονυλομάδας από την βενζυλοξυκαρβονυλο (ή "καρβοβενζοξυ" ή "καρβοβενζυλοξυ", Cbz ή Z) ομάδα. Η ομάδα αυτή υφίσταται ήπια ομολυτική διάσπαση με καταλυτική υδρογόνωση. Η αντίδραση συμπληρώνεται με αυθόρμητη αποκαρβοξυλίωση:



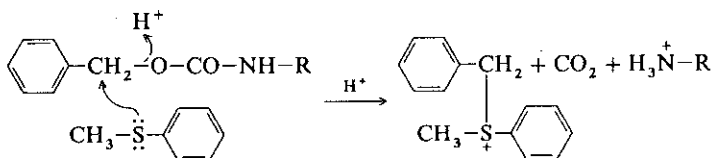
Η υδρογονόλυση των βενζυλεστέρων καταλύεται από μέταλλα της ομάδας του λευκοχρύσου, κυρίως από παλλάδιο. Το τελευταίο χρησιμοποιείται υπό μορφή μαύρου παλλαδίου ή παλλαδίου υποστηριζόμενου σε άνθρακα ή θειϊκό βάριο. Επιπλέον τα πολύ σπουδαία χαρακτηριστικά της μεθόδου, όπως η σταθερότητα του πεπτιδικού δεσμού στις συνθήκες της διαδικασίας αποπροστασίας, η σχετικά αβλαβής φύση των παραπροϊόντων, του τολουολίου και του διοξειδίου του άνθρακα που απομακρύνονται και τα δύο χωρίς δυσκολία κατέστησαν τη νέα προστατευτική ομάδα πολύ ελκυστική. Αντί του αερίου υδρογόνου μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν δότες υδρογόνου όπως η υδραζίνη, μυρμηκικό οξύ ή μυρμηκικό αμμώνιο, αλλά αυτά δεν είναι τελείως αδρανή ως προς τα πεπτίδια. Το πιο αβλαβές κυκλοεξανίο χρειάζεται αυξημένη θερμοκρασία για γρήγορη υδρογονόλυση, ενώ το πολύ δραστικό κυκλοεξαδιένιο είναι εξαιρετικά ακριβό. Επομένως η κλασική μέθοδος της υδρογόνωσης παρουσία παλλαδίου σε άνθρακα παραμένει η μέθοδος εκλογής στα περισσότερα εργαστήρια. Άλλες αναγωγικές μέθοδοι, για παράδειγμα αναγωγή με νάτριο σε υγρή αμμωνία χρησιμοποιούνται λιγότερο συχνά.

Η ανακάλυψη (Ben Ishai και Berger 1951) ότι η βενζυλοξυκαρβονυλομάδα διασπάται με επίδραση οξέων, κυρίως με HBr σε οξικό οξύ είχε μεγάλη επίδραση στην ανάπτυξη των προστατευτικών ομάδων. Στην ετερολυτική διάσπαση του δεσμού άνθρακα-οξυγόνου το βενζυλικό κατιόν παίζει ένα σημαντικό ρόλο διευκολύνοντας την αποσύνθεση του πρωτονιωμένου ενδιάμεσου παραγώγου:

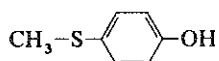


Κατά την αφαρμογή αυτής της αξιολόγησης μεθόδου δεν πρέπει φυσικά να διαφύγουν της προσοχής ούτε η δακρυγόνος δράση του βενζυλοβρωμίδιου, του παραπροϊόντος της αντίδρασης, ούτε η ικανότητά του να αλκυλιώνει διάφορες παράπλευρες αλυσίδες των αμινοξέων.

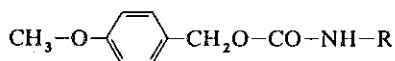
Το κλασικό αντιδραστήριο, το HBr σε οξικό οξύ, μπορεί να αντικατασταθεί από HBr σε τριφθοροοξικό οξύ, HBr σε υγρό SO₂ ή από υγρό SO₂ μόνο του. Φυσικά η βενζυλοξυκαρβονυλομάδα διασπάται γρήγορα με υγρό HF ή με ένα διάλυμα τριφθορομεθανοσουλφονικού οξέος σε τριφθοροοξικό οξύ. Πρέπει να αναφερθεί ότι απομακρύνεται επίσης με το πολύ λιγότερο δραστικό τριφθοροοξικό οξύ. Σε αυξημένες θερμοκρασίες η αντίδραση προχωρά πολύ γρήγορα, σε θερμοκρασία δωματίου χρειάζεται αρκετές μέρες για να συμπληρωθεί. Προσθήκη θειοανισόλης (Yajima et al. 1978) επιταχύνει πολύ την αντίδραση



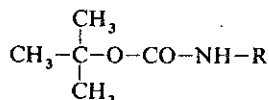
και παρόμοια αποτελέσματα επιτυγχάνονται επίσης με την λιγότερο πτητική 4-μεθυλοθειοφαινόλη



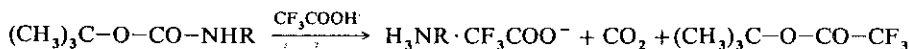
Σύντομα έγινε φανερό ότι η ευαισθησία σε οξέα της βενζυλοξυκαρβονυλομάδας μπορεί να αυξηθεί με κατάλληλες τροποποιήσεις της βενζυλομάδας. Υποκαταστάτες που ελευθερώνουν ηλεκτρόνια προκαλούν το σχηματισμό πιο σταθερών κατιόντων, έτσι η p-μεθοξυβενζυλοξυκαρβονυλομάδα



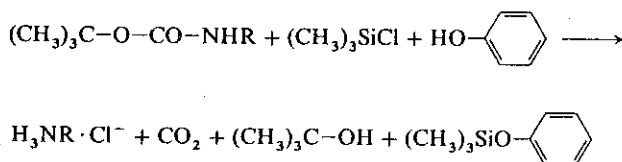
διασπάται με ασθενέστερα οξέα, όπως αραιά διαλύματα HCl σε οξικό οξύ και επίσης με τριφθοροξικό οξύ. Παρόμοια ευαισθησία σε οξέα παρέχεται με αντικατάσταση της βενζυλομάδας με την tert.βουτυλομάδα, πηγή σταθερών κατιόντων:



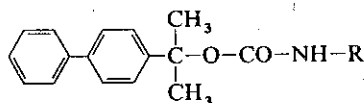
Η tert. βουτυλοξυκαρβονυλομάδα, η πιο ευρέως ίσως χρησιμοποιούμενη ομάδα για την προστασία της αμινομάδας, απομακρύνεται εύκολα με τριφθοροξικό οξύ



και επίσης με άλλα όξινα αντιδραστήρια, για παράδειγμα με τριμεθυλοχλωροσιλάνιο παρουσία φαινόλης:



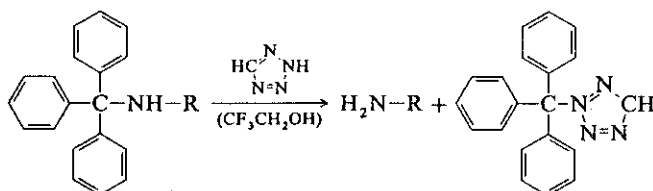
Περαιτέρω τροποποιήσεις στην ίδια κατεύθυνση είχαν επιτυχία με την πολύ ευαίσθητη σε οξέα διφαινυλοϊσοπροπυλοξυκαρβονυλομάδα (Bpoc), (Sieber and Iselin 1968)



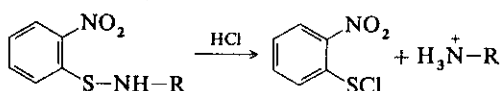
η οποία έδωσε καλά αποτελέσματα σε αρκετές απαιτητικές συνθέσεις.

Η ευαισθησία σε οξέα δεν περιορίζεται σε προστατευτικές ομάδες τύπου ουρεθάνης. Έτσι, η τριφαινυλομεθυλο (trityl, Trt) ομάδα διασπάται με οξικό οξύ και επίσης με

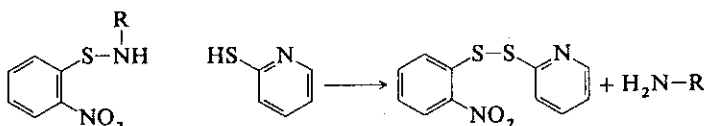
τετραζόλιο σε τριφθοροαιθανόλη



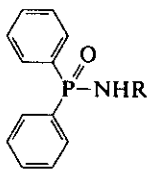
ενώ η ο-νιτροφαινυλοσουλφένυλο (Nps) ομάδα απομακρύνεται με αραιά διαλύματα HCl σε οργανικούς διαλύτες:



Αμίνες προστατευμένες με την Nps ομάδα μπορούν να αναγεννηθούν επίσης με θειώλυση, για παράδειγμα με 2-μερκαπτοπυριδίνη:

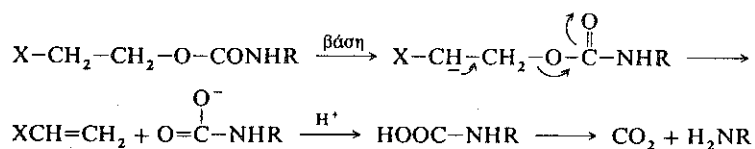


Η διφαινυλοφωσφινυλο ομάδα

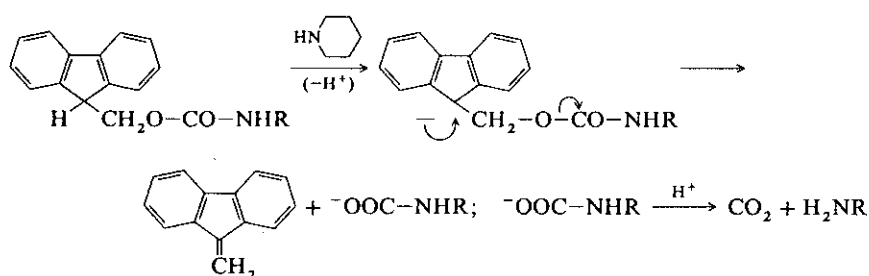


απομακρύνεται με ένα διάλυμα p-τολουολοσουλφονικού οξέος σε ισοπροπανόλη ή διμεθυλοφορμαμίδιο. Αντίθετα με την όξινη διάσπαση που βασίζεται στη δημιουργία σταθερών καρβο-κατιόντων, σ' αυτή την πορεία δεν παράγονται αλκυλιωτικά μέσα.

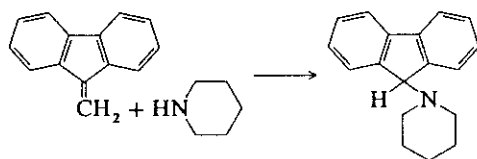
Με σκοπό να σχεδιάσουμε τη σύνθεση πολύπλοκων πεπτιδίων που περιέχουν αρκετές δραστικές παράπλευρες αλυσίδες, είναι ανάγκη να έχουμε μια ποικιλία μεθόδων προστασίας και αποπροστασίας στη διάθεσή μας. Γι' αυτό ήταν ένα σημαντικό βήμα προς αυτήν την κατεύθυνση όταν επιπλέον της αναγωγής και της επίδρασης οξέων έγινε δυνατή η αποπροστασία με ασθενείς βάσεις σε ήπιες συνθήκες. Για πολλά χρόνια γίνονταν πειράματα β-απόσπασης ευαίσθητης σε βάσεις σε αιθυλεστέρες που περιέχουν στο β-άτομο άνθρακα υποκαταστάτες δέκτες ηλεκτρονίων.



Μια επιτυχής εφαρμογή αυτής της αρχής είναι η 9-φλουορενυλομεθυλοξυκαρβονυλο (Fmoc) ομάδα (Carpino και Han 1970) που απομακρύνεται από την αμινομάδα με αφαίρεση πρωτονίου με δευτεροταγείς αμίνες. Δημιουργείται ένα καρβαμδικό οξύ, το οποίο στη συνέχεια χάνει διοξείδιο του άνθρακα και παρέχει την ελεύθερη αμίνη



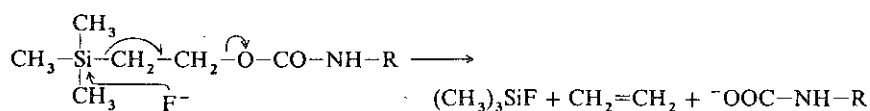
Το γεγονός ότι οι απροστάτευτες αμινομάδες είναι πράγματι ελεύθερες και όχι πρωτονιωμένες, όπως κατά την αποπροστασία με επίδραση οξέων, είναι ένα ιδιαίτερο πλεονέκτημα της μεθόδου. Η πιπεριδίνη είναι η συνιστώμενη βάση αν και σε μερικές περιπτώσεις μπορεί να ληφθούν καλλίτερα αποτελέσματα με διαιθυλαμίνη. Το παραπροϊόν, το διφαινυλοφυλβένιο, συνδυάζεται με τη δευτεροταγή αμίνη και δίνει μια σταθερή τριτοταγή βάση



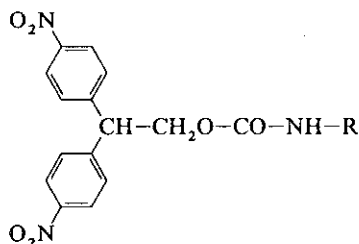
η οποία όμως συνήθως δεν παρεμβαίνει στην αντίδραση ή στην απομόνωση του προϊόντος.

Η ανάπτυξη των αμινοπροστατευτικών ομάδων δεν είναι ένα τελειωμένο κεφάλαιο. Το γεγονός ότι νέες προστατευτικές ομάδες ευαίσθητες σε ειδικά αντιδραστήρια μπορούν να σχεδιασθούν αποδείχθηκε από τον Carpino και τους βοηθούς του (1978), ο οποίος πρότεινε την τριμεθυλοσιλυλοαυτοξυκαρβονυλομάδα που διασπάται εκλεκτικά με το φθοριούχο ανιόν, που χρησιμοποιείται με τη μορφή των τετρααλκυλοαμμωνίων.

νισκῶν φθοριδίων:



Μια παρομοίως μεγάλη εκλεκτικότητα είναι χαρακτηριστική για την 2-δι-ρ-νιτροφαινυλοαιθυλοξυκαρβονυλομάδα

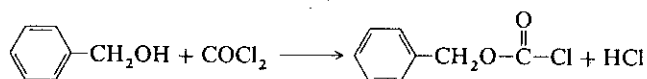


η οποία είναι σταθερή ως προς τα οξέα και τα αλκάλια και επίσης ως προς τις δευτεροταγείς αμίνες, όπως οι διαλκυλαμίνες ή η πιπεριδίνη, αλλά διασπάται ήπια από τις ισχυρές κυκλικές βάσεις



ακόμη και αν αυτές ρυθμιστούν με οξικό οξύ.

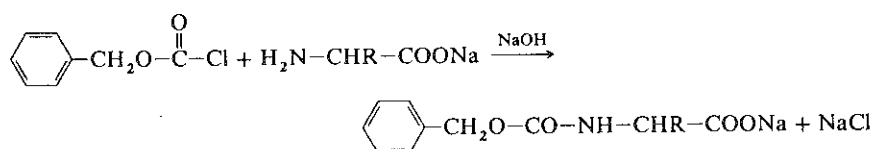
Πριν να κλείσουμε τη συζήτηση της προστασίας της αμινομάδας πρέπει να αναφέρουμε τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή N-προστατευμένων παραγώγων των αμινοξέων. Η κλασική μέθοδος που ακόμη εφαρμόζεται για την εισαγωγή της βενζυλοξυκαρβονυλομάδας είναι η ακυλίωση με τον κατάλληλο χλωροκαρβονικό αλκυλεστέρα¹. Αυτός λαμβάνεται κατά την αντίδραση του φωσγενίου με την αλκοόλη



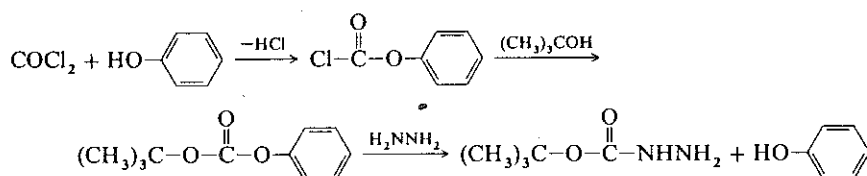
Μετά την απομάκρυνση του HCl που δημιουργείται κατά την αντίδραση (κατά πρό-
τίμηση με ρεύμα αζώτου) το αντιδραστήριο χρησιμοποιείται χωρίς καθαρισμό. Η από-
σταξη του χλωροκαρβονικού βενζυλεστέρα είναι δυνατή και μερικές φορές επιθυμητή

1 Η πιο συχνή χρησιμοποιούμενη έκφραση "χλωρομυρμηκικός εστέρας", ενώ τυπικά είναι σωστή, δεν υπονοεί το καρβονικό οξύ. Εντούτοις, η προστασία με μορφή ουρεθάνης βασίζεται στη χημεία των καρβονικών οξέων.

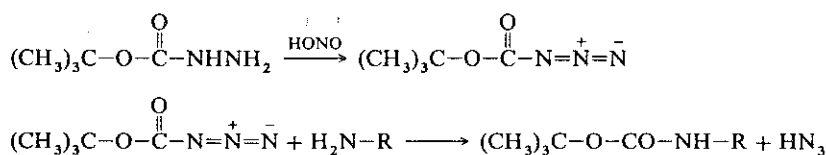
αλλά πρέπει να γίνεται σε υψηλό κενό, γιατί σε υψηλότερη θερμοκρασία και επίσης κατά τη φύλαξη το αντιδραστήριο διασπάται προς φωσγένιο και διβενζυλεστέρα του καρβονικού οξέος. Το χλωροκαρβονικό οξύ προστίθεται σε υδατικό διάλυμα του αμινοξέος παρουσία αλκάλειος



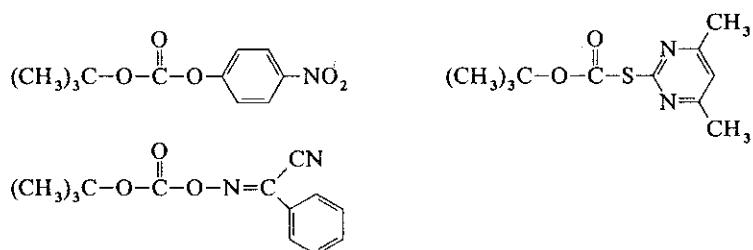
και τα προστατευμένα αμινοξέα λαμβάνονται με οξίνιση που ακολουθείται από απόσταξη ή κρυστάλλωση. Αυτή η απλή προσέγγιση δεν είναι πρακτική στην περίπτωση της tert-βουτυλοξυκαρβονυλομάδας (Boc) γιατί ο tert βουτυλοχλωροκαρβονικός εστέρας δεν είναι αρκετά σταθερός για να απομονωθεί και να φυλαχθεί. Έτσι παρασκευάστηκε το tert-βουτυλοξυκαρβονυλο-υδραζίδιο με επίδραση υδραζίνης επί του φαινυλεστέρα



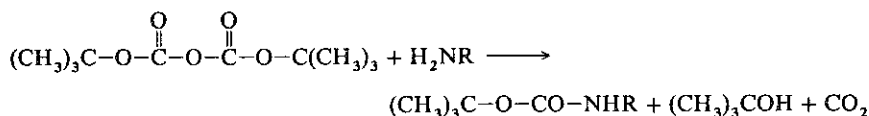
και αυτό μετατράπηκε σε αζίδιο (αζιδομυρμηκικός-tert-βουτυλεστέρας), που είναι ικανό ακυλιωτικό μέσο.



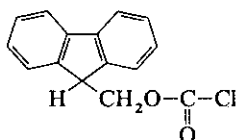
Η χρήση του αζιδίου όμως δημιούργησε σοβαρά προβλήματα. Μερικές φορές αναφέρθηκαν εκρήξεις και το υδραζωτικό οξύ που παράγεται κατά την ακυλίωση είναι πολύ τοξικό. Γι'αυτό τα Boc παράγωγα των αμινοξέων παρασκευάζονται συχνά με τη βοήθεια ενεργών εστέρων. Από τα πολλά αντιδραστήρια που προτάθηκαν γι'αυτό το σκοπό μόνον λίγα παρουσιάζονται εδώ.



Πιο πρόσφατα ο *tert.*βουτυλεστέρας του πυροκαρβονικού οξέος που συνήθως περιγράφεται σαν *tert.*βουτυλοδικαρβονικός ανυδρίτης, ή Boc-ανυδρίτης κέρδισε αξιοσημείωτη δημοτικότητα, κυρίως γιατί τα προϊόντα που σχηματίστηκαν κατά την εισαγωγή της Boc ομάδας είναι αβλαβή και απομακρύνονται εύκολα

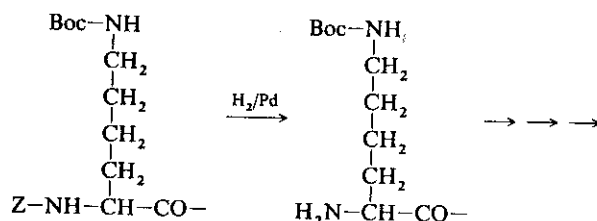


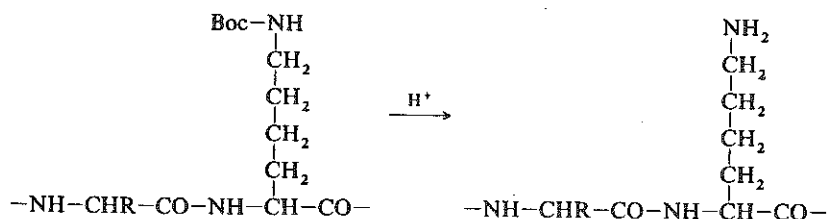
Οι μέθοδοι που συζητήθηκαν εδώ εφαρμόζονται επίσης για την ενσωμάτωση και άλλων προστατευτικών ομάδων τύπου ουρεθάνης. Σε μερικές περιπτώσεις επικρατεί η παλιά μέθοδος των χλωριδίων. Για παράδειγμα ο χλωροκαρβονικός 9-φλουορενυλομεθυλεστέρας, ένα σταθερό κρυσταλλικό στερεό, επιτρέπει ήπια εισαγωγή της Fmoc ομάδας



B. Προστασία των Αμινομάδων της Παράπλευρης Αλυσίδας

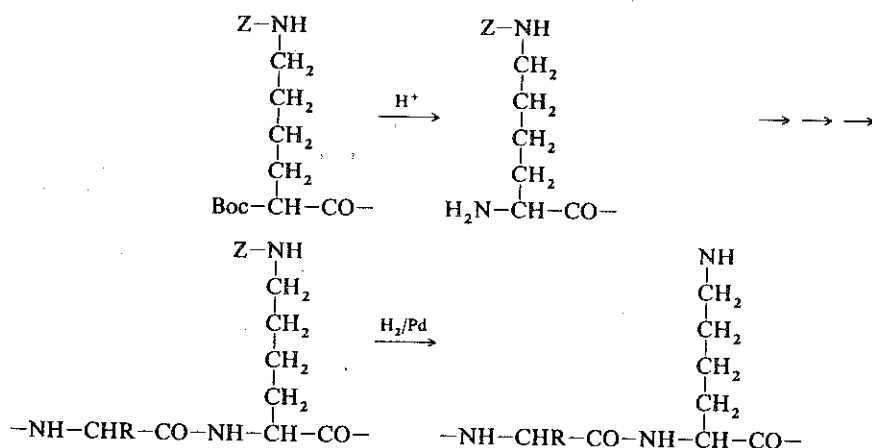
Με σκοπό να εμποδισθεί η διακλάδωση της επιμηκυνόμενης πεπτιδικής αλυσίδας πρέπει να προστατεύσουμε την αμινομάδα της παράπλευρης αλυσίδας της λυσίνης (και της ορνιθίνης). Η προστατευτική ομάδα που χρησιμοποιείται γι' αυτό το σκοπό πρέπει να παραμένει στη θέση της κατά την πορεία επιμήκυνσης της αλυσίδας, επομένως πρέπει να μην είναι ευαίσθητη στα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την αποπροστασία των α-αμινομάδων και να απομακρύνεται μόνον στο τέλος της πεπτιδικής σύνθεσης. Προφανώς χρειάζεται μια αμινο-προστατευτική ομάδα διαφορετική από εκείνη που χρησιμοποιήθηκε για την παροδική προστασία των α-αμινομάδων. Ένας κλασικός συνδυασμός που εφαρμόστηκε στη σύνθεση μεγαλύτερων πεπτιδίων είναι η προστασία των αμινομάδων της παράπλευρης αλυσίδας με την *tert.*βουτυλοξυκαρβονυλομάδα (Boc) και των α-αμινομάδων με την βενζυλοξυκαρβονυλομάδα (Z). Τα βήματα της σύζευξης ακολουθούνται από καταλυτική υδρογόνωση η οποία αποπροστατεύει την α-αμινομάδα και επιτρέπει την ακυλίωσή της στο επόμενο βήμα επιμήκυνσης της αλυσίδας. Η Boc-ομάδα, ανεπηρέαστη κατά την υδρογονόλυση, διασπάται μετά το τέλος της σύνθεσης πιο συχνά με τριφθοροξικό οξύ:



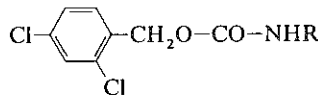
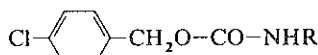
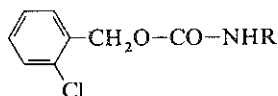
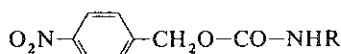


Κατά μια έννοια αυτό είναι ένα τέλειο παράδειγμα *ορθογωνικής* προστασίας στην οποία εφαρμόζονται δύο διαφορετικές χημικές αντιδράσεις, μια για την απομάκρυνση της παροδικής και η άλλη για τη διάσπαση της ημιμόνιμης προστατευτικής ομάδας. Δυστυχώς ο συνδυασμός αυτός δεν μπορεί εύκολα να χρησιμοποιηθεί στη σύνθεση πεπτιδίων που περιέχουν θειούχα αμινοξέα, γιατί η δηλητηρίαση του καταλύτη εμποδίζει τη μέθοδο. Είναι δυνατόν να χρησιμοποιήσουμε προστατευτικά μέτρα όπως προσθήκη βάσης ή χρήση υγρής αμμωνίας σαν διαλύτη, όταν η πηγή των δυσκολιών είναι τα αμινοξέα μεθειονίνης, αλλά τα αμινοξέα της κυστεΐνης παρουσιάζουν ένα λιγότερο εύκολα υπερπηδούμενο εμπόδιο.

Η χρησιμοποίηση αυτών των ομάδων με την αντίθετη έννοια, δηλαδή η Z ομάδα για την προστασία της παράπλευρης αλυσίδας των αμινοξέων της λυσίνης και η Boc ομάδα για την παροδική προστασία της α-αμινομάδας είναι γενικά πιο εφαρμόσιμη



Αυτό είναι μια *μη ορθογωνική* προστασία, αφού και οι δύο προστατευτικές ομάδες διασπώνται με οξέα, το ένα με ήπιες, το άλλο με πιο δραστικές συνθήκες. Επομένως ο συνδυασμός των Z και Boc ομάδων μ'αυτόν τον τρόπο δεν είναι τέλειος, γιατί συμβαίνει ένα μικρό αλλά όχι αμελητέο χάσιμο της Z-ομάδας από τις παράπλευρες αλυσίδες της λυσίνης κατά την επαναλαμβανόμενη απομάκρυνση των Boc ομάδων. Αυτή η ατέλεια φαίνεται να είναι μικρή, αλλά αποτελεί πηγή ανεπιθύμητων παραπροϊόντων. Μια λύση γι'αυτό το πρόβλημα είναι να καταστήσουμε τη Z ομάδα λιγότερο ευαίσθητη στα οξέα αποσταθεροποιώντας το βενζυλικό κατίον με υποκαταστάτες που έλκουν ηλεκτρόνια. Οι τροποποιημένες Z ομάδες όμως απαιτούν πολύ ισχυρά οξέα,

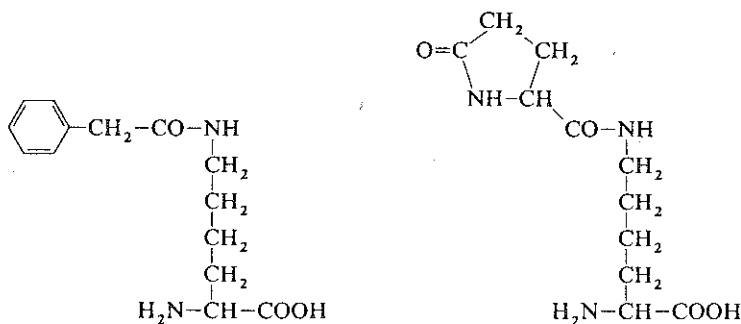


όμως απαιτούν πολύ ισχυρά οξέα, όπως υδροφθόριο ή τριφθορομεθανοσουλφονικό οξύ για την απομάκρυνσή τους κατά την τελική αποπροστασία. Αυτά τα ισχυρά οξέα όμως προκαλούν διάφορες παράπλευρες αντιδράσεις που συζητούνται στο Κεφάλαιο VII, με πρωτονίωση ακόμη και πολύ ασθενών βασικών ομάδων του ήδη σχηματισθέντος πεπτιδίου.

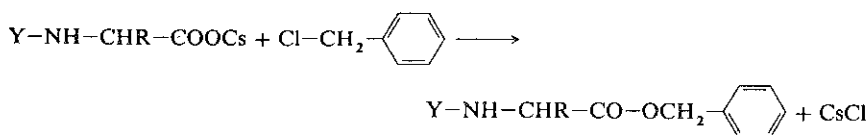
Ένας εναλλακτικός τρόπος για να αυξηθεί η εκλεκτικότητα κατά την απομάκρυνση των δύο διαφορετικών προστατευτικών ομάδων είναι να αυξηθεί η ευαισθησία της μιας από αυτές ως προς τα οξέα. Η σκέψη αυτή οδήγησε στην ανάπτυξη της ήδη αναφερθείσας διφαινυλοισοπροπυλοξυκαρβονυλομάδας (Broc) και στην εφαρμογή της πολύ ευαίσθητης σε οξέα τριφαινυλομεθυλομάδας (trityl).

Από αυτή τη συζήτηση φαίνεται ότι οι ορθογωνικοί συνδυασμοί υπερισχύουν σε σχεδιασμούς που βασίζονται σε διαφορές της ευαισθησίας ως προς το ίδιο αντιδραστήριο. Ένας ιδιαίτερα υποσχόμενος και ήδη παραδεκτός ορθογωνικός συνδυασμός είναι η χρήση της ευαίσθητης σε βάσεις 9-φλουορενυλομεθυλοξυκαρβονυλομάδας (Fmoc) για την παροδική προστασία των α-αμινομάδων και της tert.βουτυξυκαρβονυλομάδας (Boc) για την προστασία της αμινομάδας της παράπλευρης αλυσίδας των αμινοξέων της λυσίνης. Τα καρβοξύλια, συμπεριλαμβανομένης της καρβοξυλικής ομάδας του C-άκρου, προστατεύονται με τη μορφή των tert.βουτυλεστέρων, τα υδροξύλια σαν tert.βουτυλαιθέρες.

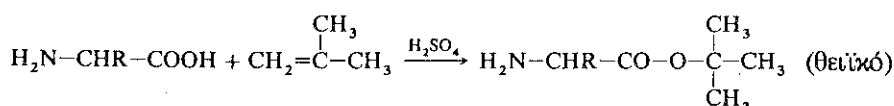
Σ' αυτό το σημείο πρέπει να αναφερθεί μια περαιτέρω και αρκετά ενδιαφέρουσα δυνατότητα. Η αμινομάδα της παράπλευρης αλυσίδας της λυσίνης μπορεί να προστατευθεί με μια προστατευτική ομάδα, η οποία είναι σταθερή στις συνθήκες που χρησιμοποιούνται για την απομάκρυνση ευαίσθητων σε οξέα και βάσεις προστατευτικών ομάδων, αλλά διασπάται με καταλύμενη από ένζυμα υδρόλυση. Εκλεκτικές υδρολάσες της N^ε-ακετυλολυσίνης δε διατίθενται εύκολα, αλλά η καλά μελετηθείσα πενικιλλινο-αμιδοϋδρολάση είναι ένας ικανός καταλύτης για την υδρόλυση της N^ε-φαινυλοακετυλολυσίνης. Ομοίως, η N^ε-πυρογλουταμυλο-λυσίνη υδρολύεται παρουσία πυρολιδονο-καρβοξυλοπεπτιδάσης σε ήπιες συνθήκες. Αυτές οι ακυλομάδες μπορούν να κρατηθούν άθικτες κατά τη διάρκεια της σύνθεσης και να απομακρυνθούν στο τελικό στάδιο



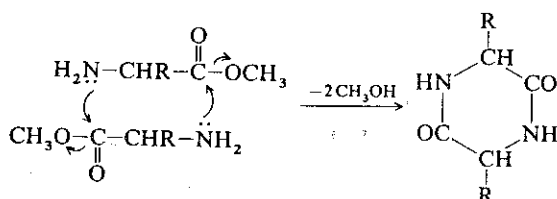
Η σαπωνοποίηση με αλκάλια που χρησιμοποιείται γενικά για την απομάκρυνση των μεθυλο και αιθυλο-εστέρων αποφεύγεται εάν αντί των απλών αλκυλεστέρων χρησιμοποιηθούν για την προστασία των καρβοξυλομάδων βενζυλεστέρες ή *tert.*βουτυλεστέρες. Οι βενζυλεστέρες εκτός από την καταλυόμενη από οξέα εστεροποίηση μπορούν επίσης να ληφθούν κατά την αντίδραση αλάτων του κασίου των προστατευμένων αμινοξέων με βενζυλοχλωρίδιο:



Η προσθήκη της καρβοξυλομάδας σε ισοβουτένιο, παρουσία ισχυρών οξέων, χρησιμοποιείται για την παρασκευή *tert.*βουτυλεστέρων:

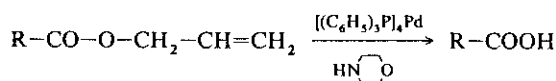


Τα άλατα των *tert.*βουτυλεστέρων που λαμβάνονται μ' αυτό τον τρόπο μπορούν να μετατραπούν στις ελεύθερες αμίνες που είναι σταθερές και μπορούν να φυλαχθούν, ενώ οι ελεύθεροι μεθυλο-, αιθυλο- και βενζυλο- εστέρες υφίστανται αυτοσυμπύκνωση προς δικετοπιπεραζίνες

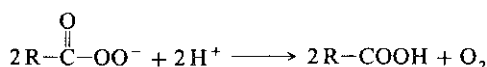
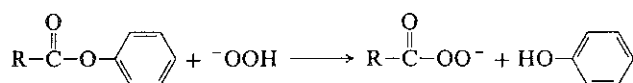


Οι βενζυλεστέρες διασπώνται με καταλυτική υδρογόνωση και επίσης με επίδραση οξέων μόνον σε εξαιρετικά δραστικές συνθήκες. Υποκαταστάτες που έλκουν ηλεκτρόνια, όπως η νιτρο-ομάδα των *p*-νιτροβενζυλεστέρων αποσταθεροποιούν το βενζυλικό κατιόν και καθιστούν τη βενζυλομάδα ακόμη περισσότερο ανθεκτική στα οξέα. Αντίθετα η δράση μετρίως ισχυρών οξέων, όπως αραιών διαλυμάτων HCl σε οξικό οξύ ή καθαρού τριφθοροξικού οξέος είναι επαρκής για την όξινη διάσπαση των *p*-μεθοξυβενζυλεστέρων και φυσικά των *tert.*βουτυλεστέρων.

Η διάσπαση αλλυλεστέρων με υδρογόνωση περιπλέκεται από τον ταυτόχρονο κορεσμό του διπλού δεσμού, αλλά παρουσία συμπλόκων του παλλάδιου η αλλυλομάδα μεταφέρεται ήπια στη μορφολίνη ή σε άλλα ασθενώς βασικά πυρηνόφιλα (Kunz and Waldmann, 1984):

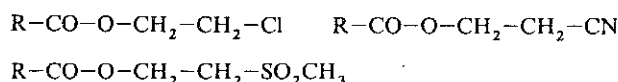


Προς το παρόν λίγες ομάδες είναι γνωστές που απομακρύνονται από το προστατευμένο καρβοξύλιο σε ήπιες αλκαλικές συνθήκες. Έτσι, οι φαινυλεστέρες διασπώνται με αλκαλικό υπεροξείδιο του υδρογόνου

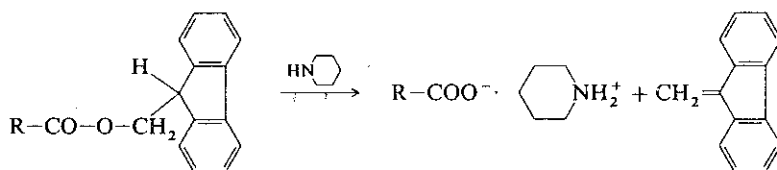


και η μέθοδος αυτή βρήκε ήδη εφαρμογή σε απαιτητικές συνθέσεις.

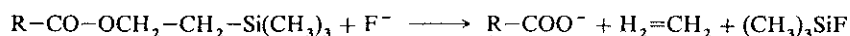
Η απομάκρυνση των καρβοξυλοπροστατευτικών εστερικών ομάδων με β-απόσπαση έχει ήδη συζητηθεί σε σχέση με τις τύπου ουρεθάνης αμινοπροστατευτικές ομάδες (βλέπε σελίδα 79). Διάφοροι ευαίσθητοι σε αλκάλια υποκατεστημένοι αιθυλεστέρες, για παράδειγμα



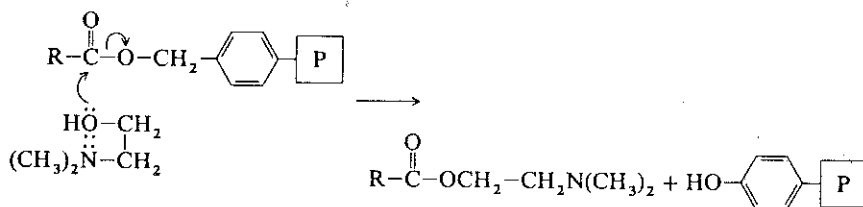
προτάθηκαν γι' αυτό το σκοπό και μερικοί απ' αυτούς έχουν ήδη εφαρμοσθεί στην πράξη. Οι φλουορενυλομεθυλο εστέρες ("Fm-εστέρας") διασπώνται με δευτεροταγείς αμίνες, όπως η πιπεριδίνη.



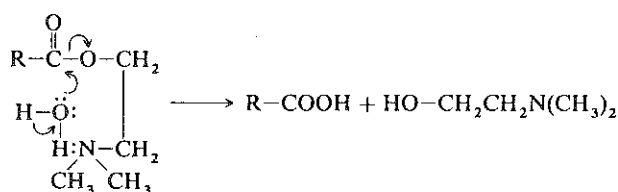
Οι τριμεθυλοσιλυλοαιθυλο εστέρες διασπώνται με τετραβουτυλοαμμωνιακό φθορίδιο:



Μια ενδιαφέρουσα πορεία που περιλαμβάνει ενδομοριακή κατάλυση σχεδιάστηκε (Barton et al. 1973) για την απομάκρυνση πεπτιδίων από πολυμερικά υποστηρίγματα, (βλ. Κεφάλαιο X) στα οποία συνδέθηκαν με τη μορφή (υποκατεστημένων) βενζυλεστέρων:



Η προσβολή από την πυρηνόφιλη διμεθυλαμινοαιθανόλη ακολουθείται από υδρόλυση του διμεθυλαμινοαιθυλεστέρα με νερό σε σχετικά ήπιες συνθήκες, γιατί παρέχεται βασική κατάλυση από την τριτοταγή αμινομάδα της εστερικής περιοχής του μορίου:



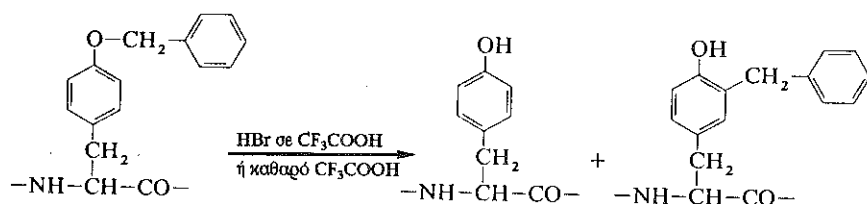
Η ιδέα της κατάλυσης είναι ακόμη περισσότερο φανερή στις προς το παρόν μόνον σποραδικά εφαρμοζόμενες μεθόδους, στις οποίες χρησιμοποιούνται πρωτεολυτικά ένζυμα, όπως θρυψίνη, χυμοθρυψίνη ή καρβοξυπεπτιδάσες για την επιτάχυνση της υδρόλυσης των αλκυλεστέρων σε ουδέτερες συνθήκες. Οι λιπάσες βρέθηκαν δραστικές για την υδρόλυση των επυλεστέρων.

Α. Προστασία των Υδροξυλομάδων

Το δευτεροταγές υδροξύλιο της θρεονίνης παραμένει ως επί το πλείστον ανεπηρέαστο κατά τη σύζευξη γιατί ο πυρηνόφιλος χαρακτήρας της υδροξυλομάδας είναι λιγότερο εμφανής από εκείνον της αμινομάδας και η δραστικότητά του ελαττώνεται περαιτέρω λόγω στεreoχημικής παρεμπόδισης από τη γειτονική μεθυλομάδα. Γι' αυτό η προστασία της παράπλευρης αλυσίδας της θρεονίνης δεν είναι επιτακτική, αλλά γενικά παρέχεται με μια προστατευτική ομάδα εάν το ακυλιωτικό μέσο χρησιμοποιείται σε μεγάλη περίσσεια, όπως στην πεπτιδική σύνθεση στερεής φάσης (βλ. Κεφάλαιο X). Η κατάσταση είναι κάπως διαφορετική με την ανεμπόδιστη πρωτοταγή υδροξυλομάδα του αμινοξέος της σερίνης. Εδώ η προστασία πραγματικά ενδείκνυται εκτός αν εφαρμοσθούν ήπια ακυλιωτικά μέσα. Ακόμη και με μετρίως δραστικά αντιδραστήρια περίσσεια του ενεργοποιημένου καρβοξυλο παραγώγου προκαλεί κατάλληλη Ο-ακυλίωση παρουσία μιας βάσης. Τέτοια ανεπιθύμητη Ο-ακυλίωση αυξάνεται περαιτέρω από το ιμιδαζόλιο και τα παράγωγά του (π.χ. αμινοξέα ιστιδίνης στην αλληλουχία) και επίσης από το 1-υδροξυβενζοτρίαζόλιο που συχνά προστίθεται στα μίγματα σύζευξης. Έτσι, η παράπλευρη αλυσίδα της σερίνης χρησιμοποιείται με μια προστατευτική ομάδα στις περισσότερες συνθέσεις. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των Ο-αλκυλο παραγώγων της σερίνης και της θρεονίνης δεν είναι πλήρως ικανοποιητικές και τα προστατευμένα αμινοξέα λαμβάνονται με ορισμένες απώλειες σε χρόνο και υλικά. Από την άλλη πλευρά η απομάκρυνση της πιο συχνά χρησιμοποιούμενης βενζυλομάδας με υδρογόνωση είναι συνήθως αρκετά απλή, εκτός αν ο καταλύτης δηλητηριασθεί, όπως στα υποστρώματα που περιέχουν θείο. Η όξινη υδρόλυση όμως μπορεί να είναι πηγή παράπλευρων αντιδράσεων. Έτσι η αποπροστασία με HBr σε οξικό οξύ συνοδεύεται από μερική ακετυλίωση. Αυτό μπορεί να εμποδισθεί με τη χρήση

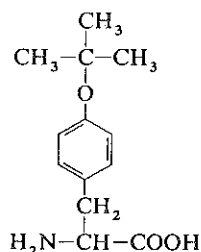
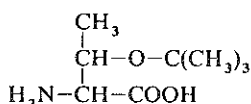
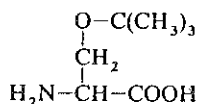
τριφθοροξικού οξέος αντί του οξικού οξέος, αλλά τότε δημιουργούνται νέα προβλήματα που θα συζητηθούν σύντομα σε σχέση με την τυροσίνη.

Η φαινολική υδροξυλομάδα της παράπλευρης αλυσίδας της τυροσίνης είναι σχετικά αδρανής και αφήνεται συχνά χωρίς προστασία ακόμη και σε μεγαλύτερες συνθέσεις. Το φαινολικό ανιόν όμως που δημιουργείται παρουσία βάσης είναι ένα καλό πυρηνόφιλο που μπορεί να συναγωνισθεί με την αμινομάδα για το ακυλιωτικό μέσον. Αν το τελευταίο χρησιμοποιείται σε περίσσεια, τότε η προστασία της παράπλευρης αλυσίδας της τυροσίνης είναι πραγματικά επιθυμητή. Όπως αναφέρθηκε στην περίπτωση της σερίνης, η O-ακυλίωση ενοείται από τις ιμιδαζολικές ομάδες των αμινοξέων της ιστιδίνης που υπάρχουν στην αλληλουχία. Η συχνά χρησιμοποιούμενη βενζυλομάδα απομακρύνεται ήπια με καταλυτική υδρογόνωση, ενώ η όξινη υδρόλυση μπορεί να οδηγήσει σε παράπλευρη αντίδραση. Ενώ το HBr σε οξικό οξύ είναι συγχρόνως αποτελεσματικό και αβλαβές, το HBr σε τριφθοροξικό οξύ δίνει επίσης εκτός από τη μητρική παράπλευρη αλυσίδα το 3-βενζυλο παράγωγό της:



Η αλκυλίωση του αρωματικού πυρήνα οφείλεται εν μέρει σε ενδομοριακή μετάθεση της βενζυλομάδας, αλλά, τουλάχιστον σε κάποιο βαθμό, προκαλείται από τον τριφθοροξικό βενζυλεστέρα που δημιουργείται κατά την αντίδραση διάσπασης. Ενδιαφέρον έχει ότι γίνεται η ίδια αλκυλίωση του δακτύλιου ακόμη και αν το HBr παραληφθεί από το αντιδραστήριο, γιατί το τριφθοροξικό οξύ μόνο του διασπά, μολονότι πιο αργά, τη βενζυλομάδα που είναι προσκολλημένη στο φαινολικό οξυγόνο και σχηματίζεται η C-βενζυλο ένωση σ'ένα αξιοσημείωτο τμήμα της ουσίας. Σαφώς η υδρογόνωση και η όξινη υδρόλυση με HBr σε οξικό οξύ είναι οι μέθοδοι που προτιμούνται για την απομάκρυνση των O-βενζυλομάδων από τα αμινοξέα της τυροσίνης αλλά η πρώτη γίνεται αδρανής σε πεπτίδια που περιέχουν θείο και η τελευταία δεν μπορεί να εφαρμοσθεί όταν υπάρχει σερίνη στην αλληλουχία. Η παράπλευρη αντίδραση κατά τη διάσπαση με HBr σε τριφθοροξικό οξύ (C-αλκυλίωση ή μετάθεση βενζυλίου) πρέπει να ελαττωθεί για να γίνει παραδεκτή η μέθοδος. Η προσθήκη φαινόλης ή κρεσόλης παρέχει τις απαραίτητες παγίδες, η ανισόλη και η 4-μεθυλοθειοφαινόλη είναι παρομοίως αποτελεσματικές. Η μετάθεση της βενζυλομάδας είναι λιγότερο προφανής όταν υπάρχουν παρεμποδίζουσες προστατευτικές ομάδες όπως η κυκλοεξυλομάδα. Αυτές όμως απαιτούν τη χρήση πολύ ισχυρών οξέων, υδροφθορίου ή τριφθορομεθανοσουλφονικού οξέος, στο τελικό στάδιο αποπροστασίας, αντιδραστηρίων που μπορούν δυστυχώς να επηρεάσουν την ακεραιότητα του πεπτιδίου που συνθέσαμε. Επομένως μέχρι να βρεθεί μια πιο ικανοποιητική λύση για την προστασία της παράπλευρης αλυσίδας της τυροσίνης, η εκλογή της προστατευτικής ομάδας πρέπει να βασίζεται στη σειρά των αμινοξέων του πεπτιδίου που πρόκειται να συνθέσουμε.

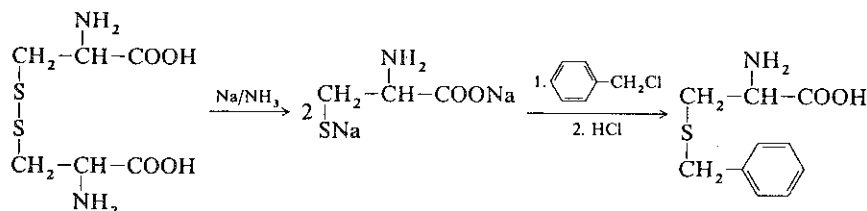
Μια σημαντική εναλλακτική λύση για τη βενζυλομάδα είναι η *tert*-βουτυλομάδα. Οι *tert*-βουτυλαιθέρες της σερίνης, θρεονίνης και τυροσίνης



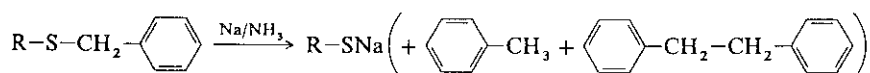
μπορούν να παρασκευασθούν όχι όμως χωρίς προσπάθεια και απώλειες. Η χρήση τους, εντούτοις, είναι περιορισμένη σε συνθέσεις στις οποίες η προσωρινή προστατευτική ομάδα που εφαρμόζεται για την προστασία της α-αμινομάδας διασπάται με μεθόδους άλλες από την όξινη διάσπαση. Σε συνδυασμό με τη βενζυλοξυκαρβονυλομάδα, εάν αυτή μπορεί να υδρογονολυθεί, ή με την ευαίσθητη σε βάσεις 9-φλουορενυλομεθυλοξυκαρβονυλομάδα (Fmoc) για παροδική προστασία οι *tert*-βουτυλο προστατευτικές ομάδες έχουν πράγματι μεγάλη πρακτική αξία για την ημιμόνιμη προστασία των ομάδων της παράπλευρης αλυσίδας.

Ε. Προστασία της Σουλφυδρυλομάδας

Η προστασία της σουλφυδρυλο-(μερκαπτο) ομάδας είναι επιτακτική. Ο πυρηνόφιλος χαρακτήρας της ομάδας SH είναι αρκετά εμφανής και δεν μπορεί να αγνοηθεί στις αντιδράσεις που σκοπεύουν στην ακυλίωση των αμινομάδων. Επιπλέον η ισχυρή τάση των μερκαπτανών να αφυδρογονώνονται προς δισουλφίδια οδηγεί σε μίγματα, εκτός αν οι χειρισμοί γίνονται με αποκλεισμό του αέρα. Μια απλή λύση γι'αυτά τα προβλήματα είναι να ενσωματώσουμε στην πεπτιδική αλυσίδα παράγωγα του δισουλφιδίου, της κυστίνης, αντί εκείνων της κυστεΐνης. Αυτό έχει όμως σαν αποτέλεσμα το διπλασιασμό του μοριακού βάρους των προστατευμένων ενδιάμεσων παραγώγων και δυσκολίες που προκαλούνται από τη μείωση της διαλυτότητάς τους σε οργανικούς διαλύτες. Γι'αυτό η προσέγγιση αυτή βρήκε περιορισμένη μόνον εφαρμογή στην πράξη. Μια δεύτερη μέθοδος, η προστασία της ομάδας SH με την κλασική βενζυλομάδα δοκιμάστηκε σε πολλές συνθέσεις. Η απλή και εύχρηστη μέθοδος για την παρασκευή της S-βενζυλο-L-κυστεΐνης (du Vigneaud et al. 1930), η αναγωγή της κυστίνης με νάτριο σε υγρή αμμωνία ακολουθούμενη αμέσως από αλκυλίωση με βενζυλοχλωρίδιο,



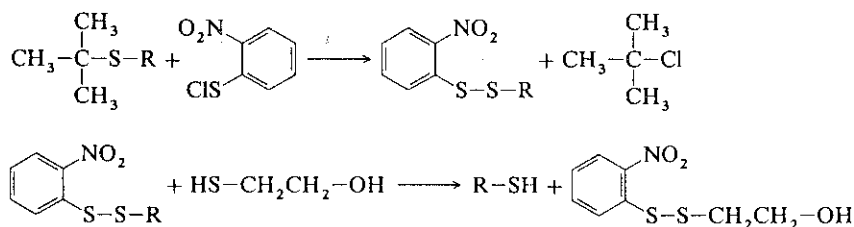
έδωσε ένα φθινό και σταθερό ενδιάμεσο παράγωγο για περαιτέρω παρασκευή παραγώγων. Επίσης η αξιοσημείωτη αντίσταση των S-βενζυλομάδων σε οξέα επιτρέπει την παροδική προστασία των α-αμινομάδων με τη βενζυλοξυκαρβονυλομάδα επειδή η τελευταία μπορεί να απομακρυνθεί με HBr σε οξικό οξύ χωρίς καμιά ανιχνεύσιμη απελευθέρωση της ομάδας SH. Εντούτοις αυτό το σημαντικό πλεονέκτημα δημιουργεί ένα νέο πρόβλημα στο τέλος της σύνθεσης της αλυσίδας, όταν απομακρύνονται οι ημιμόνιμες ομάδες. Η όξινη διάσπαση του δεσμού θείου-άνθρακα δεν είναι αδύνατη, αλλά απαιτεί πολύ ισχυρά όξινα αντιδραστήρια και ακόμη και με υγρό HF η πλήρης διάσπαση μπορεί να επιτευχθεί μόνον σε συνθήκες (π.χ. μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου) οι οποίες θέτουν σε κίνδυνο την ακεραιότητα των πεπτιδικών αλυσίδων (βλ. Κεφάλαιο VII). Ευτυχώς η αναγωγή με νάτριο σε υγρή αμμωνία



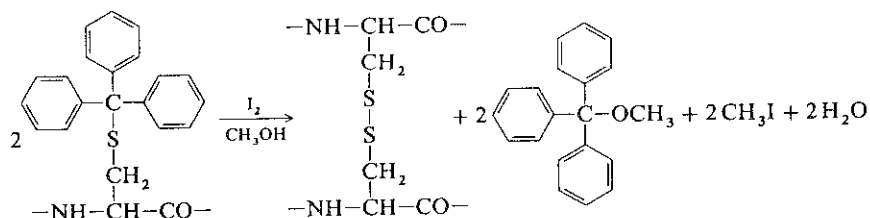
είναι ένας αποτελεσματικός εναλλακτικός τρόπος που χρησιμοποιήθηκε καλά σε πολλές περιπτώσεις.

Φυσικά είναι δυνατόν να μειωθεί η σταθερότητα της S-βενζυλομάδας ως προς τα οξέα με υποκατάσταση με ομάδες που ελευθερώνουν ηλεκτρόνια. Έτσι στην S-p-μεθοξυβενζυλομάδα το βενζυλικό κατιόν σταθεροποιείται επαρκώς ώστε να επιτρέπει διάσπαση του δεσμού S-C με υγρό υδροφθόριο σε αρκετά ήπιες συνθήκες, ενώ η S-2,4,6-τριμεθυλοβενζυλομάδα μπορεί να απομακρυνθεί με τριφθορομεθανοσουλφονικό οξύ σε οξικό οξύ παρουσία m-κρεσόλης.

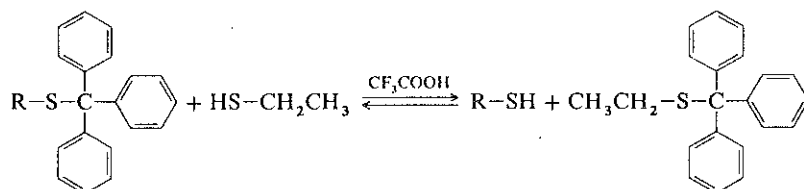
Η διάσπαση της S-tert.βουτυλομάδας με οξέα είναι πολύ προβληματική και είναι καλλίτερα να γίνεται σε δύο στάδια με κατεργασία με ο-νιτροφαινυλοσουλφενυλοχλωρίδιο ακολουθούμενη από αναγωγή του έτσι σχηματιζόμενου μικτού δισουλφιδίου με μερκαπτοαιθανόλη:



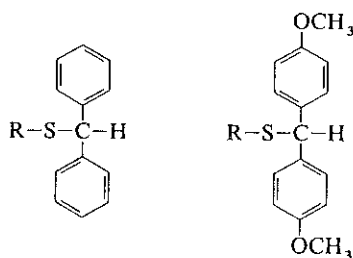
Ευαίσθητη σε οξέα προστασία μπορεί να επιτευχθεί με την εφαρμογή της S-τριφαινυλομεθυλομάδας (trityl). Η S-τριτυλο προστασία απομακρύνεται με HCl σε οργανικούς διαλύτες (π.χ. χλωροφόρμιο) και επίσης με κατεργασία με ιώδιο σε μεθανόλη, μια πορεία που δίνει το δισουλφίδιο:



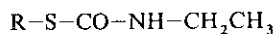
Ο ρόλος της μεθανόλης είναι πολύ σημαντικός σ' αυτήν την αντίδραση, γιατί δρα σαν δέκτης της τριτυλομάδας. Με παρόμοιο τρόπο η αιθυλομερκαπτάνη που χρησιμοποιείται σε μεγάλη περίσσεια διευκολύνει την όξινη διάσπαση της S-τριτυλομάδας και εμποδίζει την επανακυλίωση της ελεύθερης σουλφυδρυλομάδας:



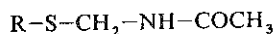
Ενδιάμεση ευαίσθησια σε οξέα μπορεί να βρεθεί στην S-διφαινυλομεθυλο (βενζυδρυλο) ομάδα και στο μεθόξυ παράγωγό της:



Η ακυλίωση της ομάδας SH δεν παρέχει τέλεια προστασία, γιατί οι S-ακυλομάδες μπορούν να μετατοπισθούν στις αμινομάδες. Αυτή η S → N ακυλο μεταφορά δεν είναι πολύ προφανής κατά την προστασία με τις S-βενζυλοξυκαρβονυλο- ή S-tert.βουτυλοξυκαρβονυλο-ομάδες, αλλά αυτές οι πιθανότητες πρέπει να δοκιμασθούν στην πράξη. Κάπως ευρύτερη εφαρμογή έχει αναφερθεί για την S-αιθυλοκαρβαμιδική ομάδα

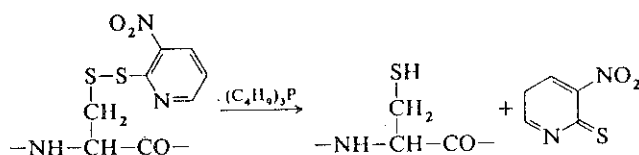


η οποία είναι εξαιρετικά σταθερή ως προς τα οξέα και διασπάται με αλκάλια ή με βάσεις συμπεριλαμβανομένης της υγρής αμμωνίας και επίσης της υδραζίνης. Μια περαιτέρω δυνατότητα για την απομάκρυνσή της, η κατεργασία με άλατα υδραργύρου (II), μοιράζεται με άλλες προστατευτικές ομάδες της σουλφυδρυλομάδας, οι οποίες παράγονται από τη φορμαλδεΐδη. Για παράδειγμα η ακεταμιδομεθυλομάδα (Acm):

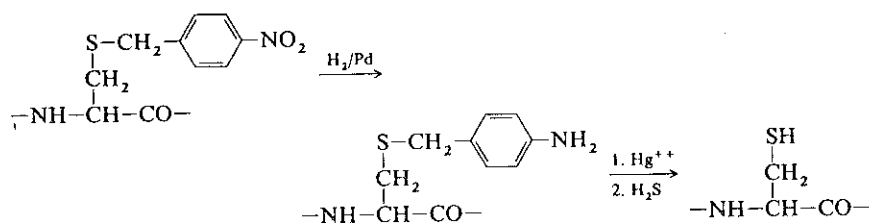


Η Acm ομάδα απέκτησε αξιοσημείωτη δημοτικότητα, ίσως λόγω της εναλλακτικής της διάσπασης με ιώδιο που δίνει ένα δι σουλφίδιο, όπως είδαμε στην ιωδόλυση της S-τριτυλομάδας. Η αποπροστασία της S-Acm ομάδας με $Ti(OOCF_3)_3$ ακολουθεί μια παρόμοια σειρά.

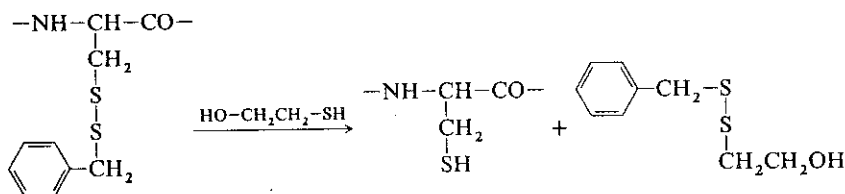
Από τις διάφορες άλλες μεθόδους που προτάθηκαν για την προστασία της θειολομάδας η ο-νιτροπυριδινοςουλφενυλομάδα (Npys) αναφέρεται εδώ λόγω της ενδιαφέρουσας αναγωγικής διάσπασης του ενδιάμεσου δι σουλφιδίου με τριβουτυλοφωσφίνη:



Μια περαιτέρω αξιοσημείωτη αν και όχι ακόμη ευρέως χρησιμοποιούμενη προστασία είναι η αλκυλίωση της παράπλευρης αλυσίδας της κυστεΐνης με την *p*-νιτροβενζυλομάδα. Ενώ δεν είναι ευαίσθητη στα οξέα και δεν μπορεί να διασπασθεί με υδρογονόλυση, η καταλυτική υδρογόνωση τη μετατρέπει στην *p*-αμινοβενζυλομάδα, η οποία έπειτα απομακρύνεται ήπια με άλατα του δισθενούς υδραργύρου, όπως ο οξικός υδράργυρος:

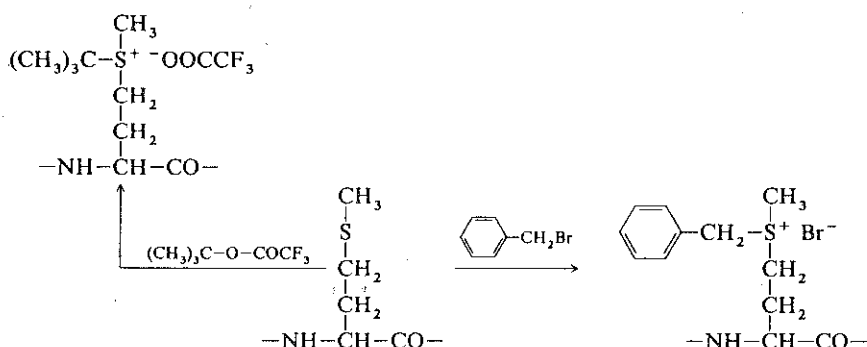


Τελικά η ομάδα SH έχει επίσης προστατευθεί με τη μορφή των μικτών δι σουλφιδίων, όπως στην S-βενζυλομερκαπτο-κυστεΐνη, που μπορούν να διασπασθούν με μερκαπτάνες.

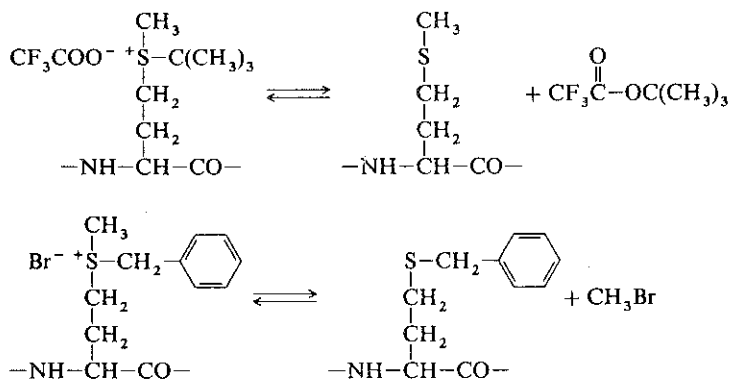


ΣΤ. Προστασία του θειοαιθέρα της Μεθειονίνης

Η θειοαιθερική ομάδα της παράπλευρης αλυσίδας του αμινοξέος της μεθειονίνης είναι αρκετά αδρανής ώστε μπορεί να μείνει απροστάτευτη κατά τη διάρκεια των περισσότερων χειρισμών της πεπτιδικής σύνθεσης. Σε μερικές περιπτώσεις μπορεί να παρατηρηθεί μικρή οξείδωση προς σουλφοξείδιο, αλλά η αλλαγή είναι αντιστρεπτή. Ήπια αναγωγικά μέσα, για παράδειγμα θειογλυκολικό οξύ, επαναφέρουν το άτομο θείου στην αρχική οξειδωτική του κατάσταση. Είναι μάλλον ευτύχημα ότι απουσία ισχυρών οξειδωτικών μέσων δε σχηματίζονται σουλφόνες, γιατί καμιά απλή αναγωγική μέθοδος δεν μπορεί να αποκαταστήσει αυτή την καταστροφή. Μια πιο σημαντική παράπλευρη αντίδραση, η αλκυλίωση του θειοαιθερικού θείου, συμβαίνει κατά την όξινη απομάκρυνση των βενζυλο- και tert.βουτυλομάδων και κατά την ανάλογη διάσπαση των βενζυλοξυκαρβονυλο- και tert.βουτυλοξυκαρβονυλομάδων, γιατί ο θειοαιθέρας είναι ένας εξαιρετικός δέκτης καρβοκατιόντων. Επίσης είναι αρκετά ευαίσθητος στην αλκυλίωση από τα παραπροϊόντα της όξινης διάσπασης, δηλαδή του βενζυλοβρωμιδίου και του τριφθοροξικού tert.βουτυλεστέρα

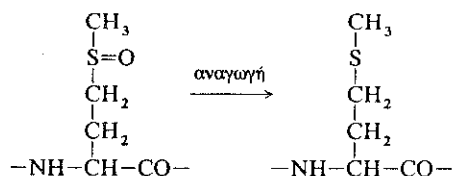


Η tert-βουτυλομάδα απομακρύνεται εύκολα από τα σουλφονικά άλατα με ήπια θέρμανση ή με μακρά φύλαξη σε θερμοκρασία δωματίου, αλλά δε διατίθεται καμιά πρακτική μέθοδος για την αποβενζυλίωση, γιατί η αποαλκυλίωση έχει σαν αποτέλεσμα το χάσιμο της μεθυλομάδας και επομένως το σχηματισμό παραγώγων της S-βενζυλο-ομοκυστεΐνης

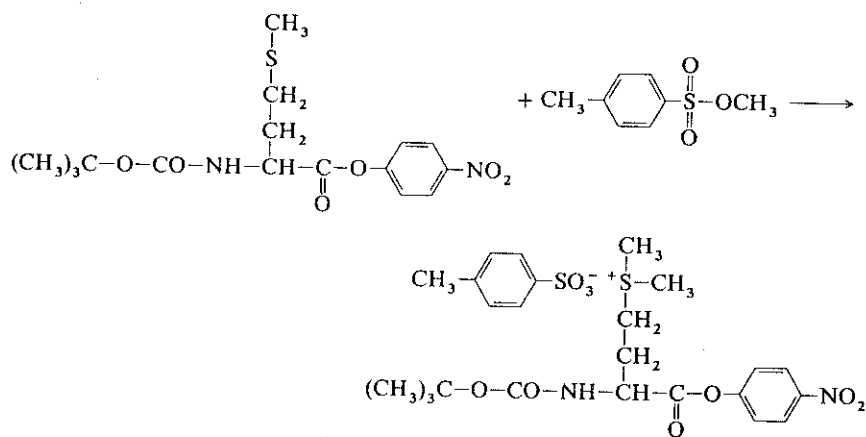


Γι' αυτό πολλοί ερευνητές προτιμούν να ενσωματώνουν S-προστατευμένα αμινοξέα μεθειονίνης στη συνθετική πεπτιδική αλυσίδα.

Για μια αξιοσημείωτη χρονική περίοδο μόνο μια μέθοδος προστασίας ήταν γνωστή γι' αυτόν το σκοπό, η οξείδωση του θειοαιθέρα προς σουλφοξείδιο (Iselin 1961). Το αρχικά συνιστούμενο οξειδωτικό μέσο, το υπεροξικό οξύ, μπορεί να αντικατασταθεί από το μεταϋπεριωδικό οξύ ή από βρωμιούχο νερό, αλλά εξαιρετικά επίσης αποτελέσματα αποκτήθηκαν με υδατικό υπεροξείδιο του υδρογόνου. Μετά το τέλος της διαδικασίας σύνθεσης της αλυσίδας ο θειοαιθέρας ξαναδημιουργείται με αναγωγή με θιογλυκολικό οξύ ή πιο αποτελεσματικά με N-μεθυλο-μερκαπτοακεταμίδιο:



Πρέπει να σημειωθεί ότι το άτομο θείου της μεθειονίνης είναι ένα νέο οπτικά ενεργό κέντρο και έτσι ένα ζεύγος διαστερομερών υπάρχει στα ενδιάμεσα παράγωγα. Αυτή είναι μια μικρή περιπλοκή που λείπει από μια εναλλακτική μέθοδο για την προστασία του θειοαιθέρα, της μετατροπής του σε *tert*-σουλφονικό άλας κατά την αντίδραση ενός ενεργοποιημένου N-ακυλο παραγώγου του αμινοξέος με *p*-τολουολοσουλφονικό μεθυλεστέρα:



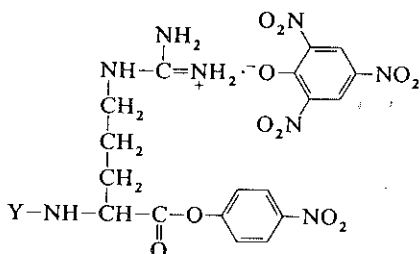
Αυτή η πλήρως προστατευμένη δραστική ένωση μπορεί να ενσωματωθεί σε μια πεπτιδική αλυσίδα και η προστασία να απομακρυνθεί στο τελικό στάδιο, για παράδειγμα με μερκαπτοαιθανόλη.

Z. Προστασία της Γουανιδινομάδας της Παράπλευρης Αλυσίδας της Αργινίνης.

Η γουανιδίνη μόνη της είναι μια εξαιρετικά ισχυρή βάση επειδή η πρωτονιωμένη της μορφή σταθεροποιείται λόγω συντονισμού



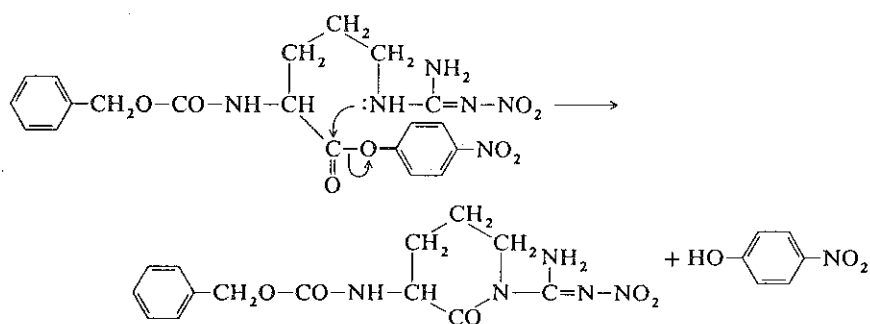
Το ίδιο είδος σταθεροποίησης υπάρχει στις μονοϋποκατεστημένες γουανιδίνες και επομένως επίσης στην παράπλευρη αλυσίδα της αργινίνης. Η ελεύθερη βάση μπορεί να ληφθεί με τη βοήθεια μεθοξειδίου του νατρίου και αφού σχηματισθεί υποβάλλεται σε ακυλίωση. Στην πρωτονιωμένη μορφή όμως η γουανιδινομάδα είναι αδρανής ως προς τα ακυλιωτικά μέσα και μπορεί να αφηθεί χωρίς περαιτέρω προστασία. Εντοντοίς η συνήθως χρησιμοποιούμενη υδροχλωρική μορφή προσδίδει δυσμενείς ιδιότητες διαλυτότητας στα ενδιάμεσα παράγωγα. Αυτό είναι λιγότερο εμφανές στα πικρικά και υπερχλωρικά άλατα και γι' αυτό προστατευμένα και ενεργοποιημένα παράγωγα, όπως



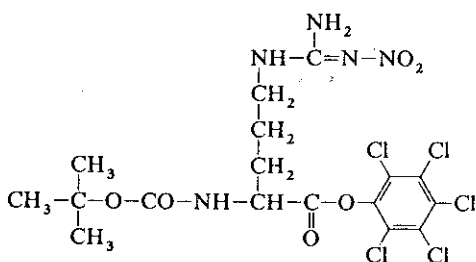
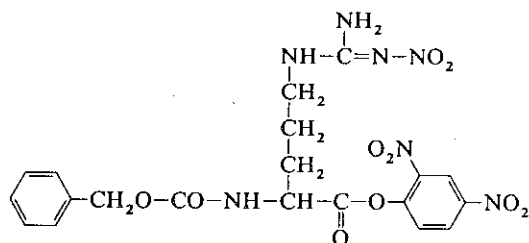
έχουν προταθεί για την ενσωμάτωση του αμινοξέος της αργινίνης. Κατά τη διάρκεια όμως των διαφόρων χειρισμών κατά τη σύνθεση της αλυσίδας τα πεπτίδια που περιέχουν αργινίνη με πρωτονιωμένη γουανιδίνη συμπεριφέρονται σαν ιοντο-ανταλλάκτες και με σκοπό να αποφύγουν αμφιλεγόμενες καταστάσεις πολλοί ερευνητές προτιμούν μια πιο σίγουρη προστασία της γουανιδινομάδας.

Μια κλασική προσέγγιση, η χρήση της νιτροαργινίνης, χρησιμοποιείται ακόμη κυρίως επειδή ο νιτρο υποκαταστάτης έχει ευμενή επίδραση στη διαλυτότητα των προστατευμένων ενδιάμεσων παραγώγων σε οργανικούς διαλύτες. Είναι πολύ απλό να εισάγουμε την νιτρο ομάδα με τη βοήθεια μίγματος ατμιζόντος νιτρικού οξέος και θειικού οξέος και η προστασία της α-αμινομάδας της νιτροαργινίνης είναι επίσης χωρίς προβλήματα. Είναι πιο δύσκολο να ενεργοποιήσουμε την καρβοξυλική ομάδα του προστατευμένου αμινοξέος λόγω της προφανούς τάσης του να παράγει λακτάμες,

παράγωγα των πιπεριδινο-2-ονών:



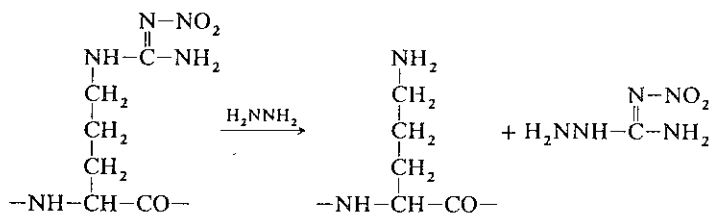
Επομένως, ενώ η νιτρομάδα καθιστά τη γουανιδινομάδα μη ευαίσθητη σε ακυλιωτικά μέσα, δε γίνεται αδρανής ως προς ενδομοριακές προσβολές. Η ταχύτητα κλεισίματος του δακτυλίου είναι μικρότερη σε ενεργούς εστέρες με ογκώδεις ομάδες ενεργοποίησης,



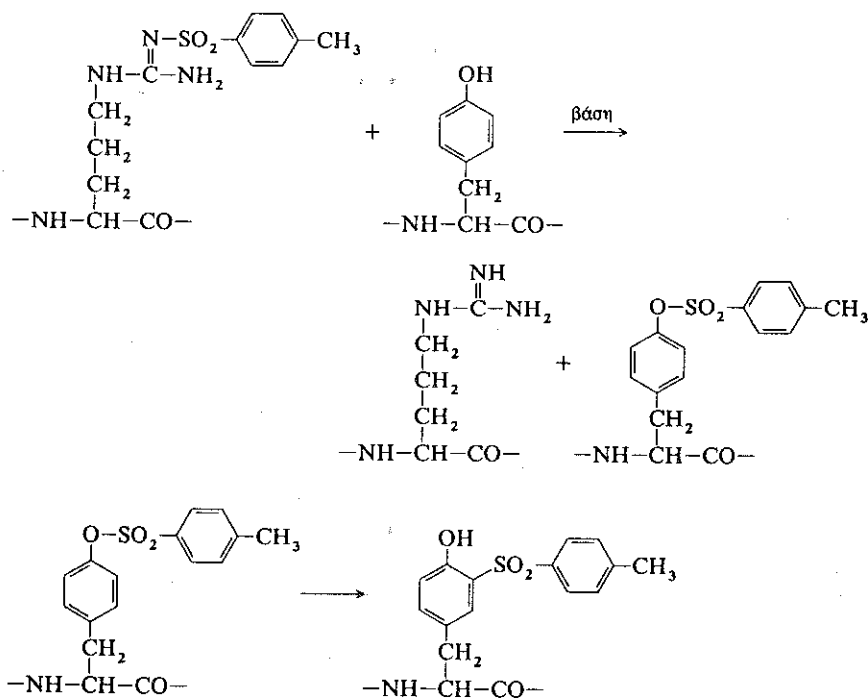
αλλά ακόμη και αυτοί δεν είναι τελείως σταθεροί. Γι'αυτό τα ενεργοποιημένα παράγωγα της νιτροαργινίνης, αφού παρασκευασθούν, πρέπει να χρησιμοποιούνται χωρίς παρατεταμένη αποθήκευση.

Η αρχικά εφαρμοζόμενη μέθοδος αποπροστασίας, η καταλυτική υδρογόνωση, καταναλώνει μάλλον πολύ χρόνο και η εκτεταμένη υδρογόνωση θα μπορούσε να οδηγήσει σε κορεσμό των αρωματικών παράπλευρων αλυσίδων. Έτσι έχει αναπτυχθεί μια ολόκληρη σειρά μεθόδων για την απομάκρυνση της νιτρομάδας, όπως καταλυτική αναγωγή με κυκλοεξαδιένιο σαν δότη υδρογόνου, αναγωγή με ψευδάργυρο σε οξικό οξύ, με χλωριούχο κασσίτερο ή με χλωριούχο τιτάνιο (III). Η νιτρομάδα μπορεί να διασπασθεί με οξέα, αλλά αντιστέκεται στη δράση του HBr σε οξικό οξύ και αποδίδεται μόνον με πολύ ισχυρά οξέα, για παράδειγμα υγρό υδροφθόριο ή πολυ-υδροφθόριο σε πυριδίνη. Πρόσθετες δυσκολίες προκαλούνται από τη μειωμένη σταθερότητα της γουανιδινομάδας του νιτροπαραγώγου, γιατί συμβαίνει αποσύνθεση προς παράγωγα

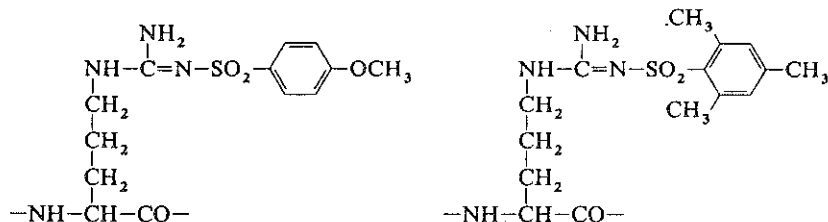
της ορνιθίνης όταν τα ενδιάμεσα παράγωγα εκτίθενται σε ισχυρές βάσεις π.χ. υδραζίνη:



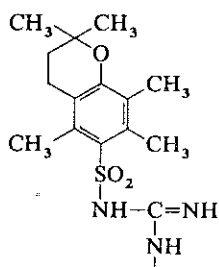
Οι ατέλειες της νιτρομάδας στην προστασία της γουανιδίνης δεν μπορούν να εξαλειφθούν πλήρως με την εφαρμογή της βενζυλοξυκαρβονυλο- ή της *tert.*βουτυλοξυκαρβονυλομάδας για τον ίδιο σκοπό, γιατί ο σχηματισμός της λακτάμης και η αποικοδόμηση προς παράγωγα ορνιθίνης εξακολουθεί να συμβαίνει. Η πιο ισχυρή προστασία με δύο Z ομάδες ή ακόμη και με δύο αδαμαντυλοξυκαρβονυλομάδες παρέχει μόνον μικρές βελτιώσεις σ'αυτή την κατεύθυνση. Η ακυλίωση της γουανιδίνης με *p*-τολουολο-σουλφονυλοχλωρίδιο κατ'αρχήν φάνηκε να υπόσχεται πολλά μέχρις ότου βρέθηκε ότι γίνεται μεταφορά της *p*-τολουολοσουλφονυλομάδας από τη γουανιδίνη στον αρωματικό πυρήνα



των παράπλευρων αλυσίδων της τυροσίνης. Αυτή η μετάθεση ακυλίου, που πιθανώς γίνεται μέσω Ο-ακυλο ενδιάμεσων παραγώγων, είναι λιγότερο προφανής εάν η παράπλευρη αλυσίδα της αργινίνης παρέχεται με την *p*-μεθοξυφαινυλοσουλφονυλομάδα και μειώνεται ακόμη περισσότερο στα 2-μεσιτυλενοσουλφονυλο παράγωγα.

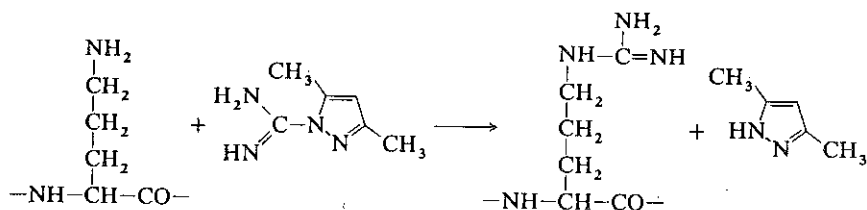


Η ευαίσθητη σε οξέα 2,2,5,7,8-πενταμεθυλοχρωmano-6-σουλφονυλομάδα



χρησιμοποιείται με επιτυχία για την προστασία της γουανιδινομάδας.

Τα προβλήματα που συνδέονται με την ομάδα της γουανιδίνης παρακάμφθηκαν σε μερικές συνθέσεις με την ενσωμάτωση προστατευμένων παραγώγων της ορνιθίνης. Στο τελευταίο στάδιο της σύνθεσης η δ-αμινομάδα της ορνιθίνης αποπροστατεύεται και μετατρέπεται στην γουανιδινομάδα με τη βοήθεια γουανυλιωτικών αντιδραστηρίων, για παράδειγμα 1-γουανιδινο-3,5-διμεθυλο-πυραζόλιου:

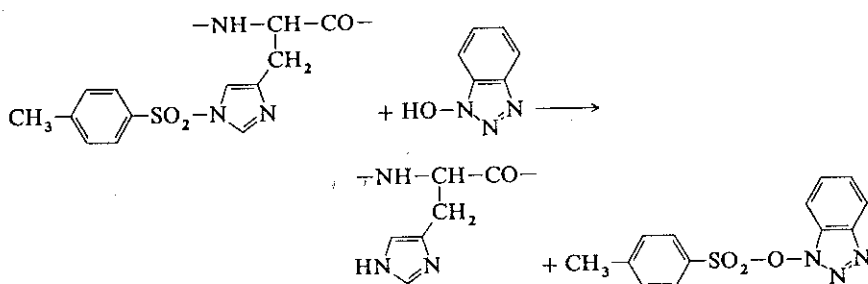


Φαίνεται σωστό να πούμε ότι οι δυσκολίες που ακόμη υπάρχουν στη σύνθεση πεπτιδίων που περιέχουν αργινίνη θα ενεργοποιήσουν περαιτέρω μελέτες για πιο ικανοποιητικές προστατευτικές ομάδες της γουανιδίνης.

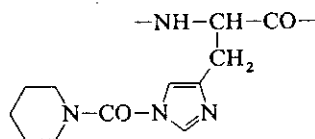
Η. Προστασία του Ιμιδαζολίου της Ιστιδίνης

Η ομάδα NH στον ιμιδαζολικό πυρήνα της παράπλευρης αλυσίδας της ιστιδίνης αφήνεται συχνά απροστάτευτη χωρίς φανερό πρόβλημα στη διαδικασία ή το προϊόν της σύνθεσης. Μερικές παράπλευρες αντιδράσεις εντούτοις μπορεί να αποδοθούν στην επίδραση του ιμιδαζολίου. Το ιμιδαζόλιο δρα σαν καταλύτης στην ανεπιθύμητη Ο-ακυλίωση των παράπλευρων αλυσίδων της σερίνης και τυροσίνης και στην υδρόλυση επίσης των ενεργών εστέρων, εάν δεν έχει αποκλεισθεί το νερό από το διαλυτικό μέσο. Επιπλέον επειδή ο βασικός χαρακτήρας του ιμιδαζολίου είναι ασθενής αλλά όχι αμελητέος, τα πεπτίδια που περιέχουν ιστιδίνη απομονώνονται μερικές φορές σε περισσότερες της μιας μορφές, για παράδειγμα σε βάση και τριφθοροξικό άλας ή σαν μίγμα υδροχλωρικού και οξικού άλατος κλπ. Γι'αυτό η προστασία του ιμιδαζολίου προσφέρει ορισμένα πλεονεκτήματα.

Η ακυλίωση της ομάδας NH δεν παρέχει πραγματική λύση γιατί τα ακυλοϊμιδαζόλια είναι δραστικές ενώσεις. Για παράδειγμα η *p*-τολουολοσουλφονυλομάδα μπορεί να μεταφερθεί σε άλλα πυρηνόφιλα, όπως η αμινομάδα, τα αλκοολικά ή φαινολικά υδροξύλια και αρκετά εύκολα στην υδροξύλομάδα της πρόσθετης ουσίας 1-υδροξυβενζοτρίαζόλιου:



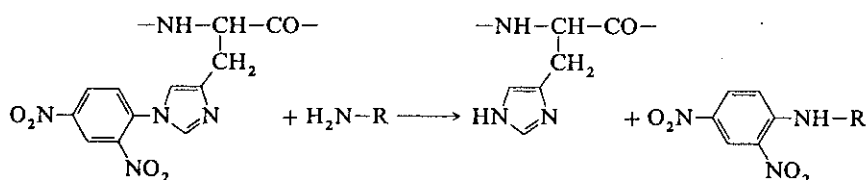
Μικρότερη μεταφορά ακυλίου σημειώθηκε με τις βενζυλοξυκαρβονυλο, *tert*.βουτυλοξυκαρβονυλο και αδαμαντυλοξυκαρβονυλομάδες. Η σταθερή σε οξέα πιπεριδινοξυκαρβονυλομάδα



είναι σχετικά αδρανής ως προς τα πυρηνόφιλα, αλλά μπορεί να απομακρυνθεί με υδραζίνη, ένα ισχυρό πυρηνόφιλο μέσο.

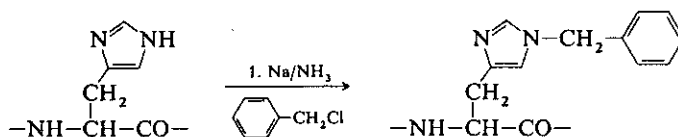
Η δινιτροφαινυλίωση του ιμιδαζολικού NH πρακτικά εξαλείφει το βασικό του χαρακτήρα εντούτοις η 2,4-δινιτροφαινυλομάδα (DNP) μοιράζεται επίσης μια λιγότερο

επιθυμητή ιδιότητα με τις πραγματικές ακυλομάδες, δηλαδή μπορεί να μετατεθεί σε ελεύθερες αμίνες:

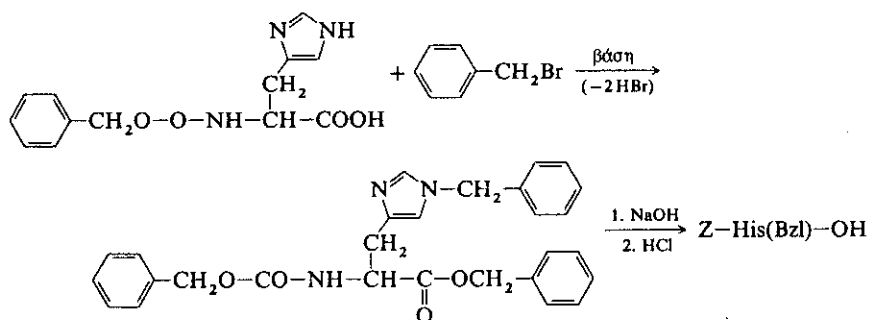


Η 2,4-δινιτροφαινυλομάδα διασπάται από θειόλες, για παράδειγμα από 2-μερκαπτοαιθανόλη, σε ήπιες βασικές συνθήκες.

Η παλιότερη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την προστασία της παράπλευρης αλυσίδας της ιστιδίνης είναι η βενζυλίωση. Η βενζυλομάδα εισάγεται με κατεργασία της ιστιδίνης με νάτριο σε υγρή αμμωνία και αλκυλίωση του παραγώγου του νατρίου με βενζυλοχλωρίδιο:

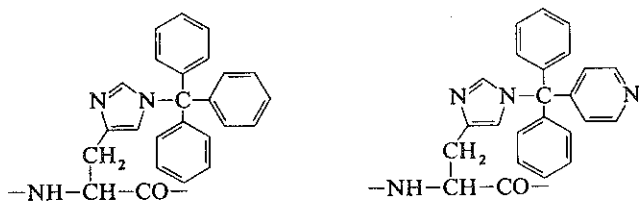


Μια πιο πρόσφατα προταθείσα προσέγγιση αρχίζει με N^α-βενζυλοξυκαρβονυλο-ιστιδίνη η οποία κατεργάζεται με βενζυλοβρωμίδιο παρουσία μιας κατάλληλης οργανικής βάσης που χρειάζεται για να δεσμεύει το οξύ που ελευθερώνεται:

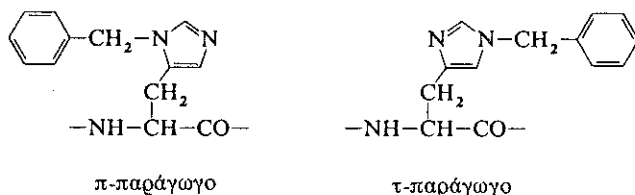


Η καρβοξυλομάδα εστεροποιείται κατά την πορεία και πρέπει να αποπροστατευθεί με σαπωνοποίηση με άλκαλι ώστε να μπορεί να ενεργοποιηθεί για την επόμενη ενσωμάτωση. Η αποπροστασία του ιμιδαζολίου μπορεί να επιτευχθεί με καταλυτική υδρογόνωση, αν και μερικές φορές συναντώνται δυσκολίες σ' αυτό το στάδιο. Μια εναλλακτική μέθοδος αποβενζυλίωσης, η κατεργασία με οξικό οξύ, πρέπει να γίνεται σε πολύ υψηλή θερμοκρασία. Μεγαλύτερη ευαισθησία σε οξέα παρουσιάζει το im-τριτυλο παράγωγο,

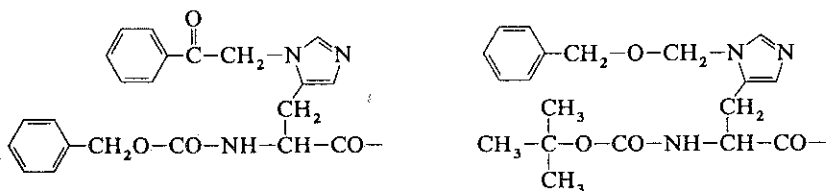
ενώ η διφαινυλο-4-πυριδυλομεθυλομάδα δεν είναι ευαίσθητη στα οξέα:



Στην προηγούμενη συζήτηση δεν έγινε καμιά διάκριση μεταξύ των δύο ατόμων αζώτου του ιμιδαζολικού δακτυλίου. Στη μη υποκατεστημένη παράπλευρη αλυσίδα της ιστιδίνης αυτά συμμετέχουν σε μια ταυτομερή ισορροπία και δεν μπορούν να διακριθούν εύκολα. Η κατάσταση αλλάζει όταν εισάγεται ένας υποκαταστάτης, ο οποίος μπορεί να βρίσκεται στο π άτομο αζώτου κοντά στο άτομο άνθρακα που συνδέεται με την ομάδα CH_2 της παράπλευρης αλυσίδας ή στο τ άτομο αζώτου το οποίο είναι πιο μακρινά από το σημείο σύνδεσης. Έτσι δύο im-βενζυλοπαράγωγα είναι πιθανά, η π -βενζυλο και η τ -βενζυλο ιστιδίνη



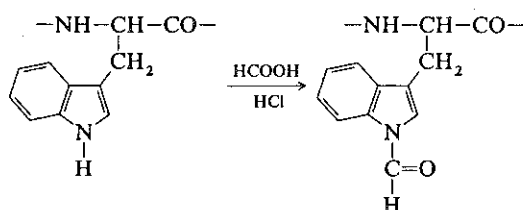
Στις συντάξεις που σχεδιάσθηκαν μέχρι στιγμής έγινε η υπόθεση ότι το λιγότερο παρεμποδισμένο άζωτο φέρει την προστατευτική ομάδα και η υπόθεση αυτή δικαιώνεται πιθανώς στην περίπτωση ογκώδους υποκαταστάτη. Εξαιτίας του ρόλου του π -αζώτου στη μερικές φορές όχι αμελητέα ρακεμοποίηση της ιστιδίνης κατά τη σύζευξη, έγιναν αρκετές προσπάθειες για την εκλεκτική παρασκευή N^π -προστατευμένων παραγώγων. Η σημασία αυτών των ενώσεων, για παράδειγμα της N^α -βενζυλοξυκαρβονυλο- N^π -φαινακυλο-L-ιστιδίνης και της N^α -tert.βουτυλοξυκαρβονυλο- N^π -βενζυλοξυμεθυλο-L-ιστιδίνης



πρέπει να αποδειχθεί με την εφαρμογή τους σε πολλές συνθέσεις.

Θ. Προστασία του Ινδολίου

Ο ινδολικός πυρήνας της παράπλευρης αλυσίδας της τρυπτοφάνης είναι αρκετά αδρανής ώστε να αφήνεται χωρίς προστασία. Η ομάδα του NH δεν ακυλιώνεται εύκολα, αλλά μπορεί να υποστεί αλκυλίωση σε μικρό αλλά όχι πάντα αμελητέο βαθμό και μερικοί ερευνητές προτιμούν να αποφύγουν την παράπλευρη αυτή αντίδραση με την εφαρμογή μιας προστατευτικής ομάδας. Μέχρι στιγμής χρησιμοποιείται ευρέως μόνον η φορμυλομάδα, ίσως επειδή εισάγεται ήπια κατά την κατεργασία της τρυπτοφάνης με HCl σε μυρμηκικό οξύ:



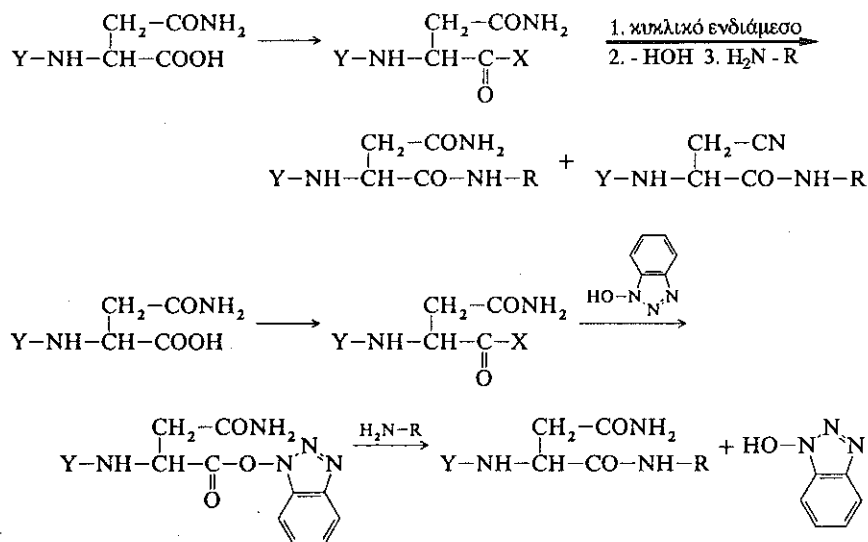
Η in-φορμυλομάδα διασπάται με ασθενείς βάσεις όπως υδατική πιπεριδίνη ή υδραζίνη. Η ευαισθησία της σε αμίνες μπορεί να προκαλέσει ορισμένα προβλήματα, γιατί σε ηπίως βασικά μέσα μετατίθεται στις α-αμινομάδες. Από την άλλη πλευρά η in-φορμυλομάδα είναι πραγματικά ικανή να μειώσει το βαθμό της αλκυλίωσης, για παράδειγμα την tert.βουτυλίωση που συμβαίνει κατά την απομάκρυνση των tert.βουτυλομάδων με οξέα. Επίσης στα N-in-φορμυλο παράγωγα πεπτιδίων που περιέχουν τρυπτοφάνη γίνεται λιγότερη οξείδωση σε όξινα μέσα, μια αντίδραση που έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό έγχρωμων προϊόντων.

Τα τελευταία χρόνια έγιναν προσπάθειες να προστατευθεί το ινδολικό άζωτο με τη βενζυλοξυκαρβονυλομάδα και αυτό έγινε δυνατό με τη χρήση "γυμνών" φθοριούχων ανιόντων που δημιουργούνται με "αιθέρες στέματος". Η tert βουτυλοξυκαρβονυλο ομάδα εισάγεται με τη βοήθεια της p-διμεθυλαμινοπυριδίνης. Η βενζυλοξυκαρβονυλομάδα μπορεί να απομακρυνθεί από τον ινδολικό πυρήνα με επίδραση ισχυρών οξέων, για παράδειγμα υγρού υδροφθορίου και επίσης με καταλυτική υδρογόνωση. Παρ'όλη τη διαφαινόμενη χρησιμότητα δεν υπάρχει προς το παρόν γενική εφαρμογή της in-Z ομάδας στη βιβλιογραφία.

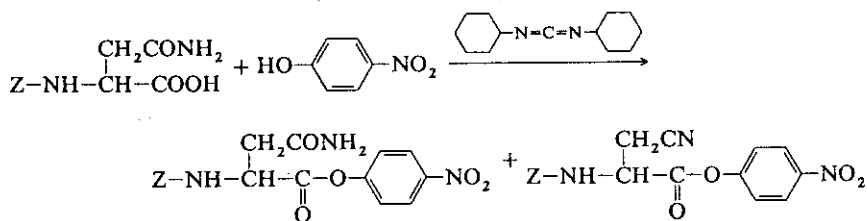
I. Καρβοξαμιδικές Προστατευτικές Ομάδες

Οι παράπλευρες καρβοξαμιδικές ομάδες της ασπαραγίνης και της γλουταμίνης μπορούν να χάσουν νερό κατά την ενεργοποίηση. Υπάρχουν πολλοί τρόποι για να αποφύγουμε αυτή την αντίδραση. Για παράδειγμα δε σχηματίζεται σημαντικό ποσό νιτριλίου εάν ο χρόνος ζωής του δραστικού ενδιάμεσου παραγώγου γίνει μικρότερος με

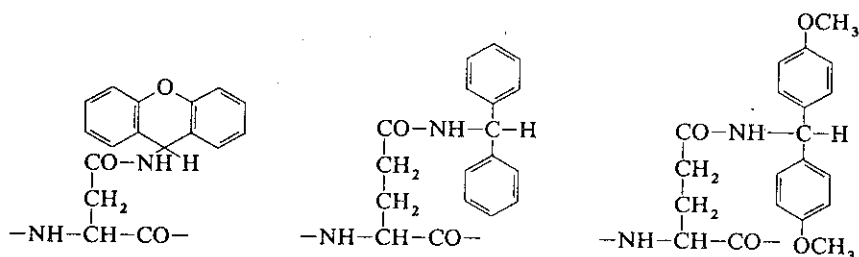
προσθήκη ενός βοηθητικού πυρηνόφιλου, όπως 1-υδροξυβενζοτριάζολιου (HOBt):



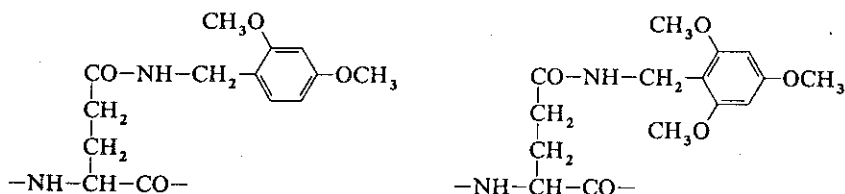
Μια εναλλακτική λύση του προβλήματος είναι η παρασκευή ενεργών εστέρων της Ν^α-προστατευμένης ασπαραγίνης και γλουταμίνης και ο διαχωρισμός του επιθυμητού καρβοξαμيدικού παραγώγου από το νιτρίλιο. Τα καθαρισμένα ενεργά ενδιάμεσα παράγωγα



είναι αρκετά σταθερά ώστε μπορούν να φυλαχθούν και να χρησιμοποιηθούν για την ενσωμάτωση της ασπαραγίνης ή γλουταμίνης. Λόγω αυτών των βοηθητικών δυνατοτήτων η προστασία της καρβοξαμيدικής ομάδας δεν είναι πάντοτε απαραίτητη. Εάν εντούτοις κρίνεται απαραίτητη διατίθεται μια ολόκληρη σειρά προστατευτικών ομάδων. Η κλασική μέθοδος, η συμπίκνωση του αμιδίου με ξανθυδρόλη, δεν είναι η ιδανική, επειδή τα υποκατεστημένα ενδιάμεσα παράγωγα είναι λιγότερο διαλυτά σε οργανικούς διαλύτες από τα αντίστοιχα απροστάτευτα και επίσης επειδή η απομάκρυνση της ξανθυδρυλομάδας απαιτεί επίδραση πολύ ισχυρών οξέων. Η βενζυδρυλομάδα έχει παρόμοιες ιδιότητες, ενώ το διμεθοξυπαράγωγό της είναι πιο ευαίσθητο στα οξέα.



Οι 2,4-διμεθυλο-και 2,4,6-τριμεθοξυ-βενζυλομάδες



διασπώνται με τριφθοροξικό οξύ, αλλά όχι σε ήπιες συνθήκες. Οι δυσκολίες αυτές είναι ο λόγος της ενσωμάτωσης της ασπαργίνης και γλουταμίνης χωρίς προστασία της παράπλευρης αλυσίδας στις περισσότερες περιπτώσεις.

Αναφορές

- Barton, M.A., Lemieux, R. U., Savoie, J.Y.: J. Amer. Chem. Soc. 95, 4501 (1973)
 Ben Ishai, D., Berger, A.: J. Org. Chem. 17, 1564 (1952)
 Bergmann, M., Zervas, L.: Ber. dtsh. Chem. Ges. 65, 1192 (1932)
 Carpino, L.A., Han, G.Y.: J. Amer. Chem. Soc. 92, 5748 (1970)
 Carpino, L.A., Tsao, J.H., Ringsdorf, H., Fell, E., Hettich, G.: J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1978, 358
 du Vigneaud V., Audrieth, L.F., Loring, H.S.: J. Amer. Chem. Soc. 52, 4500 (1930)
 Fischer, E.: Ber. dtsh. Chem. Ges. 24, 239 (1902)
 Iselin, B.: Helv. Chim. Acta 44, 61 (1961)
 Kunz, h., Wadmann, H.: Angew. Chem. Int. ed. 23, 71 (1984)
 Sieber, P., Iselin, B.: Helv. Chim. Acta 51, 614, 622 (1968)
 Yajima, H., Takeyama, M., Kanaki, J., Mitani, K.: J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1978, 482

Περαιτέρω βιβλιογραφία

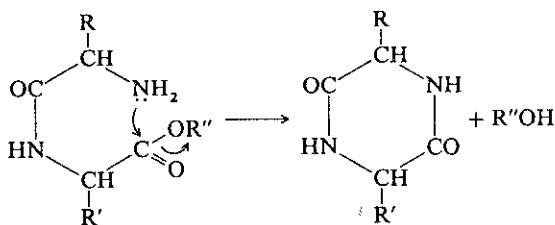
- Geiger, R., König, W.: Amine Protecting Groups, in The Peptides, vol. 3, Gross, E., Meienhofer, J., eds., pp.1-99, New York, Academic Press 1979
 Hiskey, R.G.: Sulfhydryl Protecting Groups, in The Peptides, vol. 3, Gross, E., Meienhofer, J., eds., pp. 137-167, New York, Academic Press 1979
 Roeske, R.W.: Carboxyl Protecting Groups, in The Peptides, vol. 3, Gross, E., Meienhofer, J., eds., pp. 101-136, New York, Academic Press 1979

VII. Ανεπιθύμητες Αντιδράσεις κατά τη Διάρκεια της Σύνθεσης.

Είναι τελείως αδύνατο να αναχθεί η πεπτιδική σύνθεση σε μια απλή ρουτίνα, καθόσον τα πολλαπλά βήματα, όπως είναι η προστασία, η ενεργοποίηση, η σύζευξη και η απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων, συνοδεύονται από πολλές ανεπιθύμητες αντιδράσεις. Ως εκ τούτου, αντί για ένα μόνο προϊόν λαμβάνεται συχνά ένα μίγμα πεπτιδίων και το επιθυμητό προϊόν πρέπει να εξασφαλισθεί με καθαρισμό, που μπορεί να απαιτεί αρκετά βήματα και μερικές φορές επίπονες και χρονοβόρες επεξεργασίες. Κατά συνέπεια, η τελική απόδοση σε ομογενές προϊόν μπορεί να είναι μάλλον απογοητευτική. Έτσι, είναι τελείως απαραίτητο να γνωρίζουμε και να κατανοούμε τέτοιες ανεπιθύμητες αντιδράσεις, να τις προβλέπουμε και, όταν είναι δυνατό, να τις αποτρέπουμε. Εδώ μπορούμε να συζητήσουμε μόνο εκείνες τις παράπλευρες αντιδράσεις που συναντώνται και αναφέρονται συχνά. Ένα σημαντικό πρόβλημα, η ρακεμοποίηση κατά τη διάρκεια της σύνθεσης θα αναλυθεί σ'ένα ξεχωριστό κεφάλαιο.

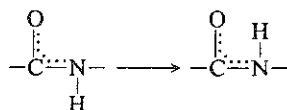
A. Κλείσιμο Δακτυλίου με Κατάλυση από Βάση.

Κατά την πορεία επιμήκυνσης της πεπτιδικής αλυσίδας η προσθήκη του τρίτου αμινοξέος (ή ενός πεπτιδίου) σ'ένα παράγωγο διπεπτιδίου αποτελεί ένα αμφίβολο βήμα. Οι αλκυλεστέρες των διπεπτιδίων υφίστανται εύκολα κυκλοποίηση και σχηματίζουν 2,5-δικετοπιπεραζίνες:



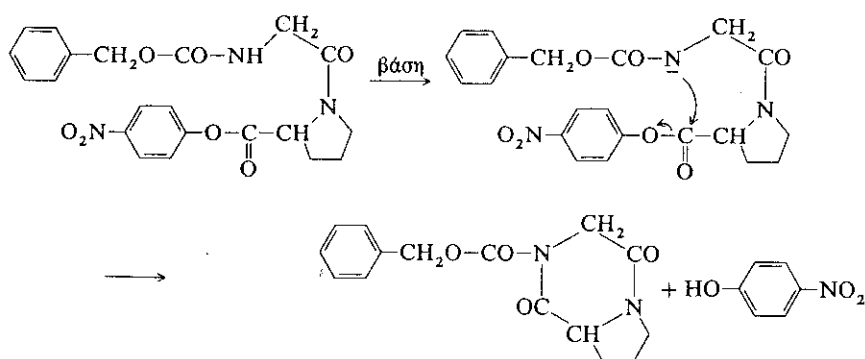
Στις δικετοπιπεραζίνες (DKP) αμφότερες οι αμιδομάδες είναι *cis*, δηλ. το καρβονυλο-οξυγόνο και το υδρογόνο του αμιδίου βρίσκονται προς την ίδια πλευρά του εν μέρει διπλού δεσμού C—N. Κατά συνέπεια, η κυκλοποίηση απαιτεί τη μετατροπή της σταθερότερης *trans* μορφής στην ασταθέστερη *cis* μορφή με κατανάλωση ενέργειας. Η

ενέργεια που απελευθερώνεται κατά το σχηματισμό της πολύ σταθερής δομής της δικετοπιπεραζίνης παρέχει την απαιτούμενη κατευθύνουσα δύναμη για την αντίδραση:



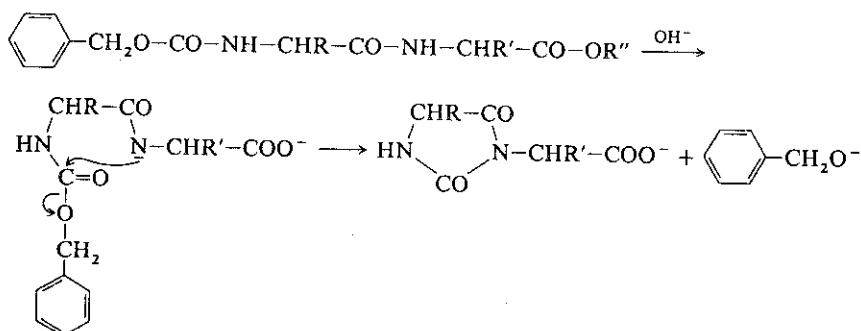
Ο σχηματισμός δακτυλίου ευνοείται ιδιαίτερα στα πεπτίδια που περιέχουν γλυκίνη και προλίνη: στην περίπτωση της γλυκίνης λόγω απουσίας μίας παρεμποδίζουσας παράπλευρης αλυσίδας, στην περίπτωση της προλίνης διότι η παράπλευρη κυκλική αλυσίδα βρίσκεται στο επίπεδο του μορίου της DKP και δεν παρεμποδίζει κατά το κλείσιμο του δακτυλίου. Παρόμοια, οι δικετοπιπεραζίνες σχηματίζονται πολύ ευκολότερα όταν το ένα από τα αμινοξέα ανήκει στην L στερεοχημική οικογένεια των αμινοξέων και το άλλο στην D οικογένεια. Σ'αυτή την περίπτωση οι παράπλευρες αλυσίδες βρίσκονται στις αντίθετες πλευρές του γενικού επιπέδου της DKP, ενώ εάν αμφότερα τα αμινοξέα είναι της ίδιας στερεοχημικής διάταξης τότε οι παράπλευρες αλυσίδες τους βρίσκονται στην ίδια πλευρά και ο όγκος τους επεμβαίνει στο κλείσιμο του δακτυλίου.

Η σχηματισμός δικετοπιπεραζινών συμβαίνει εύκολα στους μεθυλ-, αιθυλ- και βενζυλεστέρες διπεπτιδίων, αλλά όχι στους tert.βουτυλεστέρες. Στα αμίδια διπεπτιδίων λαμβάνει χώρα μόνο σε υψηλές θερμοκρασίες. Η μεγάλη συγκέντρωση αντιδρώντων αυξάνει την ταχύτητα της επιθυμητής αντίδρασης σύζευξης και έτσι μειώνει το βαθμό της κυκλοποίησης, η οποία είναι ενδομοριακή και ως εκ τούτου ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση. Η αποθήκευση εστέρων διπεπτιδίων με ελεύθερη αμινομάδα θα πρέπει, φυσικά, να αποφεύγεται. Επιπλέον παράγωγα δικετοπιπεραζινών μπορούν να παραχθούν επίσης από διπεπτίδια στα οποία η αμινομάδα είναι προστατευμένη. Για παράδειγμα, ο p-νιτροφαινυλεστέρας της βενζυλοξυκαρβονυλο-γλυκίνο-προλίνης δίνει, παρουσία μιάς βάσης, μια ακυλο δικετοπιπεραζίνη:

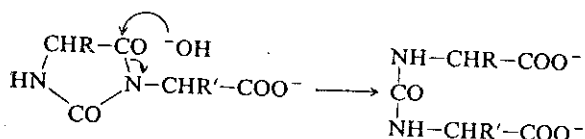


Μια διαφορετική κυκλοποίηση καταλυόμενη από βάση παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια σαπωνοποίησης εστέρων πεπτιδίων στα οποία το αμινοξύ του αμινο-άκρου

ήταν προστατευμένο από την βενζυλοξυκαρβονυλομάδα:

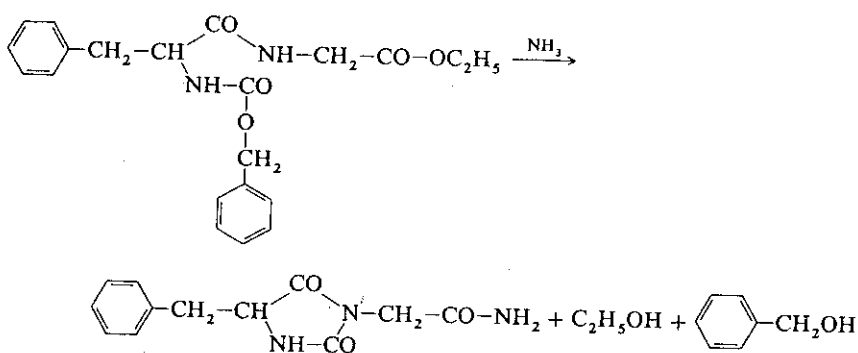


Τα προϊόντα κυκλοποίησης (υδαντοΐνες) διασπώνται με περίσσεια αλκάλειας και δίνουν προϊόντα ουρίας, δικαρβοξυλικά οξέα με την εξής δομή:



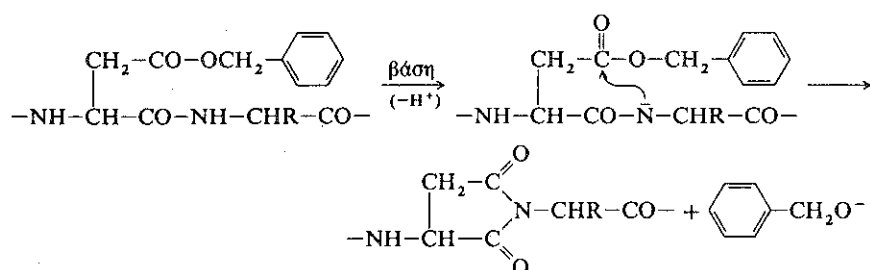
Αυτή η παράπλευρη αντίδραση συμβαίνει σε πολύ μεγάλο βαθμό εάν το R' είναι υδρογόνο, δηλαδή όταν η γλυκίνη είναι το δεύτερο αμινοξύ του πεπτιδίου, επειδή η γλυκίνη είναι το μόνο αμινοξύ το οποίο μπορεί να διακυλιωθεί εύκολα στην αμινομάδα.

Ένα ανάλογο κλείσιμο δακτυλίου προς ένα παράγωγο υδαντοΐνης συμβαίνει κατά την αμμωνιόλυση του αιθυλεστέρα της βενζυλοξυκαρβονυλο-L-φαινυλαλανυλο-γλυκίνης:

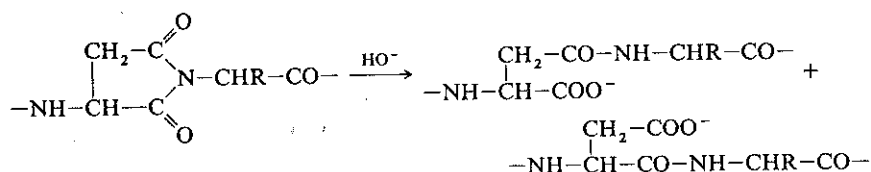


Ο καταλυόμενος από βάση σχηματισμός υδαντοϊνών δεν περιορίζεται στα προστατευμένα διπεπτίδια, μπορεί επίσης να λάβει χώρα σε παράγωγα με μεγαλύτερες αλυσίδες εάν προστατεύονται με την βενζυλοξυκαρβονυλομάδα στο αμινο άκρο και περιέχουν γλυκίνη ως δεύτερο αμινοξύ αυτού του πεπτιδίου.

Απόσπαση πρωτονίου από το άζωτο ενός αμιδίου αρχίζει με μια παρόμοια ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσβολή σε πεπτίδια που περιέχουν ασπαραγινικό οξύ με την παράπλευρη καρβοξυλομάδα προστατευμένη στη μορφή βενζυλεστέρα:

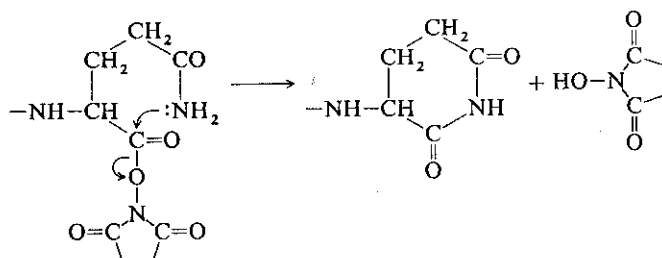


Η ταχύτητα του κλείσιμου του δακτυλίου εξαρτάται από τη σειρά των αμινοξέων του πεπτιδίου, είναι γρήγορη αν $\text{R}=\text{H}$, δηλαδή σε πεπτίδια που περιέχουν τη σειρά —Asp-Gly— και γίνεται αργότερη αν το ασπαραγινικό οξύ ακολουθείται από ένα αμινοξύ με μια ογκώδη παράπλευρη αλυσίδα, όπως είναι η βαλίνη ($\text{R}=\text{ισοπροπυλ}$). Άνοιγμα του ηλεκτριμιδικού δακτυλίου με άλκαλι δε βοηθάει διότι τα β -ασπαραγινυλοπεπτίδια σχηματίζονται ως τα κύρια προϊόντα:

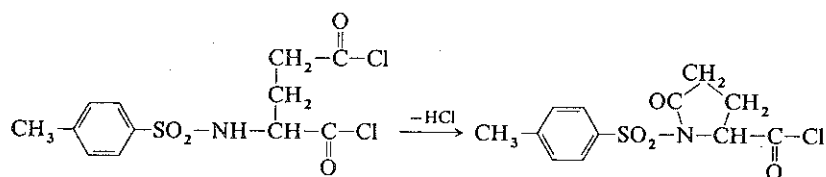


Ενώ ο σχηματισμός του ηλεκτριμιδίου με το β -βενζυλο-ασπαραγινικό οξύ μπορεί να λάβει χώρα σε μεγάλη έκταση, οι αντίστοιχοι *tert*-βουτυλεστέρες είναι αρκετά αδρανείς σε ενδομοριακή προσβολή.

Η αντίστοιχη κυκλοποίηση του γλουταμινικού οξέος είναι σχεδόν ασήμαντη, αλλά τα γλουταμιμίδια (πιπεριδινό-2,5-διόνες) σχηματίζονται από ενεργοποιημένες στο καρβοξύλιο *N*-ακυλο-γλουταμίνες:

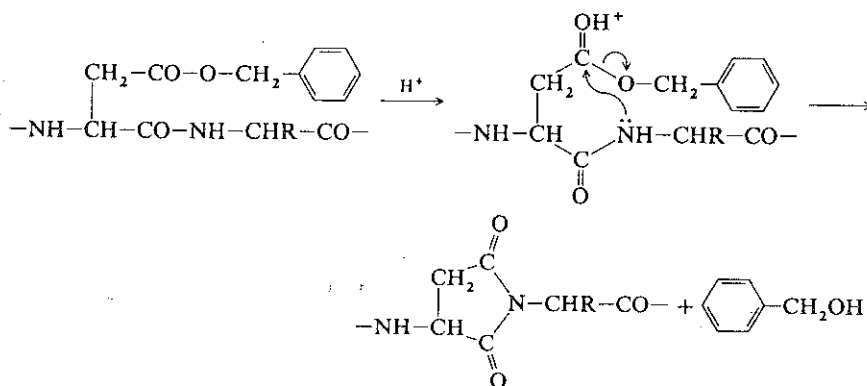


Το εναλλακτικό κλείσιμο του δακτυλίου με σχηματισμό παραγώγων του πυρογλουταμινικού οξέος (μία πυρρολιδίνη) μπορεί επίσης να συμβεί για παράδειγμα όταν το χλωρίδιο του *p*-τολουολοσουλφονυλο-γλουταμινικού οξέος αποθηκεύεται ή υποβάλλεται στην επίδραση βάσης:



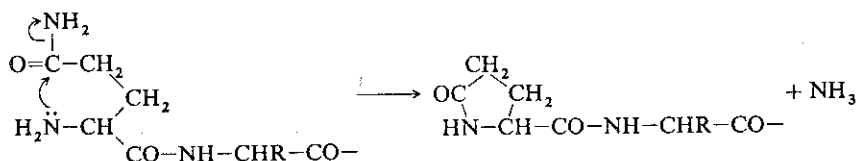
B. Κλείσιμο Δακτυλίου με Κατάλυση από Οξύ

Υπό την επίδραση ισχυρών οξέων το β-βενζυλο-ασπαραγινικό οξύ σχηματίζει πεπτίδια αμινοηλεκτρομιμίδιου



και παρόμοια κυκλοποίηση μπορεί να συμβεί ακόμη και αν η β-καρβοξυλομάδα είναι ελεύθερη. Πράγματι η ίδια παράπλευρη αντίδραση έχει παρατηρηθεί επίσης σε συνθήκες στην ουσία ουδέτερες.

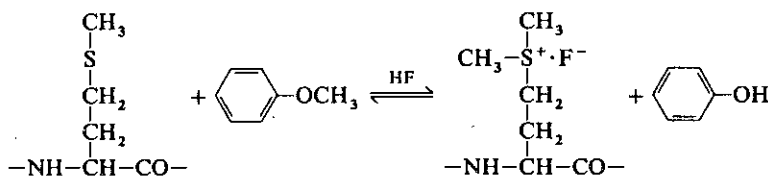
Σε πεπτίδια που έχουν γλουταμίνη στο αμινο-άκρο λαμβάνει χώρα αυθόρμητος σχηματισμός πυρρολιδόνης. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από ασθενή οξέα:



Σε υγρό υδροφθόριο, ένα συχνά χρησιμοποιούμενο αντιδραστήριο για όξινη διάσπαση, οι καρβοξυλομάδες των παράπλευρων αλυσίδων των γλουταμινικών οξέων

Δ. Αλκυλίωση

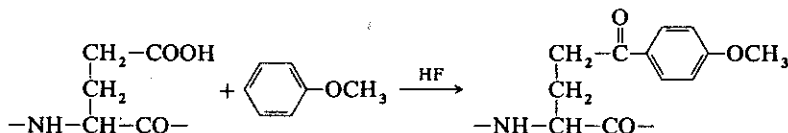
Ηλεκτρονιόφιλη υποκατάσταση των αρωματικών πυρήνων των παράπλευρων αλυσίδων της τυροσίνης και τρυπτοφάνης έχει συχνά αναφερθεί σε σχέση με την απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων σε όξινες συνθήκες. Η C-βενζυλίωση και *tert.*βουτυλίωση της παράπλευρης αλυσίδας της τυροσίνης και η N-αλκυλίωση του πυρήνα του ινδολίου της τρυπτοφάνης συχνά αποδίδονται στα αλκυλοκατιόντα που σχηματίζονται κατά την αντίδραση. Αυτή η κοινή παράπλευρη αντίδραση προκαλείται, πάντως, κυρίως από τα αλκυλιωτικά αντιδραστήρια που σχηματίζονται στην πορεία της αντίδρασης, όπως το βενζυλοβρωμίδιο ή ο τριφθοροξικός *tert.*βουτυλεστέρας. Το ίδιο ισχύει για την S-αλκυλίωση της παράπλευρης αλυσίδας της μεθειονίνης. Μετατροπή του θειοαιθέρα σε άλας σουλφονίου μπορεί επίσης να συμβεί για ένα πρόσθετο λόγο. Παρουσία ισχυρών οξέων η ανισόλη, που προστίθενται ως παγίδα κατιόντων, μεταφέρει τη μεθυλομάδα της στο άτομο του θείου:



Αυτή η παράπλευρη αντίδραση είναι αντιστρεπτή. Όπως ήδη αναφέρθηκε σε σχέση με την προστασία της παράπλευρης αλυσίδας της μεθειονίνης (Κεφάλαιο VI) ο θειοαιθέρας μπορεί να ανακτηθεί από τα τριτοταγή άλατα σουλφονίου με κατεργασία με μερκαπτάνες σε ήπια βασικές συνθήκες. Ωστόσο, αυτή η αλκυλίωση που είχε παραβλεφθεί για αρκετό καιρό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προειδοποίηση εναντίον της χωρίς μέτρο και προσοχή χρήσης των παγίδων. Η σταθερότερη στα οξέα θειοανισόλη ή η 4-μεθυλοθειοφαινόλη που είναι το ίδιο αποτελεσματική είναι λιγότερο πιθανόν να προκαλούν παρόμοια προβλήματα.

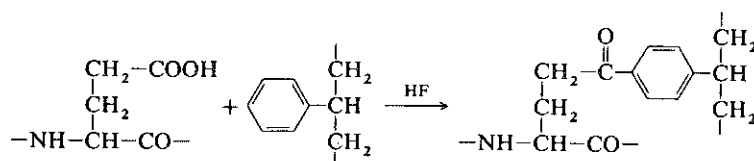
Ε. Αντίδραση Friedel-Crafts

Η ανισόλη που αναφέρθηκε στην προηγούμενη παράγραφο, μπορεί να αποτελέσει την αιτία μιας επιπλέον παράπλευρης αντίδρασης, μίας άλλης ηλεκτρονιόφιλης υποκατάστασης που καταλύεται από ισχυρά οξέα. Δηλαδή, η παράπλευρη καρβοξυλομάδα του γλουταμινικού οξέος συμμετέχει στην Friedel-Crafts αλκυλίωση της παγίδας και σχηματίζει μια σταθερή κετόνη:



Παρόμοια είναι δύσκολο να αποφευχθεί η Friedel-Crafts αντίδραση μεταξύ των παράπλευρων καρβοξυλομάδων και των αρωματικών πυρήνων αδιάλυτων πολυμερών

υποστηριγμάτων που χρησιμοποιούνται στη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση (βλέπε Κεφάλαιο X). Εδώ πάντως, τα κετονικά προαπρόϊοντα είναι σταθερά συνδεδεμένα στο πολυμερές:



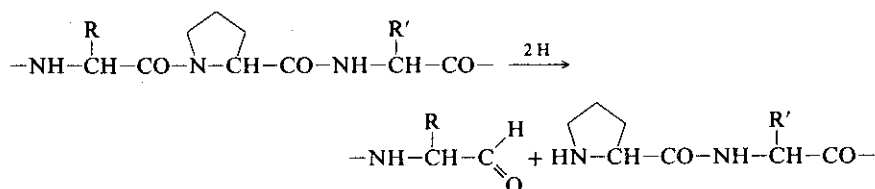
Ως εκ τούτου ενώ αντιπροσωπεύουν μια απώλεια, κανένα κετονικό προϊόν δε μολύνει το πεπτίδιο που αποσπάται από τη ρητίνη.

ΣΤ. Κορεσμός των Αρωματικών Πυρήνων

Η απομάκρυνση της βενζυλοξυκαρβονυλομάδας με καταλυτική υδρογόνωση και η υδρογονολυτική απόσπαση των βενζυλεστέρων ή βενζυλαιθέρων είναι συνήθως μια γρήγορη πορεία και οι συνθήκες που εφαρμόζονται (καταλύτης παλλάδιο, ατμοσφαιρική πίεση) δεν οδηγούν σε σημαντικό κορεσμό των αρωματικών δακτυλίων. Μια δραστηκότερη πορεία για παράδειγμα η χρήση λευκοχρύσου σε οξικό οξύ, μπορεί να αποβεί περισσότερο επικίνδυνη. Επιπλέον, ακόμη και κάτω από τις διαφορετικά ήπιες συνθήκες υδρογονόλυσης έχει παρατηρηθεί μερικός κορεσμός της φαινυλαλανίνης και τρυπτοφάνης όταν η αντίδραση έπρεπε να διαρκέσει μερικές μέρες. Αυτό μπορεί να είναι απαραίτητο όταν ενδιάμεσα που περιέχουν νιτροαργινίνη και / ή im-βενζυλοιστιδίνη αποπροστατεύονται με καταλυτική υδρογόνωση. Παρατεταμένη καταλυτική αναγωγή έχει εφαρμοσθεί ευρέως για την παρασκευή πεπτιδίων που περιέχουν εξαΰδροφαινυλαλανίνη (κυκλοεξυαλανίνη). Πρέπει, πάντως, να σημειωθεί ότι υδρογόνωση της τυροσίνης δίνει δύο ισομερή της εξαΰδροτυροσίνης και επίσης εξαΰδροφαινυλαλανίνη.

Z. Αναγωγική Διάσπαση της Πεπτιδικής Αλυσίδας

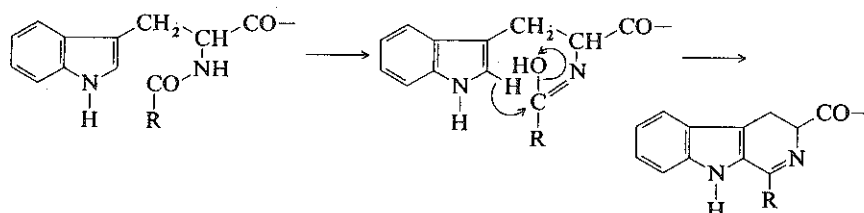
Όταν οι προστατευτικές ομάδες διασπώνται με αναγωγή με νάτριο σε υγρή αμμωνία οι πεπτιδικοί δεσμοί γενικώς δεν επηρεάζονται. Μια εξαίρεση παρατηρείται στα πεπτίδια που περιέχουν προλίνη. Το δευτεροταγές αμίδιο στο τμήμα της άκυκλο-προλίνης υφίσταται αναγωγική σχάση και σχηματίζει μια αλδεΐδη:



Αυτή η αντίδραση απαιτεί την παρουσία ενός δότη υδρογόνου, όπως είναι το νερό ή η μεθανόλη και δε συμβαίνει εάν διατηρηθούν άνυδρες συνθήκες.

Η. Οξειδωτική Αποσύνθεση του Ινδολίου της Τρυπτοφάνης

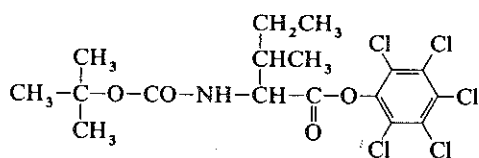
Κατά τη διάρκεια καταργασιών που γίνονται σε όξινο περιβάλλον τα πεπτίδια που περιέχουν τρυπτοφάνη δίνουν κίτρινα, ρόζ ή πορφυρά χρώματα λόγω αρκετών προϊόντων αποσύνθεσης, από τα οποία εδώ αναφέρονται μόνο τα καρβολινικά παράγωγα.



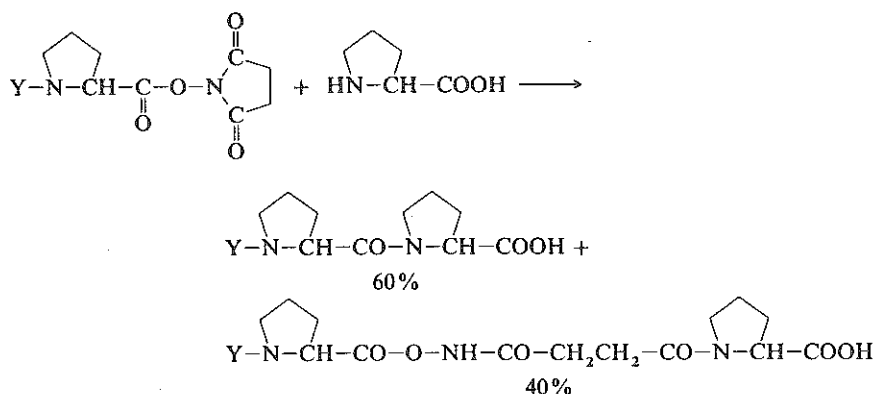
Η χαμηλή θερμοκρασία της αντίδρασης και ο αποκλεισμός του αέρα μειώνουν σε μεγάλο βαθμό την έκταση της αποσύνθεσης.

Η. Παράπλευρες Αντιδράσεις που προκαλούνται από Στερική Παρεμπόδιση

Στη μελέτη των παράπλευρων αντιδράσεων έχουμε ασχοληθεί, μέχρι τώρα, μόνο με τις ηλεκτρονικές επιδράσεις. Θα ήταν, πάντως, λάθος να υποτιμήσουμε τη σημασία των γεωμετρικών παραγόντων και, ιδιαίτερα, την επίδραση των ογκωδών παράπλευρων αλυσίδων. Η διακλάδωση της αλειφατικής αλυσίδας στη βαλίνη και στην ισολευκίνη συμβαίνει στο β-άτομο άνθρακα κοντά στην ενεργοποιημένη καρβονυλομάδα των δραστικών ενδιάμεσων. Ως εκ τούτου, αντιδράσεις ακυλίωσης στις οποίες συμμετέχουν αυτά τα αμινοξέα, δεν προχωρούν με την ίδια ταχύτητα με την οποία προχωρούν με άλλα αμινοξέα, για παράδειγμα με λευκίνη, στην οποία η διακλάδωση γίνεται στο γ-άτομο άνθρακα. Η στερική παρεμπόδιση γίνεται ακόμη μεγαλύτερη όταν η ενεργή ομάδα είναι το ίδιο ογκώδης όπως στους πενταχλωροφαινυλεστέρες:



Περισσότερες δυσκολίες πρέπει να αναμένονται εάν το αμινο-συστατικό συμμετέχει σε μια ήδη υπάρχουσα στερική επίδραση. Για παράδειγμα, σε μια προσπάθεια παρασκευής προλυλοπρολίνης διαμέσου ενός εστέρα υδροξυηλεκτρίμιδιου, η προσβολή στο καρβονύλιο του ενεργού εστέρα συνοδεύεται από μια προσβολή σε μια από τις καρβονυλομάδες του ηλεκτρίμιδιου:



Επίσης όταν η αμινομάδα που πρόκειται να ακυλωθεί είναι κάπου κρυμμένη στο πλέγμα ενός πολυμερούς υποστηρίγματος (βλέπε Κεφάλαιο X) η ακυλίωση πιθανόν να είναι ελλιπής ακόμη και σε ισορροπία και το εμπόδιο δεν μπορεί να ξεπερασθεί απλά με αύξηση της συγκέντρωσης του ακυλιωτικού αντιδραστήριου. Λιγότερο ογκώδεις ενεργές ομάδες προσφέρουν μια λύση στο δίλημμα.

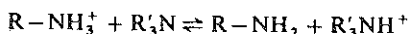
Πρέπει να προσθέσουμε εδώ ότι η στεरिकή παρεμπόδιση δεν είναι απαραίτητα επικίνδυνη. Όπως αναφέρθηκε προηγούμενα ο όγκος στο ενεργό τμήμα των μικτών ανυδριτών οδηγεί σε σαφέστερες αντιδράσεις ακυλίωσης. Παρόμοια, στους β-tert.βουτυλεστέρες του ασπαραγινικού οξέος το κλείσιμο του δακτυλίου προς αμινο-ηλεκτρικά πεπτίδια, που παρατηρείται με τους αντίστοιχους β-βενζυλεστέρες, δε συμβαίνει. Επιπλέον, ο σχηματισμός υδαντοϊνών και παραγώγων ηλεκτρίμιδίου αυξάνει σημαντικά εάν η γλυκίνη λαμβάνει μέρος στην πορεία, καθώς και συμβαίνει εύκολα δι-ακυλίωση αυτού του μοναδικού αμινοξέος που στερείται παράπλευρης αλυσίδας. Κατά συνέπεια, είναι λάθος να χρησιμοποιηθεί γλυκίνη σε πρότυπα πειράματα σχεδιασμένα για τη μελέτη παράπλευρων αντιδράσεων.

I. Πρόληψη και Αναίρεση των Παράπλευρων Αντιδράσεων

Λόγω της ιδιαιτερότητας του κάθε αμινοξέος συνιστάται να αποφεύγονται οι γενικεύσεις στην πεπτιδοχημεία. Επιπλέον, από την προηγηθείσα και βέβαια όχι εξονυχιστική συζήτηση των παράπλευρων αντιδράσεων πιθανόν να συμπεράνουμε ότι οι περισσότερες από αυτές προέρχονται από την παρουσία ισχυρών οξέων ή περίσσειας βάσης στο μίγμα της αντίδρασης. Έτσι, ο σχεδιασμός και οι συνθήκες των συνθέσεων πρέπει να επιλεγούν με τρόπο ώστε αυτές οι επικίνδυνες επιδράσεις να μπορούν να διατηρηθούν στο ελάχιστο. Ένα δεύτερο γενικό μέτρο, η χρήση των αντιδρώντων σε μεγάλη συγκέντρωση, προκύπτει από τον ενδομοριακό χαρακτήρα των ποικίλων παράπλευρων αντιδράσεων. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις και του αμινο-συστατικού και του ακυλιωτικού αντιδραστήριου η επιθυμητή αντίδραση προχωρεί με καλλίτερη ταχύτητα σε σύγκριση με αραιά διαλύματα, ως εκ τούτου οι ανταγωνιστικές παράπλευρες αντιδράσεις γίνονται αμελητέες. Όταν η μικρή διαλυτότητα ή το μεγάλο μοριακό βάρος του αμινο-συστατικού εμποδίζει τη χρήση του σε μεγάλη συγκέντρωση, τότε το ακυλιωτικό αντιδραστήριο, συνήθως το παράγωγο ενός απλού αμινοξέος, πρέπει να χρησιμοποιηθεί σε μια περίσσεια

ώστε να διασφαλίζεται μια συγκέντρωση τουλάχιστον 10^{-1} M σε όλη την πορεία της αντίδρασης σύζευξης. Αυτό το μέτρο (ή "αρχή της περισσειας") αντι-σταθμίζει τη μείωση στην ταχύτητα η οποία αναγκαστικά συμβαίνει στις διμοριακές αντιδράσεις καθώς η συγκέντρωση των αντιδρώντων μειώνεται. Ως εκ τούτου η έκταση των μονομοριακών παράπλευρων αντιδράσεων, στις οποίες η ταχύτητα είναι ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση, μπορεί να μειωθεί σημαντικά. Μια περίσσεια στο ακυλιωτικό αντιδραστήριο βοηθάει επίσης να επιτευχθεί πλήρης ακυλίωση του αμινο-συστατικού και εμποδίζει ως εκ τούτου το σχηματισμό "ελλειπών σειρών", πεπτιδίων από τα οποία ελλείπει ένα αμινοξύ.

Ένα επιπλέον πρόβλημα σχετικό με τη συγκέντρωση πρέπει να αναφερθεί εδώ. Μετά την αποπροστασία σε όξινες συνθήκες η αναγενόμενη αμίνη απομονώνεται ως άλας του οξέος που χρησιμοποιείται για την αποπροστασία. Στο επόμενο, πάντως, βήμα ακυλίωσης χρειάζεται η ελεύθερη αμίνη. Αποπρωτονίωση μπορεί να επιτευχθεί με τη βοήθεια ανταλλακτικών ιόντων ή, κατά τη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση (Κεφάλαιο X) με την κατεργασία με μια τριτοταγή αμίνη και απομάκρυνση των τριακυλαμμωνιακών αλάτων με έκπλυση. Στις συνθέσεις που γίνονται σε διάλυμα η γενική πρακτική είναι η "απελευθέρωση" του αμινο-συστατικού από το άλας του με την προσθήκη ενός ισοδύναμου ποσού μιας τριτοταγούς αμίνης (τριαιθυλαμίνη, διίσοπροπυλαμίνης, N-μεθυλομορφολίνης ή N-αιθυλοπιπεριδίνης) στο μίγμα της αντίδρασης πριν τη σύζευξη. Είναι φανερό, πάντως, ότι συχνά μόνον μια ισορροπία



μπορεί να επιτευχθεί. Ενώ είναι αληθές ότι κατά την ακυλίωση της αμινομάδας αυτή η ισορροπία μετατοπίζεται βαθμιαία προς τα δεξιά, σε κάθε χρονική στιγμή η συγκέντρωση του αμινο-συστατικού είναι μικρότερη από αυτή που θα ήταν εάν βρισκόταν στην τελειώς αποπρωτονιωμένη μορφή. Μια αξιοσημείωτη εξαίρεση παρατηρείται με την αδιαλυτότητα των τριτοταγών αμμωνιακών αλάτων σε ορισμένους διαλύτες. Για παράδειγμα η υδροχλωρική τριαιθυλαμίνη, όντας πρακτικά αδιάλυτη στον οξικό αιθυλεστέρα, αποχωρίζεται από το μίγμα της αντίδρασης (εάν ο οξικός αιθυλεστέρας χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης για τη σύζευξη) και μετατοπίζει την ισορροπία προς την επιθυμητή κατεύθυνση. Η παρουσία τριτοταγών αμινών δεν είναι συνήθως επιθυμητή κατά τη σύζευξη γιατί μπορούν να ξεκινήσουν παράπλευρες αντιδράσεις διαμέσου αφαίρεσης πρωτονίου. Αυτές οι αντιδράσεις μπορούν να παρεμποδισθούν με την προσθήκη μερικών ασθενών οξέων, για παράδειγμα 2,4-δινιτροφαινόλης ή πενταχλωροφαινόλης, οι οποίες παρουσιάζουν σαφή συγγένεια για τις τριτοταγείς αμίνες. Δεν πρωτονιώνουν το αμινο-συστατικό σε τέτοιο βαθμό που να παρεμποδίζουν την ακυλίωσή του. Επιπλέον, η χρήση τριτοταγών αμινών μπορεί να αποφευχθεί με την επιλογή αμινο-προστατευτικών ομάδων πολύ ευαίσθητων στην επίδραση οξέος και με την απομάκρυνση αυτών με κατάλληλα ασθενή οξέα, όπως το 1-υδροξυβενζοτριάζολιο ή τετραζόλιο. Τα προκύπτοντα άλατα ακυλιώνονται εύκολα ακόμη και με σχετικά μέτριους ενεργούς εστέρες, χωρίς την προσθήκη μιάς τριτοταγούς βάσης.

Περαιτέρω βιβλιογραφία

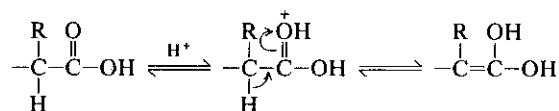
Bodanszky, M. Martinez, J.: Side Reactions in Peptide Synthesis, in *The Peptides*, vol. 5, Gross, E., Meienhofer, J. eds., pp. 111-216, New York, Academic Press 1983.

VIII. Ρακεμοποίηση

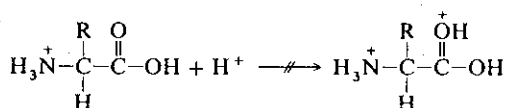
Με εξαίρεση τη γλυκίνη, σε όλα τα αμινοξέα που είναι συστατικά των πρωτεϊνών, το α-άτομο άνθρακα είναι οπτικώς ενεργό. Στη θρεονίνη και ισολευκίνη υπάρχει επίσης ένα οπτικώς ενεργό κέντρο στην παράπλευρη αλυσίδα. Προκειμένου να εξασφαλισθεί το επιθυμητό πεπτίδιο στην ομογενή μορφή του είναι απόλυτα ουσιαστικής σημασίας να αρχίσει κανείς με καθαρά εναντιομερή αμινοξέα και να επιμείνει στη διατήρηση της οπτικής ομογένειας σε όλα τα βήματα της σύνθεσης. Διαφορετικά, αντί ενός απλού προϊόντος, θα ληφθεί ένα μίγμα στερεοϊσομερών. Ο αριθμός τους σ'ένα πεπτίδιο με n οπτικώς ενεργά κέντρα είναι 2^n . Κατά συνέπεια, εάν δεν αποφευχθεί η ρακεμοποίηση, ακόμη και κατά τη σύνθεση ενός όχι πολύ μεγάλου πεπτιδίου θα παραχθεί ένα περίπλοκο μίγμα και ο διαχωρισμός του επιθυμητού προϊόντος από ένα πλήθος παρόμοιων ενώσεων πιθανόν να αποδειχθεί ότι είναι τουλάχιστον μια επίπονη και μερικές φορές εξαντλητική προσπάθεια. Ως εκ τούτου, δεν μπορεί να δοθεί υπερβολική έμφαση στη σημασία των μελετών ρακεμοποίησης και των μέτρων που πρέπει να ληφθούν για την αποφυγή οποιασδήποτε απώλειας στη οπτική καθαρότητα. Στην πραγματικότητα, οι "στρατηγικές" της πεπτιδικής σύνθεσης, που αποτελούν το γενικό σχεδιασμό στον προγραμματισμό των συνθέσεων (Κεφάλαιο IX) υπαγορεύονται καταρχήν από τις προϋποθέσεις που αφορούν τη διατήρηση της οπτικής ομογένειας.

A. Μηχανισμός Ρακεμοποίησης

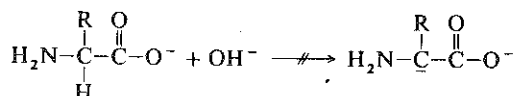
Όσον αφορά την οπτική σταθερότητα τα αμινοξέα δεν επηρεάζονται καθόλου από τα οξέα και τις βάσεις. Η ρακεμοποίηση διαμέσου ενολοποίησης των καρβοξυλικών οξέων σε όξινα διαλύματα, περιλαμβάνει πρωτονίωση του καρβονυλικού οξυγόνου



και επιπλέον, η παρουσία πλησίον ενός θετικά φορτισμένου ατόμου αζώτου παρεμποδίζει το σχηματισμό ενός δεύτερου κατιόντος:

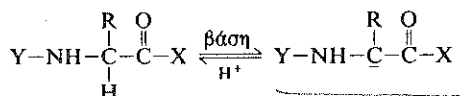


Το ίδιο μπορεί να λεχθεί για την καταλύομενη από βάση ρακεμοποίηση των αμινοξέων. Ένα αρνητικό φορτίο στο καρβοξυλικό ανιόν παρεμποδίζει την περαιτέρω απόσπαση πρωτονίου από τον α-άνθρακα των αμινοξέων γιατί τα διανιόντα

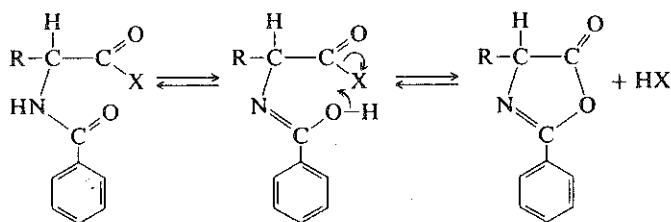


δεν είναι σταθερά σε πρωτικούς διαλύτες. Ως εκ τούτου, κατεργασίες που αφορούν τα ίδια τα αμινοξέα, για παράδειγμα η εισαγωγή της βενζυλοξυκαρβονυλομάδας, διεξάγονται σε σαφώς αλκαλικό διάλυμα. Στην πραγματικότητα, η περίσσεια του αλκάλειος παρεμποδίζει το σχηματισμό δραστικών ενδιάμεσων, όπως οι μικτοί ανυδρίτες, οι οποίοι έχουν πιθανόν την τάση για ρακεμοποίηση. Απουσία μιας ελεύθερης καρβοξυλομάδας, όπως στους αλκυλεστέρες των πεπτιδίων, δε συμβαίνει στην πραγματικότητα ρακεμοποίηση που καταλύεται από βάση κατά τη διάρκεια σαπωνοποίησης με άλκαλι.

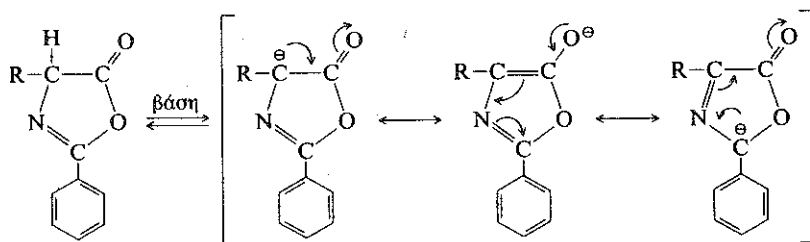
Όπως αναφέρθηκε στην τελευταία παράγραφο, η ενεργοποιημένη καρβονυλομάδα δημιουργεί το κύριο πρόβλημα για την παρασκευή οπτικώς ομογενών πεπτιδίων. Η επίδραση της έλξης ηλεκτρονίων της ενεργοποιημένης ομάδας (X) επεκτείνεται στο α-άτομο άνθρακα, το οπτικώς ενεργό κέντρο και διευκολύνει την απόσπαση του ατόμου του υδρογόνου υπό τη μορφή πρωτονίου



Αυτό το είδος απλής απόσπασης πρωτονίου, δεν είναι πάντως ο μόνος και ακόμη ο κοινότερος μηχανισμός ρακεμοποίησης. Ο συχνότερα επικαλούμενος μηχανισμός περιλαμβάνει κυκλικά ενδιάμεσα, 4,5-διϋδρο-οξαζολ-5-όνες ή αζλακτόνες:

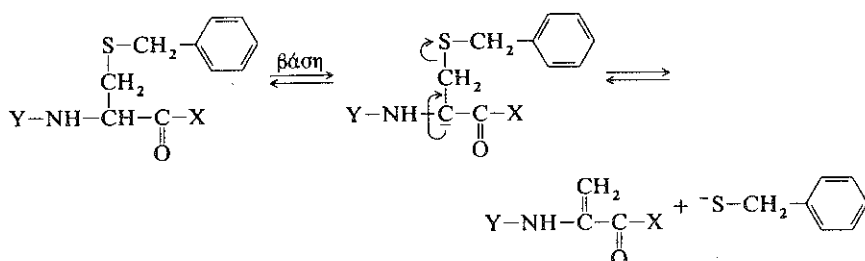


Η απόσπαση πρωτονίου από το οπτικώς ενεργό κέντρο δίνει ένα ανιόν που σταθεροποιείται με μεσομέρεια

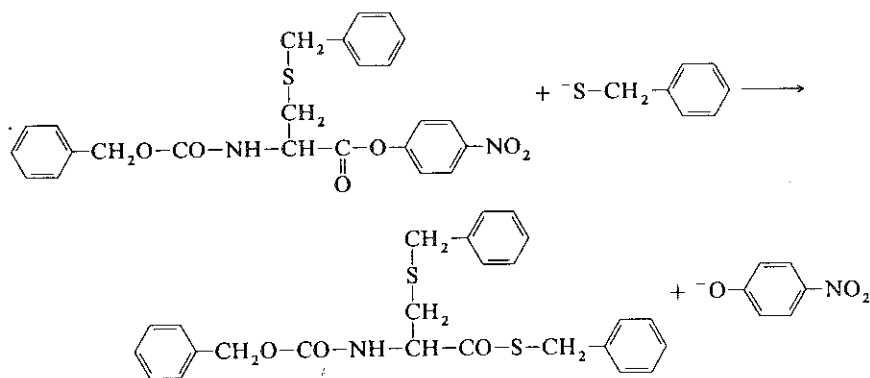


που στην αρχή προβλήθηκε ως υπόθεση και στη συνέχεια αποδείχθηκε με φάσματα υπερύθρου. Ο σχηματισμός αζλακτόνης συμβαίνει σε μεγάλο βαθμό στα βενζοϋλο-αμινοξέα, λιγότερο στα ακετυλοαμινοξέα και για μεγάλο χρονικό διάστημα θεωρούνταν ότι δε συνέβαινε καθόλου στα αμινοξέα που ήταν ακυλιωμένα με την βενζυλοξυκαρβονυλομάδα ή άλλη τύπου ουρεθάνης προστατευτική ομάδα. Η απουσία ρακεμοποίησης κατά την ενεργοποίηση του τελευταίου αποδίδεται στην αδυναμία σχηματισμού αζλακτόνης, αλλά κατά τα τελευταία χρόνια παρήχθησαν αζλακτόνες επίσης από βενζυλοξυκαρβονυλο-, *tert.*βουτυλοξυκαρβονυλο-αμινοξέα κλπ. Επιπλέον παρασκευάσθηκαν μερικές οπτικώς καθαρές αζλακτόνες. Έτσι, ο σχηματισμός της ίδιας της αζλακτόνης δεν αποτελεί ικανοποιητική εξήγηση της ρακεμοποίησης. Η σταθερότητα του κυκλικού ενδιάμεσου στις βάσεις πρέπει να ληφθεί επίσης υπόψη.

Τα ενεργοποιημένα παράγωγα της *S*-αλκυλο-κυστεΐνης υφίστανται ρακεμοποίηση που καταλύεται από βάση ακόμη και όταν η αμινομάδα τους προστατεύεται από την βενζυλοξυκαρβονυλο ή άλλη τύπου ουρεθάνης προστατευτική ομάδα. Μια απλή, αλλά όχι αδιαμφισβήτητη εξήγηση αποτελεί η αντιστρεπτή β -απόσπαση



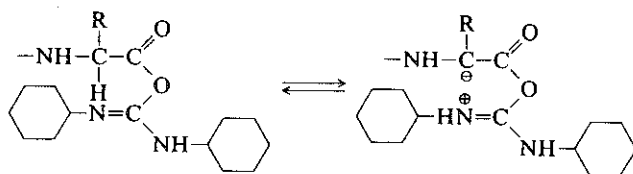
που ενισχύεται από την απομόνωση του θειοβενζυλεστέρα της *N*-βενζυλοκυκαρβονυλο-*S*-βενζυλο-DL-κυστεΐνης. Αυτό υποδεικνύει ότι η βενζυλομερκαπτάνη, ένα από τα προϊόντα της β -απόσπασης, ήταν παρούσα στο μίγμα της αντίδρασης.



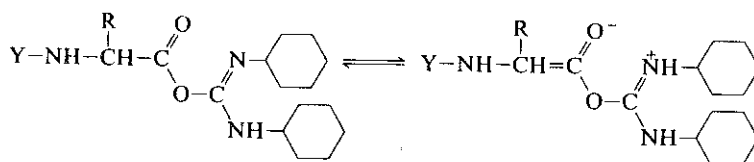
Πειράματα, πάντως, με βενζυλομερκαπτάνη επισημασμένη με ^{35}S δεν έδειξαν εμφάνιση ραδιενέργειας. Επίσης, η ρακεμοποίηση φαίνεται να είναι γρηγορότερη από την ανταλλαγή με δευτέριο στο α -άτομο άνθρακα. Έτσι η ρακεμοποίηση δια μέσου β -διάσπασης μπορεί να συμβαίνει μόνο σε υψηλές θερμοκρασίες, ενώ άλλος (ή άλλοι) μηχανισμός (ή μηχανισμοί) μπορεί να συμβαίνει στις συνθήκες που συνήθως ισχύουν κατά

τη διάρκεια της σύζευξης. Μεταξύ των διαφόρων υποθέσεων που διατυπώθηκαν η μερική αποδοχή του αρνητικού φορτίου του ενδιάμεσου καρβανιόντος από τα d-τροχιακά του ατόμου του θείου βρίσκεται σε αντίθεση με τη ρακεμοποίηση των παραγώγων της Ο-βενζυλο-σερίνης.

Οι μηχανισμοί που αναφέρθηκαν στις προηγούμενες παραγράφους είναι αυτοί που γενικά προτείνονται για την εξήγηση της ρακεμοποίησης, αλλά απέχουν πολύ από τη διαβεβαίωση ότι δε συμβαίνουν άλλοι μηχανισμοί. Για παράδειγμα φαίνεται να είναι δυνατό ότι η συνεχώς παρατηρούμενη απώλεια της οπτικής καθαρότητας του ενεργοποιημένου αμινοξέος κατά τη σύζευξη πεπτιδίων με τη βοήθεια του δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμιδίου οφείλεται σε ενδομοριακή απόσπαση πρωτονίου από το βασικό κέντρο στο δραστικό ενδιάμεσο της Ο-ακυλοϊσοουρίας



ή στην ενολοποίηση που προκαλείται από την ίδια ισχυρώς βασική ομάδα της ισοουρίας.



Έτσι ο όξινος χαρακτήρας πρόσθετων όπως το 1-υδροξυβενζοτριαζόλιο συμβάλλει στην ικανότητά τους να παρεμποδίζουν τη ρακεμοποίηση κατά τη σύζευξη με καρβοδιιμίδια.

B. Προσδιορισμός της Ρακεμοποίησης

Η απώλεια της οπτικής ομογένειας αποτελεί πάντοτε ένα συνεχή κίνδυνο στην πεπτιδική σύνθεση και υπάρχει προφανής ανάγκη για μεθόδους που μπορούν να αποκαλύψουν την παρουσία ανεπιθύμητων διαστεροϊσομερών στα ενδιάμεσα και ιδιαίτερα στο τελικό προϊόν της πορείας αύξησης της αλυσίδας. Με προσεκτικά ανεπτυγμένα χρωματογραφικά συστήματα είναι συχνά δυνατόν να διαχωρισθούν αρκετά μεγάλες πεπτιδικές αλυσίδες οι οποίες διαφέρουν ή μια από την άλλη μόνο σε σχέση με τη στερεοχημική διάταξη ενός απλού αμινοξέος. Υπάρχουν πάντως αρκετές μέθοδοι που διατίθενται γι' αυτό το είδος της εξονυχιστικής έρευνας που μπορεί να εφαρμοσθεί χωρίς ειδική μελέτη του υπό εξέταση ιδιαίτερου προϊόντος. Τέτοιες γενικές μέθοδοι απαιτούν υδρόλυση του πεπτιδίου είτε με οξύ είτε με τη βοήθεια πρωτεολυτικών ενζύμων. Η εξειδίκευση αυτών των ενζύμων είναι το κύριο πλεονέκτημα της ενζυμικής μεθόδου γιατί δε γίνεται υδρόλυση μεταξύ ενός D-αμινοξέος και του επόμενου αμινοξέος της σειράς. Ως εκ τούτου πλήρης υδρόλυση θα λάβει χώρα μόνο στα πεπτίδια που δεν περιέχουν D-αμινοξέα. Η ταχύτητα, πάντως, διάσπασης του πεπτιδικού δεσμού εξαρτάται από το αμινοξύ που διασπάται από το N-τέλος. Πολύ μικρές ταχύτητες επιτυγχάνονται κατά την υδρόλυση

γλύκυλο και προλγυλο πεπτιδίων με λευκίνοαμινοπεπτιδάση (στην οποία αποδίδεται αυτός ο ατυχής χαρακτηρισμός, καθόσον δεν είναι εξειδικευμένη για τη λευκίνη), ενώ λιγότερες δυσκολίες συναντώνται με την αμινοπεπτιδάση Μ. Γρήγορη και πλήρης υδρόλυση πεπτιδίων που περιέχουν προλίνη απαιτεί τη χρήση προλινασών. Ένα μίγμα δύο ενζύμων, π.χ. της αμινοπεπτιδάσης Μ και της προλινάσης μπορεί να είναι αρκετά αποτελεσματικό. Παρόμοια αποτελέσματα επιτυγχάνονται με καρβοξυπεπτιδάσες οι οποίες οδηγούν σε βήμα προς βήμα απομάκρυνση των απλών αμινοξέων αρχίζοντας από το C-τελικό αμινοξύ του. Η καρβοξυπεπτιδάση Α παρουσιάζει μειωμένη καταλυτική επίδραση στην περίπτωση που βασικά αμινοξέα βρίσκονται στο άμινο τέλος, ενώ η καρβοξυπεπτιδάση Β είναι περισσότερο αποτελεσματική σ' αυτήν ακριβώς την περίπτωση. Το ένζυμο της μαγιάς, η καρβοξυπεπτιδάση Υ είναι ένας γενικότερος καταλύτης.

Ένας σημαντικός αριθμός βιολογικά δραστικών πεπτιδίων τελειώνει σε καρβοξυλαμίδιο μάλλον παρά σε ελεύθερη καρβοξυλομάδα. Αυτά τα πεπτιδικά αμίδια δεν είναι, φυσικά, υποστρώματα για καρβοξυπεπτιδάσες. Ένα ανάλογο πρόβλημα συναντάται στα πεπτίδια που φέρουν μια ακυλομάδα όπως είναι η ακετυλομάδα στο N-τέλος τους και, κατά συνέπεια, δεν μπορούν να υδρολυθούν με αμινοπεπτιδάσες. Εάν και οι δύο τύποι των εξωπεπτιδασών αποτύχουν μπορεί κανείς να επιτύχει μια πρώτη διάσπαση της αλυσίδας με ενδοπεπτιδάσες, όπως είναι η θρυψίνη. Αυτή είναι πολύ ειδική για τα βασικά αμινοξέα και καταλύει την υδρολυτική διάσπαση του δεσμού μεταξύ αργινίνης και του επόμενου αμινοξέος και τη διάσπαση του δεσμού που ακολουθεί τη λυσίνη. Τα υδρολύματα της θρυψίνης είναι τότε κατάλληλα για περαιτέρω ενζυμική υδρόλυση με εξωπεπτιδάσες, ιδιαίτερα με την καρβοξυπεπτιδάση Β. Η χυμοθρυψίνη είναι παρόμοια χρήσιμη, αλλά η εξειδίκευσή της παρουσιάζεται κάπως περιορισμένη γιατί επιπλέον από το δεσμό που ακολουθεί ένα αρωματικό αμινοξύ, υδρολύεται επίσης ο δεσμός μετά από λευκίνη, παρ'όλο που αυτό γίνεται με μικρότερη ταχύτητα. Στα υδρολύματα που προέρχονται από πρωτεολυτικά ένζυμα μόνο αμινοξέα μπορούν να είναι παρόντα ενώ μη υδρολύσιμα πεπτίδια αποκαλύπτουν την παρουσία ενός D-αμινοξέος.

Η όξινη υδρόλυση που ακολουθείται από τον προσδιορισμό των D-αμινοξέων στο υδρόλυμα είναι εξίσου χρήσιμη. Για να επιτευχθεί αυτό τα αμινοξέα του υδρόλυματος ακυλώνονται με ένα καθαρό εναντιομερές ενός αμινοξέος, για παράδειγμα με τον N-καρβοβενζοξυανυδρίτη της L-λευκίνης. Στο προκύπτον μίγμα διπεπτιδίων κάθε ρακεμοποιημένο αμινοξύ σχηματίζει δύο διπεπτίδια που είναι διαστεreoϊσομερή το ένα του άλλου, για παράδειγμα L-λευκυλο-L-φαινυλαλανίνη και L-λευκυλο-D-φαινυλαλανίνη. Εφόσον αυτές είναι ενώσεις με διαφορετικές φυσικές ιδιότητες μπορούν να διαχωρισθούν και παρουσιάζουν μια διπλή κορυφή στο χρωματογράφημα ενός αναλυτή αμινοξέων. Κατά τα τελευταία χρόνια η μετατροπή σε διαστεreoϊσομερή δεν είναι πλέον απαραίτητη επειδή διατίθενται τώρα οπτικώς ενεργά υποστρώματα που επιτρέπουν το διαχωρισμό των εναντιομερών με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) και επίσης με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας σε πλάκες που είναι επιστρωμένες με μια οπτικώς ενεργή στιβάδα.

Γ. Μελέτες Ρακεμοποίησης σε Πρότυπα Συστήματα

Η ρακεμοποίηση κατά τη διάρκεια της σύνθεσης πεπτιδίων αποτελεί ένα περίπλοκο πρόβλημα. Η ποικιλία των δυνατών διαδρομών που ακολουθούνται κατά την πορεία

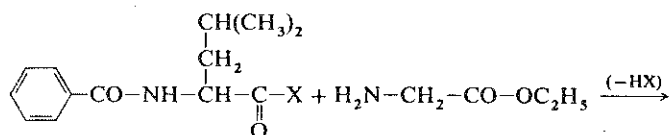
ρακεμοποίησης αυξάνει λόγω της ιδιαιτερότητας των αμινοξέων. Αυτό δείχθηκε ήδη στο παράδειγμα της S-ακυλο-κυστεΐνης η οποία χάνει τη οπτική καθαρότητα δια μέσον ενός ειδικού μηχανισμού ακόμη και αν προστατευθεί με μια τύπου ουρεθάνης προστατευτική ομάδα, η οποία παρεμποδίζει τη ρακεμοποίηση σε άλλα ακυλοαμινοξέα. Η αντίθετη πλευρά του προβλήματος παρουσιάζεται στην προλίνη, η οποία, τουλάχιστον στις κοινές συνθήκες πεπτιδικής σύνθεσης, ανθίσταται στη ρακεμοποίηση. Αυτό εξηγήθηκε συμβατικά από το γεγονός ότι η προλίνη είναι μια δευτεροταγής αμίνη και, ως εκ τούτου, στα N-ακυλο-παράγωγά της στερείται του ατόμου υδρογόνου το οποίο συμμετέχει στο σχηματισμό αζλακτονών (βλέπε τμήμα Α αυτού του κεφαλαίου). Η εμπειρία, πάντως, που έχει αποκτηθεί από τα εύκολα ρακεμοποιούμενα N-ακυλο-παράγωγα των N-μεθυλοαμινοξέων έρχεται σε αντίθεση με αυτή την υπόθεση. Φαίνεται περισσότερο πιθανόν ότι η ακαμψία της κυκλικής παράπλευρης αλυσίδας της προλίνης αποκλείει κάποιες μεταβατικές καταστάσεις που αποτελούν αναπόσπαστα τμήματα της πορείας ρακεμοποίησης.

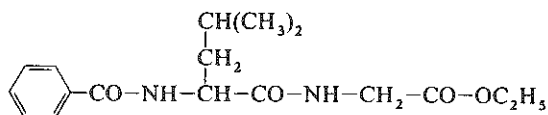
Διάφορες παράπλευρες αλυσίδες επηρεάζουν την έκταση της ρακεμοποίησης με διαφορετικούς τρόπους. Έτσι, η βενζυλική παράπλευρη αλυσίδα στη φαινυλαλανίνη συμβάλλει στη σταθεροποίηση ενός καρβανιόντος και μπορεί ως εκ τούτου να διευκολύνει την απόσπαση πρωτονίου από το α-άτομο άνθρακα. Αυτή η επίδραση είναι μεγαλύτερη στη φαινυλογλυκίνη (η οποία δεν απαντάται στις πρωτεΐνες αλλά βρίσκεται σε μικροβιακά πεπτίδια) καθόσον το οπτικώς ενεργό άτομο άνθρακα αυτής είναι βενζυλικό:



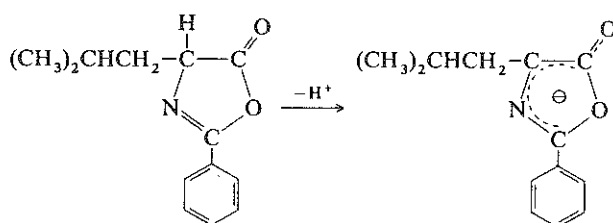
Οι αλειφατικές παράπλευρες αλυσίδες στην αλανίνη και λευκίνη δεν προκαλούν μεγάλη επίδραση αλλά η διακλάδωση στο β-άτομο άνθρακα στη βαλίνη και ισολευκίνη μπορεί να αυξήσει τη ρακεμοποίηση εφόσον ο συνδυασμός της παροχής ηλεκτρονίων και της στερικκής παρεμπόδισης καταλήγει σε μείωση των ταχυτήτων σύζευξης. Η επακόλουθη αύξηση στο χρόνο ζωής του δραστηκού ενδιάμεσου παρέχει μια περαιτέρω δυνατότητα απόσπασης πρωτονίου από τη βάση. Είναι προφανές από αυτά τα παραδείγματα ότι η επίδραση των μεμονωμένων παράπλευρων αλυσίδων, η επίδραση των μεθόδων σύζευξης και οι συνθήκες της αντίδρασης σχηματισμού του πεπτιδικού δεσμού (διαλύτες, συγκέντρωση, θερμοκρασία, πρόσθετα) πρέπει να μελετηθούν σε καλώς σχεδιασμένα πειράματα. Αρκετά πρότυπα συστήματα έχουν προταθεί γι' αυτό το σκοπό.

Το πρώτο πρότυπο (Williams και Young 1963) στηριζόταν στη σύζευξη της βενζοϋλο-L-λευκίνης με γλυκινοαιθυλεστέρα. Η ειδική στροφική ικανότητα του ακατέργαστου προϊόντος χρησιμοποιήθηκε για τον καθορισμό της





καθαρότητας του εναντιομερούς. Αυτό το απλό σύστημα έτυχε πολύ γρήγορα μεγάλης αποδοχής και προσέφερε πολύτιμες πληροφορίες. Πρέπει επίσης να ληφθούν υπόψη μερικές αδυναμίες της μεθόδου. Η βενζυλομάδα δεν είναι ο καλλίτερος αντιπρόσωπος των προστατευτικών ομάδων ή του τμήματος της πεπτιδικής αλυσίδας που ακυλιώνει το ενεργοποιημένο αμινοξύ γιατί οδηγεί περισσότερο στο σχηματισμό αζλακτόνης και πιθανόν συμβάλλει στη σταθεροποίηση του ανιόντος που σχηματίζεται από την αζλακτόνη με απόσπαση πρωτονίου:

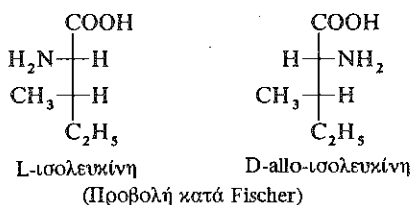


Ως εκ τούτου το πείραμα του Young πιθανόν να οδηγεί σε κάποια υπερεκτίμηση της ρακεμοποίησης. Αυτή η παραποίηση αντισταθμίζεται από τη σχετική αντίσταση της λευκίνης για ρακεμοποίηση, αλλά ένα επιπλέον πρόβλημα δημιουργείται από την αναγκαιότητα απομόνωσης του ακατέργαστου βενζυλο-λευκίνο-γλυκίνο-αιθυλεστέρα σε πάρα πολύ καλή απόδοση. Εάν επιτευχθεί μικρότερη από σχεδόν ποσοτική απόδοση στη σύζευξη ή στην ανάκτηση του προϊόντος τότε παραμένει δυνατόν ότι η μη υπολογισθείσα αναλογία περιέχει ένα όχι ασήμαντο ποσόν του D-ισομερούς.

Ένα συχνά χρησιμοποιούμενο παλιότερα πρότυπο (Anderson και Callahan 1958) βασίζεται στη σύζευξη της βενζυλοξυκαρβονυλο-γλυκυλο-L-φαινυλαλανίνης με γλυκίνο-αιθυλεστέρα. Εφόσον η φαινυλαλανίνη είναι ακυλιωμένη από τη γλυκίνη και όχι από τη βενζυλοξυκαρβονυλομάδα, δεν προστατεύεται εναντίον της ρακεμοποίησης. Κατά συνέπεια, αντιδράσεις που προκαλούν απώλεια της οπτικής καθαρότητας δίνουν επιπλέον από το Z-Gly-L-Phe-Gly-OEt, επίσης το εναντιομερές Z-Gly-D-Phe-Gly-OEt. Ο βαθμός της ρακεμοποίησης εύκολα προσδιορίζεται από το ποσό του ρακεμοποιημένου διότι διαχωρίζεται από αραιό διάλυμα αιθανόλης. Πάντως, τα αποτελέσματα αυτής της μεθόδου είναι αξιόπιστα μόνον εφόσον η αντίδραση σχηματισμού του πεπτιδικού δεσμού προχωρεί με πάρα πολύ καλή απόδοση. Η παρουσία παραπροϊόντων μπορεί να επέμβει σημαντικά στην κρυστάλλωση και μπορεί να μη διαχωρισθεί ρακεμοποιημένη ουσία παρ'όλο που το D-ισομερές έχει παραχθεί σε μεγάλο ποσό. Γενικώς: είναι επικίνδυνο να στηριζόμαστε σε αρνητικές ενδείξεις, την *αδυναμία* διαχωρισμού του ρακεμικού μίγματος.

Αρκετά νεώτερα πρότυπα συστήματα σχεδιάστηκαν με τη σκέψη για διαχωρισμό των προϊόντων τα οποία δεν είναι εναντιομερή αλλά διαστερεοϊσομερή το ένα του άλλου. Για παράδειγμα κατά τη σύζευξη της ακετυλο-L-ισολευκίνης με τον γλυκίνοαιθυλεστέρα η ρακεμοποίηση θα δώσει τον ακετυλο-D-αλλοϊσολευκυλο-γλυκίνο αιθυλεστέρα,

επειδή η αναστροφή στο α-άτομο άνθρακα οδηγεί σε ένα D-αμινοξύ, ενώ η οπτική καθαρότητα στο δεύτερο οπτικώς ενεργό κέντρο, το β-άτομο άνθρακα δεν επηρεάζεται και ως εκ τούτου σχηματίζεται ένα παράγωγο της



αλλοϊσολευκίνης. Πλήρης υδρόλυση (για παράδειγμα με 6N HCl στους 110°C για 16 ώρες) διασπά τους αμιδικούς και εστερικούς δεσμούς και το υδρόλυμα μπορεί να υποβληθεί για ανάλυση στη στήλη ενός αναλυτή αμινοξέων. Στην επιτυχώς καθιερωμένη μέθοδο ανάλυσης αμινοξέων κατά Stein-Moore η ισολευκίνη και η αλλοϊσολευκίνη παρουσιάζουν καλώς διαχωρισμένα σήματα και η αναλογία τους παρέχει την ζητούμενη πληροφορία, το βαθμό ρακεμοποίησης. Η μέθοδος δεν απαιτεί διαχωρισμό των δύο πεπτιδίων και ως εκ τούτου τα αποτελέσματα δεν τροποποιούνται από τα προβλήματα κατά τη διαδικασία ανάκτησης των προϊόντων. Σε μια γενικότερη άποψη της ίδιας ιδέας, παράγονται διαστεreoϊσομερή τριπεπτίδια, αποπροστατεύονται και όπως λαμβάνονται έτσι αναλύονται με τη βοήθεια ενός αναλυτή αμινοξέων, δηλαδή χωρίς υδρόλυση. Για παράδειγμα η βενζυλοξυκαρβονυλο-γλυκυλο-L-αλανίνη συζεύγνυται με τον L-λευκίνο βενζυλεστέρα και μετά από υδρογόνωση το μίγμα που περιέχει την γλυκυλο-L-αλανυλο-L-λευκίνη και γλυκυλο-D-αλανυλο-L-λευκίνη υποβάλλεται για ανάλυση στην κολώνα του αναλυτή. Αντικαθιστώντας την L-αλανίνη με άλλα L-αμινοξέα μπορούν να αποκτηθούν σημαντικές πληροφορίες για την ευαισθησία των διαφορών αμινοξέων σε κάποια μέθοδο σύζευξης ή στις συνθήκες της σύζευξης.

Πτητικά παράγωγα πεπτιδίων, για παράδειγμα ο τριφθοροακετυλο-L-βαλνυλο-L-βαλινομεθυλεστέρας ή ο βενζυλοξυκαρβονυλο-L-λευκυλο-L-φαινυλαλανυλο-L-βαλνινο-tert-βουτυλεστέρας μπορούν να διαχωρισθούν από τα διαστεreoϊσομερή τους που περιέχουν ένα D-αμινοξύ με αέριο χρωματογραφία. Επίσης, με την ανάλυση των nmr φασμάτων σχετικά απλών πεπτιδίων μπορεί να προσδιορισθεί ο βαθμός ρακεμοποίησης που θα παρατηρείτο κατά την παρασκευή τους χωρίς να απαιτείται διαχωρισμός των διαστεreoϊσομερών, καθόσον η διαφορά στις χημικές μετατοπίσεις επιλεκτικά μερικών απορροφήσεων είναι αρκετή για να γίνει προσδιορισμός με ολοκλήρωση των σημάτων αυτών των απορροφήσεων. Έτσι μπορεί να υπολογισθεί το εμβαδόν των καλώς διαχωρισμένων σημάτων των μεθυλοπρωτονίων της αλανίνης στον ακετυλο-L-φαινυλαλανυλο-L-αλανινο-μεθυλεστέρα και στον ακετυλο-D-φαινυλαλανυλο-L-αλανινο-μεθυλεστέρα και οι τιμές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό του βαθμού ρακεμοποίησης της φαινυλαλανίνης κατά τη διάρκεια της σύζευξης. Αυτά είναι μόνο μερικά κατ'επιλογήν παραδείγματα από τα πολυάριθμα πρότυπα συστήματα που έχουν προταθεί για τη μελέτη της ρακεμοποίησης, παρ'όλο που ακόμη και σε μια τέτοια σύντομη ανασκόπηση θα πρέπει να αναφερθεί η πορεία που στηρίζεται σε εναντιοεκλεκτικά ένζυμα. Σύζευξη της βενζυλοξυκαρβονυλο-L-αλανυλο-D-αλανίνης με τον L-αλανυλο-L-αλανινο-βενζυλεστέρα δίνει ένα προστατευμένο ενδιάμεσο από το οποίο με καταλυτική υδρογόνωση λαμβάνεται η ελεύθερη L-Ala-D-Ala-L-Ala-L-Ala. Αυτή η ένωση ανθίσταται τελείως

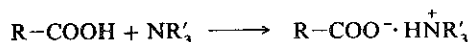
στην υδρόλυση που καταλύεται από αμινοπεπτιδάσες, εφόσον ο πρώτος δεσμός που πρέπει να διασπασθεί συνδέει το N-τελικό αμινοξύ με ένα D-αμινοξύ. Εάν, πάντως, συνέβαινε ρακεμοποίηση κατά τη διάρκεια της σύζευξης, αυτό θα άλλαζε το ενεργοποιημένο αμινοξύ, την D-αλανίνη σε L-αλανίνη και μετά την αποπροστασία θα λαμβάνονταν το τετραπεπτιδίο L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala. Αυτό υδρολύεται τελείως από τις αμινοπεπτιδάσες. Η απελευθερούμενη αλανίνη μπορεί να προσδιοριστεί και αποτελεί μια μάλλον ακριβή μέτρηση ρακεμοποίησης εφόσον για κάθε ανεστραμμένο αμινοξύ βρίσκονται τέσσερα μόρια αλανίνης στην ανάλυση.

Σ' αυτό το σημείο πρέπει να προστεθεί μια παρατήρηση που αφορά το βαθμό της ρακεμοποίησης που προσδιορίζεται με τη βοήθεια πρότυπων συστημάτων. Συνήθως θεωρείται ότι το ποσόν του ανεπιθύμητου διαστεροϊσομερούς αντιπροσωπεύει το βαθμό της ρακεμοποίησης. Ενώ αυτό θα μπορούσε να γίνει αποδεκτό για λόγους σύγκρισης θα πρέπει κανείς να έχει στο νου του ότι από το μη οπτικώς ενεργό ενδιάμεσο της πορείας της αντίδρασης τα δύο ισομερή σχηματίζονται στον ίδιο βαθμό. Έτσι ο αριθμός των μορίων που λαμβάνουν μέρος είναι δύο φορές ο αριθμός των ανεπιθύμητων διαστεροϊσομερών που σχηματίζονται.

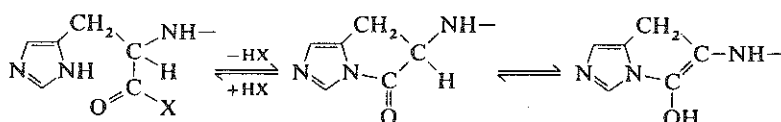
Δ. Πρόληψη της Ρακεμοποίησης

Εφόσον η ρακεμοποίηση κατά τη διάρκεια της σύζευξης ακολουθεί μια πορεία που καταλύεται από μια βάση είναι δικαιολογημένο να θεωρήσουμε ότι η φύση της βάσης δεν μπορεί να μην επιδρά στην έκβαση της ρακεμοποίησης. Η στερική παρεμπόδιση σε μερικές τριτοταγείς αμίνες μπορεί να εξασθενήσει την ικανότητά τους να πλησιάσουν το οπτικώς ενεργό κέντρο στα δραστικά ενδιάμεσα. Η δισοπροπυλαιθυλαμίνη προκαλεί λιγότερη ρακεμοποίηση από την τριαιθυλαμίνη κατά τη σύζευξη των παραγώγων της S-βενζυλο-L-κυστεΐνης, αλλά δεν παρουσιάζει σημαντικά ευεργετική επίδραση στις αντιδράσεις που περιλαμβάνουν άλλα αμινοξέα. Πιθανόν στις αζλακτόνες, τα συνήθως παραγώμενα ενδιάμεσα της ρακεμοποίησης, το οπτικώς ενεργό άτομο άνθρακα εκτίθεται αρκετά καλά και ως εκ τούτου οι ογκώδεις ομάδες της τριτοταγούς αμίνης δεν μπορούν να επέμβουν στην απόσπαση πρωτονίου. Επίσης, βρέθηκαν μερικές διαφορές στις συζεύξεις δια μέσου μικτών ανυδριτών μεταξύ της παλιότερα προτιμώμενης βάσης τριαιθυλαμίνης και τριτοταγών αμινών όπως είναι η N-αιθυλοπιπεριδίνη ή η N-αιθυλομορφολίνη, καθόσον η τελευταία οδηγεί στη λιγότερη ρακεμοποίηση. Το πρωταρχικό μάθημα που πρέπει, πάντως, να πάρουμε είναι να αποφεύγουμε, όταν είναι δυνατόν, να χρησιμοποιούμε τριτοταγείς αμίνες στο μίγμα της σύζευξης. Η συχνά εφαρμοζόμενη πορεία, η προσθήκη μιας τριτοταγούς αμίνης σ' ένα άλας του αμινο συστατικού παρουσιάζει βεβαίως μικρότερη επίδραση από τη χρήση του αμινο-συστατικού όπως είναι, δηλαδή την ελεύθερη αμίνη. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι πολύ λίγη ρακεμοποίηση λαμβάνει χώρα (εάν συμβαίνει κάποια) εάν ακολουθηθεί αυτή η απλή αρχή.

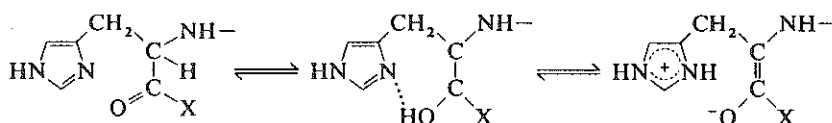
Τριτοταγείς αμίνες προστίθενται επίσης στο μίγμα της αντίδρασης όταν παρασκευάζονται μικτοί ανυδρίτες:



Είναι κατανοητό, ότι η παρασκευή των ιδίων μικτών ανυδριτών συνοδεύεται από λιγότερη ρακεμοποίηση εάν διεξαχθεί με τη βοήθεια της 1-αιθοξυκαρβονυλο-2-αιθοξυ-1,2-διυδροκινολίνης (EEDQ), καθώς δεν απαιτείται προσθήκη τριτοταγούς βάσης και η βασικότητα της κινολίνης που σχηματίζεται κατά την αντίδραση είναι αμελητέα. Είναι δυσκολότερο να αντισταθμισθεί η επίδραση ενός ενδομοριακού βασικού κέντρου, ακόμη και όταν είναι ασθενές, όπως είναι ο ιμιδαζολικός δακτύλιος στην παράπλευρη αλυσίδα της ιστιδίνης. Ενώ οι παρουσιαζόμενες εδώ κυκλοποίηση και ενολοποίηση



δεν αποκλείουν την ικανότητα των ενεργοποιημένων σωματιδίων να ακυλιώσουν το αμινο-συστατικό (τα ακυλοϊμιδαζόλια είναι καλά ακυλιωτικά αντιδραστήρια), η οπτική καθαρότητα της ιστιδίνης μπορεί βεβαίως να κινδυνεύσει κατά τη πορεία της σύζευξης. Ρακεμοποίηση δια μέσου ενολοποίησης μπορεί επίσης να συμβεί χωρίς κυκλοποίηση, ιδιαίτερα εφόσον η ενόλη μπορεί να σταθεροποιηθεί στην ενολική μορφή:

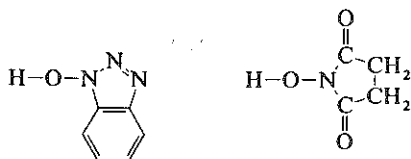


Ως εκ τούτου φαίνεται ότι αποτελεί πλεονέκτημα η περαιτέρω μείωση του βασικού χαρακτήρα του ιμιδαζολίου με προστασία, κατά προτίμηση στο π-άτομο του αζώτου.

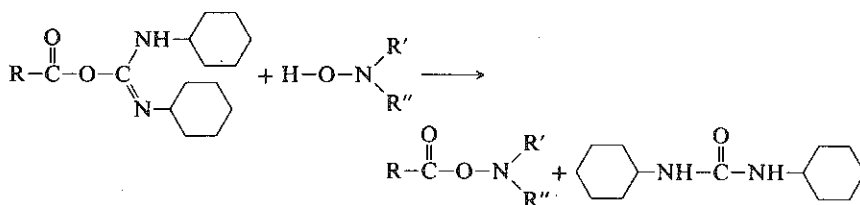
Δεν αποτελεί έκπληξη ότι η πορεία που περιλαμβάνει απόσπαση πρωτονίου επηρεάζεται από την πολικότητα του διαλύτη. Η καταλυόμενη από βάση ρακεμοποίηση των ενεργών εστέρων είναι γρήγορη σε πολικούς διαλύτες όπως το διμεθυλοφορμαμίδιο και αργή σε μη πολικά μέσα, για παράδειγμα στο τολουόλιο. Είναι μάλλον ατυχές ότι τέτοιοι μη πολικοί διαλύτες είναι πρακτικά αδύνατο να χρησιμοποιηθούν στην πεπτιδική σύνθεση. Η μικρή διαλυτότητα των περισσότερων προστατευμένων ενδιάμεσων στους οργανικούς διαλύτες που συνήθως χρησιμοποιούνται περιορίζει σημαντικά την εφαρμογή τους και για την παρασκευή μεγαλύτερων πεπτιδίων πάρα πολύ συχνά στην πραγματικότητα χρησιμοποιείται το διμεθυλοφορμαμίδιο. Το πρόβλημα της διαλυτότητας είναι λιγότερο σοβαρό στη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση (σύγκρινε το Κεφάλαιο X) όπου στην πραγματικότητα δεν απαιτείται διαλύτης, αλλά απλώς ένα μέσο στο οποίο το πολυμερές υποστρώμα φουσκώνει. Αυτό μπορεί να γίνει με το διχλωρομεθάνιο του οποίου η επίδραση στη ρακεμοποίηση βρίσκεται ότι είναι μεταξύ των δύο ακραίων περιπτώσεων που αναφέρθηκαν προηγουμένως.

Η απόσπαση πρωτονίου από το οπτικώς ενεργό άτομο άνθρακα μπορεί να περιοριστεί με την προσθήκη στο μίγμα της αντίδρασης ασθενώς όξινων υλικών. Από τα πολυάριθμα πρόσθετα που έχουν δοκιμασθεί το 1-υδροξυβενζοτριάζολιο (König και Geiger 1970 a) και το N-υδροξυηλεκτρίμιδιο (Wygang et al. 1966) είναι αυτά που χρησιμοποι-

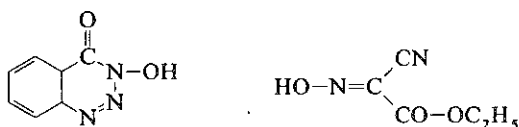
ούνται πρακτικώς κατά κόρο στις αντιδράσεις σύζευξης. Αυτές οι ενώσεις δεν είναι αρκετά όξινες για να πρωτονώσουν την αμινομάδα



του αμινο συστατικού και ως εκ τούτου δεν επεμβαίνουν στην ακυλίωση του, αλλά η οξύτητά τους είναι αρκετή για να προβάλλει ανταγωνισμό στην απόσπαση του πρωτονίου από το άτομο του άνθρακα των ενεργοποιημένων ενδιάμεσων. Η σημασία, πάντως, αυτών των πρόσθετων δε στηρίζεται απλώς στον όξινο χαρακτήρα τους γιατί και πολλά άλλα ασθενή οξέα παίζουν μικρό ρόλο ως αντιδραστήρια ανασταλτικά της ρακεμοποίησης. Αμφότερα αυτά τα πρόσθετα σχετίζονται με την υδροξυλαμίνη και δρουν ως ισχυρά βοηθητικά πυρηνόφιλα. Αντιδρούν με τα πολύ δραστικά ενδιάμεσα, όπως είναι η Ο-ακυλοίσοουρία στις συζεύξεις με καρβοδιιμίδιο



μειώνοντας ως εκ τούτου το χρόνο ζωής των σωματιδίων που οδηγούν σε ρακεμοποίηση. Οι ενεργοί εστέρες που παράγονται σ' αυτές τις αντιδράσεις παρουσιάζουν μεγαλύτερη οπτική σταθερότητα. Κατά την αντίδρασή τους με το αμινο-συστατικό το πρόσθετο αναγεννάται και εξασφαλίζει τη συνέχιση της χρήσιμης επίδρασής του. Είναι εκπληκτικό ότι τα αρκετά αποτελεσματικά πρόσθετα η 3-υδροξυ-3,4-διυδρο-1,2,3-βενζο-τριαζιν-4-όνη (König και Geiger 1970 b) και ο 2-υδροξιμινοκυανοξικός αιθυλεστέρας (Itoh 1973) δεν έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι τώρα σε μεγάλη έκταση παρ'όλο που η επίδρασή τους στην πρόληψη της ρακεμοποίησης ξεπερνά εκείνη του ευρέως χρησιμοποιούμενου 1-υδροξυβενζοτριαζολίου.



Το μάλλον γενικό μέτρο που μπορεί να ληφθεί εναντίον των παράπλευρων αντιδράσεων, δηλαδή η χρήση σε μεγάλη συγκέντρωση του καρβοξυλο-συστατικού και του αμινο-συστατικού, μπορεί επίσης να εφαρμοσθεί για τον περιορισμό της ρακεμοποίησης. Η μικρή, πάντως, διαλυτότητα των ενδιάμεσων μερικές φορές ακόμη και σε διμεθυλοφορμαμίδιο, αντιπροσωπεύει ένα τρομερό εμπόδιο που χειροτερεύει λόγω του μεγάλου μοριακού βάρους μερικών προστατευμένων πεπτιδίων. Έτσι συχνά δεν μπορεί

να επιτευχθεί μια μεγάλη μοριακή συγκέντρωση και για τα δύο συστατικά. Εάν το καρβοξυλο-συστατικό, εξάλλου, δεν είναι παράγωγο ενός πεπτιδίου, αλλά η προστατευμένη και ενεργοποιημένη μορφή ενός απλού αμινοξέος, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε περίσσεια. Αυτή η περίσσεια μπορεί να ρυθμισθεί ώστε να παρέχει μια συγκέντρωση η οποία να παραμένει ικανοποιητικά υψηλή (για παράδειγμα μεγαλύτερη από 0,1 molar) καθόλη τη διάρκεια της αντίδρασης σύζευξης. Η σχετική απλότητα των προστατευμένων και ενεργοποιημένων παραγώγων των αμινοξέων και η προμήθειά τους από εμπορικές πηγές καθιστούν αυτή τη θυσία συνήθως αποδεκτή. Πέρα και πάνω από τη δυνατότητα του να γίνουν οι αντιδράσεις σύζευξης σύμφωνα με την αρχή της περιόδου, η προσθήκη απλών αμινοξέων παρουσιάζει ένα περαιτέρω σημαντικό πλεονέκτημα για τη διατήρηση της οπτικής καθαρότητας γιατί οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες αμινο-προστατευτικές ομάδες, η βενζυλοξυκαρβονυλο και η tert-βουτυλοξυκαρβονυλο ομάδα, εμποδίζουν αποτελεσματικά τη ρακεμοποίηση στις περισσότερες περιπτώσεις. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, αυτό αποτελεί ένα κοινό χαρακτηριστικό των προστατευτικών ομάδων τύπου ουρεθάνης και ισχύει επίσης για τη σταθερή σε οξέα, ευαίσθητη στις βάσεις 9-φλουορενυλομεθυλοξυ-καρβονυλο (Fmoc) ομάδα.

Κατά την προηγηθείσα συζήτηση έχουμε ασχοληθεί μόνο με τη ρακεμοποίηση κατά τη διάρκεια του σχηματισμού του πεπτιδικού δεσμού. Απώλεια της οπτικής καθαρότητας μπορεί, πάντως, να συμβεί επίσης κατά τη διάρκεια ορισμένων αντιδράσεων αποπροστασίας. Η υδρογόνωση είναι αρκετά αβλαβής ως προς τη ρακεμοποίηση και η όξινη αποπροστασία δημιουργεί πρόβλημα μόνον εφόσον διεξαχθεί σε δραστικές συνθήκες, όπως η υψηλή θερμοκρασία. Η σαπωνοποίηση των εστέρων με άλκαλι μπορεί να προκαλέσει υπολογίσιμη ρακεμοποίηση. Αυτή πρέπει να περιορισθεί στο ελάχιστο με τη διεξαγωγή της αντίδρασης στους 0°C, κατά προτίμηση σε σταθερό pH. Η μεγάλη περίσσεια αλκάλειος πρέπει βεβαίως να αποφευχθεί. Η παρουσία ιόντων Ca^{++} παρεμποδίζει τη ρακεμοποίηση κατά την αλκαλική υδρόλυση (και επίσης πιθανόν σε πολλές περιπτώσεις σύζευξης), αλλά η πλήρης απομάκρυνση των ιόντων του μετάλλου από το σύμπλοκο δεν είναι πάντοτε εύκολη.

Αναφορές

- Anderson, G.W., Callahan, F.M.: J. Amer. Chem. Soc. 80, 2902 (1958)
 Itoh, M.: Bull. Chem. Soc. Jpn. 46, 2219 (1973)
 König, W., Geiger, R., a: Chem. Ber. 103, 788 (1970); b: Chem. Ber. 103, 2034 (1970)
 Weygand, F., Hoffmann, D., Wünsch, E.: Z. Naturforsch. 21b, 426 (1966); cf. also Wünsch, E., Drees, F.: Chem. Ber. 99, 110 (1966)
 Williams, M.W., Young, G.T.: J. Chem. Soc. 881 (1963); cf. also Smart, N.A., Young, G.T., Williams, M.W.: ibid. p. 3902

Περαιτέρω βιβλιογραφία

- Kemp, D.S.: Racemization in Peptide Synthesis in The Peptides, vol. 1, Gross, E., Meienhofer, J., eds., pp. 315-383, New York, Academic Press 1979

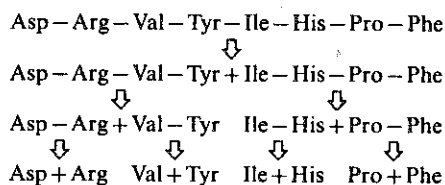
IX. Σχεδιασμός της Τακτικής της Πεπτιδικής Σύνθεσης

Κατά το στρατηγικό σχεδιασμό ο οποίος πρέπει να προηγηθεί της σύνθεσης ενός μεγάλου πεπτιδίου η ρακεμοποίηση είναι μια από τις πλέον σημαντικές μελέτες μας. Ως εκ τούτου, φαίνεται ότι είναι κατάλληλο σ' αυτό το σημείο να συζητήσουμε τα ποικίλα σχήματα της σύνθεσης. Λόγω της ιδιαιτερότητας των αμινοξέων και των ποικιλιών στις ιδιότητες των προστατευμένων αμινοξέων αποδεικνύεται πρακτικά αδύνατο να προταθεί ένα γενικό σχήμα (στρατηγική) που θα μπορούσε να εφαρμοσθεί για κάθε πεπτίδιο. Η πεπτιδική σύνθεση πρέπει να βασισθεί σε αντίστροφη συνθετική ανάλυση, αρχίζοντας με τον εντοπισμό των προβλημάτων που υπάρχουν στην πεπτιδική αλυσίδα της ένωσης που αποτελεί τον αντικειμενικό στόχο της σύνθεσής μας.

Κατ' αρχήν είναι δυνατές τρεις πορείες: Α. Συμπύκνωση πεπτιδικών τμημάτων, Β. Βήμα προς βήμα επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας αρχίζοντας με το Ν-τελικό αμινοξύ και C. Βήμα προς βήμα επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας αρχίζοντας από το C-τελικό αμινοξύ. Θα προσπαθήσουμε να αξιολογήσουμε αυτές τις εναλλακτικές πορείες, αλλά με κάποια επιφύλαξη γιατί δεν υπάρχει ομοφωνία σ' αυτό το θέμα μεταξύ των πεπτιδοχημικών.

Α. Συμπύκνωση Τμημάτων

Κατά την πρώτη εποχή της πρακτικής πεπτιδικής σύνθεσης, για την παρασκευή του εννεαπεπτιδίου οξυτοκίνη ή του οκταπεπτιδίου αγγειοτενσίνη, η συμπύκνωση τμημάτων φαινόταν ότι αποτελούσε την προφανή στρατηγική. Η αναγωγή ενός μεγαλύτερου προβλήματος σε μικρότερα προβλήματα, μια Καρτεσιανή προσέγγιση, είναι σαφώς ελκτική. Εξίσου σημαντική είναι, πάντως, η δυνατότητα της κατανομής της προσπάθειας μεταξύ των μελών μιας ομάδας. Η παρασκευή των συγκεκριμένων τμημάτων, συχνά διπεπτιδίων, θα μπορούσε να ανατεθεί στους λιγότερο έμπειρους συνεργάτες, ενώ το επίπονο έργο της συμπύκνωσης των πεπτιδικών τμημάτων σ' έναν πεπειραμένο στην πεπτιδική σύνθεση. Μια παρόμοια κατανομή αρμοδιοτήτων δεν είναι εφικτή στη βήμα προς βήμα επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας. Αυτές οι απόψεις πρέπει να έχουν κατευθύνει τους ερευνητές οι οποίοι ανέλαβαν τη σύνθεση βιολογικά δραστικών πεπτιδίων κατά τη δεκαετία του 1950. Το αντίστροφο σχεδιάγραμμα για τη σύνθεση του οκταπεπτιδίου αγγειοτενσίνη δείχνεται παρακάτω ως παράδειγμα:

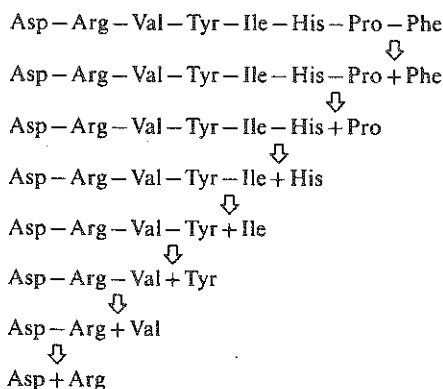


Τέσσερα διπεπτιδία συζεύγνυνται και δίνουν δύο τετραπεπτιδία και το τελικό πεπτίδιο λαμβάνεται με τη συμπύκνωση των τετραπεπτιδίων. Σ' αυτό το σημείο αδιαφορούμε για

τα προβλήματα που σχετίζονται με τα αμινοξέα με παράπλευρες δραστικές ομάδες, τις παράπλευρες αντιδράσεις που μπορούν να λάβουν χώρα κατά την εισαγωγή του ασπαραγινικού οξέος ή της βαλίνης και επίσης για τα παραπροϊόντα που σχηματίζονται κατά τη πορεία της αποπροστασίας καθόσον επιθυμούμε να συγκεντρώσουμε τη προσοχή μας στο πρόβλημα της ρακεμοποίησης. Υποθέτοντας ότι χρησιμοποιούμε τύπου ουρεθάνης αμινο-προστατευτικές ομάδες, δε θα αναμενόταν απώλεια της οπτικής ομοιογένειας κατά τη σύνθεση των τεσσάρων διπεπτιδίων. Κατά τη συμπίκνωση, πάντως, του Asp-Arg με το Val-Tyr μπορεί να συμβεί ρακεμοποίηση της αργινίνης καθόσον η τύπου ουρεθάνης προστατευτική ομάδα στο διπεπτίδιο Asp-Arg συνδέεται με το Asp και όχι με το ενεργοποιημένο αμινοξύ Arg. Παρόμοια, η σύζευξη των μερικώς προστατευμένων παραγώγων των διπεπτιδίων Ile-His και Pro-Phe μπορεί να δώσει ένα παράγωγο του τετραπεπτιδίου, το οποίο να περιέχει το διαστεreoϊσομερές με D-His αντί της επιθυμητής L-His. Εάν δε ληφθούν οι κατάλληλες προφυλάξεις το ίδιο πρόβλημα θα επανεμφανισθεί στη τελική συμπίκνωση των δύο παραγώγων των τετραπεπτιδίων και θα σχηματισθεί επίσης ένα ανάλογο της αγγειοτενσίνης που να περιέχει D-τυροσίνη. Εν περιλήψει, δεν έλαβε χώρα απώλεια της οπτικής ομοιογένειας κατά την εισαγωγή των απλών αμινοξέων, εφόσον αυτά χρησιμοποιήθηκαν με προστατευτικές ομάδες που προλαμβάνουν τη ρακεμοποίηση, αλλά ρακεμοποίηση μπορεί να συμβεί κατά τη συμπίκνωση πεπτιδίων διότι σ'αυτά οι προστατευτικές ομάδες που προλαμβάνουν τη ρακεμοποίηση είναι προσκολλημένες στο N-τελικό αμινοξύ του ενεργοποιημένου πεπτιδίου και όχι στο C-τελικό αμινοξύ που φέρει το ενεργοποιημένο καρβοξύλιο. Με την εφεύρεση των πρόσθετων όπως είναι το 1-υδροξυβενζοτριάζολιο, N-υδροξυηλεκτριμίδιο, το 3-υδροξυ-3,4-διϋδρο-1,2,βενζοτριάζιν-4-όνη ή ο 2-υδροξυμινο-κυανοξικός αιθυλεστέρας, η συμπίκνωση των πεπτιδικών τμημάτων μπορεί να διεξαχθεί με λίγη ρακεμοποίηση, αλλά το πρόβλημα δεν έχει λυθεί τελείως. Ενδείξεις που υποστηρίζουν την επίδραση αυτών των πρόσθετων στην πρόληψη της ρακεμοποίησης έχουν προκύψει από πρότυπα πειράματα, στα οποία τα δύο συστατικά που πρόκειται να συζευχθούν βρίσκονταν σε αρκετά υψηλή συγκέντρωση. Η κατάσταση μπορεί να γίνει ουσιαστικά διαφορετική στην πραγματικότητα κατά τις συνθέσεις όπου συζεύγνυνται πεπτιδικά παράγωγα μεγάλου μοριακού βάρους. Εφόσον δε θα ήταν πρακτικά δυνατό να επιμείνουμε για υψηλή μοριακή συγκέντρωση η χρήσιμη επίδραση των πρόσθετων θα ήταν μικρότερη από την αναμενόμενη. Μια παρόμοια σχέση υπάρχει επίσης μεταξύ σύζευξης μικρών πεπτιδίων έναντι της συμπίκνωσης μεγάλων πεπτιδίων σε σχέση με τις άλλες παράπλευρες αντιδράσεις. Για παράδειγμα η μετάθεση Curtius των αζιδίων των οξέων δίνει συνήθως αμελητέα ποσά παραγώγων ουρίας σε πρότυπα πειράματα, αλλά η ακυλίωση ενός μεγαλύτερου αμινο-συστατικού από το αζίδιο ενός καρβοξυλο-συστατικού με υψηλό μοριακό βάρος έδωσε συχνά απογοητευτικά αποτελέσματα. Για την αποδοχή της στρατηγικής της συμπίκνωσης πεπτιδικών τμημάτων η αντίστροφη συνθετική ανάλυση του αναμενόμενου πεπτιδίου είναι μεγάλης αξίας. Για παράδειγμα, η ρακεμοποίηση μπορεί να αποφευχθεί τελείως αν επιλεγούν πεπτιδικά τμήματα που έχουν γλυκίνη σαν C-τελικό αμινοξύ τους και ακόμη και με προλίνη σ'αυτή τη θέση πρακτικά δε θα συμβεί ρακεμοποίηση. Επίσης, η αλανίνη ή η λευκίνη έχουν την τάση να χάνουν λιγότερο την οπτική τους καθαρότητα σε σύγκριση με τη φαινυλαλανίνη ή την ιστιδίνη. Έτσι, μια έξυπνη διαίρεση της πεπτιδικής αλυσίδας σε τμήματα μπορεί να βελτιώσει πάρα πολύ τα αποτελέσματα.

Β. Βήμα προς Βήμα Επιμήκυνση της Πεπτιδικής Αλυσίδας Αρχίζοντας με το N-Τελικό Αμινοξύ.

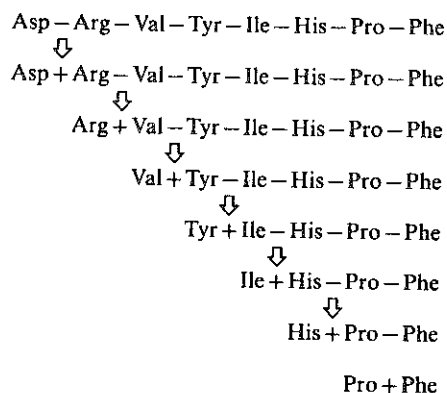
Αυτή η προσέγγιση φαίνεται ότι είναι ελκυστική πρώτα-πρώτα διότι αποτελεί τον τρόπο με τον οποίο η φύση συνθέτει τις πρωτεΐνες στα ριβοσώματα. Επιπλέον, όπως δείχνει μια απλή ματιά στο αντίστροφο συνθετικό σχήμα για την αγγειοτενσίνη



μόνο ένα αμινοξύ, το Asp του N-τέλους απαιτεί μια αμινο-προστατευτική ομάδα, η οποία απομακρύνεται μετά τη συμπλήρωση της σύνθεσης της επιθυμητής πεπτιδικής αλυσίδας. Αλλά, αυτό το πλεονέκτημα αποτελεί επίσης το μεγαλύτερο μειονέκτημα της μεθόδου γιατί η προστατευτική ομάδα προστατεύει το Asp έναντι της ρακεμοποίησης κατά τη σύνθεση του διπεπτιδικού παραγώγου Y-Asp-Arg, αλλά στα επόμενα βήματα ενεργοποιούνται προστατευμένα πεπτίδια και τα ενεργοποιημένα τους αμινοξέα του C-τέλους εκτίθενται στην επίδραση της μεθόδου σύζευξης στη ρακεμοποίηση χωρίς προστασία για οπτική καθαρότητα. Αυτό το γεγονός είναι πάρα πολύ σημαντικό ώστε να καθιστά αυτή τη στρατηγική πρακτικά αδύνατη. Έχει εφαρμοσθεί πάρα πολύ σπάνια και οι ερευνητές που αποδέχθηκαν αυτή τη μέθοδο απέτυχαν να επιβεβαιώσουν την οπτική καθαρότητα των προϊόντων τους.

Γ. Βήμα προς Βήμα Επιμήκυνση της Πεπτιδικής Αλυσίδας Αρχίζοντας με το C-Τελικό Αμινοξύ.

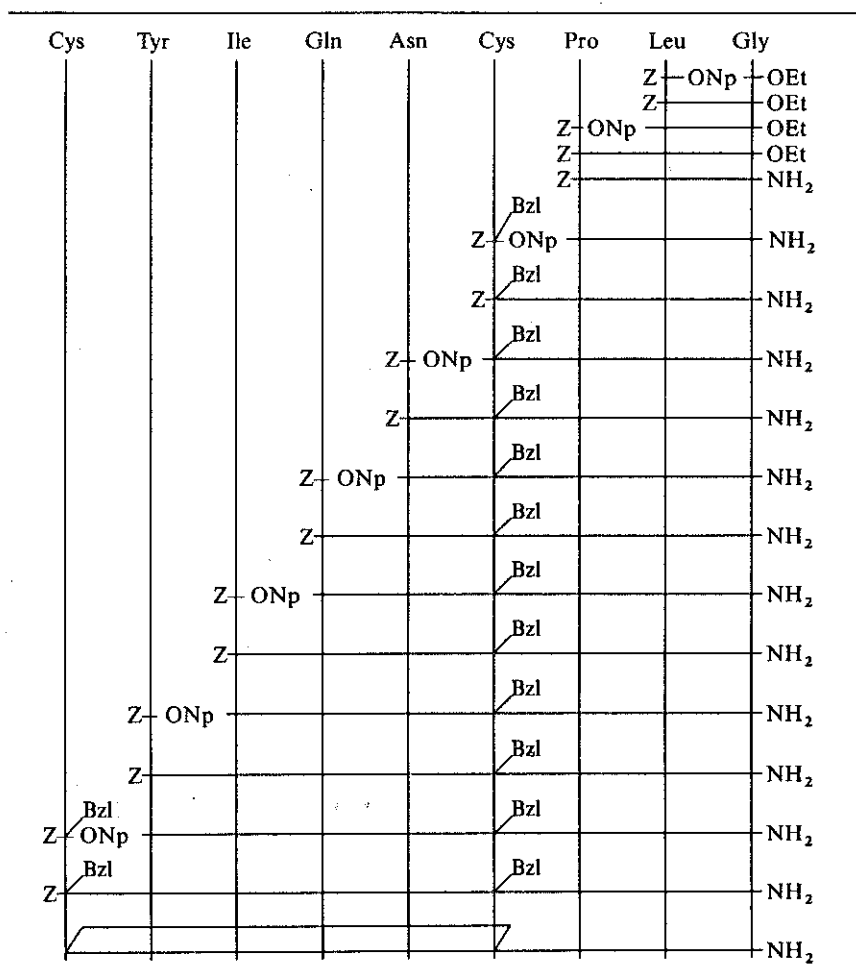
Αυτή η στρατηγική θα φαινόταν πάρα πολύ επίπονη για πρακτικούς λόγους. Απαιτεί την εισαγωγή του κάθε αμινοξέος στην προστατευμένη και ενεργοποιημένη μορφή και την απομάκρυνση της αμινο-προστατευτικής ομάδας μετά από κάθε βήμα επιμήκυνσης της αλυσίδας.



Η ικανότητα, πάντως, μιας ολόκληρης τάξης προστατευτικών ομάδων να προλαμβάνουν τη ρακεμοποίηση του αμινοξέος στο οποίο είναι συνδεδεμένες καθιστά αυτή τη μέθοδο όχι μόνο πρακτική αλλά επίσης πιθανόν την πιο χρήσιμη από τις τρεις εναλλακτικές. Η αποτελεσματικότητα της βήμα προς βήμα στρατηγικής (Bodanszky 1960) οφείλεται εν μέρει στη χρήση των ακυλιωτικών αντιδραστηρίων σε αρκετά υψηλή συγκέντρωση ώστε να εξασφαλισθούν λογικά υψηλές ταχύτητες της αντίδρασης κατά τη σύζευξη (αρχή της περισσειας). Όταν για την εισαγωγή του νέου αμινοξέος χρησιμοποιούνται οι ενεργοί εστέρες των προστατευμένων αμινοξέων ή περίσσεια του αντιδραστηρίου παραμένει αναλλοίωτη και συχνά μπορεί να ανακτηθεί.

Ακόμη και από αυτή τη σύντομη συζήτηση για τις στρατηγικές καθίσταται σαφές ότι υπάρχουν μόνο δύο σχήματα μεταξύ των οποίων πρέπει να γίνει η επιλογή: συμπίκνωση τμημάτων και βήμα προς βήμα επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας από το C-τέλος. Οι πρώτες συνθέσεις βιολογικών δραστικών πεπτιδίων ακολούθησαν τη μέθοδο της συμπίκνωσης τμημάτων και εφαρμόζεται ακόμη σε αρκετά εργαστήρια. Η πρακτικότητα της βήμα προς βήμα στρατηγικής έπρεπε πρώτα να γίνει αποδεκτή και ακόμη και οι επιτυχείς συνθέσεις της οξυτοκίνης (Σχήμα 2) και της σεκρετίνης απέτυχαν να πείσουν την πλειοψηφία των ερευνητών για τα πλεονεκτήματά της. Η ανάγκη να εκτελεσθεί μια μακρά σειρά συζεύξεων και αποπροστασιών σχεδόν μόνο με το χέρι ήταν πιθανόν το κύριο εμπόδιο για την εφαρμογή αυτής της μεθόδου. Επιπλέον, με την εφεύρεση πρακτικών τεχνικών, ιδιαίτερα με την ανάπτυξη της σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεά φάση (βλέπε Κεφάλαιο X) η βήμα προς βήμα στρατηγική εκτιμήθηκε πάρα πολύ και έτυχε ευρείας εφαρμογής. Στις περισσότερες συνθέσεις που γίνονται σε διάλυμα οι περισσότεροι ερευνητές προτιμούν να συνθέσουν πεπτίδια μέσου μεγέθους με την βήμα προς βήμα μέθοδο και να συζεύξουν αυτά σε μεγαλύτερα τμήματα και τελικώς στο μόριο της ένωσης που έχουμε ως τελικό στόχο δια μέσου βημάτων σύζευξης κατά τα οποία προλαμβάνεται η ρακεμοποίηση με την προσθήκη των ήδη συζητηθέντων βοηθητικών πυρηνόφιλων. Αυτό το μέτρο είναι συνήθως αρκετό για τη διατήρηση της οπτικής καθαρότητας, αλλά συχνά δεν είναι ικανοποιητικό όσον αφορά τις αποδόσεις. Με τμήματα μεγάλου μοριακού βάρους μερικά από τα προβλήματα που προκαλούνται από ποικίλες παράπλευρες αντιδράσεις δεν μπορούν να επιλυθούν πλήρως από την

Σχήμα 2. Βήμα προς βήμα σύνθεση της Οξυτοκίνης^a

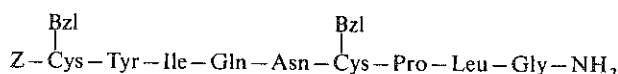


Δ. Μελέτες Τακτικής των Συνθέσεων

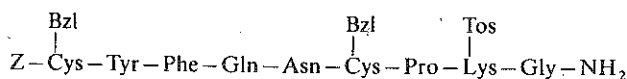
Οι περισσότερες από τις παράπλευρες αντιδράσεις που συζητήθηκαν στο Κεφάλαιο VII συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης και σύζευξης. Τα προβλήματα που απορρέουν από τις διεργασίες αποπροστασίας δεν είναι, πάντως, λιγότερο σημαντικά και μπορούν να καταστούν σοβαρά εμπόδια προκειμένου να επιτευχθεί η σύνθεση ομογενών πεπτιδίων. Λόγω του επαναληπτικού χαρακτήρα της αποπροστασίας στη βήμα προς βήμα σύνθεση η επιλογή των μεθόδων για προστασία και αποπροστασία απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή.

Συνήθως εφαρμόζεται επίδραση οξέος σε δύο πολύ διαφορετικά επίπεδα οξύτητας, κυρίως με τριφθοροξικό οξύ για την απομάκρυνση των ομάδων που προστατεύουν προσωρινά τις α-αμινομάδες και με υγρό HF για την απομάκρυνση των ομάδων που προστατεύουν μόνιμα τις παράπλευρες ομάδες. Επιπλέον, είναι σαφές ότι ο λόγος των ταχυτήτων της επίδρασης των οξέων για τα δύο διαφορετικά είδη των προστατευτικών ομάδων είναι καθορισμένος αριθμός και ότι οι σχετικά ανθεκτικές στα οξέα προστατευτικές ομάδες των παράπλευρων αλυσίδων δεν είναι τελείως σταθερές στις ήπιες όξινες συνθήκες. Ως εκ τούτου, οι ορθογωνικοί συνδυασμοί που βασίζονται σε δύο διαφορετικούς μηχανισμούς θα πρέπει να δώσουν σαφέστερα αποτελέσματα. Για παράδειγμα μια επιλογή δύο κατηγοριών ομάδων, η μια να διασπάται με υδρογόνωση, η άλλη με επίδραση οξέων φαίνεται να είναι καλλίτερη από τον μη ορθογωνικό συνδυασμό ομάδων που διασπώνται από οξέα αλλά με διαφορετική ευαισθησία στα οξέα. Ο ορθογωνικός συνδυασμός της απομακρυνόμενης με βάση p-φλουορενυλομεθυλοξυκαρβονυλο (Fmoc) ομάδας μαζί με τις προστατευτικές ομάδες για τις παράπλευρες αλυσίδες που διασπώνται από οξέα και βασίζονται στον σχηματισμό του tert.βουτυλοκατιόντος, έχει ήδη αναφερθεί αλλά απαιτείται περαιτέρω έμφαση σ' αυτό το σημείο.

Μια ελκυστική δυνατότητα στην επιλογή των προστατευτικών ομάδων έγκειται στη σύγχρονη αποπροστασία στο τέλος της σύνθεσης όλης της πεπτιδικής αλυσίδας. Για παράδειγμα το τελικό προστατευμένο εννέαπεπτίδιο της λυσينو-βασοπρεσίνης

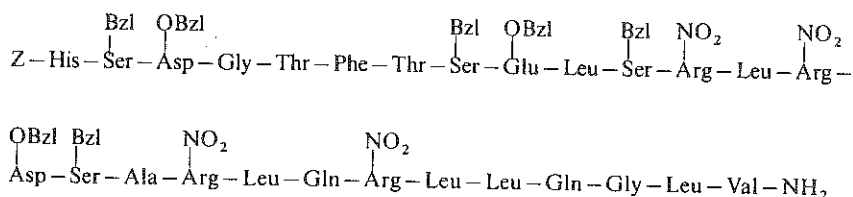


αποπροστατεύθηκε με μια απλή επεξεργασία με αναγωγή με νάτριο σε υγρή αμμωνία όπως έγινε και με το προστατευμένο εννέαπεπτίδιο της λυσينو-βασοπρεσίνης



Μέσα στο ίδιο πνεύμα επιλέχθηκε η βενζυλοξυκαρβονυλομάδα για προστασία της α-αμινομάδας του N-τελικού αμινοξέος κατά την πρώτη σύνθεση της σεκρετίνης του χοίρου (Bodanszky et al. 1966), καθόσον κατ' αυτό τον τρόπο ένα απλό βήμα, η καταλυ-

τική υδρογόνωση, αρκεί να επιτελέσει την τελική αποπροστασία:



Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στην επιλογή της παροδικής προστασίας της αμινομάδας του Ν-τελικού αμινοξέος των πεπτιδίων που θα χρησιμεύσουν ως το άμινο συστατικό σ'ένα επόμενο βήμα συμπύκνωσης πεπτιδικών τμημάτων. Για παράδειγμα η απομακρυνόμενη με βάση 9-φλουορενυλομεθυλοξυκαρβονυλομάδα δίνει, μετά από αμινών που σχηματίζονται κατά την επίδραση οξέων. Το πλεονέκτημα των ελεύθερων αμινών έχει ήδη συζητηθεί, είναι έτσι σαφές ότι η κατάλληλη επιλογή της προστατευτικής ομάδας σε τέτοια κρίσιμα σημεία έχει σημαντική επίδραση στην ποιότητα των μεγάλων ενδιάμεσων και ακόμη περισσότερο του τελικού προϊόντος.

Ε. Σύνθεση Ειδικών Πεπτιδίων

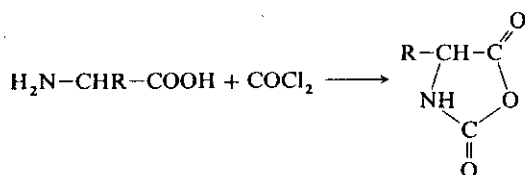
Μέχρι τώρα έχουμε ασχοληθεί κυρίως με μεθόδους που οδηγούν σε πεπτίδια, συνήθως απλής πεπτιδικής αλυσίδας, με καλώς καθορισμένη αλληλουχία αμινοξέων. Υπάρχουν πάντως πεπτιδικές αλυσίδες αρκετά μεγάλου μήκους που περιέχουν μόνο ένα είδος αμινοξέων. Τέτοια πολυαμινοξέα (ή πολυμερή αμινοξέων) μπορούν να χρησιμεύσουν ως πρότυπα πρωτεϊνών σε φυσικοχημικές μελέτες ή να παίξουν κάποιο ιδιαίτερο ρόλο, όπως για παράδειγμα η πολυλυσίνη για τη σύνθεση αντιγόνων ή η πολυλευκίνη ως οπτικώς ενεργό υποστήριγμα στο χρωματογραφικό διαχωρισμό εναντιομερών. Άλλες μεγάλες πεπτιδικές αλυσίδες συνίστανται από περισσότερα του ενός είδους αμινοξέα, τυχαία συμπολυμερή ή δύο (ή περισσότερα) αμινοξέα σε μια αλληλουχία η οποία επαναλαμβάνεται πολλές φορές, π.χ. Ala-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro... ή Ala-Gly-Pro-(Ala-Gly-Pro)_n-Ala-Gly-Pro όπου το *n* μπορεί να είναι ένας μεγάλος αριθμός. Η σύνθεση τέτοιων "πολυπεπτιδίων με επαναλαμβανόμενη αλληλουχία" επιδιώχθηκε πάρα πολλές φορές καθόσον είναι χρήσιμα για τη μελέτη των σκελετικών πρωτεϊνών όπως είναι το κολλαγόνο. Ένας τουλάχιστον το ίδιο σημαντικός αντικειμενικός στόχος είναι η σύνθεση κυκλικών πεπτιδίων. Αρκετές ορμόνες, όπως οι αναφερθείσες ήδη οξυτοκίνη και βασοπρεσίνη, η σωματοστατίνη και άλλες έχουν κυκλικές δομές και τα περισσότερα πεπτιδικά αντιβιοτικά είναι κυκλικά. Ως εκ τούτου η κυκλοποίηση των ανοικτών τους ("ευθύγραμμων") μητρικών πεπτιδικών αλυσίδων είναι ένα σημαντικό κεφάλαιο. Τελευταίο αλλά όχι μικρότερης σημασίας, είναι το γεγονός ότι πεπτίδια που περιέχουν ένα συστατικό που δεν είναι αμινοξύ ή συστατικά με τροποποιημένα αμινοξέα χρησιμοποιούνται με αυξανόμενη συχνότητα για βιολογικούς και ακόμη και ιατρικούς σκοπούς, για παράδειγμα ως αναστολείς

ενζύμων. Προβλήματα που σχετίζονται με τη σύνθεση τέτοιων ειδικών πεπτιδίων αποτελούν το αντικείμενο της συζήτησης στα επόμενα κεφάλαια.

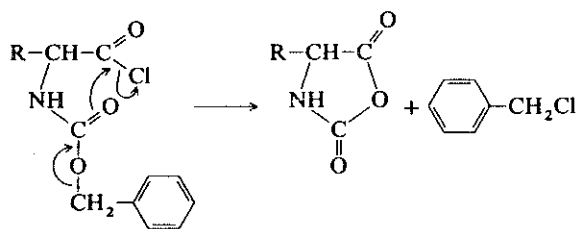
1. Πολυαμινοξέα και Πολυπεπτίδια με επαναλαμβανόμενη αλληλουχία

Ουσίες με μεγάλα μοριακά βάρη σχηματίζονται από αρκετά αμινοξέα, ιδιαίτερα από γλυκίνη, σε υψηλές θερμοκρασίες. Επίσης περίπλοκες ουσίες που να μοιάζουν με πρωτεΐνες μπορούν να παραχθούν από μίγματα αμινοξέων με θέρμανση ή με τη βοήθεια διαφόρων πηγών ενέργειας, όπως είναι η υπεριώδης ακτινοβολία ή ο βομβαρδισμός με αργά νετρόνια. Αυτές οι παρατηρήσεις και αυτές οι ουσίες προκάλεσαν ενδιαφέρουσες σκέψεις για την αρχή της ζωής, αλλά βρίσκονται έξω από το πλαίσιο αυτού του βιβλίου που ασχολείται με καλώς καθορισμένα πεπτιδία.

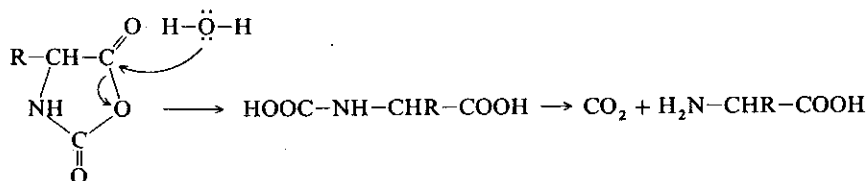
Η παρασκευή των πολυαμινοξέων δια μέσου N-καρβοξυανυδριτών (NCA ή ανυδρίτες Leuchs) αποτελεί μια κλασική πορεία. Αυτές οι ενώσεις, οι οξαζολιδινο-2,5-διόνες παρασκευάζονται εύκολα από τα αμινοξέα με κατεργασία με φωσγένιο σε απρωτικούς διαλύτες και μετά θέρμανση.



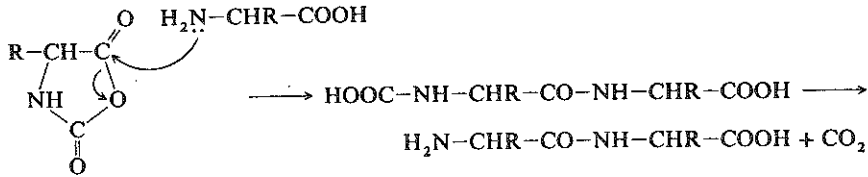
Εναλλακτικά παρασκευάζονται από τα χλωρίδια των αλκοξυκαρβονυλοαμινοξέων δια μέσου θερμικής απόσπασης αλκυλοχλωριδίου:



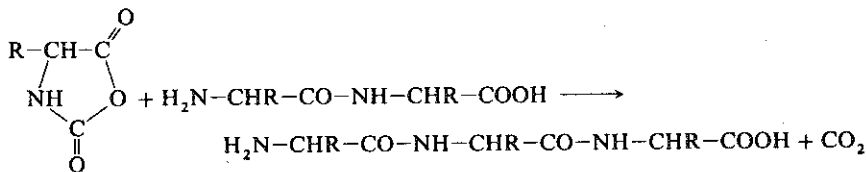
Η πολυσυμπύκνωση πολύ δραστικών ενδιάμεσων περιγράφεται συνήθως κατά ένα απλό τρόπο. Το άνοιγμα του δακτυλίου από ίχνη ύδατος δίνει ένα καρβαμικό οξύ το οποίο χάνει διοξείδιο του άνθρακα και αναπαράγει το αμινοξύ:



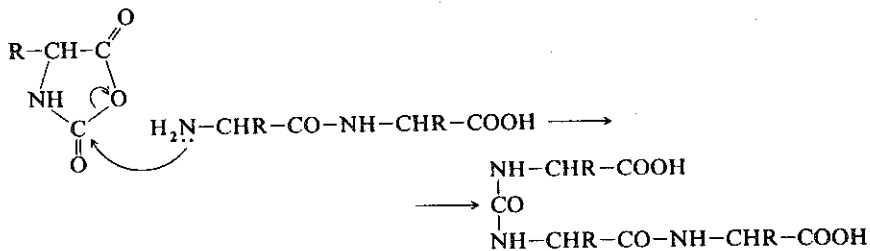
Η αμινομάδα του αμινοξέος προσβάλλει τη δραστικότερη καρβονυλομάδα ενός δευτέρου μορίου του ανυδρίτη και η αντίδραση σύζευξης ακολουθείται από αποκαρβοξυλίωση για να σχηματίσει ένα διπεπτίδιο:



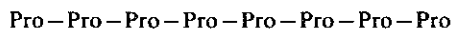
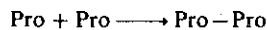
Η πορεία συνεχίζεται δια μέσου της προσβολής της αμινομάδας του διπεπτιδίου σ'ένα νέο μόριο ανυδρίτη



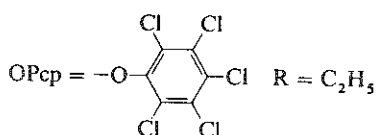
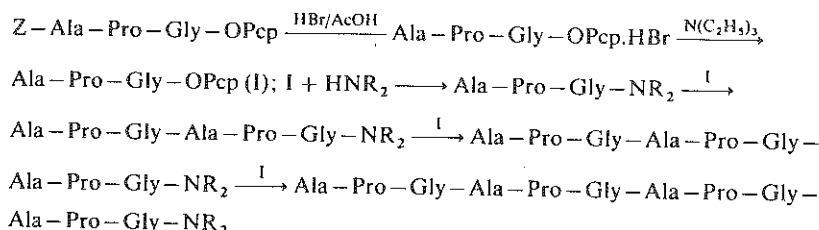
και σχηματίζονται κατ'αυτό τον τρόπο ουσίες με μεγάλο μοριακό βάρος. Στην πραγματικότητα πάντως κατά τον πολυμερισμό παράγεται ένα μίγμα πεπτιδικών αλυσίδων με ποικίλα μήκη. Η κατανομή των μοριακών βαρών του προϊόντος ποικίλει με τις συνθήκες της αντίδρασης και δεν ελέγχεται εύκολα. Μια επιπλέον περιπλοκότητα στη σύσταση του προϊόντος πολυμερισμού προκύπτει από την προσβολή του πυρηνόφιλου (ων) στη λιγότερο δραστική καρβονυλομάδα, μια δευτερεύουσα αλλά όχι αμελητέα παράπλευρη αντίδραση που δίνει υποκατεστημένες ουρίες



οι οποίες κάνουν τα συνθετικά μόρια να μοιάζουν λιγότερο με τις πεπτιδικές αλυσίδες των πρωτεϊνών. Είναι προφανές ότι καλλίτερη ομογένεια μπορεί να αναμένεται, σε σχέση με το μοριακό βάρος και τον πεπτιδικό δεσμό, σε μια λιγότερο γνωστή πορεία (Miyoshi et al. 1970) που στηρίζεται στη συστηματική σύνθεση προστατευμένων και δραστικών ενδιάμεσων σύμφωνα με σχήματα όπως το παρακάτω:



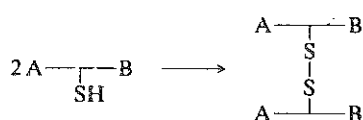
Η σύνθεση πεπτιδίων με επαναλαμβανόμενη αλληλουχία στηρίζεται συνήθως σ'ένα δραστικό παράγωγο της επαναλαμβανόμενης μονάδας από την οποία η αμινο-προστατευτική ομάδα απομακρύνεται με επίδραση οξέων. Οι πενταχλωροφαινυλεστέρες βρέθηκαν ότι δίνουν ουσίες με μεγάλο μοριακό βάρος. Η αντίδραση αρχίζει με αποπρωτονίωση με μια τριτοταγή αμίνη αλλά υποδεικνύεται επίσης η προσθήκη μιας μικρής ποσότητας μιας δευτεροταγούς αμίνης ως ενεργοποιητή:



Ένα πολυμερές με επαναλαμβανόμενη αλληλουχία και καλώς καθορισμένο μοριακό βάρος παρασκευάστηκε (Sakakibara et al. 1968) πάνω σ'ένα αδιάλυτο πολυμερές υποστήριγμα με επαναλαμβανόμενη εισαγωγή του τριπεπτιδίου Pro-Pro-Gly. Είκοσι επαναλήψεις σχημάτισαν μια αλυσίδα με είκοσι αμινοξέα και οι φυσικοχημικές ιδιότητες αυτού του πολυμερούς ήταν καλλίτερες από τις ιδιότητες του πολυμερούς που παρασκευάστηκε κατά τον πολυμερισμό ενός ενεργού εστέρα του τριπεπτιδίου. Σε μια εναλλακτική πορεία (Kemp et al. 1974) το πεπτίδιο Gly-Leu-Gly διπλασιάστηκε με την αντίδραση ενός δραστικού παραγώγου του Z-Gly-Leu-Gly με το ελεύθερο τριπεπτίδιο, ακολουθούμενο από την απομάκρυνση της προστατευτικής ομάδας από μέρος του προϊόντος. Η ενεργοποίηση του απομένοντος μέρους του προστατευμένου εξαπεπτιδίου Z-Gly-Leu-Gly-Gly-Leu-Gly και η αντίδραση του δραστικού παραγώγου με ένα αιώρημα του ελεύθερου εξαπεπτιδίου σε διμεθυλοσουλφοξείδιο έδωσε το μερικώς προστατευμένο 12-πεπτίδιο Z-Gly-Leu-gly-Gly-Leu-Gly-Gly-Leu-Gly-Gly-Leu-Gly και δια μέσου επανάληψης των διπλασιασμών έδωσε ένα 24-πεπτίδιο και τελικώς κατορθώθηκε να εξασφαλισθεί ένα πολυμερές επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας που περιείχε 48 αμινοξέα.

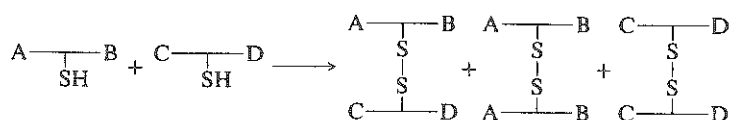
2. Θειούχες Γέφυρες S-S

Η ενδομοριακή αντίδραση μεταξύ δυο σουλφυδρυλομάδων δίνει ένα κυκλικό δισουλφίδιο και θα συζητηθεί μαζί με άλλα προβλήματα κυκλοποίησης. Ο σχηματισμός διαμοριακών γεφυρών δισουλφιδίων που συνδέουν δύο ίδιες αλυσίδες απαιτεί κυρίως αφυδρογόνωση.

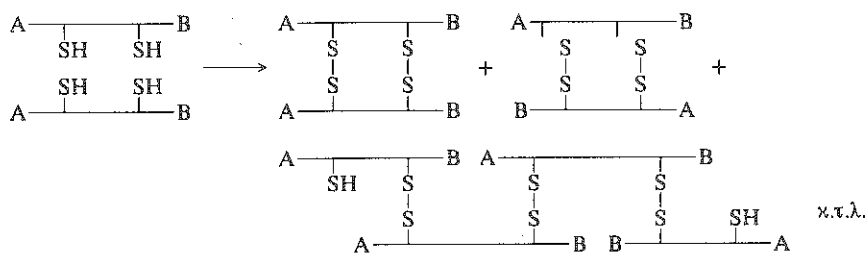


Ποικίλα οξειδωτικά αντιδραστήρια όπως είναι τα σιδηροκυανιούχο κάλι, το ιώδιο, το 1,2-διωδοαιθάνιο κλπ. έχουν προταθεί γι' αυτό το σκοπό αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις η οξείδωση από τον αέρα φαίνεται να είναι ικανοποιητική.

Η δημιουργία -S-S- γέφυρας μεταξύ δύο διαφορετικών αλυσίδων αποτελεί σαφώς μια περιπλοκότερη και πλέον επίπονη εργασία. Εδώ, επιπλέον από το επιθυμητό μικτό δισουλφίδιο, η οξείδωση δίνει επίσης τα δύο συμμετρικά δισουλφίδια.



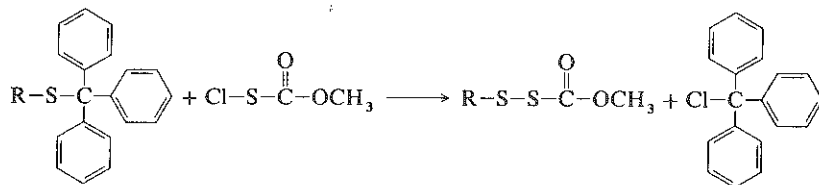
Ένα ανάλογο πρόβλημα παρουσιάζεται κατά τη σύνθεση πεπτιδίων στα οποία δύο ίδιες αλυσίδες συνδέονται με δύο -S-S- γέφυρες. Οξείδωση δι-σουλφιδρυλοενώσεων σχηματίζει ένα παράλληλο και ένα αντιπαράλληλο διμερές και επίσης ολιγομερή ή πολυμερή.



Μπορεί επίσης να επιτευχθεί ένας ελεγχόμενος σχηματισμός δισουλφιδίων. Για παράδειγμα η μεθοξυκαρβονυλοσουλφονυλομάδα (Brois et al. 1970) που είναι συνδεδεμένη με το άτομο θείου ενός πεπτιδίου που περιέχει κυστεΐνη μπορεί να υποκατασταθεί από τη σουλφιδρυλομάδα της κυστεΐνης ενός άλλου πεπτιδίου (Kamber 1973):

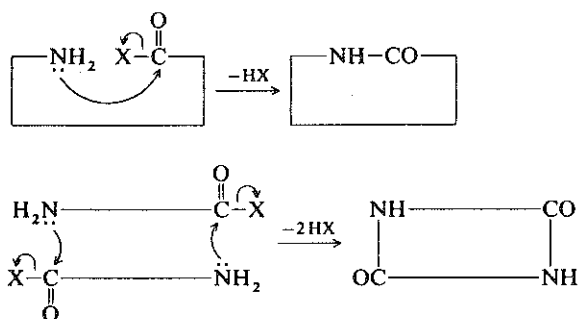


Αυτή η σουλφιδρυλοπροστατευτική ομάδα μπορεί να εισαχθεί δια μέσου της αντίδρασης ενός S-τριτυλοπαραγώγου με μεθοξυκαρβονυλοσουλφενυλο-χλωρίδιο σε ήπιες συνθήκες.

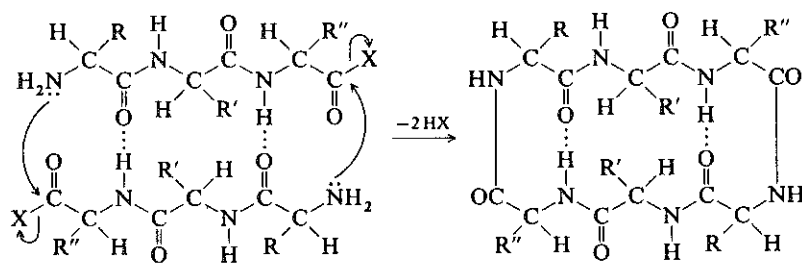


3. Κυκλικά Πεπτίδια

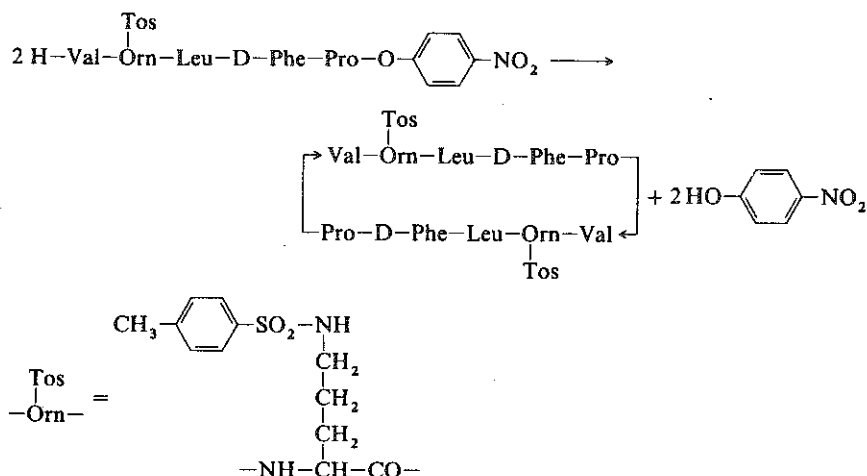
Τα πεπτίδια μπορούν να σχηματίσουν δύο είδη κυκλικών δομών. Στα *ομοδετικά* κυκλικά πεπτίδια μόνο πεπτιδικοί δεσμοί συμμετέχουν στο σχηματισμό δακτυλίου, ενώ στα *ετεροδετικά* κυκλικά πεπτίδια μια -S-S- γέφυρα, ένας δεσμός εστέρα (λακτόνη) ή ένας θειοαιθέρας μπορούν να παίξουν το ρόλο του συνδετικού κρίκου μεταξύ δύο σημείων της πεπτιδικής αλυσίδας. Κατά τη σύνθεση και των δύο τάξεων αυτών των κυκλικών πεπτιδίων τίθεται ένα γενικό πρόβλημα. Η κυκλοποίηση απαιτεί δύο δραστικές ομάδες μέσα στην ίδια πεπτιδική αλυσίδα και αυτές μπορούν να αντιδράσουν μεταξύ τους ενδομοριακά για να σχηματίσουν την κυκλική ένωση, αλλά μπορούν επίσης να αντιδράσουν κατά ένα διαμοριακό τρόπο για να δώσουν διμερή ή πολυμερή:



Ο σχηματισμός μεγαλύτερων δακτυλίων αποτελεί κάτι περισσότερο από μια απλή παράπλευρη αντίδραση. Όταν μερικές αλληλεπιδράσεις όπως οι πολλαπλοί δεσμοί υδρογόνου συγκατατούν μαζί τις δύο ενεργοποιημένες αλυσίδες σ'ένα αντιπαράλληλο συνδυασμό



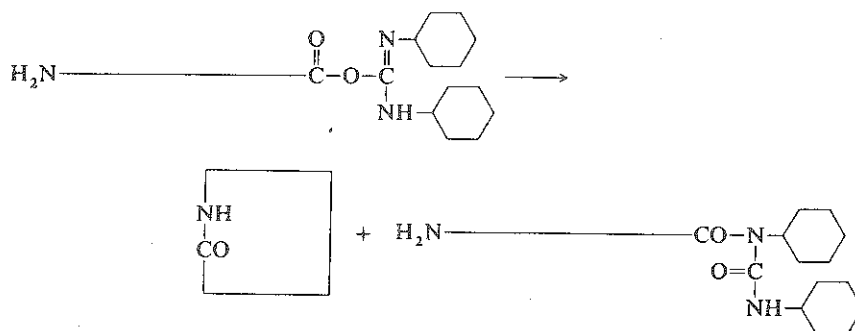
τότε το κύριο προϊόν της αντίδρασης θα είναι μάλλον το διμερές παρά το μονομερές. Τέτοιος κυκλοδιμερισμός παρατηρήθηκε (Schwyzer και Sieber 1958) κατά τη σύνθεση του κυκλικού αντιβιοτικού πεπτιδίου γραμισιδίνη S:



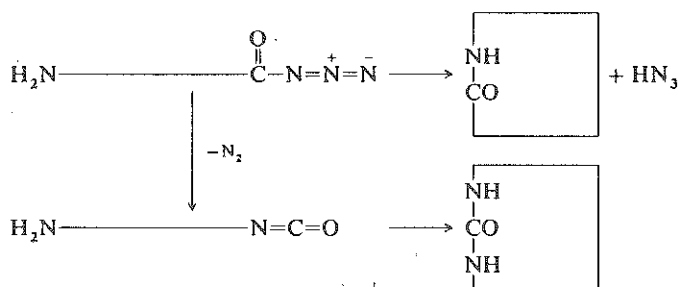
Ο διμερισμός και ο πολυμερισμός μπορούν να ελαττωθούν με την εφαρμογή της αρχής της αραιώσης (Ziegler et al. 1933). Σε αραιά διαλύματα η ταχύτητα της διαμοριακής αντίδρασης μειώνεται σημαντικά, ενώ η ταχύτητα της απλής κυκλοποίησης, μια μονομοριακή πορεία, δεν επηρεάζεται. Σύμφωνα με τα εμπειρικά δεδομένα, οι κυκλοποιήσεις πρέπει να διεξάγονται σε συγκεντρώσεις που να μην υπερβαίνουν τα 10^{-3} molar. Αυτός ο κανόνας μπορεί να παραβιασθεί σε κάποιες μεμονωμένες περιπτώσεις όπου μια προτιμώμενη σαφώς κυκλική διαμόρφωση ευνοεί το σχηματισμό δακτυλίου και παρεμποδίζει τη διαμοριακή αντίδραση.

Κατά τη σύνθεση ομοδετικών κυκλικών πεπτιδίων ο σχηματισμός δακτυλίου απαιτεί το σχηματισμό ενός πεπτιδικού δεσμού μεταξύ της αμινομάδας του N-τελικού αμινοξέος και της καρβοξυλομάδας του C-τελικού αμινοξέος. Εφόσον δεν μπορούν να ληφθούν μέτρα εναντίον της ρακεμοποίησης του C-τελικού αμινοξέος, πρέπει αυτό να επιλεγεί με μεγάλη προσοχή κατά το στάδιο σχεδιασμού της σύνθεσης. Εάν η γλυκίνη είναι ένα από τα αμινοξέα του κυκλικού πεπτιδίου που στοχεύουμε να συνθέσουμε, αυτή φυσικά αποτελεί την ιδανική επιλογή. Η προλίνη, επειδή η οπτική της καθαρότητα δεν επηρεάζεται κάτω από τις περισσότερες των συνθηκών που εφαρμόζονται κατά την πεπτιδική σύνθεση, είναι το επόμενο καλλίτερο αμινοξύ. Η προλίνη πράγματι επιλέχθηκε ως το C-τελικό αμινοξύ της ανοικτής πεπτιδικής αλυσίδας στην αναφερθείσα ήδη σύνθεση της γραμισιδίνης S. Εάν ούτε η γλυκίνη, ούτε η προλίνη βρίσκονται στην πεπτιδική αλυσίδα, τότε μπορούν να χρησιμοποιηθούν γι' αυτό το σκοπό αμινοξέα με όχι μεγάλη τάση για ρακεμοποίηση, όπως είναι η λευκίνη ή η αλανίνη. Πάντως η οπτική καθαρότητα δεν είναι το μόνο πρόβλημα που μας απασχολεί στην κυκλοποίηση. Αμινοξέα που έχουν την τάση να δίνουν ενδομοριακές παράπλευρες αντιδράσεις δε θα πρέπει να επιλεγούν, διότι οι ανταγωνιζόμενες παράπλευρες αντιδράσεις, όπως είναι ο σχηματισμός γλουταρμιδίου από ενεργοποιημένη γλουταμίνη, επηρεάζουν δυσμενώς την απόδοση των επιθυμητών κυκλικών πεπτιδίων. Παρομοίως, αμινοξέα με στεreoχημική παρεμπόδιση όπως η βαλίνη και η ισολευκίνη δεν είναι πράγματι κατάλληλα στη θέση του C-τέλους, καθόσον η μειωμένη ταχύτητα κυκλοποίησης θα αυξήσει την έκταση των παράπλευρων αντιδράσεων, για παράδειγμα

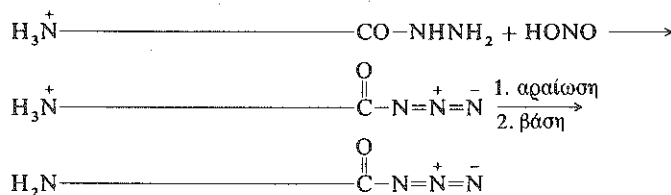
την άκυλο μετάθεση $O \rightarrow N$ που υφίσταται το ενδιάμεσο της O -ακυλοϊσοουρίας κατά τις κυκλοποιήσεις που διεξάγονται με τη βοήθεια καρβοδιιμιδίου:



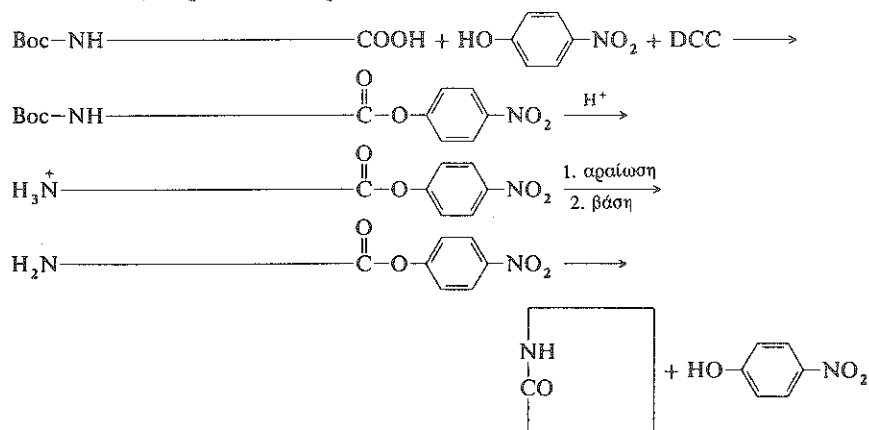
Παρόμοιες δυσκολίες θα αναμένονταν κατά την κυκλοποίηση με τη μέθοδο των αζιδίων των οξέων, όπου η μετάθεση Curtius δίνει ένα παράγωγο κυκλικής ουρίας αντί του επιθυμητού κυκλικού πεπτιδίου:



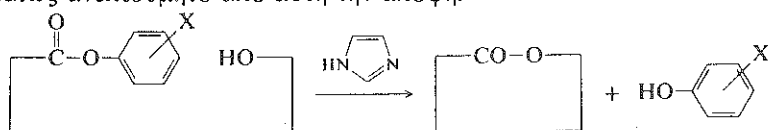
Παρόλα αυτά, ικανοποιητικά αποτελέσματα προκύπτουν συχνά κατά τις κυκλοποιήσεις δια μέσου της μεθόδου των αζιδίων. Η μέθοδος στηρίζεται στη μεγάλη διαφορά της ταχύτητας μετατροπής του υδραζιδίου το αζίδιο σε σύγκριση με την απαμίνωση του (πρωτονιωμένου) N -τελικού αμινοξέος από το νιτρικό οξύ. Ως εκ τούτου, με την υπολογισθείσα ποσότητα νιτρώδους νατρίου (ή νιτρωδο-αλκυλίου) μπορεί να λάβει χώρα γρήγορη μετατροπή του υδραζιδίου σε αζίδιο χωρίς σημαντική απαμίνωση στο N -τέλος. Η κυκλοποίηση γίνεται με την προσθήκη βάσης η οποία αποπρωτονιώνει την αμινοομάδα και επιτρέπει έτσι την ακυλίωσή της. Αυτή η προσθήκη της βάσης, πάντως, θα πρέπει να γίνει μετά από αραίωση ώστε να περιορισθεί η έκταση των διαμοριακών αντιδράσεων



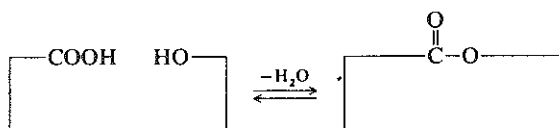
Γενικώς μπορεί να λεχθεί ότι ο διαχωρισμός του βήματος ενεργοποίησης από το βήμα της κυκλοποίησης προσφέρει καλλίτερο έλεγχο και συχνά καλλίτερες αποδόσεις. Μια σχετικά απλή υλοποίηση αυτής της αρχής είναι η μετατροπή της μερικώς προστατευμένης ανοικτής αλυσίδας της μητρικής ένωσης σε ενεργό εστέρα, η οποία ακολουθείται από απομάκρυνση της προστατευτικής ομάδας από το N-τέλος:



Κατά την παρασκευή ετεροδευτικών κυκλικών πεπτιδίων το κλείσιμο του δακτυλίου μπορεί επίσης να λαμβάνει χώρα κατά το σχηματισμό αμιδικού δεσμού. Έτσι μια αλυσίδα, η οποία επιπλέον των αμιδικών δεσμών περιέχει επίσης έναν εστερικό δεσμό (δεψιπεπτίδια) μπορεί να κυκλοποιηθεί με τις μεθόδους που περιγράφηκαν για ομοδευτικά πεπτίδια. Πάντως, είναι το ίδιο δυνατό να σχηματισθεί ο εστερικός δεσμός κατά την πορεία της κυκλοποίησης. Για τη σύνθεση πεπτιδολακτονών μπορούν να εφαρμοσθούν τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού, λιγότερο όμως αποτελεσματικά. Η υδροξυλομάδα είναι λιγότερο πυρηνόφιλη από την αμινομάδα, ως εκ τούτου το κλείσιμο δακτυλίου συνοδεύεται συχνά από παράπλευρες αντιδράσεις όπως είναι ο σχηματισμός N-ακυλουρίας στην περίπτωση των καρβοδιιμιδίων. Αυτή η παράπλευρη αντίδραση προλαμβάνεται με την προσθήκη ενός βοηθητικού πυρηνόφιλου όπως το 1-υδροξυβενζοτριάζολιο και φυσικά δε συμβαίνει όταν αντί για καρβοδιιμίδιο χρησιμοποιείται για ενεργοποίηση ένα πιο σαφές αντιδραστήριο για παράδειγμα καρβονυλοδιιμιδαζόλιο. Διαλύτες που αυξάνουν τον πυρηνόφιλο χαρακτήρα της υδροξυλομάδας μπορούν να έχουν μια ευνοϊκή επίδραση: η πυριδίνη είναι πιθανόν η ορθότερη επιλογή. Η μετεστεροποίηση των ενεργών εστέρων που καταλύεται από βάση αποτελεί μια επιπλέον δυνατότητα για το σχηματισμό δεσμού λακτόνης. Επιπλέον, όλες αυτές οι πορείες μπορούν να οδηγήσουν σε ρακεμοποίηση του ενεργοποιημένου αμινοξέος καθόσον δεν υπάρχει γειτονική αμινο-προστατευτική ομάδα που να παρεμποδίζει την απώλεια της οπτικής καθαρότητας. Το ιμιδαζόλιο που σχηματίζεται κατά την κυκλοποίηση δια μέσου καρβονυλοδιιμιδαζολίου ή το ιμιδαζόλιο που προστίθεται ως καταλύτης κατά τη μετεστεροποίηση των ενεργών εστέρων είναι βεβαίως ανεπιθύμητο από αυτή την άποψη.



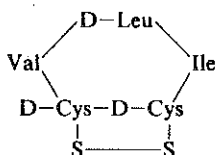
Ο περισσότερο αποτελεσματικός καταλύτης 4-διμεθυλαμινοπυριδίνη είναι επίσης ακόμη περισσότερο βλαβερός. Ως εκ τούτου ο σχηματισμός λακτόνης χρειάζεται περαιτέρω μελέτες. Για παράδειγμα κατ'ευθείαν εστεροποίηση με την κατάλληλη μετατόπιση της ισορροπίας του εστέρα δια μέσου απομάκρυνσης του ύδατος με αζεοτροπική απόσταξη



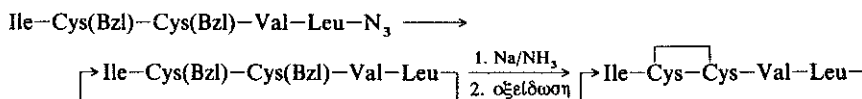
θα μπορούσε πιθανόν να είναι μια κατάλληλη μέθοδος για τη σύνθεση πεπτιδικών λακτονών.

Ετεροδεδικά κυκλικά πεπτίδια, στα οποία συμμετέχει μια δισουλφιδική γέφυρα στο σχηματισμό του δακτυλίου, παρασκευάζονται με τις μεθόδους που έχουν ήδη συζητηθεί σε σχέση με το σχηματισμό δισουλφιδικών γεφυρών μεταξύ μεμονω-μένων αλυσίδων. Φυσικά πρέπει να ακολουθηθεί η αρχή της αραίωσης ώστε να περιορισθεί η έκταση διαμοριακών αντιδράσεων.

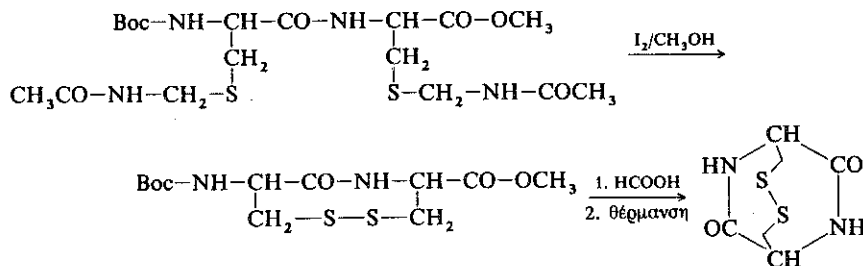
Αρκετές δικυκλικές ενώσεις βρέθηκαν μεταξύ των μικροβιακών πεπτιδίων και το τοξικό πενταπεπτίδιο μαλφορμίνη αποτελεί ένα σχετικά απλό παράδειγμα:



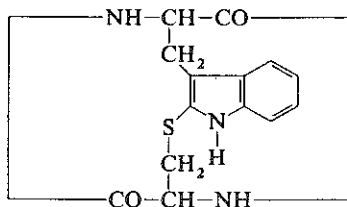
Η σύνθεση τέτοιων ουσιών μπορεί να ακολουθήσει δύο εναλλακτικούς δρόμους. Είτε εξασφαλίζεται πρώτα ο ομοδετικός δακτύλιος και η δισουλφιδική γέφυρα σχηματίζεται στο τελικό βήμα όπως στη σύνθεση της μαλφορμίνης (Bodanszky και Stahl 1974)



είτε, όπως στη σύνθεση της κυκλοκυστίνης (Kamber 1971) σχηματίζεται πρώτα ο ετεροδετικός δακτύλιος με (μερική) αποπροστασία και οξείδωση προς σχηματισμό του δισουλφιδίου:



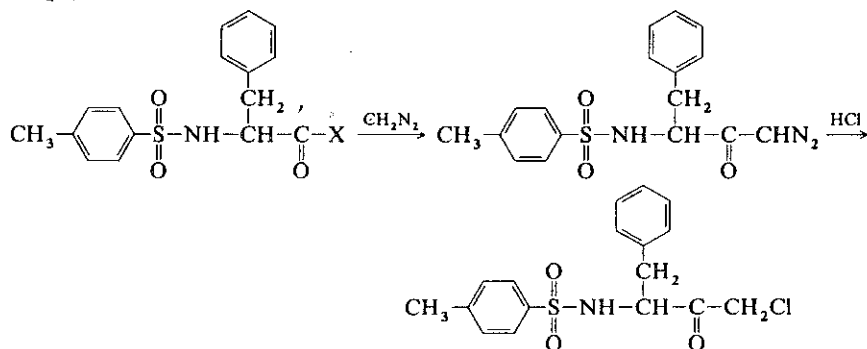
Παρόμοια παρασκευάστηκε πρώτα ένας θειοαιθέρας κατά τη σύνθεση του τοξικού πεπτιδίου των μανιταριών, της φαλλοϊδίνης και ο ομοδετικός δακτύλιος σχηματίστηκε μόνο στο επόμενο βήμα.



Η παρουσία ενός D-αμινοξέος στη σειρά αυτών των πεπτιδίων ή η εναλλαγή L και D αμινοξέων (σύγκρινε μαλφορμίνη) οδηγεί σε προτιμώμενες διαμορφώσεις (στροφές) που διευκολύνουν το κλείσιμο δακτυλίου. Γεωμετρίες που οδηγούν σε κυκλοποίηση ευνοούνται επίσης από την παρουσία στο πεπτίδιο μιας προλίνης, ενώ η γλυκίνη, λόγω της απουσίας μίας παρεμποδίζουσας παράπλευρης αλυσίδας, μπορεί παρομοίως να είναι χρήσιμη. Οι ογκώδεις παράπλευρες αλυσίδες, ιδιαίτερα της βαλίνης και ισολευκίνης με διακλάδωση στο άτομο του β-άνθρακα, ευνοούν την κυκλοποίηση.

4. Πεπτίδια του Περιέχουν Συστατικά που δεν είναι Αμινοξέα

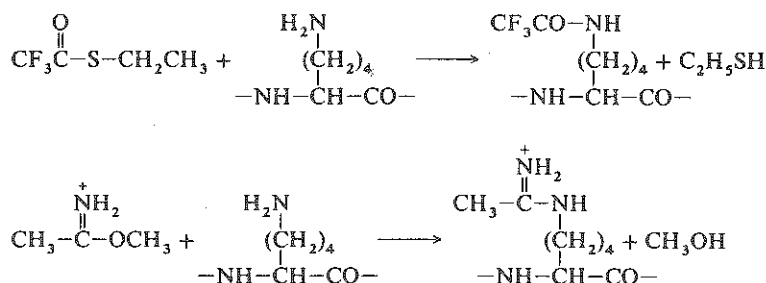
Μικρές πεπτιδικές αλυσίδες στις οποίες ένα από τα αμινοξέα έχει αντικατασταθεί από ένα τμήμα που έχει κάποια σχέση (ή μερικές φορές δεν έχει ακόμη και καμιά σχέση) με αυτό το αμινοξύ παρουσιάζονται με συνεχώς αυξανόμενη συχνότητα στη βιβλιογραφία. Στο κέντρο του ενδιαφέροντος ευρίσκονται οι αναστολείς ενζύμων. Η σύνθεση αυτών των ενώσεων καθορίζεται προφανώς από τη δραστηριότητα αυτών των μη κοινών υποκαταστατών των αμινοξέων και ως εκ τούτου είναι σχεδόν αδύνατο να καθορισθούν κανόνες για τέτοιες προσπάθειες. Θα πρέπει ως εκ τούτου να περιορίσουμε τη συζήτηση σε γενικότητες. Για παράδειγμα οι χλωρομεθυλοκετόνες που προκύπτουν από μερικά αμινοξέα είναι μη αντιστρεπτοί αναστολείς οι οποίοι όχι μόνον αλληλεπιδρούν αλλά στην πραγματικότητα αντιδρούν με το ενεργό κέντρο ενός ενζύμου με σχηματισμό ενός ομοιοπολικού δεσμού. Οι χλωρομεθυλοκετόνες παρασκευάζονται με ενεργοποίηση του προστατευμένου αμινοξέος και αντίδραση στη συνέχεια με διαζωμεθάνιο για να σχηματίσει μια διαζωκετόνη. Αυτή μετατρέπεται στην αντίστοιχη χλωρομεθυλοκετόνη με HCl σ'έναν οργανικό διαλύτη. Από την p-τουλουνολοσουλφονυλο-L-φαινυλαλανίνη παράγεται μια χλωρομεθυλοκετόνη,

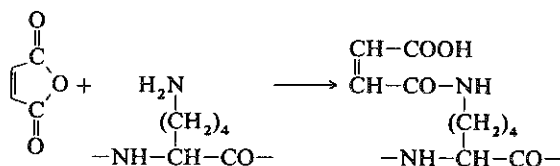


η οποία επιλεκτικά και όχι αντιστρεπτά μπλοκάρει τη χυμοθρυψίνη. Εάν, με στόχο να αυξηθεί η εξειδίκευση, απαιτείται η προσθήκη ενός μικρού πεπτιδίου με καθορισμένη συγγένεια για το ενεργό κέντρο ενός ενζύμου τύπου χυμοθρυψίνης, τότε η τολουολο-σουλφονυλο(tosyl)-προστατευτική ομάδα δεν είναι κατάλληλη διότι η απομάκρυνσή της πριν την επιμήκυνση της αλυσίδας από το άμινο τέλος απαιτεί αναγωγή με νάτριο σε υγρή αμμωνία και υπό τις συνθήκες της πορείας αποπροστασίας η χλωρομεθυλομάδα καταστρέφεται. Αντικατάσταση της tosyl-ομάδας από την 9-φλουορενυλομεθυλοξυ-καρβονυλομάδα (Fmoc) θα δημιουργούσε ένα παρόμοιο πρόβλημα: η αποπροστασία με μια δευτεροταγή αμίνη δεν είναι προφανώς δυνατή χωρίς αλκυλίωση του αντιδραστήριου από τη δραστική χλωρομεθυλοκετονομάδα. Ως εκ τούτου θα πρέπει να επιλεγούν προστατευτικές ομάδες που μπορούν να απομακρυνθούν με επίδραση οξέων, για παράδειγμα η tert.βουτυλοξυκαρβονυλο(Boc)-ομάδα. Η βενζυλοξυκαρβονυλο (Z)-ομάδα δεν είναι επίσης πλήρως αποδεκτή, διότι κατά τη διάρκεια της υδρογονόλυσης το άτομο του χλωρίου αντικαθίσταται από υδρογόνο και η απόσπαση με HBr σε οξικό οξύ δίνει μικρές αποδόσεις. Παρατεταμένη κατεργασία με τριφθοροξικό οξύ είναι κάπως καλλίτερη αλλά όχι τελείως ικανοποιητική. Ανάλογα προβλήματα προκύπτουν κατά τη σύνθεση πεπτιδίων που περιέχουν μια μουσταρδοειδή αζωτούχο ομάδα η οποία είναι επίσης σχετικά ανθεκτική στα οξέα αλλά αντιδρά με βάσεις. Μια εξονυχιστική έρευνα της δραστικότητας του αναστολέα είναι απαραίτητη πριν γίνει δυνατό να αναπτυχθεί κάποιο σχήμα σύνθεσης. Στην περίπτωση σοβαρών αδυναμιών να βρεθεί κάποιος συμβιβασμός πρέπει πιθανόν να αναζητηθούν εναλλακτικές πορείες όπως η σύνθεση ενός πεπτιδίου με φαινυλαλανίνη στο C-τελικό άκρο του πεπτιδίου και η μετατροπή της στη χλωρομεθυλοκετόνη στο τελευταίο στάδιο της σύνθεσης.

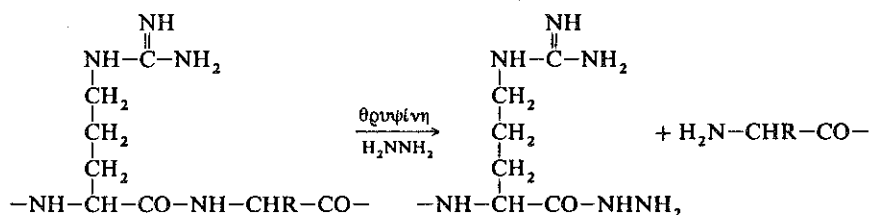
5. Ημισύνθεση (Μερική Σύνθεση)

Η εκπληκτική δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν τμήματα μιας πρωτεΐνης για τη σύνθεση μεγαλύτερων πεπτιδίων και ακόμη και πρωτεϊνών έχει προκαλέσει τη διεξαγωγή σημαντικών ερευνών. Εκλεκτική διάσπαση μιας πρωτεΐνης σε σαφώς καθορισμένους πεπτιδικούς δεσμούς είναι δυνατή με πρωτεολυτικά ένζυμα και επίσης με ορισμένες χημικές μεθόδους όπως η διάσπαση των αλυσίδων που περιέχουν μεθειονίνη με βρωμιούχο κυάνιο. Εφόσον είναι συχνά προβληματικό να ληφθούν τα τμήματα της διάσπασης με κατάλληλες προστατευτικές ομάδες, η προστασία τουλάχιστον των αμινομάδων είναι προτιμότερο να γίνει πριν τη διάσπαση. Ειδικές προστατευτικές μέθοδοι διατίθενται γι' αυτό το σκοπό: τριφθοροακετυλίωση, ακετοΐμιδιλίωση και μαλειύλιωση, ενώ όλες αυτές απομακρύνονται σε πολύ ήπιες συνθήκες:





Η ενεργοποίηση της νεοσχηματισθείσας καρβοξυλομάδας μπορεί να απλοποιηθεί εάν η ενζυμική διάσπαση, π.χ. με θρυψίνη, διεξαχθεί παρουσία περίσσειας υδραζίνης οπότε σχηματίζεται το υδραζίδιο του πεπτιδίου



και ενεργοποιείται τότε στη μορφή του αζιδίου με κατεργασία με νιτρώδες οξύ ή νιτρώδο-αλκάλια.

Την περίπλοκη μεθοδολογία της ημισύνθεσης έχει διαπραγματευθεί λεπτομερώς ο Offord (1980)

Αναφορές

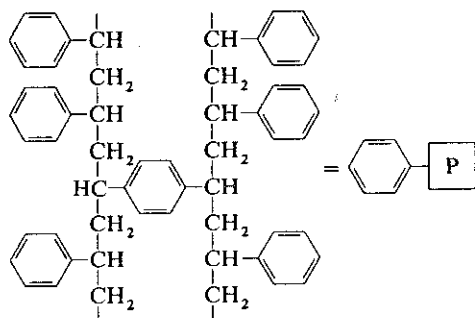
- Bodanszky, M.: Ann. New York Acad. Sci. 88, 655 (1960)
 Bodanszky, M., du Vigneaud, V.: J. Amer. Chem. Soc. 81, 5688 (1959)
 Bodanszky, M., Ondetti, M.A., Levine, S.D., Williams, N.J.: J. Amer. Chem. Soc. 89, 6753 (1967)
 Bodanszky, M., Stahl, G.L.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 2791 (1974)
 Brois, S.J., Pilot, J.F., Barnum, H.W.: J. Amer. Chem. Soc. 92, 2791 (1970)
 du Vigneaud, V., Ressler, C., Swan, J.M., Roberts, C.W., Katsoyannis, P.G., Gordon, S.: J. Amer. Chem. Soc. 75, 4879 (1953)
 Kamber, B.: Helv. Chim. Acta 54, 927 (1971)
 Kamber, B.: Helv. Chim. Acta 56, 1370 (1973)
 Kemp, D.S., Bernstein, Z.W., McNeil, G.N.: J. Org. Chem. 39, 2831 (1974)
 Miyoshi, M., Kimura, T., Sakakibara, S.: Bull. Chem. Soc. Jpn. 43, 2941 (1970)
 Offord, R.E.: Semisynthetic Proteins, John Wiley, New York, 1980
 Sakakibara, S., Kishida, Y., Kikuchi, Y., Sakai, R., Kakiuchi, K.: Bull. Chem. Soc. Jpn. 41, 1273 (1968)
 Schwyzer, R., Sieber, P.: Helv. Chim. Acta 41, 2186 (1958)
 Wieland, Th.: Peptides of Poisonous Amanita Mushrooms, Springer Verlag, New York, 1986
 Yajima, H., Fujii, N.: J. Amer. Chem. Soc. 103, 5867 (1981)
 Ziegler, K., Eberle, H., Ohlinger, H.: Liebigs Ann. Chem. 504, 95 (1933)

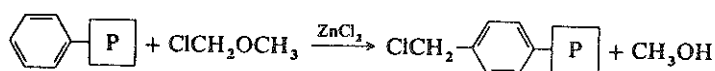
Περαιτέρω Βιβλιογραφία

- Jones, J.H.: Sequential Peptide Synthesis in Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol. 4, Weinstein, B. ed., pp. 29-63, Dekker, New York 1977
- Kricheldorf, H.R.: α -Aminoacid-N-Carboxy-Anhydrides and Related Heterocycles, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 1987
- Roberts, D.C., Velaccio, F.: Unusual Amino Acids in Peptide Synthesis in The Peptides, Vol. 5, Gross, E., Meienhofer, J. eds., pp 341-449, Academic Press, New York 1983
- Sheppard, R.C.: Partial Synthesis of Peptides and Proteins in The Peptides Vol. 2, Gross, E., Meienhofer, J. eds., pp. 441-484, Academic Press, New York 1980.

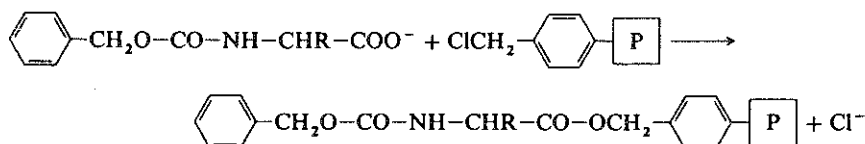
X. Σύνθεση Πεπτιδίων σε Στερεά Φάση

Η παρασκευή πεπτιδίων που περιέχουν περισσότερα αμινοξέα με τις συνήθεις μεθόδους οργανικής χημείας αποτελεί ένα επίπονο έργο. Η εισαγωγή των προστατευτικών ομάδων, οι αντιδράσεις σύζευξης και τα στάδια της αποπροστασίας συνεπάγονται ένα μεγάλο αριθμό επεξεργασιών, όπως εκπλύσεις των μιγμάτων της αντίδρασης μετά τη σύζευξη, καταβύθιση ή κρυστάλλωση των ενδιάμεσων, απομόνωση των στερεών προϊόντων με διήθηση ή φυγοκέντρηση που ακολουθείται από ξήρανση κλπ. Έτσι η σύνθεση πεπτιδικών αλυσίδων που περιέχουν μερικές δωδεκάδες αμινοξέων απαιτεί μια σχεδόν ηρωϊκή προσπάθεια και πρωτεΐνες, ακόμη και μικρές, μπορούν να παρασκευασθούν ως κατόρθωμα αλλά βεβαίως όχι ως ρουτίνα. Η ανάγκη για διευκόλυνση της πορείας σύνθεσης ήταν προφανής για αρκετό καιρό. Η βήμα προς βήμα στρατηγική, που επιδείχθηκε σε μια νέα σύνθεση της οξυτοκίνης (Bodanszky και du Vigneaud 1959) ήταν κατάλληλη για μηχανοποίηση και αυτοματοποίηση για την επιμήκυνση της αλυσίδας, λόγω της επαναληπτικότητας των πειραματικών χειρισμών αυτών των τεχνικών. Η πρόσδεση του N-προστατευμένου C-τελικού αμινοξέος σε ένα αδιάλυτο πολυμερές υποστήριγμα (μία "ρητίνη") ακολουθούμενη από αποπροστασία και ακυλίωση της ελευθερούμενης αμινομάδας με το προτελευταίο αμινοξύ και η εξακολούθηση της πορείας με παρόμοιους κύκλους αποπροστασίας και εισαγωγής των υπόλοιπων αμινοξέων απαλλάσσουν τον ερευνητή από τη χρήση ηθμών και διαχωριστικών χοανών, από εκπλύσεις και ξήρανση των ενδιάμεσων κλπ. Η περίσσεια των αρχικών πρώτων υλών και των αντιδραστηρίων καθώς επίσης και τα παραπροϊόντα των αντιδράσεων απομακρύνονται απλώς με έκπλυση του πεπτιδίου-πολυμερούς με κατάλληλα επιλεγμένους διαλύτες. Το πεπτίδιο αποχωρίζεται από το υποστήριγμα μόνο μετά από την ολοκλήρωση της σύνθεσης της πεπτιδικής αλυσίδας. Αυτή η νέα ιδέα υλοποιήθηκε από τον R.B. Merrifield (1963) κατά τη σύνθεση του τετραπεπτιδίου L-λευκυλο-L-αλανυλο-γλυκυλο-L-βαλίνη. Το αδιάλυτο υποστήριγμα που χρησιμοποιήθηκε γι' αυτό το σκοπό, η ρητίνη του Merrifield, αποτελεί ακόμη ένα από τα κύρια στηρίγματα για τη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση. Παρασκευάσθηκε με χλωρομεθυλίωση ενός συμπολυμερούς στυρολίου-διβινυλοβενζολίου.

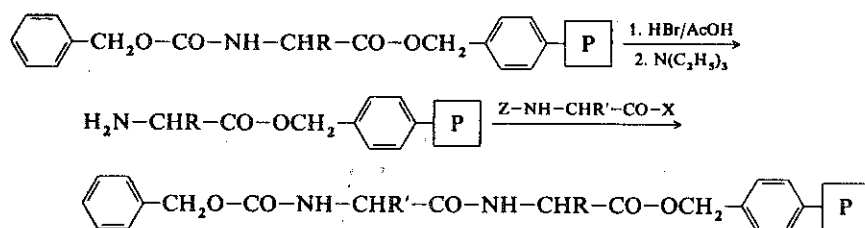




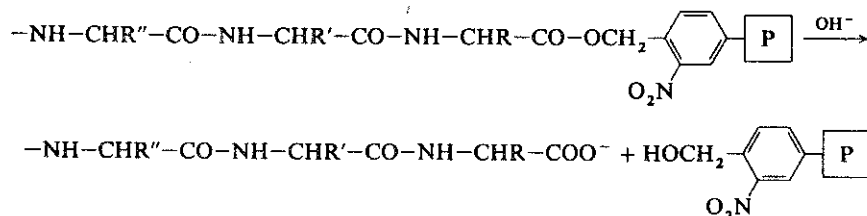
Η πρόσδεση του πρώτου αμινοξέος (του C-τελικού αμινοξέος της πεπτιδικής αλυσίδας που πρόκειται να παρασκευασθεί) επιτεύχθηκε με αντίδραση της χλωρομεθυλιωμένης ρητίνης με το τριαιθυλαμμωνιακό άλας του βενζυλοξυκαρβονυλο-αμινοξέος.



Η απομάκρυνση της βενζυλοξυκαρβονυλομάδας με HBr σε οξικό οξύ έδωσε την αμινο-ακυλο-ρητίνη η οποία μπορεί να ακυλωθεί με το επόμενο αμινοξύ που πρόκειται να εισαχθεί, χρησιμοποιούμενο φυσικά στη μορφή του N-προστατευμένου και καρβοξυλο-ενεργοποιημένου παραγώγου.

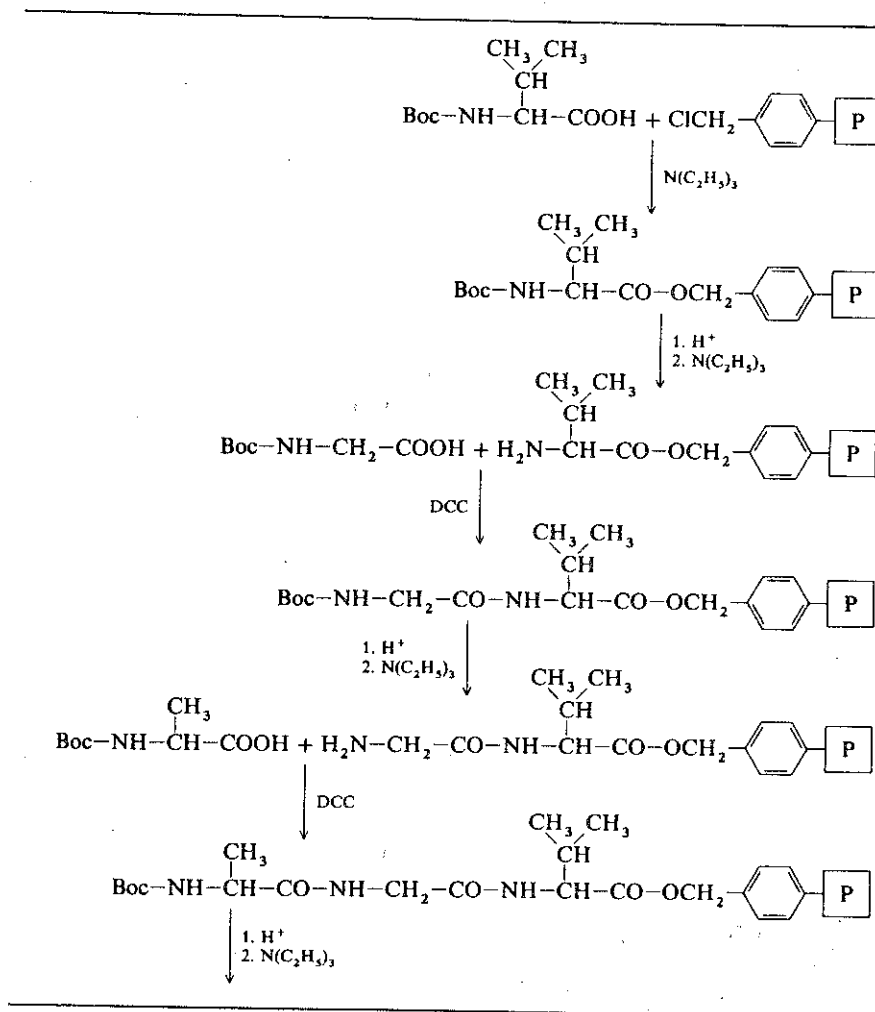


Ενώ ήταν δυνατό να αποσπασθεί η βενζυλοξυκαρβονυλομάδα χωρίς να επηρεάσει σε σημαντικό βαθμό την τύπου βενζυλεστέρα ομάδα που συνδέει το C-τελικό αμινοξύ στο πολυμερές, αυτή η επιλεκτικότητα δεν ήταν ικανοποιητική για πρακτικούς σκοπούς: σε κάθε αποπροστασία ένα μικρό αλλά όχι αμελητέο μέρος του αμινοξέος ή του πεπτιδίου αποσπάται από το πολυμερές υποστήριγμα και χάνεται. Για να αυξηθεί η εκλεκτικότητα νιτρώθηκαν οι αρωματικοί πυρήνες του πολυμερούς: οι p-νιτροβενζυλεστέρες παρουσιάζουν σημαντική αντίσταση στα οξέα. Αυτή η τροποποίηση πάντως, ενώ αυξάνει την εκλεκτικότητα κατά την αποπροστασία, κάνει απαραίτητη τη σαπωνοποίηση με άλκαλι, μια κάπως αμφίβολη μέθοδο για την απόσπαση του τελικού πεπτιδίου από τη ρητίνη.

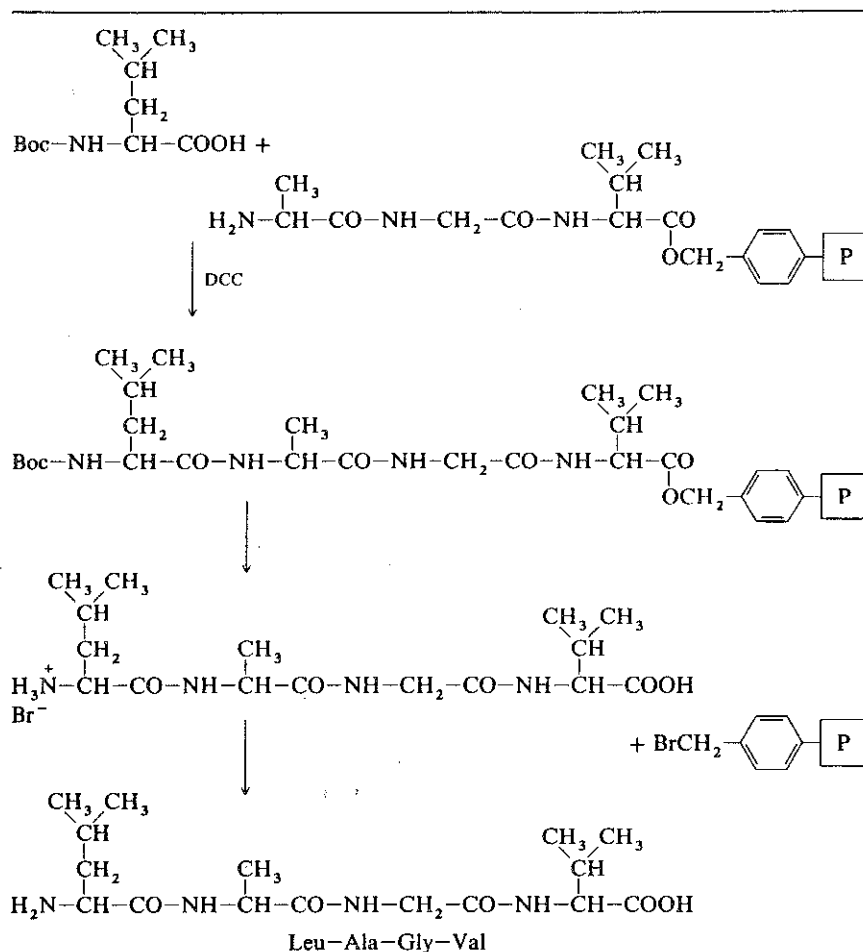


Ως εκ τούτου περαιτέρω βελτίωση δοκιμάσθηκε και πιστοποιήθηκε με την εφαρμογή των tert-βουτυλοξυκαρβονυλο-αμινοξέων μάλλον παρά των βενζυλοξυκαρβονυλο-αμινοξέων. Στη βελτιωμένη μέθοδο (Merrifield 1964) η νίτρωση της ρητίνης κατέστη περιττή, καθόσον οι σχετικά ήπιες όξινες συνθήκες που απαιτούνται για αποπροστασία μετά από κάθε σύζευξη, για παράδειγμα N HCl σε οξικό οξύ ή τριφθοροξικό οξύ αραιωμένο με διχλωρομεθάνιο δε διασπούν σε μεγάλο βαθμό τον πρώτο δεσμό του πεπτιδίου με το πολυμερές. Στις πρώτες μελέτες του Merrifield χρησιμοποιήθηκε το δικυκλοεξυλοκαρβοδιμίδιο ως το αντιδραστήριο σύζευξης και παραμένει το αντιδραστήριο της επιλογής των περισσότερων εργαστηρίων για την ενεργοποίηση. Η μέθοδος σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεά φάση απεικονίζεται στο Σχήμα 3.

Σχήμα 3



Σχήμα 3 (συνέχεια)



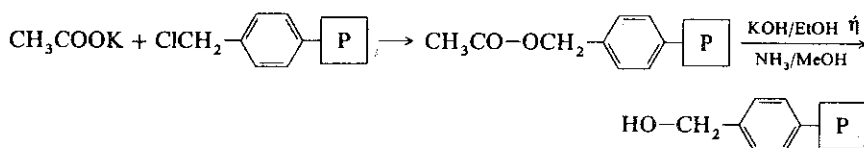
Είναι αρκετά δυνατό να εφαρμοσθεί επίσης η χρήσιμη μέθοδος της στερεάς φάσης στη συμπύκνωση τμημάτων, μερικές φορές με σημαντικά πλεονεκτήματα. Για παράδειγμα η απομόνωση ενδιάμεσων τα οποία είναι δύσκολο να χειρισθεί κανείς μπορεί να αντιμετωπισθεί με την παρασκευή τους δια μέσου ενός αμινο-συστατικού συνδεδεμένου σε μια ρητίνη. Ακόμη σημαντικότερο, εάν αυτό το συστατικό ευρίσκεται ως το άλας του οξέος που χρησιμοποιήθηκε κατά την προηγούμενη αποπροστασία, η ελεύθερη αμίνη μπορεί να εξασφαλισθεί μόνο με έκπλυση της πεπτιδο-ρητίνης με ένα διάλυμα τριαιθυλαμίνης σε διχλωρομεθάνιο. Επιπλέον, ο τελικός στόχος της μεθόδου σύνθεσης σε στερεά φάση, η μηχανοποίηση και αυτοματοποίηση της σύνθεσης της πεπτιδικής αλυσίδας μπορεί να επιτευχθεί μόνο εφόσον ακολουθηθεί η βήμα προς βήμα

στρατηγική. Ως εκ τούτου, στα επόμενα τμήματα αυτού του κεφαλαίου θα συζητηθεί μόνον αυτή η γενικώς εφαρμοζόμενη πορεία, η βήμα προς βήμα εισαγωγή μεμονωμένων αμινοξέων.

Α. Το Αδιάλυτο Πολυμερές Υποστήριγμα και ο Δεσμός που Συνδέει το Πεπτίδιο στη Ρητίνη

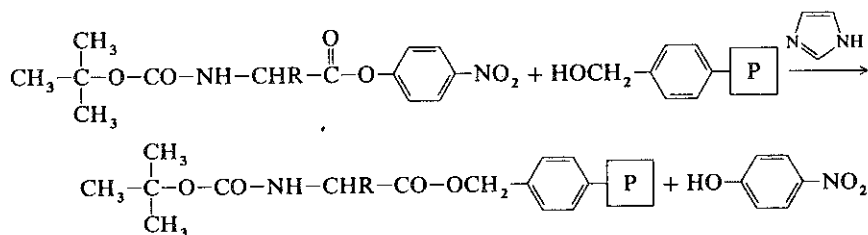
Η ρητίνη Merrifield, το χλωρομεθυλιωμένο συμπολυμερές στυρολίου-διβινυλοβενζολίου, έχει χρησιμοποιηθεί από μόνο του σε πολλές συνθέσεις αλλά αποτέλεσε επίσης τη βάση για περαιτέρω ανάπτυξη. Μείωση του ποσοστού του περιεχόμενου διβινυλοβενζολίου στο μίγμα πολυμερισμού από 2% σε 1% έδωσε μια ρητίνη η οποία φουσκώνει καλλίτερα στους διαλύτες που χρησιμοποιούνται κατά τη σύνθεση, όπως είναι το διχλωρομεθάνιο ή το διμεθυλοφορμαμίδιο. Αυτή η βελτίωση, γίνεται μεν με κόστος τη μείωση της μηχανικής σταθερότητας, επιτρέπει όμως ταχύτερη είσοδο (με διάχυση) των αντιδραστηρίων. Έτσι, σε μια δεδομένη στιγμή μπορεί να επιτευχθεί μεγαλύτερη συγκέντρωση του ακυλιωτικού αντιδραστηρίου γύρω από τις αμινομάδες. Αυτές περιβαλλόμενες από το πλέγμα του πολυμερούς, γίνονται καλλίτερα προσιτές σε μια καλώς φουσκωμένη ρητίνη όπου η επίδραση της διάχυσης που ελέγχει την ταχύτητα μειώνεται σημαντικά. Επίσης, στο 1% διασταυρωτό πολυμερές είναι πολύ λιγότερο πιθανό να παραμείνει κρυμμένο σε ορισμένες περιοχές του πλέγματος ένα μικρό ποσοστό των μορίων με το αμινο-στατικό και να μην είναι προσιτό για ακυλίωση από τα ενεργοποιημένα παράγωγα αμινοξέων με στερεοχημική παρεμπόδιση όπως είναι η βαλίνη ή η ισολευκίνη. Φυσικά, η διάσπαση των προστατευτικών ομάδων και η μετατροπή των αλάτων σε ελεύθερες αμίνες διευκολύνονται παρομοίως.

Επιπλέον από τις φυσικές βελτιώσεις θα μπορούσε επίσης να βελτιωθεί η χημεία της χλωρομεθυλιωμένης ρητίνης. Με θέρμανση της ρητίνης με ένα διάλυμα οξικού καλίου σε μια αλκοόλη υψηλού σημείου ζέσεως λαμβάνει χώρα αντικατάσταση του ατόμου του χλωρίου από το οξικό ιόν. Σαπωνοποίηση του εστέρα με ένα αλκοολικό διάλυμα υδροξειδίου του καλίου ή αμμωνιόλυση σε μεθανόλη δίνει την υδροξυμεθυλορητίνη, μια μορφή βενζυλικής αλκοόλης συνδεδεμένης στο πολυμερές.

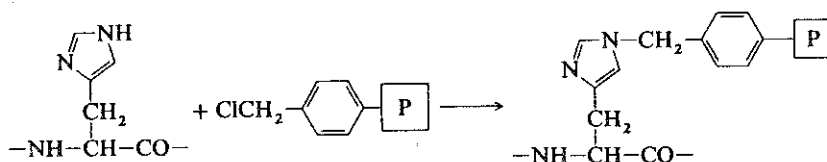


Η πρόσδεση του πρώτου αμινοξέος με εστεροποίηση με την υδροξυμεθυλορητίνη μπορεί να επιτευχθεί με τη βοήθεια αντιδραστηρίων συμπύκνωσης όπως είναι το δικυκλοεξυλο-

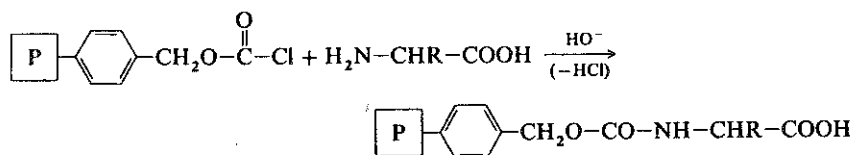
καρβοδιιμίδιο ή το καρβονυλοδιιμιδαζόλιο. Μια καταλληλότερη μέθοδος, η μετεστεροποίηση των ενεργών εστέρων που καταλύεται από το ιμιδαζόλιο



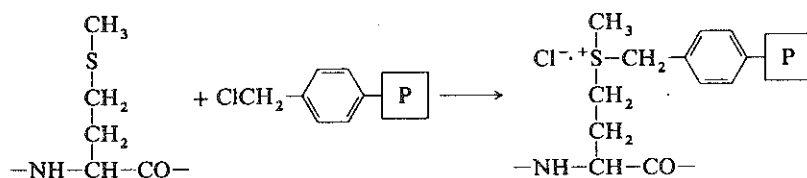
πρέπει να διεξαχθεί σε μη πολικούς διαλύτες, κατά προτίμηση σε τολουόλιο, για να αποφευχθεί ρακεμοποίηση. Ο πολύ αποτελεσματικός καταλύτης 4-διμεθυλοαμινοπυριδίνη θα προκαλέσει ρακεμοποίηση ακόμη και κάτω από τέτοιες συνθήκες. Τα πλεονεκτήματα της υδροξυμεθυλο-ρητίνης¹ έναντι του χλωρομεθυλιωμένου πολυμερούς δεν είναι αμελητέα. Στο βήμα πρόσδεσης η χλωρομεθυλομάδα μπορεί να αλκυλιώσει πυρηνόφιλες παράπλευρες ομάδες, για παράδειγμα τον πυρήνα του ιμιδαζολίου της ιωτιδίνης ή το άτομο θείου του θειοαιθέρα της μεθειονίνης



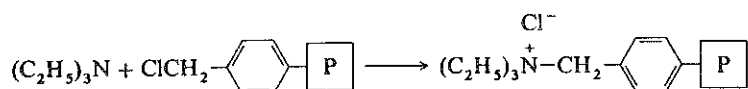
¹ Θα πρέπει να τονισθεί ότι ένα υδροξυμεθυλιωμένο αδιάλυτο υποστήριγμα παρασκευάστηκε με συμπολυμερισμό 4-υδροξυμεθυλοστυρολίου, στυρολίου και διβινυλοβενζολίου και επίσης με αναγωγή μιας καρβοξυλο-ρητίνης με LiAlH_4 από τον Letsinger και τους συνεργάτες του (1963) οι οποίοι συγχρόνως και ανεξάρτητα από τον Merrifield άρχισαν σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση. Στη δική τους μέθοδο το πολυμερές κατεργάστηκε με φωσγένιο και το πολυμερές βενζυλοχλωρο-καρβονικό ανάλογο που παρασκευάστηκε έτσι χρησιμοποιήθηκε για την ακυλίωση ενός αμινοξέος:



Το προσοδεδεμένο στη ρητίνη αμινοξύ σχεδιάστηκε να χρησιμεύσει ως το N-τελικό άκρο ενός πεπτιδίου που θα παρασκευάζεται με βήμα προς βήμα επιμήκυνση της αλυσίδας. Οι έμφυτες δυσκολίες σ' αυτή τη στρατηγική, όπως τονίσθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο, εμπόδισαν τη γενική αποδοχή της μεθόδου Letsinger για τη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση, η ανάπτυξη όμως μεθόδων σύζευξης χωρίς ρακεμοποίηση θα μπορούσε να οδηγήσει σε επανεκτίμηση αυτής της μεθόδου.

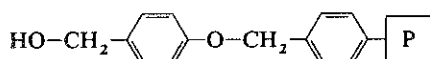


και επίσης τριτοταγείς βάσεις, όπως είναι η τριαιθυλαμίνη,

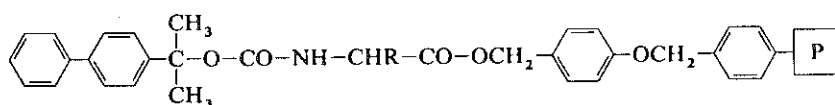


που χρησιμοποιείται στην πορεία της σύνθεσης.

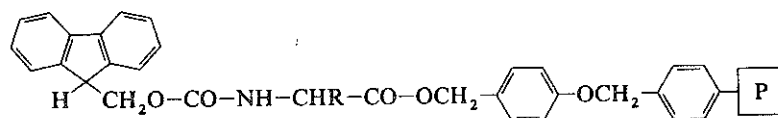
Μια περαιτέρω ανάπτυξη ιδέας της υδροξυμεθυλορητίνης αποτελούν τα πολυμερή υποστηρίγματα όπως είναι το



Εδώ το p-αλκοξυ-υποκατάστατο του τμήματος της βενζυλικής αλκοόλης αυξάνει την ευαισθησία στα οξέα του εστερικού δεσμού μεταξύ πεπτιδίου και ρητίνης και έτσι ο δεσμός της πρόσδεσης με τη ρητίνη μπορεί να διασπασθεί με τριφθοροξικό οξύ. Κατά συνέπεια οι προστατευτικές ομάδες που χρησιμοποιούνται για την προστασία της α-αμινομάδας πρέπει να είναι περισσότερο ευαίσθητες στα οξέα, όπως είναι η διφαινυλοϊσοπροπυλοξυκαρβονυλομάδα (Broc):

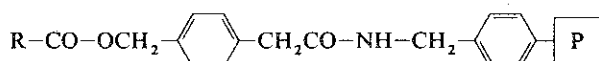


Ένας ορθογωνικός (σελίδα 83) και ως εκ τούτου πλέον σίγουρος συνδυασμός προσφέρεται από την 9-φλουορενυλομεθυλοξυκαρβονυλομάδα (Fmoc) η οποία είναι ευαίσθητη στις βάσεις:

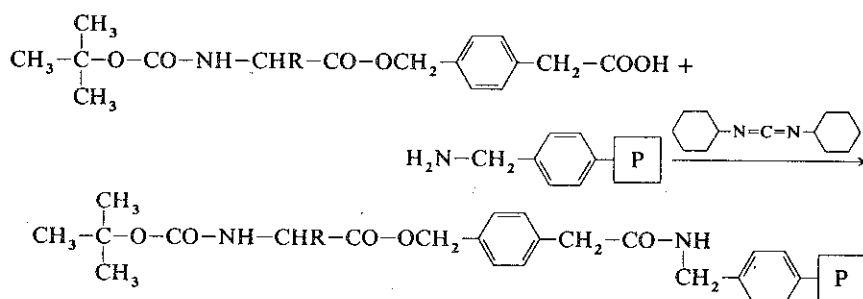


Σ'αυτό το σημείο πρέπει να επιστρέψουμε στο πρόβλημα της σταθερότητας του εστερικού δεσμού πρόσδεσης με τη ρητίνη. Απόσπαση της Boc προστατευτικής ομάδας

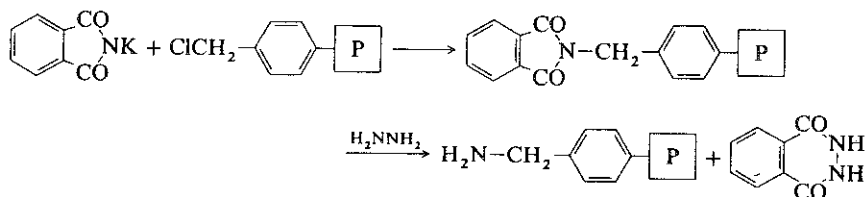
με αραιό HCl σε οξικό οξύ ή με ένα μίγμα τριφθοροξικού οξέος και διχλωρομεθάνιου δεν επηρεάζει σημαντικά το δεσμό τύπου βενζυλεστέρα. Επιπλέον, ακόμη και πολύ μικρή απώλεια πεπτιδίου από τη ρητίνη προκαλεί προβλήματα στη σύνθεση μεγάλων αλυσίδων καθώς η όξινη απομάκρυνση των α-αμινοπροστατευτικών ομάδων επαναλαμβάνεται πολλές φορές. Ως εκ τούτου, καθώς οι ενώσεις που σχεδιάζονταν να παρασκευασθούν αυξάνονταν σε μήκος, γινόταν ακόμη περισσότερο επιθυμητή η βελτίωση της ανθεκτικότητας, στα οξέα, των δεσμών της πρόσδεσης με τη ρητίνη. Από τις πολυάριθμες προτάσεις που έγιναν γι' αυτό το σκοπό τα φαινυλακεταμιδομεθυλο-παράγωγα (PAM ρητίνες) απέκτησαν σημαντική δημοτικότητα. Μια πρακτική μέθοδο που οδηγεί στην κατάλληλη αρχική ουσία



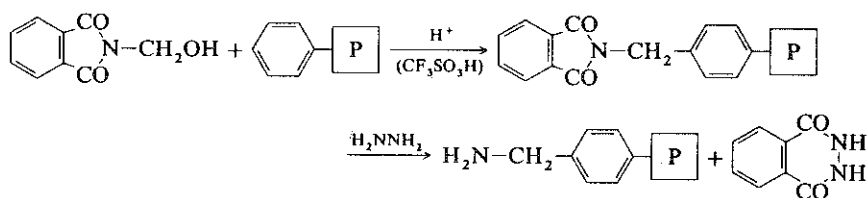
αποτελεί η σύζευξη ενός παραγώγου του φαινυλοξικού οξέος που περιλαμβάνει το C-τελικό αμινοξύ, με ένα τροποποιημένο πολυμερές, την αμινομεθυλο-ρητίνη



Το αμινομεθυλοσυμπολυμερές παρασκευάζεται εύκολα από τη χλωρομεθυλο ρητίνη



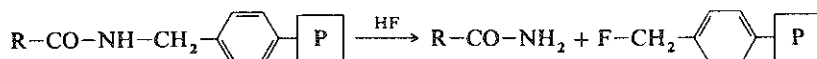
ή από το διαθέσιμο στο εμπόριο συμπολυμερές στυρολίου-διβινυλοβενζολίου:



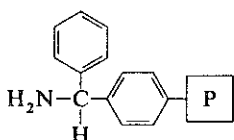
Σε μια τέτοια λεπτή ενεργοποίηση του πολυμερούς υποστηρίγματος, επιπλέον από την ομάδα που επιτρέπει την πρόσδεση του C-τελικού αμινοξέος δημιουργείται επίσης ένας "ελεύθερος χώρος". Αυτός ο χώρος παρέχει κάποια απόσταση μεταξύ της αυξανόμενης πεπτιδικής αλυσίδας και του πλέγματος της ρητίνης και μειώνει ως εκ τούτου τη δυσμενή αύξηση του όγκου γύρω από το αμινο-συστατικό που είναι συνδεδεμένο στο

πολυμερές. Τα αντιδραστήρια έχουν καλλίτερη πρόσβαση σε ένα λιγότερο παρεμποδιζόμενο πυρηνόφιλο.

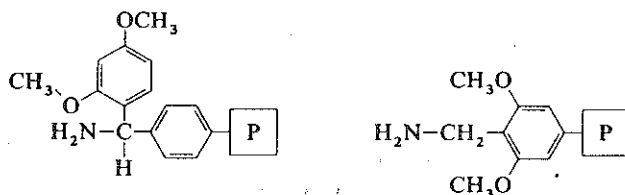
Το αμινομεθυλο-συμπολυμερές μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή αμιδίων² πεπτιδίων με όξινη διάσπαση του δεσμού C-N στο τμήμα της βενζυλαμίνης:



Για πρακτικούς σκοπούς, πάντως, είναι απαραίτητο να αυξηθεί η ευαισθησία στα οξέα αυτού του δεσμού με την παρουσία ενός δεύτερου βενζολικού δακτυλίου στο βενζυλικό άτομο άνθρακα. Οι βενζυδρολαμινορητίνες έχουν χρησιμοποιηθεί στην πραγματικότητα μόνες τους σε πολλές συνθέσεις αμιδίων πεπτιδίων.

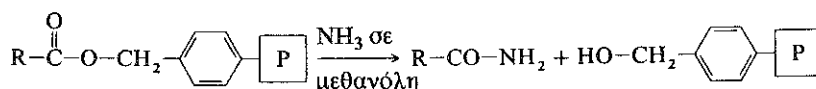


Πολυμερή σε ομάδες που είναι ακόμη περισσότερο ευαίσθητες στα οξέα όπως

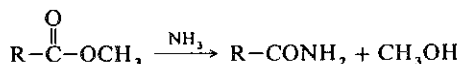
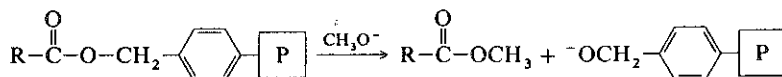


μπορεί να έχουν πρακτική αξία.

- 2 Αρκετές πεπτιδικές ορμόνες έχουν ένα αμίδιο αμινοξέος στο C-τέλος τους. Τέτοια πεπτιδικά αμίδια μπορούν να εξασφαλισθούν με αμμωνιόλυση του εστερικού δεσμού που συνδέεται με τη ρητίνη.



αλλά αυτή η αντίδραση συνοδεύεται από μεθανόλυση. Οι προκύπτοντες μεθυλεστέρες μετατρέπονται βαθμιαίως στο επιθυμητό αμίδιο



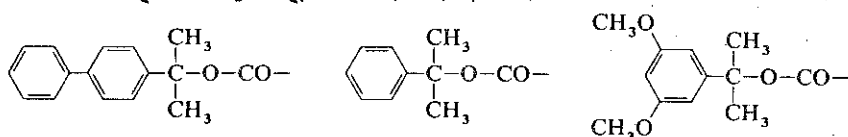
με τη διαφορά ότι η δεύτερη αντίδραση πιθανόν να χρειάζεται αρκετό χρόνο για να συμπληρωθεί. Με τις τριτοταγείς αμίνες που χρησιμοποιούνται για την ανάκτηση του μεθοξυανιόντος, οι μεθυλεστέρες μπορούν να παραχθούν ως τα μόνα προϊόντα.

Τελικώς, το συμπολυμερές στυρολίου-διβινυλοβενζολίου δεν είναι βεβαίως το μόνο αρχικό υλικό κατάλληλο για την εισαγωγή δραστικών ομάδων. Σε αδιάβροχα (στεγανά) πολυμερή εισήχθηκαν δραστικές ομάδες και πορώδεις υάλινες σφαίρες επικαλύφθηκαν με οργανικά πολυμερή για την εισαγωγή δραστικών ομάδων, αλλά οι πρωτοπόρες αυτές προσπάθειες ακολουθήθηκαν από πολύ λίγους μέχρι τώρα. Περισσότερο ευόλυνος φαίνεται να είναι, αυτή τη στιγμή, η εφαρμογή των *πολυαμιδίων*, όπως είναι το πολυακρυλαμίδιο, το πολυδιμεθυλοακρυλαμίδιο ή η πολυδιμεθυλοακρυλαμίδιο-συν-Boc-β-αλανυλοακρυόλιο-εξαμεθυλενοδιαμίνη. Οι υποσχέσεις αυτών περιορίζονται από τη συμβατότητα του υποστηρίγματος με την πεπτιδική αλυσίδα.

Οι προηγηθείσες παράγραφοι δίνουν μια υπεραπλουστευμένη εικόνα των αδιάλυτων υποστηρίγμάτων που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση. Μία λεπτομερής συζήτηση της φυσικοχημείας αυτών των υλικών, των προβλημάτων διάχυσης, του φουσκάματος σε ποικίλους διαλύτες απαιτεί μια εκτενή επεξεργασία που δεν μπορεί να χωρέσει στα πλαίσια ενός σύντομου διδακτικού βιβλίου. Ο ενδιαφερόμενος αναγνώστης πρέπει να αναφερθεί σ'ένα περιεκτικό άρθρο ανασκόπησης των Barany και Merrifield (1980).

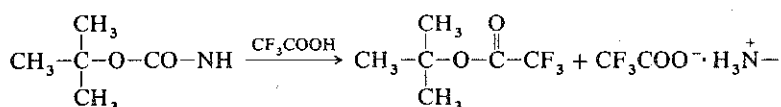
B. Απομάκρυνση των Προσωρινών Προστατευτικών Ομάδων

Μετά την πρόσδεση του προστατευμένου C-τελικού αμινοξέος στο αδιάλυτο πολυμερές υποστήριγμα πρέπει να απομακρυνθεί ή αμινο-προστατευτική ομάδα του για να επιτραπεί η εισαγωγή του επόμενου αμινοξέος, του προτελευταίου αμινοξέος του πεπτιδίου που πρόκειται να συντεθεί. Για μια σημαντικά μεγάλη χρονική περίοδο η όξινη διάσπαση εφαρμόστηκε σχεδόν αποκλειστικά γι'αυτό το σκοπό. Κατά συνέπεια έπρεπε να επιλεγούν προστατευτικές ομάδες με αυξημένη ευαισθησία στα οξέα και η *tert*-βουτυλοξυκαρβόνυλο (Boc)-ομάδα, χρησιμοποιηθείσα από τις πρώτες μέρες της σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεά φάση, διατηρήθηκε σχεδόν ως μονοπώλιο. Από καιρού εις καιρόν υποδείχθηκαν προστατευτικές ομάδες περισσότερο ευαίσθητες στα οξέα, όπως η διφαινυλοϊσοπροπυλοξυκαρβόνυλο (Bpoc), η φαινυλοϊσοπροπυλοξυκαρβόνυλο (Poc) ή η 3,5-διμεθοξυφαινυλοϊσοπροπυλοξυκαρβόνυλο (Ddz) ομάδα,



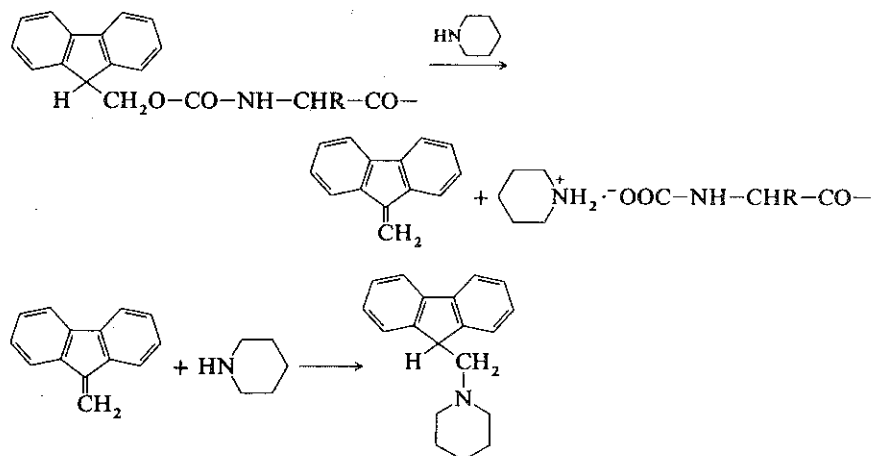
αλλά δεν έτυχαν ευρείας αποδοχής.

Το διάλυμα υδροχλωρικού οξέος σε οξικό οξύ, που χρησιμοποιήθηκε αρχικά για αποπροστασία, αντικαταστάθηκε βαθμηδόν από τριφθοροξικό οξύ. Εφόσον τα κοινώς χρησιμοποιούμενα πολυμερή δε φουσκάνουν αρκετά σε καθαρό τριφθοροξικό οξύ, ήταν απαραίτητο να αραιωθεί το αντιδραστήριο με ένα κατάλληλο διαλύτη, συνήθως διχλωρομεθάνιο. Πρέπει πάντως να δοθεί προσοχή σε μια δευτερεύουσα, αλλά όχι αμελητέα παράπλευρη αντίδραση, την αλκυλίωση ευαίσθητων παράπλευρων ομάδων από τον τριφθοροξικό-*tert*-βουτυλεστέρα που σχηματίζεται κατά την αντίδραση αποπροστασίας.



Επιπλέον, τα εναλλακτικά όξινα αντιδραστήρια, όπως το HCl σε μυρμηκικό οξύ, το μεθανοσουλφονικό οξύ, το *p*-τολουολοσουλφονικό οξύ σε διοξάνη ή το 2-μερκαπτοαιθανοσουλφονικό οξύ, το οποίο χρησιμεύει επίσης σαν παγίδα των ομάδων αλκυλίωσης, απέτυχαν να κερδίσουν την ευρύτερη αποδοχή.

Πιθανόν την πιο σημαντική εναλλακτική λύση έναντι της Boc-ομάδας και της όξινης διάσπασής της αποτελεί η χρήση αμινοπροστατευτικών ομάδων ευαίσθητων σε βάσεις. Η εφαρμογή της ο-νιτρο-φαινυλοσουλφενυλο (Nps) ομάδας, η οποία είναι ευαίσθητη στις θειούλες, επιδιώχθηκε επανειλημμένα, αλλά οι ερευνητές φαίνεται να απογοητεύτηκαν από τις περιπλοκές που σχετίζονται με την Nps μέθοδο. Ο περιορισμένος χρόνος ζωής των Nps αμινοξέων απαιτεί την αποθήκευσή τους με μορφή αλάτων, τα οποία πρέπει να μετατραπούν σε ελεύθερο οξύ πριν την σύζευξη. Επίσης η προστατευτική ομάδα θα μπορούσε να απομακρυνθεί πρόωρα από το 1-υδροξυβενζοτριάζολιο που είναι συχνά παρόν στο μίγμα της σύζευξης. Η αποδοχή της 9-φλουορενυλομεθυλοξυκαρβονυλο (Fmoc) ομάδας για την πεπτιδική σύνθεση σε στερεά φάση φάνηκε να είναι περισσότερο επιτυχής. Το αντιδραστήριο που προτιμάται στο στάδιο αποπροστασίας είναι ένα αραιό διάλυμα πιπεριδίνης σε διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF). Για να επιτευχθεί πλήρης αποπροστασία της αμινομάδας η αντίδραση αφήνεται να γίνει σε θερμοκρασία δωματίου για λίγα λεπτά και το στάδιο της διάσπασης επαναλαμβάνεται έπειτα για λίγο μεγαλύτερη χρονική περίοδο. Τα παραπροϊόντα της αντίδρασης, το διβενζοφουλβένιο και η τριτοταγής αμίνη που σχηματίζεται με προσθήκη της πιπεριδίνης στο διπλό δεσμό του



εκπλένονται εύκολα με DMF. Το πιπεριδινικό άλας του καρβαμιδικού οξέος που παράγεται κατά την αντίδραση διασπάται αυθόρμητα και δίνει πιπεριδίνη, διοξειδίο του άνθρακα και την ελεύθερη αμίνη:



Επομένως δε χρειάζεται μετατροπή των αλάτων σε ελεύθερες αμίνες όπως γίνεται κατά την αποπροστασία των ευαίσθητων σε οξέα προστατευτικών ομάδων και το πυρηνόφιλο είναι έτοιμο, όπως σχηματίζεται, για την επόμενη αντίδραση σύζευξης. Αυτό προκαλεί

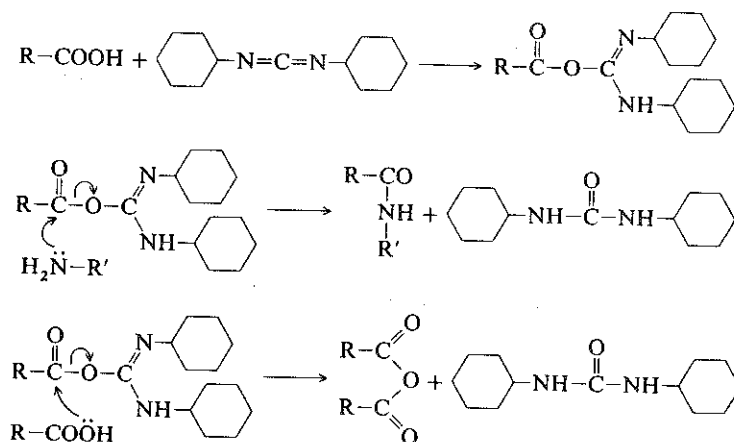
μεγάλη απλούστευση της διαδικασίας. Ο αριθμός των σταδίων έκπλυσης μειώνεται περαιτέρω από το γεγονός ότι και η σύζευξη και η αποπροστασία γίνονται στον ίδιο διαλύτη, το DMF. Το κύριο πλεονέκτημα της προσωρινής προστασίας με την Fmoc ομάδα είναι εντούτοις η ευκαιρία για χρήση ημιμόνιμων προστατευτικών ομάδων που βασίζονται στο σχηματισμό του τετ.βουτυλοκατιόντος. Ο ορθογωνικός αυτός συνδυασμός εξαλείφει αρκετές ατέλειες της μεθόδου που χρησιμοποιεί ρητίνη Merrifield και Boc προστασία. Για παράδειγμα αποφεύγονται ο κίνδυνος αλκυλίωσης και η ανάγκη δραστικών όξινων συνθηκών στο τελικό στάδιο αποπροστασίας-διαχωρισμού από τη ρητίνη. Φυσικά απαιτείται ένα τροποποιημένο πολυμερικό υποστήριγμα με έναν μη ευαίσθητο σε βάσεις δεσμό σύνδεσης που μπορεί να διασπασθεί σε ήπιες συνθήκες, για παράδειγμα με τριφθοροξικό οξύ.

Γ. Σύζευξη: Ακυλίωση του Συνδεδεμένου με τη Ρητίνη Αμινο-συστατικού.

Αν κάνουμε μια επισκόπηση των μεθόδων σύζευξης που προτάθηκαν για εφαρμογή στην πεπτιδική σύνθεση στερεάς φάσης προκύπτει ότι δοκιμάστηκαν οι περισσότερες γνωστές μέθοδοι σχηματισμού πεπτιδικού δεσμού, αλλά δε σχεδιάστηκε καμιά νέα μέθοδος ειδικά για την ακυλίωση του συνδεδεμένου με το πολυμερές αμινο-συστατικού. Γι' αυτό θα περιορίσουμε τη συζήτηση σ' αυτό το κεφάλαιο σε δύο καλά μελετημένες μεθόδους, τη σύζευξη με τη βοήθεια των καρβοδιϊμιδίων και την ακυλίωση μέσω ενεργών εστέρων.

Από την αρχή της εισαγωγής της μεθόδου στερεάς φάσης το δικυκλοεξυλκαρβοδιϊμίδιο (DCC) θεωρήθηκε το κατά προτίμηση αντιδραστήριο σύζευξης και εφαρμόζεται ακόμη στην πλειοψηφία των συνθέσεων. Η εύκολη διάθεση του αντιδραστηρίου σε χαμηλή τιμή είναι μόνον ο μικρότερος λόγος της ευρείας χρήσης του. Ένα πιο σημαντικό χαρακτηριστικό της μεθόδου είναι η γρήγορη πορεία ενεργοποίησης και σύζευξης αν και οι γρήγορες ταχύτητες που παρατηρήθηκαν με το αμινο- και με το καρβοξυλοσυστατικό σε διάλυμα δεν αναπαράγονται πλήρως με συνδεδεμένα σε πολυμερή αμινοσυστατικά. Το πλέγμα της ρητίνης δρα συγχρόνως σαν αραιωτικό και σαν στερικός παρεμποδιστής/ Παρ'όλα αυτά οι ταχύτητες αντίδρασης παραμένουν ικανοποιητικές. Αυτή είναι μια σημαντική παραδοχή, γιατί στην αυτοματοποιημένη σύνθεση στερεάς φάσης μεγάλων πεπτιδικών αλυσίδων μερικές φορές ενσωματώνονται μισή ντουζίνα ή και περισσότερα αμινοξέα σε 24 ώρες. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα της ακυλίωσης με DCC είναι η ευκολία με την οποία το παραπροϊόν N,N'-δικυκλοεξυλουρία (DCU) απομακρύνεται από το σύστημα. Όταν η σύζευξη γίνεται σε διάλυμα το DCU, το οποίο είναι δυσδιάλυτο στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες, απομακρύνεται με διήθηση. Στην τεχνική της στερεάς φάσης θα περίμενε κανείς τη συσσώρευσή του μεταξύ και εντός των μορίων της ρητίνης. Πλύσιμο με αιθανόλη θα απομάκρυνε το παραπροϊόν αλλά ακόμη κι αυτό δε χρειάζεται διότι το μίγμα τριφθοροξικού οξέος-διχλωρομεθανίου που χρησιμοποιείται για την αποπροστασία είναι ένας εξαιρετικά καλός διαλύτης του DCU. Σε μερικά εργαστήρια βελτιώνουν επιπλέον αυτή την μέθοδο εφαρμόζοντας διΐσοπροπυλοκαρβοδιϊμίδιο αντί του DCC, αφού η N,N'-διΐσοπροπυλουρία είναι πιο διαλυτή από το DCU.

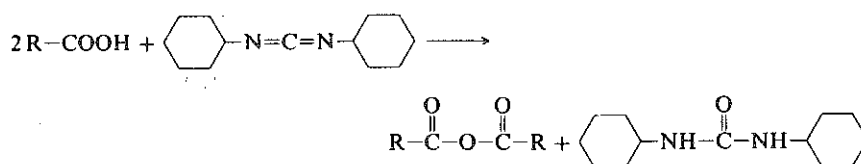
Ο κλασικός τρόπος σύζευξης με τη βοήθεια του DCC (Sheehan and Hess 1955) είναι να προσθέσουμε ένα mole του αντιδραστηρίου σε ένα διάλυμα που περιέχει ισομοριακές ποσότητες των δύο συστατικών που πρόκειται να ενωθούν με έναν πεπτιδικό δεσμό. Αυτός ο τρόπος σύζευξης αντιδραστηρίων δεν είναι κατάλληλος για τη σύνθεση σε στερεά φάση. Κατά τη διάρκεια σχηματισμού του το ενδιάμεσο παράγωγο της Ο-ακυλοϊσοουρίας προσβάλλεται από το αμινο-συστατικό, αλλά ακόμη πιο εύκολα προσβάλλεται από μη αντιδράσαντα μόρια του καρβοξυλο-συστατικού. Αυτός ο δεύτερος τρόπος αντίδρασης δίνει ένα συμμετρικό ανυδρίτη, ένα καλό ακυλιωτικό μέσο από μόνο του, αλλά δεν επιτρέπει στο μισό DCC να αντιδράσει.



Καθώς ο συμμετρικός ανυδρίτης ακυλιώνει το αμινο-συστατικό, ελευθερώνεται ένα ισοδύναμο του καρβοξυλο συστατικού και αντιδρά στη συνέχεια με το ακόμη διαθέσιμο DCC. Επομένως το DCC και το ενδιάμεσο παράγωγο της Ο-ακυλοϊσοουρίας χρησιμοποιούνται πλήρως, αλλά μόνο *σταδιακά*. Επιπλέον τα πολύ δραστικά παράγωγα της Ο-ακυλοϊσοουρίας εάν δεν προσβληθούν από ένα πυρηνόφιλο υφίστανται ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσβολή (βλ. Κεφάλαιο V) και προκύπτουν παράγωγα της σταθερής Ν-ακυλοουρίας. Αυτή είναι μόνο μια από τις παράπλευρες αντιδράσεις (βλ. Κεφάλαιο VII) που ακολουθούν τα μακράς ζωής πολύ ενεργοποιημένα ενδιάμεσα παράγωγα. Αυτή η μέθοδος σύζευξης επομένως δεν είναι ιδανική για συνθέσεις που γίνονται σε διάλυμα και ακόμη λιγότερο για συνθέσεις σε στερεά φάση όπου το αμινο-συστατικό είναι δεμένο στη ρητίνη και έτσι λιγότερο εύκολα διαθέσιμο. Μια τεχνική στην οποία η ελεύθερη αμινομάδα της πεπτιδικής ρητίνης μετατρέπεται πρώτα σε *άλας* του προστατευμένου αμινοξέος που πρόκειται να ενσωματωθεί και μετά κατεργάζεται με DCC έδωσε σχετικά καλά αποτελέσματα, πιθανόν γιατί η ενεργοποίηση ακολουθείται αμέσως από την προσβολή της αμινομάδας που κρατείται κοντά λόγω του ζεύγους ιόντων.

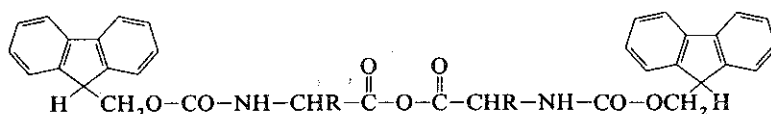
Μια σημαντική βελτίωση της σύζευξης μέσω του DCC έγινε με χρήση του αντιδραστηρίου στη μορφή συμμετρικού ανυδρίτη. Αυτό σημαίνει ότι ένα ισοδύναμο του αντιδραστηρίου σύζευξης προστίθεται σ' ένα διάλυμα που περιέχει δύο ισοδύναμα του

προστατευμένου αμινοξέος:



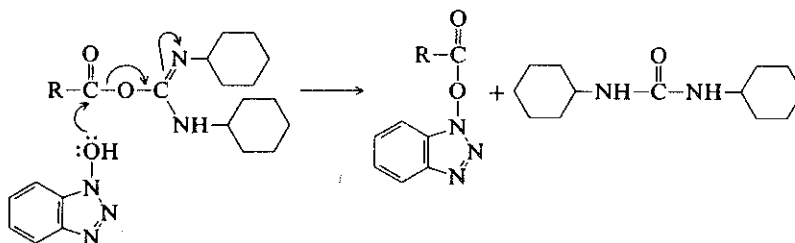
Η προσβολή του καρβοξυλο-συστατικού επί του ενδιάμεσου παραγώγου της Ο-ακυλοΐσοουρίας είναι εύκολη και δεν εμποδίζεται από το πολυμερές. Στην πραγματικότητα ο συμμετρικός ανυδρίτης μπορεί πρώτα να δημιουργηθεί σε διάλυμα και αν είναι επιθυμητό να απομακρυνθεί πριν από την προσθήκη του ακυλιωτικού μίγματος στο συνδεδεμένο με τη ρητίνη αμινο-συστατικό. Μ' αυτόν τον τρόπο σύζευξης μειώνεται σημαντικά ο χρόνος ζωής της πολύ δραστήριας Ν-ακυλοΐσοουρίας με ταυτόχρονη μείωση της έκτασης των παράπλευρων αντιδράσεων, όπως ο σχηματισμός της Ν-ακυλοουρίας. Η μέθοδος του συμμετρικού ανυδρίτη, που μέχρι πρόσφατα θεωρούνταν πολύ ακριβή, έγινε αρκετά δημοφιλής τα τελευταία χρόνια λόγω της ελάττωσης της τιμής των Boc-αμινοξέων.

Σ' αυτό το σημείο θα έπρεπε να αναφερθεί ότι οι συμμετρικοί ανυδρίτες βενζυλοξυκαρβονυλο και τετ-βουτυλοξυκαρβονυλο αμινοξέων απομονώθηκαν σε κρυσταλλική μορφή αλλά δε διατίθενται στο εμπόριο, πιθανόν λόγω του περιορισμένου χρόνου ζωής τους. Η κατάσταση φαίνεται να είναι διαφορετική με τους συμμετρικούς ανυδρίτες των Fmoc αμινοξέων.



οι οποίοι φαίνεται ότι είναι αρκετά σταθεροί.

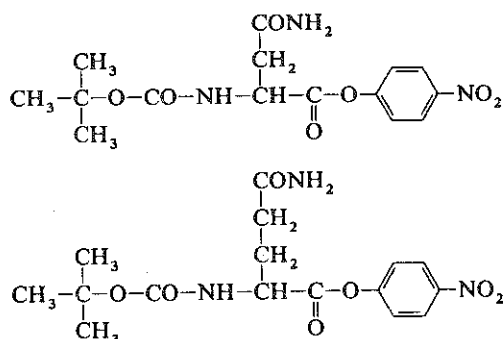
Ο χρόνος ζωής των πολύ δραστηκών ενδιάμεσων παραγώγων που προκύπτουν κατά την αντίδραση με DCC μπορεί να περιοριστεί επίσης με την προσθήκη του ισχυρού βοηθητικού πυρηνόφιλου 1-υδροξυ-βενζοτρίαζολίου (HOBt). Η εξαιρετική ικανότητα ακυλίωσης των ενεργών εστέρων που δημιουργούνται



έχει συζητηθεί στο Κεφάλαιο V.

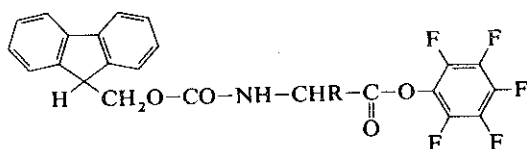
Απομονωμένοι, σταθεροί ενεργοί εστέρες έχουν χρησιμοποιηθεί στην πεπτιδική σύνθεση στερεά φάσης, αλλά η βελτίωση που επιτεύχθηκε όσον αφορά την ομοιογένεια

των προϊόντων ισοφαρίσθηκε από τον πολύ χρόνο που απαιτείται για συμπλήρωση της αντίδρασης ακυλίωσης. Μόνον οι p-νιτροφαινυλεστέρες της Boc-ασπαραγίνης και γλουταμίνης βρήκαν ευρεία εφαρμογή. Με τη βοήθειά τους μπορεί να αποφευχθεί η αντίδραση αφυδάτωσης που συμβαίνει κατά την ενεργοποίηση με DCC. Κατά την ακυλίωση με τους καθαρούς ενεργούς εστέρες

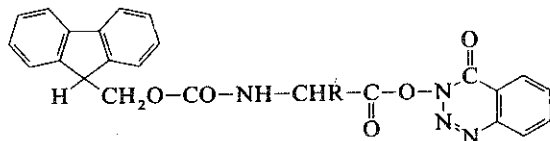


δε συμβαίνει ενσωμάτωση β-κυανοαλανίνης ή γ-κυανο-α-αμινοβουτυρικού οξέος.

Καλλίτερες ταχύτητες αντίδρασης παρατηρήθηκαν με τους πιο δραστικούς ο-νιτροφαινυλεστέρες, εν μέρει γιατί είναι λιγότερο ευαίσθητοι σε στερεοχημική παρεμπόδιση από τα p-υποκατεστημένα ανάλογά τους. Ο όγκος των ενεργών ομάδων καθιστά τους N-υδροξυηλεκτριμιδεστέρες και τους πενταχλωροφαινυλεστέρες λιγότερο κατάλληλους για ακυλίωση εντός του πλέγματος του πολυμερούς απ' ό,τι σε διάλυμα. Μόνον η εισαγωγή των ενεργών πενταφθοροφαινυλεστέρων οδήγησε σε αναβίωση της ιδέας των ενεργών εστέρων στη πρακτική της σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεά φάση. Οι πενταφθοροφαινυλεστέρες των Fmoc αμινοξέων



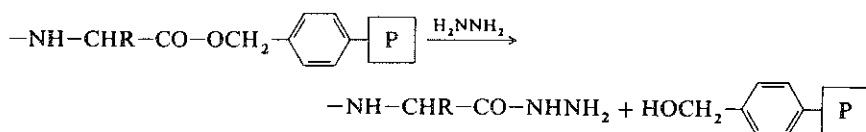
διατίθενται τώρα στο εμπόριο και χρησιμοποιούνται συχνά. Παρόμοια αποτελεσματικοί είναι οι εστέρες της 3-υδροξυ-3,4-διϋδρο-1,2,3-βενζοτριαζινο-4-όνης



Πρακτικές ταχύτητες ακυλίωσης μπορούν να επιτευχθούν επίσης με τους λιγότερο δραστικούς p-νιτροφαινυλεστέρες μέσω κατάλυσης με 3-υδροξυ-3,4-διϋδροκινναζολινο-4-όνη σε διμεθυλοφορμαμίδιο, ιδιαίτερα παρουσία μιάς τριτοταγούς αμίνης.

Δ. Διαχωρισμός του Τελικού Πεπτιδίου από το Πολυμερικό Υποστήριγμα και Τελική Αποπροστασία.

Τα δύο στάδια που αναφέρονται στον τίτλο αυτού του κεφαλαίου δε γίνονται απαραίτητα με τον ίδιο χειρισμό. Για παράδειγμα ένα συμπληρωμένο τμήμα μιάς μεγάλης πεπτιδικής αλυσίδας μπορεί να διαχωριστεί από το υποστήριγμα, ακόμη στην προστατευμένη μορφή, με υδραζινόλυση

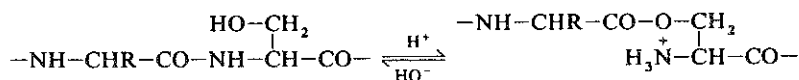


και το πεπτιδικό υδραζίδιο να χρησιμοποιηθεί, μετά τη μετατροπή του σε αζίδιο, για την ακυλίωση της αμινομάδας ενός δεύτερου τμήματος της αλυσίδας. Ομοίως όταν κατά την αμμωνιόλυση του εστερικού δεσμού πρόσδεσης παράγονται αμίδια των πεπτιδίων, η διάσπαση του δεσμού μεταξύ του πεπτιδίου και της ρητίνης γίνεται χωρίς τελική αποπροστασία. Εντούτοις στις περισσότερες συνθέσεις εφαρμόζεται επίδραση οξέων και για τη διάσπαση του δεσμού σύνδεσης και για την απομάκρυνση των ημιμόνιμων προστατευτικών ομάδων από τις παράπλευρες ομάδες. Μια ευαίσθητη σε οξέα προστατευτική ομάδα στην N-τελική αμινομάδα επιτρέπει την πλήρη αποπροστασία με ένα χειρισμό.

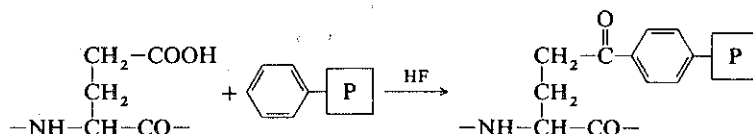
Ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος συνδυασμός προστατευτικών ομάδων, Boc για την παροδική προστασία των α-αμινομάδων και βενζυλο παράγωγα ή άλλες σχετικά ανθεκτικές σε οξέα ομάδες για την ημιμόνιμη προστασία παράπλευρων δραστικών ομάδων, μαζί με έναν τύπου βενζυλεστέρα δεσμό σύνδεσης, επιτρέπουν μικρή δυνατότητα επιλογής στο τελικό στάδιο. Η υδρογονόλυση μπορεί να γίνει, αλλά όχι πάντα με πλήρη επιτυχία. Ο εμποτισμός της ρητίνης με ένα διάλυμα οξικού παλλαδίου ακολουθούμενος από υδρογόνωση έχει σαν αποτέλεσμα την καλή διασπορά του μετάλλου μέσα στην πηκτή και έτσι γίνεται δυνατή η καταλυτική αναγωγή. Η ταχύτητα της αντίδρασης όμως δεν είναι ικανοποιητική και η πορεία πρέπει να εκτελείται σε υψηλή πίεση και θερμοκρασία. Επομένως για τον κρίσιμο χειρισμό της τελικής αποπροστασίας ο ερευνητής πρέπει να διαλέξει μεταξύ των διαφόρων όξινων αντιδραστηρίων, που είναι όλα ισχυρά οξέα.

Κατά την πρώτη περίοδο ανάπτυξης της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεά φάση χρησιμοποιήθηκε το υδροβρωμικό οξύ σε τριφθοροξικό οξύ συχνά με καλά αποτελέσματα. Μερικές όμως προστατευτικές ομάδες παράπλευρων αλυσίδων, όπως η νιτροομάδα ή η p-τολουολοσουλφονυλο-ομάδα που χρησιμοποιήθηκαν για την προστασία της γουανιδινομάδας ή η S-βενζυλομάδα της παράπλευρης αλυσίδας της κυστεΐνης αντιστέκονται πολύ σ' αυτό το αντιδραστήριο, πιθανόν γιατί το HBr διαλύεται μετρίως στο τριφθοροξικό οξύ και ακόμη και συνεχής εισαγωγή του αερίου δεν πετυχαίνει να το προμηθεύσει με συγκεντρώσεις HBr συγκρίσιμες με τις αντίστοιχες σε οξικό οξύ (Δυστυχώς το τελευταίο δεν είναι κατάλληλο γιατί η αποπροστασία με HBr σε οξικό οξύ συνοδεύεται από μερική O-ακετυλίωση της παράπλευρης αλυσίδας της σερίνης). Η χρήση υγρού υδροφθορίου σαν όξινο αντιδραστήριο (Sakakibara and Shimonishi 1965) έδωσε μεγάλη

ώθηση στην τεχνική της στερεάς φάσης. Το αέριο συμπυκνώνεται σ' ένα δοχείο από τefλόν το οποίο περιέχει την πεπτιδυλορητίνη. Το υγρό HF διαπερνά τους πόρους του πολυμερικού υλικού, διασπά το δεσμό μεταξύ του πεπτιδίου και του πολυμερούς και διαλύει το ελευθερούμενο πεπτίδιο. Την ίδια ώρα απομακρύνονται και οι βενζυλεστέρες, οι βενζυλαιθέρες και οι βενζυλοξυκαρβονυλομάδες των παράπλευρων αλυσίδων, συνήθως σε λιγότερο από 20 λεπτά στους 0°C. Σ' αυτές τις συνθήκες βενζυλομάδες υποκατεστημένες με άτομα ή ομάδες που έλκουν ηλεκτρόνια δε διασπώνται και το ίδιο συμβαίνει και για άλλες σχετικά σταθερές στα οξέα προστατευτικές ομάδες. Έτσι, για την απομάκρυνση των νιτρομάδων ή των p-τολουολοσουλφονυλο ομάδων από τις παράπλευρες αλυσίδες της αργινίνης και των S-βενζυλομάδων από τις παράπλευρες αλυσίδες της κυστεΐνης η αποπροστασία πρέπει να γίνει σε θερμοκρασία δωματίου και ο χρόνος αντίδρασης επεκτάθηκε στη μια ώρα. Σ' αυτές τις συνθήκες μια σημαντική παράπλευρη αντίδραση πρέπει να αναφερθεί δηλαδή η καλά γνωστή $N \rightarrow O$ ακυλο-μετάθεση στα αμινοξέα της σερίνης:



Η ανεπιθύμητη αυτή μετάθεση μπορεί να αντιστραφεί με κατεργασία του προϊόντος με όξινο ανθρακικό νάτριο σε νερό, αλλά τότε συμβαίνει σε κάποιο βαθμό και υδρόλυση. Αρκετές άλλες ατέλειες της μεθόδου είναι γνωστές, όπως η από το HF καταλυόμενη αντίδραση Friedel-Crafts μεταξύ των γ-καρβοξυλικών ομάδων των γλουταμινικών αμινοξέων και των αρωματικών πυρήνων του πολυμερούς:



Η παράπλευρη αυτή αντίδραση είναι αβλαβής γιατί το παραπροϊόν συνδέεται μη αντιστρεπτά με το πολυμερές και επηρεάζεται μόνον η απόδοση και όχι η καθαρότητα του συνθετικού πεπτιδίου. Πιο ενοχλητικός είναι ο σχηματισμός ηλεκτριμυδο δακτυλίου στα ασπαραγινικά παράγωγα που εκτίθενται στο HF. Η αλκυλίωση του ινδολικού δακτυλίου της τρυπτοφάνης, της φαινολικής παράπλευρης αλυσίδας της τυροσίνης και του ατόμου θείου της μεθειονίνης μπορεί να περιορισθεί με την προσθήκη παγίδων. Η συχνά χρησιμοποιούμενη ανισόλη δεν είναι τελείως κατάλληλη γι' αυτό το ρόλο: μπορεί να αποτελέσει την πηγή μεθυλομάδων οι οποίες μετατρέπουν τον θειοαιθέρα της μεθειονίνης σε ένα τριτοταγές θούλφονικό παράγωγο. Η σταθερή σε οξέα θειοανισόλη φαίνεται να είναι καλλίτερη παγίδα.

Μερικές βελτιώσεις σημειώθηκαν σε μια δύο σταδίων διαδικασία διάσπασης, κατά την οποία αρχικά χρησιμοποιείται HF αραιωμένο με διμεθυλοσουλφίδιο και στη συνέχεια εφαρμόζεται καθαρό υδροφθόριο.

Παρόλα τα μειονεκτήματα το υγρό υδροφθόριο είναι σαφώς ένα αποτελεσματικό αντιδραστήριο για το τελικό στάδιο της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεάς φάση: αποδεί-

χθηκε πολύ χρήσιμο σε πολλά εργαστήρια. Φυσικά εκτός από την προφύλαξη που απαιτείται κατά την εργασία με την επικίνδυνη αυτή ουσία πρέπει να δίνεται προσοχή στα πιθανά παραπροϊόντα του υλικού που διαχωρίζεται από το αδιάλυτο υποστήριγμα. Ευτυχώς με τις βελτιωμένες μεθόδους χρωματογραφίας έγινε δυνατόν να λαμβάνονται καθαρά πεπτίδια ακόμη και από εξαιρετικά πολύπλοκα μίγματα. Παρόλα αυτά το HF δεν είναι πιθανώς το τέλειο αντιδραστήριο για τη σύνθεση ευαίσθητων πεπτιδικών αλυσίδων. Η χρήση ενός διαλύματος τριφθορομεθανοσουλφονικού οξέος σε τριφθοροξικό οξύ παρουσία κρεσόλης είναι πιο εύκολη γιατί δεν απαιτείται καμιά ειδική συσκευή: η αντίδραση μπορεί να γίνει σε γυάλινα σκεύη. Εντούτοις μ' αυτό το ισχυρό όξινο αντιδραστήριο πρέπει κανείς να είναι προετοιμασμένος ότι θα παρατηρήσει μερικές τουλάχιστον απ' τις παράπλευρες αντιδράσεις που αναφέρθηκαν κατά τη χρήση του υγρού υδροφθορίου. Θα έπρεπε επίσης να υπενθυμισθεί ότι η όξινη διάσπαση έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία αλάτων των αμινών. Επομένως τα πεπτίδια που λαμβάνονται μετά το διαχωρισμό από το πολυμερικό υποστήριγμα είναι άλατα του υδροφθορίου, του τριφθορομεθανοσουλφονικού οξέος κλπ. Εάν τα οξικά ή τριφθοροξικά άλατα είναι πιο επιθυμητά, τότε η απόσπαση από τη ρητίνη πρέπει να ακολουθείται από κατεργασία με ένα κατάλληλο ιοντο-ανταλλακτικό υλικό.

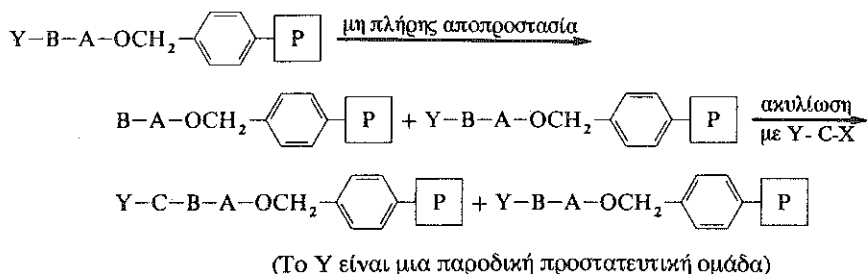
Ο ορθογωνικός συνδυασμός που ήδη αναφέρθηκε της 9-φλουορενυλομεθυλοξυκαρβονυλο (Fmoc) ομάδας για την παροδική προστασία των α-αμινομάδων με ομάδες που σχηματίζουν tert-βουτυλοκατιόντα για την ημιμόνιμη προστασία των παράπλευρων δραστικών ομάδων είναι αρκετά αποτελεσματικός για την πεπτιδική σύνθεση στερεάς φάσης. Με ευαίσθητη σε οξέα σύνδεση που βασίζεται στους p-αλκοξυ-υποκατεστημένους βενζυλεστέρες ή στις βενζυδρυλαμίνες η τελική αποπροστασία και διάσπαση του δεσμού πεπτιδίου-ρητίνης μπορεί να επιτευχθεί σε ένα στάδιο με επίδραση τριφθοροξικού οξέος. Για την ικανοποιητική διόγκωση του πολυμερούς απαιτείται ένας επιπλέον διαλύτης, όπως το διχλωρομεθάνιο και θα πρέπει να χρησιμοποιούνται παγίδες για να περιορισθεί η tert-βουτυλίωση που προκαλείται από τους τριφθοροξικούς tert-βουτυλεστέρες που δημιουργούνται κατά την αντίδραση αποπροστασίας. Ο Fmoc-tert-βουτυλο συνδυασμός αντιπροσωπεύει μια μεγάλη βελτίωση έναντι της μη ορθογωνικής προσέγγισης, η οποία απαιτεί δραστική όξινη διάσπαση στο τελικό στάδιο.

Ε. Μερικά Προβλήματα που Συναντώνται στην Πεπτιδική Σύνθεση Στερεάς Φάσης

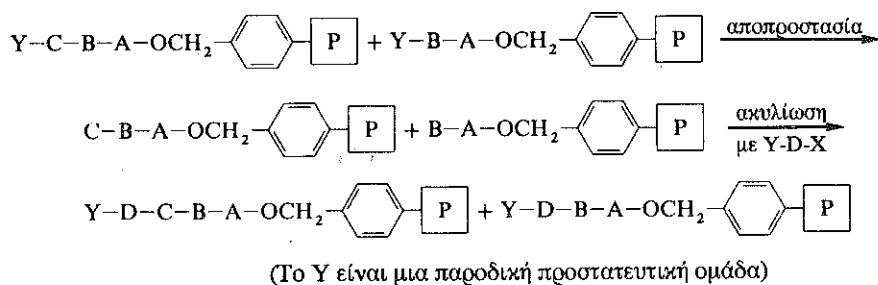
Οι παράπλευρες αντιδράσεις και οι ατέλειες που συζητήθηκαν σ' αυτό το κεφάλαιο δεν περιορίζονται στη μέθοδο της στερεάς φάσης. Συμβαίνουν και στις συνθέσεις που γίνονται σε διάλυμα, αλλά μάλλον λιγότερο συχνά. Το πλέγμα του πολυμερικού υποστηρίγματος εμποδίζει την ακυλίωση και την αποπροστασία και εάν αυτές οι αντιδράσεις τερματισθούν πρόωρα θα σχηματισθούν παραπροϊόντα τα οποία θα προστεθούν στο τελικό συνθετικό προϊόν. Τα ανάλογα παραπροϊόντα που σχηματίζονται σε διάλυμα αναγνωρίζονται εύκολα και μπορούν να απομακρυνθούν όταν τα ενδιάμεσα παράγωγα απομονώνονται και καθαρίζονται. Η πιθανότητα αυτή είναι πρακτικά αδύνατη στη μέθοδο της στερεάς σύνθεσης και γι' αυτό είναι απαραίτητο να αναφερθούν αυτά τα προβλήματα.

2. Ελλιπής αλληλουχία

Ανεξάρτητα από τη μέθοδο που ακολουθείται η αποπροστασία και η ακυλίωση πρέπει να γίνονται πλήρως. Στη σύνθεση στερεάς φάσης είναι πραγματικά επιτακτική ανάγκη να αποπροστατεύονται ακόμη και τα τελευταία ίχνη της τελικής αμινομάδας. Εάν λιγότερο από το πλήρες ποσό του αμινο-συστατικού διατίθεται για ακυλίωση τότε στην επακόλουθη ενσωμάτωση του επόμενου αμινοξέος παράγονται δύο προστατευμένα πεπτίδια:



Στον επόμενο κύκλο η ομάδα Y απομακρύνεται και ενσωματώνεται το προστατευμένο αμινοξύ D. Μ'αυτόν τον τρόπο παράγονται δύο προστατευμένα ενδιάμεσα πεπτίδια:

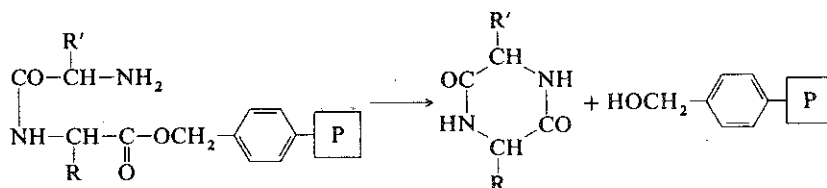


Στο δεύτερο από αυτά λείπει το αμινοξύ C, έχει δηλαδή "ελλιπή αλληλουχία". Η εικόνα περιπλέκεται περαιτέρω εάν συμβαίνει μη πλήρης αποπροστασία σε αρκετούς ή και σε όλους τους κύκλους κατά τη διαδικασία επιμήκυνσης της αλυσίδας. Γι' αυτό πρέπει να επιμένει κανείς στην πλήρη αποπροστασία ακόμη και με το κόστος της παράτασης του χρόνου αντίδρασης. Λόγω του κινδύνου παράπλευρων αντιδράσεων, όπως η ακυλίωση, κατά τη διάρκεια της αντίδρασης αποπροστασίας θα ήταν προτιμότερο να χρησιμοποιηθεί πρώτα ένας μάλλον σύντομος χρόνος αποπροστασίας και να απομακρυνθούν οι βλαβερές ουσίες που παράγονται κατά την πορεία. Μετά η αποπροστασία επαναλαμβάνεται, αυτή τη φορά για ένα μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

Οι συνέπειες της μη πλήρους ακυλίωσης είναι αρκετά όμοιες. Εάν ένα κλάσμα του συνδεδεμένου στη ρητίνη διπεπτιδίου B—A δεν ακυλωθεί κατά την ενσωμάτωση του αμινοξέος C, τότε μετά την επόμενη αποπροστασία και επιμήκυνση με το (προστατευμένο) αμινοξύ D, το ενδιάμεσο παράγωγο Y-D-C-B-A θα περιέχει και το "ελλιπές πεπτίδιο" Y-D-B-A. Αυτή η περιπλοκή είναι ιδιαίτερα πιθανόν να συμβεί κατά

την ακυλίωση με παράγωγα της βαλίνης και ισολευκίνης. Μερικές αμινομάδες φαίνεται να βρίσκονται σε απομονωμένες περιοχές του πλέγματος του πολυμερούς και εμποδίζονται επιπλέον από την αυξανόμενη πεπτιδική αλυσίδα. Τέτοιες αμινομάδες είναι απρόσιτες σε ογκώδη ακυλιωτικά μέσα και παραμένουν αναλλοίωτες ακόμη και σε ισορροπία. Μια μερική λύση του σχηματισμού ελλειπών αλληλουχιών μπορεί να βρεθεί στο σκόπιμο τερματισμό των αλυσίδων με μη δραστικό N-τέλος. Μη ογκώδη ακυλιωτικά αντιδραστήρια όπως ο οξικός ανυδρίτης, ο οξικός *p*-νιτροφαινυλεστέρας ή το ακετυλοϊμιδαζόλιο μπορούν να φθάσουν στις κρυμένες αμινομάδες. Οι έτσι τερματιζόμενες αλυσίδες είναι πολύ πιο διαφορετικές από την προς σύνθεση ένωση από ότι οι αλυσίδες με ελλιπή αλληλουχία και επομένως διαχωρίζονται πιο εύκολα από αυτήν. Έχουν προταθεί αρκετά πολύπλοκα ακυλιωτικά μέσα για να διευκολύνουν την απομόνωση προστατευμένων αλυσίδων από το κύριο προϊόν. Έγχρωμες ακυλομάδες παρέχουν απλό ορατό έλεγχο κατά το διαχωρισμό των πεπτιδίων, ομάδες με ιονικές ιδιότητες επιτρέπουν την απόσπαση των προστατευμένων αλυσίδων με τη βοήθεια ιοντο-ανταλλακτών. Στη γενική πρακτική της πεπτιδικής σύνθεσης στερεάς φάσης εφαρμόζεται μόνον η ακετυλίωση.

Μια ειδική περίπτωση "ελλιπούς αλληλουχίας" είναι η ταυτόχρονη απώλεια δύο αμινοξέων, του αμινοξέος που είναι προσκολλημένο μέσω ενός εστερικού δεσμού στο πολυμερές μαζί με το προηγούμενο αμινοξύ. Η γνωστή τάση των διπεπτιδικών εστέρων για κυκλοποίηση είναι υπεύθυνη γι'αυτήν την παράπλευρη αντίδραση. Η απόσπαση των δύο αμινοξέων σαν μια δικετοπιπεραζίνη,



αφήνει το συμπολυμερές στυρολίου-διβινυλοβενζολίου με τη μορφή του υδροξυμεθυλο παραγώγου που ακυλιώνεται κατά την ενσωμάτωση του τρίτου αμινοξέος. Σα συνέπεια αρχίζει μια νέα αλυσίδα από την οποία λείπουν το C-τελικό αμινοξύ και το προηγούμενό του. Αυτή η παράπλευρη αντίδραση που συμβαίνει συνήθως σε μικρό βαθμό είναι πιο σημαντική όταν περιλαμβάνεται γλυκίνη ή προλίνη. Ο σχηματισμός της δικετοπιπεραζίνης μπορεί να διατηρηθεί σ'ένα παραδεκτό επίπεδο αποφεύγοντας καθυστερήσεις μετά την αποπροστασία της διπεπτιδυλο ρητίνης και δημιουργώντας ευνοϊκές συνθήκες για την ενσωμάτωση του τρίτου αμινοξέος. Αυτό πρέπει να προστεθεί με τη μορφή ενός πολύ δραστικού παραγώγου και σε υψηλή συγκέντρωση.

Είναι δύσκολο να προβλεφθούν όλες οι πιθανές ατέλειες της πορείας επιμήκυνσης της αλυσίδας και ακόμη πιο προβληματικό να βρεθούν τέλειες λύσεις για τις ανεπιθύμητες παράπλευρες αντιδράσεις. Γι'αυτό πρέπει κανείς να καταφύγει σε έλεγχο της συμπλήρωσης των διαφόρων σταδίων. Η τιτλοδότηση των απροστάτευτων αμινομάδων με ένα ισχυρό οξύ, για παράδειγμα υπερχλωρικό οξύ, έχει προταθεί σαν μια μέθοδος με την οποία η πορεία της αποπροστασίας και της ακυλίωσης μπορεί να ελεγχθεί. Κατά την ακυλίωση με ενεργούς εστέρες η απορρόφηση της αποσπώμενης

ουσίας (π.χ. p-νιτροφαινόλη) στο υπεριώδες μπορεί να χρησιμοποιηθεί για έλεγχο. Οι εστέρες της 3-υδροξυ-3,4-διϋδρο-1,2,3-βενζοτριαζίνης δίνουν ένα κίτρινο χρώμα που οφείλεται στο ενολικό άλας της αμίνης. Εφόσον η ακυλίωση του τελευταίου είναι πλήρης το χρώμα της ρητίνης εξαφανίζεται. Στα περισσότερα εργαστήρια όμως το τελικό σημείο αποδεικνύεται με κατεργασία ενός μικρού δείγματος του πεπτιδυλο πολυμερούς με νινυδρίνη. Ένα θετικό τεστ προκαλεί επανάληψη του σταδίου σύζευξης. Εξίσου αποτελεσματική είναι και η ανίχνευση των ελεύθερων αμινομάδων με μπλέ της βρωμοφαινόλης. Φαίνεται ότι η πεπτιδική σύνθεση στερεάς φάσης θα μπορούσε να αυτοματοποιηθεί πλήρως μόνον εάν η διαδικασία περιελάμβανε αναλυτικό έλεγχο της αποπροστασίας και της σύζευξης. Σήμερα τα όργανα που διατίθενται στο εμπόριο δεν έχουν τη δυνατότητα να το κάνουν αυτό. Αντιθέτως οι αυτόματοι αναλυτές αμινοξέων ανιχνεύουν εύκολα την παρουσία "ελλιπών αλληλουχιών" στο τελικό συνθετικό προϊόν: η πρόωγη εμφάνιση ενός αμινοξέος, δηλαδή η εμφάνισή του έναν κύκλο νωρίτερα από ότι θα αναμένονταν, είναι σαφής ένδειξη ότι το αμινοξύ αυτό έχει αφαιρεθεί από την αλληλουχία.

Αναφορές

- Bodanszky, M., du Vigneaud, V.: *Nature*, 183, 1324 (1959)
 Letsinger, R.L., Kornet, M.J.: *J. Amer. Chem. Soc.* 85, 3045 (1963)
 Merrifield, R.B.: *J. Amer. Chem. Soc.* 85, 2149 (1963)
 Merrifield, R.B.: *J. Amer. Chem. Soc.* 86, 304 (1964)
 Sheehan, J.C., Hess, G.P.: *J. Amer. Chem. Soc.* 77, 1067 (1955)
 Sakakibara, S., Shimonishi, Y.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 38, 1412 (1965)

Περαιτέρω Βιβλιογραφία

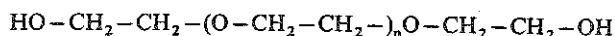
- Atherton, E., Sheppard, R.C.: *Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach*. IRL Press at Oxford University Press, Oxford 1989
 Barany, G., Merrifield, R.B.: *Solid Phase Peptide Synthesis*, in *The Peptides* Vol. 2, Gross, E., Meienhofer, J., eds. pp. 1-284, Academic Press, New York 1980
 Birr, C.: *Aspects of the Merrifield Peptides Synthesis*, Springer Verlag, Berlin 1978
 Stewart, J. M., Young, J.D.: *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd ed., Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois 1984

XI. Ειδικές Μέθοδοι Σύνθεσης

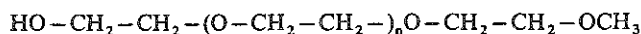
Η πεπτιδική σύνθεση στερεάς φάσης είναι η μόνη ευρέως εφαρμοζόμενη τεχνική γρήγορης σύνθεσης αλλά έχουν προταθεί επίσης και αρκετές άλλες μέθοδοι για τη γρήγορη σύνθεση μεγάλων πεπτιδικών αλυσίδων. Μερικές από αυτές τις εναλλακτικές μεθόδους έχουν κάποια πλεονεκτήματα έναντι της σύνθεσης σε στερεά φάση. Οι αντιδράσεις γίνονται σε διάλυμα και δεν επηρεάζονται από την ελάττωση της ταχύτητας εντός της πηκτής. Επίσης όπου είναι δυνατή η απομόνωση των ενδιάμεσων παραγώγων, αυτά μπορεί να αναλυθούν και να καθαρισθούν. Ένα μεγάλο μειονέκτημα όμως συχνό στις διάφορες μεθόδους που θα συζητηθούν παρακάτω είναι ότι διατίθενται λιγότερο σε μηχανοποίηση και αυτοματοποίηση απ' ό,τι η μέθοδος Merrifield.

A. Αλυσίδες Προσκολλημένες σε ένα Διαλυτό Πολυμερές (Μέθοδος Υγρής Φάσης).

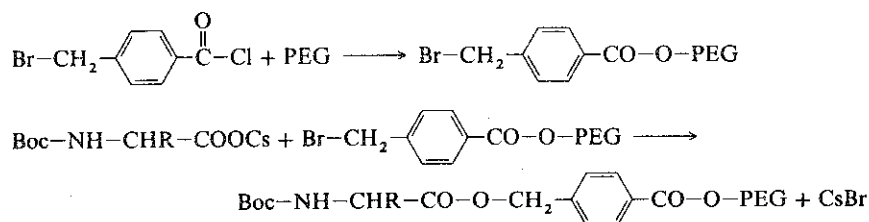
Ένα αμινοξύ προσκολλημένο σ' ένα διαλυτό πολυμερές από την καρβοξυλική του ομάδα μπορεί να ακυλωθεί από ένα κατάλληλα προστατευμένο και ενεργοποιημένο αμινοξύ και να αρχίσει μ' αυτό τον τρόπο η σύνθεση της πεπτιδικής αλυσίδας. Τα ενδιάμεσα πεπτιδυλο-πολυμερή καταβυθίζονται και πλένονται για να απομακρυνθούν μη αντιδράσαντα αρχικά υλικά και παραπροϊόντα, το καθαρό προϊόν επαναδιαλύεται, αποπροστατεύεται, ακυλώνεται ξανά σε διάλυμα κ.ό.κ. Κατά την πρώτη εφαρμογή αυτής της αρχής (Shemyakin et al. 1965) χρησιμοποιήθηκε υψηλού μοριακού βάρους πολυστυρόλιο (~200.000 daltons), φυσικά χωρίς διασταύρωση. Τα αμινοακυλο- και τα πεπτιδυλο-πολυμερή είναι διαλυτά σε τετραϋδροφουράνιο, διμεθυλοφορμαμίδιο, διμεθυλοσουλφοξείδιο και άλλους πολικούς διαλύτες. Μετά τη συμπλήρωση των απαραίτητων αντιδράσεων τα ενδιάμεσα προϊόντα διαχωρίζονται από το διάλυμα με αραιώση με νερό, το ίζημα πλένεται και η πορεία συνεχίζεται μέχρι να συντεθεί η επιθυμητή πεπτιδική αλυσίδα. Για το διαχωρισμό των ενδιάμεσων πεπτιδυλο-πολυμερών χρησιμοποιήθηκε επίσης χαμηλότερου μοριακού βάρους πολυστυρόλιο (~20.000 daltons) κατά τον ίδιο τρόπο εκτός του ότι χρησιμοποιήθηκε διήθηση από πηκτή (gel filtration) αντί καταβύθισης. Η καλλίτερα αναπτυχθείσα τεχνική όμως βασίζεται σ' ένα διαφορετικό είδος πολυμερούς που ονομάζεται πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG)



ή αν προτιμηθεί ένα στηρικτικό υλικό με μια δραστική ομάδα, ο μονομεθυλο αιθέρας της.



Το πρώτο αμινοξύ συνδέεται με το PEG μέσω μιάς ομάδας σύνδεσης:



Η διαλυτότητα του PEG επιτρέπει επίσης τη σύζευξη και σε υδατικά διαλύματα. Σ' αυτή την περίπτωση ένα διαλυτό στο νερό καρβοδιϊμίδιο, όπως



μπορεί να μεσολαβήσει για την αντίδραση.

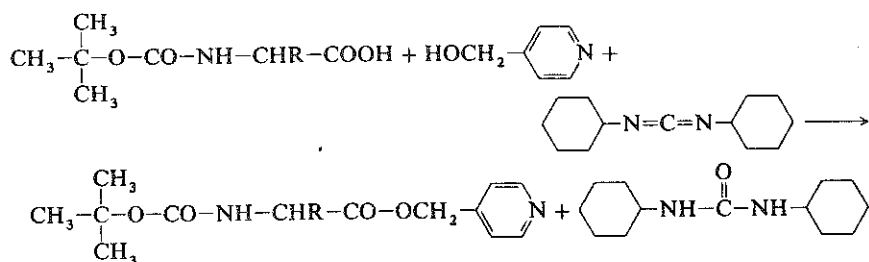
Για τη σύνθεση πεπτιδίων μετρίου μεγέθους τα διαλυτά πολυμερή παρέχουν μια πρακτική τεχνική που δίνει προϊόντα με ικανοποιητική απόδοση και ομοιογένεια. Η μέθοδος, εντούτοις, έχει μερικούς περιορισμούς. Με την αύξηση του μήκους της αλυσίδας οι φυσικές ιδιότητες των ενδιάμεσων πεπτιδυλο-πολυμερών αλλάζουν βαθμιαία από τις ιδιότητες του PEG προς τις ιδιότητες της προστατευμένης πεπτιδικής αλυσίδας. Τα αναφερόμενα στη διαλυτότητα προβλήματα που παρουσιάζονται σε πολλά υψηλού μοριακού βάρους προστετευμένα πεπτίδια έχουν συζητηθεί σε προηγούμενα κεφάλαια.

B. Μέθοδος των Πικολυλο-Εστέρων

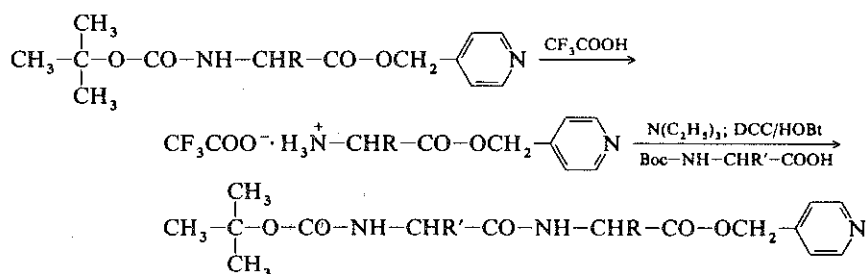
Η ερευνητική ομάδα πεπτιδίων του Πανεπιστημίου της Οξφόρδης οδηγούμενη από τον G.T. Young πρότεινε έναν ενδιαφέροντα και σπουδαίο συνδυασμό της πεπτιδικής σύνθεσης στερεάς φάσης και της σύνθεσης σε διάλυμα (Camble et al. 1968). Προστάτευσαν το C-τελικό αμινοξύ με μια ημιμόνιμη καρβοξυλο-προστατευτική ομάδα που δημιουργεί ένα κατιόν με πρωτονίωση. Επομένως τα προστατευμένα ενδιάμεσα παράγωγα της σύνθεσης ενώνονται εύκολα με όξινες κατιοντοανταλλακτικές ρητίνες και μπορούν έτσι να διαχωρισθούν από την περίσσεια των αρχικών υλικών και από τα παραπροϊόντα. Οι αντιδράσεις της σύζευξης και της αποπροστασίας γίνονται σε διάλυμα με καλά μελετημένες μεθόδους.

Η ημιμόνιμη προστασία που εκλέχθηκε γι' αυτό το σκοπό είναι προστασία της C-τελικής καρβοξυλομάδας με τη μορφή των πικολυλο εστέρων. Η 4-υδροξυμεθυλοπυριδι-

νη ακυλιώνεται με ένα ακυλαμινο οξύ, συνήθως με τη βοήθεια του καρβοδιϊμιδίου:



Η πικολυλο εστερική ομάδα είναι αρκετά σταθερή στα οξέα γιατί η πρωτονίωση του πυριδινικού δακτυλίου αποσταθεροποιεί το δραστικό καρβοκατιόν του βενζολικού ατόμου άνθρακα. Έτσι η τετ-βουτυλοξυκαρβονυλομάδα που χρησιμοποιείται για την προστασία των α-αμινομάδων μπορεί να αποσπασθεί εκλεκτικά με τριφθοροξικό οξύ και το προκύπτον άλας της αμίνης να χρησιμοποιηθεί¹ στο επόμενο στάδιο σύζευξης:



Το προστατευμένο διπεπτιδικό παράγωγο προσροφάται μετά πάνω σε μια κατιοντοανταλλακτική ρητίνη. Το αρχικά προταθέν σουλφοαιθυλο-sephadex G-25 αντικαταστάθηκε αργότερα από μια δικτυωτή ρητίνη, την Amberlyst-15 διαποτισμένη με 3-βρωμοπυριδίνη για να αποφευχθεί η πρόωρη διάσπαση των ευαίσθητων σε οξέα προστατευτικών ομάδων από τον όξινο ιοντοανταλλάκτη. Η ρητίνη πλένεται με οργανικούς διαλύτες και το προστατευμένο ενδιάμεσο παράγωγο εκλύεται με πυριδίνη σε διμεθυλοφορμαμίδιο. Συμπύκνωση και καταβύθιση με αιθέρα απομακρύνει την 3-βρωμοπυριδίνη που εκλύεται ταυτόχρονα. Το προστατευμένο πεπτιδικό ενδιάμεσο παράγωγο αναλύεται, χαρακτηρίζεται και αν είναι αναγκαίο καθαρίζεται περαιτέρω. Ακολουθεί ένας δεύτερος κύκλος αποπροστασίας, σύζευξης και προσρόφησης κ.ό.κ.

¹ Η χρήση μίγματος του τριφθοροξικού άλατος και μιας τριτοταγούς αμίνης αντί του αμινο-συστατικού μόνου του είναι μια απλοποίηση που δεν έχει επιτευχθεί πλήρως. Επιπλέον των μειονεκτημάτων που συζητήθηκαν στο κεφάλαιο VII οδηγεί σε μερική τριφθοροακετυλίωση της αμινομάδας γιατί δεν μπορεί να αποφευχθεί η ενεργοποίηση του τριφθοροξικού οξέος από τα καρβοδιϊμίδια. Η προσθήκη του 1-υδροξυβενζοτριάζολιου δεν εξαλείφει πλήρως αυτή την παράπλευρη αντίδραση.

Παρόλο που η μέθοδος του πικολυλο εστέρα μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για συμπύκνωση κλασμάτων είναι πιο κατάλληλη για τη βήμα προς βήμα στρατηγική.

Στο τελικό στάδιο η εστερική ομάδα διασπάται με αναγωγικές μεθόδους όπως καταλυτική υδρογόνωση, αναγωγή με νάτριο σε υγρή αμμωνία ή ηλεκτρολυτική αναγωγή σε μια κάθοδο υδραργύρου. Μπορεί επίσης να γίνει σαπωνοποίηση με κρύο άλκαλι αλλά συνιστάται με μερικές επιφυλάξεις γιατί μπορεί να προκαλέσει κάποια ρακεμοποίηση και άλλες παράπλευρες αντιδράσεις.

Η μέθοδος του πικολυλο εστέρα φάνηκε σε αρκετά παραδείγματα, συμπεριλαμβανομένης της παρασκευής εξαιρετικά πολύπλοκων μορίων, να είναι πολύ αποτελεσματική. Δεν χρησιμοποιείται ακόμη ευρέως πιθανώς επειδή η πορεία δεν οδηγεί εύκολα σε μηχανοποίηση και αυτοματοποίηση. Επίσης καταναλώνει χρόνο και απαιτεί προσεκτική εκτέλεση. Εντούτοις εάν η παρασκευή των πεπτιδίων απαιτεί υψηλή καθαρότητα η μέθοδος αυτή αξίζει τον κόπο να εκτελεσθεί.

Γ. Γρήγορη Σύνθεση

1. Σύνθεση της Αλυσίδας Χωρίς Απομόνωση των Ενδιάμεσων Παραγώγων.

Έχει επίσης προταθεί διευκόλυνση της πεπτιδικής σύνθεσης με παράλειψη της απομόνωσης των προστατευμένων ενδιάμεσων παραγώγων. Διάφοροι μέθοδοι σύζευξης χρησιμοποιήθηκαν γι' αυτό το σκοπό, για παράδειγμα η μέθοδος των αζιδίων, των μικτών ανυδριτών και του καρβοδιϊμιδίου. Το κοινό χαρακτηριστικό αυτών των προτάσεων είναι η εκχύλιση των αρχικών ουσιών που δεν αντέδρασαν και των υδατοδιαλυτών παραπροϊόντων από το μίγμα της αντίδρασης με αραιό HCl, διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου και νερό. Η οργανική φάση θα περιέχει μόνον το επιθυμητό ενδιάμεσο παράγωγο, το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιείται χωρίς απομόνωση ή περαιτέρω καθαρισμό στον επόμενο κύκλο αποπροστασίας-σύζευξης. Τα τελευταία χρόνια αρκετοί ερευνητές απέδειξαν την πρακτικότητα τέτοιων απλών μεθόδων αλλά καμιά απ' αυτές δε χρησιμοποιήθηκε με τον ενθουσιασμό που έδειξαν για την πεπτιδική σύνθεση στερεάς φάσης. Η επιφύλαξη αυτή μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι σ' αυτές τις γρήγορες μεθόδους η εξέταση των ενδιάμεσων παραγώγων και η απόσπαση των παραπροϊόντων που δεν απομακρύνονται με έκπλυση θυσιάζονται χωρίς το σημαντικό κέρδος που προκύπτει με τη μέθοδο στερεάς φάσης, δηλαδή εύκολη, μηχανοποιημένη και αυτοματοποιημένη εκτέλεση.

2. Σύνθεση της Αλυσίδας με Απομόνωση των Ενδιάμεσων Παραγώγων

Η επαρκής ενεργοποίηση που επιτυγχάνεται με τους πενταφθοροφαινυλεστέρες επιτρέπει τη βήμα προς βήμα σύνθεση των πεπτιδίων σε αξιοσημείωτα μικρό χρόνο. Το ακαθάριστο προϊόν της ακυλίωσης, ένα προστατευμένο ενδιάμεσο παράγωγο, καταβυθίζεται και πλένεται και αμέσως αποπροστατεύεται και χρησιμοποιείται σαν αμινοσυστατικό για την ενσωμάτωση του επόμενου αμινοξέος. Ένα προστατευμένο οκταπεπτι-

διο με την αλληλουχία της αγγειοτενσίνης μπορεί να συντεθεί σε μια μόνο μέρα (Kisfaludy και Nyéki 1975) και ομοίως γρήγορη επιμήκυνση της αλυσίδας έδωσε την προστατευμένη μορφή της οξυτοκίνης (Kisfaludy και Schön 1975).

Δ. Σύνθεση "in situ"

Μια τεχνική στην οποία τα ενδιάμεσα παράγωγα απομονώνονται αλλά παραμένουν στο ίδιο δοχείο καθ' όλη την πορεία επιμήκυνσης της αλυσίδας είναι δυνατή με χρησιμοποίηση ενός φυγόκεντρου σωλήνα με κατάλληλη προσαρμογή (Bodanszky et al. 1973). Αυτός μπορεί να προσαρμοσθεί σε έναν περιστρεφόμενο συμπτυκωτή και έτσι είναι κατάλληλος και για την απομάκρυνση των διαλυτών και για το διαχωρισμό ιζημάτων με φυγοκέντρωση. Ένα προστατευμένο ενδιάμεσο, για παράδειγμα ένα tert-βουτυλοξυκαρβονυλο τριπεπτιδικό αμίδιο, τοποθετείται στον τροποποιημένο φυγόκεντρικό σωλήνα και κατεργάζεται με ένα όξινο αντιδραστήριο όπως με τριφθοροξικό οξύ. Η συμπύκνωση της περίσσειας του οξέος στο κενό ακολουθείται από καταβύθιση με αιθέρα. Το τριφθοροξικό άλας ξηραίνεται, ζυγίζεται, εξετάζεται (με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας κ.λ.π.) και μετά διαλύεται στο διαλύτη που επιλέχθηκε για τη σύζευξη, π.χ. διμεθυλοφορμαμίδιο. Προστίθεται μια τριτοταγής αμίνη ακολουθούμενη από τον ενεργό εστέρα του προστατευμένου αμινοξέος που πρόκειται να ενσωματωθεί και αν είναι επιθυμητό από την προσθήκη ενός καταλύτη, για παράδειγμα 3-υδροξυ-3,4-διυδροκίναζολινο-4-ονης. Η συμπλήρωση της ακυλίωσης ανιχνεύεται με τέστ νινυδρίνης. Απομάκρυνση του διαλύτη στο κενό και καταβύθιση με αιθέρα ή οξικό αιθυλεστέρα συμπληρώνει τον κύκλο. Με την κατάλληλη επιλογή του διαλύτη δεν καταβυθίζεται απλώς το προστατευμένο ενδιάμεσο, αλλά διαχωρίζεται επίσης η περίσσεια του ενεργού εστέρα, του καταλύτη και του άλατος της τριτοταγούς αμίνης. Το προστατευμένο πεπτιδίο πλένεται, ξηραίνεται, ζυγίζεται και εξετάζεται. Εάν είναι απαραίτητο μπορεί να ανακρυσταλλωθεί ή να ξανακαταβυθισθεί ακόμη στο ίδιο δοχείο. Είναι έτοιμο για τον επόμενο κύκλο της βήμα προς βήμα σύνθεσης της αλυσίδας. Εξαιρετικά μεγάλα πεπτιδία μπορούν να παρασκευασθούν μ' αυτόν τον τρόπο, αλλά η τεχνική "in situ" δεν έχει ευρεία εφαρμογή μέχρι σήμερα.

Ε. Ταυτόχρονη Σύνθεση Πεπτιδικών Αναλόγων

Η τεχνική "in situ" που περιγράφηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο εφαρμόστηκε για την ταυτόχρονη σύνθεση της σεκρετίνης και τριών αναλόγων της (Fink και Bodanszky 1976) απλά διεξάγοντας την πορεία σε τέσσερις φυγόκεντρικούς σωλήνες. Σ' όλα τα στάδια επιμήκυνσης της αλυσίδας εκτελέστηκαν παρόμοιοι χειρισμοί στα ενδιάμεσα παράγωγα των τεσσάρων σωλήνων εκτός από τα στάδια όπου έπρεπε να εισαχθεί ένα αμινοξύ διαφορετικό από το αμινοξύ της μητρικής αλληλουχίας. Η πεπτιδική σύνθεση στερεάς φάσης είναι ακόμη πιο κατάλληλη για την ταυτόχρονη σύνθεση αλυσίδων. Σε μια ενδιαφέρουσα παραλλαγή αυτής της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν δύο ρητίνες, πολυμερή με επαρκώς διαφορετικές πυκνότητες ώστε να επιτρέπουν το διαχωρισμό τους μέσω κατακάθισης σ' ένα μέσο με ενδιάμεση πυκνότητα. Τα δύο πολυμερή με τα πεπτιδία προσκολλημένα σ' αυτά χειρίσθηκαν σαν ένα μίγμα αλλά διαχωρίσθηκαν πριν από τα

στάδια στα οποία ένα διαφορετικό αμινοξύ έπρεπε να ενσωματωθεί στο καθένα απ' αυτά. Φυσικά διαχωρίστηκαν ξανά πριν τα πεπτίδια αποσπασθούν από τα πολυμερικά τους υποστρώματα.

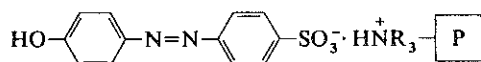
Περαιτέρω απλοποίηση της ταυτόχρονης σύνθεσης αλυσίδων μπορεί να επιτευχθεί τοποθετώντας μικρές ποσότητες μιας αμινοακυλο-ρητίνης ή ενός πεπτιδυλο-πολυμερούς σε ιδιαίτερα δοχεία που είναι διαπερατά από το διαλύτη. Για παράδειγμα σακουλάκια τσαγιού διαπερατά στο διαλύτη προτάθηκαν γι' αυτό το σκοπό (Houghten 1985). Μια ομάδα αρκετών τέτοιων δειγμάτων κατεργάζονται με τον ίδιο τρόπο όταν εισάγονται τα ίδια αμινοξέα και ένα κατάλληλα σημειωμένο δείγμα επιλέγεται από την ομάδα όταν πρόκειται να γίνει αλλαγή της μητρικής αλληλουχίας. Η δυνατότητα παρασκευής μεγάλων σειρών αναλόγων ενός βιολογικώς δραστικού πεπτιδίου για χρησιμοποίηση σε ανοσολογικά και φαρμακολογικά τεστ είναι βεβαίως ελκυστική. Σχεδιάστηκαν ευφυείς κατασκευές για την ταυτόχρονη σύνθεση πολυσυστημάτων που περιλαμβάνουν εκατοντάδες ή χιλιάδες αναλόγων πεπτιδίων (π.χ. Furka et al 1991). Η ευκολία της μεθόδου προκάλεσε ενδιαφέρον σχετικά με την ποιότητα των προϊόντων.

ΣΤ. Αδιάλυτα Αντιδραστήρια

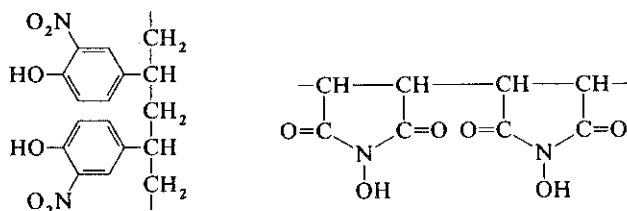
1. Ενεργοί Εστέρες

Οι ενεργοί εστέρες πολυμερών αντιπροσωπεύουν μια ενδιαφέρουσα παραλλαγή της πεπτιδικής σύνθεσης στερεάς φάσης. Στην τελευταία το αμινο-συστατικό συνδέεται με ένα πολυμερές, ενώ στους αδιάλυτους ενεργούς εστέρες το καρβοξύλο-συστατικό είναι συνδεδεμένο με ένα αδιάλυτο πολυμερές. Το κύριο πλεονέκτημα αυτών των ακυλιωτικών μέσων έγκειται στην ευκολία απομάκρυνσης με διήθηση του προκύπτοντος παραπροϊόντος μαζί με την περίσσεια του αντιδραστήριου που δεν αντέδρασε. Το ποσό του αδιάλυτου ενεργού εστέρα που δεν αντέδρασε μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ενσωμάτωση του ίδιου αμινοξέος σ' ένα άλλο στάδιο ή σε μια άλλη σύνθεση.

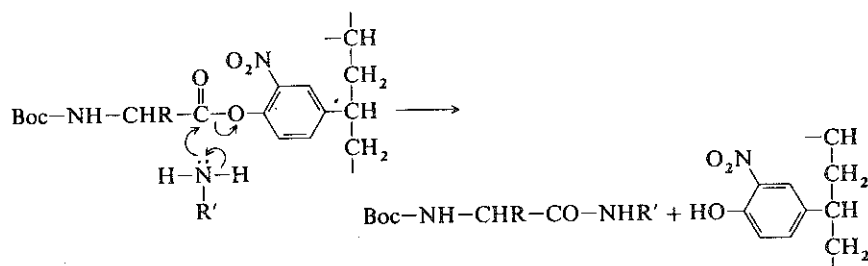
Τα πρώτα παραδείγματα αδιάλυτων ενεργών εστέρων ήταν παράγωγα φαινολών που χρησιμοποιήθηκαν με μια ομάδα που σχηματίζει ιόντα μέσω της οποίας μπορούν να προσκολληθούν σε μια ιοντοανταλλακτική ρητίνη (Wieland και Birt 1966).



Εναλλακτικές εφαρμογές αυτής της νέας προσέγγισης είναι οι νιτρο-πολυμερείς φαινόλες (Fridkin et al. 1968) και ένας τύπος πολυμερούς του Ν-υδροηλεκτριμιδίου (Laufer et al. 1968):



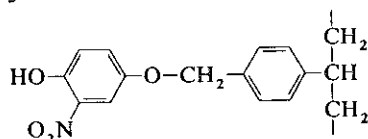
Η εστεροποίηση της καρβοξυλομάδας αυτών των ουσιών με ένα προστατευμένο αμινοξύ γίνεται με το συνήθη τρόπο μέσω ενεργοποίησης της καρβοξυλομάδας με ένα καρβοδιϊμίδιο. Τα προκύπτοντα δραστικά παράγωγα αμινοούνται από το αμινο-συστατικό.



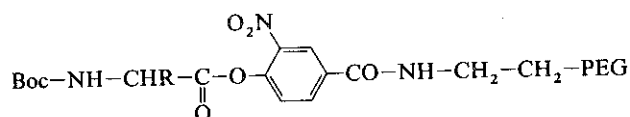
διαλυμένο σ' έναν οργανικό διαλύτη στον οποίο το αντιδρόν πολυμερές φουσκώνει καλά. Ο ενεργός εστέρας του αδιάλυτου υλικού μπορεί να ελεγχθεί πριν και μετά την ακυλίωση, για παράδειγμα με αντίδραση μικρού δείγματος με βενζυλαμίνη. Η ποσότητα της βάσης που δεν αντέδρασε προσδιορίζεται με μη υδατική τιτλοδότηση με ένα ισχυρό οξύ.

Σ' αυτό το σημείο χρειάζεται κάποια προσοχή. Αυτή η ευφυής διαδικασία εκτελείται εύκολα όσο το αμινο-συστατικό είναι πράγματι διαλυμένο στο εκλεγέντα διαλύτη. Η δυσκολία που συναντάται συχνά, ο σχηματισμός ασθενώς διαλυτών προστατευμένων ενδιάμεσων παραγώγων, μπορεί να παράγει ιξώδη πηκτώματα από τα οποία ο διαχωρισμός των σωματιδίων του πολυμερούς ακυλιωτικού μέσου δεν είναι εύκολος.

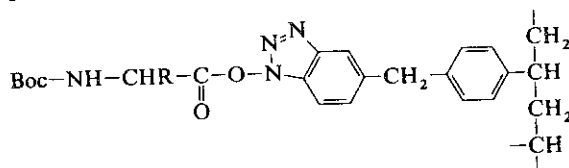
Περαιτέρω ανάπτυξη οδήγησε σε βελτιωμένους ενεργούς εστέρες πολυμερών στους οποίους τοποθετείται μια ομάδα μεταξύ της δραστικής ομάδας και του πολυμερούς, όπως στο



ή στο ενεργοποιημένο παράγωγο του αμινοξέος που προσκολλάται στην πολυαιθυλενογλυκόλη:

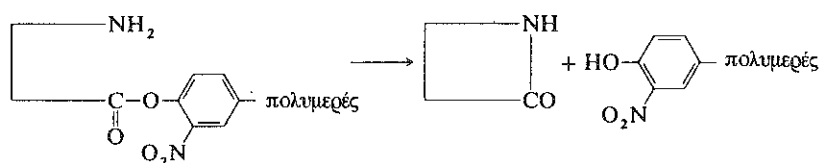


Ομοίως μεσολαβεί μια ομάδα σε πολυμερικά ανάλογα εστέρων του 1-υδροξυβενζο-τριάζολιου:

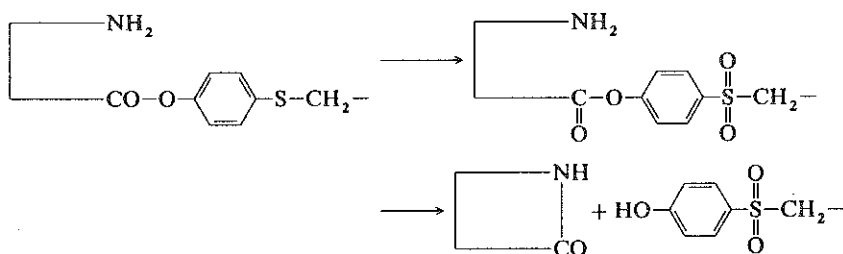


Οι αδιάλυτοι ενεργοί εστέρες άνοιξαν νέες δυνατότητες. Έτσι το διάλυμα του αμινο-συστατικού μπορεί να περάσει από κολόνα ενός τέτοιου ακυλιωτικού μέσου και το προϊόν ακυλίωσης λαμβάνεται με έκλυση. Ύστερα από κατάλληλη αποπροστασία το νέο αμινο-συστατικό περνάει από δεύτερη κολόνα που περιέχει το επόμενο αμινοξύ που πρέπει να ενωθεί, φυσικά στην προστατευμένη και ενεργοποιημένη μορφή. Για την πλήρη πραγματοποίηση αυτής της αρχής σε μια συνεχή πορεία είναι ανάγκη να βρεθούν προσωρινές προστατευτικές ομάδες που να παράγουν μόνον αδρανείς ενώσεις. Διαφορετικά η συσσώρευση των παραπροϊόντων που σχηματίζονται στις περισσότερες μεθόδους αποπροστασίας, όπως τα τετ.βουτυλοτριφθοροξικά ή τριακυλαμμωνιακά άλατα που παράγονται κατά την κατεργασία των αμινοαλάτων με τριτοταγείς βάσεις θα παρέμβουν στη διαδικασία.

Μια πρακτική εφαρμογή της ιδέας των αδιάλυτων ενεργών εστέρων είναι η χρήση τους στη σύνθεση κυκλικών πεπτιδίων. Η αποπροστατευμένη N-τελική αμινομάδα μιας αλυσίδας με κατάλληλο μήκος προσβάλλει το δραστικό καρβονύλιο του εστέρα στο C-άκρο:



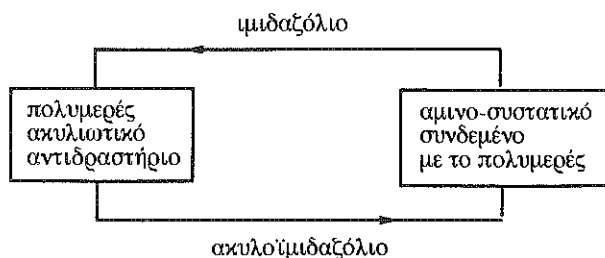
Κανένα ή μικρό κλείσιμο δακτυλίου αναμένεται σε αλυσίδες που περιέχουν λιγότερα από έξι αμινοξέα. Για καλλίτερο έλεγχο προτιμάται να χρησιμοποιηθούν εστέρες που είναι τελείως αδρανείς αλλά μπορούν να ενεργοποιηθούν όταν είναι επιθυμητή η κυκλοποίηση. Για παράδειγμα η οξείδωση ενός θειοαιθέρα στην δέκτη ηλεκτρονίων σουλφόνη



παρέχει την απαραίτητη αύξηση της δραστικότητας.

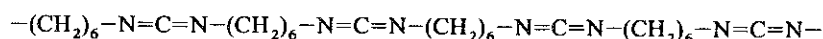
Τελικά ενώ δεν είναι προφανές πώς το αμινοσυστατικό και το καρβοξυλο-συστατικό θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε μορφή πολυμερούς, το δίλημμα αυτό λύθηκε (Cohen et al. 1981) με την εισαγωγή ενός μεσολαβητή. Ένα διάλυμα ιμιδαζόλιου κυκλοφορεί μέσω ξεχωριστών κλινών του αδιάλυτου δραστικού καρβοξυλο-συστατικού και του συνδεδεμένου με το πολυμερές αμινο-συστατικού. Τα ακυλο-ιμιδαζόλια που δημιουργούνται στην κλίνη του ενεργού εστέρα είναι εξαιρετικά ακυλιωτικά μέσα που μεταφέρουν την ακυλομάδα στο πυρηνόφιλο της άλλης κλίνης και μετατρέπουν έτσι το

αμινοσυστατικό στο επιθυμητό προστατευμένο ενδιάμεσο που είναι ακόμη συνδεδεμένο με το πολυμερές.

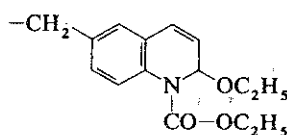


2. Πολυμερή Αντιδραστήρια Σύζευξης

Αυτές οι ελκυστικές αλλά κάπως ασαφείς μέθοδοι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν περισσότερο ευρέως στο μέλλον. Ένα πρώτο παράδειγμα, το πολυεξαμεθυλενοκαρβοδιϊμίδιο (Wolman et al. 1967)

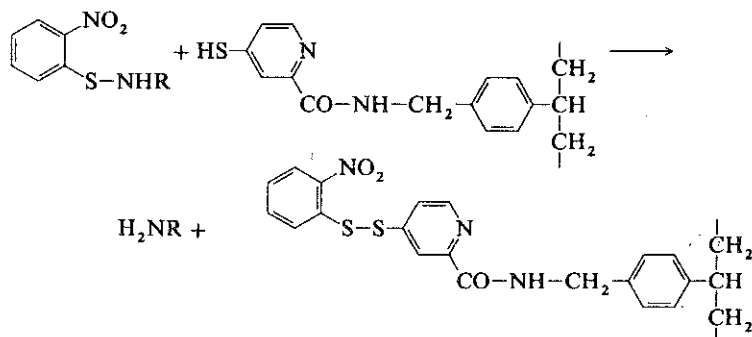


ακολουθήθηκε από αρκετές άλλες εφαρμογές αυτής της ιδέας, από τις οποίες πρέπει να αναφερθεί ο συνδεδεμένος σε πολυμερές τύπος της 1-αιθοξυκαρβονυλο-2-αιθοξυ-1,2-διυδροκινολίνης (EEDQ)

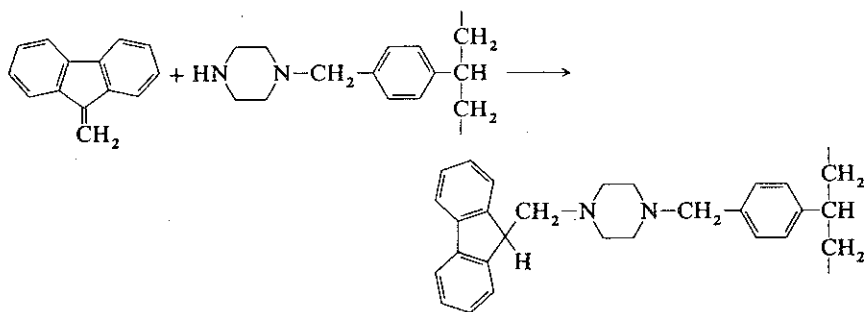


3. Αδιάλυτα Αντιδραστήρια Διάσπασης

Η απομάκρυνση της ο-νιτροφαινυλοσουλφενυλο ομάδας με μια πολυμερή μορφή της 2-μερχαπτοπυριδίνης



έχει ένα προφανές πλεονέκτημα έναντι του απλού διαλυτού θειο-αντιδραστήριου. Το προϊόν διάσπασης παγιδεύεται στο πολυμερές και απομακρύνεται από το μίγμα αντίδρασης με διήθηση. Ομοίως αν χρησιμοποιηθεί για την απομάκρυνση της 9-φλουορενυλομεθυλοξυκαρβονυλο (Fmoc) ομάδας μια συνδεδεμένη με το πολυμερές δευτεροταγής αμίνη, το διβενζοβουλβένιο που δημιουργείται κατά την αντίδραση παραμένει προσκολλημένο στο αδιάλυτο αντιδραστήριο.



Αναφορές

- Bodanszky, M., Funk, K.W., Fink, M.L.: *J. Org. Chem.* 38, 3565 (1973)
 Camble, R., Garner, R., Young, G.T.: *Nature* 214, 247; *J. Chem. Soc.* 1969, 1918
 Cohen, B.J., Kraus, M.A., Patchornik, A.: *J. Amer. Chem. Soc.* 103, 762 (1981)
 Fink, M.L., Bodanszky, M.: *J. Amer. Chem. Soc.* 98, 974 (1976)
 Fridkin, M., Patchornik, A., Katchalski, E.: *J. Amer. Chem. Soc.* 88, 3164 (1966)
 Furka, A., Sebastyén, E., Asgedom, M., Dibó, G.: *Int.J. Peptide Protein Res.* 37, 487 (1991)
 Houghten, R.A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. US* 82, 5131 (1985)
 Laufer, D.A., Chapman, T.M., Marlborough, D.I., Vaidya, V.M., Blout, E.R.: *J. Amer. Chem. Soc.* 90, 2696 (1968)
 Kisfaludy, L., Nyéki, O.: *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* 86, 343 (1977)
 Kisfaludy, L., Schön, I.: *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* 84, 227 (1975)
 Shemyakin, M.M., Ovchinnikov, Y.A., Kiryushkin, A.A., Kozhevnikova, I.V.: *Tetrahedron letters* 1965, 2323
 Wieland, T., Birr, C.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 5, 310 (1966)
 Wolman, Y., Kivity, S., Frankel, M.: *Chem. Commun.* 1967, 629

Περαιτέρω βιβλιογραφία

- Fridkin, M.: *Polymeric Reagents in Peptide Synthesis*, in *The Peptides*, vol. 2, Gross, E., Meienhofer, J. eds. pp. 333-363, New York, Academic Press 1980
 Kisfaludy, L.: *Repetitive Methods in Solution*, *ibid.* pp. 417-440
 Mutter, M., Bayer, E.: *The Liquid-Phase Method for Peptide Synthesis*, *ibid.* pp. 285-332

XII. Ανάλυση και Χαρακτηρισμός Συνθετικών Πεπτιδίων

Το μοριακό βάρος των περισσότερων συνθετικών οργανικών ενώσεων είναι πολύ κάτω των 1000 daltons. Τα προϊόντα της πεπτιδικής σύνθεσης όμως έχουν συχνά μοριακά βάρη που υπερβαίνουν αυτόν τον αριθμό. Υπολογίζοντας με μέσο μοριακό βάρος αμινοξέος 115 ακόμη και το μοριακό βάρος ενός εννεαπεπτιδίου είναι μεγαλύτερο από 1000 και προκαλείται περαιτέρω αύξηση με τα οξέα (π.χ. οξικό οξύ) που συνδέονται με κατιόντα της παράπλευρης αλυσίδας βασικών αμινοξέων. Σε προστατευμένα ενδιάμεσα παράγωγα οι προστατευτικές ομάδες συνεισφέρουν σημαντικά στο μέγεθος του μορίου. Ενώ το υψηλό μοριακό βάρος από μόνο του θα μπορούσε να είναι η αιτία μερικών δυσκολιών στην ανάλυση το πρόβλημα προκύπτει από την παρόμοια στοιχειακή σύνθεση των αμινοξέων που περιέχονται. Έτσι η ενσωμάτωση ενός ακόμη αμινοξέος θα οδηγούσε σε μικρές μόνον αλλαγές των τιμών της στοιχειακής ανάλυσης και των φυσικών ιδιοτήτων ενός ενδιάμεσου παραγώγου. Επιπλέον τα παραπροϊόντα που σχηματίζονται στους διάφορους χειρισμούς της σύνθεσης έχουν συχνά παρόμοια σύσταση με τα επιθυμητά πεπτιδικά παράγωγα. Αυτές οι δυσκολίες προφανώς αυξάνουν την ανάγκη λεπτομερούς εξέτασης των συνθετικών πεπτιδίων, εάν είναι δυνατόν με τη χρήση διαφόρων τεστ. Στα επόμενα κεφάλαια θα επιχειρήσουμε να περιγράψουμε μερικές καλά καθιερωμένες μεθόδους ανάλυσης που είναι χρήσιμες γι' αυτό το σκοπό.

A. Έλεγχος Ομοιογένειας

Αρχικά τα συνθετικά πεπτίδια πρέπει να ελεγχθούν ως προς την ομοιογένεια. Είναι σπατάλη χρόνου και ως επί το πλείστον χωρίς αποτέλεσμα να αναλύεται η σύσταση των αμινοξέων ή η στοιχειακή σύσταση μιγμάτων. Ομοίως οι φασματοσκοπικές εξετάσεις έχουν νόημα μόνον εάν μελετηθούν ομογενή δείγματα. Το απότομο σημείο τήξεως είναι μια ενθαρρυντική ένδειξη αλλά όχι η τελευταία λέξη για την καθαρότητα. Επίσης ακόμη και η πιο απλή και λιγότερο ακριβή μέθοδος, η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (tlc) μπορεί να ανιχνεύσει τις πιο συνήθεις προσμίξεις, αρχικές ουσίες που δεν αντέδρασαν καθώς και την πλειοψηφία των παραπροϊόντων. Φυσικά η εξήγηση των χρωματογραφημάτων πρέπει να βασίζεται στην πείρα και την κρίση. Η ευπρόσδεκτη παρατήρηση μιας μόνο κηλίδας μπορεί να παραπλανήσει γιατί σε μερικά συστήματα διαλυτών η συγγένεια του ενός διαλύτη με το silica gel μπορεί να προκαλέσει το σχηματισμό ενός δεύτερου μετώπου διαλύτη στο οποίο αρκετές ουσίες μπορούν να μετακινηθούν και να εμφανισθούν σε μια γραμμή. Επιπλέον, όπως συμβαίνει συχνά, η μέθοδος ανίχνευσης αποτυγχάνει να αποκαλύψει κύριες ουσίες. Τα περισσότερα αντιδραστήρια χρώματος είναι πολύ ειδικά και δεν ανιχνεύουν όλες τις ουσίες και ακόμη και στις λιγότερο ειδικές μεθόδους θερμικά σταθερές και πτητικές ενώσεις, όπως

οι δικετοπιπεραζίνες ή η πανταχού παρούσα N,N'-δικυκλοεξυλουρία (DCU) μπορεί να διαφύγουν και να παραβλεφθούν. Η πολύ γενική μέθοδος της χλωρίωσης των αμιδίων ακολουθούμενη από μια αντίδραση χρώματος βασισμένη στην οξειδωτική δράση των χλωριμιδίων δεν είναι απολύτως αξιόπιστη γιατί σε μερικά κυκλικά πεπτίδια οι αμιδικές ομάδες δεν είναι προσιτές στο συνήθως χρησιμοποιούμενο για τη χλωρίωση αντιδραστήριο, τον υποχλωριώδη βουτυλεστέρα. Τέτοια προβλήματα θα μπορούσαν να λυθούν για παράδειγμα με τη χρήση αέριου χλωρίου αλλά γενικά είναι καλλίτερα να χρησιμοποιούνται περισσότερες από μια μέθοδοι ανίχνευσης. Μια απ' αυτές θα μπορούσε να είναι η έκθεση σε ατμούς ιωδίου.

Μπορεί επίσης να συμβαίνει η αντίθετη περιπλοκή, να παράγονται δύο κηλίδες από μια ουσία. Οξικά, τριφθοροξικά κ.λ.π. άλατα των πεπτιδίων μετατρέπονται εν μέρει στα αντίστοιχα υδροχλωρικά από υδροχλωρικό οξύ στο silica gel. Στα p-τολουολοσουλφονικά άλατα η αντικατάσταση από υδροχλωρικό οξύ έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση μιας επιπλέον κηλίδας που οφείλεται στο p-τολουολοσουλφονικό οξύ. Τέτοιες δυσκολίες μπορεί να ελαττωθούν και οι παραπλανητικές συμπτώσεις, όπως δύο πεπτίδια με παρόμοιες τιμές R_f αποφεύγονται με τη χρήση δύο ή περισσότερων συστημάτων διαλυτών. Η σύσταση αυτών των συστημάτων χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας πρέπει να είναι ουσιαστικά διαφορετική του ενός από το άλλο και όχι απλώς οι ίδιοι διαλύτες χρησιμοποιημένοι σε διαφορετικές αναλογίες. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα συστήματα, μεθανόλη-χλωροφόρμιο, n-βουτανόλη-οξικό οξύ-νερό και n-βουτανόλη-πυριδίνη-οξικό οξύ-νερό είναι γενικά ικανοποιητικά, αλλά αν προκύψουν προβλήματα μπορούν να συμπληρωθούν με επιπλέον συστήματα διαλυτών. Για παράδειγμα η αντικατάσταση της βουτανόλης με οξικό αιθυλεστέρα παρέχει ένα λιγότερο ιξώδες και επομένως πιο γρήγορα κινούμενο σύστημα διαλυτών με μεγάλη διαχωριστική ικανότητα.

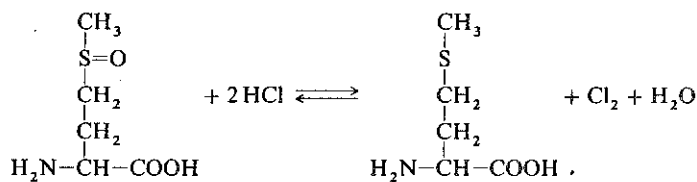
Η ανακάλυψη της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (hplc) προκάλεσε επανάσταση στην εξέταση των πεπτιδίων και οι διατιθέμενες στο εμπόριο κολόνες αναστροφής φάσης επιτρέπουν το γρήγορο διαχωρισμό, την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των συστατικών ενός μίγματος καθώς και την αυτόματη καταγραφή των αποτελεσμάτων. Δεν υπάρχει καμμία αμφιβολία γιατί η μέθοδος απέκτησε τεράστια δημοτικότητα σε μικρό χρονικό διάστημα. Οι θερμοί υποστηρικτές της hplc ξεχνούν όμως μερικές φορές ότι χρειάζεται κάποια επιφύλαξη ακόμη και στις καλλίτερες μεθόδους. Έτσι ουσίες που καθαρίστηκαν με παρασκευαστική hplc αναλύονται συχνά με hplc στο ίδιο σύστημα. Αυτό είναι προφανώς εσφαλμένο και τα αποτελέσματα είναι εντελώς παραπλανητικά. Επίσης εμπιστεύονται πολύ την ποσοτική ανάλυση μιγμάτων αν και οι αριθμοί στον εκτυπωτή είναι απλώς ολοκληρωμένες τιμές της περιοχής κάτω από τις κορυφές που καταγράφονται σύμφωνα με την απορρόφηση στο υπεριώδες. Από τον κατασκευαστή έγινε η σιωπηρή αλλά ως επί το πλείστον αδικαιολόγητη υπόθεση ότι στα καταγραφόμενα μήκη κύματος τα διάφορα συστατικά του μίγματος έχουν τον ίδιο ειδικό συντελεστή απορρόφησης. Επιπλέον μικρές ποσότητες προσμίξεων με συντελεστές απορρόφησης που είναι τάξεις μεγέθους μεγαλύτεροι από το συντελεστή απορρόφησης του κύριου συστατικού μπορεί να κάνουν ουσίες σχεδόν ομογενείς να φαίνονται πολύ ακάθαρτες. Το αντίθετο λάθος είναι εξίσου πιθανό.

Τα ελεύθερα πεπτίδια μπορεί να εξετασθούν με ηλεκτροφόρηση χάρτου ή επίσης με ηλεκτροφόρηση λεπτής στιβάδος. Εάν υπάρχουν μια ή περισσότερες ομάδες που σχηματίζουν κατιόντα (αμινομάδα, γουανιδινομάδα, ιμιδαζόλιο) η ηλεκτροφόρηση σ' έναν όξινο διαλύτη είναι περισσότερο αποκαλυπτική. Ενώσεις με ελεύθερες καρβοξυλομάδες κινούνται καλλίτερα σε βασικές συνθήκες και επιτρέπουν διαχωρισμό ανάλογα με τον αριθμό των καρβοξυλικών ανιόντων. Πρέπει να ληφθεί επίσης υπ' όψη ο όξινος χαρακτήρας του φαινολικού υδροξυλίου της τυροσίνης.

Εάν κάποια απ' αυτές τις μεθόδους δείξει αρκετά ποσά προσμίξεων τότε τα συνθετικά πεπτίδια πρέπει να καθαρισθούν περαιτέρω πριν να αναλυθούν περισσότερο εκτεταμένα ή να χαρακτηρισθούν. Η χρωματογραφία και η κατανομή κατ' αντιροή είναι οι πιο συχνά εφαρμοζόμενες μέθοδοι για τον καθαρισμό των πεπτιδίων και των προστατευμένων ενδιάμεσων παραγώγων, αλλά η κλασική μέθοδος της κρυστάλλωσης παραμένει η απλούστερη και μερικές φορές η πιο αποτελεσματική μέθοδος.

B. Ανάλυση Αμινοξέων και Προσδιορισμός Αλληλουχίας

Ο προσδιορισμός της σύστασης των αμινοξέων είναι χωρίς αμφιβολία η πιο σημαντική μέθοδος ανάλυσης των συνθετικών πεπτιδίων. Η υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών που προηγείται πρέπει φυσικά να είναι πλήρης. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί διαλύοντας το δείγμα σε υδροχλωρικό οξύ σταθερού βρασμού και θερμαίνοντας το διάλυμα κατά σημείου ξέσεως προτίμηση σε μια σφραγισμένη σε κενό αμπούλα, στους 110° C για 16 ώρες. Μερικά προστατευμένα ενδιάμεσα παράγωγα όμως είναι αδιάλυτα σε 6N HCl ακόμη και στο σημείο βρασμού του. Σ' αυτές τις περιπτώσεις το πρόβλημα μπορεί να λυθεί με μίγματα HCl και μύρμηκικού οξέος. Για την υδρόλυση πεπτιδίων συνδεδεμένων με πολυμερή χρησιμοποιείται συχνά ένα μίγμα HCl-προπιονικού οξέος. Η παρουσία του σουλφοξείδιου της μεθειονίνης στα συνθετικά πεπτίδια απαιτεί ειδική αντιμετώπιση. Κατά την υδρόλυση με HCl η μεθειονίνη και το σουλφοξείδιό της εμφανίζονται στο καταγραφικό του αναλυτή αμινοξέων, αλλά όχι αναγκαστικά στην αναλογία που υπάρχουν στο δείγμα. Το σουλφοξείδιο εν μέρει ανάγεται:

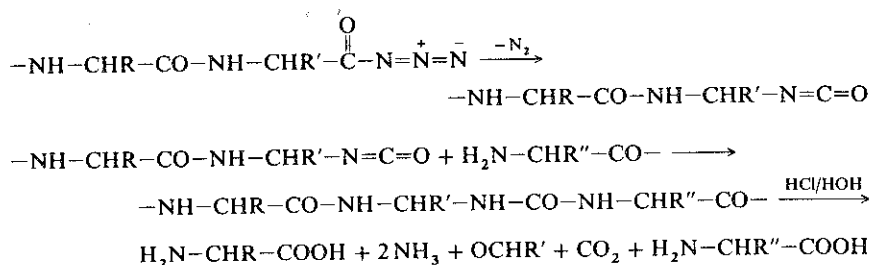


Αφού το χλώριο που δημιουργείται κατά την πορεία μπορεί να καταναλωθεί, για παράδειγμα με χλωρίωση του φαινολικού δακτυλίου της τυροσίνης, αξίζει να προστεθεί ένα μικρό ποσό ενός αναγωγικού μέσου, όπως η β-μερκαπτοαιθανόλη στο μίγμα υδρόλυσης. Σ' αυτή την περίπτωση μόνον μεθειονίνη θα βρεθεί στο υδρόλυμα. Εάν χρειάζονται επίσης πληροφορίες για το σουλφοξείδιο της μεθειονίνης που περιέχεται

στο πεπτιδίο τότε αντί του HCl πρέπει να χρησιμοποιηθεί για την υδρόλυση ένα υδατικό διάλυμα μεθανοσουλφονικού οξέος που αφήνει το σουλφοξείδιο άθικτο.

Για πλήρη υδρόλυση δεσμών μεταξύ αμινοξέων με ογκώδεις παράπλευρες αλυσίδες η παραπάνω αναφερθείσα περίοδος των 16 ωρών δεν είναι επαρκής. Εκτός από την ισολευκίνη και τη βαλίνη τα συνθετικά ενδιάμεσα παράγωγα μπορεί να περιέχουν αμινοξέα με ογκώδεις και σταθερές στα οξέα προστατευτικές ομάδες, όπως η 5-βενζυλοκνυστεΐνη. Αν σ' αυτήν προηγείται ή ακολουθεί ένα ογκώδες αμινοξύ, τότε ο χρόνος υδρόλυσης πρέπει να παραταθεί αξιοσημείωτα. Αφού τα υδροξυαμινοξέα και επίσης η τρυπτοφάνη αποσυντίθενται σταδιακά σ' αυτές τις συνθήκες, πρέπει να γίνουν περισσότερες από μια αναλύσεις με μικρότερους και μεγαλύτερους χρόνους υδρόλυσης.

Κατά την εκτίμηση των αποτελεσμάτων αναλύσεων προϊόντων συμπύκνωσης κλασμάτων δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στα αμινοξέα που υπάρχουν σε ένα μόνον απ' τα πεπτιδία που συζεύγνυνται κατά την αντίδραση. Εάν το καρβοξύλο συστατικό περιέχει το αμινοξύ Α που δεν υπάρχει στο άμινο συστατικό, ενώ συμβαίνει το αντίθετο για το αμινοξύ Β, τότε η παρουσία ισομοριακών ποσοτήτων των αμινοξέων Α και Β στο υδρόλυμα θεωρείται συνήθως σαν απόδειξη επιτυχούς σύζευξης. Φυσικά το συμπέρασμα που προκύπτει από την ανάλυση των "διαγνωστικών" αμινοξέων είναι σίγουρο μόνον όταν υπάρχουν αποδείξεις για την ομοιογένεια του αναλυθέντος δείγματος. Για παράδειγμα η σύζευξη κλασμάτων με τη μέθοδο των αζιδίων (βλ. Κεφάλαιο V) συνοδεύεται συχνά από τη μετάθεση Curtius των αζιδίων με αποτέλεσμα ένα προϊόν συμπύκνωσης που είναι διαφορετικό από το επιθυμητό προϊόν, αλλά μπορεί να έχει "διαγνωστικά" αμινοξέα στην κατάλληλη μοριακή αναλογία. Αντίθετα η απουσία από το υδρόλυμα του αμινοξέος που ενεργοποιήθηκε με τη μορφή αζιδίου είναι απόδειξη μετάθεσης Curtius:



Τέλος η *ανάκτηση* των αμινοξέων του υδρολύματος, δηλαδή τα μοριακά ποσά που βρέθηκαν έναντι του ποσού του δείγματος που υδρολύθηκε, είναι ένα καλό μέτρο του περιεχόμενου πεπτιδίου στο συνθετικό δείγμα. Η αξία αυτής της πληροφορίας δεν πρέπει να υποτιμηθεί. Δείγματα συνθετικών πεπτιδίων περιέχουν αρκετά συχνά υγρασία, οργανικούς διαλύτες και μερικές φορές ακόμη και ανόργανες προσμίξεις. Επίσης δεν είναι ασυνήθιστο ότι το ποσό του οξικού οξέος που βρέθηκε με ανάλυση οξικών αλάτων υπερβαίνει το υπολογισμένο ποσό από τον αριθμό των βασικών κέντρων του μορίου. Γι' αυτό το βάρος ενός δείγματος δεν αποκαλύπτει το πεπτιδικό του περιεχόμενο και η ποσοτική ανάλυση αμινοξέων που αρχίζει με την υδρόλυση ενός ακριβώς ζυγισθέντος ποσού του πεπτιδίου είναι μια απλή και αξιόπιστη μέθοδος προσδιορισμού του.

Σε εργαστήρια όπου χρησιμοποιούνται αυτόματα όργανα προσδιορισμού της αλληλουχίας αξίζει να χρησιμοποιηθούν αυτά για την εξέταση συνθετικών υλικών, ή τουλάχιστον του τελικού προϊόντος μιας σύνθεσης. Ατέλειες της πορείας επιμήκυνσης της αλυσίδας, όπως απουσία ενός αμινοξέος (που μερικές φορές συναντάται στην πεπτιδική σύνθεση στερεάς φάσης) αναγνωρίζονται οπωσδήποτε κατά τον προσδιορισμό της αλληλουχίας.

Γ. Στοιχειακή Ανάλυση

Επειδή οι τιμές που προσδιορίζονται με στοιχειακή ανάλυση δεν είναι πολύ διαφορετικές από πεπτίδιο σε πεπτίδιο οι πληροφορίες που αποκτώνται μ' αυτή την παραδοσιακή μέθοδο δε θεωρούνται συχνά αρκετά σημαντικές ώστε να δικαιολογήσουν τη θυσία χρόνου και ουσίας. Η πείρα εντούτοις δείχνει ότι ενώ οι ακριβείς τιμές της στοιχειακής σύστασης που προσδιορίζονται με καύση δεν είναι πραγματικά ικανές να αποδείξουν την καθαρότητα ενός συνθετικού πεπτιδίου, οι τιμές που δε συμφωνούν με τις υπολογισμένες προειδοποιούν τον ερευνητή και προκαλούν μια πιο λεπτομερή εξέταση ώστε να διευκρινισθούν οι λόγοι αυτής της ασυμφωνίας.

Ένα συχνά συναντώμενο πρόβλημα στη στοιχειακή ανάλυση είναι η εύρεση χαμηλών τιμών για τον άνθρακα και το άζωτο. Εάν συγχρόνως βρεθεί υψηλή τιμή για το υδρογόνο αυτό δείχνει την ύπαρξη υγρασίας στο δείγμα. Ουσίες που ξηραίνονται με λυοφιλοποίηση μπορεί να περιέχουν και 50% νερό που δεν απομακρύνεται με ξήρανση εκτός αν αυτή γίνει σε υψηλή θερμοκρασία και για παρατεταμένη χρονική περίοδο. Το ίδιο συμβαίνει για την απομάκρυνση διαλυτών που παραμένουν σε προστατευμένα και με πεπτίδια. Τα προστατευμένα και ελεύθερα πεπτίδια μπορεί να συμπεριφερθούν σαν υγροσκοπικές ουσίες, όπως συμβαίνει στο βαμβάκι. Αυτό σημαίνει ότι τα ξηρά δείγματα απορροφούν υγρασία από τον αέρα χωρίς να διαλυθούν. Γι' αυτό πρέπει να ζυγισθούν σε κλειστές φιάλες μετά την ξήρανση και να χειρισθούν με αποκλεισμό υγρασίας.

Χαμηλές τιμές για τον άνθρακα και το άζωτο αλλά με σωστή αναλογία C/N και χωρίς υψηλή τιμή για το υδρογόνο προτείνουν την παρουσία ανόργανων προσμίξεων. Ένας τελικός καθαρισμός με χρωματογραφία πηκτής, για παράδειγμα σε κολόνες sephadex είναι γενικά επαρκής για την απομάκρυνση τέτοιων προσμίξεων, αλλά πρέπει να έχουμε υπ' όψη μας ότι τα πεπτίδια είναι καλοί υποκαταστάτες για τα μεταλλικά ιόντα και τα σύμπλοκα είναι συχνά αρκετά σταθερά. Συχνά συναντώμενες προσμίξεις, όπως οξικό οξύ ή τριφθοροοξικό οξύ σε περίσσεια πάνω από το ποσό που εξουδετερώνει τις βασικές ομάδες αναγνωρίζονται με ανάλυση που εκτείνεται σε όλα τα παρόντα στοιχεία. Ένα επιπλέον κέρδος μιας τέτοιας ανάλυσης είναι ο έλεγχος της σύνθεσης, γιατί τα αποτελέσματα πρέπει να προστεθούν πάνω από το 100%. Σε μερικές προβληματικές περιπτώσεις καλό είναι να γίνει ο προσδιορισμός δραστηκών ομάδων, τιτλοδότηση με οξέα ή βάσεις κ.λ.π. Δεν πρέπει να παραβλεφθεί η πιθανή παρουσία χλωριούχων, φθοριούχων ή τριφθορομεθανοσουλφονικών ιόντων που οφείλεται στο οξύ που χρησιμοποιείται για την αποπρόστασία.

Δ. Μέτρηση της Οπτικής Ικανότητας

Ο προσδιορισμός της στροφικής ικανότητας μόνος του δεν παρέχει σημαντικές πληροφορίες για μια συνθετική ουσία. Επίσης η υπόθεση που γίνεται συχνά ότι μεταξύ διαφορετικών παρασκευών του ίδιου πεπτιδίου αυτό με την μεγαλύτερη τιμή στροφικής ικανότητας έχει επίσης και τη μεγαλύτερη οπτική καθαρότητα μπορεί να είναι λανθασμένη. Για παράδειγμα η αφυδάτωση της παράπλευρης αλυσίδας της ασπαργίνης που δίνει β-κυανοαλανίνη συνοδεύεται από μια αξιοσημείωτη αύξηση της στροφικής ικανότητας και η αύξηση αυτή μπορεί να ισοφαρίσει τη μείωση που προκαλείται από ρακεμοποίηση. Θα ήταν λάθος όμως λόγω αυτών των επιφυλάξεων να παραλείψουμε τον προσδιορισμό της οπτικής ικανότητας. Η στροφική ικανότητα είναι μια χαρακτηριστική φυσική σταθερά, συνήθως διαφορετική για διαφορετικά πεπτίδια και η ασυμφωνία μεταξύ αναφερθέντων και ευρεθέντων τιμών προκαλεί επιπρόσθετες έρευνες. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό να συγκρίνουμε τη στροφική ικανότητα ενός συνθετικού πεπτιδίου με εκείνη του φυσικού προϊόντος. Φυσικά όταν ο σκοπός της σύνθεσης είναι η απόδειξη της ορθότητας της προτεινόμενης δομής η σύγκριση αυτή γίνεται απαραίτητη.

Για τον προσδιορισμό της οπτικής ικανότητας πρέπει γενικά να χρησιμοποιούνται συνθήκες (θερμοκρασία, συγκέντρωση, διαλύτης) που να μην είναι πολύ διαφορετικές από εκείνες που αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Σε υδατικά διαλύματα το pH έχει μεγάλη επίδραση στα αποτελέσματα. Η στροφική ικανότητα των πεπτιδίων μπορεί να αλλάξει δραστικά με προσθήκη οξέων ή βάσεων. Η τιμή που προσδιορίστηκε για ένα δείγμα οξικής λυσινο-βασοπρεσίνης υπέστη ουσιαστική αλλαγή όταν αυτό ξηράνθηκε σε υψηλή θερμοκρασία. Αυτό το παράξενο φαινόμενο ήταν απλώς συνέπεια της απώλειας ενός ισοδύναμου οξικού οξέος κατά την ξήρανση. Η ασυμφωνία εξαφανίστηκε όταν χρησιμοποιήθηκε οξικό οξύ αντί του νερού σαν διαλύτης για τον προσδιορισμό. Τα προβλήματα και οι αντιλογίες που συναντώνται κατά τον προσδιορισμό της στροφικής ικανότητας μπορούν μερικές φορές να επιλυθούν επεκτείνοντας την εξέταση από την ανάγνωση σ' ένα απλό μήκος κύματος στην καταγραφή του φάσματος οπτικής στροφικής διασποράς.

Ε. Φάσματα Απορρόφησης Υπερύθρου και Υπεριώδους

Τα φάσματα υπερύθρου είναι χρήσιμα για την εξέταση μικρού μοριακού βάρους ενδιάμεσων παραγώγων, όπως προστατευμένα και ενεργοποιημένα παράγωγα αμινοξέων. Η διέγερση δόνησης για το ουρεθανικό καρβονύλιο (περίπου 1700 cm^{-1}) διακρίνεται από εκείνη της ενεργοποιημένης καρβονυλομάδας (πάνω από 1800 cm^{-1}). Επίσης αλλαγές στο φάσμα ir χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη μετασχηματισμών σε πολυμερικά υποστηρίγματα. Για παράδειγμα η μετατροπή του χλωρομεθυλιωμένου συμπολυμερούς στυρολίου-διβινυλοβενζολίου στο ακετοξυ παράγωγο ακολουθείται από την εμφάνιση και ανάπτυξη της κορυφής εστερικού καρβονυλίου, ενώ η επακολουθούσα σαπωνοποίηση από τη βαθμιαία εξαφάνιση της ίδιας κορυφής απορρόφησης.

Λιγότερο αποκαλυπτικά είναι τα φάσματα ir μεγαλύτερων πεπτιδικών μορίων. Εάν δε διατίθενται ειδικά όργανα, όπως υψηλής διαχωριστικής ικανότητας φασματοφωτόμετρα μετασχηματισμού Fourier, η μεγάλη αμυδκή απορρόφηση επικαλύπτει άλλες καρβονυλικές συχνότητες. Σε μερικές ειδικές περιπτώσεις όμως τα φάσματα ir μπορούν να δώσουν μοναδικές πληροφορίες. Για παράδειγμα η εστεροποίηση του φαινολικού υδροξυλίου της τυροσίνης με θειϊκό οξύ αποκαλύπτεται καλλίτερα από το χαρακτηριστικό φάσμα ir των θειϊκών εστέρων το οποίο σαφώς διακρίνεται από το φάσμα των σουλφονικών παραγώγων που είναι τα κύρια παραπροϊόντα της πορείας σούλφωσης.

Τα φάσματα υπεριώδους παρέχουν εξαιρετικές πληροφορίες για τα αμινοξέα τυροσίνη και τρυπτοφάνη ακόμη και σε μεγάλα πεπτίδια. Σε ουδέτερο διάλυμα τα μέγιστα των κύριων περιοχών απορρόφησης των αρωματικών χρωμοφώρων των δύο αμινοξέων είναι πολύ κοντά το ένα με το άλλο ώστε δεν μπορεί να γίνει σαφής διάκριση μεταξύ τους. Με προσθήκη όμως αλκάλειας ή μιας οργανικής βάσεως το φαινολικό υδροξύλιο της παράπλευρης αλυσίδας της τυροσίνης μετατρέπεται εύκολα σε φαινολικόν ιόν. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την μετατόπιση κατά 20 nanometers του μέγιστου απορρόφησης προς το ορατό. Έτσι είναι δυνατόν να προσδιορισθούν τα ποσά της τυροσίνης και της τρυπτοφάνης σε πεπτίδια απλώς με εξέταση του φάσματος uv . Τα άλλα χρωμοφόρα στις παράπλευρες αλυσίδες των αμινοξέων είναι ασθενή για απλές μελέτες, αλλά απουσία τυροσίνης και τρυπτοφάνης μπορεί να προσδιορισθεί η απορρόφηση της παράπλευρης αλυσίδας της φαινυλαλανίνης και σε μερικά πεπτίδια επίσης οι δισουλφιδικές γέφυρες. Μερικές προστατευτικές ομάδες συμβάλλουν περισσότερο στην απορρόφηση στο uv . Έτσι η νιτρο ομάδα της νιτροαργινίνης και το φλουορενυλο σύστημα στα Fmoc παράγωγα είναι ισχυρά χρωμοφόρα και σίγουρα δεν πρέπει να παραβλεφθούν κατά την εξέταση των πεπτιδικών παραγώγων με φασματοφωτομετρία uv .

ΣΤ. Φάσματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

Η αξία της υψηλής διαχωριστικής ικανότητας φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (nmr) και των δύο διαστάσεων φασμάτων nmr έχει τονισθεί στο κεφάλαιο IV. Η προσπάθεια που απαιτείται για την καταγραφή και εξήγηση αυτών των φασμάτων δε δικαιολογείται αναγκαστικά για την εξέταση των συνθετικών πεπτιδίων. Οι πληροφορίες όμως που μπορεί να αποκτηθούν για τα συνθετικά ενδιάμεσα και τελικά προϊόντα με την πρωτονιακή φασματοσκοπία nmr με απλά όργανα και σε λίγο χρόνο δεν πρέπει να υποτιμηθούν. Ορισμένα προστάτευμένα πεπτίδια ιδιαίτερα διατίθενται για ανάλυση με φάσματα nmr. Ο συντονισμός των αρωματικών βενζυλομάδων και βενζυλοξυκαρβονυλομάδων όταν συγκρίνεται με τις ευδιάκριτες κορυφές των tert-βουτυλομάδων παρέχει αποδείξεις για την επιτυχία μιας αντίδρασης σύζευξης. Οι καλά διαχωρισμένες αρωματικές κορυφές που αντιπροσωπεύουν πρωτόνια του ιμιδαζολικού δακτυλίου της ιστιδίνης ή του ινδολικού πυρήνα της τρυπτοφάνης ταυτοποιούνται χωρίς δυσκολία. Είναι λιγότερο απλό να ταυτοποιήσουμε τις συχνότητες συντονισμού των ομάδων OH ή NH ή τις κορυφές των υδρογόνων που

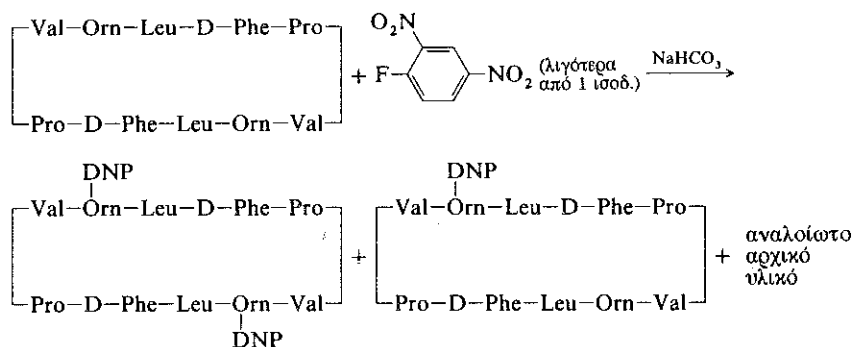
συνδέονται με α - ή β - άτομα άνθρακα των αμινοξέων. Μια εξαίρεση παρουσιάζεται με τα μεθυλο πρωτόνια της αλανίνης όπου η μεθυλομάδα επειδή είναι κοντά στην περιοχική δέκτη ηλεκτρονίων του πεπτιδικού σκελετού αναγνωρίζεται εύκολα σαν μια διπλή κορυφή μετατοπισμένη σε χαμηλότερο πεδίο από τους συντονισμούς άλλων μεθυλομάδων. Δεν είναι πάντοτε απλό να αναλυθούν τα διάφορα άλλα μεθυλικά πρωτόνια στο φάσμα μεγαλύτερων πεπτιδίων, αλλά τουλάχιστον μπορεί να προσδιορισθεί το άθροισμά τους με ολοκλήρωση της σύνθετης κορυφής και η τιμή αυτή, συγκρίνεται με την τιμή μιας κορυφής αναφοράς. Στα πεπτίδια που περιέχουν μεθειονίνη η S-μεθυλομάδα είναι ιδιαίτερα κατάλληλη για τέτοια σύγκριση.

Ένα συχνά συναντώμενο πρόβλημα κατά την καταγραφή των φασμάτων nmr προστατευμένων πεπτιδίων είναι να βρεθεί ο κατάλληλος διαλύτης (εκτός αν μελετηθούν φάσματα σε στερεή κατάσταση). Αν και το CDCl_3 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μικρά προστατευμένα πεπτίδια τα περισσότερα των δειγμάτων δε διαλύονται επαρκώς στο δευτεριωμένο χλωροφόρμιο. Το δευτεριωμένο διμεθυλοφορμαμίδιο και διμεθυλοσουλφοξείδιο είναι πιο εύχρηστα, αλλά οι χημικές μετατοπίσεις είναι μάλλον διαφορετικές από εκείνες που παρατηρούνται σε CDCl_3 . Αυτό συμβαίνει ακόμη περισσότερο σε τριφθοροξικό οξύ, έναν εξαιρετικό διαλύτη για τα περισσότερα ενδιαμέσα παράγωγα αλλά προφανώς όχι αδρανής ως προς αυτά. Ένας καλός συμβιβασμός μπορεί να βρεθεί με τη χρήση πλήρως δευτεριωμένου οξικού οξέος, CD_3COOD . Οι χημικές μετατοπίσεις που βρέθηκαν σε αυτό το διαλύτη είναι αρκετά κοντά με εκείνες που καταγράφηκαν σε CDCl_3 και ένα πρόσθετο όφελος είναι η αξιοσημείωτη απλοποίηση του φάσματος που οφείλεται στην ανταλλαγή των αμιδικών και υδροξυλικών πρωτονίων με το ιονιζόμενο άτομο δευτερίου του διαλύτη. Εάν είναι επιθυμητή μια σύγκριση με ένα φάσμα στο οποίο δεν έγινε καμιά ανταλλαγή μπορεί να χρησιμοποιηθεί το CD_3COOH .

Τα αποπροστατευμένα πεπτίδια είναι συνήθως διαλυτά στο νερό, έτσι το D_2O είναι ένας πρακτικός διαλύτης για την καταγραφή των nmr φασμάτων τους. Εάν είναι αναγκαίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί και το CD_3COOD . Εάν ένα δείγμα είναι αδιάλυτο και στο νερό και στο οξικό οξύ, τότε μια λύση στο πρόβλημα είναι η χρήση μίγματος D_2O και CD_3COOH . Η κάπως ανώμαλη κορυφή του DHO που οφείλεται στη μερική ανταλλαγή πρωτονίων από το D_2O μπορεί να ελαττωθεί ή να εξαλειφθεί προκαλώντας πλήρη ανταλλαγή με συμπίκνωση και επαναδιάλυση του δείγματος σε νέο διαλύτη. Μια σημαντική πληροφορία από το φάσμα nmr των τελικών προϊόντων είναι η απουσία συντονισμού η οποία αντιστοιχεί σε προστατευμένες ομάδες. Έχουν αναφερθεί αρκετές περιπτώσεις στη βιβλιογραφία όπου κάποιες προστατευτικές ομάδες δεν μπόρεσαν να απομακρυνθούν στις συνήθως εφαρμοζόμενες συνθήκες. Μια βενζυλομάδα μπορεί να παραμείνει επίμονα στην υδροξυλομάδα της θρεονίνης ή στο ιμιδαζολικό άζωτο της παράπλευρης αλυσίδας της ιστιδίνης. Τέτοιες ατέλειες παρουσιάζονται με μεγάλη σαφήνεια στο πρωτονιακό φάσμα nmr των ελεύθερων πεπτιδίων. Δε χρειάζεται να ληχθεί ότι επιπρόσθετες χρήσιμες πληροφορίες μπορεί να ληφθούν με τη βοήθεια φασμάτων άνθρακα-13 ή με φασματοσκοπία nmr βασισμένη σε άλλους πυρήνες, αλλά τα πρωτονιακά φάσματα nmr είναι γενικά επαρκή για τη λεπτομερή εξέταση των περισσότερων ενδιαμέσων και τελικών προϊόντων της πεπτιδικής σύνθεσης.

Z. Προσδιορισμός Μοριακού Βάρους

Το μοριακό βάρος των συνθετικών πεπτιδίων είναι συνήθως καθορισμένο. Αξιοσημείωτες εξαιρέσεις αποτελούν τα κυκλικά πεπτίδια γιατί κατά την πορεία σχηματισμού του δακτυλίου μπορεί να γίνει αντί της απλής κυκλοποίησης και κυκλοδιμερισμός. Οι λόγοι αυτού του καλά μελετημένου φαινομένου συζητήθηκαν σε σχέση με τη σύνθεση κυκλικών πεπτιδίων (Κεφάλαιο IX). Ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους με τη βοήθεια φασμάτων μάζας φαίνεται να είναι ένας απλός τρόπος απάντησης των ερωτήσεων για την ύπαρξη ή απουσία του κυκλοδιμερισμού, αλλά τα αποτελέσματα είναι λιγότερο σαφή απ' ό,τι θα αναμενόταν. Το μικρότερου μοριακού βάρους προϊόν της απλής κυκλοποίησης μπορεί να είναι παρόν απλώς σαν πρόσμιξη, εντούτοις λόγω της μεγαλύτερης πτητικότητας και της καλλίτερης θερμικής σταθερότητας μπορεί να εμφανισθεί σαν το κύριο συστατικό. Λόγω της αυτο-συσσωμάτωσης των πεπτιδικών μορίων και η διήθηση από πηκτή και η κατακάθιση στην υπερχυρόκεντρο δεν μπορούν να είναι πλήρως αξιόπιστες για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους των πεπτιδίων. Μέθοδοι που βασίζονται στον αριθμό των σωματιδίων (ταπείνωση του σημείου τήξεως, αύξηση του σημείου ζέσεως, ωσμωτική πίεση) μπορεί να δώσουν παρομοίως παραπλανητικά αποτελέσματα με πεπτίδια που έχουν την τάση για συσσωμάτωση. Η κατάσταση περιπλέκεται περισσότερο σε ενώσεις με ιονιζόμενες ομάδες όπως ελεύθερες καρβοξύλο, αμινο ή γονανιδινομάδες. Εάν τα αντίθετα ιόντα θα εμφανισθούν ή όχι σαν ξεχωριστά σωματίδια εξαρτάται από το διαχωρισμό τους ο οποίος με τη σειρά του είναι συνάρτηση του διαλύτη που χρησιμοποιείται για τη μελέτη. Αυτό το είδος των περιπλοκών αποφεύγεται με μια "χημική" προσέγγιση, τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους με τη μέθοδο της μερικής υποκατάστασης. Η αξία της αποδείχθηκε στις έρευνες της γραμισιδίνης S (Battersby και Craig 1951). Κατεργασία με λιγότερο από ένα ισοδύναμο 2,4-δινιτροφθοροβενζολίου έδωσε ένα μίγμα μη υποκατεστημένων, μονοϋποκατεστημένων και διϋποκατεστημένων πεπτιδίων. Τα δινιτροφαινυλο (DNP) παράγωγα διαχωρίστηκαν και προσδιορίστηκε η απορρόφηση στο υπ της μονοϋποκατεστημένης ένωσης. Το μοριακό βάρος υπολογίστηκε στη συνέχεια με τη βοήθεια του γνωστού μοριακού συντελεστή απορρόφησης της 2,4-δινιτροφαινυλο ομάδας:



Με κατάλληλες τροποποιήσεις η μέθοδος μπορεί να εφαρμοσθεί για κάθε πεπτίδιο που μπορεί να επισημανθεί με ένα χρωμοφόρο.

Αναφορές

Battersby, A. R., Craig, L.C.: J. Amer. Chem. Soc. 73, 1887 (1951); cf. also *ibid.* 74, 4023 (1952)

Περαιτέρω Βιβλιογραφία

Benson, J.R., Louie, P.C., Bradshaw, R.A.: Amino Acid Analysis of Peptides, in: The Peptides, Vol. 4, Gross, E., Meienhofer, J., eds. pp. 217-260, New York, Academic Press 1981

Stein, S.: Ultramicroanalysis of Peptides and Proteins by High-performance Liquid Chromatography and Fluorescence Detection, in: The Peptides, Vol.4, Gross, E., Meienhofer, J., eds. pp. 261-283. New York, Academic Press 1981

Ευρετήριο

- αγγειοτενσίνη 6,129,131
αδαμαντυλοξυκαρβονυλομάδα 98,100
αζίδια οξέων 56,57,133,142,147
αξιδομυρμηκικός tert.βουτυλεστέρας 81
αζλακτόνες 20,56,118,119,123,125
αιθυλεστέρες 85,86,107
S-αιθυλοκαρβαμδική ομάδα 92
αιθυλομερκαπτάνη 92
N-αιθυλομορφολίνη 125
EEDQ βλέπε 1-αιθυλοξυκαρβονυλο-2-αιθυλοξυ-1,2-διϋδροκινολίνη
1-αιθυλοξυκαρβονυλο-2-αιθυλοξυ-1,2-διϋδροκινολίνη 66,126
αιθυλοξυκαρβονυλο-γλυκυλο-γλυκίνο αιθυλεστέρας 75
N-αιθυλοπιπεριδίνη 116,125
S-ακεταμιδομεθυλομάδα (Acm) 93
ακετοΐμιδιλίωση 146
ακετυλαμινομηλονικός διαιθυλεστέρας 2
ακετυλαμινο οξέα 5,28,119
ακετυλίωση 26,58,74
—, μερική 88
O-ακετυλίωση 164
ακετυλο-D-αλλοΐσολευκυλο-γλυκίνο αιθυλεστέρας 123
ακετυλοΐμιδαζόλιο 169
ακετυλο-L-ισολευκυλο-γλυκίνο αιθυλεστέρας 123
N^ε-ακετυλολυσίνη, υδρολάση 84
ακετυλομάδα 16,74
ακετυλο-φαινυλαλανυλο-αλανίνο μεθυλεστέρας 124
ακυλαμινοακυλο-αμινοακυλο-υδραζίδια 71
ακυλάση 5
O-ακυλίωση 88,100
N-ακυλο-γλουταμίνες 109
ακυλο-δικοτοπιπεραζίνες 107
ακυλοΐμιδαζόλια 178
O-ακυλοΐσοουρίας ενδιάμεσα 64,120,126,142,143,161,162
ακυλο-κατιόνια 111
O-ακυλο-1-υδροξυβενζοτρίαζόλιο 66
ακυλοξυ-φωσφονικά ενδιάμεσα παράγωγα 72
N-ακυλοουρίας παράγωγα 66,143,161,162
αλανίνη 27,122,125,130,141
β-αλανίνη 4
L-Ala-D-Ala-L-Ala-L-Ala 124
L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala 125
αλδεΐδες 167
— από ακυλο-προλινό παράγωγα 113
αλκυλίωση 37,76,90,94,103,160,168
O-αλκυλο-ισοουρία 164
S-αλκυλο-κυστεΐνη 119,122
αλκυλοξυκαρβονυλοαμινοξέων χλωρίδια 136
αλκυλοξυκαρβονυλομάδα 56
αλλοΐσολευκίνη 124
αλλυλεστέρες 86
cis-αμίδια 106
αμινο-συστατικό 54
α-αμινοαδιπικό οξύ 4
αμινοαιθυλίωση 29
O-αμινοακυλο-σαλικυλαμίδια 71
αμινοαλκοόλες 20
S-p-αμινοβενζυλομάδες 93
2-αμινοεπτανοϊκό οξύ 2
αμινοηλεκτρικά πεπτίδια 110
αμινόλυση ενεργών εστέρων 61
αμινομεθυλο ρητίνες 156,157
D-αμινοξέα 145
αμινοξέα, εστέρες p-τολουολοσουλφονικών αλάτων 85
αμινοξέα με στερεοχημική παρεμπόδιση 141

- 6-αμινοπενικιλανικό οξύ (6-APA) 8
 αμινοπεπτιδάση M 21, 121
 αμινοπεπτιδάσες 125
 αμμωνιόλυση 108, 153, 157, 167
 — εστέρων 60
 Amberlyst-15 173
 αμπικιλίνη 8
 αναγωγή με νάτριο σε υγρή αμμωνία 90, 91
 ανιλίδια ακυλαμινοξέων 68
 ανισόλη, αντίδραση Friedel-Crafts 112
 αντίδραση Friedel-Crafts 110, 163
 αντιδραστήριο Bates 67
 ανυδρίτες καρβοξυλικών οξέων 58
 ανυδρίτης κιτρακονικού οξέος 201
 ανυδρίτης Leuchs βλέπε N-καρβοξυ
 ανυδρίτες
 αποικοδόμηση Edman 20, 22, 23, 27, 28, 30, 31
 αποκαρβοξυλίωση 75, 137
 β-απόσπαση 78, 87, 119
 αργινίνη 21, 29, 30, 96
 Arg-Asp, δεσμός 29
 αρχή της αραιώσης 141, 142
 αρχή της περίσσειας 116, 128
 αρωματική ηλεκτρονιόφιλη υποκατάσταση 112
 αρωματικοί πυρήνες, κορεσμός 113
 ασπαργίνη 32, 103-105, 121, 186
 ασπαραγινικά παράγωγα 32, 165
 ασπαραγινικό οξύ 15, 31, 32, 85, 130, 131
 β-ασπαραγινυλο πεπτίδια 109
 Asp-Arg αλληλουχία 130
 Asp-Gly μερική αλληλουχία 109
 Asp-Pro δεσμός 31
 ασπαράμη 70
 ασύμμετρη σύνθεση, επαγωγικά 72
 ασύμμετροι ανυδρίτες βλέπε μικτοί
 ανυδρίτες
 αφαίρεση πρωτονίου 109
 — —, ενδομοριακή 120, 123
 βαλίνη 13, 114, 122, 130, 141, 153, 184
 Val-Tyr 130
 βασοπρεσσίνη 17, 135
 O-βενζοτρίαζολυλο-N-οξυτριμεθυλαμινο-
 φωσφονυλο εξαφθοροφωσφορικό άλας
 (αντιδραστήριο BOP) 67
 O-βενζοτρίαζολυλο-τετραμεθυλοϊσοουρο-
 νυλο εξαφθοροφωσφορικό άλας (HBTU)
 67
 βενζοϋλίωση 74
 βενζοϋλο-λευκυλο-γλυκίνο αιθυλεστέρας
 122, 123
 βενζοϋλομάδα 123
 βενζυδρυλαμίνες 166
 βενζυδρυλαμινο ρητίνες 157
 βενζυδρυλο, βλέπε διφαινυλομεθυλο
 βενζυδρυλομάδα 104
 βενζυλαιθέρες 90, 165
 βενζυλαμίνη, παράγωγα 157
 βενζυλεστέρας 107, 150, 156, 165
 βενζυλική αλκοόλη 153
 C-βενζυλίωση 112
 β-βενζυλο ασπαραγινικά παράγωγα 110
 βενζυλο βρωμίδιο 76, 94, 101, 112
 N^π-βενζυλο-ιστιδίνη 102
 N^ε-βενζυλο-ιστιδίνη 102
 βενζυλο κατιόν 76
 —, αποσταθεροποίηση 83
 S-βενζυλο-L-κυστεΐνη 90, 125, 184
 S-βενζυλο-ομοκυστεΐνη 95
 O-βενζυλο-σερίνη 120
 S-βενζυλομάδα 91, 111, 165
 N^{im}-βενζυλομάδα 101
 βενζυλομάδες 77, 91, 187
 —, μετάθεση 89
 βενζυλομερκαπτάνη 119
 S-βενζυλομερκαπτο-κυστεΐνη 93
 βενζυλοξυκαρβονυλο αμινοξέα 150
 βενζυλοξυκαρβονυλο-αλανυλο-αλανυλο-
 αλανυλο-αλανινο βενζυλεστέρας 124
 βενζυλοξυκαρβονυλο-L-ασπαραγινικό οξύ
 70
 N-βενζυλοξυκαρβονυλο-S-βενζυλο-DL-
 κυστεΐνη θειοβενζυλεστέρας 119
 βενζυλοξυκαρβονυλο-γλυκυλο-αλανυλο-
 λευκίνο βενζυλεστέρας 124

- βενζυλοξυκαρβονυλο-γλυκυλο-προλιν
 p-νιτροφαινυλεστέρας 107
 βενζυλοξυκαρβονυλο-γλυκυλο-φαινυλαλα-
 νυλο-γλυκίνο αιθυλεστέρας 123
 N-βενζυλοξυκαρβονυλο-ιστιδίνη 101
 βενζυλοξυκαρβονυλο-λευκυλο-φαινυλα-
 λανινο tert.βουτυλεστέρας 124
 βενζυλοξυκαρβονυλο ομάδα 7,75-77,82,
 90,91,98,100,101,103,108,113,119,134,
 146,150,162,187
 S-βενζυλοξυκαρβονυλο ομάδα 92
 N^α-βενζυλοξυκαρβονυλο-N^π-φαινακυλο-L-
 ιστιδίνη 102
 βενζυλο χλωρίδιο 37,86,136
 βήμα προς βήμα επιμήκυνση αλυσίδας
 βλέπε βήμα προς βήμα στρατηγική
 βήμα προς βήμα στρατηγική 132,149,175
 BOC-ανυδρίτης, βλέπε tert.βουτυλεστέρας
 του πυροκαρβονικού οξέος
 BOC-Cl αντιδραστήριο 67
 BOP-αντιδραστήριο, βλέπε βενζοτριάζολυ-
 λο-N-οξυτρι-διμεθυλαμινο-φωσφονυλο-
 εξαφθοροφωσφορικό άλας
 βοηθητικά πυρηνόφιλα 65,66,103,132
 βομβαρδισμός με ταχεία άτομα 27
 tert.βουτυλαιθέρες 84,90
 tert.βουτυλεστέρας του πυροκαρβονικού
 οξέος (δικαρβονικού οξέος) 82
 tert.βουτυλεστέρας του τριφθοροξικού
 οξέος 94,112,158,178
 tert.βουτυλεστέρες 84,86,107
 β-tert.βουτυλεστέρες του ασπαργινικού
 οξέος 115
 S-tert.βουτυλομάδα 91
 tert.βουτυλομάδες 77
 tert.βουτυλοξυκαρβονυλο-ασπαργινο
 p-νιτροφαινυλεστέρας 163
 N^α-tert.βουτυλοξυκαρβονυλο-N^π-βενζυλο-
 ξυμεθυλο-ιστιδίνη 102
 tert.βουτυλοξυκαρβονυλο-γλουταμινο p-
 νιτροφαινυλεστέρας 163
 tert.βουτυλοξυκαρβονυλομάδα 7,78,82-84,
 92,94,98,100,103,150,155,158,159,162
 N^π-tert.βουτυλοξυκαρβονυλο τρυπτοφάνη
 103
 βραδυκινίνη 6
 βρωμιούχο νερό 32,95
 N-βρωμοηλεκτρίμιδιο 32
 βρωμοφαινόλη, μπλέ 170
 γαστρίνη 6
 γέφυρες αλάτων 44
 γλουκαγόνο 44
 γλουταμίνη 103-105,110,167
 —, N-τελική 16
 γλουταμινικό οξύ 85
 γλουταριμίδιο 109,141
 γλυκίνη 15,21,107,108,115,117,125,141
 1-γουανιδινο-3,5-διμεθυλοπυραζόλιο 99
 γουανυλίωση 99
 γουανιδινο παράγωγα 96-98,111,183
 δέκτες 92
 δεσμοί υδρογόνου 40-42
 δευτεροταγής δομή 16,42,43
 δευτεροταγής-τριτοταγής δομή 43
 δεψιπεπτίδια 143
 2-δι-p-νιτροφαινυλο-αιθυλοξυκαρβονυλο-
 μάδα 80
 διαγνωστικά αμινοξέα 184
 διαγράμματα Debye 49
 διαγράμματα Ramachandran 40
 διαζωκετόνες 145
 διαζωμεθάνιο 20,145
 διαιθυλαμίνη 79
 διακλάδωση στο β-άτομο άνθρακα 145
 διακλάδωση των πεπτιδικών αλυσίδων 82
 διακυλο αμίνες 115
 διαλυτά πολυμερή 171
 διανιόντα 118
 διβενζοφουλβένιο 79,180
 διβενζυλεστέρας του καρβονικού οξέος 81
 διβινυλοβενζόλιο 153
 διέδρες γωνίες των πεπτιδικών δεσμών
 14,39
 διθειοερυθρίτολη 37
 διθειοθρεϊτόλη 37

- διύσοπροπυλαμίνη 116,125
 διύσοπροπυλοκαρβοδιϊμίδιο 160
 διύδοεθάνιο, οξείδωση 139
 -DKP βλέπε δικετοπιπεραζίνη
 2,5-δικετοπιπεραζίνες (DKP-s) 86,106,
 107,169,182
 DCC, DCCI βλέπε δικυκλοεξυλο-
 καρβοδιϊμίδιο
 δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμίδιο 7,63,66,68,
 150,154,160,173
 DCU βλέπε N,N'-δικυκλοεξυλουρία
 N,N'-δικυκλοεξυλουρία (DCU) 65,160,162,
 182
 4,4-διμεθοξυβενζυδρυλομάδα 104
 3,5-διμεθοξυφαινυλοϊσοπροπυλοξυκαρβο-
 νυλο (Ddz) ομάδα 158
 διμεθυλαμινοαιθανόλη 88
 5-διμεθυλαμινο-ναφθαλινο-2-σουλφονυλο
 χλωρίδιο (danzyλ χλωρίδιο) 18,45
 4-διμεθυλαμινοπυριδίνη 103,144,154
 N,N-διμεθυλοφορμαμίδικό χλωρίδιο 56
 διμερή, παράλληλα 140
 —, αντιπαράλληλα 140
 2,4-δινιτροφαινόλη 116
 2,4-δινιτροφαινυλο αμινοξέα (DNP-αμι-
 νοξέα) 18
 — υδραζίδια οξέος 19
 — παράγωγα 18,189
 N^{im}-2,4-δινιτροφαινυλο-ιστιδίνη 100,101
 2,4-δινιτροφθοροβενζόλιο 17,19,117,189
 δισουλφίδια 34,90,92
 —, κυκλικά 138
 δισουλφιδικές γέφυρες 34,43,138,139,144
 διϋδροαλανίνη 4
 διϋδρο-α-αμινοβουτυρικό οξύ (διϋδρο-
 βουτυρίνη) 4
 4,5-διϋδρο-οξαζολ-5-όνες 118
 διφαινυλοϊσοπροπυλοξυκαρβονυλο (Broc)
 ομάδα 77,84,155
 S-διφαινυλομεθυλο (βενζυδρυλο) ομάδα 92
 διφαινυλο-4-πυριδυλομεθυλο ομάδα 102
 διφαινυλοφωσφινυλο ομάδα 78
 διφαινυλοφωσφορδυλο αζίδιο 57
 δομική ελευθερία 45
 —, παράμετροι 45,51
 δότες υδρογόνου
 α-έλικά 40,41,43,44,46,49
 ελικοειδή αμινοξέα 50
 ελλειπείς αλληλουχίες 116,168,169
 β-ενδορφίνη 6
 ενεργοί εστέρες 7,60,68,132,143,160,166,
 169,175,178
 — —, αδιάλυτων πολυμερών 176,178
 ενολοποίηση 120
 εξαϋδροπυροσίνη 113
 εξαϋδροφαινυλαλανίνη 113
 εξωπεπτιδάσες 21,28,121
 επτυλεστέρες 88
 εστεροποίηση 14,85,177
 Z-ομάδα, βλέπε βενζυλοξυκαρβο-
 νυλομάδα
 ηλεκτρολυτική αναγωγή 174
 ημιμόνιμη προστασία 74
 θειαζολιδινόνες 23,24
 θειοαιθέρες 112,140
 θειοανισόλη 76,165
 θειογλυκολικό οξύ 94
 θειόλες 101,159
 θειόλυση 78
 θειολυσίνη 30
 θειονυλο χλωρίδιο 56,85
 θερμολυσίνη 30,70
 θρεονίνη 69,88,90,117
 θρομβίνη 31
 θρυψίνη 28-31,70,88,147
 ιμιδαζολιδινόνες 167
 ιμιδαζόλιο 100,102,183
 — παράγωγα 126
 ινδολικός πυρήνας 188
 ινσουλίνη 5,7,35,44,69
 ινσουλίνη χοίρου χωρίς αλανίνη 69
 ιξωδομετρία 45
 ιονικές δυνάμεις 50

- ισοβουτένιο 86
 ισοβουτυλοξυκαρβονικά οξέα, μικτοί ανυδρίτες 59
 IIDQ βλέπε 1-ισοβουτυλοξυκαρβονυλο-2-ισοβουτυλοξυ-1,2-διϋδροκινολίνη
 1-ισοβουτυλοξυκαρβονυλο-2-ισοβουτυλοξυ-1,2-διϋδροκινολίνη 66
 ισοκυανικοί εστέρες 57
 ισολευκίνη 26,62,114,117,122,124,141,153
 ισοουρικά παράγωγα 120
 ιστιδίνη 30,100-102,126,130,188
 ιώδιο σε μεθανόλη, οξειδωση 92
 ιωδοξικό οξύ 37
- καίσιο, άλατα 86
 καλλιδίνη 6
 καλσιτονίνη 6
 καρβαμιδικά οξέα 75,79,136
 καρβοβενζοξυ ομάδα, βλέπε βενζυλοξυ-καρβονυλο ομάδα
 καρβοδιϊμίδια 64,120,126,142,143,174
 —, διαλυτά στο νερό 172
 καρβολινικά παράγωγα 114
 καρβονυλοδιϊμιδαζόλιο 66,143,154
 NCA βλέπε N-καρβοξυανυδρίτες
 N-καρβοξυανυδρίτες 56,136,137
 καρβοξυπεπτιδάση Y 21,70,121
 καρβοξυπεπτιδάσες 21,69,88
 καρβοξυπεπτιδάσες A και B 21
 καρβοξυ συστατικό 54
 καταλυτική υδρογόνωση 75,76,82,86,97, 101,103,113,128,134,136, 174
 κετόνες 167
 4-κετοπιτεκολινικό οξύ 4
 κινολίνη 67
 κορτικοτροπίνη 6
 κρεσόλες 166
 m-κρεσόλη 91
 κρυσταλλογραφία ακτίνων X 39,40,45, 48-50
 κυανιούχο κάλι 35
 β-κυανοαλανίνη 163,196
 γ-κυανο-α-αμινοβουτυρικό οξύ 163
 κυανο μεθυλεστέρες 60
- κυκλικά δισουλφίδια 34,37
 κυκλικά πεπτιδια 27,34,37,178
 — —, ετεροδετικά 140,143,144
 — —, ομοδετικά 140,141
 κυκλικός διχρωϊσμός 45,46
 κυκλο-κυστίνη 144
 κυκλοδιμερισμός 89,140
 κυκλοεξαδιένιο σαν δότης υδρογόνου 76, 97
 κυκλοεξάνιο σαν δότης υδρογόνου 76
 κυκλοεξυλο ομάδα 89
 κυκλοποίηση 108,135,138,111-143,145, 167,169,189
 —, γλουταμινο αμινοξέων 109
 κυστεαμίνη 36
 κυστεϊκό οξύ 29,36
 κυστεΐνη 29,36,83,94,139,164
- λακτάμες 97,98
 λακτόνες 140
 λανθιονίνη 4
 λευκιναμινοπεπτιδάση 21,31,121
 λευκίνη 21,26,30,122,130
 λευκίνο-N-καρβοξυανυδρίτης 121
 λευκυλο-φαινυλαλανίνη 121
 LiAlH₄ 20
 LiBH₄ 20
 λιπάσες 88
 λυσίνη 26,29,82,83
 λυσίνο-βασοπρεσίνη 134
 L-λευκυλο-L-αλανυλο-γλυκίνο-L-βαλίνη 149
 Leu-εγκεφαλίνη
- μαλειύλωση 146
 μαλφορμίνη 144
 μεθανόλυση 157
 μεθανοσουλφονικό οξύ 13,159,184
 μεθειονίνη 21,30,34,36,83,94,112,183
 — σουλφόνη 36,94
 — σουλφοξείδιο 36,83,94,95
 μέθοδος αζιδίων 174,184
 μέθοδος Edman-dansyl 25
 μέθοδος νιτροφαινυλεστέρα 62

μέθοδος οξειδωσης-αναγωγής 72
 μέθοδος Stein-Moore ανάλυσης
 αμινοξέων 124
 μέθοδος τεσσάρων κέντρων συμπίκνωσης
 (4CC) 71
 p-μεθοξυβενζυλεστέρες 86
 S-p-μεθοξυβενζυλομάδα 91
 p-μεθοξυβενζυλοξυκαρβονυλομάδα 77
 S-μεθοξυκαρβονυλοσουλφενυλο ομάδα
 139
 μεθοξυκαρβονυλοσουλφενυλο χλωρίδιο
 139
 p-μεθοξυφαινυλοσουλφονυλο ομάδα 99
 μεθυλεστέρες 60,85,86,107,151
 C-μεθυλίωση 27
 N-μεθυλο αμινοξέα 122
 β-μεθυλο-ασπαργινικό οξύ 4
 4-μεθυλοθειοφαινόλη 77,112
 μεθυλο ιωδίδιο 26,27
 CD₃I 27
 μεθυλο κετόνες 20
 N-μεθυλο-λευκίνη 4
 N-μεθυλο-μερκαπτο οξικό οξύ 95
 N-μεθυλομορφολίνη 116
 S-μεθυλο ομάδα, nmr φάσμα 188
 N-μεθυλοφαινυλαλίνη 4
 CDCl₃ 188
 μερκαπτάνες 37,90,93
 —, οξείδωση 139
 2-μερκαπτοαιθανόλη 15,36,91,101,183
 —, θειόλυση 95
 2-μερκαπτο οξικό οξύ 36
 2-μερκαπτοαιθυλαμίνη 36
 β-μερκαπτοβαλίνη 4
 2-μερκαπτοαιθανοσουλφονικό οξύ 13,159
 2-μερκαπτοπυριδίνη 78
 — εστέρες 62
 — πολυμερής μορφή 179
 Met-εγκεφαλίνη 6
 μετάθεση ακυλίου 99
 —, N → O 111,165
 —, O → N 66,142
 —, S → N 92
 μετάθεση Curtius 57,130,133,152,184

μέταλλα ομάδας λευκοχρύσου 76
 μεταϊπεριωδικό οξύ 95
 μετεστεροποίηση, καταλύομενη από βάση
 61,143
 — ενεργών εστέρων 154
 —, καταλύομενη από ιμιδαζόλιο 154
 μη λεινικός ανυδρίτης 29
 μη πολικές αλληλεπιδράσεις 42
 μικροβιακά πεπτίδια 8,9,122
 μικτοί ανυδρίτες 7,58-60,91,115,118,125,
 126,174
 μοριακός κυκλικός διχρωϊσμός 46
 μορφολίνη 86
 μυρμηκικό αμμώνιο σαν δότης υδρογόνου
 76
 μυρμηκικό οξύ ως δότης ηλεκτρονίων 76

 νάτριο υδρίδιο 26
 — σε υγρή αμμωνία 36,113,134,146
 D₂O 188
 νινυδρίνη 170
 νιτρίλια 103,104
 νιτροαργινίνη 96,97,113,187
 p-νιτροβενζυλεστέρες 86,150
 S-p-νιτροβενζυλομάδα 93
 2-νιτροπυριδινιοσουλφενυλο(Npys) ομάδα
 93
 p-νιτροφαινόλη 169
 o-νιτροφαινυλεστέρες 60,163
 p-νιτροφαινυλεστέρες 60,61,133,163
 o-νιτροφαινυλοσουλφενυλο (Nps) ομάδα
 78,159,179
 o-νιτροφαινυλοσουλφενυλο χλωρίδιο 91
 νιτρώδες οξύ 147
 νιτρωδο-αλκύλια 147
 νορβαλίνη 4
 νορλευκίνη 4

 ξανθυδρόλη 104
 ξανθυδρυλομάδα 104

 ολιγομερή 35
 ομονορλευκίνη 2
 ομοσερίνη 34

- dansyl αμινοξέα 18,25
 dansyl χλωρίδια 18
 οξικός ανυδρίτης 19,26,58,169
 οξικός p-νιτροφαινυλεστέρας 169
 οξικό οξύ 181,184
 CD_3COOD 188
 CD_3COOH 188
 όξινη υδρόλυση 69,76,78,79,86,97,134,
 146,159,160,164,166
 — — βενζυλεστέρων 86
 — — tert.βουτυλομάδων 69,86
 — — με τριφθοροξικό οξύ 86,159,169
 — — με υγρό HF 134
 όξινο θειώδες νάτριο 36
 οξυτοκίνη 6,7,34,62,70,129,133-135,149,
 175
 οξυχλωρίδιο του φωσφόρου 55
 οπιοειδή πεπτίδια 6
 οπτική στροφική διασπορά (ord) 45,46,
 146
 ορθογωνικός συνδυασμός 83,84,134,166
 ορμόνη ενεργοποίησης μελανοκυττάρων 6
 ορνιθίνη 4,82,98,99
 ουρεθάνες 75
 ουρία, παράγωγα 108,130,137,142
 ουσία P 6

 παλλάδιο, οξικό 164
 — μαύρο 76
 — σύμπλοκα 86
 — σε BaSO_4 76
 — σε άνθρακα 76
 παπαΐνη 30
 παροδική προστασία 74
 πενικιλλαμίνη 4
 πενικιλλινό-αμινοϊδρόλάση 84
 2,2,5,7,8-πενταμεθυλοχρωμάνο-6-σουλ-
 φονυλο ομάδα 99
 πενταχλωροφαινόλη 116
 πενταχλωροφαινυλεστέρας 62,113,114,
 138
 —, Fmoc αμινοξέων 163
 πεπτίδια, οξικά άλατα 182
 —, τριφθοροξικά άλατα 182

 πεπτιδικά αζίδια 164
 — υδραζίδια 147,164
 πεψίνη 30
 πιβαλικό οξύ βλέπε τριμεθυλοξικό οξύ
 πικολύλο εστέρες 172
 πικολύλο εστερική ομάδα 173
 — — μέθοδος 174
 πικρικά άλατα ή παράγωγα αργινίνης 96
 πιπεκολινικό οξύ 4
 πιπεριδίνη 79,80,87,159
 —, υδατική 103
 πιπεριδινο-2,5-διόνες 109
 πιπεριδινοκαρβονυλομάδα 100
 πιπεριδινο-2-όνες 97
 πολικές (coulombic) αλληλεπιδράσεις 43
 πολυαιθυλενογλυκόλη 177
 — μονομεθυλο αιθέρας 171
 πολυακυλαμίδιο 158
 πολυαμινοξέα 41,44,135
 πολυδιμεθυλοακυλαμίδιο 158
 πολυεξαμεθυλενοκαρβοδιϋμίδιο 179
 πολυλυσίνη 135
 πολυμερή 140
 πολυμερισμός 137
 πολυπεπτίδια με επαναλαμβανόμενη
 αλληλουχία 135,138
 πολυστυρόλιο 171
 πολυσυμπύκνωση 136
 προλιδάση 30,121
 προλίνη 21,107,113,121,122,130,141
 προλύλο-πρόλίνη 114
 Pro-Phe 130
 πρότυπο Anderson-Callahan 123
 πρωτεάσες 30
 πρωτεολυτικά ένζυμα 68,70,120,121
 πρωτοταγής δομή 16
 πυρογλουταμινικό οξύ 110,111
 πυρογλουταμύλο πεπτίδια 166
 — αμινοξέα 16,30,110
 — —, N-τελικό 28
 πυρρολιδόνες
 πυρρολιδονοκαρβοξυλοπεπτιδάση 84
 πυρρολιδονοκαρβοξυλοπεπτίδια 84

- ρακεμοποίηση 57,67,68,102,117-127,130-133,154,174
 —, καταλυόμενη από βάση 118
 —, ανίχνευση 12
 — ενεργών εστέρων 126
 ριβονουκλεάση 43,132
 ριζίνη 6
 Pro-Phe 130
 Ruhemann, μώβ 14
- Sanger αντιδραστήριο βλέπε 2,4-δινιτρο-φθοροβενζόλιο
 σαπωνοποίηση με άλκαλι 86,107,118,128, 153
 σαρκosίνη 4
 σεκετίνη 7,30,31,62,134
 σερίνη 15,90,100,164,165
 —, O-αλκυλο παράγωγα
 σιδηροκυανιούχο κάλι, οξειδωση 139
 σουλφοαιθυλο-sephadex 173
 σουλφοαμιδικοί δεσμοί, ανθεκτικοί σε οξέα 18
 σουλφυδρυλομάδα 34,37,43,90,92,139
 στερική παρεμπόδιση 160
 στρόφες 40-43, 145
 συμμετρικά διςουλφίδια 31
 συμμετρικοί ανυδρίτες 58,64,65,68,161, 162,167
 συμπολυμερή στυρολίου-διβινυλοβενζολίου 156,169
 — —, χλωρομεθυλίωση 149,151
 συνεργατικά φαινόμενα 42
 συσσωμάτωση 44,189
 σωματοστατίνη 135
- ταφτσίνη 6
 τεστ Young 123
 τεταρτοταγής δομή 4
 τετρααλκυλαμμωνιακό φθορίδιο 87
 τετραβουτυλαμμωνιακό φθορίδιο 87
 τετραζόλιο 78
 τολουόλιο 154
 p-τολουολοσουλφονικός μεθυλεστέρας 95
 p-τολουολοσουλφονικό οξύ 78,85,159,182
 p-τολουολοσουλφοναμινοξέα 56
 p-τολουολοσουλφονυλο-γλουταμινικό οξύ 110
 p-τολουολοσουλφονυλο ομάδα 98,100,146, 164,165
 tosyl βλέπε p-τολουολοσουλφονυλο
 τριαιθυλαμίνη 116,125,155
 τριαιθυλαμμωνιακό χλωρίδιο 116
 τριάλκυλοφωσφίνη 36
 τριβουτυλοφωσφίνη 93
 S-2,4,6-τριμεθυλοβενζυλο ομάδα 91
 τριμεθυλοξικό οξύ, μικτοί ανυδρίτες 59
 τριμεθυλοπυριτίωση 14
 τριμεθυλοσιλυλο αιθυλεστέρες 87
 τριμεθυλοσιλυλοαιθυλοξυκαρβονυλο ομάδα 79
 τριμεθυλοχλωροσιλάνιο 77
 τρινιτροτολουόλιο 17
 τριτοταγής δομή 16,43
 τριφαινυλομεθυλο (trityl)ομάδα 77,84,92, 93,101,139
 S-τριφαινυλομεθυλο (S-trityl) ομάδα 139
 τριφθοροαιθανόλη 78
 τριφθοροακετυλίωση 146
 τριφθοροακετυλο-βαλυλο-βαλινο μεθυλεστέρας 124
 τριφθοροακετυλο ομάδα 74
 — πεπτίδια 167
 τριφθορομεθανοσουλφονικό οξύ σε τριφθοροξικό οξύ 76,84,89,91,166
 τριφθοροξικό οξύ 72,82,88,105,134,146, 150,156,158,164,167,173
 2,4,5-τριχλωροφαινυλεστέρες 63
 τρυπτοφάνη 13,14,30,32,36,45,47,103, 112-114,184,187,188
 trityl βλέπε τριφαινυλομεθυλο τύπου ουρεθάνης προστατευτικές ομάδες 77,110,128,130
 τυροσίνη 14,30,32,36,45,47,89,90,99, 100,112,130,187
- υγρή αμμωνία 93
 HPLC βλέπε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης

- υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) 12,14,24,182
 υγρό HF 76,84,89,91,98,103,110,111,134, 164,165
 υδαντοΐνες 75,108
 υδραζίδια 142
 υδραζίδια οξέων 57
 υδραζίνη 19,79,93,147,164
 — σαν δότης υδρογόνου 76
 υδραζινόλυση 164
 — εστέρων 57
 υδραζωτικό οξύ 57,81
 Hg^{2+} , οξικός 93
 υδρίδια του βορίου 36
 υδρογονόλυση 164
 υδρογόνωση, καταλυτική βλέπε καταλυτική υδρογόνωση
 H_2S 85
 2-υδροξυμινοκυανοξικός αιθυλεστέρας 127,130
 3-υδροξυ-3,4-διϋδρο-1,2,3-βενζοτρίαζιν-4-όνη 127,130,175
 —, εστέρες 163,169
 3-υδροξυ-3,4-διϋδροκινναζολινο-4-όνη, κατάλυση 163
 1-υδροξυ-2-πυριδόνη 61
 υδροξυαμινοξέα 184
 HOBT βλέπε 1-υδροξυβενζοτρίαζόλιο
 1-υδροξυβενζοτρίαζόλιο (HOBT) 61,65, 100,104,116,120,126,127,130,143,159
 —, εστέρες 62,177
 N-υδροξυηλεκτρίμιδιο 62,126,130
 —, εστέρες 62,114,163
 —, πολυμερές 176
 HBr σε οξικό οξύ 76,88,91,150,164
 — σε υγρό SO_2 76
 — σε τριφθοροξικό οξύ 76,89,164
 β-υδροξυλευκίνη 4
 υδροξυλυσίνη 2
 4-υδροξυμεθυλοπυριδίνη 172
 4-υδροξυμεθυλοστυρόλιο 154
 υδροξυμεθυλο ρητίνες 153,155
 υδροξυπυρόλη 2
 2-υδροξυπυριδίνη 62
 υδροφθόριο, υγρό βλέπε υγρό HF
 υδροφιλα αμινοξέα 50
 υδροφοβοί δεσμοί 42,49
 — αμινοξέα 50
 HCl σε οξικό οξύ 150,155,164
 — σε μυρμηκικό οξύ 159
 υπερμεθυλίωση 26,27
 υπερμυρμηκικό οξύ, οξειδωση 36
 υπεροξείδιο υδρογόνου 36
 —, αλκαλικό 87
 υπερχλωρικά άλατα αργινίνης 96
 υποβρωμιώδες οξύ 32
 υποχλωριώδες βουτυλεστέρας 180
 φαινόμενο Cotton 46,47
 φαινυλακεταμιδομεθυλο (PAM) ρητίνες 156
 N^ε-φαινυλακετυλολυσίνη 84
 φαινυλαλανίνη 29,30,45,47,113,122, 130,187
 L-φαινυλαλανινο μεθυλεστέρες 70
 φαινυλεστέρες 87
 φαινυλογλικίνη 4,122
 φαινυλοθειάζολιδινόνες 24
 φαινυλοθειοκαρβαμιδικά παράγωγα 22,23,28
 φαινυλοθειοϊδαντοΐνες 22,23
 φαινυλοϊσοθειοκυανικός εστέρας 22,25
 O-φαινυλο-ισοουρικά άλατα 64
 φαινυλοκαρβαμιδικά παράγωγα 22
 φαινυλοϊδαντοΐνες 22
 φαλλοΐδίνη 145
 φασματομετρία μάζης 25,27
 φασματοσκοπία nmr 124
 —, δύο διαστάσεων 45
 ο-φθαλaldeΐδη 15
 φθορίδια οξέων 56
 φθοριούχα ανιόντα 79
 —, γυμνά 103
 φθορισμός 15,19,45
 — φασματοσκοπία 45
 Fmoc βλέπε 9-φλουορενυλομεθυλοξυ-καρβονυλο

9-φλουορενυλομεθυλοξυκαρβονυλο (Fmoc)
ομάδα 9,79,82,84,90,134,135,146,155,
159,166,180,187

φλουορενυλο σύστημα σαν χρωμοφόρο
187

9-φλουορενυλομεθυλοξυκαρβονυλο
χλωρίδια 56

—, φθορίδια 56

9-φλουορενυλομεθυλο χλωροκαρβονικός
εστέρας 82,87

β-φύλλα 40,41,43,44

—, αντιπαράλληλα 41

—, παράλληλα 41

φωσγένιο 80,81,154

Cu^{++} ιόντα, πρόληψη της ρακεμοποίησης
128

χημικός ιονισμός 27,28

χλωρίδια οξέων 55,56,58

χλωριούχος κασσίτερος 97

χλωριούχο τιτάνιο (III) 97

χλωροακετυλο αμινοξέα 5

χλωροκαρβονικοί αλκυλεστέρες 59,80

χλωροκαρβονικός βενζυλεστέρας
80,81,154

χλωρομεθυλιωμένο συμπολυμερές στυρο-
λίου-διβινυλοβενζολίου 154,186

χλωρομεθυλοκετόνες 29

χλωρομεθυλοκετόνη από p-τολουολοσουλ-
φονυλο-L-φαινυλαλανίνη 145

χλωρομυρμηκικοί αλκυλεστέρες 59

χλωρομυρμηκικός τετ.βουτυλεστέρας 80

χρωματογραφία λεπτής στιβάδος 121

χυμοθρυψίνη 29,31,70,88,146

χυμοπαπαΐνη 70

ψευδάργυρος σε οξικό οξύ 97