ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΤΟΠΩΝ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΠΡΩΤΕΙΝΗΣ GP41 ΤΟΥ HIV-1

Τζούμπα Ορνέλα

Χημικός

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΧΗΜΕΙΑ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2015

Αφιερωμένο στην οικογένεια μου

Πρόλογος

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Χημείας Πεπτιδίων του Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά το χρονικό διάστημα Οκτώβριος 2012 – Μάιος 2015. Ένα μέρος αυτής, τα βιολογικά πειράματα που αφορούν τον ιό HIV, πραγματοποιήθηκαν στο ινστιτούτο βιοϊατρικής έρευνας Georg-Speyer-Haus, στη Φρανκφούρτη της Γερμανίας, υπό την επίβλεψη της Δρ. Ursula Dietrich.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσά μου, Καθηγήτρια κ. Μαρία Σακαρέλλου-Δαϊτσιώτου για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετάσχω στην ερευνητική της ομάδας και την ανάθεση του θέματος της εργασίας μου, καθώς και για την συνεχή καθοδήγηση της.

Ευχαριστώ ιδιαιτέρως, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Ευγενία Πάνου-Πομώνη για την πολύτιμη βοήθεια της, το συνεχές ενδιαφέρον και την ενθάρρυνσή της κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή κ. Βασίλειο Τσίκαρη, για το ενδιαφέρον και το χρόνο που αφιέρωσε ως μέλος της τριμελούς επιτροπής.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δημήτρη Κρικοριάν για την άριστη συνεργασία και την συνεχή καθοδήγηση κατά την διάρκεια των πειραμάτων, όπως και τον Βασίλη Μούση για τις σημαντικές υποδείξεις του.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους φίλους μου και συναδέρφους μου Μαργαρίτα Τσιρογιάννη, Ευγενία Φώτου, Βιβή Τρύπου, Κώστα Χιώνη και Εύη Φώτου για την άψογη συνεργασία, την στήριξη και το ευχάριστο περιβάλλον στη διάρκεια αυτών των χρόνων. Ακόμη, θέλω να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τις αγαπημένες μου φίλες Συναρίδου Μαρία, Καβέλη Ιωάννα και Βούλγαρη Δέσποινα για όλα αυτά τα όμορφα χρόνια στα Γιάννενα και για τη στήριξη τους σε κάθε δύσκολη στιγμή.

Τέλος, χωρίς την στήριξη και την ενθάρρυνση της οικογένειάς μου η πραγματοποίηση των σπουδών μου θα ήταν αδύνατη. Επομένως, τις μεγαλύτερες ευχαριστίες μου οφείλω στους γονείς μου Χαρίλαο και Χαρίκλεια και στην αδερφή μου Αμαλία.

Τζούμπα Ορνέλα

Ιωάννινα, Μάιος 2015

Περιεχόμενα

Θεωρητικό Μέρος

Κεφάλαιο 1: Ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV)

1.1 Εισαγωγή……..…….....5
1.2 Μορφολογία του ιού HIV-1……..….....6
1.3 Κυτταρικός τροπισμός.....8
1.4 Είσοδος του ιού HIV στα κύτταρα.....9
1.5 Κύκλος αναπαραγωγής του ιού HIV…….....13
1.6 Παθογένεια – Ανοσολογική απόκριση στην HIV μόλυνση……..……...15
1.7 Αντιρετροϊκή θεραπεία της μόλυνσης HIV…….....18

Κεφάλαιο 2: Ανάπτυξη εμβολίων κατά του HIV

2.1 Εισαγωγή.....25
2.2 Διαφορετική απόκριση των ατόμων στην HIV μόλυνση.....26
2.3 Εξουδετερωτικά αντισώματα και πεπτιδομιμητικοί επίτοποι.....27
2.3.1 Μηχανισμός εξουδετέρωσης των bnAbs.....28
2.3.2 Μηχανισμοί διαφυγής του HIV-1 από το ανοσοποιητικό σύστημα…….....29
2.3.3 Στοιχεία για την αποτελεσματική προστασία των
εξουδετερωτικών αντισωμάτων…….....30
2.3.4 Ανοσογόνα και προκαταρτικά εμβόλια.....31

Κεφάλαιο 3: Πεπτιδική Σύνθεση

3.1 Εισαγωγή.....37
3.2 Πεπτιδικός δεσμός.....39
3.3 Στερεοχημεία πεπτιδικού δεσμού.....40
3.4 Σύνθεση πεπτιδίων.....41
3.5 Σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση.....42

3.6 Το αδιάλυτο στερεό υπόστρωμα.....44
3.7 Ρητίνες.....45
3.8 Προστασία της α-αμινομάδας.....49
3.9 Πλευρικές προστατευτικές ομάδες.....51
3.10 Αντιδραστήρια σύζευξης.....55
3.11 Έλεγχος της πορείας της αντίδρασης σύζευξης με Test Kaiser.....60
3.12 Ανεπιθύμητες αντιδράσεις στην πεπτιδική σύνθεση.....61
3.12.1 Ρακεμοποίηση.....61
3.12.2 Συσσωμάτωση.....63
3.12.3 Σχηματισμός δικετοπιπεραζίνης.....64
3.12.4 Σχηματισμός ασπαρτιμιδίου.....65
3.13 Αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη και αποπροστασία.....66
3.14.1 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC).....68
3.14.2 Φασματομετρία μαζών.....69
3.14.2.1 Τετράπολοι αναλυτές – Quadrupole analyzers.....72
3.14.2.2 Ανιχνευτής Ιόντων.....73

Κεφάλαιο 4: Συνθετικοί Πεπτιδικοί Φορείς

4.1 Εισαγωγή.....77
4.2 Επαναλαμβανόμενοι Ολιγοπεπτιδικοί Φορείς
(Sequential Oligopeptide Carries, SOCn).....78
4.3 Φορέας Πολλαπλών Αντιγονικών Πεπτιδίων
(Multiple Antigenic Peptides, MAPs).....80
4.4 Σύστημα πρόσδεσης πεπτιδίων TASPs
(Template - Assembled Synthetic Proteins).....81

Κεφάλαιο 5: Χημειοεκλεκτική Σύνδεση Πεπτιδίων

5.1 Εισαγωγή.....85
5.2 Δεσμός οξίμης.....86
5.2.1 Στερεοχημεία δεσμού οξίμης.....87

5.2.2 Σταθερότητα του δεσμού οξίμης.....88
5.2.3 Εισαγωγή της καρβονυλομάδας – Σχηματισμός αλδεϋδών σε πεπτίδια.....88
5.2.4 Εισαγωγή της αμινοοξυακετυλομάδας.....90
5.3 Ενζυμική διάσπαση του δεσμού οξίμης στην χημειοεκλεκτική σύνδεση.....91

Κεφάλαιο 6: Σκοπός της Εργασίας.....97

Πειραματικό Μέρος

Κεφάλαιο 7: Σύνθεση των επιτόπων της gp41

7.1 Εισαγωγή.....105
7.2 Πεπτιδική σύνθεση.....106
7.2.1 Αντιδραστήρια.....106
7.3 Γενική πορεία σύνθεσης.....108
7.4 Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση επιτόπων της gp41 και του τριπεπτιδίου Lys-Ala-Arg-NH_2.....111
7.4.1 EC26-2A4-EW επίτοπος της gp41.....111
7.4.2 EC26-2A4-NK επίτοπος της gp41.....113
7.4.3 EC26-2A4 επίτοπος της gp41.....115
7.4.4 Τριπεπτίδιο: Lys-Ala-Arg-NH_2.....118

Κεφάλαιο 8: Σύνθεση πεπτιδικών παραγώγων κατάλληλων για χημειοεκλεκτική σύνδεση

8.1 Εισαγωγή.....123
8.2 Γενική πορεία σύνθεσης.....123
8.2.1 Σύνθεση του N^{ε}-αμινοοξυακέτυλο φορέα SOC_4-I.....123
8.2.2 Σύνθεση των αλδεϋδικών παραγώγων.....124
8.2.3 Οξείδωση 2-άμινο-αλκοόλης προς αλδεΰδη παρουσία $NaIO_4$.....124
8.2.4 Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος.....125

8.3 Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του N^{ε}-αμινοοξυακέτυλο φορέα SOC_4-I και των αλδεϋδικών παραγώγων.....125
8.3.1 N^{ε}-αμινοοξυακέτυλο φορέας SOC_4-I: Ac-$SOC_4(Aoa)_4$-NH_2.....125
8.3.2 N^{ε}-αμινοοξυακέτυλο (Lys^1 και Lys^7) φορέας SOC_4-I: Ac-$SOC_4(Ac_2Aoa_2)$-NH_2.....128
8.3.3 Αλδεϋδικό παράγωγο του επιτόπου EC26-2A4-EW.....130
8.3.4 Αλδεϋδικό παράγωγο του επιτόπου EC26-2A4-NK.....132
8.4.5 Αλδεϋδικό παράγωγο του επιτόπου EC26-2A4.....134
8.4.6 Αλδεϋδικό παράγωγο του τριπεπτιδίου Lys-Ala-Arg-NH_2.....136

Κεφάλαιο 9: Χημειοεκλεκτική σύνδεση πεπτιδίων-SOC_4

9.1 Εισαγωγή.....141
9.2 Χημειοεκλεκτική σύνδεση σε υγρή φάση-Σχηματισμός δεσμού οξίμης.....141
9.2.1 Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος.....143
9.3 Σύνθεση του πεπτιδικού αναλόγου Ac-SOC_4-[EC26-2A4-EW-K(CH=N-O)]$_4$-NH_2.....143
9.4 Σύνθεση του πεπτιδικού αναλόγου Ac-SOC_4-[EC26-2A4-NK-K(CH=N-O)]$_4$-NH_2.....146
9.5 Σύνθεση του πεπτιδικού αναλόγου Ac-SOC_2-{Ac_2,[EC26-2A4-K(CH=N-O)]$_2$}-NH_2.....148
9.6 Σύνθεση του πεπτιδικού αναλόγου Ac-SOC_4-[Ac-Lys(CH=N-O)-Ala-Arg]$_4$-NH_2.....150

Κεφάλαιο 10: Βιολογικά Πειράματα

10.1 Εισαγωγή.....155
10.2 Πειραματική πορεία ELISA.....158
10.2.1 Δραστικότητα των SOC_4-συμπλεγμάτων με τον ορό EC26 και το mAb 2F5.....159
10.2.2 Αξιολόγηση ειδικών Abs EC26-2A4 στο πλάσμα μολυσμένων ατόμων με HIV-1 που επάγονται από το σύμπλεγμα SOC4-EC26-2A4 μέσω ELISA.....161
10.3 Μελέτη της ενζυμικής διάσπασης του δεσμού οξίμης στην χημειοεκλεκτική σύνδεση από τα μικροσωμάτια χοιρινού συκωτιού.....162

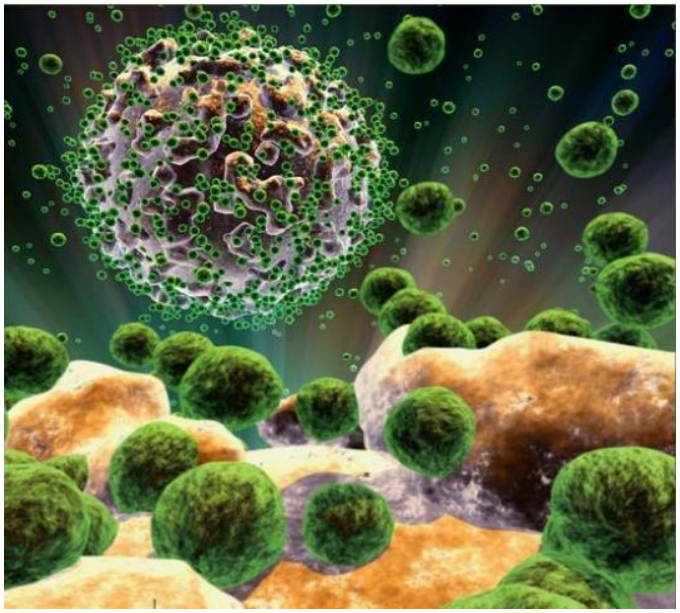
10.3.1 Απομόνωση μικροσωματίων με διαφορική φυγοκέντρηση.....163
10.3.2 Προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο BCA.....164
10.3.3 Επώαση του συμπλέγματος Ac-SOC_4-[Ac-Lys(CH=N-O)-Ala-Arg]$_4$-NH_2
με τα μικροσωμάτια.....166

Κεφάλαιο 11: Συμπεράσματα.....171

Παράρτημα

I. Περίληψη.....177
II. Summary.....179
III. Βιβλιογραφία.....181
IV. Συντομεύσεις.....204

Θεωρητικό Μέρος



Κεφάλαιο 1

Ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV)

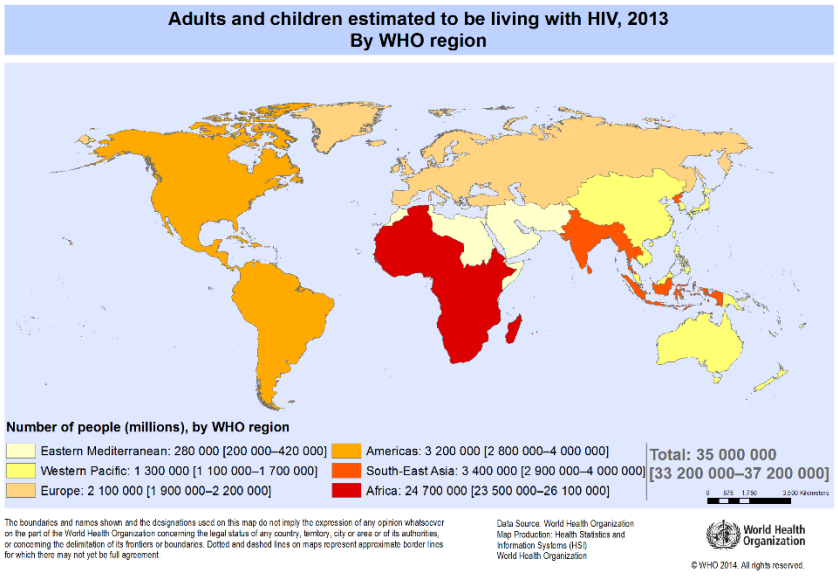
1.1 Εισαγωγή

Το σύνδρομο της επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS) αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά το 1981 στις ΗΠΑ, και τα πρώτα ιοσωμάτια του ιού της ανθρώπινης ανοανεπάρκειας, HIV (human immunodeficiency virus), απομονώθηκαν 2 χρόνια αργότερα, εγκαινιάζοντας μια νέα εποχή στην μάχη ενάντια στους παθογόνους ιούς [1, 2]. Σύμφωνα με το Πρόγραμμα Ηνωμένων Εθνών για το AIDS, από την αρχή της εξάπλωσης της επιδημίας υπολογίζεται ότι περίπου 78 εκατομμύρια άνθρωποι έχουν μολυνθεί από τον ιό HIV και περίπου 39 εκατομμύρια από αυτούς πέθαναν. Έως τα τέλη του 2013, περίπου 35 εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως ζουν μολυσμένοι από τον ιό του HIV και η πλειοψηφία αυτών (71%) εντοπίζεται στις υπο-Σαχάριες περιοχές της Αφρικής, όπου ένας στους είκοσι ενήλικες ζουν με τον ιό **(Εικόνα 1.1)**. Στην Ελλάδα, σύμφωνα με το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων, το 2013 δηλώθηκαν 920 περιστατικά, εκ των οποίων 820 (89,1%) ήταν άνδρες και 100 (10,9%) γυναίκες. Από τις περιπτώσεις που δηλώθηκαν για πρώτη φορά ως HIV+ το 2013, 90 (9.8%) άτομα είχαν ήδη εμφανίσει ή ανέπτυξαν κλινικά AIDS εντός του συγκεκριμένου έτους. Σε παγκόσμιο επίπεδο υπολογίζεται ότι μέσα στο 2013 πέθαναν περίπου 1.5 εκατομμύρια ασθενείς, 22% λιγότεροι από το 2009 και 35% λιγότεροι από το 2005.

Ο ιός HIV ανήκει στην οικογένεια των Retroviridae το γένος των Lentivirus, και αποτελείται από 2 κύρια είδη, τον HIV-1 και τον HIV-2, τα οποία παρουσιάζουν 40% ομολογία στο γένωμα τους αλλά διαφέρουν τόσο στις μορφολογικές όσο και στις λειτουργικές τους ιδιότητες. Ο HIV-1 είναι το επικρατέστερο είδος στις μολύνσεις που παρατηρούνται στον δυτικό κόσμο, και διαιρείται σε τρεις τύπους (M, N και O) [3], με βάση τις διαφορές που έχουν προσδιοριστεί στην περιοχή του φακέλου. Ο τύπος M είναι ο πιο διαδεδομένος και υποδιαιρείται σε οκτώ υποτύπους, με βάση το συνολικό γονιδίωμα, που διαφέρει γεωγραφικά. Οι πιο διαδεδομένοι από τους υποτύπους αυτούς, είναι ο B (κυρίως στην Βόρεια Αμερική και Ευρώπη), οι A και D (κυρίως στην Αφρική) και ο C (κυρίως στην Αφρική και την Ασία). Η έρευνα γύρω από τον HIV-1 επικεντρώνεται κυρίως στον υπότυπο B [4].

Η μόλυνση με τον HIV προκαλεί σοβαρές δυσλειτουργίες στο ανοσοποιητικό σύστημα που οδηγούν στην εκδήλωση του AIDS, με τον οργανισμό να γίνεται επιρρεπής σε ευκαιριακές λοιμώξεις και σε ανάπτυξη νεοπλασμάτων, ενώ παράλληλα εμφανίζονται

μεταξύ των άλλων και αρνητικές επιπτώσεις στο νευρικό, στο αιμοποιητικό και αναπνευστικό σύστημα.



Εικόνα 1.1. Πληθυσμιακή κατανομή των εκτιμούμενων φορέων του HIV παγκοσμίως για το έτος 2013 (πηγή: Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας, WHO).

Η μετάδοση του HIV πραγματοποιείται μέσω:

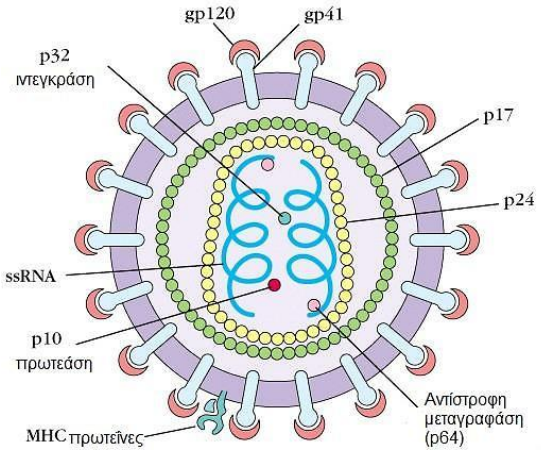
- Της σεξουαλικής επαφής
- Της χρήσης μολυσμένης σύριγγας μεταξύ ναρκομανών
- Της κάθετης μετάδοσης απευθείας από τη μητέρα στο έμβρυο
- Της μετάγγισης μολυσμένου αίματος

Το αίμα, το σπέρμα, οι κολπικές εκκρίσεις και το μητρικό γάλα είναι τα βιολογικά υγρά που περιέχουν την μεγαλύτερη ποσότητα ιικού φορτιού [5]. Η παρουσία υψηλού ιικού φορτίου (>1500 αντίγραφα/ml) [6] και η απρόσεκτη σεξουαλική συμπεριφορά είναι παράγοντες που αυξάνουν τις πιθανότητες μετάδοσης [7].

1.2 Μορφολογία του ιού HIV-1

Ο ιός HIV, παρατηρούμενος σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, έχει σχεδόν σφαιρική δομή με διάμετρο 100-150nm και αποτελείται από το καψίδιο, το νουκλεοκαψίδιο, 2 μόρια μονόκλωνου RNA ως γενετικό υλικό και τον ιικό φάκελο. Ο φάκελος αποτελείται

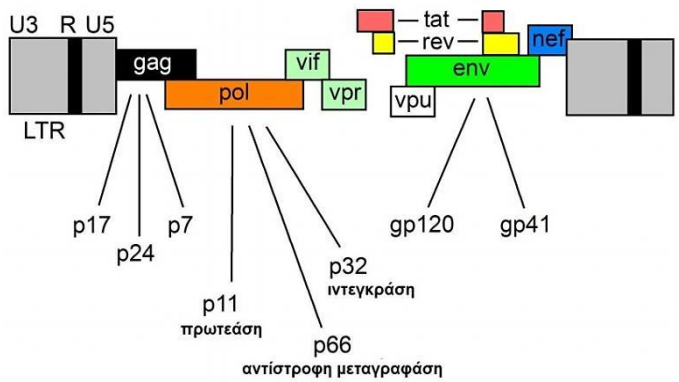
από μια λιπιδιακή διπλοστοιβάδα προερχόμενη από την κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή και αποτελείται κυρίως από δύο γλυκοπρωτεΐνες, την gp41 και την gp120. Οι γλυκοπρωτεΐνες αυτές προέρχονται από μία πρόδρομη πρωτεΐνη, την gp160, και είναι υπεύθυνες για την είσοδο του ιού στα κύτταρα. Η gp41 είναι διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη και η gp120 είναι συνδεδεμένη στην gp41, εκτεθειμένη στην επιφάνεια του ιού, άριστα τοποθετημένη για την λειτουργία της, δηλαδή την πρόσδεση του ιού στα κύτταρα μέσω των κατάλληλων υποδοχέων κυτταρική επιφάνειας που φέρει. Εκτός των άλλων, ο ιικός φάκελος περιέχει και πρωτεΐνες από την κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή όπως μόρια του κυρίου συμπλόκου μείζονος ιστοσυμβατότητας (MHC) τάξης I και II, και τα μόρια CD28 [8, 9, 10]. Μέσα στο φάκελο βρίσκεται ο πυρήνας του ιού, ή το νουκλεοκαψίδιο, το οποίο περιέχει το στρώμα του ιού που αποτελείται από τρείς δομικές πρωτεΐνες, την p24, την p17 και την p9. Από αυτές, η p17 ενώνεται με τον φάκελο του ιού, η p24 σχηματίζει το καψίδιο μέσα στο οποίο είναι κλεισμένα τα 2 μόρια RNA (ssRNA) και τα ιικά ένζυμα, ενώ η p9 είναι ένα νουκλεοκαψίδιο προσκολλημένο στα μόρια RNA [11]. Επίσης, περιέχει δύο μόρια αντίστροφης μεταγραφάσης (p64) και τις νουκλεοειδικές πρωτεΐνες p10, μία πρωτεάση και την p32, μία ιντεκγράση **(Εικόνα 1.2).**



Εικόνα 1.2. Σχηματικό διάγραμμα διατομής του ιικού σωματιδίου του HIV.

Η ικανότητα αντιγραφής των περισσότερων ρετροϊών εξαρτάται από τα γονίδια gag (group-antigen), pol (polymerase) και env (envelope). Η «κλασσική» δομική διαμόρφωση του ρετροϊϊκού γονιδιώματος είναι: 5’ LTR-gag-pol-env-LTR 3’ [12]. Οι περιοχές LTR (long terminal repeat) συνιστούν τα άκρα του ιικού γονιδιώματος, που συνδέονται στο DNA του κυττάρου ξενιστή μετά την ενσωμάτωση του ιού και δεν κωδικοποιούν για ιική

πρωτεΐνη. Το γονιδίωμα του ιού HIV αποτελείται από 9.800 νουκλεοτίδια και είναι περίπου 100.000 φορές μικρότερο από το ανθρώπινο γονιδίωμα. Παρά το σχετικά μικρό του μέγεθος διαθέτει μια εξαιρετικά περίπλοκη δομή που κωδικοποιεί τουλάχιστον 17 διαφορετικές πρωτεΐνες **(Εικόνα 1.3)**. Τα τρία κύρια γονίδια gag, pol και env, κωδικοποιούν πρόδρομες μορφές πολυπρωτεϊνών που διασπώνται για να δώσουν τις πρωτεΐνες του νουκλεοκαψιδίου, τα ένζυμα που απαιτούνται για την αντιγραφή και τις πρωτεΐνες του φακέλου. Εκτός αυτών, ο HIV διαθέτει 6 ρυθμιστικές πρωτεΐνες, την Tat, Rev, Nef, Vif, Vpu και Vpr. Η Tat και η Rev ρυθμίζουν την ιική μεταγραφή καθώς η Tat λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας και η Rev μεταφέρει τα μη ματισμένα RNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα [13]. Η Vif ενισχύει την ωρίμανση και την μολυσματικότητα του ιού, η Vpu ρυθμίζει την διαδικασία της συγκρότησης των καινούργιων ιοσωματίων, προάγει την εξωκυττάρωση ιικών σωματιδίων, αποσυνθέτει το CD4 στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ) και η Vpr ρυθμίζει την μεταφορά του νουκλεοκαψιδίου στον πυρήνα [14, 15]. Τέλος, η Nef ενισχύει την μολυσματικότητα του ιού καθώς προκαλεί μείωση της έκφρασης του υποδοχέα CD4 και του MHC-I στο κυττάρο-ξενιστή [16].



Εικόνα 1.3. Οργάνωση του γονιδιώματος του HIV-1.

1.3 Κυτταρικός τροπισμός

Ο ιός HIV μεταδίδεται κυρίως κατά την σεξουαλική επαφή αφού ιοσωμάτια μπορούν να περάσουν το επιθηλιακό βλεννογόνο και να μολύνουν συγκεκριμένα κύτταρα που έχουν σαν κύριο χαρακτηριστικό την έκφραση του υποδοχέα CD4 (μακροφάγα/μονοκύτταρα και ένα υποσύνολο των Τ-κυττάρων) [17, 18]. Παρόλο που

αρχικές μελέτες υποστήριζαν ότι ο υποδοχέας CD4 είναι ο μοναδικός υποδοχέας που χρησιμοποιείται από τον HIV-1, μεταγενέστερες μελέτες απέδειξαν ότι για την επιτυχημένη είσοδο του ιού στο κύτταρο ξενιστή είναι απαραίτητη η ύπαρξη συνυποδοχέων [19]. Επικρατέστεροι συνυποδοχείς για την είσοδο του ιού είναι οι υποδοχείς χημειοκινών CCR5 και CXCR4, ενώ παράλληλα έχουν προταθεί και άλλοι ο οποίοι όμως χρησιμοποιούνται από λιγοστά στελέχη του HIV και είναι υπό διερεύνηση [20, 21].

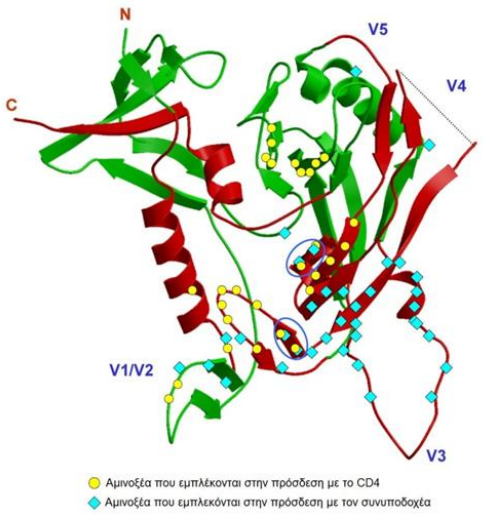
Ο καθορισμός του τροπισμού, δηλαδή ποια κύτταρα θα μολυνθούν από τα διάφορα ιικά στελέχη, καθορίζεται από την προσδετική προτίμηση που δείχνουν στους συνυποδοχείς. Στελέχη του ιού που χρησιμοποιούν τον CXCR4 υποδοχέα ονομάζονται T-τροπικά (X4) και μολύνουν κυρίως Τ κύτταρα. Αντιθέτως στελέχη του ιού που χρησιμοποιούν τον CCR5 υποδοχέα ονομάζονται Μ-τροπικά (R5) και μολύνουν κυρίως μακροφάγα. Επιπλέον έχουν αναφερθεί στελέχη που μπορούν να χρησιμοποιήσουν και τον CCR5 και τον CXCR4 υποδοχέα, και ονομάζονται dual-tropic. Ο πρωταρχικός στόχος του ιού κατά την μετάδοση από άτομο σε άτομο είναι τα μακροφάγα του επιθηλιακού βλεννογόνου και επομένως τα R5 στελέχη επικρατούν στα αρχικά στάδια της μόλυνσης [22]. Για αυτό τον λόγο, μεταλλάξεις στον CCR5 υποδοχέα αναστέλλουν την μόλυνση των κυττάρων με τον HIV, χωρίς να υπάρχουν επιπτώσεις στα κύτταρα αφού πιστεύεται ότι άλλοι υποδοχείς χημειοκινών καλύπτουν την βιολογική δράση του CCR5 [23]. Αν και υπάρχουν αρκετές εξαιρέσεις [24, 25], κατά κανόνα η μετάβαση των ιικών στελεχών που χρησιμοποιούν το CCR5 υποδοχέα σε εκείνα που χρησιμοποιούν τον CXCR4 συνυποδοχέα έχει συνδεθεί με τη μετάβαση απ τη λανθάνουσα ασυμπτωματική φάση στις κλινικές εκδηλώσεις που συνδέονται με το AIDS [26].

1.4 Είσοδος του ιού HIV στα κύτταρα

Η είσοδος του ιού στα κύτταρα περιλαμβάνει τρία διακριτά βήματα: 1) την αλληλεπίδραση του ιού με τον CD4 υποδοχέα του κυττάρου ξενιστή, 2) την αλληλεπίδραση του ιού με τους συνυποδοχείς, και 3) την μεμβρανική σύντηξη του φακέλου του ιού με την κυτταρική μεμβράνη του ξενιστή. Το κύριο μόριο για την επιτυχή έκβαση των δύο πρώτων βημάτων είναι η γλυκοπρωτεΐνη gp120 η οποία, όπως ήδη αναφέραμε, βρίσκεται στην εξωτερική επιφάνεια του ιικού φακέλου και προέρχεται από τον πρωτεολυτικό κατακερματισμό της προ-πρωτεΐνης gp160 σε δύο λειτουργικές

πρωτεΐνες την gp120 και την gp41. Οι δύο πρωτεΐνες γλυκοζυλιώνονται στο σύμπλεγμα Golgi και στην συνέχεια μεταφέρονται στην κυτταρική μεμβράνη όπου θα αποτελέσουν στην συνέχεια δομικό συστατικό του φακέλου του ιού κατά την έξοδο του από το κύτταρο [27]. Ο ιικός φάκελος περιέχει τριμερή που αποτελούνται από ετεροδιμερή της gp120-gp41, όπου η gp41 είναι το διαμεμβρανικό κομμάτι και η gp120 το εξωμεμβρανικό [28].

Η gp120 είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που αποτελείται από 480 αμινοξέα και 25 ολιγοσακχαρικές αλυσίδες. Διακρίνεται σε πέντε μεταβλητές (V1-V5) και πέντε σταθερές περιοχές (C1-C5) [29] **(Εικόνα 1.4)**. Οι σταθερές περιοχές σχηματίζουν τον πυρήνα της πρωτεΐνης, ενώ οι μεταβλητές περιοχές (όπως και πολυάριθμες γλυκοζυλιωμένες περιοχές) βρίσκονται κοντά στην επιφάνεια. Σε φυσική κατάσταση η gp120 περιέχει δυο διακριτές περιοχές: μία εσωτερική που εμπλέκεται σε αλληλεπιδράσεις με την gp41 και στο σχηματισμό της τριμερούς προεκβολής (ακίδα) του φακέλου, και μία εξωτερική που σχηματίζει το μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειας της προεκβολής και είναι έντονα γλυκοζυλιωμένη. Η πρόσδεση του CD4 στην gp120 προκαλεί σημαντικές διαμορφωτικές αλλαγές στην πρωτεΐνη, που οδηγούν στο σχηματισμό μια τρίτης περιοχής που καλείται γεφυρωτικό φύλλο. Η περιοχή αυτή αποτελείται από αντιπαράλληλα β-φύλλα που συνδέουν την εξωτερική με την εσωτερική περιοχή και παίζει κυρίαρχο ρόλο στην αλληλεπίδραση με τους συνυποδοχείς [30]. Παρά την μεγάλη συνολική ετερογένεια της γλυκοπρωτεΐνης gp120, η περιοχή πρόσδεσης του CD4 είναι εξαιρετικά σταθερή και αποτελεί ένα ιδιαίτερα ελκυστικό στόχο κατά του ιού.



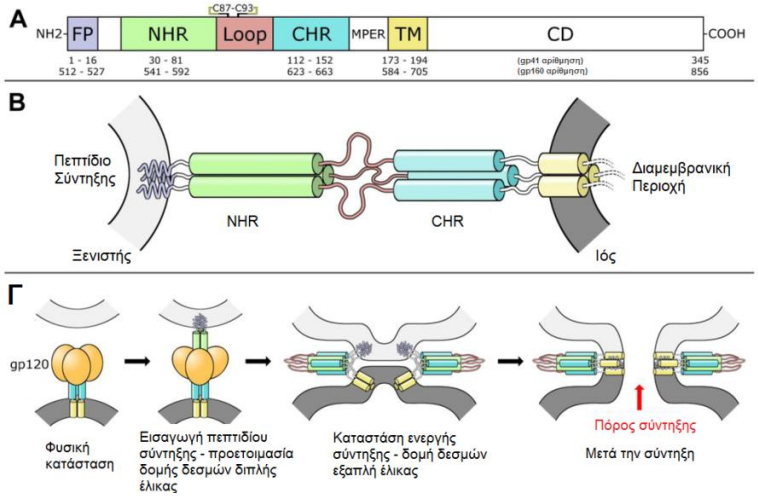
Εικόνα 1.4. Δομή της γλυκοπρωτεΐνης gp120, όπου φαίνονται οι χαρακτηριστικές περιοχές και τα σημεία πρόσδεσης με το CD4 και τον συνυποδοχέα.

Η πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με υψηλή συγγένεια με το CD4 γεγονός που δικαιολογεί την προτίμηση του ιού για τα CD4+ κύτταρα. Το CD4 είναι μια μονομερής μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη μεγέθους 55 kDa, που περιλαμβάνει τέσσερις εξωκυτταρικές περιοχές με δομή ανοσοσφαιρίνης (D_1-D_4), μία υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή και μία μεγάλου μήκους κυτταροπλασματική ουρά. Το αμινο τελικό άκρο του CD4 (D1) αποτελείται από τρείς θηλιές, γνωστές και ως συμπληρωματικές καθοριστικές περιοχές (complementary determining regions, CDR1, CDR2 και CDR3). Η πρόσδεση της γλυκοπρωτεΐνης gp120 στον CD4 υποδοχέα επιτυγχάνεται μέσω αλληλεπίδρασης περίπου 43 αμινοξέων που βρίσκονται στο καρβόξυ τελικό άκρο της πρωτεΐνης με την περιοχή CDR2 του CD4 [31]. Αυτή η αλληλεπίδραση δεν είναι αρκετή για να προκαλέσει την είσοδο του ιού στα κύτταρα, αλλά είναι σημαντική για την αναγνώριση του κυττάρου στόχου και για να αυξήσει την συγγένεια σε άλλα ικά συστατικά για την πρόσδεση με τους συνυποδοχείς. Η πρόσδεση της gp120 με τον CD4 υποδοχέα προκαλεί αλλαγή στην χωροδιάταξη της δομής της gp120 με αποτέλεσμα οι μεταβλητές περιοχές της, V1/V2, να μετακινούνται προκαλώντας την προεκβολή της τρίτης μεταβλητής V3 [32]. Η τρίτη μεταβλητή περιοχή V3 της gp120 είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση του ιού με τους συνυποδοχείς και παρόλο που ο ακριβής μηχανισμός της αλληλεπίδρασης δεν είναι πλήρως κατανοητός, έχει βρεθεί ότι η αλληλεπίδραση της V3 περιοχής με τον υποδοχέα χημειοκινών CCR5 είναι ιοντικής φύσεως [33]. Πιο συγκεκριμένα, θετικά φορτισμένα αμινοξέα της τρίτης μεταβλητής περιοχής της gp120 φαίνεται να αλληλεπιδρούν με τα αρνητικά σουλφουρωμένα αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο του CCR5.

Τελευταίο στάδιο για την είσοδο του ιού στα κύτταρα είναι η σύντηξη των μεμβρανών του φακέλου και της κυτταρικής μεμβράνης. Η gp41 είναι υπεύθυνη για την σύντηξη των μεμβρανών και αποτελείται από 345 αμινοξέα με μοριακή μάζα 41 kDa, ενώ δεν περιέχει σαφώς καθορισμένες μεταβλητές περιοχές, και είναι πιο προστατευμένη από την gp120. Διαιρείται σε τρεις κύριες περιοχές: την εξωκυτταρική περιοχή (ectodomain), τη διαμεμβρανική (TM) περιοχή, και μία ασυνήθιστα μεγάλη κυτταροπλασματική περιοχή (CD) στο εσωτερικό της ιικής μεμβράνης.

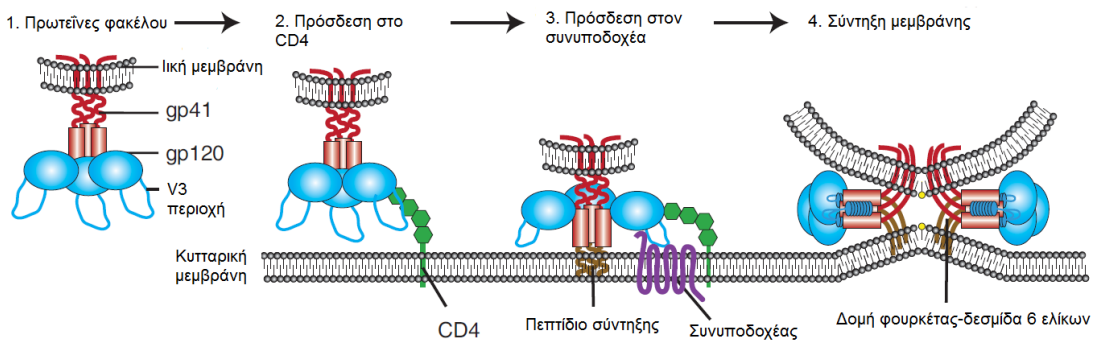
Η εξωτερική περιοχή περιέχει καθοριστικούς παράγοντες με πολλές διαφορετικές λειτουργίες που εμπλέκονται στη σύντηξη του ιού με τις μεμβράνες του ξενιστή: (i) μια N-τελική υδρόφοβη περιοχή η οποία λειτουργεί σαν πεπτίδιο σύντηξης (Fusion Peptide, FP) (ii) μια πολική περιοχή (Polar Region, PR) (iii) δύο επαναλαμβανόμενες α-έλικες, το N-τελικό επαναλαμβανόμενο επταπεπτίδιο (N-terminal heptad region, NHR) και το C-τελικό επαναλαμβανόμενο επταπεπτίδιο (CHR) (iv) μια υδρόφιλη θηλιά που ενώνεται με μία

δισουλφιδική γέφυρα και ενώνει τα επαναλαμβανόμενα επταπεπτίδια, γνωστή ως ανοσοκυρίαρχη θηλία (immunodominant loop, ID) και (v) μία περιοχή πλούσια σε τρυπτοφάνη, την κεντρική στη μεμβράνη εξωτερική περιοχή (Membrane-Proximal External Region, MPER) **(Εικόνα 1.5)**.



Εικόνα 1.5. (Α) Σχηματικό διάγραμμα της πρωτεΐνης gp41 με τις χαρακτηριστικές τις περιοχές. **(Β)** Μοντέλο που αναπαριστά το τριμερές της gp41 πριν το σχηματισμό «φουρκέτας» (δομή δεσμών εξαπλής έλικας) αφού το πεπτίδιο σύντηξης προσδεθεί στην μεμβράνη του ξενιστή. **(Γ)** Μοντέλο της μεμβρανικής σύντηξης μέσω της gp41 που απεικονίζει τα διάφορα στάδια για το σχηματισμό της δομής «φουρκέτας» και τελικά του πόρου σύντηξης, που οδηγεί στην ενσωμάτωση του ιού στον ξενιστή [34].

Όταν η gp120 προσδένεται στον συνυποδοχέα συμβαίνουν περαιτέρω αλλαγές στην χωροδιάταξη του τριμερούς του φακέλου που επιτρέπουν στην gp41 να μεσολαβήσει στη σύντηξη των μεμβρανών ιού και ξενιστή. Η gp41 ξεδιπλώνεται και η υδροφοβική πεπτιδική αλληλουχία σύντηξης προεκβάλλεται προς την μεμβράνη του κυττάρου. Η είσοδος του πεπτιδίου στην κυτταρική μεμβράνη προκαλεί επαναδίπλωση της gp41 σε δομή «φουρκέτας» (hairpin-like structure) έτσι ώστε τα δύο υδροφοβικά επαναλαμβανόμενα επταπεπτίδια να τοποθετούνται αντιπαράλληλα σχηματίζοντας μια δομή δεσμών εξαπλής έλικας (6-helix bundle formation) [35, 36]. **(Εικόνα 1.6).** Αυτή η δομή φουρκέτας πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνη για την σύντηξη των μεμβρανών και την είσοδο του HIV στο κύτταρο ξενιστή.



Εικόνα 1.6. Σχηματική περιγραφή της εισόδου του HIV-1 στο κύτταρο.

1.5 Κύκλος αναπαραγωγής του ιού HIV

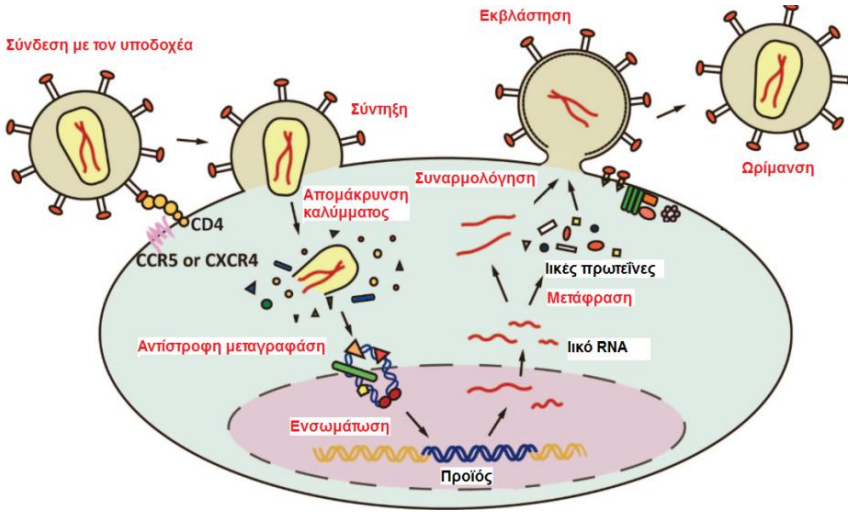
Η σύντηξη της μεμβράνης του φακέλου με την κυτταρική μεμβράνη και κατ΄ επέκταση η είσοδος του ιού στο κύτταρο είναι το αρχικό στάδιο του βιολογικού κύκλου του HIV. Αμέσως μετά την είσοδο του ιού το ιικό καψίδιο ελευθερώνει το γενωμικό RNA και όλες τις πρωτεΐνες μέσα στο κυτταρόπλασμα [37] και ακολουθεί η μεταγραφή των δύο κλώνων RNA του ιού σε DNA. Η διαδικασία αυτή καταλύεται από μόρια της αντίστροφης μεταγραφάσης του ιού και είναι αντίθετη από τη γνωστή πορεία μεταγραφής του DNA σε RNA. Η αντίστροφη μεταγραφάση κινείται κατά μήκος του RNA, συνδέοντας τις κατάλληλες νουκλεοτιδικές βάσεις με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή μιας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA. Όταν ολοκληρωθεί αυτό το στάδιο, η αντίστροφη μεταγραφάση ξεκινά την κατασκευή μιας δεύτερης αλυσίδας DNA, χρησιμοποιώντας την πρώτη ως εκμαγείο.

Κατά την διάρκεια της αντίστροφης μεταγραφής η πολυμεράση του ιού τοποθετεί 1 λανθασμένο νουκλεοτίδιο ανά 1500 με 4000 βάσεις, γεγονός που εξηγεί τον μεγάλο αριθμό μεταλλάξεων [38]. Στην συνέχεια το συμπληρωματικό DNA μεταφέρεται με την βοήθεια δύο ιικών πρωτεϊνών, την Vpr και την Vif, στον πυρήνα του κυττάρου, όπου ενσωματώνεται με την βοήθεια της ιικής ιντεγκράσης (IN) στο DNA του ξενιστή [39]. Σε αυτήν την φάση ο ιός ονομάζεται προϊός και μπορεί να διατηρηθεί σε αυτήν την κατάσταση για αρκετό χρονικό διάστημα.

Μετά από την ενσωμάτωση του ιικού cDNA στο DNA του κυττάρου απαιτείται η παρουσία κυτταρικών μεταγραφικών παραγόντων για την έναρξη της μεταγραφής ορισμένων γονιδίων με την βοήθεια της κυτταρικής RNA πολυμεράσης ΙΙ. Τέτοιοι μεταγραφικοί παράγοντες είναι ο NF-kB, ο NFAT και ο AP-1. Έτσι εξηγείται η αυξημένη

παραγωγή ιοσωμάτων που παρατηρείται σε ενεργοποιημένα Τ κυρίως κύτταρα όπου οι συγκεκριμένοι μεταγραφικοί παράγοντες είναι λειτουργικά ενεργοί. Στην αρχή η μεταγραφή του ιικού DNA είναι μειωμένη και περιορίζεται στην δημιουργία μικρών ματισμένων mRNA που κωδικοποιούν τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες του ιού (Tat, Rev and Nef). Έκφραση της Tat πρωτεΐνης και η επακόλουθη πρόσδεση της στο 5' άκρο του ιικού DNA έχει ως αποτέλεσμα την επιστράτευση της κυτταρικής κυκλίνης Τ1 η οποία προκαλεί αύξηση της μεταγραφής κατά 1000 φορές [40].

Στην συνέχεια τα ιικά ματισμένα μεταγραφήματα mRNA μεταφέρονται από την Rev, με την βοήθεια της κυτταρικής πρωτεΐνης CRM-1, στο κυτταρόπλασμα όπου πραγματοποιείται η μετάφραση τους [41, 42]. Με εξαίρεση το mRNA του env γονιδίου που η μετάφραση γίνεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Μετά τον πρωτεολυτικό κατακερματισμό της gp160 στις gp120 και gp41, ακολουθεί η μεταφορά τους στην πλασματική μεμβράνη όπου και συμπλέκονται με τις πρόδρομες πρωτείνες Gag και Pol, τις Vif, Vpr, Nef και με το RNA. Πρωτεολυτική κατεργασία των Gag και Pol σηματοδοτεί την εκβλάστηση (Viral Budding) των ώριμων ιοσωμάτων και την απομάκρυνση του ιού από το κύτταρο [43] **(Εικόνα 1.7)**. Ο σχηματισμός νέων ιικών σωματιδίων είναι μια σταδιακή διαδικασία: ο πυρήνας ενός νέου ιού σχηματίζεται από το RNA του HIV-1, τις πρωτεΐνες gag και τα ένζυμα pol και κινείται προς την κυτταρική επιφάνεια..



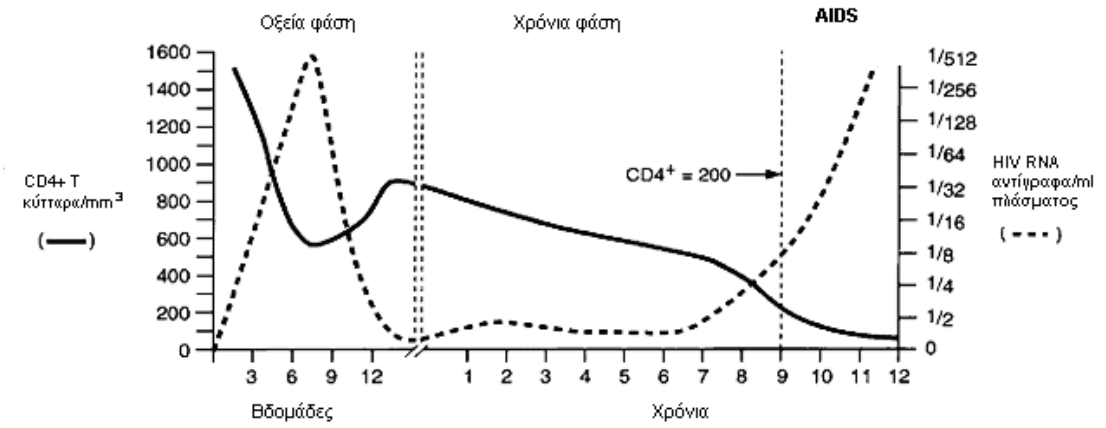
Εικόνα 1.7. Κύκλος αναπαραγωγής του ιού HIV.

1.6 Παθογένεια – Ανοσολογική απόκριση στην HIV μόλυνση

Η βάση της παθογένειας της HIV λοίμωξης είναι η προσβολή του ανοσοποιητικού συστήματος του ανθρώπου από το ίο με την ανάπτυξη της ανοσοεπάρκειας και η επακόλουθη ανοσολογική απάντηση με αποτέλεσμα μία εξαντλητική χρόνια φλεγμονώδη διαδικασία. Ο ιός HIV μολύνει ζωτικά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος όπως είναι CD4+ Τ κύτταρα, τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα [44]. Η μόλυνση από τον ιό μειώνει τα επίπεδα των CD4+ Τ κύτταρων μέσω διαφόρων μηχανισμών, οι οποίοι περιλαμβάνουν απόπτωση των «παρευρισκόμενων» μη μολυσμένων κυττάρων [45], απευθείας θανάτωση των μολυσμένων κυττάρων από τον ιό και τέλος θανάτωση των μολυσμένων CD4+ Τ κύτταρων από τα CD8 κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα που τα αναγνωρίζουν ως μολυσμένα [46]. Όταν ο αριθμός των CD4+ Τ κύτταρων ξεπεράσει ένα κρίσιμο επίπεδο, η κυτταρική ανοσία αποδυναμώνεται, με αποτέλεσμα ο οργανισμός να είναι ευάλωτος στις ευκαιριακές λοιμώξεις.

Το κύριο χαρακτηριστικό της μόλυνσης με τον HIV-1 είναι η ελάττωση του αριθμού των $CD4^+$ Τ λεμφοκυττάρων που οδηγεί σε δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και την εμφάνιση της νόσου του AIDS. Από την στιγμή της μόλυνσης μέχρι την εκδήλωση του AIDS η λοίμωξη με τον HIV παρουσιάζει τρεις χαρακτηριστικές φάσεις [47] **(Εικόνα 1.8).** Η πρώτη φάση, γνωστή ως οξεία φάση (acute phase), ορίζεται από την στιγμή της μόλυνσης μέχρι την εμφάνιση αντισωμάτων κατά του ιού και διαρκεί μερικές εβδομάδες. Τα πρωταρχικά κλινικά συμπτώματα είναι όμοια με αυτά της λοιμώδους μονοπυρήνωσης και γι' αυτό τις περισσότερες φορές δεν γίνεται επιτυχής διάγνωση. Κατά την διάρκεια της οξείας φάσης, ο ιός πολλαπλασιάζεται διαρκώς απουσία οποιασδήποτε ειδικής αντι-ιικής ανοσοποιητικής απάντησης και δύναται να παραχθούν πάνω από 100 εκατομμύρια αντίγραφα ιικού RNA ανά ml. Παράλληλα, παρατηρείται ελάττωση στον αριθμό των $CD4^+$ Τ κυττάρων, με παράλληλη αύξηση του αριθμού των $CD8^+$ Τ κυττάρων που ακολουθούν την αύξηση του ιικού φορτιού [48]. Η δυσλειτουργία των HIV ειδικών $CD4^+$ Τ κυττάρων παρατηρείται πολύ νωρίς στην διάρκεια της οξείας φάσης και αυτό πιστεύεται ότι οφείλεται στην προτίμηση του ιού να μολύνει πρωταρχικά τα συγκεκριμένα κύτταρα [49]. Στην συνέχεια ο αριθμός των $CD4^+$ Τ κυττάρων παρουσιάζει ανάκαμψη αλλά ο αριθμός δεν φτάνει ποτέ τα αρχικά επίπεδα ενώ ο αριθμός των $CD8^+$ Τ κυττάρων παραμένει ελαφρώς αυξημένος.

Μετά την οξεία φάση παρατηρείται μια ισορροπία ανάμεσα στον αριθμό των $CD4^+$ Τ λεμφοκυττάρων και του ιικού φορτίου που χαρακτηρίζει την ασυμπτωματική φάση. Η ασυμπτωματική φάση διαρκεί αρκετά χρόνια με κύριο χαρακτηριστικό την απουσία κλινικών συμπτωμάτων και με σταδιακή καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος. Ο χρόνος ημιζωής ενός ιοσωματίου είναι περίπου 30 λεπτά και ο συνολικός αριθμός ημερήσιας παραγωγής ιοσωμάτων σε έναν ασθενή με χρόνια μόλυνση φτάνει περίπου τα 1010 ιοσωμάτια [50]. Προς το τέλος της ασυμπτωματικης φάσης και εξαιτίας του μικρού αριθμού $CD4^+$ Τ κυττάρων, οι φορείς παρουσιάζουν αρκετά κλινικά συμπτώματα που παρομοιάζουν αυτά μιας τυπικής ίωσης. Όταν ο αριθμός των $CD4^+$ Τ κυττάρων πέσει κάτω από το όριο των 200 κυττάρων/μl τότε ο φορέας θεωρείται ότι έχει πλέον περάσει στο τρίτο στάδιο της μόλυνσης που είναι η εκδήλωση του AIDS.



Εικόνα 1.8. Σχηματική αναπαράσταση της προόδου μιας τυπικής HIV μόλυνσης. Το σχεδιάγραμμα δείχνει τις αλλαγές στον αριθμό των CD4 του περιφερικού αίματος και το ιικό φορτίο [51].

Έκτος από την ελάττωση του αριθμού των $CD4^+$ Τ κυττάρων και την ανικανότητα του οργανισμού να αναπληρώσει τα κύτταρα που πεθαίνουν, δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος οφείλεται και στην μειωμένη λειτουργικότητα των μολυσμένων Τ κυττάρων όσον αφορά την αναγνώριση αντιγόνων και την ανοσολογική απάντηση. Η μειωμένη λειτουργικότητα των $CD4^+$ Τ κυττάρων οφείλεται κυρίως στην μειωμένη έκφραση μορίων που σχετίζονται με την αντιγονοπαρουσίαση με αποτέλεσμα τα κύτταρα να αδυνατούν να αναγνωρίσουν επαρκώς τα αντίστοιχα αντιγόνα τους.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η μείωση της έκφρασης του CD4 υποδοχέα στα κύτταρα που είναι μολυσμένα από τον ιό κυρίως λόγο της δράσης της Nef πρωτεΐνης [16]. Επίσης, κατά την μόλυνση από τον HIV -1 τα δενδριτικά κύτταρα διαθέτουν μειωμένη λειτουργική ικανότητα που χαρακτηρίζεται από μειωμένη έκφραση δεικτών ωρίμανσης (maturation markers), μειωμένη έκφραση κυτταροκινών και προβλήματα στην επεξεργασία και παρουσίαση του αντιγόνου [52]. Η ιική ανθεκτικότητα και μεταλλακτικότητα έχουν ως αποτέλεσμα τη χρόνια αντιγονοπαρουσίαση και τη διαρκή μεταλλαγή των αντιγονικών στόχων των Τ κυττάρων και των αντισωμάτων. Δημιουργείται μία κατάσταση χρόνιας ενεργοποίησης και χρόνιας αντιγονοπαρουσίασης που οδηγεί σε μία ειδική για τον HIV απόκριση των Τ κυττάρων κατά την οποία υπερτερούν κύτταρα με φαινότυπο δραστικών κυττάρων [53].

Τέλος, στα κύτταρα που δεν έχουν μολυνθεί από τον ιό, επιδρούν διάφορες πρωτεΐνες του ιού όπως η Tat και η gp120 και προκαλούν δυσλειτουργία των Τ κυττάρων με συνέπεια να χάνουν την ανοσοποιητική τους ικανότητα. Στον **Πίνακα 1.1** παρουσιάζονται συνοπτικά οι δυσλειτουργίες που προκαλεί ο ιός HIV στα κύτταρα του ανοσοποιητικού.

Πίνακας 1.1. Διαταραχές κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος στην HIV λοίμωξη.

Τύπος κυττάρου	Χαρακτηριστικές διαταραχές
CD4 $^{+}$ Τ- λεμφοκύτταρα	• Σημαντική ελάττωση του αριθμού • Διαταραχή στην έκφραση και παραγωγή των κυτταροκινών • Διαταραχή στην απάντηση σε αντιγόνα
CD8^{+} Τ-λεμφοκύτταρα	Διαταραχή στην κυτταροτοξική δράση
Β-λεμφοκύτταρα	Πολυκλωνική ενεργοποίηση με επακόλουθη εξάντληση και διαταραχή στην αντισωματική απάντηση έναντι αντιγόνων
Μονοκύτταρα-Μακροφάγα	Διαταραχή στην χημειοταξία και την φαγοκυττάρωση
Πολυμορφοπύρηνα	Διαταραχή στην χημειοταξία και την φαγοκυττάρωση και την ενδοκυττάρια καταστροφή του υλικού που φαγοκυτταρώθηκε
Κύτταρα φυσικοί φονείς (NK)	Διαταραχή στην απελευθέρωση κυτταροτοξικών παραγόντων

Η ανοσολογική απόκριση περιλαμβάνει στοιχεία της χυμικής και της κυτταρικής ανοσίας. Η χυμική ανοσία περιλαμβάνει μηχανισμούς με τους οποίους παράγονται

αντισώματα έναντι του ιού HIV από τα Β-λεμφοκύτταρα. Τα αντισώματα αυτά εμφανίζονται συνήθως σε διάστημα 4-12 εβδομάδων μετά την μόλυνση και στρέφονται κυρίως κατά των αντιγόνων gag, pol, env καθώς και έναντι άλλων ρυθμιστικών πρωτεϊνών του ιού. Τα αντισώματα αυτά είναι δεσμευτικά, εξουδετερωτικά και κυτταροτοξικά. Τα δεσμευτικά αντισώματα ενώ διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην διάγνωση δεν είναι τόσο αποτελεσματικά στην άμυνα του ξενιστή. Τα εξουδετερωτικά αντισώματα, τα οποία μπορεί να είναι ειδικού τύπου ή ομάδας, είναι ικανά να εξουδετερώσουν πολλά στελέχη του ιού (αντισώματα ομάδας), ενώ τα ειδικού τύπου ένα συγκεκριμένο στέλεχος. Τα κυτταροτοξικά αντισώματα από τα οποία εξαρτάται η κυτταροτοξικότητα (ADCC-antibody dependent cellular cytotoxicity) μπορούν να φονεύουν μολυσμένα αλλά και μη μολυσμένα κύτταρα [54].

Κατά την πρόοδο της νόσου η συνεχής διέγεσρη των Β-λεμφοκυττάρων, υπό την επίδραση του HIV ή των gp120 και gp41, ενώ οδηγεί αρχικά σε μια πολυκλωνική διέγερση με αποτέλεσμα την αύξηση των ανοσοσφαιρινών του ορού, τελικά καταλήγει σε εξάντληση τους και τα επίπεδα των ανοσοσφαιρινών, ελαττώνονται δραματικά με αντίστοιχη ελάττωση και των αντισωμάτων έναντι του ιού.

Η κυτταρική ανοσία βασίζεται στα βοηθητικά $CD4^+$ Τ κύτταρα, τα οποία οδηγούν σε έκκριση κυτταροκινών, οι οποίες ενεργοποιούν άλλα ανοσοδραστικά κύτταρα όπως τα $CD8^+$ Τ λεμφοκύτταρα, τα Β λεμφοκύτταρα και τα φυσικά κυτταροκτόνα (NK). Τα $CD8^+$ Τ λεμφοκύτταρα αναστέλλουν τον ιό μέσω καταστροφής των μολυσμένων κυττάρων μέσω ειδικών κυτταροτοξικών Τ-λεμφοκυττάρων (CTL) ή καταστέλλοντας τον ιό στα προσβεβλημένα κύτταρα μέσω έκκρισης διαλυτών κατασταλτικών παραγόντων.

Το σύνολο των διαταραχών τόσο της κυτταρικής όσο και της χυμικής ανοσίας το οποίο προκαλείται από τον ιό HIV οδηγεί σε μία ευρεία ανοσοκαταστολή, χρονική διάρκεια της νόσου και επακόλουθες παθολογικές καταστάσεις όπως είναι η ανάπτυξη ευκαιριακών λοιμώξεων και διαφόρων νεοπλασμάτων.

1.7 Αντιρετροϊκή θεραπεία της μόλυνσης HIV

Από την πρώτη απομόνωση του ιού μέχρι σήμερα, σημαντικός στόχος στο πεδίο της έρευνας του HIV είναι η ανακάλυψη φαρμακευτικών σκευασμάτων που θα καταπολεμούν αποτελεσματικά την μόλυνση. Προς αυτήν την κατεύθυνση έχει παρατηρηθεί ικανοποιητική πρόοδος και περίπου πάνω από 20 αντί-HIV φάρμακα έχουν πάρει την

έγκριση του Αμερικανικού οργανισμού φαρμάκων (FDA) [55]. Η πλειοψηφία αυτών των φαρμάκων σχετίζεται με την παρεμπόδιση της διαδικασίας αντιγραφής του ιού, γεγονός που υποδεικνύει ότι η μόλυνση του κυττάρου έχει ήδη επιτευχτεί. Μέχρι πρόσφατα, σκοπός λοιπόν των συγκεκριμένων φαρμάκων ήταν να παρεμποδίσουν ή να μειώσουν την περαιτέρω μολυσματικότητα του ιού. Όλα τα ευρέως χρησιμοποιούμενα φάρμακα δρουν αναστέλλοντας κάποιο από τα στάδια του αναπαραγωγικού κύκλου του ιού. Τα αντιρετροϊκά φάρμακα κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τον μηχανισμό δράσης στις παρακάτω ομάδες :

- Νουκλεοτιδικά ανάλογα-αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (Nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NRTI)
- Μη νουκλεοτιδικά ανάλογα-αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NNRTI) [56]
- Αναστολείς πρωτεασών (Protease inhibitors, PI) [57]
- Αναστολείς σύντηξης (Fusion inhibitors)
- Αναστολείς της ιντεγκράσης (Integrase stand transfer inhibitors, INSTIs)

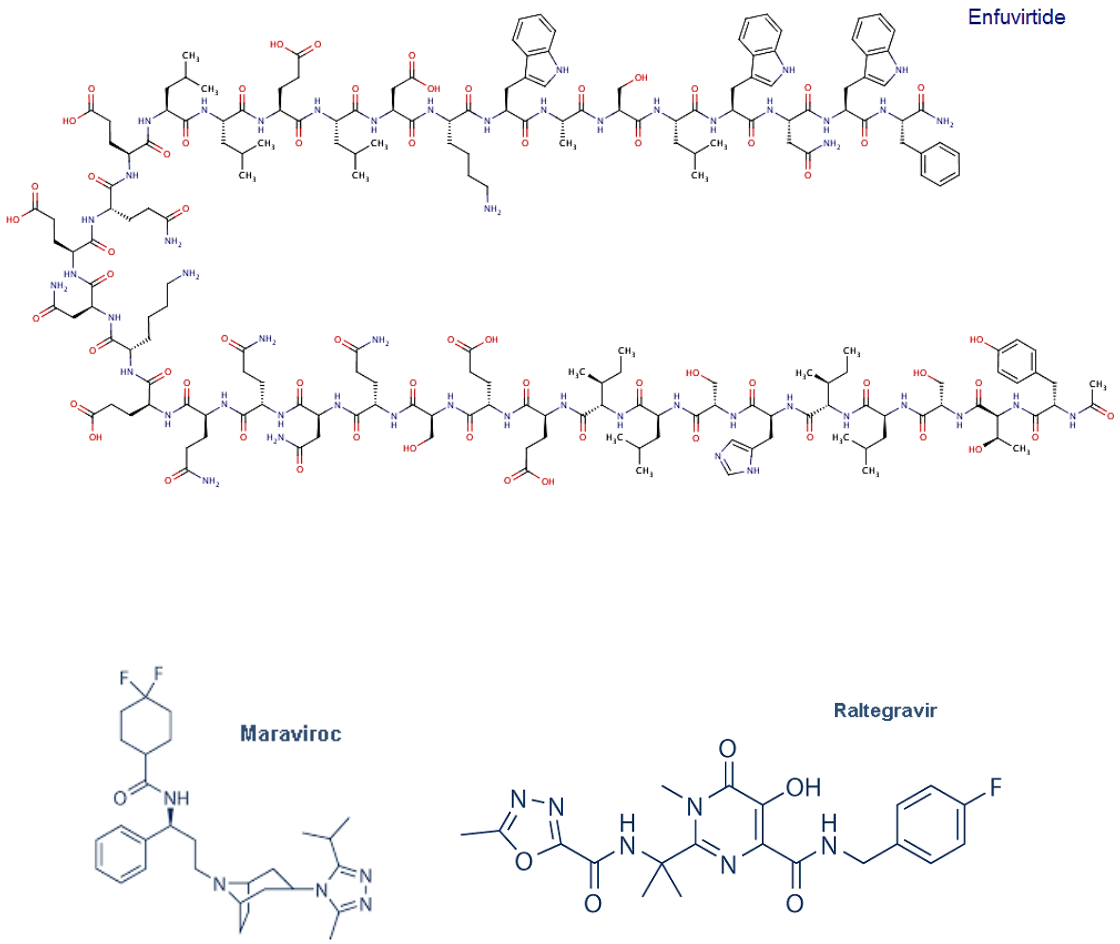
Τα τελευταία χρόνια τα φάρμακα χορηγούνται σε συνδυασμό, με στόχο να αυξηθούν οι πιθανότητες επιτυχίας της θεραπεία. Η συνδυαστική αυτή θεραπεία ονομάζεται HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy). Παρόλο που η θνησιμότητα σε παγκόσμιο επίπεδο έχει μειωθεί σημαντικά, ο μεγάλος αριθμός μεταλλάξεων του ιού έχει δημιουργήσει ανθεκτικά στελέχη τα οποία αντιστέκονται στην θεραπεία.

Η νέα γένια φαρμάκων καλείται να καταπολεμήσει την υψηλή τοξικότητα και την ανθεκτικότητα που παρατηρήθηκε στα πρώτα φαρμακευτικά σκευάσματα. Μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί αποτελεσματική θεραπεία και τα υπάρχοντα φάρμακα απλώς αυξάνουν το προσδόκιμο ζωής των ασθενών. Η νέα τάση στον σχεδιασμό φαρμάκων έχει επικεντρωθεί κυρίως στην ανάπτυξη φαρμάκων που θα εμποδίζουν την είσοδο του ιού στο κύτταρο. Οι αναστολείς της εισόδου του ιού πιστεύεται ότι είναι το επόμενο βήμα για την καταπολέμηση την ασθένειας αφού εκτός των άλλων είναι δυνατόν να παρεμποδίσει την μετάδοση του ιού σε νέους φορείς [58]. Το πρώτο φάρμακο αυτής της κατηγορίας είναι το Enfuvirtide (Fuseon, T-20) το οποίο έχει πάρει την έγκριση του FDA και της Ευρωπαϊκής επιτροπής για την θεραπεία του AIDS. Είναι ένα συνθετικό πεπτίδιο 36 αμινοξέων το οποίο μιμείται την φυσική πεπτιδική αλληλουχία που βρίσκεται στο C-τελικό τμήμα της gp41 και συγκεκριμένα το επαναλαμβανόμενο επταπεπτίδιο (heptad repeat 2, HR2) με αποτέλεσμα να προσδένεται ανταγωνιστικά στο υδροφοβικό επαναλαμβανόμενο επταπεπτίδιο (HR1), εμποδίζοντας τα δύο τμήματα να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους και

να σχηματίσουν τη δομή «φουρκέτας» που είναι απαραίτητη για τη σύντηξη του φάκελου του ίου με την μεμβράνη του κυττάρου στόχου. Επίσης, στην κατηγορία των φαρμάκων που αφορούν τους αναστολείς σύντηξης και συγκεκριμένα ανταγωνιστές του υποδοχέα CCR5, το 2007 εγκρίθηκε το Maraviroc και δρα παρεμποδίζοντας την είσοδο των ιών με τροπισμό CCR5 εντός των CD4+ Τ κυττάρων. Απαραίτητη προϋπόθεση για τη χρήση του είναι να έχει προηγηθεί μελέτη τροπισμού στους ασθενείς, καθώς η δράση του σε στελέχη με μικτό τροπισμό ή X4 είναι μέτρια [59].

Το 2007 το Raltegravir πήρε έγκριση ως το πρώτο φάρμακο της κατηγορίας αναστολέων της ιντεγκράσης, ένα ένζυμο κλειδί στον κύκλο αναπαραγωγής του ιού καθώς ενσωματώνει το ιϊκό DNA στο γονιδίωμα του ξενιστή και είναι απαραίτητο για την αντιγραφή του ιού [60]. Στην **Εικόνα 1.9** παρουσιάζονται οι χημικοί τύποι των τριών αυτών αντιρετροϊκών φαρμάκων.

Η επιτυχία της HAART στην αντιμετώπιση του AIDS έχει προκαλέσει συζήτηση, για το κατά πόσο είναι δυνατό να εξαλειφθεί ο ιός από ένα μολυσμένο άτομο και να θεραπευτεί πλήρως. Η γενική πεποίθηση είναι ότι αυτό δεν είναι πιθανό, κυρίως εξαιτίας της παραμονής μολυσμένων $CD4^+$ Τ κυττάρων και μακροφάγων σε λανθάνουσα κατάσταση, τα οποία μπορεί να αποτελέσουν δεξαμενή μολυσματικών ιοσωματίων, αν ο προϊός ενεργοποιηθεί. Ακόμα και με ιικό φορτίο κάτω από το επίπεδο ανίχνευσης των δοκιμασιών PCR, το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να ανακάμψει ικανοποιητικά, ώστε να εξαλείψει τον ιό που μπορεί να αρχίσει να αντιγράφεται σε απόκριση κάποιου σήματος ενεργοποίησης. Επιπλέον, ο ιός μπορεί να εμμένει σε σημεία όπως ο εγκέφαλος, όπου δεν εισχωρούν τα αντιρετροϊκά φάρμακα, ακόμα και αν ο ιός είναι μη ανιχνεύσιμος στην κυκλοφορία.



Εικόνα 1.9. Χημικοί τύποι των enfuvirtide, maraviroc και raltegravir. Το καθένα παρεμποδίζει ένα καθοριστικό στάδιο για την είσοδο και την αναπαραγωγή του ιού.

Κεφάλαιο 2

Ανάπτυξη εμβολίων κατά του HIV

2.1 Εισαγωγή

Το κόστος της εξαιρετικά δραστικής αντι-ρετροϊικής θεραπείας (HAART), η αυστηρή αγωγή και οι παρενέργειες αποκλείουν την καθολική της εφαρμογή. Επιπλέον, ο ιός αναπτύσσει αντοχή στα φάρμακα και υπάρχουν αποθήκες (reservoirs) του ιού που καθιστούν αδύνατη την εκρίζωσή του [1]. Ακόμα και αν επιτευχθεί η θεραπεία στα άτομα που λαμβάνουν συνδυαστικές θεραπείες, η επιδημία στις αναπτυσσόμενες χώρες, στις οποίες βρίσκεται η πλειονότητα των θυμάτων του AIDS δεν θα επηρεαστεί σημαντικά. Η καλύτερη λύση για να σταματήσει η εξάπλωση του AIDS είναι ένα ασφαλές, αποτελεσματικό εμβόλιο που να εμποδίζει τη μόλυνση και την εξέλιξη της ασθένειας. Οι δυσκολίες στην ανάπτυξη ενός προφυλακτικού εμβολίου, το οποίο θα αποτρέπει τη λοίμωξη και θα είναι αποτελεσματικό για όλες τις πιθανές οδούς μόλυνσης, συμπεριλαμβανομένων των βλεννογόνων, έγκεινται:

- Στην αποφυγή χρήσης συμβατικών τεχνικών παρασκευής εμβολίου με ζώντα εξασθενημένο ή αδρανοποιημένο (νεκρό) ιό για λόγους ασφαλείας
- Στη μεγάλη γενετική ποικιλομορφία του HIV
- Στο ότι ο HIV παρακάμπτει τους ανοσολογικούς μηχανισμούς
- Στην έλλειψη περιστατικών φυσικής ανοσίας για να προσδιοριστεί ο στόχος που πρέπει να επιτευχτεί μέσω του εμβολίου. Παράλληλα, και τα μοντέλα σε ζώα είναι ανεπαρκή (λίγα πρωτεύοντα μολύνονται από τον HIV και σε αυτά που καταγράφεται λοίμωξη δεν παρατηρείται ανοσοκαταστολή) [2] για να μιμηθούν με επιτυχία τα αντίστοιχα παθολογικά και ανοσολογικά φαινόμενα στον άνθρωπο

Στις σύγχρονες τεχνικές παρασκευής εμβολίου έναντι του HIV περιλαμβάνονται: (πλασμιδιακά) DNA εμβόλια, τα οποία είναι ασφαλή και μη τοξικά εμβόλια αλλά με περιορισμένη ανοσοδιέγερση στον άνθρωπο και εμβόλια με ανασυνδυασμένους ιούς φορείς, που χορηγούνται είτε μόνα τους είτε ως ενισχυτικά σε συνδυασμό με DNA εμβόλια [3].

Τα πλέον ενθαρρυντικά αποτελέσματα από τις ερευνητικές προσπάθειες στο χώρο των εμβολίων, προέρχονται από μία τυχαιοποιημένη, πολυκεντρική, φάσης III κλινική δοκιμή με την ονομασία RV144 [4]. Στην έρευνα αυτή, η οποία δημοσιεύτηκε το 2009, αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα μίας προσέγγισης συνδυασμού δύο εμβολίων: του κύριου εμβολίου με έναν τροποποιημένο ιό-φορέα (ALVAC-HIV) και ενός ενισχυτικού (AIDSVAX B/E), που περιέχει ανασυνδυασμένη gp120. Τα εμβόλια βασίζονται στα HIV

στελέχη B και E, τα οποία κυκλοφορούν στην Ταϊλάνδη. Η τροποποιημένη ανάλυση με βάση την πρόθεση θεραπείας έδειξε ότι από τους 8.197 συμμετέχοντες που εμβολιάστηκαν, μολύνθηκαν οι 51, ενώ από τα 8.198 άτομα της ομάδας εικονικού εμβολίου (Placebo) μολύνθηκαν οι 74. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν μείωση της επίπτωσης του HIV λόγω του εμβολίου κατά 31,2%. Το συγκεκριμένο εμβόλιο δεν επηρέασε τα επίπεδα του ιικού φορτίου ή τις τιμές των $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων στα άτομα που είχαν εμβολιαστεί αλλά μολύνθηκαν από τον HIV και δείχνει περιορισμένη αποτελεσματικότητα στα άτομα υψηλού κινδύνου.

2.2 Διαφορετική απόκριση των ατόμων στην HIVμόλυνση

Η πλειονότητα των μολυσμένων ατόμων χωρίς θεραπεία χαρακτηρίζονται από συνεχή ιική αντιγραφή (ιικό φορτίο >10.000 αντίγραφα/ml) και σταδιακή ελάττωση των $CD4^+$ T κυττάρων. Ωστόσο, ένα μικρό ποσοστό μολυσμένων ατόμων (5-15%) παραμένουν κλινικά και ανοσολογικά σταθεροί για χρόνια. Οι long-term non progressors (LTNPs) αρχικά ορίσθηκαν με βάση τη διάρκεια της μόλυνσης και τον αριθμό των $CD4^+$ T κυττάρων. Όταν έγινε δυνατή η μέτρηση του ιικού φορτίου διαπιστώθηκε πως οι περισσότεροι LTNPs παρουσιάζουν χαμηλά έως μέτρια επίπεδα ιικού φορτίου στο αίμα (συνήθως <2000 αντίγραφα HIV RNA/ml), αλλά η περαιτέρω παρακολούθηση αποκάλυψε ότι είχαν σταθερά αυξανόμενο ιικό φορτίο και φθίνοντα αριθμό CD4+ T κυττάρων. Ένα υποσύνολο της ομάδας αυτής, οι Elite Controllers (ECs), που αντιστοιχεί σε ποσοστό <1% των μολυσμένων ατόμων, είναι ικανό να διατηρήσει το ιικό φορτίο κάτω από τα όρια της ανίχνευσης (<50 αντίγραφα HIV RNA/ml) και σταθερό αριθμό $CD4^+$ T κυττάρων χωρίς αντιρετροϊική αγωγή. Οι μηχανισμοί που προσδίδουν την ιδιαίτερη αυτή ικανότητα στους ECs, να ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό του HIV-1, έχουν αποτελέσει το επίκεντρο πολλών μελετών, καθώς μπορούν να αποκαλύψουν τους καθοριστικούς μηχανισμούς που είναι υπεύθυνοι για τον ανοσολογικό έλεγχο του HIV ή την ανοσολογική αποτυχία. Τα μέχρι τώρα ερευνητικά αποτελέσματα ενοχοποιούν ιολογικούς, γενετικούς και ανοσολογικούς παράγοντες [5].

Οι ECs μπορεί να έχουν μολυνθεί από εξασθενημένους ιούς λόγω μεταλλάξεων ή ελλείψεων σε γονίδια, όπως στο nef [6], στις συντηρημένες περιοχές του gag που μειώνουν την πολλαπλασιαστική ικανότητα του ιού να εισέλθει στο κύτταρο [7] ή στο γονίδιο env, που επίσης ελαττώνουν την ικανότητα του ιού να εισέλθει στο κύτταρο [8]. Η

διαδικασία της αντιγονοπαρουσίασης διαδραματίζει κομβικό ρόλο στον περιορισμό του πολλαπλασιασμού του ιού στους ECs, όπως αποδεικνύεται από μία πρόσφατη ευρεία ανάλυση του γονιδιώματος σε μια πολυεθνική ομάδα HIV-1 controllers και progressors όπου αναγνωρίστηκαν πάνω από 300 σημειακοί πολυμορφισμοί εντοπισμένοι στην περιοχή του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC), καθώς και δύο παραλλαγές του γονιδίου CCR5 [9]. Επίσης έχει δειχθεί ότι τα $CD4^+$ T κύτταρα των ECs έχουν μειωμένη ευαισθησία στη μόλυνση από τον HIV-1 [10] και είναι λιγότερο επιρρεπή στην απόπτωση μέσω του υποδοχέα Fas, τον κύριο υποδοχέα του κυτταρικού θανάτου που επάγεται από ενεργοποίηση [11]. Οι ECs διατηρούν την ικανότητα τους να παράγουν IL2,IL17 και IL21 [12].

Η κατανόηση των μηχανισμών ελέγχου της μόλυνσης από τον HIV στις ομάδες αυτές θα δώσει χρήσιμες πληροφορίες που θα συντελέσουν στην ανάπτυξη αποτελεσματικής θεραπείας και εμβολίου έναντι του ιού.

2.3 Εξουδετερωτικά αντισώματα και πεπτιδομιμητικοί επίτοποι

Τα εξουδετερωτικά αντισώματα εντοπίζονται στον περιφερειακό αίμα και έχουν την ιδιότητα να δρουν σαν δεύτερη γραμμή υπεράσπισης, όταν αποτυγχάνει η κυτταρική ανοσία του ανθρώπινού οργανισμού. Τα εξουδετερωτικά αντισώματα (neutralizing antibodies, nAbs) κατά του HIV-1 διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην πρόληψη της μόλυνσης. Τα αντισώματα αυτά έχουν την ικανότητα να εξουδετερώνουν το αντιγόνο παρεμποδίζοντας ή καταστρέφοντας την βιολογική του δράση. Μια πιο εξειδικευμένη κατηγορία αποτελούν τα ισχυρά εξουδετερωτικά αντισώματα (broadly neutralizing antibodies, bnAbs), τα οποία είναι σε θέση να εξουδετερώνουν πολλαπλά στελέχη του HIV. Αν και ο ρόλος τους στον περιορισμό της αναπαραγωγή του ιού στα ήδη μολυσμένα άτομα δεν είναι ξεκάθαρος, υπάρχουν αποδείξεις ότι τα εξουδετερωτικά αντισώματα ενισχύουν την κυτταρική ανοσία, αποτρέποντας ή καθυστερώντας την εξέλιξη του AIDS.

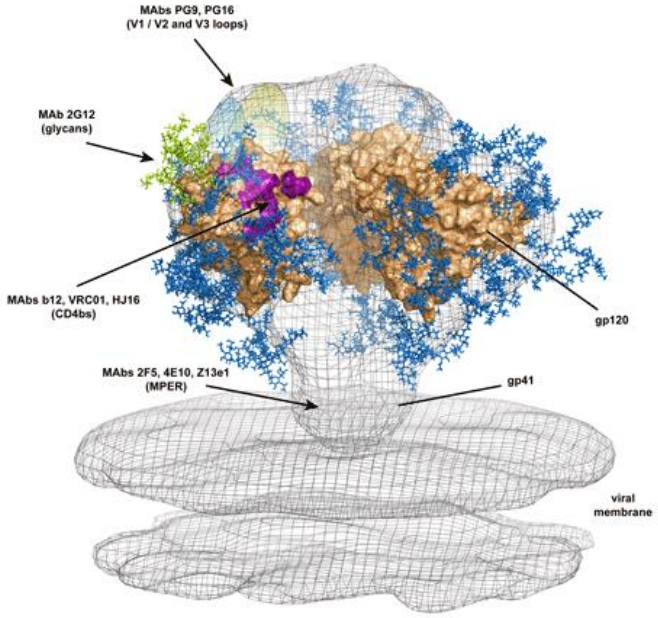
Ο χαρακτηρισμός των bnAbs που έχουν ταυτοποιηθεί αποκαλύπτει ασυνήθιστα διαμορφωτικά χαρακτηριστικά και μεγάλη έκταση μεταλλάξεων στις συμπληρωματικές καθοριστικές περιοχές (complementary determining regions, CDR), ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης τους με τα εξελισσόμενα Env αντιγόνα [13]. Επομένως, απαιτείται χρόνος για να αναπτυχθούν bnAbs, και αν είναι παρόντα, ανιχνεύονται σε χρόνια μολυσμένα άτομα μετά από αρκετά χρόνια από τη στιγμή της μόλυνσης [14]. Οι HIV

controllers είναι μια πολλά υποσχόμενη πηγή για την ταυτοποίηση των nAbs, καθώς στα άτομα αυτά, υπάρχει χρόνος να αναπτυχθούν και να ωριμάσουν, απουσία θεραπείας. Σε έρευνα, ταυτοποιήθηκαν LTNPs και ECs με εξουδετερωτικά αντισώματα στο πλάσμα τους και μέσω βιβλιοθηκών φάγων συλλέγονται μικρά πεπτίδια [15] ή μεγαλύτερα τμήματα πρωτεϊνών του φακέλου του HIV-1 που αναγνωρίζονται από τα αντισώματα αυτά [16]. Αυτό επέτρεψε την ταυτοποίηση νέων γραμμικών και διαμορφωτικών επιτόπων ικανών να επάγουν εξουδετερωτικά αντισώματα μετά από εμβολιασμό σε ποντίκια [17].

Σημαντικός στόχος στην ανάπτυξη αποτελεσματικών εμβολίων, επομένως, είναι η παραγωγή ισχυρών εξουδετερωτικών αντισωμάτων μετά από εμβολιασμό, ο μηχανισμός δράσης αυτών περιγράφεται εκτενώς στη συνέχεια, όπως και οι μηχανισμοί που χρησιμοποιεί ο ιός για να διαφύγει από το ανοσοποιητικό σύστημα.

2.3.1 Μηχανισμός εξουδετέρωσης των bnAbs

Ο πιο κοινός μηχανισμός δράσης των εξουδετερωτικών αντισωμάτων είναι η παρεμπόδιση της εισόδου του ιού στα κύτταρα στόχους. Τα εξουδετερωτικά αντισώματα εμποδίζουν την μόλυνση μέσω της πρόσδεσης τους σε διαφορετικά διαμορφωτικά ενδιάμεσα που εκτίθενται κατά την πορεία της εισόδου του ιού στο κύτταρο [18, 19]. Κάποια από τα εξουδετερωτικά αντισώματα που έχουν ταυτοποιηθεί, τα οποία αποτελούν και bnAbs, είναι το b12 έναντι του σημείου σύνδεσης του CD4 στην gp120, το 2G12 που κατευθύνονται κατά των γλυκοζυλιομένων επιτόπων της gp120 και το 17b έναντι των περιοχών πρόσδεσης του συνυποδοχέα στην gp120. Οι περιοχές αυτές αποκαλύπτονται μετά την πρόσδεση του CD4. Επίσης, έχουν αναφερθεί, τα 2F5 και 4E10 εξουδετερωτικά αντισώματα που στοχεύουν στην gp41, αποτρέποντας την σύντηξη, που είναι το τελικό βήμα της εισόδου του ιού στον ξενιστή. Τα περισσότερα bNAbs που ταυτοποιούνται έχουν ως στόχους τις παραπάνω περιοχές **(Εικόνα 2.1)**. Τα αντισώματα αυτά εμποδίζουν την λοίμωξη μέσω της πρόσδεσης τους σε διακριτούς επιτόπους του φακέλου του ιού που είναι καθοριστικοί για την μόλυνση. Επίσης, HIV-nAbs είναι γνωστό ότι συνδέονται με περιοχές κυτταρικών υποδοχέων που εμπλέκονται στην είσοδο του HIV-1 [20]. Η χαρτογράφηση των επιτόπων που διεγείρουν τέτοια αντισώματα μέσω της τεχνολογίας των φάγων, χρησιμοποιείται στην ταυτοποίηση κυτταρικών επιτόπων εισόδου του HIV-1 [21, 22].



Εικόνα 2.1. Μοντέλο του φακέλου του HIV, όπου φαίνονται οι επίτοποι που αναγνωρίζονται από μονοκλωνικά bnAbs. Οι προεκβολές του φακέλου αποτελούνται από ετεροτριμερή γλυκοπρωτεϊνών $(gp120)_3$ $(gp41)_3$. [23].

Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι ο αριθμός των gp120/gp41τριμερών φακέλου ποικίλουν στην επιφάνεια των ιοσωμάτων και συνήθως είναι μεταξύ 7 με 19 και εξαρτάται από τον τύπο κυττάρου από τον οποίο παράχθηκε ο ιός [24]. Τα εξουδετερωτικά αντισώματα, μπορούν να ασκήσουν την εξουδετερωτική τους δράση και μέσω διασταυρωτής σύνδεσης ιοσωμάτων σχηματίζοντας μεγάλα μοριακά συσσωματώματα, τα οποία καταστρέφονται με φαγοκυττάρωση. Εναλλακτικά, ενεργοποιούν το συμπλήρωμα ή προκαλούν την ενεργοποίηση κυτταροτοξικής απάντησης, οδηγώντας στο θάνατο των μολυσμένων κυττάρων, αντί της εξουδετέρωσης ελεύθερων ιοσωμάτων [25]. Επίσης, αξίζει να αναφερθεί ότι ενίοτε, τα αντισώματα έχουν ενισχυμένες ιδιότητες, ειδικά μετά από ανοσοποιήσεις με ολόκληρα ιοσώματα [26].

2.3.2 Μηχανισμοί διαφυγής του HIV-1 από το ανοσοποιητικό σύστημα

Οι γλυκοπρωτεΐνες του φακέλου του ιού και ειδικά η gp120, είναι οι κύριοι ειδικοί ιικοί στόχοι που έχουν πρόσβαση τα εξουδετερωτικά αντισώματα. Ο HIV-1 χρησιμοποιεί διάφορους τρόπους ώστε να αποτρέψει την παραγωγή εξουδετερωτικών αντισωμάτων εναντίον του από το κύτταρο ξενιστή. Πρώτον, οι σταθερές περιοχές που είναι σημαντικές

για την πρόσδεση των υποδοχέων και για τη είσοδο του ιού στο κύτταρο, καλύπτονται από υψηλά μεταβλητές περιοχές, V1-V5, με αποτέλεσμα να είναι προστατευμένες από μια ενδεχόμενη επίθεση αντισωμάτων [27]. Παρότι εξουδετερωτικά αντισώματα μπορούν να παραχθούν και για αυτές τις περιοχές και ειδικά κατά τις V3 θηλιάς, ξεφεύγουν ταχύτατα λόγω μεταλλάξεων, αλλαγών στις μεταβλητές θηλιές, καθώς και λόγω μετατοπίσεων των σημείων γλυκοζυλίωσης [28].

Επιθυμητοί στόχοι για την παραγωγή ισχυρών εξουδετερωτικών αντισωμάτων είναι οι συντηρημένες περιοχές της gp120, οι οποίες σχηματίζουν τα σημεία πρόσδεσης με τον υποδοχέα [29, 30]. Αντισώματα κατά των επιτόπων που αντιστοιχούν στα σημεία πρόσδεσης του CD4 και του CCR5 δύσκολα παράγονται καθώς τα σημεία αυτά επικαλύπτονται από τις θηλιές V1/V2 και V3 [29]. Η διαμορφωτική αλλαγή που προκύπτει μετά την πρόσδεση του CD4 στην πρωτεΐνη, αφήνει εκτεθειμένους επιτόπους που αντιστοιχούν στη θέση πρόσδεσης του συνυποδοχέα αλλά στο σημείο αυτό το ιοσωμάτιο είναι ήδη πολύ κοντά στην κυτταρική μεμβράνη περιορίζοντας τον χώρο για την πρόσβαση εξουδετερωτικών αντισωμάτων. Αυτή η πολύπλοκη διαδικασία μόλυνσης που περιλαμβάνει διαδοχική πρόσδεση δυο υποδοχέων, όπου η πρόσδεση του δεύτερου εξαρτάται από την πρόσδεση του πρώτου, καθώς η θέση πρόσδεσης για τον συνυποδοχέα αποκαλύπτεται μόνο μετά την πρόσδεση του CD4, αποτελεί έναν έξυπνο μηχανισμό του ιού που προστατεύει του καθοριστικούς επιτόπους για την είσοδο του στον ξενιστή, από τα εξουδετερωτικά αντισώματα.

2.3.3 Στοιχεία για την αποτελεσματική προστασία των εξουδετερωτικών αντισωμάτων

Αν και η χυμική ανοσολογική απόκριση συμβάλει ξεκάθαρα στην αποτροπή της μόλυνσης από τον HIV-1, ο ρόλος της στον έλεγχο μιας ήδη υπάρχουσας μόλυνσης αποτελεί ακόμα θέμα συζήτησης. Ενώ η καταστολή της μόλυνσης αποδίδεται κυρίως στην κυτταρική ανοσία [19, 31], σε πολλές δημοσιεύσεις υποδεικνύεται ότι αντισώματα, που εγείρονται από την μόλυνση ή χορηγούνται παθητικά, είναι ικανά να συμβάλλουν στον έλεγχο της αναπαραγωγής του ιού [32]. Εξουδετερωτικά αντισώματα έναντι του HIV ανιχνεύονται μετά από 8 εβδομάδες από τη στιγμή της μόλυνσης [33]. Στα άτομα που ανιχνεύτηκαν τα αντισώματα αυτά, παρατηρήθηκε μία αντίστροφη συσχέτιση ανάμεσα στου τίτλους nAbs και του ιικού φορτιού. Έρευνα αποδεικνύει την παρουσία nAbs σε βιολογικά υγρά ατόμων που ανήκουν στην κατηγορία υψηλού κινδύνου, οροαρνητικών

(HEPS) και σε μολυσμένα άτομα που είναι ικανά να ελέγχουν ή να καθυστερούν ως ένα βαθμό την εξέλιξη της μόλυνσης [34, 35]. Επίσης, σε συντρόφους μολυσμένων από HIV ατόμων, πέρα από μία ισχυρή ανοσολογική απόκριση, ανιχνεύτηκαν HIV-nAb [35, 36]. Μέχρι στιγμής δεν είναι τίποτα γνωστό για τους επιτόπους που αναγνωρίζουν αυτά τα αντισώματα, αλλά η παρουσία τους στην κυκλοφορία του αίματος μειώνει την μολυσματικότητα του ιού, μειώνει τον κίνδυνο της μετάδοσης [37] και λειτουργεί θετικά στην αντιμετώπιση της υπάρχουσας μόλυνσης [36].

Γενικά εξουδετερωτικά αντισώματα (bnAbs) συνέβαλαν στον έλεγχο της ιαιμίας σε χρόνια μολυσμένους μακάκους με HIV-1 [38, 39]. Μονοκλωνικά bnAbs έναντι του HIV-1 (bnmAbs), τα οποία παρεμποδίζουν κρίσιμα σημεία για την είσοδο του ιού στο κύτταρο, έχουν απομονωθεί από ασθενείς με χρόνια μόλυνση με HIV [40]. Τα πλήρως χαρακτηρισμένα bnmAbs, όπως τα b12, 2G12, 2F5 και 4E10 παράγονται ταχύτατα τα τελευταία χρόνια με απευθείας κλωνοποίηση από Β-κύτταρα ειδικά για την Env, που απομονώθηκαν από χρόνιους ασθενείς με bnAbs στο πλάσμα τους [41, 42].

Η παρουσία των nAbs σε μολυσμένα με HIV άτομα, τα οποία είναι σε θέση να ελέγχουν την λοίμωξη για χρόνια χωρίς αντιρετροϊκή θεραπεία υποδεικνύει ότι ο HIV είναι ευάλωτος στην χυμική ανοσολογική απόκριση των ατόμων αυτών. Πολλές μελέτες έχουν υποδείξει ισχυρά nAbs με διασταυρωτή δράση στον ορό των long-term nonprogressors (LTNPs) [43, 44]. Μια πρόσφατη έρευνα ξεκάθαρα καταδεικνύει την παρουσία bnAs σε ορούς των LTNPs και μέσω μια αντίστροφης διαδικασίας εμβολιασμού γίνεται ταυτοποίηση των επιτόπων που εγείρουν αυτά τα αντισώματα, οι οποίοι με τη σειρά τους θα πρέπει να εγείρουν nAb ύστερα από εμβολιασμό.

2.3.4 Ανοσογόνα και προκαταρτικά εμβόλια

Η ανάπτυξη εμβολίου κατά του HIV, το οποίο θα είναι ικανό να παράγει εξουδετερωτικά αντισώματα που θα αποτρέπουν την μόλυνση από τον ιό και να ενισχύει την κυτταροτοξική δράση έναντι υπάρχουσας μόλυνσης, αποτελεί πραγματική πρόκληση. Ακόμα και σε ένα μολυσμένο άτομο ένα εμβόλιο που διεγείρει την κυτταρική ανοσία έχει ωφέλιμη δράση τόσο στην καταστροφή των μολυσμένων κυττάρων όσο και στον περιορισμό της εξάπλωσης του ιού σε αλλά κυτταρικά τμήματα [44].

Έχει γίνει μεγάλη προσπάθεια για την ταυτοποίηση αποτελεσματικών ανοσογόνων με τη χρήση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών και πεπτιδίων. Στις περισσότερες δοκιμές οι πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοποίηση αποτελούν πρωτεΐνες του φακέλου του

HIV, συνδυασμένες κάποιες φορές με άλλες πρωτεΐνες του ιού, όπως η p24 και η Tat. Επίσης, έχουν χρησιμοποιηθεί πεπτιδικά εμβόλια που μιμούνται τη θηλιά V3 και CTL επίτοποι για τις Nef, Gag και Env.

Επειδή τα εξουδετερωτικά αντισώματα κατευθύνονται κυρίως έναντι των πρωτεϊνών του φακέλου, η gp120 θεωρήθηκε ένας πολλά υποσχόμενος στόχος για την ανάπτυξη εμβολίου, αλλά η μεταβλητότητα του ιού και η ικανότητα του φακέλου να μεταλλάσσεται δυσκολεύουν το σενάριο αυτό. Εκτεταμένες διαμορφωτικές μελέτες των πρωτεϊνών του φακέλου και των τριμερών δομών του, αποδεικνύουν την μεγάλη μεταβλητότητα του ιού, που αποτελεί και την άμυνα του κατά του ανοσοποιητικού. Η ικανότητα των πρωτεϊνών του φακέλου να αποφεύγουν την αντίδραση του ανοσοποιητικού, κυρίως λόγω της προστασίας τους από τμήματα σακχαριτών, παρακάμφθηκε σε μία έρευνα σε πιθήκους μολυσμένους με μεταλλαγμένο SIV, όπου τα σημεία γλυκοζυλίωσης γύρω από τις περιοχές V1/V2 απομακρύνθηκαν ώστε να αποκαλυφθούν οι περιοχές που αναγνωρίζουν τα CD4 αντισώματα. Πράγματι τα αντισώματα που παρήχθησαν αρχικά τουλάχιστον εμπόδισαν την μόλυνση, πριν ο ιός μεταλλαχτεί και διαφύγει [45]. Το παράδειγμα αυτό αποδεικνύει ότι εμβόλια που περιέχουν τροποποιημένες πρωτεΐνες του ιού και αναδεικνύουν τα αδύναμα σημεία του, είναι ικανά να διεγείρουν bnAbs τα οποία αναχαιτίζουν την μόλυνση, τουλάχιστον για λίγο.

Ένα κρίσιμο θέμα που προκύπτει για την έκβαση της μόλυνσης φαίνεται να είναι ο ακριβής χρόνος της ανοσολογικής απόκρισης. Μία ανεπτυγμένη ανοσία πριν την έκθεση στον ιό δίνει στον ξενιστή το πλεονέκτημα της επικράτησης [46]. Άλλη μια δυσκολία που συναντάται σε πολλές δοκιμασίες είναι η κατάλληλη παρουσίαση των ανοσογόνων ώστε να επάγουν nAb, ακόμα και στις περιπτώσεις όπου οι αντίστοιχοι επίτοποι είναι γνωστοί. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί το mnAb 2F5 που κατευθύνεται κατά της gp41, παρεμβαίνοντας στην σύντηξη των μεμβρανών στο τελικό στάδιο της μόλυνσης. Ο επίτοπος που αντιστοιχεί σε αυτό το αντίσωμα είναι πολύ καλά μελετημένος [47, 48], ωστόσο σε πολυάριθμες δοκιμασίες απέτυχε να επάγει nAb μετά από εμβολιασμό σε ζώα. Η χρήση φάγων ίσως είναι κατάλληλος τρόπος για την κατάλληλη παρουσίαση στο ανοσοποιητικό σύστημα. Η ανοσοποίηση μακάκων με ένα εμβόλιο φάγων που περιείχε διάφορα πεπτίδια που αντιπροσωπεύουν περιοχές του φακέλου του HIV-1, τα οποία αρχικά απομονώθηκαν από τον ορό μολυσμένων ατόμων, προκάλεσαν εξουδετερωτικά αντισώματα και προστάτευσαν από την μόλυνση με SHIV89.6P [49, 50]. Επομένως, τα πλεονεκτήματα εμβολίων αποτελούμενα από μικρά πεπτίδια τα οποία μιμούνται διάφορους στόχους των αντισωμάτων του ιικού φακέλου και η τεχνολογία απεικόνισης

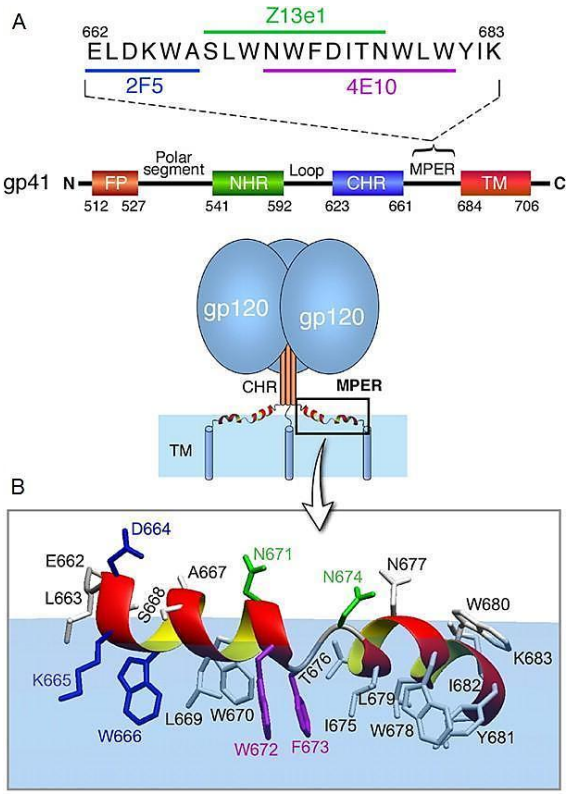
στην επιφάνεια φάγων αποτελούν ισχυρά εργαλεία στην ανάπτυξη νέων υποψήφιων εμβολίων.

Ένας από τους κύριους στόχους στην ανάπτυξη πεπτιδομιμητικών επιτόπων είναι η περιοχή MPER της γλυκοπρωτεΐνης gp41 του HIV-1, η οποία αποτελεί αντικείμενο έρευνας και της παρούσας εργασίας.

Περιοχή MPER

Είναι μία υψηλά συντηρημένη, πλούσια σε τρυπτοφάνη, υδρόφοβη περιοχή, σημαντική για την σύντηξη του ιού με τη μεμβράνη του ξενιστή. Η περιοχή περιλαμβάνει τα τελευταία 24 C-τελικά αμινοξέα του ectodomain της gp4, πλησίον της διαμεμβρανικής περιοχή (TM). Στην περιοχή αυτή βρίσκονται γραμμικοί επίτοποι σε παράθεση, που αναγνωρίζουν τα 2F5, 4E10, 10E8 και Z13 μονοκλωνικά bnAbs **(Εικόνα 2.2)**. Η δομή της MPER αποτελείται από δύο έλικες που συνδέονται μεταξύ τους με μία εύκαμπτη άρθρωση [51]. Η περιοχή αυτή αποτελεί βασικό στόχο στην ανάπτυξη εμβολίου κυρίως γιατί είναι υψηλά συντηρημένη και διότι περιέχει τους επιτόπους έναντι των οποίων κατευθύνονται τα παραπάνω μονοκλωνικά bnAbs.

Ωστόσο, εξουδετερωτικά αντισώματα κατά της MPER σπάνια ανιχνεύονται σε ασθενείς [52]. Μία πιθανή εξήγηση γι αυτό, είναι το γεγονός ότι κάποιοι επίτοποι της MPER είναι «προστατευμένοι» και εκτίθενται παροδικά μόνο, λόγω των διαμορφωτικών αλλαγών στο τριμερές του φακέλου κατά τη διαδικασία εισόδου του ιού στον ξενιστή. Παρά το γεγονός ότι η MPER δεν παρουσιάζει μεγάλη ανοσογονικότητα, σε σχέση π.χ. με την V3 θηλιά, τα αντισώματα που επάγει είναι γενικά εξουδετερωτικά αντισώματα (bnAbs), τα οποία παρουσιάζουν την μεγαλύτερη δραστικότητα. Το mAb 2F5 που αναγνωρίζει τον επίτοπο ^{662}ELDKWA^{676} εξουδετερώνει το 80-100% των μεταδιδόμενων HIV-1 υποτύπων [53]. και το mAb 4E10 που αναγνωρίζει τον επίτοπο ^{671}NWFDIT^{676} εξουδετερώνει περίπου το 100% [54].



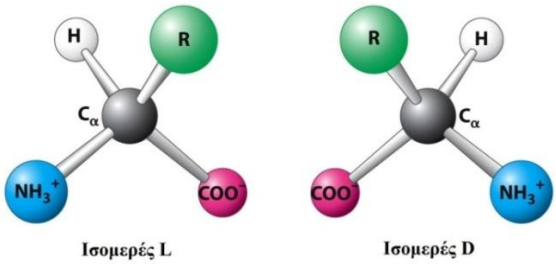
Εικόνα 2.2. (A) Σχηματικό διάγραμμα της gp41 με τα τμήματα που την απαρτίζουν όπου διακρίνεται και η περιοχή MPER. Διακρίνονται οι πεπτιδικοί επίτοποι 2F5 (μπλε), Z13e1 (πράσινο), και 4E10 (μωβ). **(B)** Απλό μοντέλο του φακέλου που περιλαμβάνει την MPER και την TM και NMR δομή της MPER του (HxB2) σε μιμητική επιφάνεια του ιοσωματίου. Τα απαραίτητα αμινοξέα για την επαγωγή των εξουδετερωτικών αντισωμάτων είναι διαφορετικά χρωματισμένα 2F5 (μπλε), Z13e1 (πράσινο), και 4E10 (μωβ) [55].

Κεφάλαιο 3

Πεπτιδική Σύνθεση

3.1 Εισαγωγή

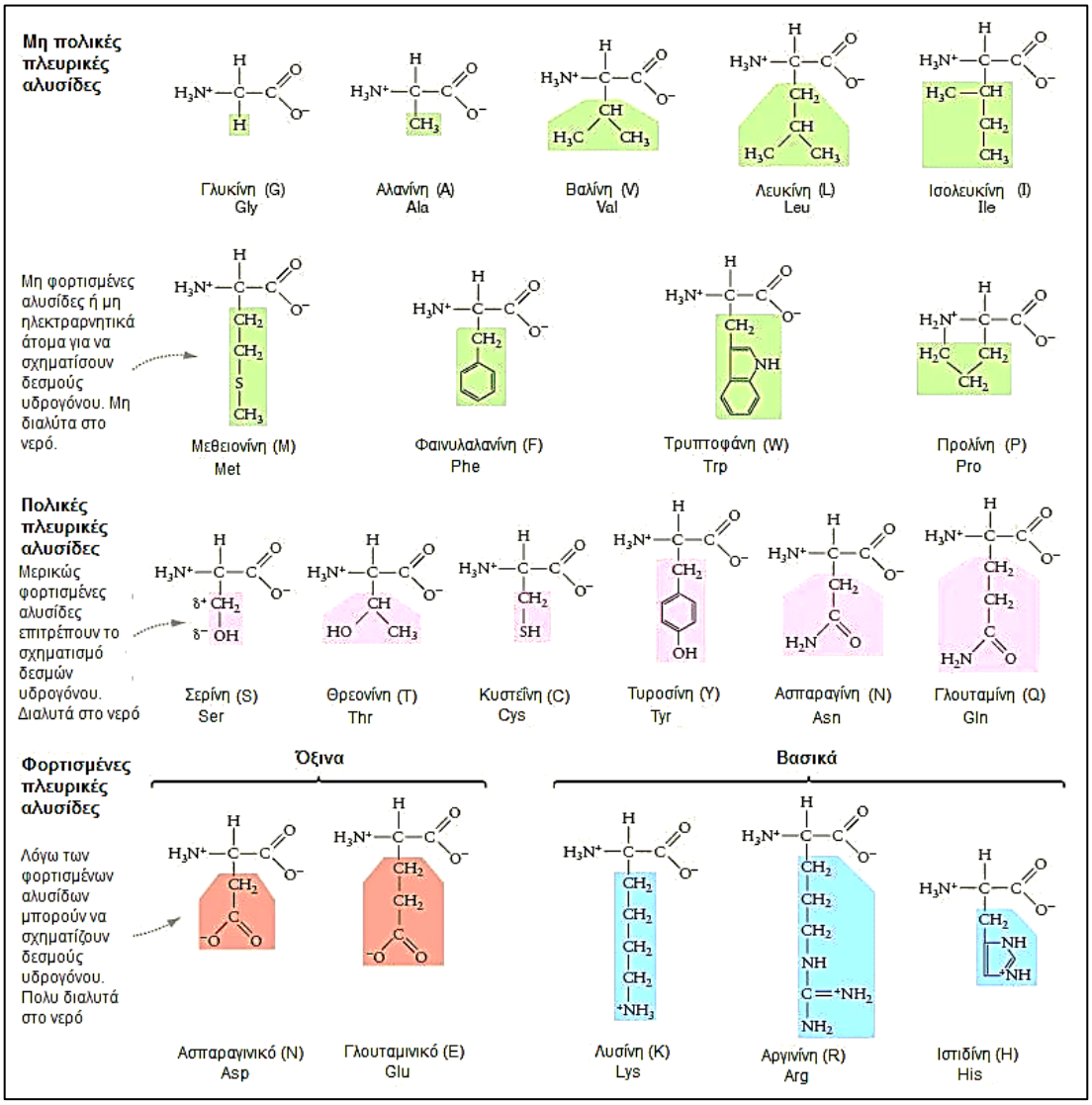
Οι πρωτεΐνες είναι τα πιο πολυδύναμα μακρομόρια στους ζωντανούς οργανισμούς και εξυπηρετούν βασικές λειτουργίες σε όλες σχεδόν τις βιολογικές διεργασίες. Οι πρωτεΐνες μικρού μήκους αποκαλούνται πεπτίδια. Τα αμινοξέα αποτελούν τις δομικές μονάδες των πρωτεϊνών και των πεπτιδίων. Ένα *α-αμινοξύ* αποτελείται από ένα κεντρικό άτομο *α-άνθρακα*, συνδεδεμένο με μια αμινική ομάδα, μια καρβοξυλική ομάδα, ένα άτομο υδρογόνου και μια χαρακτηριστική ομάδα R, που καλείται πλευρική αλυσίδα και τα διακρίνει σε όξινα, βασικά και ουδέτερα. Έχοντας τέσσερις διαφορετικές ομάδες συνδεδεμένες στο τετράεδρο του ατόμου του α-άνθρακα, τα α-αμινοξέα είναι χειρόμορφα. Τα δύο κατοπτρικά είδωλα ονομάζονται L- και D- ισομερή **(Εικόνα 3.1).** Στις πρωτεΐνες απαντούν μόνο L-αμινοξέα [1]. Τα φυσικά αμινοξέα είναι είκοσι **(Εικόνα 3.2)**.



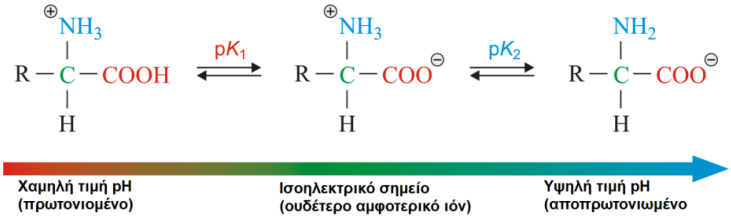
Εικόνα 3.1. Τα D και L είναι εναντιομερή αποτελούν αντίστροφες εικόνες το ένα του άλλου.

Τα αμινοξέα περιέχουν μια όξινη και μια βασική λειτουργική ομάδα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, να υφίστανται μια ενδομοριακή οξεοβασική αντίδραση, ώστε να απαντούν κυρίως με τη μορφή διπολικών ιόντων ή αμφοτερικών ιόντων. Σε ένα διάλυμα οξέος με χαμηλή τιμή pH, τα αμινοξέα πρωτονιώνονται και απαντούν κατά κανόνα ως κατιόντα. Σε ένα διάλυμα βάσης με υψηλή τιμή pH, τα αμινοξέα αποπρωτονιώνονται και απαντούν κατά κανόνα ως ανιόντα. Η ενδιάμεση τιμή pH, στην οποία το αμινοξύ εξισορροπεί ανάμεσα στην ανιοντική και την κατιοντική μορφή του, δηλαδή στην ουδέτερη μορφή του διπολικού ιόντος αποτελεί το ισοηλεκτρικό σημείο του **(Εικόνα 3.3)**. Το ισοηλεκτρικό σημείο κάθε αμινοξέος εξαρτάται από την δομή του. Τα 15 ουδέτερα αμινοξέα έχουν ισοηλεκτρικά σημεία κοντά στην τιμή του ούδετερου pH (5.0-6.5). Τα δύο αμινοξέα που φέρουν μια επιπλέον καρβοξυλομάδα στην πλευρική αλυσίδα εμφανίζουν ισοηλεκτρικά

σημεία σε χαμηλότερες τιμές pH, ενώ τα τρία αμινοξέα με βασικές πλευρικές αλυσίδες εμφανίζουν ισοηλεκτρικά σημεία σε υψηλότερες τιμές pH, εξαιτίας της επιπλέον αμινομάδας [2].



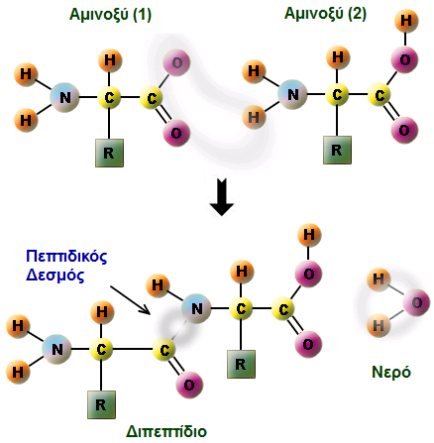
Εικόνα 3.2 . Τα είκοσι φυσικά αμινοξέα.



Εικόνα 3.3. Οι καταστάσεις ιοντισμού αμινοξέος.

3.2 Πεπτιδικός δεσμός

Ο πεπτιδικός δεσμός ή αμιδικός δεσμός είναι ένας ομοιοπολικός δεσμός που σχηματίζεται μεταξύ της καρβοξυλομάδας ενός αμινοξέος και της αμινομάδας ενός άλλου μέσω μιας πυρηνόφιλης προσβολής που συνοδεύεται από την απώλεια ενός μορίου νερού **(Εικόνα 3.4)**. Η ισορροπία της αντίδρασης είναι μετατοπισμένη προς την πλευρά της υδρόλυσης παρά της σύνθεσης, κατά την οποία έχουμε απελευθέρωση ενέργειας. Προς την πλευρά σχηματισμού του πεπτιδικού δεσμού απαιτείται κατανάλωση ελεύθερης ενέργειας (ενδόθερμη αντίδραση, ~ 4kcal/mol). Για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση μεταξύ των δύο αμινοξέων θα πρέπει να γίνει ενεργοποίηση σε ένα από τα αντιδρώντα. Συνήθως γίνεται ενεργοποίηση του καρβοξυλίου του ενός αμινοξέος.



Εικόνα 3.4. Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού

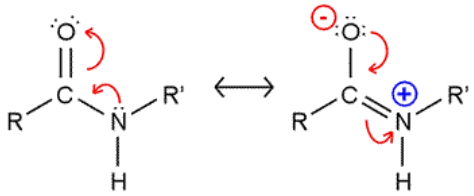
Για να μετατραπούν τα καρβοξυλικά οξέα σε ακυλιωτικά μέσα πρέπει οι καρβοξυλικές τους ομάδες να αντικατασταθούν από έναν υποκαταστάτη (X) δέκτη ηλεκτρονίων, ώστε να αυξηθεί η πολικότητα της καρβονυλικής ομάδας και επομένως ο ηλεκτρονιόφιλος χαρακτήρας του ατόμου του άνθρακα. Έτσι διευκολύνεται πολύ η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

Η ενεργοποίηση του καρβοξυλίου δεν είναι αρκετή για να ληφθεί το επιθυμητό προϊόν αλλά απαιτείται παροδική προστασία της α-αμινομάδας του N-τελικού αμινοξέος, όπως και του α-καρβοξυλίου του C-τελικού αμινοξέος. Επίσης, λόγω της ύπαρξης δραστικών ομάδων στις παράπλευρες αλυσίδες ορισμένων αμινοξέων είναι πιθανό να σχηματιστούν ανεπιθύμητα προϊόντα, εκτός του επιθυμητού, και για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη

κατάλληλη προστασία. Ιδιαίτερα σημαντική είναι και η επιλογή των μεθόδων που θα εφαρμοστούν για το σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού, καθώς τα αμινοξέα, εκτός της γλυκίνης, περιέχουν ένα ασύμμετρο α-άτομο άνθρακα. Για αυτό το λόγο, θα πρέπει να ληφθούν μέτρα για να αποφευχθεί η ρακεμοποίηση κατά τη διαδικασία της σύζευξης, η οποία οδηγεί στη δημιουργία ανεπιθύμητων προϊόντων που δύσκολα μπορούν να διαχωριστούν με τις συνήθεις μεθόδους καθαρισμού. Επομένως, η σύνθεση των πεπτιδίων είναι μια αρκετά πολύπλοκη διαδικασία και απαιτείται μεγάλη προσοχή στο σχεδιασμό και στη διεξαγωγή της.

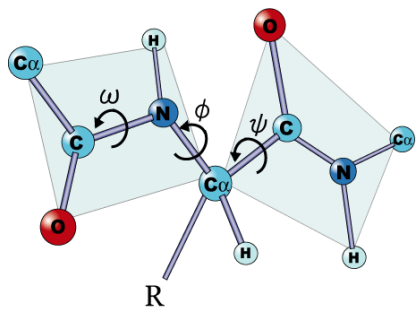
3.3 Στερεοχημεία πεπτιδικού δεσμού

Το 1951, οι Pauling και Corey απέδειξαν με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ, ότι το μήκος του δεσμού C-N στον πεπτιδικό δεσμό είναι μικρότερο (1.32 Å) από ότι σε έναν απλό δεσμό C-N (1.47 Å). Αυτό οφείλεται στο φαινόμενο συντονισμού **(Εικόνα 3.5)** του πεπτιδικού δεσμού, το οποίο προσδίδει μερικό χαρακτήρα διπλού δεσμού στον δεσμό C-N.



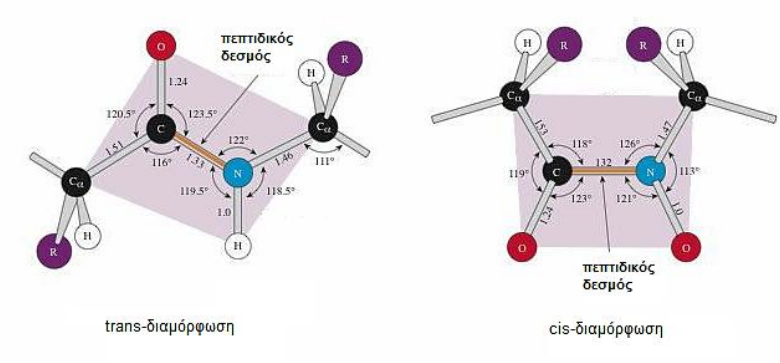
Εικόνα 3.5. Φαινόμενο συντονισμού στον πεπτιδικό δεσμό

Η διαμόρφωση του πεπτιδικού σκελετού χαρακτηρίζεται από τρείς γωνίες στρέψης φ [(=O-N-C^{α}-C(=O)], ψ [N-C^{α}-C(=O)-N] και ω [C^{α}-C(=O)-N-C-] **(Εικόνα 3.6).**



Εικόνα 3.6. Γωνίες στρέψης στον πεπτιδικό σκελετό

Η ελεύθερη περιστροφή γύρω από τον αμιδικό δεσμό C-N, περιορίζεται δραστικά λόγω του χαρακτήρα του διπλού δεσμού, με ενεργειακό φράγμα περιστροφής ~ 105 kJ mol^{-1}. Επομένως, υπάρχουν δύο στερεοϊσομερή του πεπτιδικού δεσμού: το trans-ισομερές και το cis-ισομερές **(Εικόνα 3.7).** Η trans-διαμόρφωση ευνοείται ενεργειακά λόγω των στερεοχημικών παρεμποδίσεων που παρατηρούνται στην cis διάταξη από τις παράπλευρες αλυσίδες (R) των δύο ατόμων C^{α} και προτιμάται στις πρωτεΐνες και στα φυσικά πεπτίδια. με εξαίρεση αυτά που περιέχουν προλίνη και ο πεπτιδικός δεσμός, στον οποίο συμμετέχει η δευτεροταγής ομάδα, είναι δυνατόν να έχει και την cis και την trans διαμόρφωση. Οι cis ισομερείς μορφές απαντώνται στις δικετοπιπεραζίνες, οι οποίες είναι κυκλικά διπεπτίδια.



Εικόνα 3.7. Ο πεπτιδικός δεσμός στην trans και cis διαμόρφωση. Οι γωνίες δίνονται σε μοίρες και τα μήκη δεσμών σε Å.

3.4 Σύνθεση πεπτιδίων

Γενικά η σύνθεση πεπτιδίων πραγματοποιείται είτε σε διάλυμα είτε σε στερεή φάση και αποτελεί μια αρκετά πολύπλοκή διαδικασία. Η σύνθεση σε διάλυμα προηγήθηκε της σύνθεσης σε στερεή φάση, αλλά παρουσιάζει αρκετά μειονεκτήματα και δυσκολίες, καθώς σε κάθε βήμα της είναι αναγκαία η απομόνωση, ο καθαρισμός και η ταυτοποίηση των ενδιάμεσων προϊόντων σύνθεσης καθιστώντας την όλη διαδικασία επίπονη και χρονοβόρα.

Τα βήματα που ακολουθούνται στην πεπτιδική σύνθεση καθώς και οι προϋποθέσεις που θα πρέπει να πληρούνται είναι τα εξής:

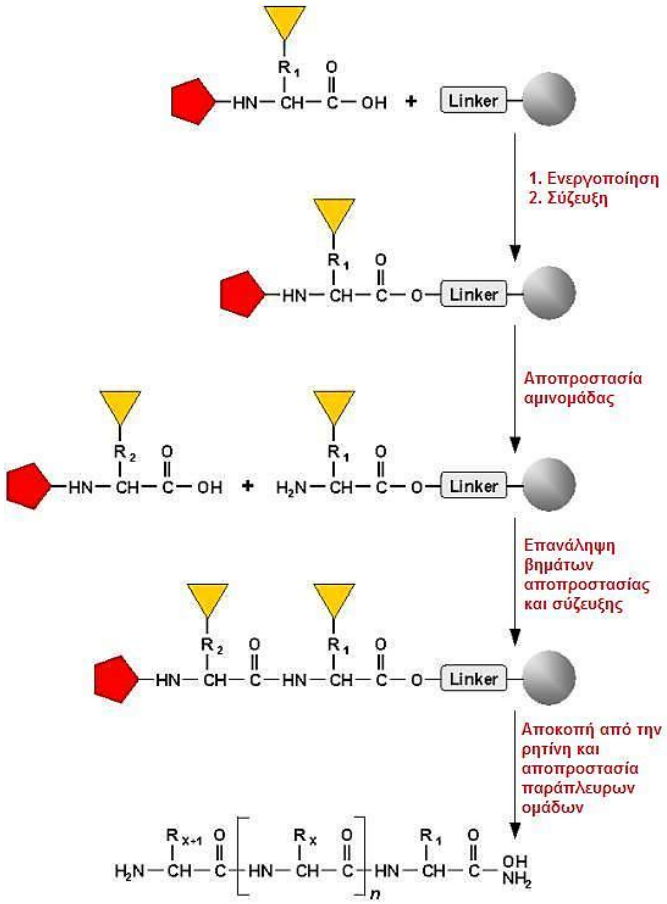
- Παροδική προστασία της α-αμινομάδας του N-τελικού αμινοξέος με κατάλληλη ομάδα η οποία μειώνει την πυρηνοφιλία της.

- Παροδική προστασία του α-καρβοξυλίου του C- τελικού αμινοξέος. Η προστασία του α-καρβοξυλίου στην πεπτιδική σύνθεση σε υγρή φάση, επιτυγχάνεται με εστεροποίηση της καρβοξυλομάδας, ενώ στη στερεή φάση η προστασία αυτή δεν είναι απαραίτητη διότι το καρβοξύλιο είναι συζευγμένο με το στερεό υπόστρωμα (ρητίνη).
- Παροδική προστασία των δραστικών ομάδων των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων επειδή είναι δυνατόν να αντιδράσουν κατά τη διάρκεια της σύνθεσης προκαλώντας ανεπιθύμητα παραπροϊόντα.
- Σχηματισμός του πεπτιδικού δεσμού με ενεργοποίηση του καρβοξυλίου του N-τελικού αμινοξέος και ακολούθως σύζευξη με την ελεύθερη αμινομάδα του άλλου αμινοξέος. Για την ενεργοποίηση του καρβοξυλίου οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι: των χλωριδίων, των αζιδίων, των μικτών ανυδριτών, των ενεργών εστέρων. Ωστόσο, σήμερα η επικρατέστερη μέθοδος σχηματισμού του πεπτιδικού δεσμού είναι με τη χρήση αντιδραστηρίων σύζευξης.
- Απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων, μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης, με κατάλληλο τρόπο ώστε να μην καταστρέφονται οι πεπτιδικοί δεσμοί και η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη στην περίπτωση σύνθεσης σε στερεή φάση.

3.5 Σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση

Η σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση (Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS) εισήχθη το 1963 από τον Merrifield και αποτέλεσε επανάσταση για την πεπτιδική σύνθεση. Η μέθοδος βασίζεται στο γεγονός ότι, η σύνθεση του πεπτιδίου πραγματοποιείται σε ένα αδιάλυτο πολυμερές υποστήριγμα (ρητίνη). Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η σύνδεση του αδιάλυτου υποστηρίγματος με ένα σύνδεσμο (linker) που περιέχει μια δραστική ομάδα (υδρόξυλο, χλώρο ή άμινο- ρητίνη) στην οποία προσδένεται ομοιοπολικά το C-τελικό αμινοξύ με το καρβοξύλιό του, ενώ η N^{α} –αμινομάδα και η παράπλευρη αλυσίδα του να είναι κατάλληλα προστατευμένες. Η σύνθεση συνεχίζεται με διαδοχικά βήματα αποπροστασιάς της N^{α} –αμινομάδας του αμινοξέος και σύζευξης του επόμενου, κατάλληλα προστατευμένου αμινοξέος. Με αυτόν τον τρόπο το πεπτίδιο συντίθεται πάνω στη ρητίνη από το C-τελικό άκρο προς το N-τελικό άκρο **(Εικόνα 3.8)**. Κατά την διαδικασία της σύνθεσης το πεπτίδιο παραμένει συνδεδεμένο στη ρητίνη ενώ, η περίσσεια των αντιδραστηρίων και τα παραπροϊόντα της σύνθεσης απομακρύνονται εύκολα

πραγματοποιώντας εκπλύσεις με κατάλληλους διαλύτες και διήθηση. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης, ακολουθεί αποκοπή από την ρητίνη με κατάλληλα αντιδραστήρια και παραλαμβάνεται το πεπτίδιο ως ελεύθερο οξύ ή αμίδιο, ανάλογα με τη δραστική ομάδα του συνδέσμου.



Εικόνα 3.8. Γενικό σχήμα σύνθεσης πεπτιδίου σε στερεή φάση

Το μεγάλο πλεονέκτημα της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση είναι ότι επιτρέπει τη σύνθεση μεγάλων πεπτιδίων σε μικρότερο χρόνο από ότι η σύνθεση σε υγρή φάση, με υψηλή απόδοση και ικανοποιητική καθαρότητα. Ένα σημαντικό, μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι, μαζί με το επιθυμητό προϊόν λαμβάνονται και παραπροϊόντα που δυσκολεύουν τον καθαρισμό, στην περίπτωση που η αποπροστασία της N^{α}-αμινομάδας ή/και η αντίδραση σύζευξης δεν γίνουν ποσοτικά, καθώς δεν απομονώνεται κάθε ενδιάμεσο προϊόν σύζευξης, με αποτέλεσμα η ταυτοποίηση του πεπτιδίου να γίνεται μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης. Ωστόσο, η σύνθεση σε στερεή φάση χρησιμοποιείται ευρύτατα διότι τα πλεονεκτήματα της υπερτερούν των μειονεκτημάτων.

3.6 Το αδιάλυτο στερεό υπόστρωμα

Ένα στερεό πολυμερές για να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα στην πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση θα πρέπει να έχει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά:

- Να είναι χημικά αδρανές, μηχανικά σταθερό και αδιάλυτο σε σχέση με τους διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην σύνθεση.
- Να περιέχει αρκετές δραστικές θέσεις ως σημεία πρόσδεσης με το πρώτο αμινοξύ της πεπτιδικής αλυσίδας και οι αντιδράσεις μεταξύ των πεπτιδίων σε αυτό να είναι ελάχιστες.
- Να αποτελείται από σωματίδια κατάλληλου σχήματος και μεγέθους, τα οποία να επιτρέπουν την εύκολη πρόσδεση της πεπτιδικής αλυσίδας μέσω ομοιοπολικού δεσμού και την εύκολη αποκοπή της, μετά το τέλος της σύνθεσης.
- Να διογκώνεται με τους διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην πεπτιδική σύνθεση και να επιτρέπει την εύκολη διείσδυση των αντιδραστηρίων στα σωματίδια αλλά και την εύκολη απομάκρυνση της περίσσειας αυτών και των παραπροϊόντων της αντίδρασης μέσω εκπλύσεων και διήθησης.

Οι ρητίνες, επομένως, μετά την διόγκωση τους στους διαλύτες δεν αποτελούν στερεά πολυμερή αλλά πηκτώματα (gel) με κινητές πολυμερικές αλυσίδες, γεγονός το οποίο διευκολύνει τη διάχυση και την πρόσβαση των αντιδραστηρίων σε όλα τα σημεία της αντίδρασης.

Το πολυμερές που χρησιμοποιείται ευρύτατα στην πεπτιδική σύνθεση είναι το συμπολυμερές στυρολίου-διβινυλοβενζολίου (PS-DVB). Το ποσοστό του περιεχόμενου διβινυλοβενζολίου για βέλτιστη δράση είναι το 1%, καθώς δίνει ένα πολυμερές υψηλής απόδοσης, κυρίως επειδή αυξάνεται η ικανότητα διόγκωσης διευκολύνοντας έτσι τη διάχυση των αντιδραστηρίων. Πολυμερή με μικρότερο ποσοστό DVB δεν έχουν μηχανική σταθερότητα ενώ με μεγαλύτερο ποσοστό έχουν αυξημένη σκληρότητα και δεν διογκώνονται ικανοποιητικά στους συνήθης διαλύτες της πεπτιδικής σύνθεσης.

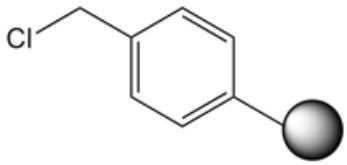
Για να επιτευχθεί η πρόσδεση του πρώτου αμινοξέος στο πολυμερικό υπόστρωμα, όπως αναφέραμε, απαιτείται η εισαγωγή ομάδων πρόσδεσης (linkers). Οι σύνδεσμοι αυτοί, περιέχουν μια λειτουργική ομάδα η οποία πληροί τις προϋποθέσεις μιας προστατευτικής ομάδας που μπορεί να διασπαστεί κάτω από ήπιες συνθήκες και να οδηγήσει σε ένα C-τελικό άκρο είτε ως ελεύθερο οξύ είτε ως αμίδιο και μια άλλη με την οποία προσδένεται στο πολυμερικό υπόστρωμα. Επειδή οι ομάδες πρόσδεσης θεωρούνται παράλληλα και προστατευτικές ομάδες της C-τελικής α-καρβοξυλομάδας του συντιθέμενου πεπτιδίου, η

επιλογή τους πρέπει να γίνεται λαμβάνοντας υπόψη και τη μορφή του C-τελικού άκρου του πεπτιδίου, το οποίο μπορεί να έχει τη μορφή καρβοξυλίου, αμιδίου, εστέρα, θειοεστέρα, υδραζιδίου ή αλκοόλης. Στις περισσότερες περιπτώσεις το C-τελικό αμινοξύ συνδέεται με τη ρητίνη μέσω εστερικού δεσμού, καθώς και μέσω αμιδικού ή υδραζιδικού δεσμού. Η σωστή επιλογή της ομάδας πρόσδεσης, σε συνδυασμό με τα στάδια της προσκόλλησης του C-τελικού αμινοξέος στη ρητίνη και της απομάκρυνσης του πεπτιδίου από αυτή, οδηγεί στη βελτιστοποίηση της απόδοσης της σύνθεσης καθώς και στην ελαχιστοποίηση της ρακεμοποίησης, κατά τη διάρκεια της πρόσδεσης του πρώτου αμινοξέος στη ρητίνη, και του σχηματισμού δικετοπιπεραζίνης, κατά το στάδιο αποπροστασίας του διπεπτιδίου.

3.7 Ρητίνες

Παρακάτω θα αναφερθούν συνοπτικά μερικές από τις σημαντικότερες ρητίνες που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση.

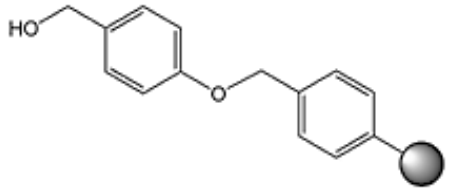
- **Χλωρομεθυλιωμένη ρητίνη (Ρητίνη Merrifield)**



Στην κλασσική ρητίνη του Merrifield, η χλωρομεθυλομάδα αποτελεί την ομάδα πρόσδεσης και εισάγεται στη ρητίνη πολυστυρενίου/διβινυλοβενζολίου (PS-DVB) με χλωρομεθυλίωση τύπου Friedel-Crafts. Η σύνδεση του πρώτου αμινοξέος με τη ρητίνη πραγματοποιείται μέσω πυρηνόφιλης υποκατάστατης του χλωρίου από το καρβοξυλικό ιόν του αμινοξέος. Ο εστερικός δεσμός που δημιουργείται μεταξύ ρητίνης και πεπτιδικής αλυσίδας είναι σταθερός στις συνθήκες της πεπτιδικής σύνθεσης και διασπάται μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης με τη χρήση ισχυρών οξέων, όπως υγρό HF, TFMSA ή HBr/TFA. Επομένως, η ρητίνη αυτή χρησιμοποιείται στην Boc-μεθοδολογία. Στο τέλος της συνθετικής διαδικασίας λαμβάνονται πεπτίδια με καρβοξυλική ομάδα στο C-τελικό άκρο τους. Ένα μειονέκτημα της ρητίνης του Merrifield, ειδικά στην περίπτωση σύνθεσης μεγάλων πεπτιδικών αλυσίδων, αποτελεί η απώλεια 1-2% πεπτιδίου σε κάθε βήμα

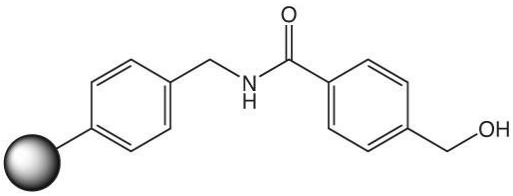
επαναλαμβανόμενης κατεργασίας με τριφθοροξικό οξύ για την αποκοπή της προστατευτικής ομάδας Boc των προστιθέμενων N^{α}-προστατευμένων αμινοξέων [3].

- **Ρητίνη 4-Αλκοξυβενζυλικής αλκοόλης (Wang Resin)**



Στη σύνθεση πεπτιδίων με τη χρήση της Wang ρητίνης, το p-αλκοξυ-υποκατάστατο του τμήματος της βενζυλικής αλκοόλης αυξάνει την ευαισθησία στα οξέα του εστερικού δεσμού μεταξύ πεπτιδίου και ρητίνης με αποτέλεσμα να διασπάται σε ήπιες όξινες συνθήκες με τη χρήση 95% TFA. Η Wang ρητίνη χρησιμοποιείται ευρέως με την Fmoc-μεθοδολογία και λαμβάνονται πεπτίδια με καρβοξυλική ομάδα στο C-τελικό άκρο τους. Η σύνδεση του C-τελικού αμινοξέος της πεπτιδικής αλυσίδας με τη ρητίνη επιτυγχάνεται με τη μέθοδο των ενεργών εστέρων ή των καρβοδιιμιδίων [4].

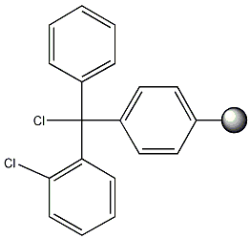
- **4-Υδροξυμεθυλο-φαινυλακεταμιδομεθυλο ρητίνη (PAM resin)**



Η PAM ρητίνη αναπτύχθηκε ως εναλλακτική της ρητίνης Merrifield, κατά τη χρησιμοποίηση της οποίας παρατηρείται απώλεια πεπτιδίου, λόγω της επαναλαμβανόμενης όξινης απομάκρυνσης της Boc προστατευτικής ομάδας, καθώς και ανεπαρκής δραστικότητα κατά την πυρηνόφιλη υποκατάσταση του βενζυλοχλωριδίου της ομάδας πρόσδεσης από το καρβοξυλικό ανιόν του πρώτου αμινοξέος. Η PAM ρητίνη είναι 100 φορές πιο σταθερή έναντι του TFA από τη ρητίνη Merrifield, εξαιτίας της ηλεκτρονιακής έλξης που ασκεί η π-καρβοξαμιδομεθυλομάδα. Παρασκευάζεται με ακυλίωση του αμινομεθυλοπολυστυρενίου από το (4-υδροξυμεθυλοφαινυλο)-οξικό οξύ, ενώ το πρώτο αμινοξύ προσδένεται στη ρητίνη μέσω εστερικού δεσμού με τη μέθοδο των ενεργών εστέρων ή των καρβοδιιμιδίων. Η PAM ρητίνη είναι συμβατή με την Boc

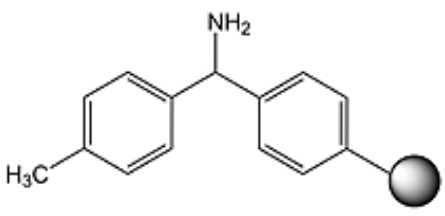
μεθοδολογία και η αποκοπή της πεπτιδικής αλυσίδας επιτυγχάνεται υπό την επίδραση ισχυρών οξέων, όπως υγρό HF, TFMSA ή HBr/TFA, οδηγώντας στο σχηματισμό πεπτιδίων με ελεύθερη καρβοξυλομάδα στο C-τελικό άκρο τους [5].

- **Ρητίνη του 2-Χλωροτριτυλο χλωριδίου (2-chlorotritylchloride resin)**



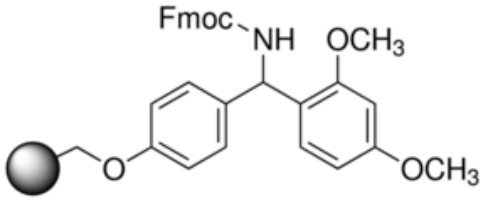
Η ρητίνη του 2-χλωροτριτυλο χλωριδίου είναι μια ρητίνη πολύ ευαίσθητη σε οξέα με αποτέλεσμα να χρησιμοποιείται για τη σύνθεση πεπτιδίων και προστατευμένων πεπτιδικών τμημάτων με ελεύθερη καρβοξυλομάδα στο C-τελικό άκρο τους, ακολουθώντας την Fmoc-μεθοδολογία [6]. Το πρώτο αμινοξύ προσεγγίζει τη ρητίνη υπό τη μορφή άλατος της διισοπροπυλοαιθυλαμίνης (DIEA), αποκλείοντας έτσι την ρακεμοποίηση καθώς το αμινοξύ δρα ως πυρηνόφιλο και όχι ως ηλεκτρονιόφιλο, αναδεικνύοντας αυτή τη ρητίνη κατάλληλη για την πρόσδεση ευαίσθητων στη ρακεμοποίηση αμινοξέων όπως είναι η κυστεΐνη και η ιστιδίνη [7, 8]. Επίσης, η χρησιμοποίηση της συνίσταται για τη σύνθεση πεπτιδίων με C-τελικό αμινοξύ προλίνη, αφού η ογκώδης τριτυλομάδα ελαχιστοποιεί το σχηματισμό δικετοπιπεραζίνης λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης που επάγουν οι βενζυλικοί δακτύλιοι [9]. Η απομάκρυνση του πεπτιδίου από την ρητίνη γίνεται κάτω από πολύ ήπιες συνθήκες, κατά την κατεργασία με AcOH/TFE/DCM ή 0,5%TFA/DCM. Αξίζει να σημειωθεί ότι, κατά την χρήση της, απαιτείται προσεκτική φύλαξη, χρήση άνυδρων διαλυτών και συσκευών απαλλαγμένων από υγρασία.

- **Ρητίνη της 4-μεθυλοβενζυδρυλαμίνης (MBHA resin)**



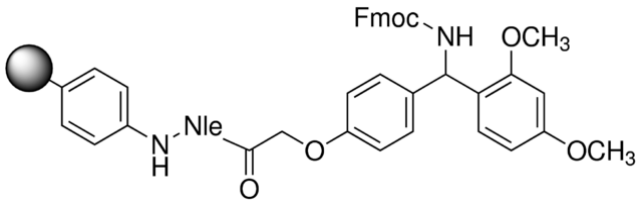
Στην ρητίνη της 4-μεθυλοβενζυδρυλαμίνης η σύνδεση του πρώτου αμινοξέος με τη ρητίνη πραγματοποιείται μέσω αμιδικού δεσμού με τις συνήθεις μεθόδους. Μετά την απομάκρυνση του πεπτιδίου από την ρητίνη λαμβάνονται πεπτίδια με το C-τελικό άκρο σε αμιδική μορφή (-$CONH_2$) και είναι συμβατή τόσο με την Boc- όσο και με την Fmoc-στρατηγική. Η αποκοπή του πεπτιδίου επιτυγχάνεται με την κατεργασία της πεπτιδορητίνης με HF ή TFMSA [10].

- **Ρητίνη της 2,4-Διμεθοξυ-βενζυλυδρυλαμίνης (Rink Amide resin)**



Στην ρητίνη της 2,4-διμεθοξυ-βενζυλυδρυλαμίνης ο συνδυασμός της βενζυδρυλαμινικής ομάδας με τους δυο επιπλέον μεθόξυ υποκαταστάτες στον δεύτερο αρωματικό δακτύλιο καθιστά την ρητίνη αυτή ακόμα πιο ευαίσθητη σε όξινες συνθήκες και επιτρέπει την αποκοπή του πεπτιδίου με ελεύθερη αμιδική ομάδα στο C-τελικό άκρο του, με διάλυμα 95% TFA. Είναι συμβατή με την Fmoc-μεθοδολογία, ωστόσο, βασικό μειονέκτημα της αποτελεί η διάσπαση του linker κατά τη χρήση υψηλής συγκέντρωσης TFA, γεγονός που οδηγεί στη λήψη παραπροϊόντων [11].

- **4-(2',4'-Διμεθοξυφαινυλο-Fmoc-αμινομεθυλο)-φαινοξυακεταμιδο-νορλευκιλαμινομεθυλο-ρητίνη (Rink Amide AM resin)**



Η ρητίνη αυτή, αποτελεί παραλλαγή της Rink Amide φέροντας επιπλέον μια αμινομεθυλομάδα, μια νορλευκίνη και μια ακετυλομάδα. Η τροποποίηση αυτή προσφέρει μεγαλύτερη σταθερότητα στο linker έναντι του TFA. Το γεγονός ότι, η αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη επιτυγχάνεται με τη χρήση διαλύματος 95% TFA, την καθιστά

συμβατή με την Fmoc-μεθοδολογία. Το πεπτίδιο παραλαμβάνεται με ελεύθερη αμιδική ομάδα στο C-τελικό άκρο του.

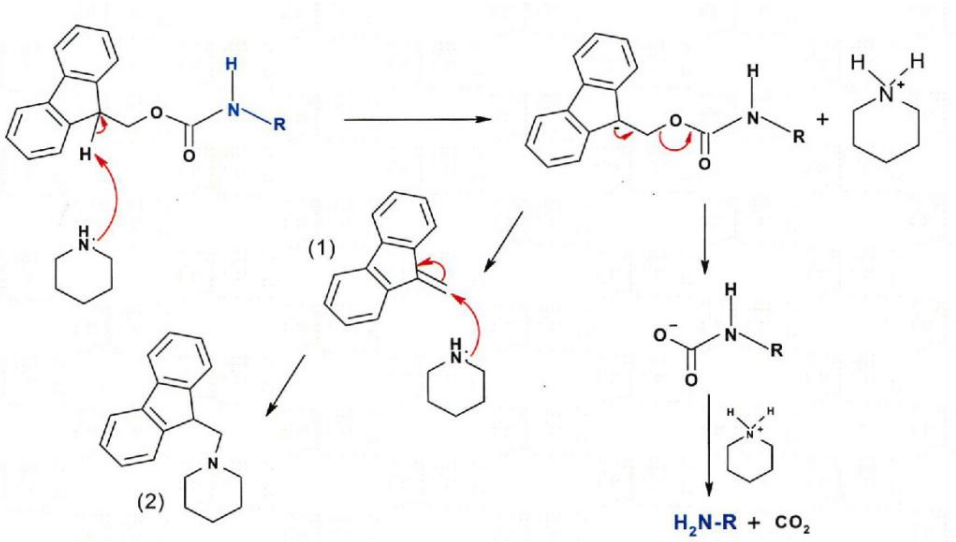
3.8 Προστασία της α-αμινομάδας

Η επιλογή της παροδικής προστασίας της α-αμινομάδας ενός αμινοξέος είναι στρατηγικής σημασίας για την πεπτιδική σύνθεση. Η προστασίας της α-αμινομάδας έχει στόχο τη μείωση της πυρηνοφιλίας του ατόμου του αζώτου, ώστε το ασύζευκτο ζεύγος να μην είναι πλέον διαθέσιμο. Αυτό επιτυγχάνεται είτε με την έλξη ηλεκτρονίων μέσω συζυγιακού φαινομένου, στην περίπτωση που χρησιμοποιείται ουρεθανικού τύπου ομάδες για την προστασία της α-αμινομάδας, είτε λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης, στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται ογκώδεις αλκυλοπροστατευτικές ομάδες.

Οι σημαντικότερες και συχνότερα χρησιμοποιούμενες N^{α} προστατευτικές ομάδες που χρησιμοποιούνται στην πεπτιδική σύνθεση περιγράφονται παρακάτω.

- **9-φλουορενυλομεθυλοξυκαρβονυλομάδα (Fmoc) [12]**

Η ευρέως χρησιμοποιούμενη N^{α} προστατευτική ομάδα η ουρεθανικού τύπου, Fmoc-ομάδα που είναι σταθερή στην επίδραση οξέων, ενώ απομακρύνεται σε βασικό περιβάλλον. Η απομάκρυνσή της Fmoc ομάδας πραγματοποιείται πολύ γρήγορα από τα αμινοξέα ή τα πεπτίδια κατά την κατεργασία τους με διαλύματα μη παρεμποδισμένων στερεοχημικά, κυκλικών, δευτεροταγών αμινών, όπως η πιπεριδίνη [13]. Συγκεκριμένα, πραγματοποιείται με β-απόσπαση του όξινου πρωτονίου του φλουορενίου από μία βάση η οποία οδηγεί στο σχηματισμό διφαινυλοφουλβενίου και διοξειδίου του άνθρακα. Το διφαινυλοφουλβένιο είναι ένα δραστικό ηλεκτρονιόφιλο που θα μπορούσε εύκολα να προσδεθεί στην απροστάτευτη αμινομάδα αν δεν παγιδευτεί. Ωστόσο, συνδέεται με την πιπεριδίνη και δίνει μια σταθερή τριτοταγή βάση που δεν παρεμβαίνει στην αντίδραση και στην απομόνωση του προϊόντος **(Εικόνα 3.9)**. Όσον αφορά τους διαλύτες, η απομάκρυνση της Fmoc ομάδας πραγματοποιείται ταχύτερα σε πολικούς διαλύτες όπως το DMF από ότι σε μη πολικούς (DCM). Για τους παραπάνω λόγους, η απομάκρυνση της Fmoc γίνεται συνήθως με διάλυμα 20% πιπεριδίνη/DMF. Η Fmoc ομάδα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την προστασία της α-αμινομάδας των αμινοξέων σε συνδυασμό με ευαίσθητες σε όξινες συνθήκες πλευρικές προστατευτικές ομάδες όπως η Boc και η tBu.



Εικόνα 3.9. Μηχανισμός απομάκρυνσης της Fmoc-ομάδας με χρήση πιπεριδίνης.

- **Τριτοταγής βουτυλοξυκαρβονυλομάδα (Boc)**

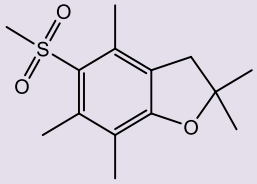
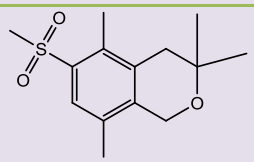
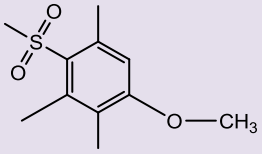
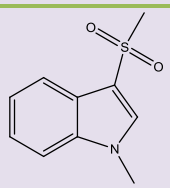
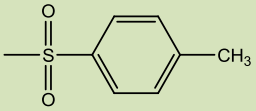
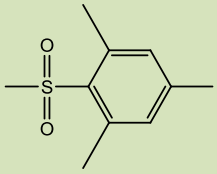
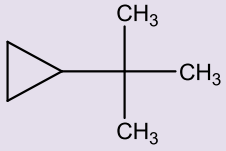
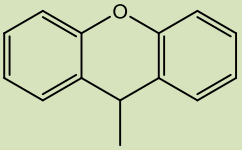
Η τριτοταγής βουτυλόξυκαρβονυλομάδα (Boc) αποτελεί μια από τις σημαντικότερες άμινο-προστατευτικές ομάδες. Η Boc προστατευτική ομάδα είναι συμβατή με τις περισσότερες μεθόδους πεπτιδικής σύνθεσης και παρέχει ικανοποιητική προστασία έναντι φαινομένων ακυλιώσης και ρακεμοποίησης. Απομακρύνεται κάτω από ήπιες όξινες συνθήκες, κυρίως με τη χρήση TFA [14] ή HCl σε οργανικούς διαλύτες οξικό οξύ, οξικό αιθυλεστέρα ή διοξάνη. Κατά την απομάκρυνσή της με όξινες συνθήκες σχηματίζεται το πολύ σταθερό tert-βουτυλο κατιόν, το οποίο, ναι μεν, μετατρέπεται σε ισοβουτένιο, μπορεί όμως να αλκυλιώσει πλευρικές λειτουργικές ομάδες ευαίσθητων αμινοξέων, όπως της Trp και της Tyr. Το ισοβουτένιο μπορεί να αντιδράσει περαιτέρω με TFA σχηματίζοντας τον τριφθοροξικό οξύ tert-βουτυλεστέρα, που επίσης έχει αλκυλιωτικές ικανότητες. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, κατά την απομάκρυνση της Boc ομάδας είναι επιτακτική η χρήση ουσιών, που δρουν ως δεσμευτές (scavengers) των κατιόντων που παράγονται.

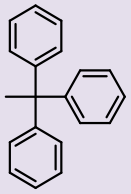
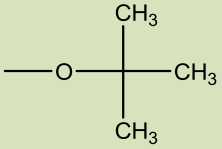
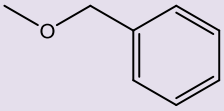
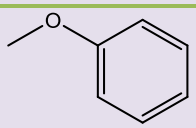
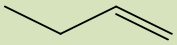
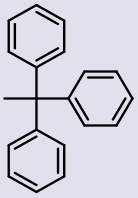
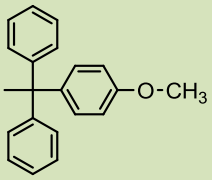
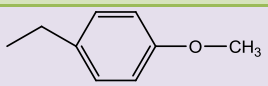
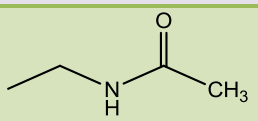
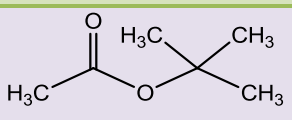
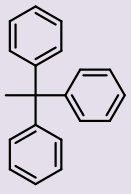
3.9 Πλευρικές προστατευτικές ομάδες

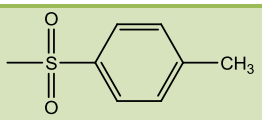
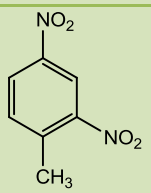
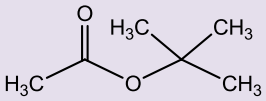
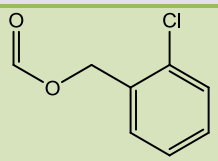
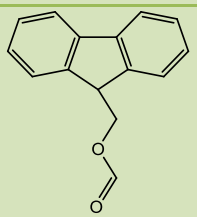
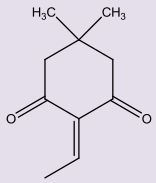
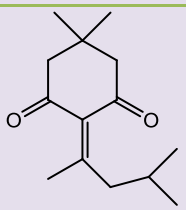
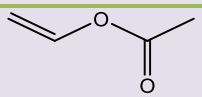
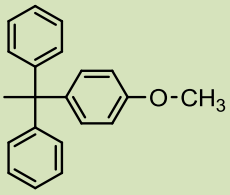
Η προστασία των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων που φέρουν δραστικές ομάδες είναι απαραίτητη για την αποφυγή ανεπιθύμητων παράπλευρων αντιδράσεων κατά την πεπτιδική σύνθεση. Οι προστατευτικές ομάδες που επιλέγονται πρέπει να είναι σταθερές στις συνθήκες αποπροστασίας της α-αμινομάδας, να είναι σταθερές στις συνθήκες σχηματισμού του πεπτιδικού δεσμού και να απομακρύνονται εύκολα μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης κατά την αποκοπή του πεπτιδίου ή/και εκλεκτικά όταν είναι απαραίτητο. Όταν χρησιμοποιείται η Fmoc ομάδα για την προστασία της α-αμινομάδας των αμινοξέων, οι πλευρικές προστατευτικές ομάδες επιλέγονται με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι σταθερές κατά την κατεργασία με διάλυμα πιπεριδίνης, ενώ συνήθως απομακρύνονται από το πεπτίδιο με TFA. Η στρατηγική αυτή είναι γνωστή ως Fmoc/tBu στρατηγική. Αντίθετα, όταν για την προστασία της α-αμινομάδας των αμινοξέων χρησιμοποιείται η Boc ομάδα, η επιλογή των πλευρικών προστατευτικών ομάδων γίνεται κατά τέτοιο τρόπο ώστε να είναι σταθερές στο TFA. Αυτή η στρατηγική σύνθεσης είναι γνωστή ως Boc/Bzl. Κάποια από τα αμινοξέα μπορούν να ενσωματωθούν στην πεπτιδική αλυσίδα χωρίς να απαιτείται προστασία της παράπλευρης ομάδας τους.

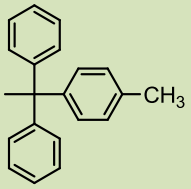
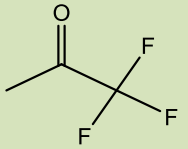
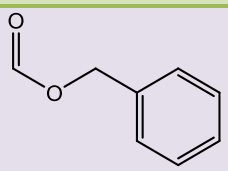
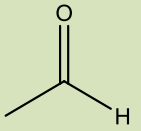
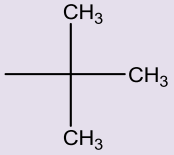
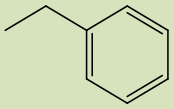
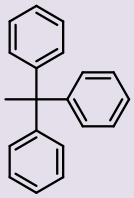
Στον **Πίνακα 3.1** παρουσιάζονται τα αμινοξέα των οποίων οι πλευρικές ομάδες απαιτούν προστασία, καθώς και οι ομάδες που χρησιμοποιούνται κατά περίπτωση.

Πίνακας 3.1. Οι κυριότερες προστατευτικές ομάδες των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων.

Αμινοξύ	Μεθοδολογία Σύνθεσης	Ονομασία	Συντομο-γραφία	Χημικός Τύπος
Arg	**Fmoc**	2,2,4,6,7-πενταμεθυλο-διϋδροβενζοφουρανο-5-σουλφονυλομάδα	**Pbf** [15]	
		2,2,5,7,8-πενταμεθυλο-χρωμανο-6-σουλφονυλομάδα	**Pmc** [16]	
		4-μεθοξύ-2,3,6-τριμεθυλοφαινυλο-σουλφονυλομάδα	**Mtr** [17]	
		1,2-διμέθυλ-ινδόλη-3-σουλφονυλομάδα	**MIS** [18]	
	Boc	π-τολουόλιο-σουλφονυλομάδα	**Tos** [19,20]	
		2,4,6-τριμεθυλοφαινυλο-σουλφονυλομάδα	**Mts** [21]	
Asn/Gln	**Fmoc**	1-κυκλοπροπυλ-1-μεθυλαιθυλομάδα	**Dmcp** [22]	
	Boc	Ξανθυλομάδα	**Xan** [23]	

Asn/Gln	**Fmoc/Boc**	Τριτυλομάδα (τριφαινυλο-μεθυλομάδα)	**Trt** [24]	
Asp/Glu	**Fmoc**	t-βουτοξυομάδα	**OtBu** [25]	
	Boc	Βενζυλοξυομάδα	**OBzl**	
		Κυκλοεξυλοξυομάδα	**OcHx** [26]	
	Fmoc/Boc **(εκλεκτική αποπροστασία)**	Αλλυλομάδα	**OAll** [27]	
Cys	**Fmoc (ελεύθερη –SH ή κυκλοποίηση σε SPPS)**	Τριτυλομάδα (τριφαινυλο-μεθυλομάδα)	**Trt** [28]	
	Fmoc (εκλεκτική αποπροστασία στην ρητίνη)	4-μεθοξυ-τριτυλομάδα	**Mmt** [29]	
	Boc	p-μεθοξυ-βενζυλομάδα	**pMeOBzl**	
	Fmoc/Boc (κυκλοποίηση σε SPPS ή υγρή φάση)	Ακεταμιδομεθυλομάδα	**Acm** [28]	
His	**Fmoc**	t-βουτοξυ-καρβονυλομάδα	**Boc**	
		Τριτυλομάδα (τριφαινυλο-μεθυλομάδα)	**Trt** [30]	

His	**Boc**	π-τολουολο-σουλφονυλομάδα	**Tos** [31]	
		2,4-δινιτροφαινυλομάδα	**Dnp** [32]	
Lys	**Fmoc**	t-βουτοξυ-καρβονυλομάδα	**Boc**	
	Boc	2-χλωρο-βενζυλοξυ-καρβονυλομάδα	**2-Cl-Z** [33]	
		9-φλουορενυλο-μεθυλοξυ-καρβονυλομάδα	**Fmoc**	
	Fmoc/Boc **(εκλεκτική αποπροστασία**	1-(4,4-διμεθυλο-2,6- διοξο-κυκλοεξ-1-υλιδεν) αιθυλομάδα	**Dde** [34]	
		1-(4,4-διμεθυλο-2,6- διοξο-κυκλοεξ-1-υλιδεν)-3-μεθυλ-βουτυλομάδα	**ivDde** [35]	
		Αλλυλοξυ-καρβονυλομάδα	**Alloc**	
	Fmoc **(εκλεκτική αποπροστασία)**	4-μεθοξυ-τριτυλομάδα	**Mmt** [36]	

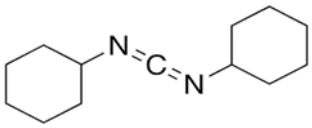
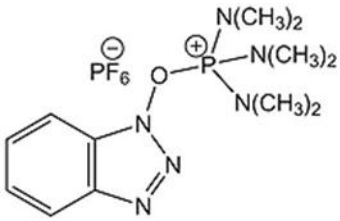
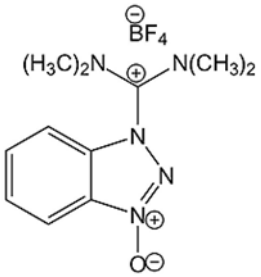
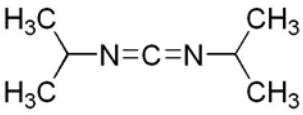
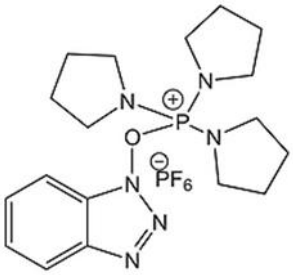
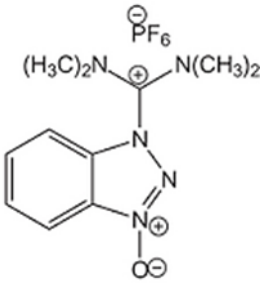
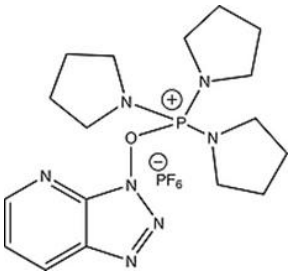
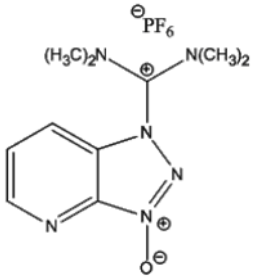
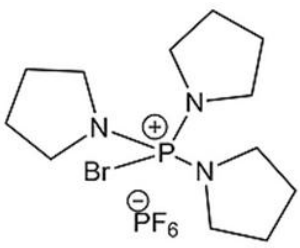
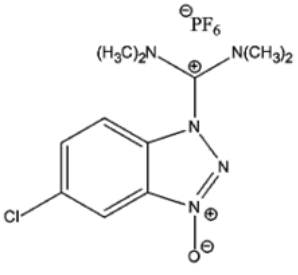
Lys	**Fmoc** **(εκλεκτική αποπροστασία)**	4-μεθυλο-τριτυλομάδα	**Mtt**	
		Τριφθορο-ακετυλομάδα	**Tfa** [37]	
	Fmoc/Boc	Βενζυλοξυ-καρβονυλομάδα	**Z** [33]	
	Boc	Φορμυλομάδα	**For** [38]	
Ser/Thr Tyr	**Fmoc**	t-βουτυλομάδα	**tBu** [39]	
	Boc	Βενζυλομάδα	**Bzl** [40-42]	
	Fmoc/Boc	Τριτυλομάδα (τριφαινυλο-μεθυλομάδα)	**Trt** [43]	

3.10 Αντιδραστήρια σύζευξης

Η χρήση των αντιδραστηρίων σύζευξης κατά την πεπτιδική σύνθεση είναι ευρέως διαδεδομένη και αποτελεί την κύρια μέθοδο σύζευξης, λόγω της εύκολης χρήσης τους και της ταχύτητα των αντιδράσεων, καθώς ενεργοποίηση και σύζευξη πραγματοποιούνται ταυτόχρονα (in situ coupling reagents), ακόμα και σε στερικά παρεμποδισμένα αμινοξέα, χωρίς σημαντικές παράπλευρες αντιδράσεις.

Στον **Πίνακας 3.2** παρουσιάζονται τα κυριότερα αντιδραστήρια σύζευξης που χρησιμοποιούνται κατά την πεπτιδική σύνθεση.

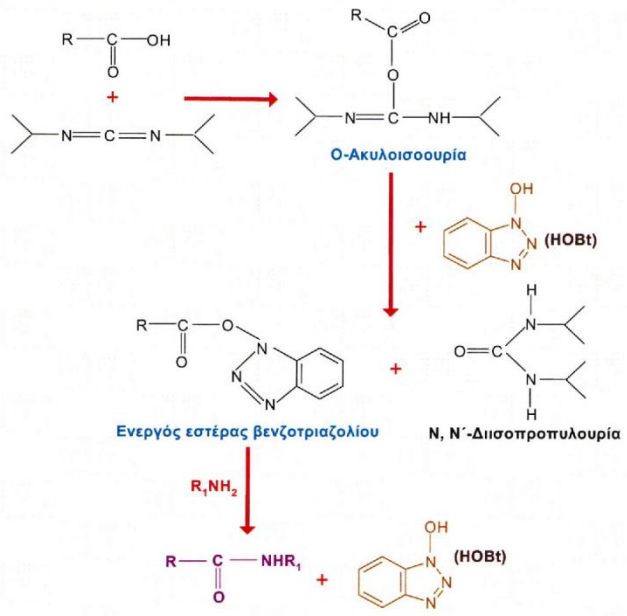
Πίνακας 3.2. Αντιδραστήρια σύζευξης.

Καρβοδιϊμίδια	Φωσφονικά παράγωγα	Ουρονικά παράγωγα
DCC 	**BOP** 	**TBTU** 
DIC 	**PyBOP** 	**HBTU** 
	PyAOP 	**HATU** 
	PyBrop 	**HCTU** 

Καρβοδιϊμίδια

Το N,N΄-δικυκλοέξυλοκαρβοδιιμίδιο (DCC) και το διϊσοπρόπυλοκαρβοδιϊμίδιο (DIC) είναι δύο ευρύτατα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια σύζευξης μέχρι και σήμερα. Ωστόσο, η χρήση τους παρουσιάζει μειονεκτήματα όπως ο σχηματισμός της μη δραστικής N-ακυλοουρίας, λόγω ενδομοριακής O→N μετάθεσης στην O-ακυλο-ισοουρία αλλά και η μεγάλη τάση για ρακεμοποίηση λόγω του ιδιαίτερα δραστικού ενδιάμεσου παράγωγου της O-ακυλο-ισοουρίας

Το φαινόμενο αυτό μπορεί να περιοριστεί με την προσθήκη βοηθητικών πυρηνόφιλων, όπως το 1-υδροξυβενζοτριαζόλιο (HOBt) [44]. Η προσβολή του HOBt στο δραστικό ενδιάμεσο παράγωγο, δίνει O-ακυλο-1-υδροξυβενζοτριαζόλιο, που είναι ισχυρά ακυλιωτικό μέσο. Επιπλέον, η παρουσία ενός δεύτερου πηρηνόφιλου στο μίγμα της αντίδρασης περιορίζει την ρακεμοποίηση καθώς μειώνει την συγκέντρωση της O-ακυλο-ισοουρίας και επομένως την έκταση της O→N άκυλο-μετάθεσης που οδηγεί στο σχηματισμό των παραγώγων της N-ακυλοουρίας (**Εικόνα 3.10)**. Τέλος, το HOBt ως ασθενές οξύ εμποδίζει την αφαίρεση πρωτονίου από το οπτικώς ενεργό άτομο άνθρακα, συμβάλλοντας έτσι και με ένα δεύτερο τρόπο στη διατήρηση της οπτικής ενεργότητας [45].



Εικόνα 3.10. Μηχανισμός σχηματισμού πεπτιδικού δεσμού με τη χρήση DIC και HOBt.

Ένα άλλο βοηθητικό πυρηνόφιλο, το 1-υδροξυ-7-αζαβενζοτριαζόλιο (HOAt) [46], εμφανίζει βελτιωμένες ιδιότητες, καθώς συνδυάζει τα χαρακτηριστικά του HOBt και μια τριτοταγή βάση στο ίδιο μόριο, με αποτέλεσμα να επιταχύνει σημαντικά την ταχύτητα της αντίδρασης και ταυτόχρονα να δίνει βέλτιστες αποδόσεις σύζευξης και ελάχιστη ρακεμοποίηση [47].

Επίσης, με την χρήση των καρβοδιϊμιδίων δημιουργείται πρόβλημα κατά τον διαχωρισμό από τα παραπροϊόντα. Το παραπροϊόν που σχηματίζεται με τη χρήση του DCC, η N,N' δικυκλοεξυλουρία (DCU), είναι ιδιαίτερα δυσδιάλυτο στους κοινούς διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην πεπτιδική σύνθεση στερεής φάσης (DCM) και για το λόγο αυτό συνήθως προτιμάται το DIC, καθώς το παραπροϊόν που σχηματίζει, η N,N' διϊσοπροπυλουρία, είναι σχετικά διαλυτό [48].

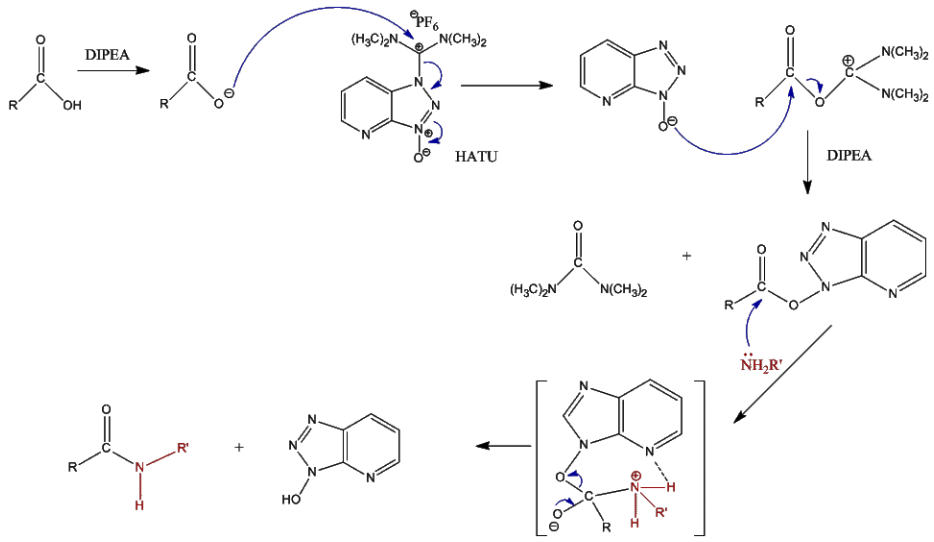
Εκτός από τα καρβοδιιμίδια, τα τελευταία χρόνια στην πεπτιδική σύνθεση χρησιμοποιούνται ευρέως τα φωσφονικά ή ουρανικά άλατα, τα οποία σε συνδυασμό με μια τριτοταγή βάση, μετατρέπουν τα προστατευμένα αμινοξέα σε ενεργούς εστέρες.

► Φωσφονικά και Ουρονικά άλατα

Στα φωσφονικά παράγωγα, ανήκει το βενζοτριαζολ-1-υλ-οξυ-τρις-(διμεθυλαμινο)-φωσφονικό εξαφθοροφωσφορικό άλας, **BOP** [49], το οποίο αποτελεί ένα ιδιαίτερα αποτελεσματικό αντιδραστήριο σύζευξης. Παρουσιάζει όμως, σημαντικά μειονεκτήματα όπως είναι ο σχηματισμός του ιδιαίτερα τοξικού και καρκινογόνου HMPA κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και ο αυξημένος κίνδυνος ρακεμοποίησης [50]. Τα αντιδραστήρια σύζευξης **PyBOP** [51] και **PyAOP** [52], ανάλογο του HOAt, όπου οι διμεθυλάμινο υποκαταστατες αντικαταστάθηκαν από δακτυλίους πυρολιδίνης, πλεονεκτούν έναντι του BOP, καθώς δεν παράγουν επικίνδυνα παραπροϊόντα. Σε στερικά παρεμποδισμένα αμινοξέα συχνά χρησιμοποιείται το βρώμο-τρις-πυρρολιδινο-φωσφονικό εξαφθοροφωσφορικό άλας, **PyBroP** [53]. Τα παραπάνω αντιδραστήρια δεν αντιδρούν με την αμινομάδα και έτσι μπορούν να προστεθούν απευθείας στο μίγμα της αντίδρασης που περιλαμβάνει και το άμινο και το καρβόξυλο συστατικό. Για το σχηματισμό του καρβοξυλικού ανιόντος, συνήθως, προστίθεται μια τριτοταγής βάση. Η πυρηνόφιλη προσβολή του καρβοξυλίου οδηγεί στο σχηματισμό του ιδιαίτερα δραστικού ακυλοφωσφονικού ενδιαμέσου, το οποίο μετατρέπεται απευθείας στον εστέρα του HOBt υπό την παρουσία HOBt.

Το ο-βενζοτριαζολυλο-τετραμεθυλο-ισοουρονικό τετραφθοροξικό άλας (TBTU) [54] και το ο-βενζοτριαζολυλο-τετραμεθυλο-ισοουρονικό εξαφθοροξικό άλας (HBTU) [55] ανήκουν στα ουρονικά παράγωγα. Η σύνθεση τους βασίζεται στο HOBt. Συγκριτικές μελέτες μεταξύ του HBTU του TBTU έδειξαν ότι η διαφορά στο αντισταθμιστικό ιόν δεν έχει επίδραση στα ποσοστά σύζευξης ή στα επίπεδα ρακεμοποίησης [54]. Πυρηνόφιλη προσθήκη στο καρβοξύλιο οδηγεί στο σχηματισμό ενός Ο-ακυλο-ουρανικού ενδιαμέσου, που αντιδρά περαιτέρω και δίνει τον ενεργό HOBt (ή HOAt) εστέρα. Αντίθετα με τα καρβοδιιμίδια και τα φωσφονικά άλατα, τα ουρονικά παράγωγα αντιδρούν με την αμινομάδα σχηματίζοντας τετραμεθυλογουανιδίνο παράγωγα. Δέσμευση του αμινοσυστατικού έχουμε όταν το αντιδραστήριο προστίθεται απευθείας στο μίγμα της αντίδρασης. Για να αποφευχθεί αυτό, η ενεργοποίηση του καρβοξυλίου από τα ουρονικά αντιδραστήρια, πραγματοποιείται πριν από την προσθήκη αυτού στο μίγμα της αντίδρασης σύζευξης.

Το **HATU**, ένα άλλο αντιδραστήριο σύζευξης, με βάση το HOAt, αποδεικνύεται ένα ιδιαίτερα αποτελεσματικό αντιδραστήριο σύζευξης, που παρουσιάζει μικρότερα ποσοστά ρακεμοποίησης σε σχέση με το HBTU και το TBTU [56, 57]. Η αυξημένη δραστικότητα του HOAt έναντι HOBt οφείλεται στην χαμηλότερη τιμή pka αλλά και στο άζωτο της πυριδίνης που ευνοεί την αλληλεπίδραση με το άμινο συστατικό μέσω δεσμού υδρογόνου κατά την διαδικασία της σύζευξης **(Εικόνα 3.11).**



Εικόνα 3.11. Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού με τη χρήση HATU ως αντιδραστηρίου σύζευξης.

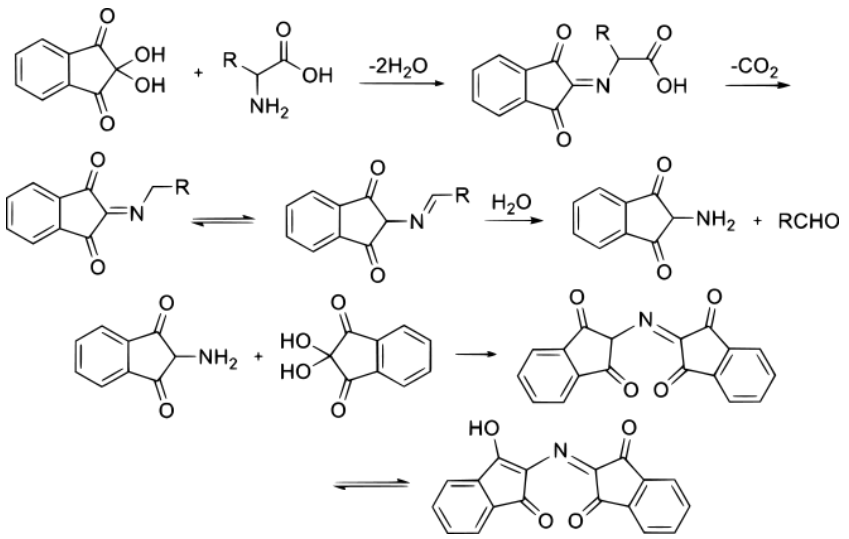
Επίσης, ένα καινούργιο αντιδραστήριο, το **HCTU** (6-χλωρο-ο-βενζοτριαζολυλο τετραμεθυλο-ισοουρονικό εξαφθοροξικό άλας) [58] σε συγκριτικές μελέτες με το TBTU, έδειξε εξαιρετική δράση κατά την σύνθεση δύσκολων αλληλουχιών, όπου υπάρχει στερεοχημική παρεμπόδιση και κατά την κυκλοποίηση πεπτιδίων.

3.11 Έλεγχος της πορείας της αντίδρασης σύζευξης με Test Kaiser

Ο πιο διαδεδομένος τρόπος για τον έλεγχο της πορείας της αντίδρασης σύζευξης είναι το test Kaiser [59] **(Εικόνα 3.11)**. Πρόκειται για μια απλή, γρήγορη και ευαίσθητη χημική δοκιμασία, η οποία δίνει ένα έγχρωμο σήμα όταν υπάρχουν ελεύθερες πρωτοταγείς αμινομάδες. Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται στο τεστ Kaiser είναι τα εξής:

- 5 g Νινυδρίνης σε 100 ml αιθανόλης
- 80 g Φαινόλη σε 20 ml αιθανόλης
- 2 ml 0,001 M KCN σε 98 ml πυριδίνης

Η διαδικασία που εφαρμόζετε είναι η ακόλουθη: στο τέλος της αντίδρασης σύζευξης, μικρή ποσότητα κόκκων πεπτιδορητίνης φέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα και προστίθενται τρεις σταγόνες από το κάθε ένα από τα παραπάνω διαλύματα. Το μίγμα θερμαίνεται για 5min στους 100^{o}C. Στην περίπτωση που το χρώμα του διαλύματος παραμείνει αμετάβλητο (κιτρινωπό), η δοκιμή θεωρείται αρνητική ως προς την ύπαρξη ελεύθερης αμινομάδας, οπότε η αντίδραση έχει ολοκληρωθεί. Αν το χρώμα του διαλύματος και των κόκκων της ρητίνης γίνει μπλε, η δοκιμή θεωρείται θετική οπότε απαιτείται επανάληψη της σύζευξης. Πρέπει αν σημειωθεί ότι κάποια μη προστατευμένα αμινοξέα [60] (π.χ. Ser, Asn, Asp) δεν δίνουν το αναμενόμενο σκούρο μπλε χρώμα, χαρακτηριστικό των ελεύθερων πρωτοταγών αμινομάδων. Κατά καιρούς, έχουν παρατηρηθεί λανθασμένα αρνητικά τεστ, κυρίως σε περίπλοκες αλληλουχίες όπου παρατηρείται συσσωμάτωση, όπως και λανθασμένα θετικά τεστ που πιθανότατα οφείλονται στην ευαισθησία της Fmoc ομάδας στη θέρμανση. Για το λόγο αυτό, υπερβολική θέρμανση θα πρέπει να αποφεύγεται.



Εικόνα 3.12. Τεστ Kaiser. Αντίδραση νινυδρίνης με πρωτοταγείς αμίνες, όπου σχηματίζεται βάση του Schiff για να δώσει το τελικό χρωμοφόρο προϊόν.

3.12 Ανεπιθύμητες αντιδράσεις στην πεπτιδική σύνθεση

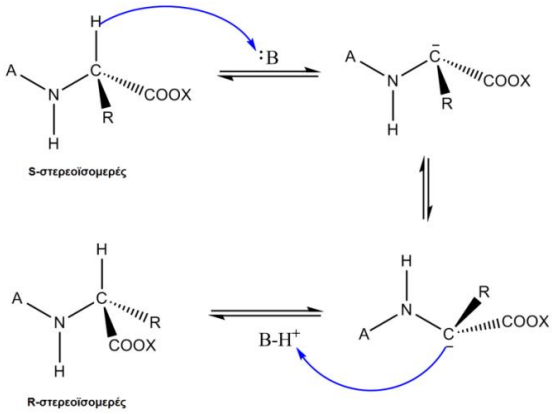
Μια σειρά προβλημάτων τα οποία απαντώνται κατά τη διάρκεια της σύνθεσης, καθώς και τρόποι αντιμετώπισής τους αναφέρονται παρακάτω.

3.12.1 Ρακεμοποίηση

Εκτός από την γλυκίνη, τα υπόλοιπα αμινοξέα περιέχουν ένα χειρικό (οπτικώς ενεργό) κέντρο στο α-άτομο άνθρακα. Η ισολευκίνη και η θρεονίνη περιέχουν ένα επιπλέον χειρικό κέντρο στην παράπλευρη αλυσίδα τους. Οι ιδιότητες των πρωτεϊνών και των πεπτιδίων εξαρτώνται από τη διαμόρφωση (στερεοδιάταξη) των χειρικών τους κέντρων. Η αλλαγή στη στερεοδιάταξη ενός και μόνο χειρικού κέντρου (ρακεμοποίηση) μπορεί να έχει δραστικές επιδράσεις στη βιολογική δράση και για το λόγο αυτό επιβάλλεται να ελαχιστοποιείται κατά την πεπτιδική σύνθεση. Επιπλέον, ο διαχωρισμός μίγματος διαστερεομερών είναι ιδιαίτερα δύσκολος. Ο βαθμός της ρακεμοποίησης εξαρτάται από μια σειρά παραγόντων, όπως τη μέθοδο ενεργοποίησης, τη N-προστατευτική ομάδα και τις συνθήκες της αντίδρασης (θερμοκρασία, διαλύτες). Οι σημαντικότεροι μηχανισμοί ρακεμοποίησης στην πεπτιδική σύνθεση είναι μέσω απόσπασης του όξινου υδρογόνου από το στερεογονικό άτομο άνθρακα και μέσω σχηματισμού οξαζολόνης.

■ Ρακεμοποίηση μέσω απόσπασης α-πρωτονίου

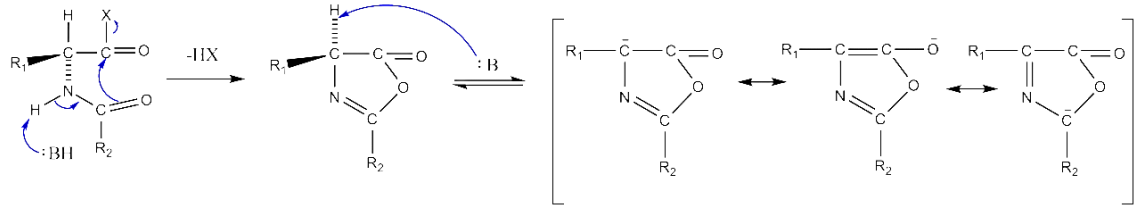
Σε όλα τα οπτικώς ενεργά αμινοξέα ο ένας από τους υποκαταστάτες του ασύμμετρου α-άνθρακα είναι ένα όξινο άτομο υδρογόνου, του οποίου η οξύτητα αυξάνεται κατά την ενεργοποίηση της καρβοξυλομάδας, με κίνδυνο την απόσπασή του. Το σχηματιζόμενο καρβανιόν μπορεί να πρωτονιωθεί και από τις δύο πλευρές προς δύο εναντιομερείς μορφές *D*- και *L*-. Στην πράξη ωστόσο ρακεμοποίηση με απευθείας απόσπαση του α-υδρογόνου σπανίως παρατηρείται **(Εικόνα 3.13)**.



Εικόνα 3.13. Μηχανισμός ρακεμοποίησης μέσω απόσπασης α-πρωτονίου υπό την επίδραση βάσης. Όπου Α: αμινοπροστατευτική ομάδα, Χ: ενεργοποιός ομάδα, Β: βάση.

■ Ρακεμοποίηση μεσώ σχηματισμού αζλακτόνης [5-(4Η)-Οξαζολόνης]

Ο μηχανισμός αυτός είναι ο πιθανότερος και περιλαμβάνει το σχηματισμό ενδιάμεσου κυκλικού παραγώγου (αζλακτόνης), μέσω απόσπασης του όξινου πρωτονίου της προστατευμένης αμινομάδας υπό τη επίδραση βάσης. Η τάση των αζλακτονών προς ρακεμοποίηση οφείλεται στην ευκολία με την οποία μπορεί να αποσπασθεί, υπό την επίδραση βάσης, το όξινο πρωτόνιο του χειρόμορφου κέντρου, σχηματίζοντας σταθερά, λόγω συντονισμού, καρβανιόντα **(Εικόνα 3.14)**. Η οξαζολόνη αποτελεί ισχυρό ακυλιώτικο μέσο και είναι δυνατό είτε να δεχτεί πυρηνόφιλη προσβολή από την ελεύθερη αμινομάδα του αμινοσυστατικού, σχηματίζοντας οπτικά καθαρό προϊόν, είτε να υποστεί απόσπαση πρωτονίου υπό την επίδραση της βάσης και να οδηγήσει στο σχηματισμό ρακεμικού μίγματος.



Εικόνα 3.14. Σταθεροποίηση καρβανιόντος μέσω συντονισμού.

Ο βαθμός της ρακεμοποίησης εξαρτάται από τις συνθήκες της αντίδρασης και συγκεκριμένα από το προς ενεργοποίηση αμινοξύ, την προστατευτική ομάδα της α-αμινομάδας, τη μέθοδο σύζευξης, το διαλύτη, τη θερμοκρασία, την ποσότητα και το είδος της χρησιμοποιούμενης βάσης.

Αμινοξέα που φέρουν ηλεκτραρνητική ομάδα σε θέση β, όπως η Ser, η Thr, η Cys το Asp καθώς και τα αρωματικά αμινοξέα, είναι πιο επιρρεπή στη ρακεμοποίηση, αφού η παρουσία της ηλεκτραρνητικής ομάδας διευκολύνει την απόσπαση πρωτονίου από το α-άτομο άνθρακα [61, 62]. Επίσης, οι αμινοπροστατευτικές ομάδες ουρεθανικού τύπου (Z-, Boc-, Fmoc- κ.α) ελαχιστοποιούν την έκταση της ρακεμοποίησης, σε αντίθεση με τις ακυλομάδες (Ac-) που ευνοούν το σχηματισμό αζλακτόνης. Στην σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση χρησιμοποιούνται στερικά παρεμποδισμένες τεταρτοταγείς αμίνες με σκοπό να ελαχιστοποιηθεί η βασικά καταλυόμενη απόσπαση του πρωτονιού του C^{α}. Επίσης, δίνεται έμφαση στην προσθήκη βοηθητικών πυρηνόφιλων στο διάλυμα σύζευξης.

3.12.2 Συσσωμάτωση

Κατά την αύξηση της πεπτιδικής αλυσίδας, δεσμοί υδρογόνου και υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις ενοχοποιούνται για το σχηματισμό δευτεροταγών δομών και συσσωματωμάτων (aggregates) είτε με το στερεό υπόστρωμα είτε με τις άλλες αναπτυσσόμενες αλυσίδες. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε ανικανότητα διόγκωσης της πεπτιδορητίνης, όπου σε συνδυασμό με την αδυναμία των αντιδραστηρίων να εισχωρήσουν στους πόρους του πολυμερούς, έχει ως αποτέλεσμα, οι συζεύξεις και οι επακόλουθες αποκοπές της Fmoc-ομάδας να μην ολοκληρώνονται [63].

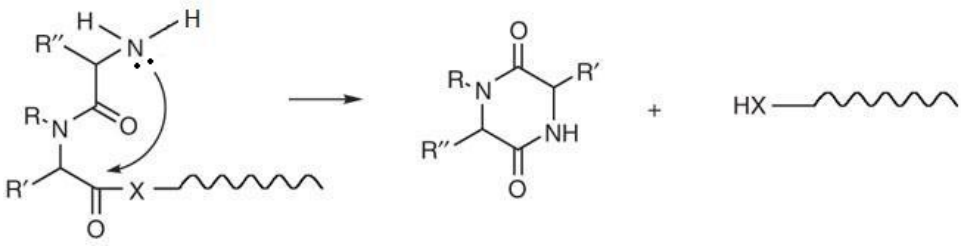
Η συσσωμάτωση φαίνεται να εξαρτάται από την πεπτιδική αλληλουχία και την φύση των προστατευτικών ομάδων. Έτσι, αλυσίδες πλούσιες σε β-υποκατεστημένα αμινοξέα

(π.χ. Val, Ile, Leu) και ογκώδεις στερεοχημικά παρεμποδισμένες ομάδες συχνά δυσκολεύουν την επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας. Η χρήση υψηλών θερμοκρασιών και πολικών απρωτικών διαλυτών, όπως το DMF και η καλύτερη, N-μεθυλο-πυρολιδίνη (NMP), βελτιώνουν σημαντικά τις δύσκολες συζεύξεις αυξάνοντας τη διεισδυτικότητα στους πόρους της ρητίνης. Σε πολυμερή υποστρώματα με μεγάλη πυκνότητα πεπτιδικών αλυσίδων αυξάνεται ο πολυαμιδικός χαρακτήρας οδηγώντας σε απώλεια των διογκωτικών ιδιοτήτων. Έτσι, συνίσταται οι υποκαταστάσεις να επιλέγονται έτσι ώστε το πεπτιδικό περιεχόμενο να μην ξεπερνά το 50% της πεπτιδορητίνης [64].

3.12.3 Σχηματισμός δικετοπιπεραζίνης

Μια ιδιαίτερα ανεπιθύμητη αντίδραση που συμβαίνει στην πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση είναι ο σχηματισμός δικετοπιπεραζίνης. Συγκεκριμένα, μετά την αποπροστασία της αμινομάδας του σχηματιζόμενου διπεπτιδίου (που είναι συνδεδεμένο με την ρητίνη), παρατηρείται συχνά, προσβολή της καρβονυλομάδας του εστερικού δεσμού από την ελεύθερη αμινομάδα [65-67]. Αποτέλεσμα αυτής της προσβολής είναι η απομάκρυνση του διπεπτιδίου από την ρητίνη ως δικετοπιπεραζίνη (DKP) (**Εικόνα 3.15).** Η ενδομοριακή αυτή αμινόλυση, εξαρτάται από την αλληλουχία των αμινοξέων. Η παρουσία Gly, Pro, D-αμινοξέων ή N-αλκυλ-αμινοξέων στο διπεπτίδιο έχει βρεθεί ότι, επιταχύνει το σχηματισμό δικετοπιπεραζίνης. Άρα, εάν αυτά τα αμινοξέα, βρίσκονται στην πρώτη και στη δεύτερη θέση της πεπτιδικής αλυσίδας, τότε η κυκλοποίηση μπορεί να συμβεί σε μεγάλο βαθμό.

Ο σχηματισμός DKP οδηγεί όχι μόνο σε μειωμένες αποδόσεις αλλά και σε πεπτιδικές αλυσίδες μειωμένες κατά το C-τελικό διπεπτίδιο και προκύπτουν από την ακυλίωση της καινούργιας ρητίνης που σχηματίστηκε κατά την αποκοπή του C-τελικού διπεπτιδίου. Η χρήση ρητινών που περιέχουν ογκώδεις υποκαταστάτες, όπως η chlorotrityl chloride (CTC) ρητίνη, προλαμβάνει το σχηματισμό DKP λόγω στεροχημικών παρεμποδίσεων.

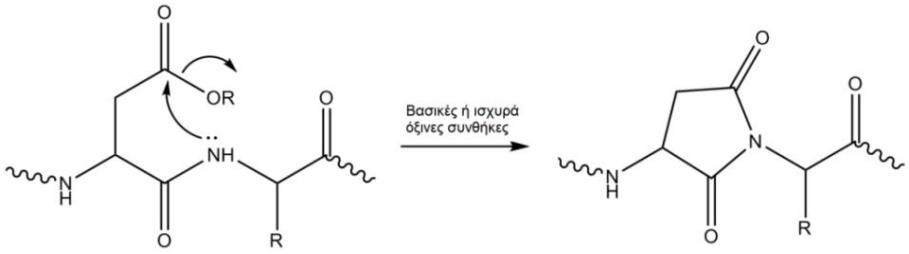


Εικόνα 3.15. Σχηματισμός δικετοπιπεραζίνης.

3.12.4 Σχηματισμός ασπαρτιμιδίου

Ο σχηματισμός ασπαρτιμιδίου, όξινα ή βασικά καταλυόμενος, είναι ίσως η πιο συνηθισμένη παράπλευρη αντίδραση που συναντάται κατά την πεπτιδική σύνθεση. Η αντίδραση περιλαμβάνει πυρηνόφιλη προσβολή του αζώτου που είναι προσκολλημένο στην α-καρβοξυλομάδα του ασπαρτικού οξέος ή της ασπαραγίνης, στον καρβονυλικό άνθρακα της πλευρικής αλυσίδας προς σχηματισμό κυκλικού ιμιδίου (ασπαρτιμιδίου) (**Εικόνα 3.16).** Η αντίδραση εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την φύση του οξέος ή της βάσης καθώς και από τη πεπτιδικής αλληλουχία και τις προστατευτικές ομάδες [69,70]. Οι πιο ευπαθείς αλληλουχίες για τον σχηματισμό ασπαρτιμιδίου είναι -Asp(tBu)-Gly-, -Asp(tBu)-Asn(Trt)-.

Για τον περιορισμό του φαινόμενου μπορούν να χρησιμοποιηθούν ασθενέστερες βάσεις από την πιπεριδίνη, που συνήθως χρησιμοποιείται κατά την αποκοπή της Fmoc ομάδας, όπως η πιπεραζίνη [71] ή η μορφολίνη, καθώς αποτελεί το πιο κρίσιμο στάδιο για το σχηματισμό του ασπαρτιμιδίου. Επίσης, η προσθήκη ασθενών οξέων όπως το HOBt ή η δινιτροφαινόλη στο διάλυμα αποκοπής της Fmoc ομάδας, φαίνεται να περιορίζει την ανεπιθύμητη αυτή αντίδραση.



Εικόνα 3.16. Σχηματισμός δακτυλίου ασπαρτιμιδίου.

3.13 Αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη και αποπροστασία

Το τελικό στάδιο κατά τη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση περιλαμβάνει την αποκοπή του πεπτιδίου από το στερεό υπόστρωμα, καθώς και την αποπροστασία των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων από τις προστατευτικές τους ομάδες. Συνήθως, η αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη πραγματοποιείται υπό την επίδραση οξέων. Συγκεκριμένα, όταν εφαρμόζεται η Boc/Bzl μεθοδολογία χρησιμοποιείται άνυδρο HF, ενώ όταν εφαρμόζεται Fmoc/tBu μεθοδολογία απαιτούνται ηπιότερες όξινες συνθήκες, οπότε χρησιμοποιείται διάλυμα TFA.

Κατά την απομάκρυνση των παράπλευρων προστατευτικών ομάδων και της ρητίνης δημιουργούνται καρβανιόντα με έντονα ηλεκτρονιόφιλο χαρακτήρα [72] που μπορούν να προσβάλλουν τα πυρηνόφιλα κέντρα του πεπτιδίου, όπως τους δακτυλίους της τυροσίνης και της τρυπτοφάνης, τον θειοαιθέρα της μεθειονίνης κ.α. Για την αποφυγή παράπλευρων αντιδράσεων, είναι απαραίτητη η προσθήκη ενώσεων- παγίδων (scavengers) στο διάλυμα αποπροστασίας, ο ρόλος των οποίων είναι η δέσμευση των κατιόντων που δημιουργούνται

Ανάλογα με τα αμινοξέα που απαρτίζουν την πεπτιδική αλυσίδα και τις προστατευτικές ομάδες που χρησιμοποιούνται επιλέγεται το κατάλληλο διάλυμα αποπροστασίας που αποτελείται από το κατάλληλο οξύ, που δημιουργεί τις συνθήκες για την απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων και την αποδέσμευση από τη ρητίνη, και τους κατάλληλους δεσμευτές κατιόντων.

Στην Fmoc/tBu μεθοδολογία, που χρησιμοποιείται συνηθέστερα στη σύνθεση σε στερεή φάση, κατά την απομάκρυνση των ομάδων Boc και tBu με TFA σχηματίζεται το τριτοταγές καρβοκατιόν $(CH_3)_3C^+$ ή το τριφθοροξικό άλας του. Και τα δύο είναι δυνατό να προκαλέσουν την αλκυλίωση αμινοξέων, όπως της Trp, της Tyr, της Met, και της Cys, που οδηγεί στην τροποποίηση του πεπτιδικού προϊόντος, ενώ αντίδραση των προαναφερθέντων αμινοξέων με κατιόντα της ομάδας πρόσδεσης στη ρητίνη (linker) μπορεί να οδηγήσει στην μη αντιστρεπτή επαναδέσμευση του πεπτιδίου στο πολυμερικό υπόστρωμα [73]. Προσθέτοντας scavengers στο μίγμα της αντίδρασης αποδέσμευσης, οι παράπλευρες αντιδράσεις που προαναφέρθηκαν είναι δυνατό να περιοριστούν δραστικά. Εξαίρεση αποτελεί η σουλφονίωση της Trp από τα προϊόντα που προκύπτουν κατά την απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων Mtr και Pmc της Arg [74], η οποία μπορεί να αποτραπεί αν η εισαγωγή της Trp στην πεπτιδική αλυσίδα πραγματοποιηθεί με τη μορφή του προστατευμένου παραγώγου Fmoc-Trp(Boc)-OH [75, 76]. Η χρησιμοποίηση του εν

λόγω παραγώγου εμποδίζει και την επανασύνδεση της C-τελικής Trp με τα κατιόντα του linker της ρητίνης. Το φαινόμενο της σουλφονίωσης παρατηρείται και σε άλλα αμινοξέα, όπως στην Arg (N-σουλφονίωση) [77] στην Ser και την Thr (O-σουλφονίωση) [78].

Ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος δεσμευτής κατιόντων είναι η αιθανοδιθειόλη (EDT), η οποία πέρα από το γεγονός ότι αποτελεί εξαιρετικό scavenger των tBu κατιόντων, βοηθάει και στην απομάκρυνση της προστατευτικής Trt ομάδας της Cys και είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στην καταστολή της όξινα καταλυόμενης οξείδωσης της Trp.

Η όξινα καταλυόμενη οξείδωση της Met περιορίζεται με την προσθήκη στο μίγμα αποπροστασίας αιθυλομεθυλο-σουλφιδίου (EMS), EDT ή θειοανισόλης, αν και ο σχηματισμός του σουλφοξειδίου της Met ελαχιστοποιείται αν η αντίδραση αποδέσμευσης λάβει χώρα σε ατμόσφαιρα αζώτου, ο αιθέρας που χρησιμοποιείται για την κρυστάλλωση του πεπτιδίου είναι απαλλαγμένος από υπεροξείδια και όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι εκτενώς απαερωμένοι. Η θειοανισόλη, επίσης, επιταχύνει την απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων Mtr, Pmc και Pbf της Arg. Η φαινόλη προσφέρει προστασία σε αμινοξέα όπως η Tyr και η Trp, ενώ τριαλκυλσιλάνια, όπως το τριαιθυλσιλάνιο (TES) και το τριισοπροπυλσιλάνιο (TIS), χρησιμοποιούνται ως ικανοποιητικοί αντικαταστάτες της δύσοσμης EDT [79]. Τα αντιδραστήρια αυτά είναι επίσης πολύ δραστικά έναντι των πολύ σταθερών κατιόντων που δημιουργούνται κατά την απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων Trt ή Tmob [80] καθώς και του linker της Rink Amide ρητίνης.

Το μίγμα που χρησιμοποιείται συνήθως αποτελείται από TFA/TIS/H_2O (95/2.5/2.5) και είναι αποτελεσματικό για τις περισσότερες αλληλουχίες. Ωστόσο, στην περίπτωση που στην αλληλουχία περιέχεται κυστεΐνη και πολλές t-βουτύλο προστατευτικές ομάδες, το παραπάνω μίγμα δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό και συνίσταται η προσθήκη EDT στο μίγμα αποκοπής ή η χρήση του αντιδραστήριο K {(Reagent K): TFA/H2O/φαινόλη/θειοανισόλη/EDT [82.5:5:5:5:2.5]}. Το τελευταίο περιέχει ιδιαίτερα τοξικά και δύσοσμα αντιδραστήρια, γι αυτό και η χρήση του περιορίζεται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες.

Η αντίδραση αποδέσμευσης και αποπροστασίας θα πρέπει να ολοκληρώνεται σε σύντομο χρονικό διάστημα (2-4 ώρες), προκειμένου να περιορίζονται οι παράπλευρες αντιδράσεις εξαιτίας της εκτεταμένης έκθεσης ευαίσθητων αμινοξέων στις όξινες συνθήκες που επικρατούν.

3.14 Τεχνικές καθαρισμού και ταυτοποίησης πεπτιδίων

Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης και την αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη ακολουθούν ο καθαρισμός και η ταυτοποίηση του με τις τεχνικές που αναφέρονται παρακάτω.

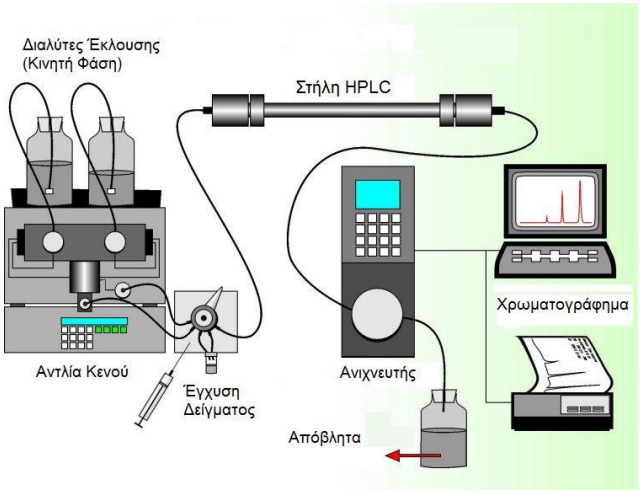
3.14.1 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC)

Η τεχνική που χρησιμοποιείται, κατά κύριο λόγο, για τον καθαρισμό των πεπτιδίων, είναι η ημι-παρασκευαστική ή παρασκευαστική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης *(Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography , **RP-HPLC)***. Ο διαχωρισμός στην HPLC είναι αποτέλεσμα της συνδυαστικής δράσης μιας στατικής και μιας κινητής φάσης. Το δείγμα εισάγεται στην κορυφή της στήλης και με τη βοήθεια της κινητής φάσης τα συστατικά του μετακινούνται με τη μορφή ζωνών και τελικά εκλούονται το ένα μετά το άλλο. Οι ενώσεις που αναλύονται κατανέμονται μεταξύ της στατικής και της κινητής φάση με αποτέλεσμα να μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες κατά μήκος της στήλης. Στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης είναι δυνατή η χρήση μίγματος διαλυτών καθώς και η βαθμιαία μεταβολή της σύστασης της κινητής φάσης

Στην RP-HPLC η αλληλεπίδραση με την στατική φάση στηρίζεται σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και η σταδιακή έκλουση διαφορετικών πεπτιδίων πραγματοποιείται με βαθμιαία μείωση της πολικότητας της υγρής φάσης. Συνήθως, χρησιμοποιείται βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης με H_2O/CH_3CN με 0,1% TFA. Ως οργανικός διαλύτης χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο, το ακετονιτρίλιο. Το TFA αλληλεπιδρά με το πεπτίδιο και διευκολύνει τον διαχωρισμό του, από τα τυχόν παραπροϊόντα. Το TFA είναι το οργανικό οξύ που χρησιμοποιείται ευρέως για το διαχωρισμό των πεπτιδίων με πολύ καλά αποτελέσματα, καθώς είναι πτητικό, με αποτέλεσμα να απομακρύνεται εύκολα από τα συλλεγόμενα κλάσματα και απορροφάει σε χαμηλά μήκη κύματος. Άλλοι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι η μεθανόλη και η ισοπροπανόλη. Κατά τη διάρκεια του προγράμματος έκλουσης, το ποσοστό του οργανικού διαλύτη αυξάνει βαθμιαία, αυξάνοντας την υδροφοβικότητα της υγρής φάσης. Η στατική φάση στην RP-HPLC είναι συνήθως πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου συνδεδεμένα με αλειφατικές ανθρακικές αλυσίδες. Το μέγεθος της ανθρακικής αλυσίδας κυμαίνεται από 4 -18 άτομα άνθρακα και ανάλογα με το μέγεθος και την υδροφοβικότητα του πεπτιδίου επιλέγεται η

κατάλληλη. Συνήθως, για τα πεπτίδια αλλά και για πρωτεΐνες με μοριακό βάρος μικρότερο από 5.000 D χρησιμοποιούνται στήλες με αλειφατική αλυσίδα 18 ατόμων άνθρακα (C-18) [81].

Για την ανίχνευση των προϊόντων που εκλούονται χρησιμοποιούνται συνήθως, ανιχνευτές υπεριώδους ακτινοβολίας, σταθερού ή μεταβαλλόμενου μήκους κύματος. Η παρακολούθηση πραγματοποιείται σε μήκος κύματος 214-220 nm (το μέγιστο της απορρόφησης του πεπτιδικού δεσμού). Ωστόσο, εάν το πεπτίδιο περιέχει αρωματικά αμινοξέα (Phe, Tyr ή Trp) πραγματοποιείται στα 240-280 nm. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται σχηματικά η διάταξη ενός οργάνου HPLC **(Εικόνα 3.17).**



Εικόνα 3.17. Σχηματική διάταξη ενός οργάνου HPLC.

3.14.2 Φασματομετρία μαζών

Η πιο δημοφιλής μέθοδος για την ταυτοποίηση των συνθετικών πεπτιδίων είναι η φασματομετρία μαζών (MS).

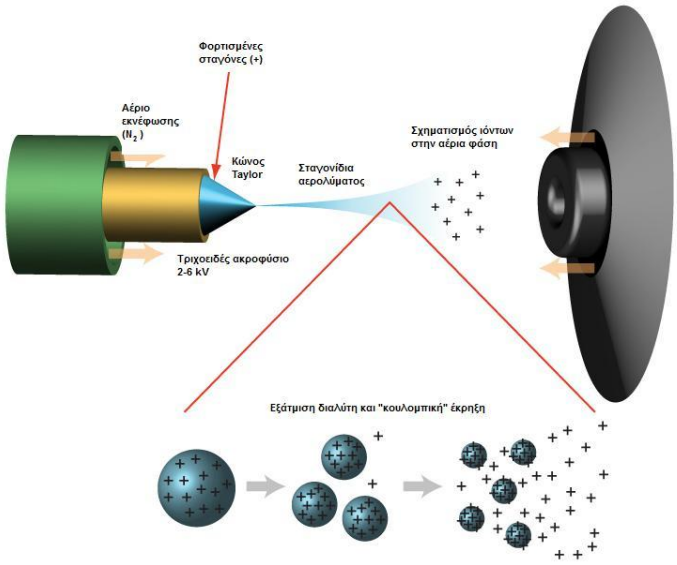
Η φασματομετρία μαζών είναι μια τεχνική που παρέχει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη σύνθεση, τη δομή και την καθαρότητα των πεπτιδίων. Η βασική αρχή στην οποία στηρίζονται όλοι οι φασματογράφοι μάζας είναι η δημιουργία και ο διαχωρισμός, μέσω ηλεκτρικού ή/και μαγνητικού πεδίου, ανάλογα με το λόγο m/z , όπου m η μάζα σε μονάδες Dalton και z το φορτίο του ιόντος ακέραιο πολλαπλάσιο ενός στοιχειώδους φορτίου.

Ανάλογα με τη φύση και το μέγεθος της προς ανάλυση ουσίας, η μέθοδος που χρησιμοποιείται για τη δημιουργία ιόντων και το διαχωρισμό του, με βάση το λόγο m/z, είναι καθοριστικής σημασίας για την απόδοση της τεχνικής.

Η τεχνική του ηλεκτροψεκασμού (*Electrospray Ionization, **ESI**)* χρησιμοποιείται ευρέως στην ανάλυση βιομορίων με μεγάλο μοριακό βάρος. Ηλεκτροψεκάσμος χαρακτηρίζεται η διαδικασία παραγωγής φορτισμένων σταγονιδίων κατά την εκνέφωση ενός διαλύματος σε ηλεκτρικό πεδίο. Το υγρό ρέει μέσα από ένα τριχοειδές ακροφύσιο (από ανοξείδωτο ατσάλι ή τηγμένο οξείδιο του πυριτίου), ενώ την ίδια στιγμή εφαρμόζεται δυναμικό στο ακροφύσιο της τάξης των 2-6 kV. Όταν το δυναμικό είναι θετικό παράγονται θετικά φορτισμένες σταγόνες, ενώ όταν είναι αρνητικό παράγονται αρνητικά φορτισμένες.

Επίσης, υπό την επίδραση του υψηλού δυναμικού, το σχήμα της επιφάνειας του διαλύματος στην ακίδα του τριχοειδούς αλλάζει και σχηματίζει ,κώνο (κώνος Taylor). Από την κορυφή του κώνου αυτού, προβάλλει ένα λεπτό ρεύμα υγρού, από το οποίο παράγονται φορτισμένες σταγόνες.

Μετά την εκνέφωση τα φορτισμένα σταγονίδια που παράγονται μειώνονται σε μέγεθος, λόγω εξάτμισης, και διαιρούνται μέχρι του σημείου που η άπωση των φορτισμένων μορίων που βρίσκονται εντός των σταγονιδίων οδηγεί σε μία «κουλομπική» έκρηξη (Coulombic explosion). Τα ιόντα πλέον βρίσκονται στην αέρια φάση και είναι έτοιμα για την είσοδο τους στον αναλυτή μαζών **(Εικόνα 3.18)**. Ένα σταθερό εκνέφωμα ESI μπορεί να επιτευχθεί για ροές 0,05 – 10 μL/min. Για την σταθεροποίηση του φαινομένου χρησιμοποιείται συχνά ένα αδρανές αέριο εκνέφωσης όπως N_2 και θερμότητα. Όταν το ESI γίνεται σε ροές μικρότερες του 1 μL/min τότε καλείται νανο-ηλεκτροψεκάσμος, nano-ESI ή nESI [82]. Στο φαινόμενο του ESI, η υγρή φάση συμπυκνώνεται και μετατρέπεται σε αέρια, χωρίς όμως να παράγονται ιόντα, αλλά εξατμίζοντας τα ήδη υπάρχοντα.



Εικόνα 3.18. Αναπαράσταση του φαινομένου του ηλεκτροψεκασμού. Το εκνέφωμα οδηγείται προς το φασματόμετρο μαζών υπό τάση με την ταυτόχρονη εξάτμιση του διαλύτη και την εξαέρωση των ιόντων.

Τα πεπτίδια και οι πρωτεΐνες έχουν πολλές ιοντιζόμενες ομάδες, με συνέπεια, κατά τον ηλεκτροψεκάσμο τους να σχηματίζονται πολλαπλά φορτισμένα ιόντα [83]. Ένα τέτοιο φάσμα αντιστοιχεί σε μία κατανομή πολλαπλά πρωτονιωμένων ιόντων ($[M+zH]^{z+}$).

Το ESI μπορεί να θεωρηθεί σαν μία ηλεκτρολυτική κυψέλη στην οποία, όταν αναλύονται κατιόντα, γίνεται εκλεκτικός εμπλουτισμός ως προς αυτά στην επιφάνεια των σταγονιδίων του εκνεφώματος, ενώ τα ανιόντα κινούνται προς το κέντρο. Ο μηχανισμός του σχηματισμού των ιόντων στην αέρια φάση δεν έχει πλήρως εξακριβωθεί και για την ερμηνεία του κυριαρχούν δύο θεωρίες: το μοντέλο εξάτμισης ιόντων (ion evaporation model, IEV) και το μοντέλο υπολειμματικό φορτίου (charge residue model, CR) [84, 85]. Η πρώτη θεωρία υποστηρίζει πως τα ιόντα περνούν στην αέρια φάση κατά την εξάτμιση του εκνεφώματος και την «κουλομπική έκρηξη» που λαμβάνει χώρα όταν η ακτίνα των σταγονιδίων του αερολύματος μειωθεί αρκετά. Στην περίπτωση της δεύτερης θεωρίας υποτίθεται ότι τα αέρια ιόντα σχηματίζονται όταν έχει ολοκληρωθεί το φαινόμενο της εξάτμισης του διαλύτη στο αερόλυμα. Ο πρώτος μηχανισμός θεωρείται πως κυριαρχεί στον ιοντισμό μικρομορίων, ενώ ο δεύτερος, μακρομορίων και πολυμερών.

Στην καρδιά του φασματόμετρου μαζών βρίσκεται ο αναλυτής μαζών ή ακριβέστερα ο αναλυτής ιόντων. Πρόκειται για το μέρος της οργανολογίας που διαχωρίζει τα αέρια ιόντα με βάση κάποιες από τις ιδιότητες τους με στόχο την εκλεκτική ανίχνευση τους στον

ανιχνευτή. Η επιλογή της μεθόδου ιοντισμού και του αναλυτή μαζών είναι τα δύο στοιχεία που καθορίζουν το είδος του φασματομέτρου καθώς και τις δυνατότητες που παρέχει στον αναλυτή. Οι αναλυτές ιόντων χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες:

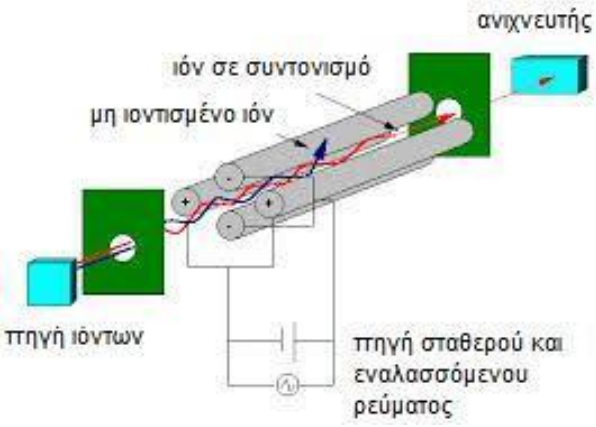
- συνεχούς τύπου (μαγνητικοί, τετράπολοι αναλυτές)
- παλμικού τύπου (αναλυτές χρόνου πτήσεως)
- τύπου παγίδας ιόντων (τετράπολες παγίδες, μετασχηματισμού Φουριέ τροχιακού συντονισμού, κυκλοπαγίδας ιόντων)

Παρακάτω αναλύεται συνοπτικά ο αναλυτής ιόντων που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.

3.14.2.1 Τετράπολοι αναλυτές – Quadrupole analyzers

Ένας τετράπολος αναλυτής μαζών αποτελείται από τέσσερις υπερβολικές ή κυκλικές ράβδους τοποθετημένες παράλληλα και σε ρομβοειδή διάταξη. Οι ράβδοι με κατάλληλο έλεγχο δημιουργούν ηλεκτρομαγνητικά πεδία επηρεάζοντας την τροχιά των ιόντων που κινούνται κατά μήκος των τεσσάρων ράβδων **(Εικόνα 3.19)**. Η κίνηση των ιόντων στο περίπλοκο πεδίο που προκύπτει περιγράφεται από τις εξισώσεις Matthieu [86], η λύση των οποίων στηρίζεται σε δύο παραμέτρους, τα δυναμικά παραγωγής του σταθερού και του εναλλασσόμενου ρεύματος. Η εφαρμογή αυτών των δυναμικών αναγωγής έχει σαν αποτέλεσμα, τα ιόντα σε συντονισμό με το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο να διαγράφουν τροχιά παράλληλη με τις ράβδους και οδηγούνται στον ανιχνευτή. Το ιόν με ακατάλληλο m/z απορρίπτεται.

Οι τετράπολοι αναλυτές παρουσιάζουν το μεγάλο πλεονέκτημα του απόλυτου έλεγχου της τροχιάς των ιόντων με συνέπεια οι δέσμες αερίων ιόντων να κατευθύνονται με μεγάλη ακρίβεια π.χ. σε μία κυψέλη θραύσης. Μειονέκτημα των τετράπολων αναλυτών αποτελεί το γεγονός ότι δουλεύουν με συνεχή τρόπο κάτι που σημαίνει πως όλη η ανάλυση των ιόντων πρέπει να γίνει μέσα σε συγκεκριμένο χρόνο, π.χ. κατά τη διάρκεια έκλουσης ενός πεπτιδίου από μία χρωματογραφική στήλη (μερικά δευτερόλεπτα δηλαδή).



Εικόνα 3.19: Σχηματική αναπαράσταση τετράπολου αναλυτή ιόντων. Στην εικόνα φαίνεται ο επιτυχής διαχωρισμός δύο ιόντων. Το ιόν σε συντονισμό με το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο διαγράφει τροχιά παράλληλη με τις ράβδους και οδηγείται στον ανιχνευτή. Το ιόν με ακατάλληλο m/z απορρίπτεται.

3.14.2.2 Ανιχνευτής Ιόντων

Για την καταγραφή του φάσματος μαζών το ιοντικό σήμα πρέπει να μετατραπεί σε ηλεκτρικό. Οι συνηθέστεροι τύποι ανιχνευτών είναι:

- η φωτογραφική πλάκα ή ένα κύπελλο Faraday
- ο πολλαπλασιαστής ηλεκτρονίων
- ιοντικός φωτοπολλαπλασιαστής

Για τον υπολογισμό του λόγου M/Z χρησιμοποιείται η εξίσωση:

$$\frac{\boldsymbol{M}}{\boldsymbol{Z}} = \frac{\boldsymbol{M} + \boldsymbol{n}\boldsymbol{H}^{+}}{\boldsymbol{n}}$$

$\boldsymbol{M}$: η μοριακή μάζα του δείγματος

$\boldsymbol{n}$: ο αριθμός των θετικών φορτίων

$\boldsymbol{H^{+}}$: η μάζα του πρωτονίου

Κεφάλαιο 4

Συνθετικοί Πεπτιδικοί Φορείς

4.1 Εισαγωγή

Τις τελευταίες δεκαετίες, η ραγδαία εξέλιξη στην τεχνολογία των πεπτιδίων οδήγησε στην ανάπτυξη και την εφαρμογή συνθετικών πεπτιδικών φορέων, με στόχο την πρόσδεση βιοδραστικών πεπτιδίων, όπως ανοσογόνα/αντιγονικά πεπτίδια, φάρμακα και αντιμικροβιακές ενώσεις. Τέτοια συμπλέγματα, φορέα-πεπτιδίου, αυξάνουν την δραστικότητα, την εξειδίκευση και την στοχευμένη δράση των παραπάνω ενώσεων. Επίσης, προκαλούν ισχυρή ανοσολογική απόκριση όταν συνδέονται με αντιγονικούς επιτόπους, ενισχύοντας την έρευνα ως προς τη χρήση τους για την παρασκευή ισχυρών ανοσογόνων.

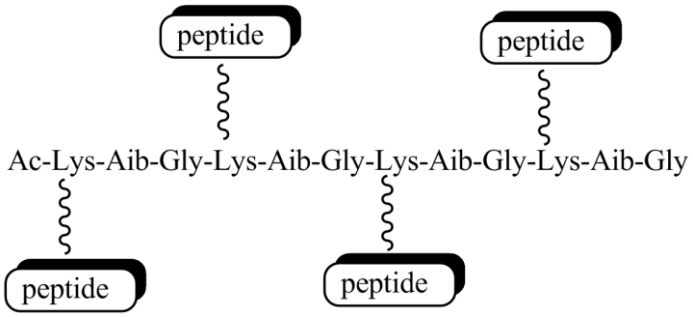
Τα πεπτίδια λόγω του μικρού τους μεγέθους και του χαμηλού μοριακού βάρους δεν αποτελούν αποτελεσματικά ανοσογόνα. Η ανοσογονικότητα τους, ωστόσο, αυξάνεται όταν συνδεθούν με ένα φορέα, όπως π.χ. οι πρωτεΐνες Bovine Serum Albumin (BSA), Keyhole Limpet Haemocyanin (KLH), ή diphtheria toxoid (DT). Ωστόσο, τα συμπλέγματα με πρωτεΐνες παρουσιάζουν αρκετά μειονεκτήματα, όπως, αμφιλεγόμενη σύνθεση και δομή του συμπλέγματος πρωτεΐνης-επιτόπου, αλλαγή της βιολογικά ενεργής διαμόρφωσης των συζευγμένων επιτόπων και παραγωγή μη ειδικής ανοσολογικής απόκρισης, που προέρχεται από την πρωτεΐνη φορέα και όχι από τον επίτοπο.

Με στόχο να αντιμετωπιστούν τα παραπάνω προβλήματα, αναπτύχθηκαν συνθετικοί πεπτιδικοί φορείς, οι οποίοι μπορούν να αντικαταστήσουν τους πρωτεϊνικούς φορείς, με στόχο την κατασκευή ισχυρών ανοσογόνων και τελικά εμβολίων, αλλά και πολλές άλλες εφαρμογές. Οι κυριότεροι τύποι των φορέων αυτών είναι ο Φορέας Πολλαπλών Αντιγονικών Πεπτιδίων (Multiple Antigenic Peptides, MAPs) [1], τα δενδρομερή [2], το μοντέλο TASPs (Template Assembled Synthetic Proteins) [3] και οι Επαναλαμβανόμενοι Ολιγοπεπτιδικοί Φορείς (Sequential Oligopeptide Carriers, SOC_n).

4.2 Επαναλαμβανόμενοι Ολιγοπεπτιδικοί Φορείς (Sequential Oligopeptide Carries, SOC_n)

Ο βασικός στόχος στο σχεδιασμό των φορέων SOC ήταν η δημιουργία μιας προκαθορισμένης τρισδιάστατης δομής, έτσι ώστε τα προσδεμένα πεπτίδια να έχουν ένα καθορισμένο προσανατολισμό στο χώρο. Η κανονικότητα της δευτεροταγούς δομής του φορέα SOC_n, έχει στόχο να επάγει στα αντιγονικά πεπτίδια τη διατήρηση της φυσικής «ενεργής» τους διαμόρφωσης, χωρίς να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους ή με τον φορέα. Επιπλέον, η απουσία διαμορφωτικών περιορισμών και στερεοχημικών παρεμποδίσεων των τελικών συμπλεγμάτων ευνοεί μια βέλτιστη αναγνώριση από το αντίσωμα και προκαλεί ισχυρές ανοσολογικές αποκρίσεις [4,5].

Ο SOC_n-I **(Εικόνα 4.1)** αποτελείται από την επαναλαμβανόμενη τριπλέτα αμινοξέων (-Lys-Aib-Gly-), τα οποία προσδίδουν συγκεκριμένες ιδιότητες στον φορέα. Η λυσίνη, μέσω της αμινομάδας στην παράπλευρη αλυσίδας της, επιτρέπει την πρόσδεση του αντιγονικού πεπτιδίου. Το αμινο-ισοβουτυρικό οξύ (Aib) ευνοεί ιδιαίτερα την επαγωγή ελικοειδούς δομής στον πεπτιδικό σκελετό, λόγω των στερεοχημικών περιορισμών που προκύπτουν από τις δυο μεθυλομάδες στον α-άνθρακα [6, 7]. Επιπλέον, το Aib δεν ανήκει στα φυσικά αμινοξέα, με αποτέλεσμα να αυξάνει την ανθεκτικότητα της πεπτιδικής αλληλουχίας στην οποία περιλαμβάνεται, στην ενζυμική αποικοδόμηση, που αποτελεί συχνό πρόβλημα των πεπτιδίων in vivo. Τέλος, η γλυκίνη επιλέχτηκε για τον μικρό στερεοχημικό όγκο που καταλαμβάνει.



Εικόνα 4.1. Σχηματική παρουσίαση του φορέα SOCn-I.

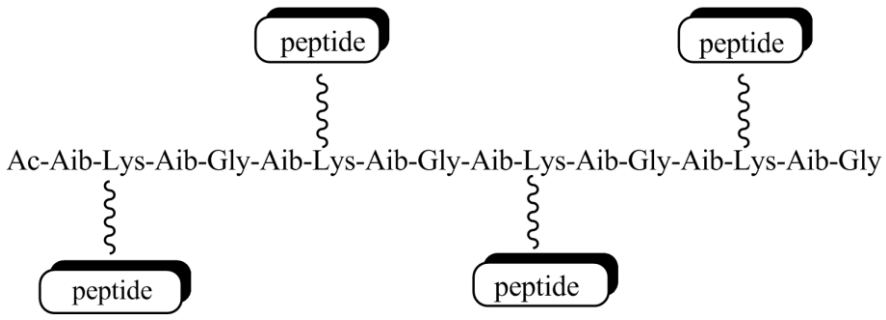
Τα δομικά χαρακτηριστικά του SOC_n-I φορέα προσδιορίστηκαν με ^{1}H NMR και μοριακή δυναμική. Από τα δεδομένα αυτά συμπεραίνουμε ότι ο φορέας υιοθετεί μια

παραμορφωμένη 3_{10}-έλικα με ελαφρώς καμπυλωτό άξονα και κάθε ζεύγος ατόμων του SOC_n-I φορέα να έχει απόκλιση rms, μικρότερη από 1.4 Å, από μια κανονική 3_{10}-έλικα [8]. Η διαμορφωτική ανάλυση του SOC_n-II φορέα με ^{1}H NMR, CD και FTIR πειράματα έδειξε ότι ο φορέας σχηματίζει 3_{10}-έλικα, περίπου ίδιου μήκους με την έλικα του SOC_n-I φορέα.

Τα SOC_n συμπλέγματα υποβλήθηκαν σε ^{1}H NMR φασματοσκοπία με τη βοήθεια COSY, HOHAHA και NOESY πειραμάτων. Διαπιστώθηκε ότι οι φορείς διατηρούν την ελικοειδή δομή τους, ακόμη και μετά την πρόσδεση των αντιγονικών πεπτιδίων. Επίσης, ιδιαίτερα σημαντικό είναι ότι τα προσδεμένα πεπτίδια δεν αντιδρούν μεταξύ τους ή με το φορέα διατηρώντας έτσι τα αρχικά χαρακτηριστικά τους [9].

Επίσης βρέθηκε ότι διατηρείται η «ενεργός» διαμόρφωση του αντιγονικού πεπτιδιού μετά την πρόσδεση του στο φορέα SOC_n και ότι ο φορέας επιβάλλει σε μερικές περιπτώσεις την επικράτηση ενός μόνο διαμορφωμερούς, όπως προκύπτει από διαμορφωτικές μελέτες NMR, επιβεβαιώνοντας με αυτόν τον τρόπο τον αρχικό σχεδιασμό [10].

Ο φορέας SOC-II **(Εικόνα 4.2)**, ο οποίος αποτελείται από την επαναλαμβανόμενη αλληλουχία (-Aib-Lys-Aib-Gly-), συντέθηκε με στόχο την αύξηση της ελικοειδούς δομής σε σχέση με τον φορέα SOC-I, λόγω του δεύτερου καταλοίπου Aib που περιέχει και την μελέτη της επίδρασης της θέσης της λυσίνης κατά μήκος του σκελετού του φορέα, στην οποία είναι συνδεδεμένο το αντιγονικό πεπτίδιο, κατά την αναγνώριση του από το αντίσωμα [11].

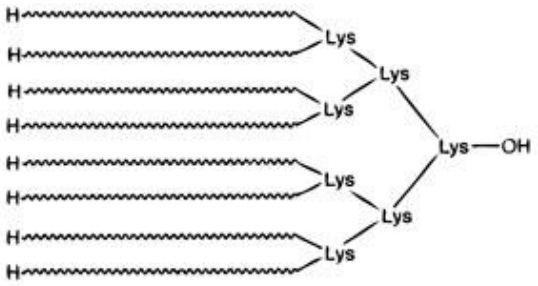


Εικόνα 4.2. Σχηματική παρουσίαση του φορέα SOCn-II.

4.3 Φορέας Πολλαπλών Αντιγονικών Πεπτιδίων (Multiple Antigenic Peptides, MAPs)

Το σύστημα MAPs αποτελεί μια κατηγορία διακλαδισμένων πεπτιδίων **(Εικόνα 4.3)** που έχει ως «μήτρα» διακλαδισμένες Lys σε δύο ή τρία επίπεδα, που στόχο έχουν να εγείρουν ισχυρή ανοσολογική απόκριση και πιθανή εφαρμογή την ανάπτυξη συνθετικών εμβολίων [12].

Το σύστημα MAPs, που εισήχθη από τον Tam παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα στην παραγωγή αντιγονικών πεπτιδίων. Πρώτον, στο σύστημα αυτό, πολλαπλά αντίγραφα του πεπτιδικού αντιγόνου είναι συνδεδεμένα σε μια μονάδα που αποτελείται από μια δομή μικρού αριθμού επαναλαμβανόμενων επιπέδων (n) λυσίνης που αποτελεί τον κεντρικό πυρήνα και προκύπτουν 2^n ελεύθερες αμινομάδες στις οποίες προσδένονται τα αντιγονικά πεπτίδια. Δεύτερον, υπάρχει η δυνατότητα πρόσδεσης διαφορετικών αντιγόνων στο ίδιο μόριο με κατάλληλη ορθογωνική προστασία των α- και ε- αμινομάδων των Lys στο τελευταίο επίπεδο διακλάδωσης. Ένα χαρακτηριστικό μοντέλο MAP αποτελείται από ένα κεντρικό πυρήνα από επτά λυσίνες που οδηγούν σε οχτώ διακλαδώσεις πεπτιδίων.



Εικόνα 4.3. Σχηματική αναπαράσταση MAPs με τρία επίπεδα διακλάδωσης και οκτώ θέσεις πρόσδεσης.

Συστήματα MAP που αποτελούνται από τέσσερα αντίγραφα του κύριου εξουδετερωτικού επιτόπου του ιού HIV-1 εμφάνισαν ενισχυμένη ανοσογονικότητα σε κάποιες περιπτώσεις, υπερτερώντας των συμπλεγμάτων με πρωτεΐνες φορείς (π.χ. KLH). Επίσης, συστήματα MAP έχουν χρησιμοποιηθεί, μεταξύ άλλων, για την ανάπτυξη εμβολίων κατά της ελονοσίας, της ηπατίτιδας Β και του τοξοπλάσματος (Toxoplasma Gondii) [13, 14, 15].

Τα MAP μοντέλα, σε σχέση με τη συμβατική μέθοδο, όπου ένα αντιγονικό πεπτίδιο προσδένεται σε μια πρωτεΐνη φορέα, είναι χημικά και ανοσολογικά συγκεκριμένα, ωστόσο συχνά προκαλούν κατώτερες ανοσολογικές αποκρίσεις. Αυτό το αποτέλεσμα αποδόθηκε στη μη-κανονική δευτεροταγή δομή που πυρήνα της λυσίνης. Λόγω αυτής της τυχαίας διαμορφωτικής ποικιλίας των MAP συστημάτων, παράγεται ένας μεγάλος αριθμός διαμορφωτικών Β-κυτταρικών επιτόπων, οδηγώντας σε μια μη ειδική ανοσολογική απόκριση. Επιπλέον, λόγω στερεοχημικών παρεμποδίσεων των μακρομορίων, ιδιαίτερα όταν υπάρχει μεγάλος αριθμός διακλαδώσεων και μεγάλα αντιγόνα, παρουσιάζονται προβλήματα στην σύνθεση και στον καθαρισμό τους.

4.4 Σύστημα πρόσδεσης πεπτιδίων TASPs (Template - Assembled Synthetic Proteins)

Ο de-novo σχεδιασμός πολυπεπτιδικών αλληλουχιών με κύριους στόχους καταλυτικές κι ανοσολογικές ιδιότητες, παρουσιάζει πολλούς περιορισμούς που προκύπτουν από την αναδίπλωση των πρωτεϊνών. Το γεγονός αυτό μπορεί να αντιμετωπιστεί με την κατασκευή πρωτεϊνών με μη φυσική αρχιτεκτονική δομή αλλά με μια προκαθορισμένη ενδομοριακή αναδίπλωση.

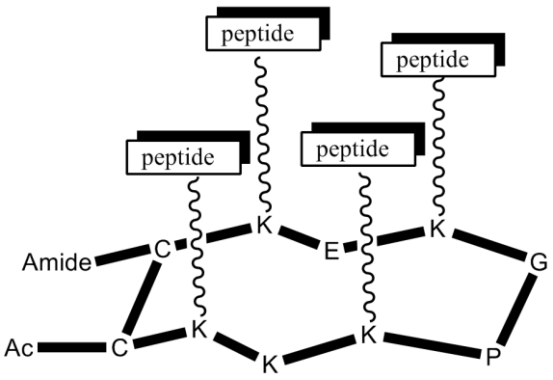
Για το λόγο αυτό, αναπτύχθηκε από τον Mutter et al [16], το σύστημα πρόσδεσης πεπτιδίων TASPs (Template-Assembled Synthetic Proteins), το οποίο βασίζεται στην πρόσδεση πεπτιδίων με προκαθορισμένη τρισδιάστατη δομή σε μια δομική μονάδα. Η χρήση περιορισμένων διαμορφωτικά μορίων ως εκμαγείο προσαρμόζοντας γεωμετρικά το πρώτο αμινοξύ στον σωστό προσανατολισμό για το σχηματισμό έλικας ή β πτυχωτού φύλλου αποτελεί ένα τρόπο για να παρακαμφθούν εντροπικά προβλήματα στο σχηματισμό της δευτεροταγούς δομής.

Στη δομή TASP η πεπτιδικές αλυσίδες προσδένονται σε ένα κυκλικό πεπτιδικό εκμαγείο μέσω της παράπλευρης αμινομάδας της Lys, σχηματίζοντας α-ελικοειδείς δομές. Επίσης, αλληλεπιδρούν ενδομοριακά οδηγώντας σε τέσσερα «πακέτα» α-έλικας, προσομοιάζοντας πρωτεϊνικές δομές.

Κάθε πολυλειτουργικό μόριο με την κατάλληλη διευθέτηση των λειτουργικών του ομάδων μπορεί να δράσει ως εκμαγείο για την κατασκευή μοντέλων TASP (π.χ. κυκλικά πεπτίδια, στερεοχημικά παρεμποδισμένα πεπτίδια, αλειφατικά ή αρωματικά πολυκυκλικά συστήματα). Ένα μοντέλο που χρησιμοποιείται, ως επί το πλείστον, είναι ένα κυκλικό δεκαπεπτιδίο με την επαναλαμβανόμενη αλληλουχία (Pro-Gly-Lys-Ala-Lys). Η δομή του

πεπτιδικού αυτού μοντέλου περιλαμβάνει δύο σκέλη β-πτυχωτών φύλλων (Lys-Ala-Lys) που συνδέονται με δύο β-στροφές με το τμήμα Pro-Gly. Πειράματα μοριακής δυναμικής υποδεικνύουν ότι η επαναλαμβανόμενη κυκλική αλληλουχία (Pro-Gly-Lys-Ala-Lys) παρουσιάζει χαμηλή ενέργεια διαμόρφωσης, με τις τέσσερις παράπλευρες αλυσίδες των Lys να έχουν την ίδια κατεύθυνση και οι ε-αμινομάδες τους, που αποτελούν και το σημείο πρόσδεσης, να έχουν την κατάλληλη απόσταση μεταξύ τους για τον σχηματισμό τέσσερων δομικών «πακέτων» α-έλικας.

Στην βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί μοντέλα TASP με τοπολογία βαβ-, 4α- και 4α/4β, χρησιμοποιώντας κυρίως εκμαγεία με γενική μορφή P-Lys-X-Lys-Pro-Gly-Lys-Y-Lys-Z [P,X,Y,Z = Ac-Lys, Lys, Lys, Lys-R ή Ac, Lys, Glu, NH_2; Ac = acetyl; R = NH-(CH_2-)$_5$CO-NH-CH_2-COOH] [17]. Με στόχο να αυξηθούν οι πιθανές τοπολογικές αναδιπλώσεις έγινε προσπάθεια σύνθεσης μεγαλυτέρων τμημάτων εκμαγείου. Ωστόσο, το μέγεθος που μπορούν να λάβουν υπόκεινται σε περιορισμούς λόγο προβλημάτων που προκύπτουν κατά την πορεία της σύνθεσης και κατά τον καθαρισμό. Στην **Εικόνα 4.4** απεικονίζεται η δομή ενός τέτοιου μοντέλου.



Εικόνα 4.4. Σχηματική αναπαράσταση ενός κυκλικού μοντέλου TASP.

Κεφάλαιο 5

Χημειοεκλεκτική Σύνδεση Πεπτιδίων

5.1 Εισαγωγή

Παρά την εξέλιξη της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση (SPPS), η σύνθεση πολύπλοκων πρωτεϊνικών μορίων παρουσιάζει αρκετές δυσκολίες κυρίως λόγω της χαμηλής απόδοσης του τελικού προϊόντος. Με στόχο, να αντιμετωπιστούν οι δυσκολίες αυτές αναπτύχθηκαν χημικές μέθοδοι παρασκευής πρωτεϊνών και πεπτιδικών τμημάτων με διακλαδισμένη δομή που μπορούν να διακριθούν σε τρείς γενικές κατηγορίες:

- τη βήμα-προς-βήμα σύνθεση σε στερεή φάση
- το σχηματισμό του τελικού προϊόντος μέσω σύνδεσης πλήρως προστατευμένων πεπτιδικών τμημάτων (convergent synthesis)
- το σχηματισμό μακρομορίων μέσω χημειοεκλεκτικής σύνδεσης (chemoselective ligation) απροστάτευτων πεπτιδικών τμημάτων

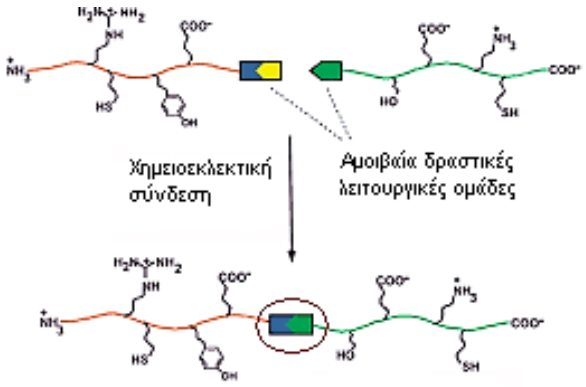
Η χημειοεκλεκτική σύνδεση ακολουθεί δύο στρατηγικές:

- την χημική σύνδεση (Chemical Ligation) όπου σχηματίζεται ένας μη-αμιδικός δεσμός, όπως π.χ. θειοαιθέρας, οξίμη, θειαζολιδίνη
- την φυσική χημική σύνδεση (native chemical ligation, NCL) όπου ένας αμιδικός δεσμός, μέσω μια ενδομοριακής μετάθεσης ακυλίου [1], συνδέει τα επιθυμητά τμήματα

Η χημειοεκλεκτική σύνδεση επιτρέπει την εκλεκτική τροποποίηση πρωτεϊνών και άλλων βιομορίων σε αραιωμένα υδατικά διαλύματα. Είναι σημαντικό οι αντιδράσεις αυτές να πραγματοποιούνται σε σχετικά ουδέτερο pH, που παρατηρείται στα περισσότερα βιολογικά συστήματα, όπως και σε μικρές συγκεντρώσεις και να επιτρέπουν την σύζευξη ανάμεσα σε απροστάτευτα τμήματα δραστικών λειτουργικών ομάδων που συνήθως συναντώνται στα βιολογικά μακρομόρια, όπως πρωτεΐνες, νουκλεοτίδια και υδατάνθρακες.

Πιο συγκεκριμένα, η επίτευξη της χημειοεκλεκτικής σύνδεσης βασίζεται σε αμοιβαία δραστικές λειτουργικές ομάδες, παρουσία και άλλων δραστικών ομάδων που παραμένουν αδρανείς **(Εικόνα 5.1)**. Τα αντιδρώντα πεπτιδικά τμήματα που συντίθεται ανεξάρτητα, έχουν μικρότερο μοριακό βάρος, λαμβάνονται σε σχετικά τελική καλή απόδοση και καθαρότητα, μειώνοντας έτσι τα παραπροϊόντα από το τελικό προϊόν. Επίσης, η απουσία προστατευτικών ομάδων αυξάνει τη διαλυτότητα τους στα υδατικά διαλύματα, όπου συνήθως πραγματοποιείται η αντίδραση.

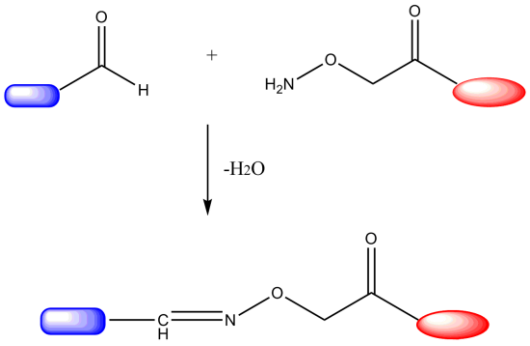
Μελέτες έχουν δείξει ότι πρωτεΐνες και βιομόρια που παράγονται με τη μέθοδο αυτή διατηρούν τη δομή τους και τη δραστικότητα τους [2, 3 ,4].



Εικόνα 5.1. Χημειοεκλεκτική σύνδεση δύο απροστάτευτων πεπτιδικών τμημάτων

5.2 Δεσμός οξίμης

Ο δεσμός οξίμης (-CH=N-O-) σχηματίζεται μεταξύ μιας καρβονυλικής ομάδας, αλδεΰδης ή κετόνης και ενός παράγωγου υδροξυλαμίνης, συνήθως μιας αμινοοξυακετυλιωμένης ομάδας (NH_2-O-CH_2CO-) **(Εικόνα 5.2)**.



Εικόνα 5.2. Σχηματισμός δεσμού οξίμης.

Όταν οι παραπάνω δραστικές λειτουργικές ομάδες εισαχθούν κατάλληλα σε δυο πεπτιδικά τμήματα, τότε η μεταξύ τους αντίδραση οδηγεί στη χημειοεκλεκτική σύνδεση των πεπτιδικών τμημάτων μέσω ενός δεσμού οξίμης. Η αντίδραση οξίμης πραγματοποιείται ταχύτατα και εκλεκτικά σε υδατικό διάλυμα [4]. Με την χημειοεκλεκτική σύνδεση μέσω δεσμού οξίμης, επομένως, λαμβάνουμε σχετικά εύκολα,

γρήγορα και σε ικανοποιητική απόδοση διακλαδισμένα μακρομόρια που φέρουν έναν ή περισσότερους δεσμούς οξίμης.

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε ελαφρώς όξινο (pH 4.0-5.0) έως και αρκετά όξινο (pH 2.0-3.0) υδατικό διάλυμα. Στις συνθήκες αυτές οι δραστικές αμινομάδες που πιθανώς υπάρχουν στα αντιδρώντα τμήματα και μπορούν να δράσουν σαν πυρηνόφιλα και να συναγωνιστούν την αμινοόξυ-ομάδα, παραμένουν ισχυρά πρωτονιωμένες και επομένως μη δραστικές. Επομένως, οι ομάδες αυτές δεν πρόκειται να αντιδράσουν με την αλδεϋδομάδα. Αντίθετα, στις συνθήκες αυτές η ασθενώς βασική, αμινοόξυ-ομάδα, παραμένει μη πρωτονιωμένη και δρα σαν πυρηνόφιλο για την ηλεκτρονιόφιλη αλδεϋδομάδα [5]. Ουσιαστικά, το γειτονικό άτομο οξυγόνου, που έλκει ηλεκτρόνια καθιστά το άτομο αζώτου της αμινοόξυ-ομάδας περισσότερο πυρηνόφιλο από μία αμινομάδα. Η πρωτονίωση των ομάδων αυτών εξυπηρετεί ιδιαίτερα την διαλυτοποίηση των πεπτιδίων.

Ο χρόνος που απαιτείται για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση οξίμης επηρεάζεται από το μέγεθος και την πολυπλοκότητα των αντιδρώντων τμημάτων. Σε περίπλοκες περιπτώσεις (δυσδιάλυτα πεπτίδια) η χρήση οργανικών συνδιαλυτών (π.χ. CH_3CN, DMSO) μαζί με το ρυθμιστικό διάλυμα μπορεί να επιταχύνει (37 ^{0}C) την αντίδραση. Επιπλέον, η ρύθμιση του pH του διαλύματος και η θέρμανση κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, βελτιώνουν την απόδοση της αντίδρασης.

5.2.1 Στερεοχημεία δεσμού οξίμης

Ο δεσμός οξίμης ανάμεσα στο άτομο άνθρακα και αζώτου λόγω της σχετικής ακαμψίας που εμφανίζει, υφίσταται σε δύο διακριτές γεωμετρικά ισομερείς μορφές, το E (ή anti-) ισομερές και το Z (ή syn-) ισομερές **(Εικόνα 5.3)**. Σε στερεή κατάσταση και οι δύο μορφές είναι διακριτές και παρουσιάζουν μεγάλη διαμορφωτική σταθερότητα. Σε διάλυμα η ισορροπία ανάμεσα στις δυο ισομερείς μορφές αποκαθίσταται ταχύτατα, ευνοώντας την επικράτηση της σταθερότερης θερμοδυναμικά μορφής.

E- (anti-) Z- (syn-)

Εικόνα 5.3. Ισομερείς μορφές του δεσμού οξίμης.

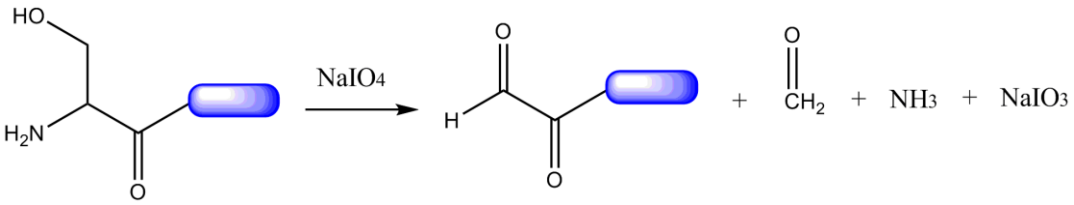
Η αντίδραση σχηματισμού οξίμης πιθανότατα δεν εμφανίζει στερεοειδικότητα αλλά εξαρτάται από τις συνθήκες τις αντιδράσεις. Η επικράτηση του ενός ισομερούς επηρεάζεται από το είδος των υποκατατατών. Στην περίπτωση ογκωδών υποκατάστατων συνήθως υπερισχύει το E- ή anti-ισομερές. Ειδικά στην περίπτωση αντιδράσεων που περιέχουν μεθυλοξίμες λαμβάνεται μίγμα ισομερών, γεγονός που αποδεικνύεται από την ύπαρξη δυο γειτονικών κορυφών που αντιστοιχούν στο ίδιο μοριακό βάρος. Με βάση τη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί και οι δυο ισομερείς μορφές σε αντιδράσεις σύζευξης μεταξύ σακχαριτών και αμινοξυακέτυλο πεπτιδίων [6], όπως και στις αντιδράσεις στεροειδών με αμινοξυαλκυλαμίνες [7]. Οι διαφορετικές ισομερείς μορφές πιθανώς να διαφοροποιούν τις ιδιότητες του τελικού προϊόντος.

5.2.2 Σταθερότητα του δεσμού οξίμης

Ο δεσμός οξίμης είναι σταθερός σε ένα μεγάλο εύρος τιμών pH, σε πολύ ακραίες όμως βασικές συνθήκες, όπως σε υψηλές τιμές pH (>9) μπορεί να υδρολυθεί. Σε φυσιολογικό pH παραμένει σταθερός αλλά η ταχύτητα της αντίδρασης περιορίζεται σημαντικά. Επίσης, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία λαμβάνονται καλά αποτελέσματα ακόμα και σε αρκέτα χαμηλές τιμές pH, έως την τιμή 2,1 [8].

5.2.3 Εισαγωγή της καρβονυλομάδας – Σχηματισμός αλδεϋδών σε πεπτίδια

Ένα σημαντικό βήμα στην χημειοεκλεκτική σύνδεση είναι η προετοιμασία των αντιδρώντων τμημάτων με τις κατάλληλες δραστικές λειτουργικές ομάδες. Η καρβονυλομάδα που απαιτείται για τον σχηματισμό δεσμού οξίμης, προέρχεται συνήθως από μια αλδεΰδη. Η αλδεΰδη επιλέγεται κυρίως για την ευκολία εισαγωγής της σε μια πεπτιδική αλυσίδα ύστερα από την οξείδωση καταλοίπων Ser ή Thr. Η οξείδωση της 2-αμινο-αλκοολικής ομάδας των καταλοίπων αυτών πραγματοποιείται από το υπεριωδικό ανιόν και οδηγεί στον σχηματισμό της επιθυμητής αλδεϋδικής ομάδας **(Εικόνα 5.4)** [9, 10].



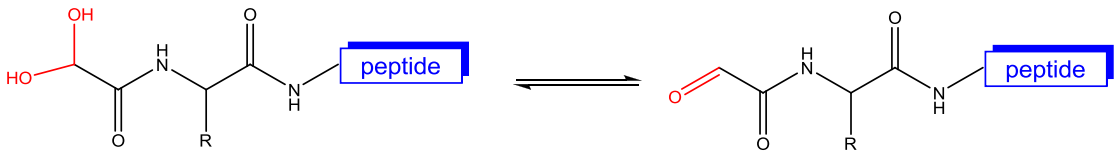
Εικόνα 5.4. Αντίδραση οξείδωσης της 2-αμινο-αλκοολικής ομάδας της Ser από το υπεριωδικό νάτριο.

Η 2-αμινο-αλκοολική ομάδα, στην όποια επιδρά το υπεριωδικό ανιόν, προκύπτει σε ένα πεπτίδιο όταν η Ser ή Thr βρίσκονται στο N- τελικό άκρο του πεπτιδίου ή όταν τα αμινοξέα αυτά, είναι συνδεδεμένα στην παράπλευρη αλυσίδας μιας Lys, η οποία μπορεί να βρίσκεται σε οποιαδήποτε θέση στην αλληλουχία του πεπτιδίου, με επικρατέστερη, ωστόσο, το C-τελικό άκρο της πεπτιδικής αλληλουχίας. Η δεύτερη περίπτωση διευκολύνει ιδιαίτερα τη σύνθεση διακλαδισμένων πεπτιδίων.

Η οξείδωση της 2-αμινο-αλκοολικής ομάδας από το υπεριωδικό ανιόν είναι μια πολύ γρήγορη και εκλεκτική αντίδραση, ωστόσο υπάρχουν και άλλες παράπλευρες ομάδες που δυνητικά μπορούν να οξειδωθούν. Από τα πιο ευαίσθητα στην οξείδωση αμινοξέα (Tyr, Trp, His, Met, Cys) η Cys είναι σχεδόν βέβαιο ότι οξειδώνεται ταχύτατα και για αυτό θα ήταν προτιμότερο να μην συμμετέχει στην πεπτιδική αλληλουχία. Ο θειοαιθέρας της Met οξειδώνεται, επίσης, από το υπεριωδικό ανιόν, προς το αντίστοιχο σουλφοξείδιο, η οξείδωση όμως περιορίζεται σε ήπιες συνθήκες οξείδωσης. Σε ουδέτερο pH και χρησιμοποιώντας πολύ μικρή μοριακή αναλογία (<2) υπεριωδικού : πεπτιδίου, ο σχηματισμός σουλφοξειδίου είναι περίπου 40 φορές πιο αργός από την οξείδωση της Ser ή της Thr. Επομένως, παρότι δεν μπορεί να αποκλειστεί, η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε πολύ μικρό βαθμό [9, 11]. Τα υπόλοιπα ευαίσθητα, στην οξείδωση, αμινοξέα (Tyr, Trp, His) δεν υφίστανται αξιόλογη επίδραση από το υπεριωδικό, με αποτέλεσμα η παρουσία τους στην πεπτιδική αλληλουχία να μην δημιουργεί προβλήματα.

Η αντίδραση οξείδωσης πραγματοποιείται σε ουδέτερο pH, συνήθως σε ρυθμιστικό διάλυμα ιμιδαζολίου-HCl pH 6,9. Το $NaIO_4$ χρησιμοποιείται σε διπλάσια περίσσεια η σε περίσσεια κατά 1.2 έναντι του πεπτιδίου ως προς κάθε 2-αμινο-αλκοολική ομάδα, ενώ η αντίδραση ολοκληρώνεται μέσα σε λίγα λεπτά (1-10). Μετά το πέρας του χρόνου, προστίθεται διάλυμα αιθυλενογλυκόλης για τη δέσμευση της περίσσειας του $NaIO_4$ [11, 12].

Η απομόνωση του επιθυμητού οξειδωμένου πεπτιδίου πραγματοποιείται με ημι-παρασκευαστική RP-HPLC και ανιχνεύεται ως μια κορυφή. Ωστόσο, το προϊόν της μοναδικής κορυφής κατά την ταυτοποίηση με φασματομετρία μάζας, εμφανίζει δύο κορυφές, μία που αντιστοιχεί στο επιθυμητό πεπτίδιο και μία που διαφέρει κατά +18Da από αυτό. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στην ισορροπία μεταξύ της αλδεΰδης και της ένυδρης μορφής της, μιας διόλης **(Εικόνα 5.5)** [9, 13].



Εικόνα 5.5. Συντονισμός μεταξύ της άνυδρης και ένυδρης μορφής της αλδεΰδης.

5.2.4 Εισαγωγή της αμινοοξυακετυλομάδας

Η αμινοοξυακετυλομάδα (NH_2-O-CH_2CO-) εισάγεται σε ένα πεπτίδιο με τρόπο παρόμοιο με την εισαγωγή των προστατευμένων αμινοξέων, με βάση της αρχές της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση.

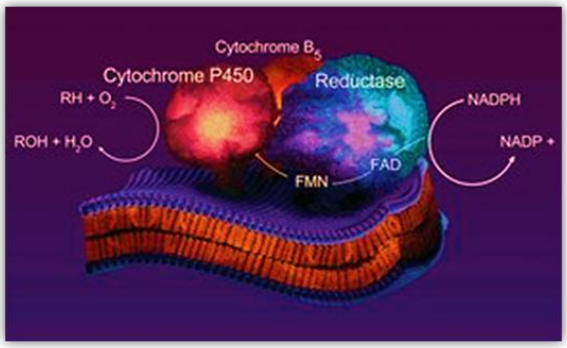
Συνήθως, χρησιμοποιείται το παράγωγο Boc- προστατευμένο αμινοόξυ-οξικό οξύ (Boc-$NHOCH_2COOH$ ή Boc-Aoa-OH) σε συνδυασμό με DIC/HOBt για την ενεργοποίηση του καρβοξυλίου [14]. Με τον τρόπο αυτό, επιτυγχάνεται η εισαγωγή της αμινοξυακετυλομάδας είτε στο N-τελικό άκρο του πεπτιδίου είτε στην παράπλευρη αλυσίδα μιας λυσίνης.

Η χρήση του Boc-Aoa-OH είναι συμβατή τόσο με την Fmoc/tBu όσο και με την Boc/Bzl μεθοδολογία πεπτιδικής σύνθεσης. Η απομάκρυνση της Boc- προστατευτικής ομάδας πραγματοποιείται κατά την αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη με διάλυμα TFA ή HF, αντίστοιχα. Η αμινοοξυακετυλομάδα που ελευθερώνεται αντιδρά γρήγορα και εκλεκτικά με την καρβονυλική ομάδα αλδεϋδών ή κετονών προς σχηματισμό δεσμού οξίμης. Η αντίδραση αυτή είναι πολύ ευαίσθητη και για το λόγο αυτό πρέπει να δίνεται μεγάλη προσοχή για την αποφυγή ανεπιθύμητων αντιδράσεων με ίχνη αλδεϋδών ή κετονών που απαντώνται στους διαλύτες, στα εργαστηριακά σκεύη ή που συνυπάρχουν ως παραπροϊόντα κατά τη σύνθεση των αλδεϋδικών πεπτιδικών τμημάτων [15].

5.3 Ενζυμική διάσπαση του δεσμού οξίμης στην χημειοεκλεκτική σύνδεση

Ο δεσμός οξίμης αποτελεί ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο στην στοχευμένη μεταφορά βιοδραστικών μορίων και την αποτελεσματική δράση τους στον οργανισμό. Η πρόσδεση του δραστικού συστατικού σε ένα φορέα ή σε ένα μόριο που το κατευθύνει στο σημείο-στόχο (target moiety), μέσω του δεσμού οξίμης αυξάνει την ανθεκτικότητα κατά τη μεταφορά του στον οργανισμό, αφού δεν διασπάται στην κυκλοφορία του αίματος ή στο πεπτικό σύστημα. Ωστόσο, ο ιδανικός δεσμός ανάμεσα στα δύο μόρια οφείλει να είναι ευαίσθητος σε όξινο pH και στην ενζυμική διάσπαση, ώστε είτε να απελευθερώνει το δραστικό μόριο, είτε να προκαλεί την αναγέννηση της δραστική του μορφής, είτε να οδηγεί στο σχηματισμό ενός ενεργού μεταβολίτη [17].

Από πολλές έρευνες έχει αποδειχθεί η αναγωγή παράγωγων οξίμης στα αντίστοιχα παράγωγα ιμίνης μέσω του ενζυμικού συστήματος των μικροσωματίων χοιρινού συκωτιού που αποτελείται από NADH κυτοχρωμική b5-ρεδουκτάση, κυτόχρωμα b5 και ένα ισοένζυμο του κυτοχρώματος P450 υποοικογένειας 2D (CYP2D) [18, 19, 20] **(Εικόνα 5.6)**. Στην ερευνητική εργασία των Heberling, et al [19] μελετήθηκε η δράση των μικροσωματίων από συκώτι χοίρου, που περιέχουν ολόκληρο το παραπάνω ενζυμικό σύστημα (i), η δράση του συστήματος χωρίς NADH (ii) και του καθαρισμένου ανασυσταθέντος ενζυμικού συστήματος με διαφορετικές ποσότητες κυτοχρώματος b5 (iii). Έγινε επίσης, σύγκριση της αναγωγικής δράσης του κυτοσολίου με τα μικροσωμάτια.



Εικόνα 5.6. Σχηματική απεικόνιση του ενζυμικού συστήματος b5-ρεδουκτάση, κυτοχρώματος b5 και κυτοχρώματος P450 ισοενζύμου CYP2D.

Τα μικροσωμάτια είναι μικροσκοπικά σφαιρικά κυστίδια που προκύπτουν από το ενδοπλασματικό δίκτυο (κυρίως το λείο) του συκωτιού και άλλων ιστών, μετά από τη

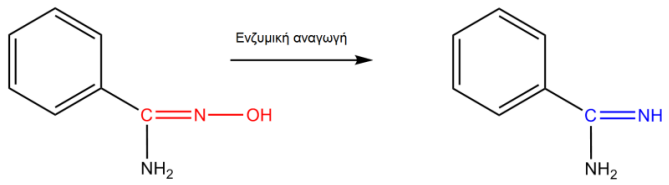
διάσπαση των κυττάρων, με φυγοκέντρηση, τα ένζυμα που περιέχονται σε αυτά καλούνται μικροσωμιακά ένζυμα και καταλύουν μεγάλο αριθμό οξειδωτικών, αναγωγικών και υδρολυτικών αντιδράσεων.

Πίνακας 5.1. In vitro αναγωγή της βενζαμιδοξίμης σε βενζαμιδίνης από τα μικροσωμάτια και το κυτοσόλιο του χοιρινού συκωτιού και από καθαρισμένο ανασυσταθέν ενζυμικό σύστημα [19].

Επεξεργασία του χοιρινού συκωτιού	Σύσταση	Βενζαμιδοξίμη → Βενζαμιδίνη (nmol μεταβολίτη /min/mg πρωτεΐνης)	Αριθμός Προσδιορισμών
Μικροσωμάτια	Ολοκληρωμένο ενζυμικό σύστημα	7.13 ± 0.08	4
	Χωρίς NADH	Δεν ανιχνεύτηκε	4
Κυτοσόλιο	Ολοκληρωμένο ενζυμικό σύστηνμα	Δεν ανιχνεύτηκε	4
Καθαρισμένο Ενζυμικό Σύστημα	Ολοκληρωμένο ενζυμικό σύστημα **(I)** (26.4 nmol κυτοχρώματος b5/ mg πρωτεΐνης)	9.24 ± 0.73	4
	Χωρίς ρεδουκτάση b5	0.57 ± 0.17	4
	Κυτόχρωμα b5	0.05 ± 0.03	4
	CYP2D	0.42 ± 0.13	4
	Ολοκληρωμένο ενζυμικό σύστημα **(II)** (38.9 nmol κυτοχρώματος b5/ mg πρωτεΐνης)	19.2 ± 2.0	4
	Χωρίς ρεδουκτάση b5	1.66 ± 0.25	4
	Κυτόχρωμα b5	Δεν ανιχνεύτηκε	4
	CYP2D	1.19 ± 0.09	4

Από τον **Πίνακα 5.1** διαπιστώνουμε ότι τα μικροσωμάτια που απομονώθηκαν από το χοιρινό συκώτι είναι ικανά να προκαλέσουν αναγωγή της οξίμης σε ιμίνη μέσω του ενζυμικού συστήματος που περιέχεται σε αυτά **(Εικόνα 5.7)**. Επίσης, παρατηρείται ότι η παρουσία του συνενζύμου NADH είναι απαραίτητη για την αναγωγή. Τέλος, από τα

αποτελέσματα που πρόεκυψαν από τη χρήση του καθαρισμένου ανασυσταθέντος ενζυμικού συστήματος, συμπεραίνουμε ότι η παρουσία και των τριών συστατικών, κυτοχρωμικής b5-ρεδουκτάσης, κυτοχρώματος b5 και του CYP2D, είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική αναγωγική δράση του ενζυμικού συστήματος.



Εικόνα 5.7. Ενζυμική αναγωγή της βενζαμιδοξίμης σε βενζαμιδίνη.

Η ενζυμική διάσπαση του δεσμού οξίμης μπορεί να αποδειχθεί σημαντική ιδιαίτερα κατά την ενδοκυττάρια μεταφορά και απελευθέρωση φαρμάκων ή βιομορίων. Η σύζευξη των δραστικών ουσιών σε πεπτιδικά μόρια με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά (διαμόρφωση, δράση) αυξάνει την αποτελεσματικότητα τους. Τα συμπλέγματα δεσμού οξίμης παρουσιάζουν σταθερότητα κατά την εξωκυττάρια μεταφορά στον οργανισμό, αυξάνουν την εκλεκτικότητα ως προς τον τελικό στόχο και κατά την αναγωγική διάσπαση του δεσμού από το ενζυμικό σύστημα των μικροσωματίων επιτρέπουν την απελευθέρωση της δραστικής ουσίας στα κύτταρα στόχους [17, 21].

Κεφάλαιο 6

Σκοπός της Εργασίας

Τριάντα τέσσερα χρόνια έχουν περάσει από την αναγνώριση του συνδρόμου της επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS) και ο απολογισμός της επιδημίας είναι περίπου 78 εκατομμύρια άνθρωποι μολυσμένοι από τον ιό HIV και περίπου 39 εκατομμύρια νεκροί, αριθμοί που καθιστούν τον HIV ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα δημόσιας υγείας παγκοσμίως. Ο ιός HIV που είναι και ο αιτιολογικός παράγοντας για το AIDS, προκαλεί σταδιακή μείωση των $CD4^+$ T λεμφοκυττάρων που οδηγεί σε δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και καθιστά τον ασθενή ευάλωτο σε ευκαιριακές μολύνσεις και ογκογένεση. Η υπάρχουσα αντιρετροϊκή θεραπεία έχει μειώσει σημαντικά την θνησιμότητα σε παγκόσμιο επίπεδο αλλά η εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών του ιού και η υψηλή τοξικότητα αποτελούν σημαντικά εμπόδια για την επιτυχημένη καταπολέμηση της μόλυνσης, καθιστώντας την ανάπτυξη εμβολίου κατά του ιού την αποτελεσματικότερη λύση για την αντιμετώπιση και την πρόληψη της μόλυνσης από τον HIV.

Βασικός στόχος στην προσπάθεια ανάπτυξης εμβολίου κατά του HIV-1 είναι η επαγωγή ισχυρών εξουδετερωτικών αντισωμάτων (bnAbs) εναντίον του ιού. Ωστόσο, παρά την ταυτοποίηση μεγάλου αριθμού επιτόπων ικανών να προκαλέσουν την παραγωγή bnAbs σε ορούς ασθενών, οι επίτοποι αυτοί, μέχρι στιγμής έχουν αποτύχει να επάγουν τέτοια αντισώματα μετά από εμβολιασμό in vivo. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην προσπάθεια αναζήτησης επιτόπων ικανών να επάγουν ισχυρά εξουδετερωτικά αντισώματα, αποτελεί μια ομάδα ασθενών που εμφανίζουν καθυστέρηση στην εξέλιξη της ασθένειας, επιτρέποντας έτσι την επαρκή ωρίμανση της συγγένειας μεταξύ αντιγόνου-αντισώματος και ονομάζονται elite controllers (ECs). Η ανίχνευση επιτόπων που αναγνωρίζονται από αντισώματα που έχουν αναπτυχθεί στο πλάσμα των ECs θα συμβάλει καθοριστικά στην ανάπτυξη ισχυρών ανοσογόνων.

Η παρούσα εργασία με στόχο την ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού εμβολίου που επιτυγχάνει την παρεμπόδιση της εξέλιξης της νόσου του AIDS και κυρίως στην πρόληψη της μόλυνσης από τον ιό HIV πραγματεύεται τη σύνθεση πεπτιδικών επιτόπων της γλυκοπρωτεΐνης 41 του φακέλου του HIV-1, συζευγμένων με τον φορέα SOC και τη μελέτη της ανοσολογικής απόκρισης που αυτοί επάγουν.

Για το σκοπό αυτό παρασκευάσθηκαν και μελετήθηκαν:

- Πεπτιδικοί επίτοποι που προσδιορίστηκαν με τη χρήση της τεχνολογίας παρουσίασης στην επιφάνεια φάγων (phage display technology). Συγκεκριμένα, μέσα από μια βιβλιοθήκη φάγων που στην επιφάνεια τους παρουσίαζαν τμήματα των πρωτεϊνών του φακέλου του HIV-1, μετά από τη διαδικασία διαλογής (biopanning) με τον ορό ασθενούς

EC και συγκεκριμένα του EC26, ο οποίος είχε την ισχυρότερη εξουδετερωτική δράση στα πειράματα που διεξήχθησαν, επελέγησαν και συντέθηκαν επίτοποι που ανήκουν στην γλυκοπρωτεΐνη gp41. Στην αλληλουχία που αντιστοιχεί στους επιτόπους προστέθηκε μια λυσίνη, στην παράπλευρη της οποίας προστέθηκε μια σερίνη:

- **EC26-2A4-EW: EQELLELDKWK(S)**
- **EC26-2A4-NK: NEQELLELDKK(S)**
- **EC26-2A4: IEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWFDK(S)**

➧ Ακολούθησε οξείδωση της παράπλευρης 2-άμινο-αλκοολικής ομάδας της σερίνης, ώστε να προκύψει η αλδεϋδική ομάδα απαραίτητη για την χημειοεκλεκτική σύνδεση με τον φορέα:

- **H-EQELLELDKWK(COCHO)-NH_2**
- **H-NEQELLELDKK(COCHO)-NH_2**
- **H-IEESQNQQEKNEQELLELDKWKASLWNWFDK(COCHO)-NH_2**

➧ Οι επίτοποι αυτοί, προσδέθηκαν στον Επαναλαμβανόμενο Ολιγοπεπτιδικό Φορέα (Sequential Oligopeptide Carrier, SOC_4) με χημειοεκλεκτική σύνδεση μέσω σχηματισμού δεσμού οξίμης με σκοπό να προκληθεί ισχυρή και ανοσολογική απόκριση. Τα SOC_4-συμπλέγματα που προέκυψαν είναι τα εξής:

- **SOC4-EC26-2A4-EW: Ac-SOC_4-[EQELLELDKWK(CH=N-O)]$_4$-NH_2**
- **SOC4-EC26-2A4-NK: Ac-SOC_4-[NEQELLELDKK(CH=N-O)]$_4$-NH_2**
- **SOC4-EC26-2A4: Ac-SOC_4{Ac_2,[IEESQNQQEKNEQELLELDKWK ASLWNWFDK(CH=N-O)]$_2$}-NH_2**

➧ Για την ανοσολογική μελέτη των παραπάνω SOC_4-συμπλέγματων πραγματοποιήθηκαν πειράματα ELISA, ώστε να διερευνηθεί η δραστικότητα τους με τα αντισώματα του ορού EC26 και στη συνέχεια με τους ορούς ασθενών που είναι θετικοί στον HIV-1. Επίσης, μελετήθηκε η δραστικότητα τους με το μονοκλωνικό αντίσωμα 2F5, που αποδεδειγμένα εμφανίζει ισχυρή εξουδετερωτική δράση, με σκοπό να διαπιστωθεί η

ικανότητα των SOC_4-συμπλεγμάτων να δρουν ως ανοσογόνα παρουσιάζοντας ειδική δέσμευση με αντισώματα του ορού ασθενών και με το εξουδετερωτικό mAb 2F5.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε, επιπλέον, η ενζυμική αναγωγή του δεσμού οξίμης στην χημειοεκλεκτική σύνδεση από τα μικροσωμάτια χοιρινού συκωτιού, με πιθανή εφαρμογή την ενδοκυττάρια μεταφορά και απελεύθερωση βιομορίων.

Ο δεσμός οξίμης αποτελεί ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο για την στοχευμένη μεταφορά βιοδραστικών μορίων και την αποτελεσματικότερη δράση τους στον οργανισμό. Η πρόσδεση του δραστικού συστατικού σε ένα φορέα ή σε ένα μόριο που το κατευθύνει στο σημείο-στόχο, μέσω του δεσμού οξίμης αυξάνει την ανθεκτικότητα κατά τη μεταφορά στον οργανισμό, αφού δεν διασπάται στην κυκλοφορία του αίματος ή στο πεπτικό σύστημα. Ένα παράδειγμα πιθανής εφαρμογής τέτοιων συμπλεγμάτων αποτελούν συμπλέγματα που μεταφέρουν κυτταροτοξικούς παράγοντες συνδεδεμένα σε μόρια που αναγνωρίζουν εξειδικευμένα τα καρκινικά κύτταρα, απελευθερώνοντας τις τοξικές ουσίες στο εσωτερικό τους.

Η ενζυμική διάσπαση του δεσμού οξίμης, που ενώνει το προς μεταφορά μόριο με τον φορέα, αποδεικνύεται ιδιαίτερα σημαντική για ενδοκυττάρια απελευθέρωση φαρμάκων ή βιομορίων. Η σύζευξη των δραστικών ουσιών σε πεπτιδικά μόρια (φορείς) με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά (διαμόρφωση, δράση) αυξάνει την αποτελεσματικότητα τους και κατά την αναγωγή του δεσμού οξίμης από το ενζυμικό σύστημα των μικροσωματίων επιτρέπουν την απελευθέρωση της δραστικής ουσίας στα κύτταρα στόχους.

- Με σκοπό να μελετηθεί η ενζυμική αναγωγή του δεσμού οξίμης με τη χρήση μικροσωματίων, συντέθηκε και μελετήθηκε το τριπεπτίδιο Lys-Ala-Arg-NH_2 το οποίο προσδέθηκε στο φορέα SOC_4, ως ένα απλοποιημένο μοντέλο για τη μελέτη μας, με στόχο να προσδιορισθούν οι βέλτιστες αναγωγικές συνθήκες του πολυενζυμικού συστήματο. Η παρακολούθηση της αναγωγικής διάσπασης του δεσμού πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της τεχνικής ESI-MS.

Πειραματικό Μέρος

Κεφάλαιο 7

Σύνθεση των επιτόπων της gp41

7.1 Εισαγωγή

Στην παρούσα εργασία συντέθηκαν και προσδιορίστηκαν τα παρακάτω πεπτιδικά παράγωγα:

Οι επίτοποι της gp41, όπου στο καρβοξυ - τελικό άκρο κάθε επιτόπου προστέθηκε μία λυσίνη και στην παράπλευρη ομάδα της, μία σερίνη :

1. **EC26-2A4-EW: H-EQELLELDKWK(S)-NH_2**
2. **EC26-2A4-NK: H-NEQELLELDKK(S)-NH_2**
3. **EC26-2A4: H-IEESQNQQEKNEQELLELDKWKASLWNWFDK(S)-NH_2**

Το τριπεπτίδιο Lys-Ala-Arg-NH_2 ως πεπτιδικό μοντέλο για την μελέτη της ενζυμικής διάσπασης, όπου στην παράπλευρη ομάδα της λυσίνης προστέθηκε μια σερίνη:

4. **Ac-Lys(Ser)-Ala-Arg-NH_2**

Η σύνθεση των πεπτιδικών παραγώγων πραγματοποιήθηκε βήμα προς βήμα σύμφωνα με τις αρχές τις πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση κατά Merrifield ακολουθώντας την Fmoc/tBu στρατηγική. Ως πολυμερικό υπόστρωμα όλων των παραγώγων χρησιμοποιήθηκε η Rink Amide AM ρητίνη, επιλέγοντας την υποκατάσταση της, ανάλογα με το μοριακό βάρος των συντιθέμενων πεπτιδίων. Για να επιτευχθεί η σύνδεση των πεπτιδίων με το φορέα, οξειδώθηκαν προς σχηματισμό αλδεϋδικών παραγώγων και ακολούθησε χημειοεκλεκτική σύνδεση, μέσω οξίμης υπό κατάλληλες συνθήκες.

Ο καθαρισμός των πεπτιδίων, η ταυτοποίηση και ο έλεγχος της καθαρότητας πραγματοποιήθηκε με τις εξής τεχνικές:

- **Ημιπαρασκευαστική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης** (Semi preparative High Performance Liquid Chromatography – Reversed Phase, RP-HPLC), Shimadzu LC-10AD VP, SCL-10A VP, σε στήλη Discovery C18 25cm × 3mm, 5μm (SUPELCO) με ανιχνευτή UV/Vis (Shimadzu SPD-10A VP)
- **Αναλυτική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης** (Analytical High Performance Liquid Chromatography – Reversed Phase, RP-HPLC), Shimadzu LC-10AD VP, SCL-10A VP, σε στήλη Discovery C18 25cm × 3mm, 5μm (SUPELCO) με ανιχνευτή UV/Vis (Shimadzu SPD-10A VP)
- **Φασματομετρία Μάζας Electrospray Ionization (ESI-MS)** Micromass Platform LC Quandrupole

7.2 Πεπτιδική σύνθεση

7.2.1 Αντιδραστήρια

Ρητίνη

Το πολυμερικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε κατά την πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση ήταν η 4-[2΄, 4΄-διμεθοξυ-φανυλ-(9-φλουορενυλμεθοξυκαρβονυλ)-αμινομεθυλ]-φαινοξυ ακεταμιδο-νορλευκιλαμινομεθυλ-ρητίνη (Rink Amide AM ρητίνη). Κατά την αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη αυτή, προκύπτει αμίδιο στο C-τελικό άκρο της κάθε πεπτιδικής αλληλουχίας.

Διαλύτες

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στην πεπτιδική σύνθεση και τον καθαρισμό των πεπτιδίων είναι οι εξής:

1. Διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF)
2. Διχλωρομεθάνιο (DCM)
3. Διμεθυλοφορμαμίδιο σε molecular sieves, DMF/molecular sieves. Το DMF αποσυντίθεται σε θερμοκρασία δωματίου, απελευθερώνοντας διμεθυλαμίνη και μονοξείδιο του άνθρακα. Η διμεθυλαμίνη παρεμποδίζει τον ποιοτικό έλεγχο σύζευξης (Test Kaizer) και για το λόγο αυτό το DMF αποθηκεύεται υπεράνω molecular sieve 4Å, ώστε να δεσμευτούν τα παραπροϊόντα
4. Διάλυμα πιπεριδίνης σε DMF, 20% πιπεριδίνη/ DMF για την αποπροστασία της Fmoc-ομάδας
5. Διϊσοπροπυλοαιθυλαμίνη, DIEA
6. Διάλυμα οξικού ανυδρίτη (Ac_2O) και πυριδίνης, για την ακετυλίωση των ελεύθερων αμινομάδων
7. Μεθανόλη (MeOH)
8. Διάλυμα τριφθοροξικού οξέος (TFA) σε νερό και τριϊσοπροπυλοσιλάνιο (TIS), TFA/H_2O/TIS, για την αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη και τις παράπλευρες προστατευτικές ομάδες.
9. Μίγμα εξανίου-νερού 1:1, για ταχύτερη απομάκρυνση του TFA κατά την διαδικασία συμπύκνωσης

10. Διαιθυλαιθέρας, για την επιτυχή καταβύθιση του πεπτιδίου μετά την συμπυκνωσή του
11. Οξικό οξύ (CH_3COOH) 2N, για την παραλαβή του πεπτιδίου μετά την καταβύθιση
12. Ακετονιτρίλιο (CH_3CN)

Αντιδραστήρια Σύζευξης

Τα αντιδραστήρια σύζευξης που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πεπτιδική σύνθεση είναι τα εξής:

- Ο-βενζοτριαζολυλο-τετραμεθυλο-ισοουρονικό εξαφθοροφωσφορικό άλας **(HBTU)**
- Ο-βενζοτριαζολυλο-τετραμεθυλο-ισοουρονικό τετραφθοροβορικό άλας **(TBTU)**
- N,N-διϊσοπρόπυλο καρβοιϊμίδιο **(DIC)**

Ως βοηθητικό πυρηνόφιλο χρησιμοποιήθηκε το:

- 1-υδροξυβενζοτριαζόλιο **(HOBt)**

N^{α} –Fmoc προστατευμένα παράγωγα αμινοξέων

Τα N^{α} –Fmoc προστατευμένα παράγωγα αμινοξέων που χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση των πεπτιδίων καταγράφονται στον παρακάτω πίνακα. **(Πίνακας 7.1)**

Πίνακας 7. 1. Τα N^{α} –Fmoc προστατευμένα παράγωγα αμινοξέων που χρησιμοποιήθηκαν στην πεπτιδική σύνθεση και τα μοριακά τους βάρη.

N^{α} –Fmoc προστατευμένα παράγωγα αμινοξέων	Μοριακό Βάρος g/mol
Fmoc-Aib-OH	325.4
Fmoc-Ala-OH	311.3
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	648.8
Fmoc-Asn(Trt)-OH	596.7
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	411.5
Fmoc-Gln(Trt)-OH	610.7
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	425.5
Fmoc-Gly-OH	297.3
Fmoc-His(Trt)-OH	619.7
Fmoc-Ile-OH	353.4
Fmoc-Leu-OH	353.4
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468.5
Fmoc-Lys(Mtt)-OH	624.8
Fmoc-Phe-OH	387.4
Fmoc-Pro-OH	337.4
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383.4
Fmoc-Trp(Boc)-OH	526.6

7.3 Γενική πορεία σύνθεσης

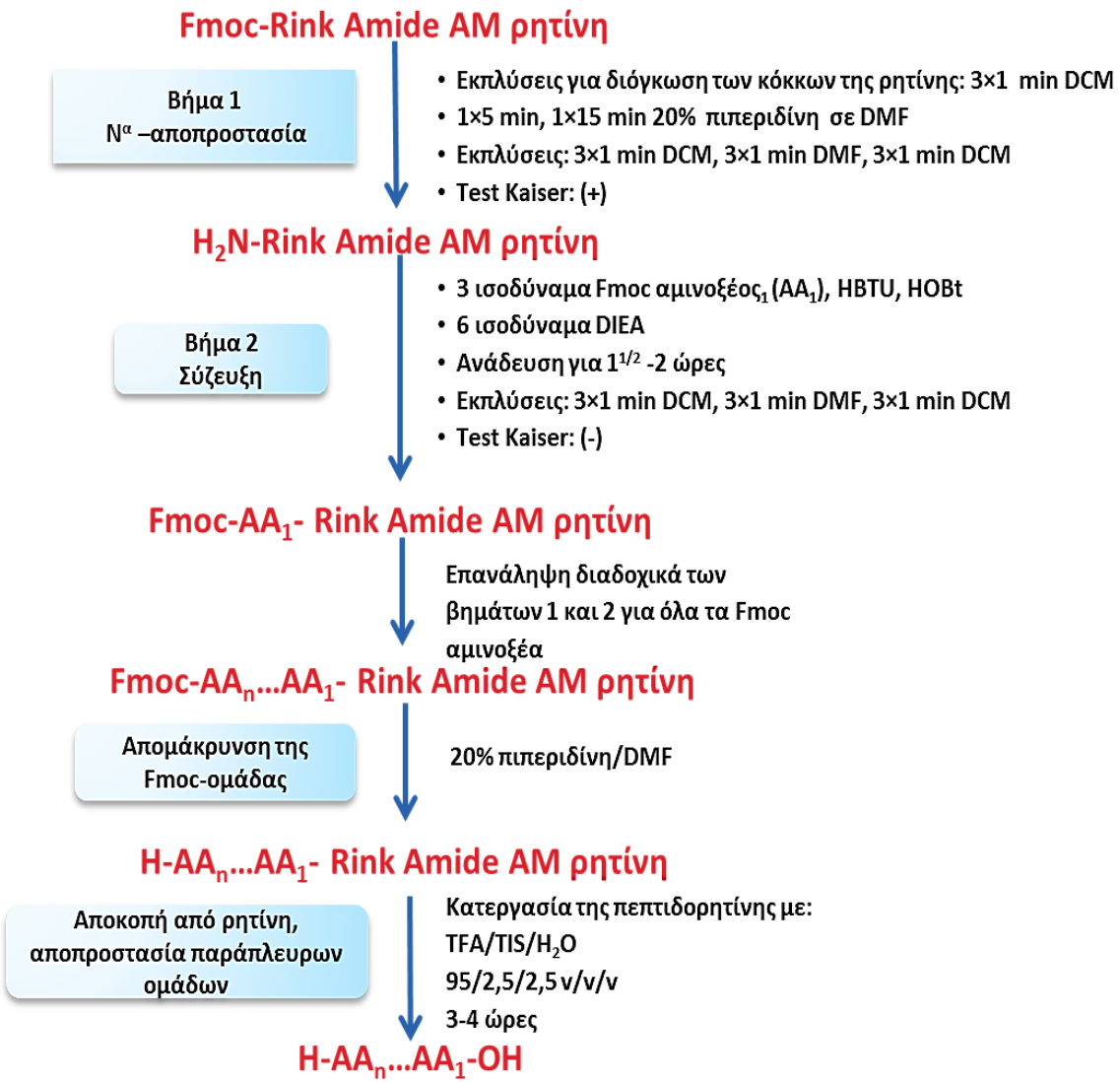
Η γενική πορεία σύνθεσης που χρησιμοποιήθηκε ακολουθεί τις αρχές της Fmoc/tBu στρατηγικής σύνθεσης σε στερεή φάση **(Σχήμα 7.1)**.

Η σύνθεση των πεπτιδίων πραγματοποιείται σε ειδικό περιστρεφόμενο σκεύος (vessel), στο οποίο τοποθετείται η κατάλληλη ποσότητα ρητίνης Rink Amide AM με Fmoc προστατευμένη την αμινομάδα της. Πραγματοποιούνται εκπλύσεις με DCM για την διόγκωση των κόκκων της ρητίνης και κατεργασία με διάλυμα πιπεριδίνης/DMF για την

αποκοπή της Fmoc ομάδας από την αμινομάδα της ρητίνης. Η αποπροστασία της αμινομάδας επιβεβαιώνεται με τον ποιοτικό έλεγχο νινυδρίνης (Test Kaiser). Ο χρωματισμός των κόκκων (μπλε ή καφέ) πιστοποιεί την ύπαρξη ελεύθερων αμινομάδων, γεγονός που δηλώνει την αποπροστασία της αμινομάδας της ρητίνης.

Στην ελεύθερη αμινομάδα της ρητίνης συνδέθηκε το πρώτο αμινοξύ της πεπτιδικής αλυσίδας μέσω σχηματισμού πεπτιδικού δεσμού ανάμεσα στην καρβοξυλομάδα του προστατευμένου αμινοξέος με την αμινομάδα της ρητίνης. Για την επίτευξη της σύζευξης εισήχθησαν στο vessel HOBt/HBTU/DIEA/Fmoc-προστατευμένο αμινοξύ σε αντίστοιχες αλληλουχίες 3/3/6/3. Μετά από ανάδευση 2 ωρών ακολούθησαν εκπλύσεις με DMF (molecular sieves) και DCM, και η έκβαση της σύζευξης διαπιστώνεται με Test Kaiser. Λευκοί κόκκοι στο στάδιο αυτό δηλώνουν την επιτυχή σύζευξη του αμινοξέος. Στην περίπτωση εμφάνισης χρωματισμένων κόκκων, επαναλαμβάνεται το στάδιο σύζευξης. Σε περιπτώσεις δύσκολων συζεύξεων, κυρίως λόγω στερεοχημικών παρεμποδίσεων, όπου παρά την επανάληψη του σταδίου, η σύζευξη αποτυγχάνει, επιβάλλεται η αλλαγή του αντιδραστηρίου σύζευξης. Αντί του HBTU χρησιμοποιούνται τα DIC και TBTU. Στην περίπτωση του DIC απαιτείται περισσότερος χρόνος για την αντίδραση σύζευξης (5-6 ώρες) και δεν προστίθεται DIEA στο μίγμα σύζευξης. Στην περίπτωση του TBTU ακολουθούνται ακριβώς οι ίδιες συνθήκες με το HBTU.

Επαναλαμβάνοντας τα προηγούμενα στάδια, αποκοπής της Fmoc-ομάδας του κάθε αμινοξέος και προσθήκη του επόμενου, επιμηκύνεται η πεπτιδική αλυσίδα.



Σχήμα 7.1. Πορεία πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση σε ρητίνη Rink Amide AM με την Fmoc/tBu στρατηγική.

Μετά την προσθήκη όλων των αμινοξέων της πεπτιδικής αλληλουχίας ακολουθεί αποπροστασία της Fmoc-ομάδας του τελευταίου αμινοξέος και η αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη με ταυτόχρονη απομάκρυνση των παράπλευρων προστατευτικών ομάδων μέσω κατεργασίας με 20 ml διάλυμα 95% TFA/ 2,5% TIS/ 2,5% H_2O (v/v/v) για 3-4 ώρες.

Ακολούθησε διήθηση υπό κενό για την απομάκρυνση της ρητίνης, ενώ το TFA απομακρύνεται με εξάτμιση σε περιστροφικό εξατμιστήρα (flash evaporator), η οποία επιταχύνεται με την προσθήκη μίγματος DCM/εξανίου, 1:1 (v/v).

Τέλος, το ελαιώδες υπόλειμμα κατεργάζεται με διαιθυλαιθέρα και διατηρείται στην κατάψυξη overnight προς καταβύθιση του πεπτιδίου. Ακολουθεί διήθηση και παραλαβή

του πεπτιδίου με υδατικό διάλυμα οξικού οξέος (CH_3COOH) 2N. Το πεπτίδιο παραλαμβάνεται στην τελική στερεή του μορφή μετά από λυοφιλοποίηση. Ακολουθεί καθαρισμός και ταυτοποίηση.

7.4 Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση επιτόπων της gp41 και του τριπεπτιδίου Lys-Ala-Arg-NH_2

7.4.1 EC26-2A4-EW επίτοπος της gp41

Ο επίτοπος αυτός αποτελείται από την ακόλουθη αλληλουχία αμινοξέων:

H-EQELLELDKWK(S)-NH_2

M. B.: 1516,69

M. T.: $C_{68}H_{109}N_{17}O_{22}$

Για τη σύνθεση του πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκαν 1,351g ρητίνης Rink Amide AM με υποκατάσταση 0,37 mmol/g και ακολουθήθηκε η γενική πορεία σύνθεσης που περιγράφεται στο **Σχήμα 7.1**.

Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του γραμμικού τμήματος του πεπτιδίου και χωρίς να πραγματοποιηθεί αποπροστασία της α-αμινομάδας του τελευταίου αμινοξέος (Glu^1), έγινε εκλεκτική απομάκρυνση της Mtt προστατευτικής ομάδας από την ε-αμινομάδα της Lys ως εξής:

- 9 × 3 min διάλυμα 1,8% TFA/DCM
- Εκπλύσεις: 3 × 1 min DCM, 3 × 1 min DMF, 3 × 1 min DCM
- Εξουδετέρωση άλατος TFA της Lys-$N^{\varepsilon}H_2$: 2 × 2 min 7% DIEA/DCM
- Εκπλύσεις: 3 × 1 min DCM, 3 × 1 min DMF, 3 × 1 min DCM
- Test Kaiser (+)

Στη συνέχεια, στην ελεύθερη πλέον ε-αμινομάδα της Lys, προστέθηκε το παράγωγο Fmoc-Ser(tBu)-OH. Τέλος, η Fmoc ομάδα απομακρύνθηκε ταυτόχρονα από τις α-αμινομάδες των αμινοξέων Glu και Ser.

Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης, η πεπτιδορητίνη ξηράνθηκε υπεράνω P_2O_5 σε ξηραντήρα κενού.

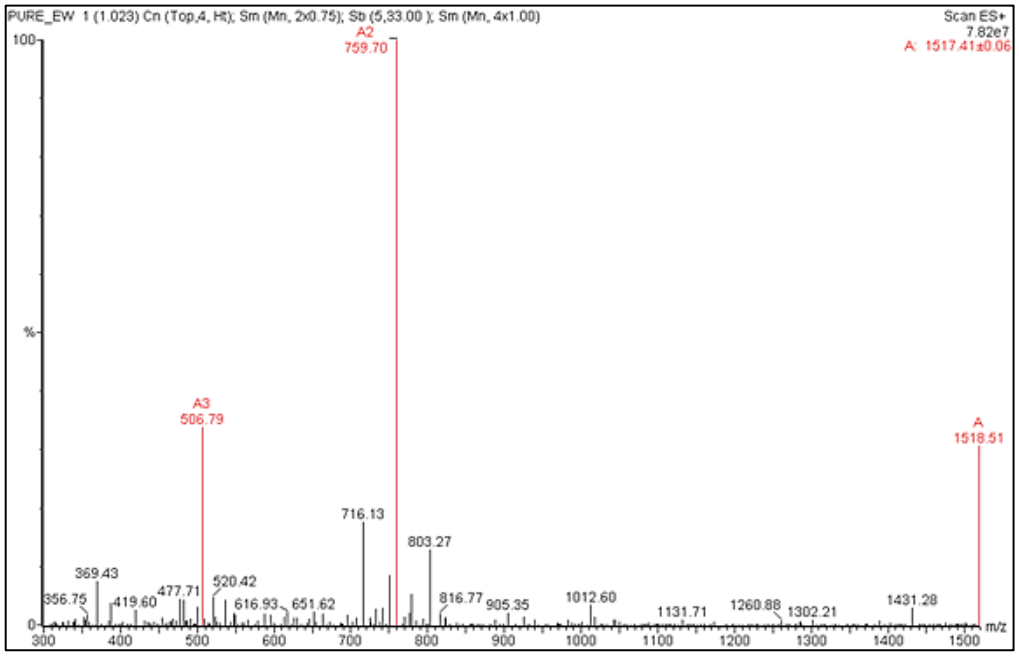
Η αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη με ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας όλα τα υπόλοιπα στάδια που

περιγράφηκαν μέχρι την παραλαβή του πεπτιδίου στην στερεή του μορφή, ύστερα από λυοφιλοποίηση.

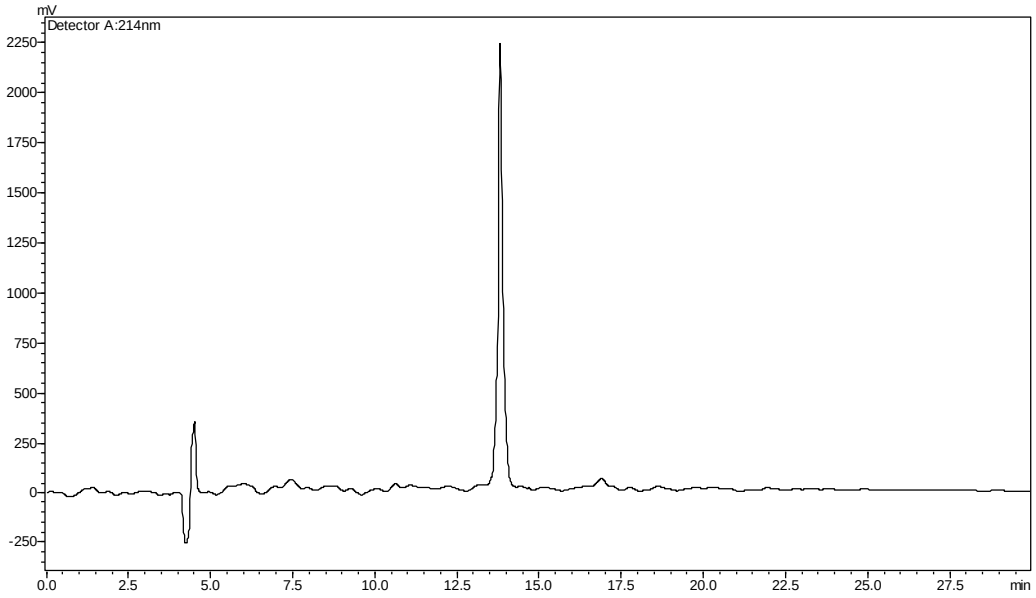
Ο καθαρισμός του πεπτιδίου έγινε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC χρησιμοποιώντας βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης στα 214 nm υπό τις παρακάτω συνθήκες:

- 10-70% CH_3CH/0,1% TFA
- 90-30% H_20/0,1% TFA
- χρόνος έκλουσης: 30 min
- ταχύτητα ροής: 4,7 ml/min
- απόδοση καθαρισμού: 49%

Η ταυτοποίηση του επιθυμητού κλάσματος έγινε με φασματομετρία μάζας ESI-MS **(Σχήμα 7.2)**, ενώ η καθαρότητα επιβεβαιώθηκε με αναλυτική RP-HPLC **(Σχήμα 7.3)**.



Σχήμα 7.2. Φάσμα μάζας ESI του καθαρού επιτόπου EC26-2A4-EW. Ευρεθέν μοριακό βάρος 1517,41, υπολογισθέν μοριακό βάρος 1516,69.



Σχήμα 7.3. Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού επιτόπου EC26-2A4-EW.

7.4.2 EC26-2A4-NK επίτοπος της gp41

Ο επίτοπος αυτός αποτελείται από την ακόλουθη αλληλουχία αμινοξέων:

H-NEQELLELDKK(S)-NH_2

M. B.: 1444,69

M. T.: $C_{61}H_{105}N_{17}O_{23}$

Για τη σύνθεση του πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκαν 1,351g ρητίνης Rink Amide AM με υποκατάσταση 0,37 mmol/g και ακολουθήθηκε η γενική πορεία σύνθεσης που περιγράφεται στο **Σχήμα 7.1**.

Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του γραμμικού τμήματος του πεπτιδίου και χωρίς να πραγματοποιηθεί αποπροστασία της α-αμινομάδας του τελευταίου αμινοξέος (Asn^1), έγινε εκλεκτική απομάκρυνση της Mtt προστατευτικής ομάδας από την ε-αμινομάδα της Lys με χρήση διαλύματος 1,8% TFA σε DCM, όπως ήδη αναφέραμε, όπου στη συνέχεια, προστέθηκε το παράγωγο Fmoc-Ser(tBu)-OH. Τέλος, η Fmoc ομάδα απομακρύνθηκε ταυτόχρονα από τις α-αμινομάδες των αμινοξέων Asn και Ser.

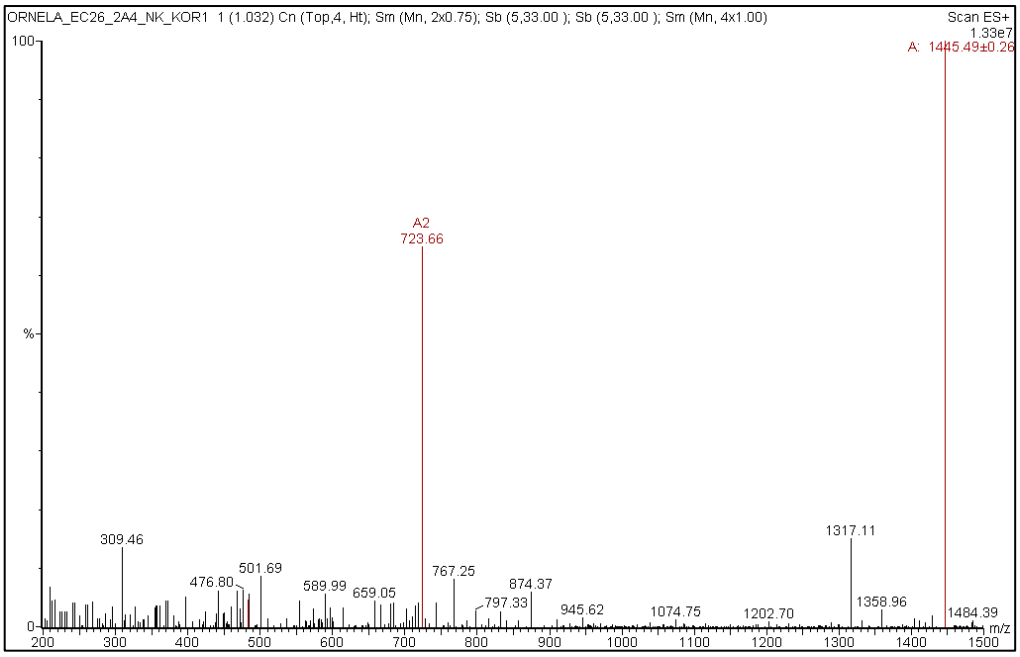
Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης, η πεπτιδορητίνη ξηράνθηκε υπεράνω P_2O_5 σε ξηραντήρα κενού.

Η αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη με ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας όλα τα υπόλοιπα στάδια που έχουν περιγραφεί μέχρι την παραλαβή του πεπτιδίου στην στερεή του μορφή, ύστερα από λυοφιλοποίηση.

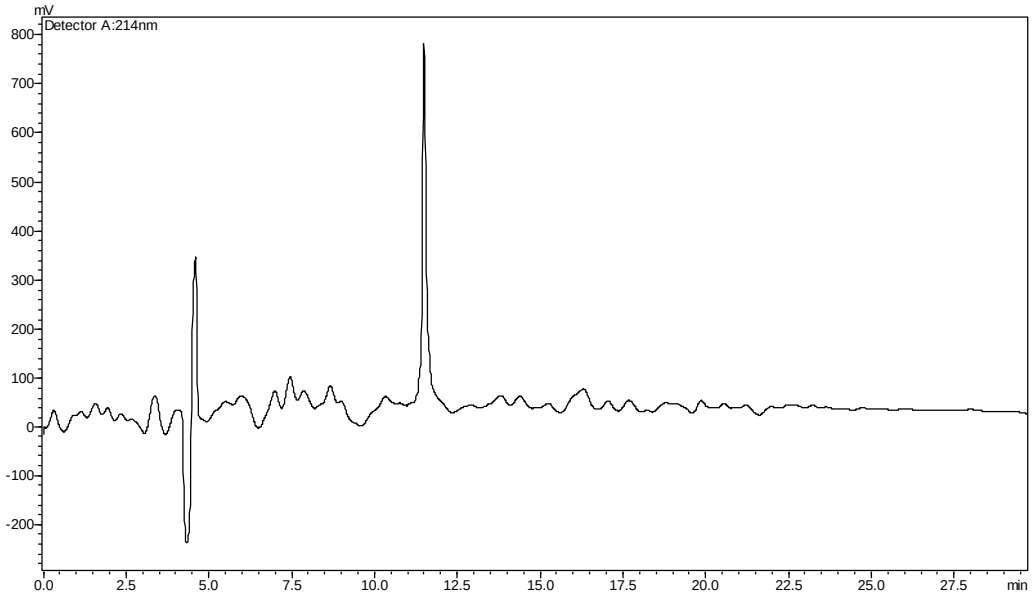
Ο καθαρισμός του πεπτιδίου έγινε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC χρησιμοποιώντας βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης στα 214 nm υπό τις παρακάτω συνθήκες:

- 10-70% CH_3CH/0,1% TFA
- 90-30% H_20/0,1% TFA
- χρόνος έκλουσης: 30 min
- ταχύτητα ροής: 4,7 ml/min
- απόδοση καθαρισμού: 48%

Η ταυτοποίηση του επιθυμητού κλάσματος έγινε με φασματομετρία μάζας ESI-MS **(Σχήμα 7.4)**, ενώ η καθαρότητα επιβεβαιώθηκε με αναλυτική RP-HPLC **(Σχήμα 7.5).**



Σχήμα 7.4. Φάσμα μάζας ESI του καθαρού επιτόπου EC26-2A4-NK. Ευρεθέν μοριακό βάρος 1445,49, υπολογισθέν μοριακό βάρος 1444,59.



Σχήμα 7.5. Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του επιτόπου EC26-2A4-NK.

7.4.3 EC26-2A4 επίτοπος της gp41

Ο επίτοπος αυτός αποτελείται από την ακόλουθη αλληλουχία αμινοξέων:

H-IEESQNQQEKNEQELLELDKWKASLWNWFDK(S)-NH2

M. B.: 3865,13

M. T.: $C_{172}H_{255}N_{45}O_{57}$

Για την σύνθεση του επιτόπου EC26-2A4 χρησιμοποιήθηκε 1 g ρητίνης με υποκατάσταση 0,37 mmol/g και ακολουθήθηκε η γενική πορεία σύνθεσης που περιγράφεται στο **Σχήμα 7.1**.

Το πρώτο παράγωγο αμινοξέος που προστέθηκε ήταν το Fmoc-Lys(Mtt)-OH και ακολούθησε η προσθήκη του Boc-Ser(tBu)-OH, στην παράπλευρη αλυσίδα της Lys, αφού προηγουμένως γίνει εκλεκτική απομάκρυνση της Mtt προστατευτικής ομάδας από την ε-αμινομάδα της Lys με χρήση διαλύματος 1,8% TFA σε DCM, με τη διαδικασία που ήδη περιγράφηκε. Η εισαγωγή της σερίνης έγινε στα πρώτα βήματα της σύνθεσης ως Boc προστατευμένο αμινοξύ, σε αντίθεση με τα προηγούμενα πεπτίδια, όπου πραγματοποιήθηκε μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης, λόγω της μεγάλης αλληλουχίας του πεπτιδίου που πιθανώς να δημιουργούσε πρόβληματα στη σύζευξη της.

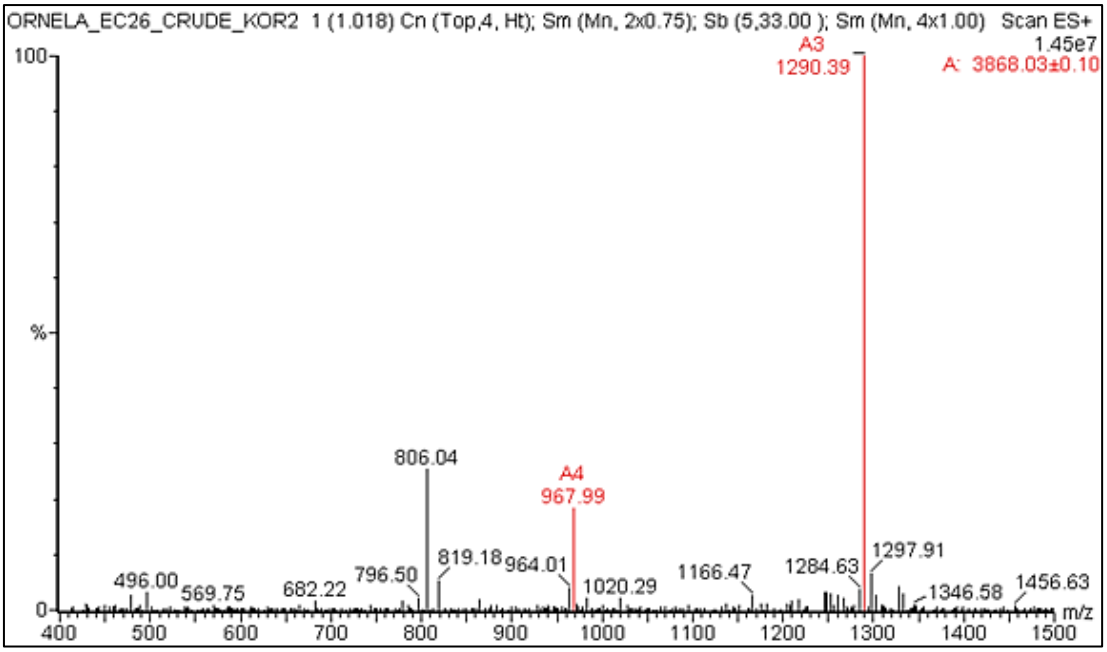
Μετά την επιτυχή σύζευξη λυσίνης-σερίνης, πραγματοποιήθηκε ακετυλίωση με διάλυμα οξικού ανυδρίτη (Ac_2O)/πυριδίνης ώστε να δεσμευτούν τυχόν υπάρχουσες ελεύθερες αμινομάδες, που θα δημιουργούσαν προβλήματα στην πορεία της σύνθεσης. Στη συνέχεια, ακολούθησε η προσθήκη του τρίτου αμινοξέος, αφού έγινε αποκοπή της Fmoc-ομάδας της Lys, και η σύνθεση συνεχίστηκε μέχρι την προσθήκη του τελευταίου αμινοξέος.

Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης έγινε απομάκρυνση της Fmoc-ομάδας του τελευταίου αμινοξέος, η πεπτιδορητίνη ξηράνθηκε υπεράνω P_2O_5 σε ξηραντήρα κενού και στη συνέχεια έγινε αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη και απομάκρυνση των παράπλευρων προστατευτικών ομάδων. Τέλος, ακολουθήθηκαν τα υπόλοιπα στάδια μέχρι την παραλαβή του πεπτιδίου σε στερεή μορφή μετά από λυοφιλοποίηση.

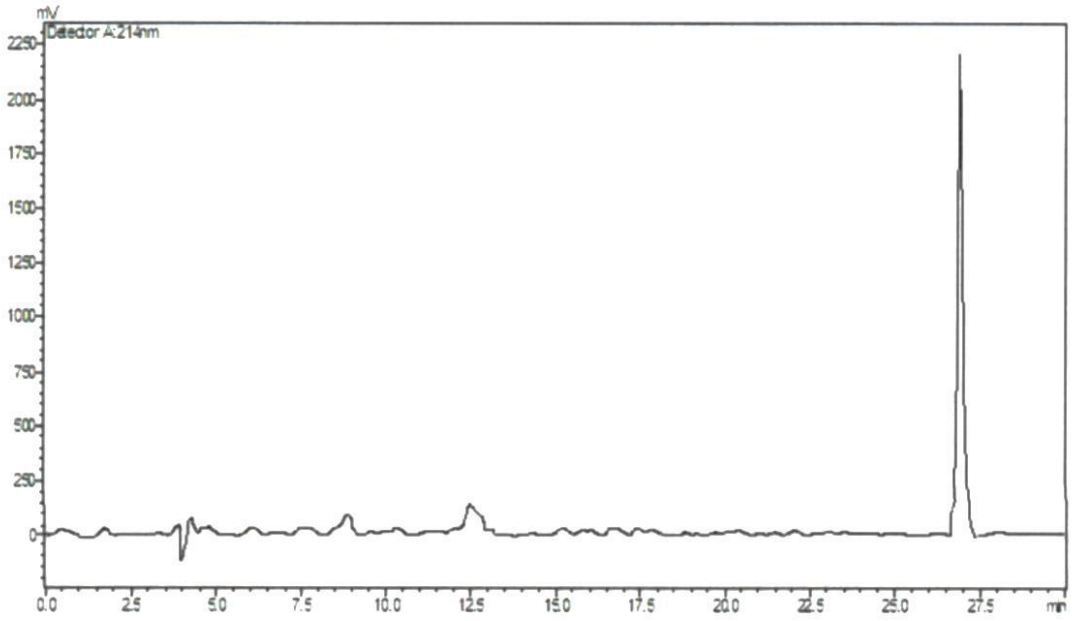
Ο καθαρισμός του πεπτιδίου έγινε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC χρησιμοποιώντας βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης στα 214 nm υπό τις παρακάτω συνθήκες:

- 30-60% CH_3CH/0,1% TFA
- 70-40% H20/0,1% TFA
- χρόνος έκλουσης: 30 min
- ταχύτητα ροής: 4,7 ml/min
- απόδοση καθαρισμού: 15%

Η ταυτοποίηση του επιθυμητού κλάσματος έγινε με φασματομετρία μάζας ESI-MS **(Σχήμα 7.6)**, ενώ η καθαρότητα επιβεβαιώθηκε με αναλυτική RP-HPLC **(Σχήμα 7.7)**.



Σχήμα 7.6. Φάσμα μάζας ESI του καθαρού επιτόπου EC26-2A4. Ευρεθέν μοριακό βάρος 3868,03, υπολογισθέν μοριακό βάρος 3865,13.



Σχήμα 7.7. Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού επιτόπου EC26-2A4.

7.4.4 Τριπεπτίδιο: Lys-Ala-Arg-NH_2

Ac-Lys (Ser)-Ala-Arg-NH_2
M. B.: 501,58 g/mol
M.T.: $C_{20}H_{39}N_9O_6$

Για τη σύνθεση του πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκαν 3 g ρητίνης Rink Amide AM με υποκατάσταση 0,47 mmol/g και ακολουθήθηκε η γενική πορεία σύνθεσης που περιγράφεται στο **Σχήμα 7.1**.

Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του γραμμικού τμήματος του πεπτιδίου, η πεπτιδορητίνη ξηράνθηκε υπεράνω P_2O_5 σε ξηραντήρα κενού. Μετά την ξήρανση η πεπτιδορητίνη χωρίστηκε σε δύο τμήματα, το ένα (2,218 g) χρησιμοποιήθηκε για την ολοκλήρωση της σύνθεσης του πεπτιδίου και το υπόλοιπο φυλάχτηκε για μελλοντική χρήση.

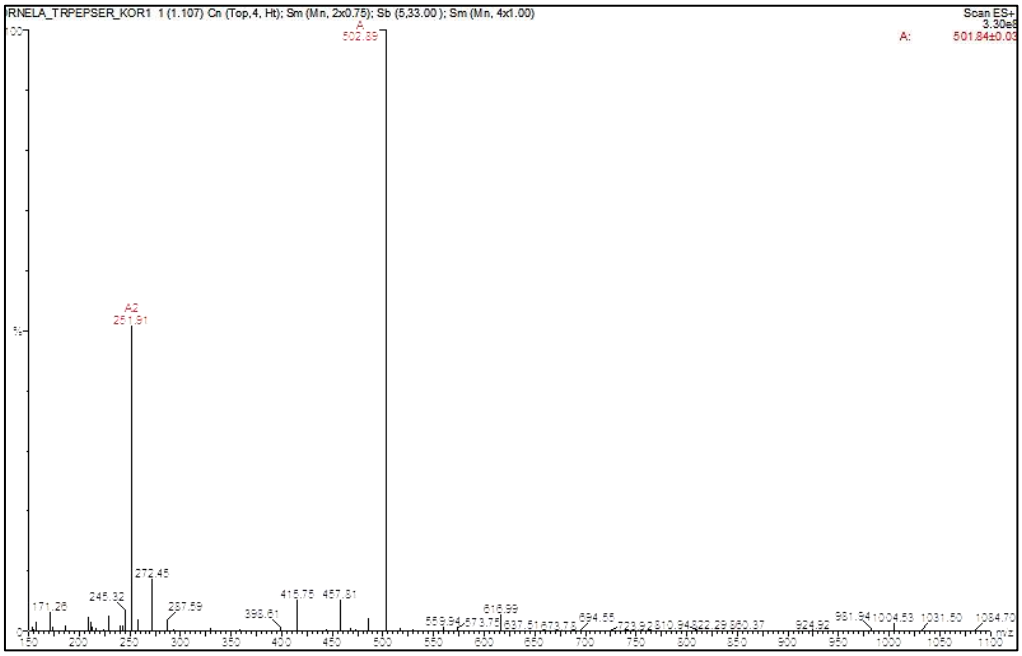
Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση της Fmoc-ομάδας της α-αμινομάδας της Lys και ακολούθησε ακετυλίωση της ελεύθερης πλέον αμινομάδας με διάλυμα οξικού ανυδρίτη (Ac_2O)/πυριδίνης. Το επόμενο βήμα, ήταν η εκλεκτική απομάκρυνση της Mtt προστατευτικής ομάδας από την ε-αμινομάδα της Lys με χρήση διαλύματος 1,8% TFA σε DCM, όπου στη συνέχεια, προστέθηκε το παράγωγο Fmoc-Ser(tBu)-OH. Τέλος, έγινε απομάκρυνση της Fmoc-ομάδας της Ser και ξήρανση της πεπτιδορητίνης υπεράνω P_2O_5 σε ξηραντήρα κενού.

Η αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη με ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας όλα τα υπόλοιπα στάδια που περιγράφηκαν, μέχρι την παραλαβή του πεπτιδίου στην στερεή του μορφή, ύστερα από λυοφιλοποίηση.

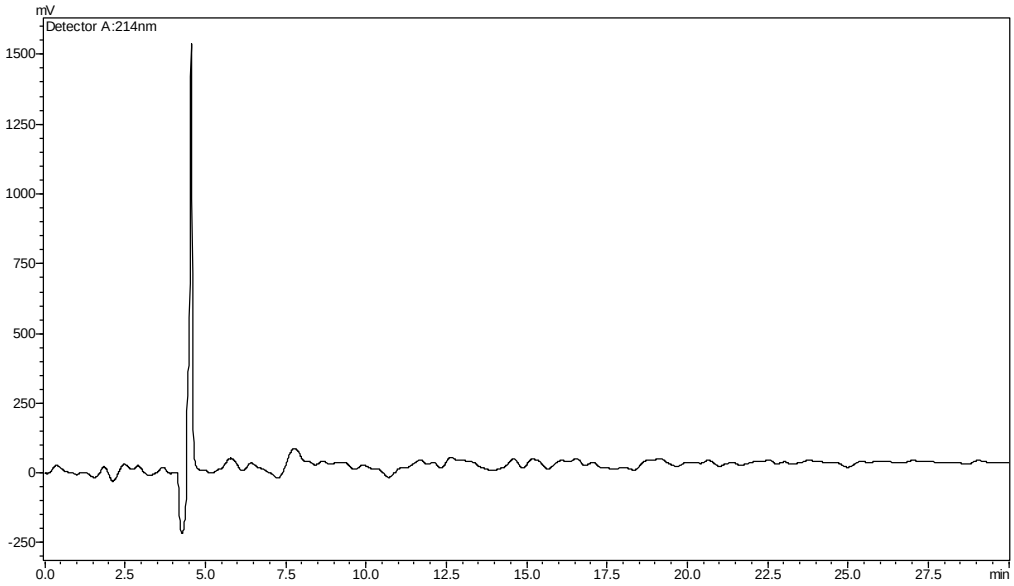
Ο καθαρισμός του πεπτιδίου έγινε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC χρησιμοποιώντας βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης στα 214 nm υπό τις παρακάτω συνθήκες:

- 10-70% CH_3CH/0,1% TFA
- 90-30% H20/0,1% TFA
- χρόνος έκλουσης: 30 min
- ταχύτητα ροής: 4,7 ml/min
- απόδοση καθαρισμού: 69%

Η ταυτοποίηση του επιθυμητού κλάσματος έγινε με φασματομετρία μάζας ESI-MS **(Σχήμα 7.8)**,ενώ η καθαρότητα επιβεβαιώθηκε με αναλυτική RP-HPLC **(Σχήμα 7.9)**.



Σχήμα 7.8. Φάσμα μάζας ESI του πεπτιδίου Ac-Lys(Ser)-Ala-Arg-NH_2. Ευρεθέν μοριακό βάρος 501,58, υπολογισθέν μοριακό βάρος 501,84.



Σχήμα 7.9. Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του πεπτιδίου Ac-Lys(Ser)-Ala-Arg-NH_2.

Κεφάλαιο 8

Σύνθεση πεπτιδικών παραγώγων κατάλληλων για χημειοεκλεκτική σύνδεση

8.1 Εισαγωγή

Στην παρούσα εργασία συντέθηκαν και μελετήθηκαν τα εξής πεπτιδικά παράγωγα κατάλληλα για αντιδράσεις χημειοεκλεκτικής σύνδεσης μέσω δεσμού οξίμης:

1. N^{ε}-αμινοοξυακέτυλο φορέας SOC_4-I:

Ac-SOC_4(Aoa_4)-NH_2

2. N^{ε}-αμινοοξυακέτυλο (Lys^1 και Lys^7) φορέας SOC_4-I:

Ac-SOC_4(Ac_2Aoa_2)-NH_2

3. Αλδεϋδικό παράγωγο του επιτόπου EC26-2A4-EW:

H-EQELLELDKWK(COCHO)-NH_2

4. Αλδεϋδικό παράγωγο του επιτόπου EC26-2A4-NK:

H-NEQELLELDKK(COCHO)-NH_2

5. Αλδεϋδικό παράγωγο του επιτόπου EC26-2A4:

H-IEESQNQQEKNEQELLELDKWKASLWNWFDK(COCHO)-NH_2

6. Αλδεϋδικό παράγωγο τριπεπτιδίου: Lys-Ala-Arg-NH_2:

H-Lys(COCHO)-Ala-Arg-NH_2

8.2 Γενική Πορεία Σύνθεσης

8.2.1 Σύνθεση του N^{ε}-αμινοοξυακέτυλο φορέα SOC_4-I

Η σύνθεση διακλαδισμένων πεπτιδίων, όπως η πρόσδεση των επιτόπων στην παράπλευρη αλυσίδα των λυσινών του ολιγοπεπτιδικού φορέα SOC_4-I, απαιτεί ορθογωνική προστασία των καταλοίπων λυσίνης με μια προστατευτική ομάδα η οποία είναι δυνατόν να απομακρυνθεί εκλεκτικά, μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του γραμμικού τμήματος του φορέα. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε το παράγωγο της λυσίνης Fmoc-Lys(Mtt)-OH, καθώς η Mtt ομάδα απομακρύνεται εκλεκτικά, σε ελαφρώς όξινες συνθήκες με διάλυμα 1,8% TFAσε DCM (9 × 3 min), χωρίς να παρατηρείται αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη, επιτρέποντας έτσι την συνέχιση της σύνθεσης από την ε-αμινομάδα της λυσίνης. Μετά την απομάκρυνση της Mtt ομάδας, προστέθηκε στις αμινομάδες των λυσινών το παράγωγο Boc-$NHOCH_2COOH$ (Boc-αμινοόξυ οξικό οξύ). Η Boc προστατευτική ομάδα απομακρύνθηκε κατά την τελική αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη.

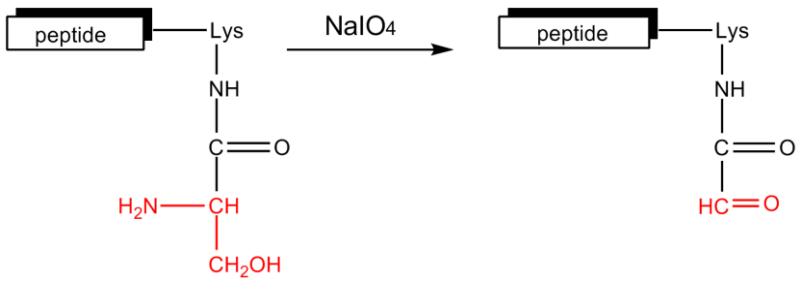
8.2.2 Σύνθεση των αλδεϋδικών παραγώγων

Για να προσδεθούν οι επίτοποι της γλυκοπρωτεΐνης gp41 και το τριπεπτίδιο στον N^{ε}-αμινοοξυακέτυλο φορέα SOC_4-I, απαιτείται η τροποποίηση αυτών ώστε να προκύψει μια αλδεϋδική ομάδα η οποία αντιδρά εκλεκτικά με την αμινο-όξυ ομάδα του φορεα, σε όξινο περιβάλλον.

Για να επιτευχθεί αυτό, όπως αναφέρθηκε και στο προηγούμενο κεφάλαιο, στο καρβόξυ-άκρο των πεπτιδίων προστέθηκε μια λυσίνη που φέρει την Mtt προστατευτική ομάδα στην ε-αμινομάδα της, όπου μετά την αποπροστασία της προστέθηκε μια σερίνη, ως Fmoc-Ser(tBu)-OH. Η εισαγωγή της σερίνης εξασφαλίζει την ύπαρξη μιας ελεύθερης 2-άμινο-αλκοολικής ομάδας στο πεπτίδιο η οποία οξειδώνεται με υπεριωδικό νάτριο ($NaIO_4$) προς αλδεΰδη.

8.2.3 Οξείδωση 2-άμινο-αλκοόλης προς αλδεΰδη παρουσία $NaIO_4$

Η αντίδραση οξείδωσης της 2-άμινο-αλκοολικής ομάδας της σερίνης προς αλδεΰδης **(Σχήμα 8.1)** υπό την επίδραση $NaIO_4$ πραγματοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα ιμιδαζολίου- HCl pH 6,9. Το $NaIO_4$ χρησιμοποιείται σε μοριακή αναλογία 2:1 ως προς την 2-άμινο-αλκοολική ομάδα και η αντίδραση ολοκληρώνεται ταχύτατα (~3-6 min). Η περίσσεια του $NaIO_4$ δεσμεύεται από την προσθήκη διαλύματος αιθυλενογλυκόλης σε μοριακή αναλογία 2:1 ως προς το $NaIO_4$.



Σχήμα 8.1. Αντίδραση οξείδωσης της 2-άμινο-αλκοολικής ομάδας της σερίνης.

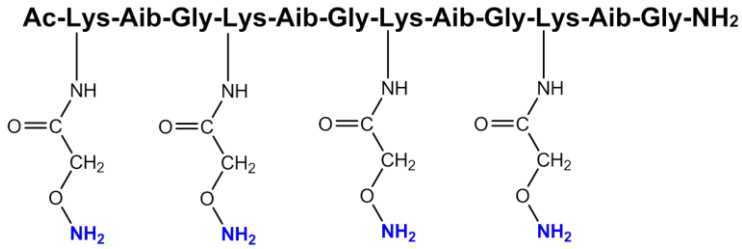
8.2.4 Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος

Για την παραγωγή του ρυθμιστικού διαλύματος ιμιδαζολίου-HCl, pH 7, παρασκευάστηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

- **Διάλυμα Α**: Υδατικό διάλυμα ιμιδαζολίου ($C_3H_4N_2$, M.B.: 68,08) 0,2 M
  - ✓ 0,6808 g ιμιδαζολίου διαλύονται σε 50 ml H_2O
- **Διάλυμα Β**: υδατικό διάλυμα υδροχλωρίου (HCl M.B.: 36,46) 0,1 M
  - ✓ 0,77 ml πυκνού HCl εισάγονται σε ογκομετρική φιάλη των 250 ml και συμπληρώνεται ο όγκος με H_2O
- **Ρυθμιστικό διάλυμα ιμιδαζολίου-HCl 50 mM, pH 7:**
  - ✓ 25 ml διαλύματος Α και 25,4 ml διαλύματος Β εισάγονται σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml και ο όγκος συμπληρώνεται με H_2O
- **Υδατικό διάλυμα αιθυλενογλυκόλης (EG) 100 mM:**
  - ✓ 0, 56 ml αιθυλενογλυκόλης εισάγονται σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml και ο όγκος συμπληρώνεται με H_2O

8.3 Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του N^{ε}-αμινοοξυακέτυλο φορέα SOC_4-I και των αλδεϋδικών παραγώγων

8.3.1 N^{ε}-αμινοοξυακέτυλο φορέας SOC_4-I: Ac-SOC_4(Aoa)$_4$-NH_2

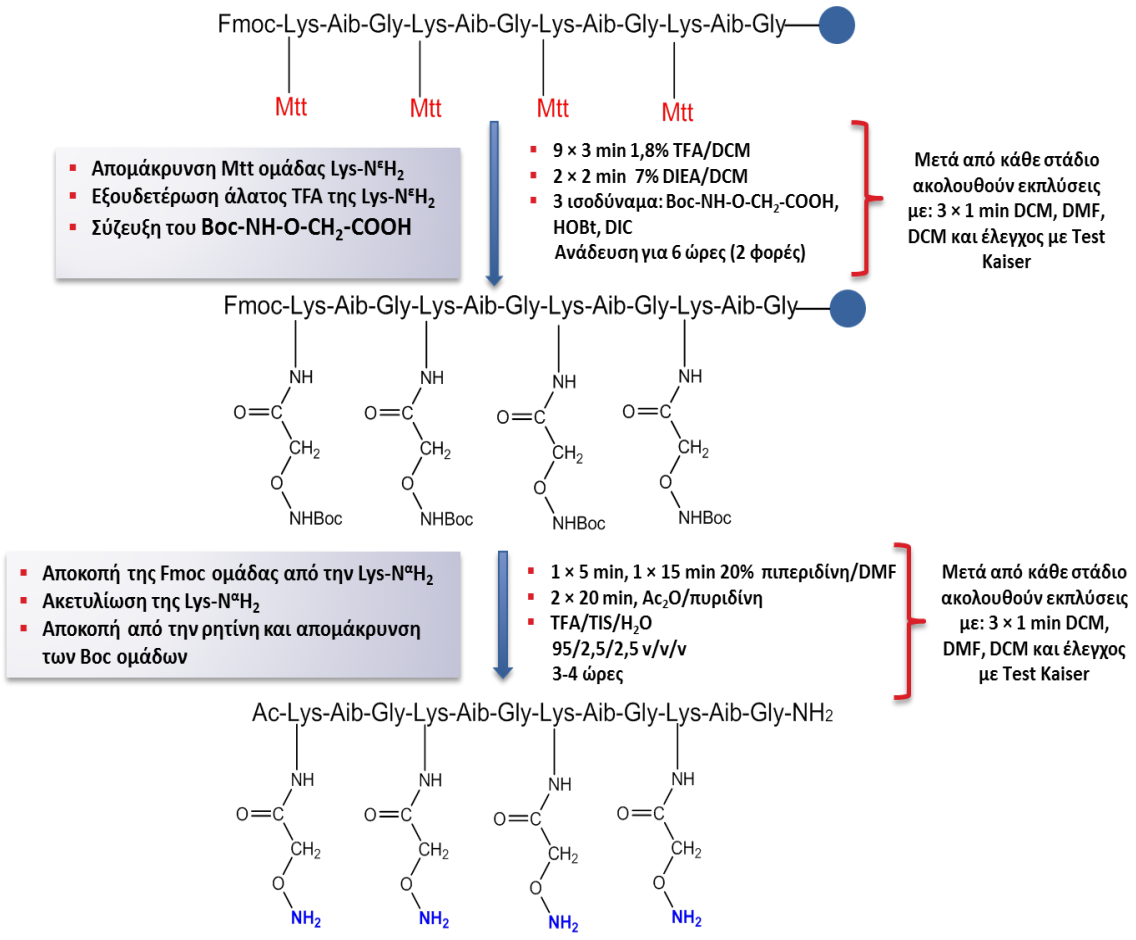


M.B.: 1432,60

M.T: $C_{58}H_{105}N_{21}O_{21}$

Για τη σύνθεση του φορέα χρησιμοποιήθηκαν 2,00 g ρητίνης Fmoc-Rink Amide AM με υποκατάσταση 0,33 mmol/g. Αρχικά, έγινε η σύνθεση του γραμμικού τμήματος του

φορέα SOC_4-I, που φέρει Mtt ομάδα στην ε-αμινομάδα των τεσσάρων λυσινών, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στο **Σχήμα 7.1**. Στη συνέχεια, έγινε απομάκρυνση της Mtt ομάδα από την ε-αμινομάδα των λυσινών και εισαγωγή της αμινοοξυακετυλομάδας. Αυτό επιτυγχάνεται με την σύζευξη του Boc-$NHOCH_2COOH$ (Boc-αμινοόξυ οξικό οξύ) στις ελεύθερες αμινομάδες των λυσινών, με χρήση DIC ως αντιδραστηρίου σύζευξης και παρουσία HOBt ως βοηθητικού πυρηνόφιλου, όπως περιγράφεται στο **Σχήμα 8.2**. Ακολούθησε απομάκρυνση της Fmoc ομάδας από την α-αμινομάδα της τελευταίας λυσίνης και στη συνέχεια ακετυλίωση της ελεύθερης πλέον αμινομάδας. Τέλος, η πεπτιδορητίνη ξηράνθηκε υπεράνω P_2O_5 σε ξηραντήρα κενού.



Σχήμα 8.2. Πορεία σύνθεσης του N^{ε}-αμινοοξυακέτυλο φορέας SOC_4-I (Ac-$SOC_4(Aoa)_4$-NH_2) σε ρητίνη Fmoc-Rink-Amide AM.

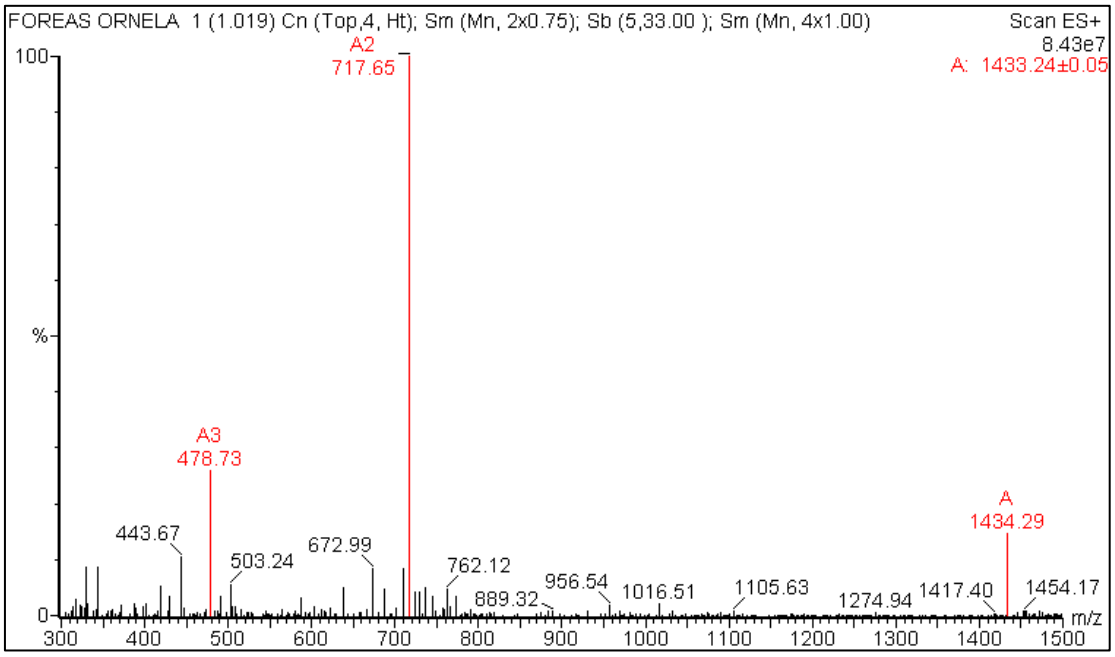
Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη με ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων πραγματοποιήθηκε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης με 20 ml διαλύματος 95% TFA/ 2,5% TIS/ 2,5% H2O (v/v/v) για 3 ώρες υπό συνεχή μαγνητική

ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε διήθηση υπό κενό για την απομάκρυνση της ρητίνης, συμπύκνωση μέχρι ξηρού, εκπλύσεις με DCM/εξάνιο 1:1 (v/v), καταβύθιση του πεπτιδίου με διαιθυλαιθέρα υπό ψύξη, διήθηση και τέλος παραλαβή του πεπτιδίου με υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 2N και λυοφιλοποίηση.

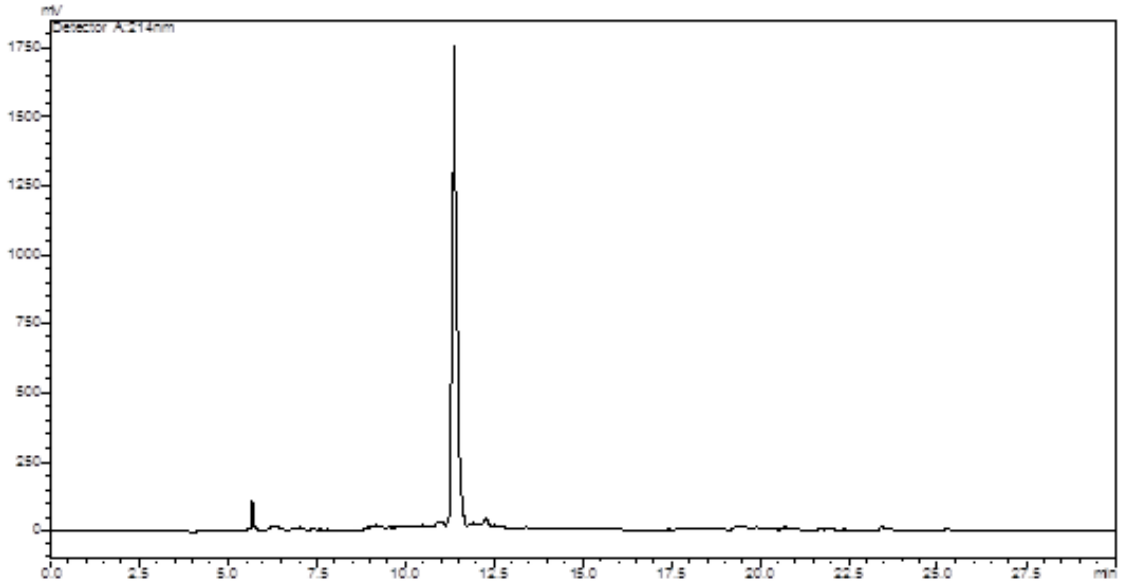
Ο καθαρισμός του πεπτιδίου έγινε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC χρησιμοποιώντας βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης στα 214 nm υπό τις παρακάτω συνθήκες:

- 10-70% CH_3CH/0,1% TFA
- 90-30% H_20/0,1% TFA
- χρόνος έκλουσης: 30 min
- ταχύτητα ροής: 4,7 ml/min
- απόδοση καθαρισμού: 43%

Η ταυτοποίηση του επιθυμητού κλάσματος έγινε με φασματομετρία μάζας ESI-MS **(Σχήμα 8.3)**, ενώ η καθαρότητα επιβεβαιώθηκε με αναλυτική RP-HPLC **(Σχήμα 8.4)**.

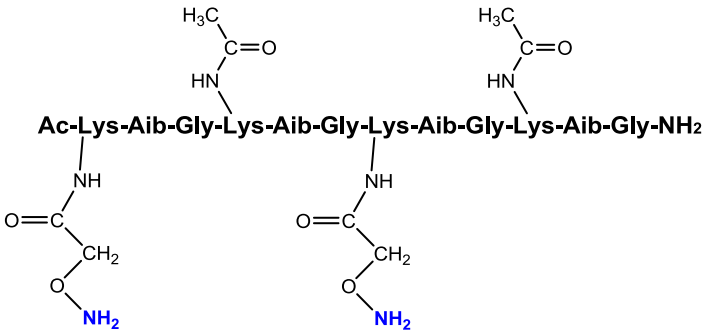


Σχήμα 8.3. Φάσμα μάζας ESI του καθαρού N^{ε}-αμινοοξυακέτυλο φορέα SOC_4-I, Ac-$SOC_4(Aoa)_4$-NH_2. Ευρεθέν μοριακό βάρος 1433,24, υπολογισθέν 1432,60.



Σχήμα 8.4. Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού N^{ε}-αμινοοξυακέτυλο φορέα SOC_4-I, Ac-$SOC_4(Aoa)_4$-NH_2.

8.3.2 N^{ε}-αμινοοξυακέτυλο (Lys^1 και Lys^7) φορέας SOC_4-I: Ac-$SOC_4(Ac_2Aoa_2)$-NH_2



M.B.: 1370,57

M.T: $C_{58}H_{103}N_{19}O_{19}$

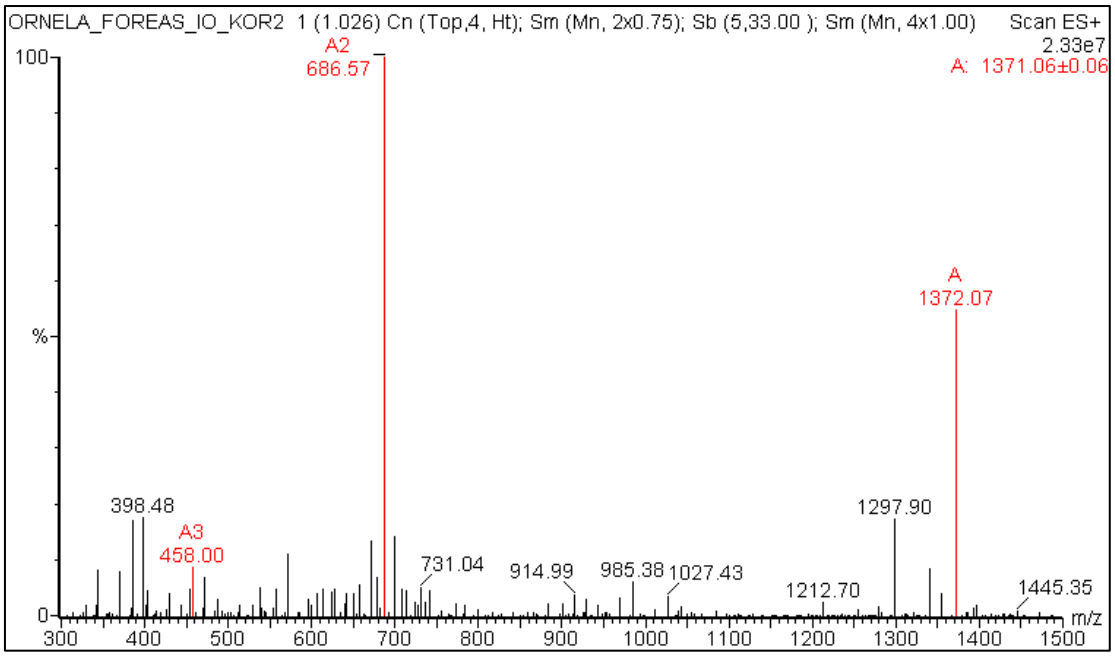
Για τη σύνθεση του φορέα χρησιμοποιήθηκαν 1,37 g ρητίνης Fmoc-Rink Amide AM με υποκατάσταση 0,37 mmol/g. Τα αμινοξέα Lys^4 και Lys^{10} προστέθηκαν ως Fmoc-Lys(Ac)-OH παράγωγα, ενώ τα αμινοξέα Lys^1 και Lys^7 ως Fmoc-Lys(Mtt)-OH παράγωγα. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης και την απομάκρυνση της Fmoc-ομάδας του τελευταίου αμινοξέος πραγματοποιήθηκε ακετυλίωση χρησιμοποιώντας 30 ισοδύναμα

οξικού ανυδρίτη σε 15 ml πυριδίνης (2 × 20 min). Ακολούθησε απομάκρυνση της Mtt-ομάδας από τα αμινοξέα Lys^1 και Lys^7 και προστέθηκε το Boc-$NHOCH_2COOH$ (Boc-αμινοόξυ οξικό οξύ) στις ελεύθερες πλέον αμινομάδες των λυσινών, με σκοπό την εισαγωγή της αμινοξυακετυλομάδας.

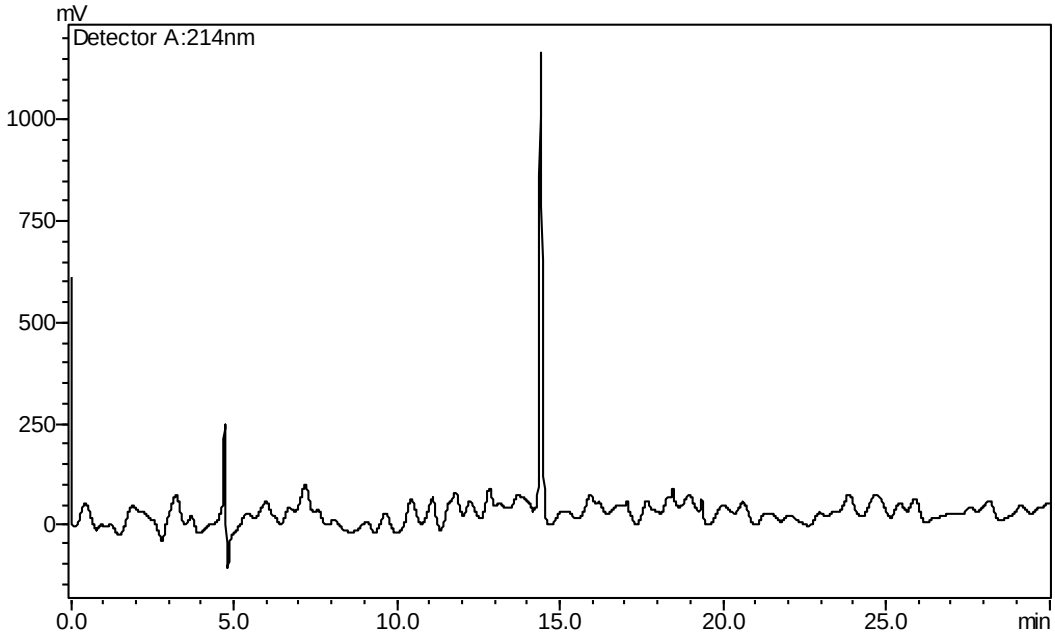
Ο καθαρισμός του φορέα πραγματοποιήθηκε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC χρησιμοποιώντας βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης στα 214 nm υπό τις παρακάτω συνθήκες:

- 10-40% CH_3CH/0,1% TFA
- 90-60% H_20/0,1% TFA
- χρόνος έκλουσης: 30 min
- ταχύτητα ροής: 4,7 ml/min
- απόδοση καθαρισμού: 35%

Η ταυτοποίηση του επιθυμητού κλάσματος έγινε με φασματομετρία μάζας ESI-MS **(Σχήμα 8.5)**, ενώ η καθαρότητα επιβεβαιώθηκε με αναλυτική RP-HPLC **(Σχήμα 8.6)**.



Σχήμα 8.5. Φάσμα μάζας ESI του καθαρού N^{ε}-αμινοοξυακέτυλο φορέα SOC_4-I, Ac-$SOC_4(Ac_2Aoa_2)$-NH_2. Ευρεθέν μοριακό βάρος 1371,06, υπολογισθέν 1370,57.



Σχήμα 8.6. Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού N^{ε}-αμινοοξυακέτυλο φορέα SOC_4-I, Ac-SOC_4(Ac_2Aoa_2)-NH_2

8.3.3 Αλδεϋδικό παράγωγο του επιτόπου EC26-2A4-EW

Η αλληλουχία που προκύπτει μετά την οξείδωση είναι:

H-EQELLELDKWK(COCHO)-NH_2

M.B.: 1485,64

M.T.: $C_{67}H_{104}N_{16}O_{22}$

10 mg του καθαρού επιτόπου H-EQELLELDKWK(S)-NH_2 (6,59 μmol) διαλύθηκαν σε 659 μl H_2O σε σφαιρική φιάλη των 25 ml και αραιώθηκαν με 5,27 ml ρυθμιστικού διαλύματος ιμιδαζολίου-HCl pH 6,9. Στο υπό ανάδευση διάλυμα προστέθηκε διάλυμα $NaIO_4$ (1,69 mg, 7,9 μmol) (× 1,2 περίσσεια) σε 658 μl H_2O. Η αντίδραση οξείδωσης αφέθηκε για 5 min και τερματίστηκε με την προσθήκη 158 μl (15,8 μmol) διαλύματος αιθυλενογλυκόλης 100 mM.

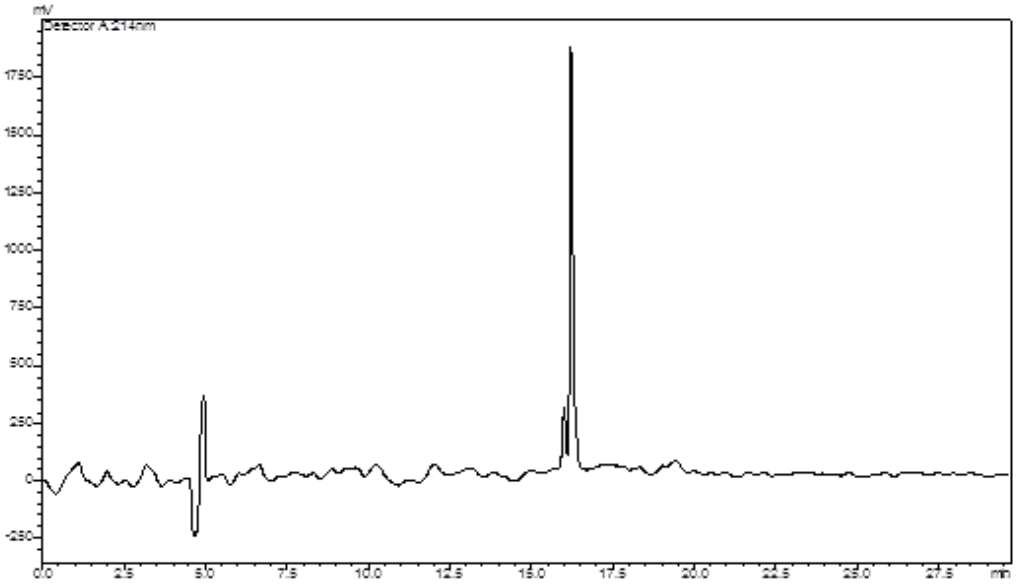
Η απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος έγινε, μετά από κατάλληλη αραίωση, με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC (2 ενέσεις) χρησιμοποιώντας βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης στα 214 nm υπό τις παρακάτω συνθήκες:

- 10-60% CH_3CH/0,1% TFA
- 90-40% H_20/0,1% TFA
- χρόνος έκλουσης: 30 min
- ταχύτητα ροής: 4,7 ml/min
- απόδοση καθαρισμού: 60%

Η ταυτοποίηση του επιθυμητού κλάσματος έγινε με φασματομετρία μάζας ESI-MS **(Σχήμα 8.7)**, ενώ η καθαρότητα επιβεβαιώθηκε με αναλυτική RP-HPLC **(Σχήμα 8.8)**. Το επιθυμητό προϊόν ανιχνεύεται ως μία κορυφή στην RP-HPLC, ενώ κατά την ταυτοποίηση με ESI-MS εμφανίζει δύο κορυφές, μία που αντιστοιχεί στο επιθυμητό πεπτίδιο και μία που διαφέρει κατά +18Da από αυτό. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στην ισορροπία μεταξύ της αλδεΰδης και της ένυδρης μορφής της, μιας διόλης σε υδατικό διάλυμα.

Η πορεία οξείδωσης επαναλήφθηκε ώστε να συλλεχθεί επαρκής ποσότητα για την χημειοεκλεκτική σύνδεση με το φορέα.

Σχήμα 8.7. Φάσμα μάζας ESI του καθαρού αλδεϋδικού παραγώγου του επιτόπου EC26-2A4-EW . Ευρεθέν μοριακό βάρος 1486,77, υπολογισθέν 1485,64 (κόκκινα χρωματισμένα μοριακά ιόντα). Τα πράσινα χρωματισμένα μοριακά ιόντα αντιστοιχούν στην ένυδρη μορφή της αλδεΰδης (+18 Da).



Σχήμα 8.8. Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού αλδεϋδικού παραγώγου του επιτόπου EC26-2A4-EW.

8.3.4 Αλδεϋδικό παράγωγο του επιτόπου EC26-2A4-NK

Η αλληλουχία του επιτόπου μετά την οξείδωση είναι:

H-NEQELLELDKK(COCHO)-NH_2

M.B.: 1413,53

M.T.: $C_{60}H_{100}N_{16}O_{23}$

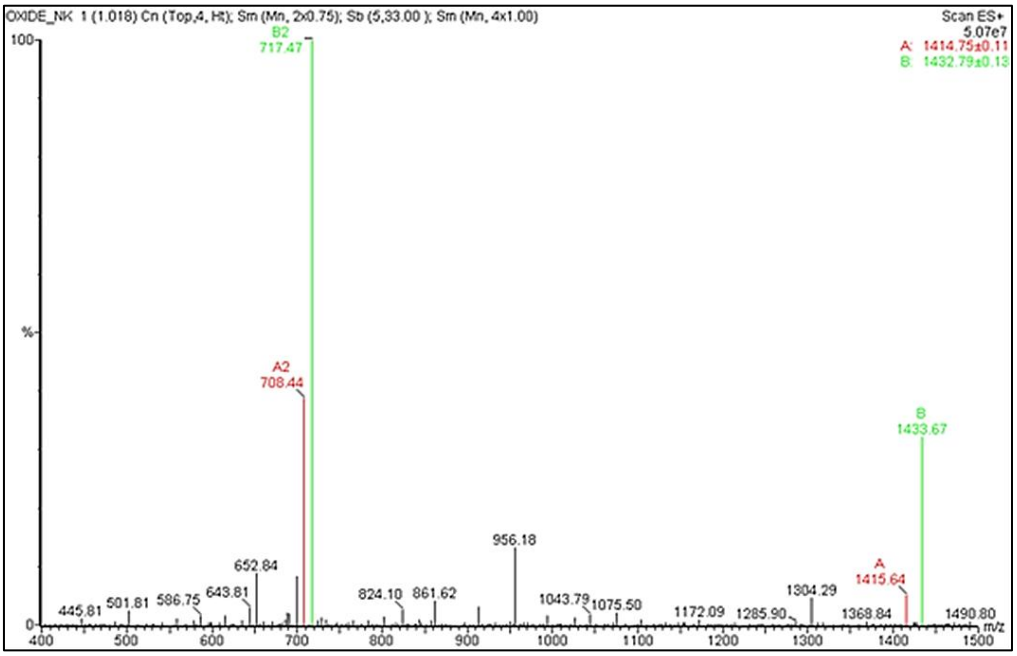
10 mg του καθαρού επιτόπου H-NEQELLELDKK(S)-NH_2 (6,92 μmol) διαλύθηκαν σε 692 μl H_2O σε σφαιρική φιάλη των 25 ml και αραιώθηκαν με 5,54 ml ρυθμιστικού διαλύματος ιμιδαζολίου-HCl pH 6,9. Στο υπό ανάδευση διάλυμα προστέθηκε διάλυμα $NaIO_4$ (1,78 mg, 8,3 μmol) (× 1,2 περίσσεια) σε 692 μl H_2O. Η αντίδραση οξείδωσης αφέθηκε για 5 min και τερματίστηκε με την προσθήκη 166 μl (16,6 μmol) διαλύματος αιθυλενογλυκόλης 100 mM.

Η πορεία οξείδωσης επαναλήφθηκε ώστε να συλλεχθεί επαρκής ποσότητα για την χημειοεκλεκτική σύνδεση με το φορέα.

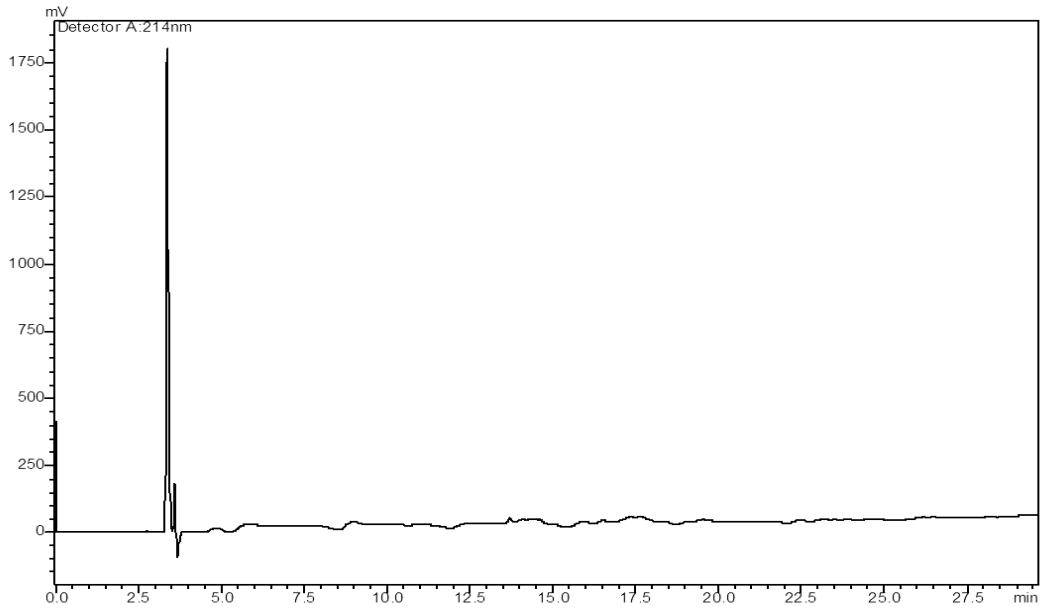
Η απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος, μετά από κατάλληλη αραίωση, έγινε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC (2 ενέσεις) χρησιμοποιώντας βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης στα 214 nm υπό τις παρακάτω συνθήκες:

- 10-60% CH_3CH/0,1% TFA
- 90-40% H_20/0,1% TFA
- χρόνος έκλουσης: 30 min
- ταχύτητα ροής: 4,7 ml/min
- απόδοση καθαρισμού: 60%

Η ταυτοποίηση του επιθυμητού κλάσματος έγινε με φασματομετρία μάζας ESI-MS **(Σχήμα 8.9)**, ενώ η καθαρότητα επιβεβαιώθηκε με αναλυτική RP-HPLC **(Σχήμα 8.10)**.



Σχήμα 8.9. Φάσμα μάζας ESI του καθαρού αλδεϋδικού παραγώγου του επιτόπου EC26-2A4-NK. Ευρεθέν μοριακό βάρος 1414,75, υπολογισθέν 1413,53 (κόκκινα χρωματισμένα μοριακά ιόντα). Τα πράσινα χρωματισμένα μοριακά ιόντα αντιστοιχούν στην ένυδρη μορφή της αλδεΰδης (+18 Da).



Σχήμα 8.10. Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού αλδεϋδικού παραγώγου του επιτόπου EC26-2A4-NK.

8.4.5 Αλδεϋδικό παράγωγο του επιτόπου EC26-2A4

Η αλληλουχία που προκύπτει μετά την οξείδωση του επιτόπου είναι:

H-IEESQNQQEKNEQELLELDKWKASLWNWFDK(COCHO)-NH_2

M.B.: 3834,08

M.T.: $C_{171}H_{250}N_{44}O_{57}$

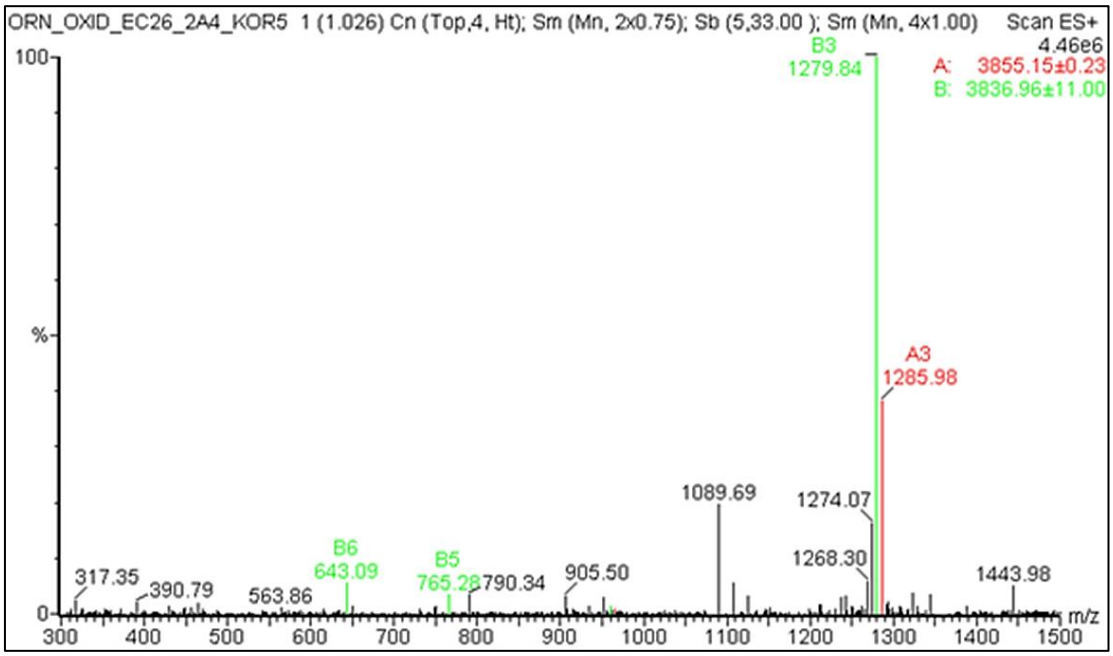
8 mg του καθαρού επιτόπου EC26-2A4 (2 μmol) διαλύθηκαν σε 200 μl H_2O σε σφαιρική φιάλη των 25 ml και αραιώθηκαν με 1,6 ml ρυθμιστικού διαλύματος ιμιδαζολίου-HCl pH 6,9. Στο υπό ανάδευση διάλυμα προστέθηκε διάλυμα $NaIO_4$ (0,86 mg, 4 μmol) (× 2 περίσσεια) σε 200 μl H_2O. Η αντίδραση οξείδωσης αφέθηκε για 6 min και τερματίστηκε με την προσθήκη 80 μl (8 μmol) διαλύματος αιθυλενογλυκόλης 100 mM.

Η πορεία οξείδωσης επαναλήφθηκε ώστε να συλλεχθεί επαρκής ποσότητα για την χημειοεκλεκτική σύνδεση με το φορέα.

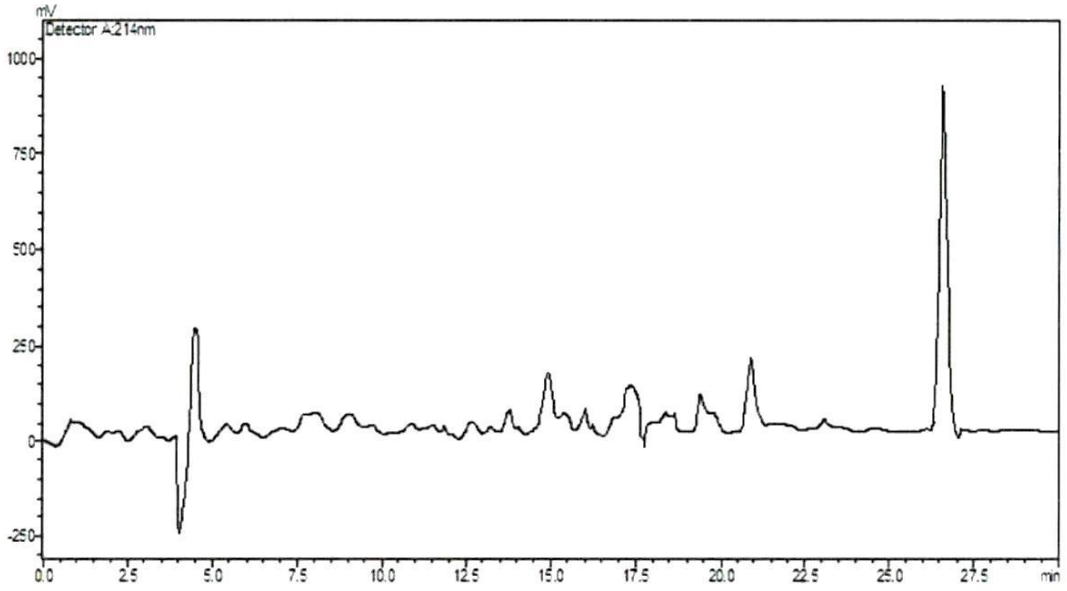
Η απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος, μετά από κατάλληλη αραίωση, έγινε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC (2 ενέσεις) χρησιμοποιώντας βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης στα 214 nm υπό τις παρακάτω συνθήκες:

- 30-60% CH_3CH/0,1% TFA
- 70-40% H_20/0,1% TFA
- χρόνος έκλουσης: 30 min
- ταχύτητα ροής: 4,7 ml/min
- απόδοση καθαρισμού: 58%

Η ταυτοποίηση του επιθυμητού κλάσματος έγινε με φασματομετρία μάζας ESI-MS **(Σχήμα 8.11)**, ενώ η καθαρότητα επιβεβαιώθηκε με αναλυτική RP-HPLC **(Σχήμα 8.12)**.



Σχήμα 8.11. Φάσμα μάζας ESI του καθαρού αλδεϋδικού παραγώγου του επιτόπου EC26-2A4. Ευρεθέν μοριακό βάρος 3836,96, υπολογισθέν 3834,08 (πράσινα χρωματισμένα μοριακά ιόντα). Τα κόκκινα χρωματισμένα μοριακά ιόντα αντιστοιχούν στην ένυδρη μορφή της αλδεΰδης (+18 Da).



Σχήμα 8.12. Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού αλδεϋδικού παραγώγου του επιτόπου EC26-2A4.

8.4.6 Αλδεϋδικό παράγωγο του τριπεπτιδίου Lys-Ala-Arg-NH_2

Η αλληλουχία του πεπτιδίου μετά την οξείδωση είναι:

Ac-Lys(COCHO)-Ala-Arg-NH_2

M.B.: 470,52

M.T.: $C_{19}H_{34}N_8O_6$

5 mg του καθαρού πεπτιδίου Ac-Lys(Ser)-Ala-Arg-NH_2 (10 μmol) διαλύθηκαν σε 1 ml H_2O σε σφαιρική φιάλη των 25 ml και αραιώθηκαν με 8 ml ρυθμιστικού διαλύματος ιμιδαζολίου-HCl pH 6,9. Στο υπό ανάδευση διάλυμα προστέθηκε διάλυμα $NaIO_4$ (2,57 mg, 12 μmol) (× 1,2 περίσσεια) σε 1 ml H_2O. Η αντίδραση οξείδωσης αφέθηκε για 3 min και τερματίστηκε με την προσθήκη 240 μl (24 μmol) διαλύματος αιθυλενογλυκόλης 100 mM.

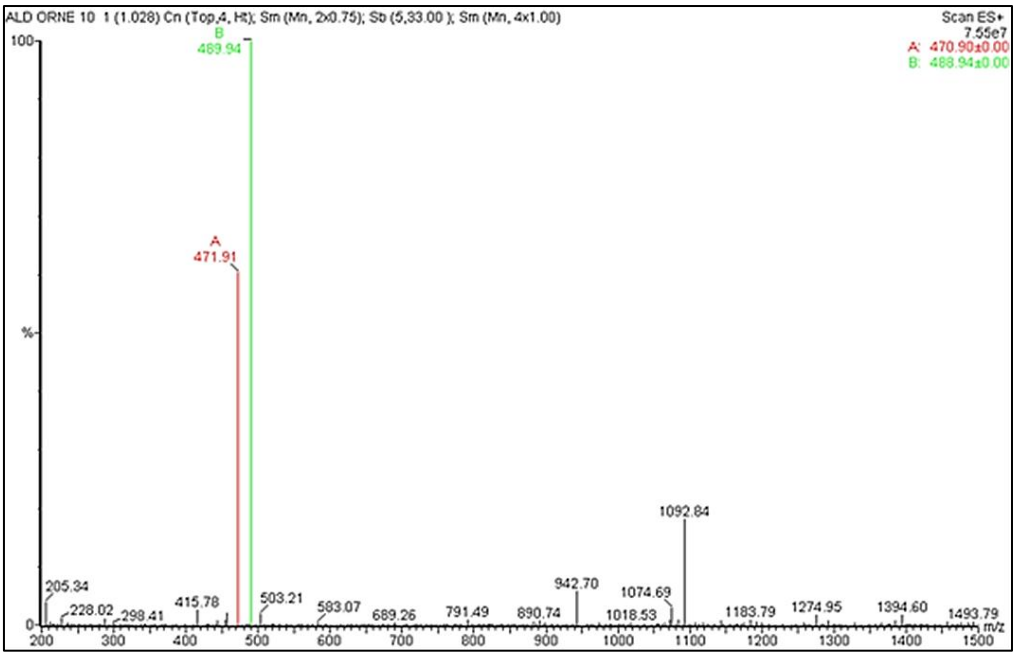
Η πορεία οξείδωσης επαναλήφθηκε ώστε να συλλεχθεί επαρκής ποσότητα για την χημειοεκλεκτική σύνδεση με το φορέα.

Η απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος, μετά από κατάλληλη αραίωση, έγινε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC (2 ενέσεις) χρησιμοποιώντας βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης στα 214 nm υπό τις παρακάτω συνθήκες:

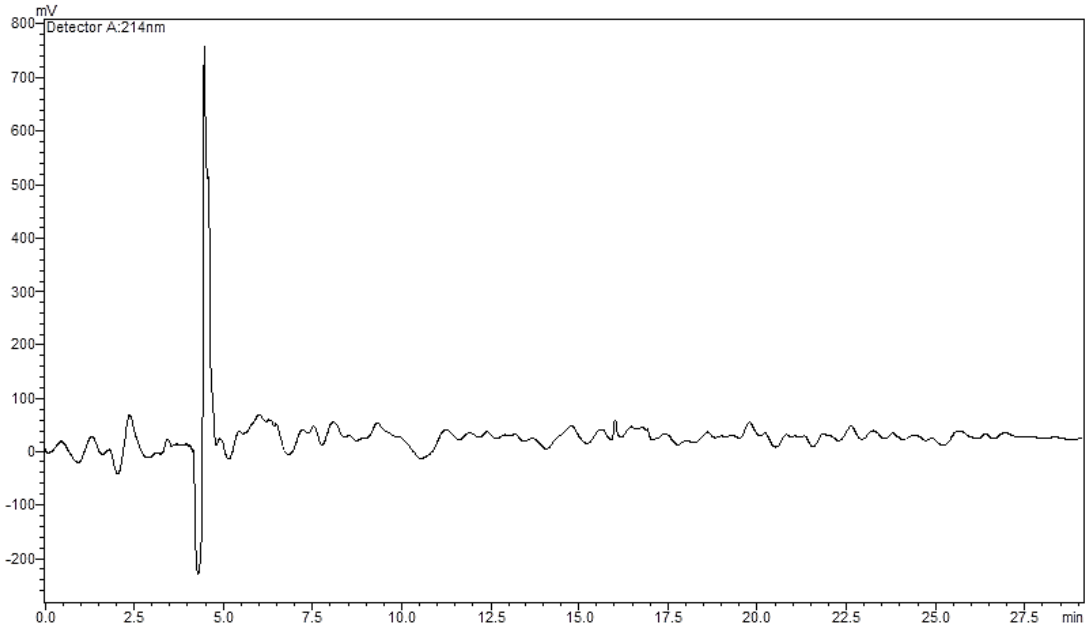
- 10-60% CH_3CH/0,1% TFA
- 90-40% H_20/0,1% TFA
- χρόνος έκλουσης: 30 min
- ταχύτητα ροής: 4,7 ml/min
- απόδοση καθαρισμού: 326%

Η ταυτοποίηση του επιθυμητού κλάσματος έγινε με φασματομετρία μάζας ESI-MS **(Σχήμα 8.13)**, ενώ η καθαρότητα επιβεβαιώθηκε με αναλυτική RP-HPLC **(Σχήμα 8.14)**.

Η απόδοση του αλδεϋδικού παραγώγου βρέθηκε ιδιαίτερα αυξημένη, πιθανώς λόγω δέσμευσης μορίων νερού από το πεπτίδιο. Επιπλέον, στη στερεή του μορφή ήταν ιδιαίτερα κολλώδες, με αποτέλεσμα να μην λαμβάνονται σωστά αποτελέσματα κατά τη ζύγιση. Έγιναν προσπάθειες βελτίωσης της μορφής του πεπτιδίου, είτε τροποποιώντας το πρωτόκολλο οξείδωσης, είτε επιχειρώντας την καλύτερη ξήρανση του πεπτιδίου (αύξηση χρόνου λυοφιλοποίησης, τοποθέτηση σε ξηραντήρα κενού με P_2O_5), χωρίς αποτέλεσμα. Ωστόσο, σε μεγάλη βελτίωση της μορφής του πεπτιδίου οδήγησε η διαδικασία που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 9 (9.6).



Σχήμα 8.13. Φάσμα μάζας ESI του καθαρού αλδεϋδικού παραγώγου Ac-Lys(COCHO)-Ala-Arg-NH_2. Ευρεθέν μοριακό βάρος 470,90 υπολογισθέν 470,52 (κόκκινα χρωματισμένα μοριακά ιόντα). Τα πράσινα χρωματισμένα μοριακά ιόντα αντιστοιχούν στην ένυδρη μορφή της αλδεΰδης (+18 Da).



Σχήμα 8.14. Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του πεπτιδίου Ac-Lys(COCHO)-Ala-Arg-NH_2.

Κεφάλαιο 9

Χημειοεκλεκτική σύνδεση πεπτιδίων-SOC_4

9.1 Εισαγωγή

Παρασκευάσθηκαν με χημειοεκλεκτική σύνδεση μέσω δεσμού οξίμης μεταξύ του N^{ε}-αμινοοξυακέτυλο φορέα SOC_4-I και των αλδεϋδικών παραγώγων των επιτόπων EC26-2A4-EW, EC26-2A4-NK και EC26-2A4, όπως και του τριπεπτιδίου Lys-Ala-Arg-NH_2, τα παρακάτω πεπτιδικά ανάλογα:

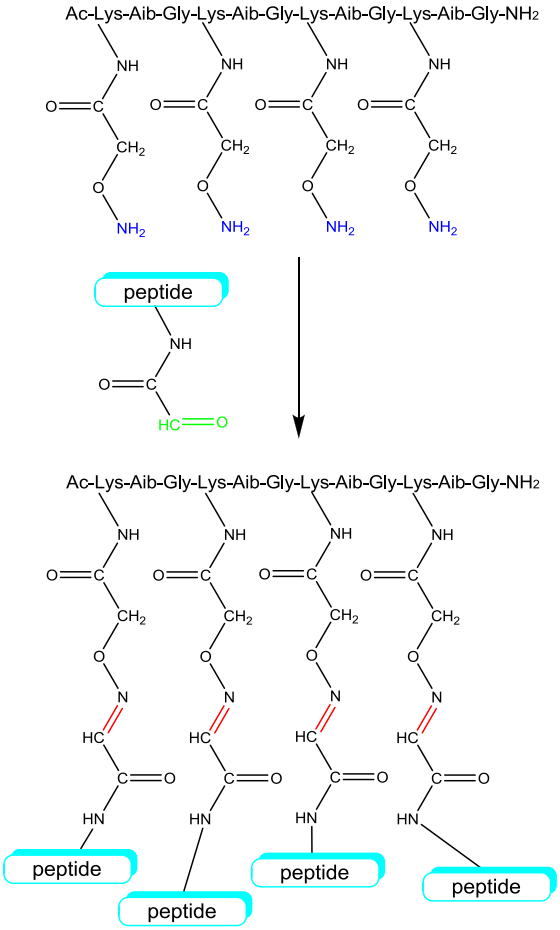
1. **Ac-SOC_4-[EQELLELDKWK(CH=N-O)]$_4$-NH_2**
2. **Ac-SOC_4-[NEQELLELDKK(CH=N-O)]$_4$-NH_2**
3. **Ac-SOC_4{Ac_2,[IEESQNQQEKNEQELLELDKWKASLWNWFD K(CH=N-O)]$_2$}-NH_2**
4. **Ac-SOC_4-[Ac-Lys(CH=N-O)-Ala-Arg]$_4$-NH_2**

9.2 Χημειοεκλεκτική σύνδεση σε υγρή φάση-Σχηματισμός δεσμού οξίμης

Η χημειοεκλεκτική σύνδεση του N^{ε}-αμινοοξυακέτυλο φορέα SOC_4-I με τα αλδεϋδικά παράγωγα μέσω σχηματισμού δεσμού οξίμης **(Σχήμα 9.1)** πραγματοποιήθηκε σε υγρή φάση. Ουσιαστικά, πραγματοποιείται αντίδραση μεταξύ της αλδεϋδικής ομάδας στην παράπλευρη αλυσίδα της C-τελικής λυσίνης των επιτόπων της gp41 και της αμινοοξυακετυλομάδας του φορέα SOC_4-I.

Κατά την πορεία που ακολουθείται για την χημειοεκλεκτική αντίδραση σχηματισμού δεσμού οξίμης, σε σφαιρική φιάλη (25 ml) εισάγεται ποσότητα αλδεϋδικού παραγώγου και διαλύεται σε όγκο H_2O, ώστε να προκύψει διάλυμα 10 mM. Το αλδεϋδικό παράγωγο βρίσκεται πάντα σε περίσσεια (×1,5) ως προς την αμινοοξυακετυλομάδα του φορέα SOC_4-I. Το διάλυμα αραιώνεται με εξαπλάσια ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος 0,1 M οξικού οξέος-οξικού νατρίου pH 4,6 και στη συνέχεια προστίθεται κατάλληλη ποσότητα υδατικού διαλύματος N^{ε}-αμινοοξυακέτυλο φορέα SOC_4-I (10 mM), ώστε να ικανοποιείται η συνθήκη: ***μmol αλδεΰδης = μmol φορέα × 4 (ή 2) × 1,5.*** Η αντίδραση ευνοείται σε θερμοκρασία ~35^{o}C (η σφαιρική τοποθετείται σε υδρόλουτρο) και η πορεία της ελέγχεται με φασματομετρία μάζας ESI-MS. Για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση σε ικανοποιητική απόδοση απαιτούνται 48 έως 120 ώρες, ανάλογα με την αλληλουχία του πεπτιδίου. Η απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος επιτυγχάνεται με απευθείας ένεση του διαλύματος της αντίδρασης σε ημιπαρασκευαστική RP-HPLC (αφού προηγουμένως γίνουν οι

κατάλληλες αραιώσεις με τους διαλύτες που χρησιμοποιούνται κατά τον καθαρισμό), όπου συλλέγονται τα κλάσματα και μετά από ταυτοποίηση με ESI-MS, το επιθυμητό κλάσμα παραλαμβάνεται σε στερεή μορφή μετά από λυοφιλοποίηση.



Σχήμα 9.1. Χημειοεκλεκτική σύνδεση αλδεϋδικού παραγώγου-φορέα μέσω σχηματισμού δεσμού οξίμης

Με βάση τη βιβλιογραφία, η χημειοεκλεκτική αντίδραση σχηματισμού δεσμού οξίμης πραγματοποιείται τόσο σε ελαφρώς όξινο (pH 4,6) όσο και σε πολύ όξινο (pH ~2) υδατικό περιβάλλον. Ως διαλύτης χρησιμοποιείται συνήθως το ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος-οξικού νατρίου ή αραιό υδατικό διάλυμα (0,1%) τριφθοροξικού οξέος. Η επιλογή του διαλύτη ή του μίγματος διαλυτών όπου θα λάβει χώρα η αντίδραση εξαρτάται σε πολύ μεγάλο βαθμό από την διαλυτότητα των πεπτιδικών τμημάτων που πρόκειται να συμπλεχθούν. Συνήθως, σε δυσδιάλυτα πεπτίδια χρησιμοποιούνται οργανικοί διαλύτες (π.χ. CH_3CN) ως συνδιαλύτες.

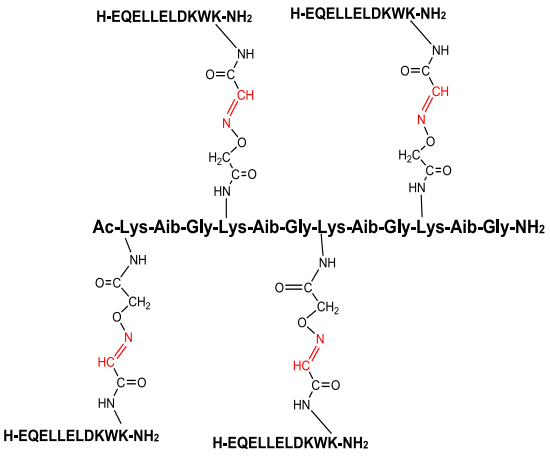
Το πρωτόκολλο της αντίδρασης τροποποιείται ανάλογα με το βαθμό διαλυτότητας του κάθε πεπτιδίου που συμμετέχει στην χημειοεκλεκτική αντίδραση, όπως θα διαπιστωθεί και στη συνέχεια.

9.2.1 Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος

- **Διάλυμα Α** (υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0,2 M): σε ογκομετρική φιάλη των 250 ml εισάγονται 2,89 ml πυκνού οξικού οξέος και συμπληρώνεται με H_2O
- **Διάλυμα Β** (υδατικό διάλυμα οξικού νατρίου 0,2 M): σε ογκομετρική φιάλη των 250 ml εισάγονται 4,1 g πυκνού οξικού νατρίου και συμπληρώνεται με H_2O
- **Ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος-οξικού νατρίου 0,1 M, pH 4,6:** 25,5 ml διαλύματος Α και 24,5 ml διαλύματος Β εισάγονται σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml και ο όγκος συμπληρώνεται με H_2O

9.3 Σύνθεση του πεπτιδικού αναλόγου

Ac-SOC$_4$-[EC26-2A4-EW-K(CH=N-O)]$_4$-NH$_2$



M.B.: 7303,10

M.T.: $C_{326}H_{513}N_{85}O_{105}$

11,14 mg αλδεϋδικού παραγώγου του επιτόπου H-EQELLELDKWK(COCHO)-NH_2 (7,5 μmol) διαλύθηκαν σε 700 μl H_2O/0,1% TFA και 300 μl CH_3CN/0,1% TFA σε σφαιρική φιάλη των 10 ml η οποία ήταν τοποθετημένη σε υδρόλουτρο 35-37 ^oC. Στο υπό ανάδευση διάλυμα προστέθηκε διάλυμα του N^{ε}-αμινοοξυακέτυλο φορέα SOC_4-I (1,79 mg,

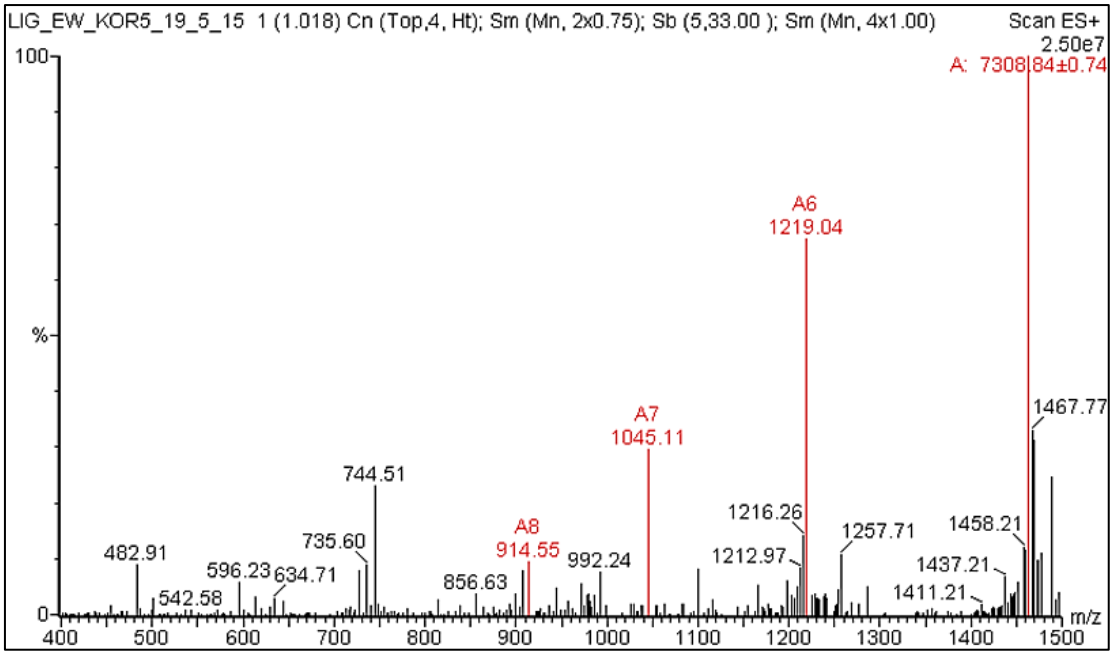
1,25 μmol) σε 125 μl H_2O. Η σφαιρική παρέμεινε στο υδρόλουτρο υπό ανάδευση για 4 ημέρες.

Το μίγμα αραιώθηκε με 3,5 ml H2O/0,1% TFA και 0,5 ml CH_3CN/0,1% TFA και το επιθυμητό προϊόν απομονώθηκε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC χρησιμοποιώντας το παρακάτω βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης στα 214 nm, που οδήγησε στον καλύτερο διαχωρισμό:

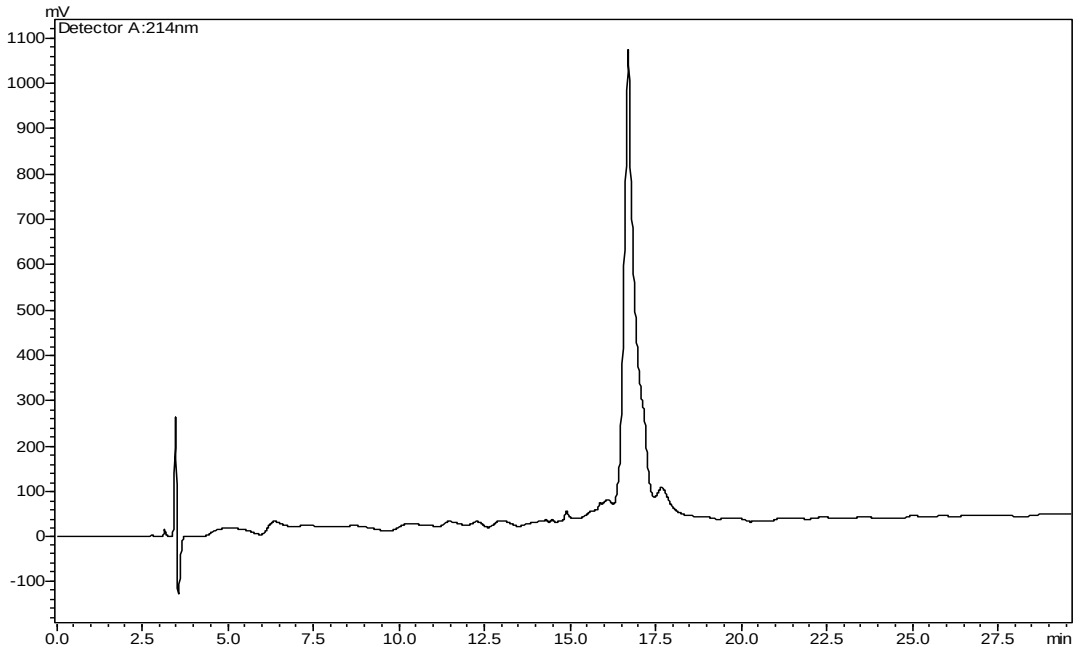
- 10-60% CH_3CH/0,1% TFA
- 90-40% H_20/0,1% TFA
- χρόνος έκλουσης: 30 min
- ταχύτητα ροής: 4,7 ml/min
- απόδοση καθαρισμού: 55%

Η ταυτοποίηση του επιθυμητού κλάσματος έγινε με φασματομετρία μάζας ESI-MS **(Σχήμα 9.2)** και το προϊόν ελήφθη σε στερεή μορφή μετά από λυοφιλοποίηση του κατάλληλου κλάσματος. Η καθαρότητα επιβεβαιώθηκε με αναλυτική RP-HPLC **(Σχήμα 9.3).**

Θα πρέπει να τονιστεί ότι το συγκεκριμένο πεπτίδιο ήταν ιδιαιτέρα δυσδιάλυτο με αποτέλεσμα να είναι αδύνατο να διαλυθεί στη θεωρητική ποσότητα όγκου H_2O (750 μl) και για το λόγο αυτό προστέθηκε αρχικά CH_3CN/0,1% TFA ώστε να διαλυθεί ευκολότερα και στη συνέχεια H_2O/0,1% TFA. Επίσης, κατά την προσθήκη ακόμα και μικρής ποσότητας ρυθμιστικού διαλύματος CH_3COOH-CH_3COONa παρατηρήθηκε έντονο θόλωμα. Επομένως, στις επόμενες χημειοεκλεκτικές αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν δεν προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα παρά μόνο CH_3CN/0,1% TFA (αρχικά) και H_2O/0,1% TFA συνολικού όγκου ~1 ml.



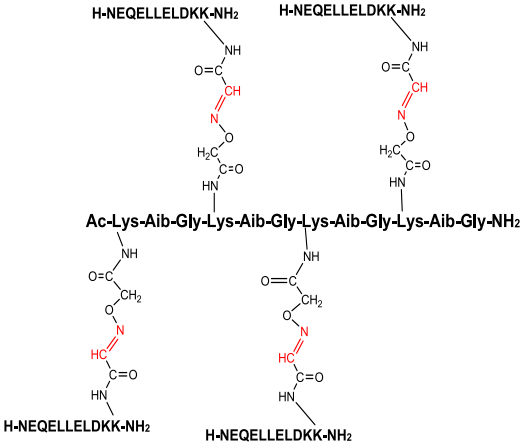
Σχήμα 9.2. Φάσμα μάζας ESI του καθαρού αναλόγου Ac-SOC$_4$-[EC26-2A4-EW-K(CH=N-O)]$_4$-NH$_2$. Ευρεθέν μοριακό βάρος 7308,84, υπολογισθέν 7303,10.



Σχήμα 9.3. Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού πεπτιδικού αναλόγου Ac-SOC$_4$-[EC26-2A4-EW-K(CH=N-O)]$_4$-NH$_2$.

9.4 Σύνθεση του πεπτιδικού αναλόγου

Ac-SOC$_4$-[EC26-2A4-NK-K(CH=N-O)]$_4$-NH$_2$



M.B.: 7014,66

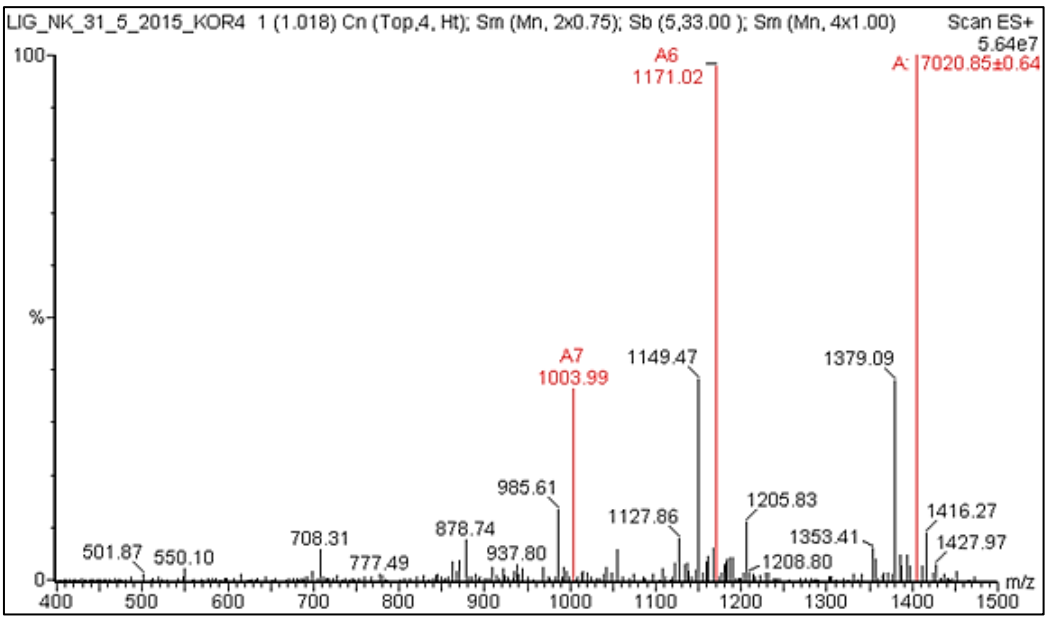
M.T.: $C_{298}H_{497}N_{85}O_{109}$

10,6 mg αλδεϋδικού παραγώγου του επιτόπου H-NEQELLELDKK(COCHO)-NH$_2$ (7,5 μmol) διαλύθηκαν σε 700 μl H$_2$O/0,1% TFA και 300 μl CH$_3$CN/0,1% TFA σε σφαιρική φιάλη των 10 ml η οποία ήταν τοποθετημένη σε υδρόλουτρο 35-37 ^{0}C. Αρχικά προστίθεται CH$_3$CN/0,1% TFA (100 μl) διότι το πεπτίδιο είναι ιδιαιτέρα δυσδιάλυτο. Δεν χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα CH$_3$COOH-CH$_3$COONa, καθώς και αυτό το πεπτίδιο, μετά από δοκιμή, σχημάτισε θόλωμα κατά την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος. Στο υπό ανάδευση διάλυμα προστέθηκε διάλυμα του N$^{\varepsilon}$-αμινοοξυακέτυλο φορέα SOC$_4$-I (1,79 mg, 1,25 μmol) σε 125 μl H$_2$O. Η σφαιρική παρέμεινε στο υδρόλουτρο υπό ανάδευση για 4 ημέρες.

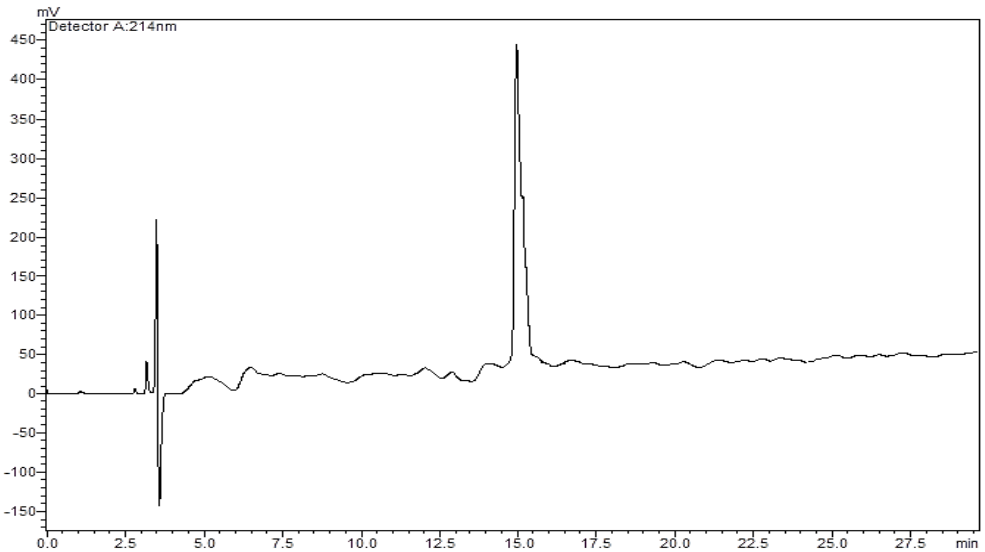
Το μίγμα αραιώθηκε με 3,5 ml H2O/0,1% TFA και 0,5 ml CH$_3$CN/0,1% TFA και το επιθυμητό προϊόν απομονώθηκε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC χρησιμοποιώντας το παρακάτω βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης στα 214 nm, που οδήγησε στον καλύτερο διαχωρισμό:

- 10-60% CH$_3$CH/0,1% TFA
- 90-40% H$_2$0/0,1% TFA
- χρόνος έκλουσης: 30 min
- ταχύτητα ροής: 4,7 ml/min
- απόδοση καθαρισμού: 42%

Η ταυτοποίηση του επιθυμητού κλάσματος έγινε με φασματομετρία μάζας ESI-MS **(Σχήμα 9.4)** και το προϊόν ελήφθη σε στερεή μορφή μετά από λυοφιλοποίηση του κατάλληλου κλάσματος. Η καθαρότητα επιβεβαιώθηκε με αναλυτική RP-HPLC **(Σχήμα 9.5).**



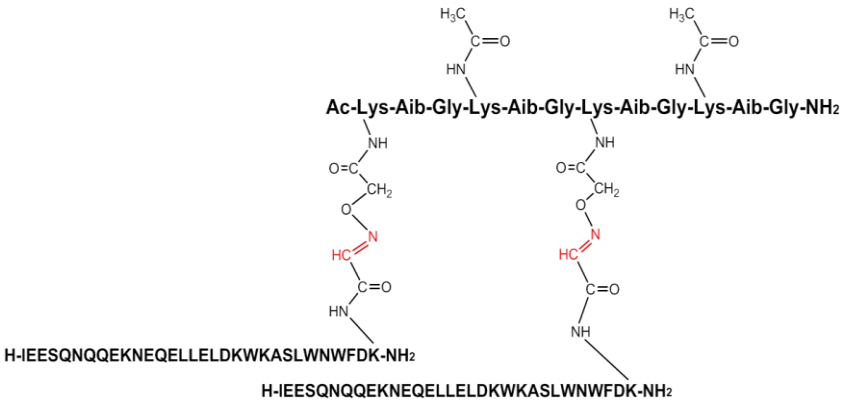
Σχήμα 9.4. Φάσμα μάζας ESI του καθαρού αναλόγου Ac-SOC_4-[EC26-2A4-NK-K(CH=N-O)]$_4$-NH_2. Ευρεθέν μοριακό βάρος 7020,85, υπολογισθέν 7014,66.



Σχήμα 9.5. Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού πεπτιδικού αναλόγου Ac-SOC_4-[EC26-2A4-NK-K(CH=N-O)]$_4$-NH_2.

9.5 Σύνθεση του πεπτιδικού αναλόγου

Ac-SOC$_2$-{Ac$_2$,[EC26-2A4-K(CH=N-O)]$_2$}-NH$_2$



M.B.: 9002,93

M.T.: $C_{400}H_{599}N_{107}O_{131}$

Για την σύνθεση του συγκεκριμένου πεπτιδικού αναλόγου χρησιμοποιήθηκε N^{ε}-αμινοοξυακέτυλο φορέας SOC$_4$-I (Lys^1, Lys^7), με δύο αντίγραφα επίτοπου.

11,5 mg αλδεϋδικού παραγώγου του επιτόπου EC26-2A4 (3 μmol) διαλύθηκαν επιτυχώς σε 300 μl H_2O σε σφαιρική φιάλη των 25 ml η οποία ήταν τοποθετημένη σε υδρόλουτρο 35-37 ^{0}C. Κατά την προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος CH_3COOH-CH_3COONa (1,8 ml) παρατηρήθηκε θόλωμα στο διάλυμα της αντίδρασης και για το λόγο αυτό δεν προστέθηκε άλλη ποσότητα (θεωρητικά 1,8 ml). Προστέθηκαν, συνολικά 400 μl H_2O/0,1% TFA και 400 μl CH_3CN/0,1% TFA, σταδιακά ανά 200 μl, και προέκυψε διαυγές διάλυμα. Στη συνέχεια, στο υπό ανάδευση διάλυμα προστέθηκε διάλυμα του N^{ε}-αμινοοξυακέτυλο φορέα SOC$_4$-I (Lys1, Lys7) (1,37 mg, 1 μmol) σε 100 μl H_2O και παρατηρήθηκε ξανά θόλωμα. Ωστόσο, η σφαιρική παρέμεινε στο υδρόλουτρο υπό ανάδευση για 5 ημέρες.

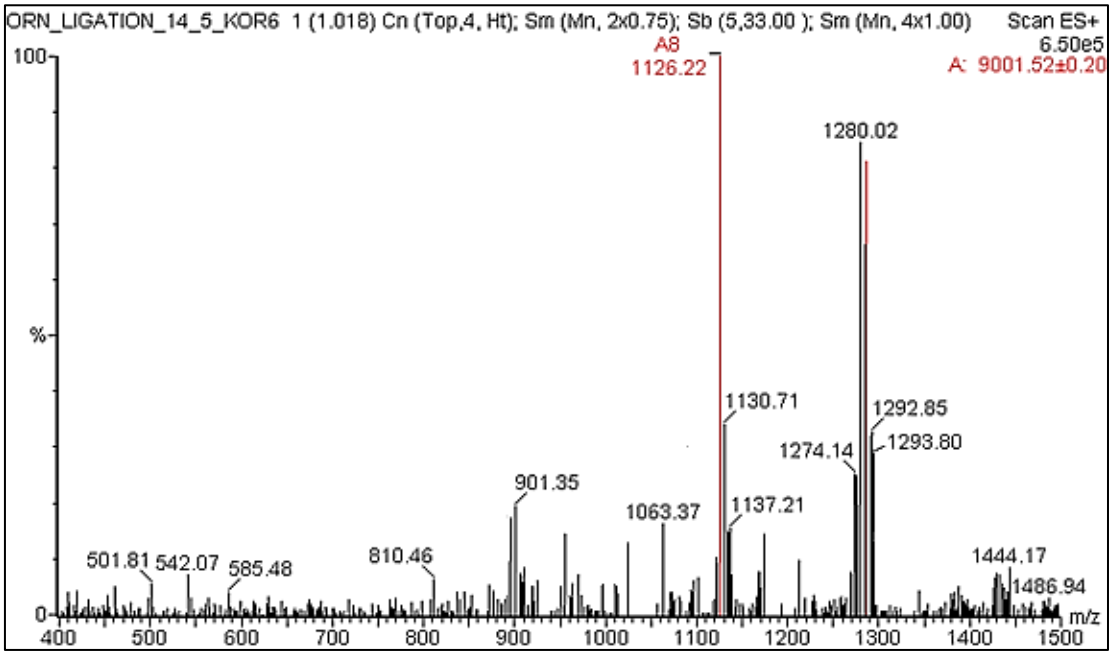
Το μίγμα αραιώθηκε με 5,5 ml H_2O/0,1% TFA και 2 ml CH_3CN/0,1% TFA και το επιθυμητό προϊόν απομονώθηκε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC χρησιμοποιώντας το παρακάτω βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης στα 214 nm, που οδήγησε στον καλύτερο διαχωρισμό:

- 20-60% CH_3CH/0,1% TFA
- 80-40% H_20/0,1% TFA
- χρόνος έκλουσης: 30 min

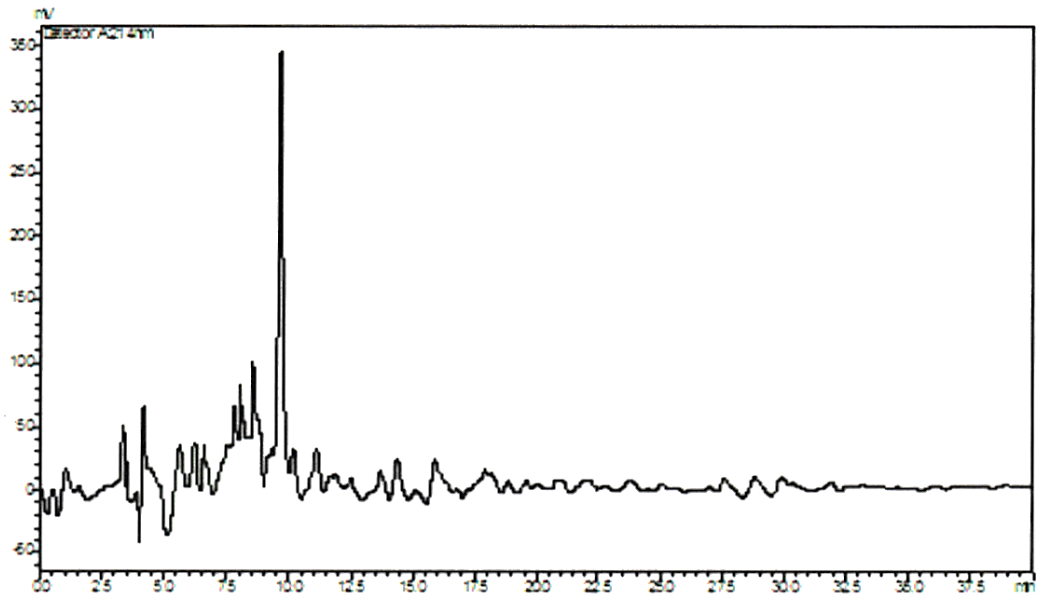
- ταχύτητα ροής: 4,7 ml/min
- απόδοση καθαρισμού: 35%

Η ταυτοποίηση του επιθυμητού κλάσματος έγινε με φασματομετρία μάζας ESI-MS **(Σχήμα 9.6)** και ακολούθησε λυοφιλοποίηση του κατάλληλου κλάσματος. Η καθαρότητα του επιθυμητού προϊόντος επιβεβαιώθηκε με αναλυτική RP-HPLC με βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης 40-60% CH_3CN/0,1%TFA σε H_2O/0,1% TFA, ταχύτητα ροής 1 ml/min για 40 min, ανίχνευση 214 nm **(Σχήμα 9.7)**.

Στις υπόλοιπες αντιδράσεις χημειοεκλεκτικής σύνδεσης δεν προστέθηκε ρυθμιστικό διαλύμα CH_3COOH-CH_3COONa.

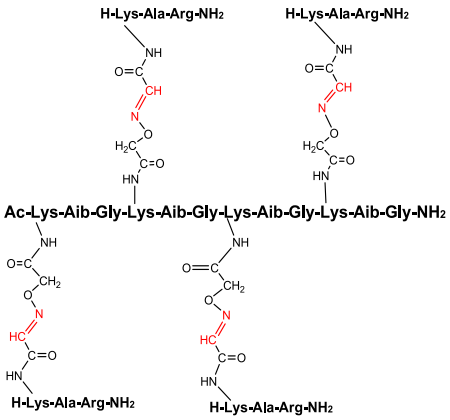


Σχήμα 9.6. Φάσμα μάζας ESI του καθαρού αναλόγου Ac-SOC_2-{Ac_2,[EC26-2A4-K(CH=N-O)]$_2$}-NH_2. Ευρεθέν μοριακό βάρος 9001,52, υπολογισθέν 9002,93.



Σχήμα 9.7. Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού πεπτιδικού αναλόγου Ac-SOC_2-{Ac_2,[EC26-2A4-K(CH=N-O)]$_2$}-NH_2.

9.6 Σύνθεση του πεπτιδικού αναλόγου Ac-SOC_4-[Ac-Lys(CH=N-O)-Ala-Arg]$_4$-NH_2



M.B.: 3242,62

M.T.: $C_{134}H_{233}N_{53}O_{41}$

Για την σύνθεση του πεπτιδικού αναλόγου χρησιμοποιήθηκε περίσσεια (× 4) αλδεϋδικού παράγωγου Ac-Lys(CHOCO)-Ala-Arg-NH_2 λόγω της απόδοσης που

υπολογίστηκε κατά την απομόνωση του (326%). Αρά, ενώ θεωρητικά έπρεπε να προστεθούν 7,06 mg (15 μmol), προστέθηκαν 28,24 mg και διαλύθηκαν σε 1,5 ml H_2O/0,1% TFA σε σφαιρική φιάλη (25 ml), τοποθετημένη σε υδρόλουτρο 35-37 ^{0}C. Το διάλυμα αραιώνεται με 9 ml ρυθμιστικού διαλύματος CH_3COOH-CH_3COONa. Στο υπό ανάδευση διάλυμα προστέθηκε διάλυμα του N^{ε}-αμινοοξυακέτυλο φορέα SOC_4-I (3,6 mg, 2,5 μmol) σε 250 μl H_2O. Η σφαιρική παρέμεινε στο υδρόλουτρο υπό ανάδευση για 48 ώρες.

Το επιθυμητό προϊόν απομονώθηκε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC χρησιμοποιώντας το παρακάτω βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης στα 214 nm:

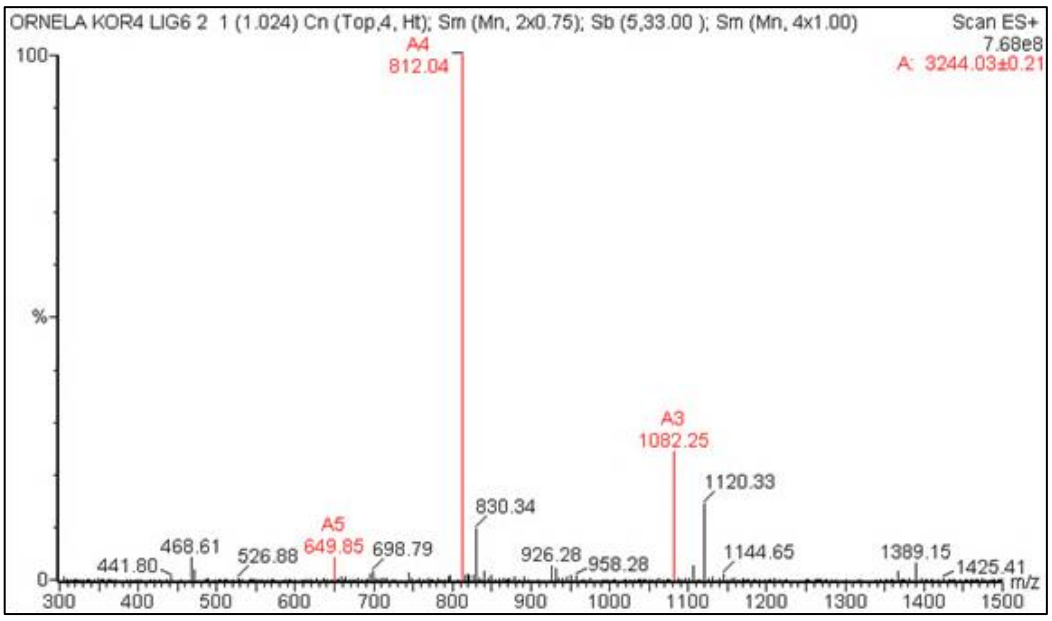
- 10-60% CH_3CH/0,1% TFA
- 90-40% H_20/0,1% TFA
- χρόνος έκλουσης: 30 min
- ταχύτητα ροής: 4,7 ml/min
- απόδοση καθαρισμού: 15%

Η ταυτοποίηση του επιθυμητού κλάσματος έγινε με φασματομετρία μάζας ESI-MS **(Σχήμα 9.8)** και το προϊόν ελήφθη σε στερεή μορφή μετά από λυοφιλοποίηση του κατάλληλου κλάσματος. Η καθαρότητα επιβεβαιώθηκε με αναλυτική RP-HPLC **(Σχήμα 9.9).**

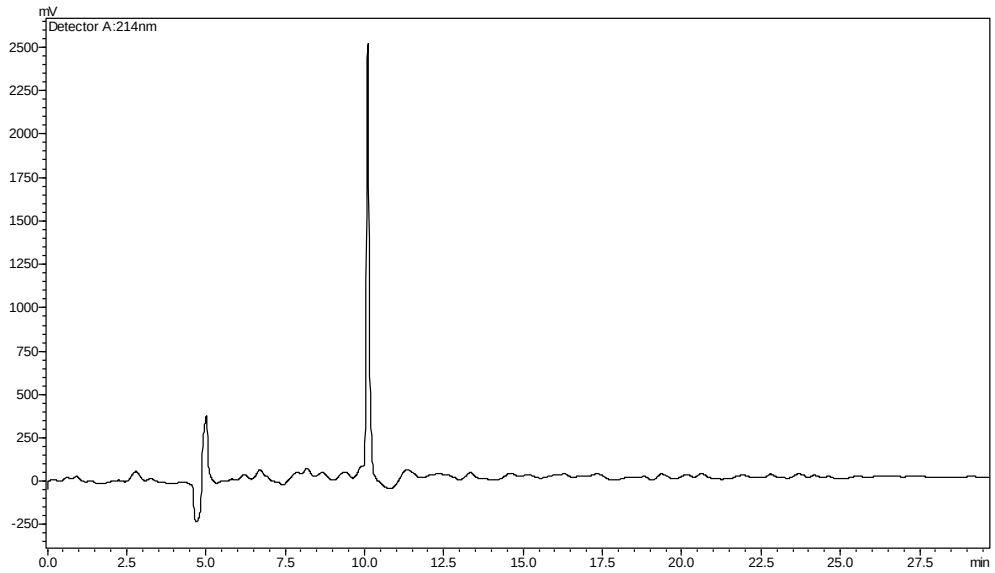
Κατά την απομόνωση των προϊόντων της αντίδρασης στην ημιπαρασκευαστική RP-HPLC, συλλέχθηκε και μία κορυφή που αντιστοιχεί στο αλδεϋδικό παράγωγο και φυλάχθηκε με σκοπό να χρησιμοποιηθεί για την χημειοεκλεκτική αντίδραση με τον φορέα, αφού συλλεχθεί επαρκής ποσότητα. Η χημειοεκλεκτική αντίδραση του φορέα με το προϊόν αυτό, αύξησε την απόδοση της αντίδρασης σύζευξης από 15% στο 45%. Στις επόμενες χημειοεκλεκτικές αντιδράσεις, με στόχο να συλλεχθεί επαρκής ποσότητα συμπλέγματος ακολουθήθηκε η παρακάτω κατεργασία του αλδεϋδικού παράγωγου πριν τη χρήση του στην αντίδραση:

- 28 mg αλδεϋδικού παράγωγου διαλύθηκαν σε 12 ml ρυθμιστικού διαλύματος CH_3COOH-CH_3COONa
- μαγνητική ανάδευση για 24 ώρες σε υδρόλουτρο στους 35 ^{0}C
- απομόνωση των προϊόντων της αντίδρασης με δυο ενέσεις στην RP-HPLC και ταυτοποίηση του επιθυμητού κλάσματος με ESI-MS
- λυοφιλοποίηση του επιθυμητού κλάσματος
- χημειοεκλεκτική αντίδραση

Το αλδεϋδικό προϊόν που προέκυψε είχε πολύ καλύτερη μορφή, χωρίς να είναι κολλώδες. Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε για την χημειοεκλεκτική αντίδραση ήταν ίδια με αυτή που περιγράφηκε παραπάνω. Η κατεργασία αυτή του αλδεϋδικού παραγώγου αύξησε κατά πολύ την απόδοση της χημειοεκλεκτικής αντίδρασης.



Σχήμα 9.8. Φάσμα μάζας ESI του καθαρού αναλόγου Ac-SOC_4-[Ac-Lys(CH=N-O)-Ala-Arg]$_4$-NH_2. Ευρεθέν μοριακό βάρος 3244,03, υπολογισθέν 3242,62.



Σχήμα 9.9. Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού πεπτιδικού αναλόγου Ac-SOC_4-[Ac-Lys(CH=N-O)-Ala-Arg]$_4$-NH_2.

Κεφάλαιο 10

Βιολογικά Πειράματα

10.1 Εισαγωγή

Τα βιολογικά πειράματα της παρούσας εργασίας που αφορούν τον ιό HIV-1 διεξήχθησαν στο Ινστιτούτο Βιοϊατρικής Έρευνας Georg-Speyer-Haus στη Φρανκφούρτη της Γερμανίας, υπό την επίβλεψη της Δρ. Ursula Dietrich.

Βασικός στόχος στην προσπάθεια ανάπτυξης εμβολίου κατά του HIV-1 είναι η επαγωγή ισχυρών εξουδετερωτικών αντισωμάτων (bnAbs) εναντίον του ιού. Οι μηχανισμοί που προκαλούν την παραγωγή των bnAbs σε μία φυσική μόλυνση δεν έχουν ακόμα διευκρινιστεί. Υπάρχουν αποδείξεις που υποδεικνύουν ότι τα περισσότερα ειδικά αντισώματα για τον HIV-1 που επάγονται στα πρώτα στάδια της μόλυνσης αποτυγχάνουν να εξουδετερώσουν μεγάλο φάσμα στελεχών του HIV-1, στρέφοντας έτσι την προσοχή στην μελέτη ασθενών που εμφανίζουν καθυστέρηση στην εξέλιξη της ασθένειας, επιτρέποντας έτσι την επαρκή ωρίμανση της συγγένειας μεταξύ αντιγόνου-αντισώματος. Μια υποομάδα μολυσμένων ατόμων με HIV-1 που μπορεί να ελέγχει την μόλυνση για πολλά χρόνια χωρίς αντιρετροϊκή θεραπεία, διατηρώντας τα επίπεδα του ιικού φορτίου κάτω από τα όρια ανίχνευσης (<50 αντίγραφα/mL) είναι οι elite controllers (ECs) και αποτελούν σημαντική πηγή πληροφοριών προς αυτήν την κατεύθυνση.

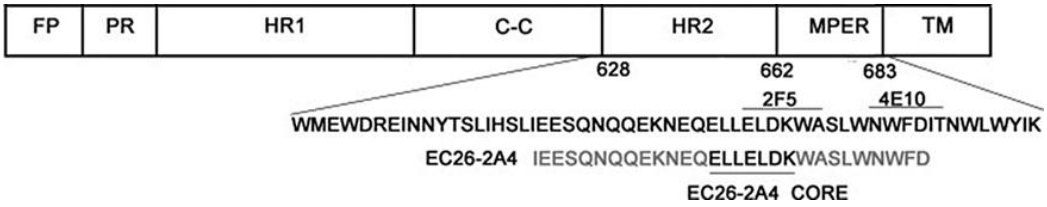
Όσον αφορά τους ECs, η χαρτογράφηση των επιτόπων που αποτελούν στόχο των bnAbs με διασταυρωτή δράση, εξακολουθεί να είναι υποτυπώδης. Η αποκρυπτογράφηση αυτών των επιτόπων είναι σημαντική, δεδομένου ότι μπορεί να αντιπροσωπεύουν ευάλωτα σημεία του φακέλου του HIV-1 και να βοηθήσουν στο σχεδιασμό πιο αποτελεσματικών ανοσογόνων ικανών να επάγουν εξουδετερωτικά αντισώματα μετά από εμβολιασμό.

Στην παρούσα εργασία, οι επίτοποι που μελετήθηκαν εντοπίζονται στην συντηρημένη περιοχή MPER της gp41 στην οποία, σπάνια ανιχνεύονται αντισώματα σε ασθενείς, γεγονός που οφείλεται πιθανότατα σε μηχανισμούς που σχετίζονται με την αντίδραση αυτών των αντισωμάτων με αυτοαντιγόνα [1]. Επιπλέον, κάποιοι επίτοποι της MPER βρίσκονται μόνο παροδικά εκτεθειμένοι εξαιτίας των διαμορφωτικών αλλαγών του φακέλου του ιού κατά την διαδικασία εισόδου του στο κύτταρο. Έτσι, αν και η περιοχή δεν χαρακτηρίζεται από μεγάλη ανοσογονικότητα, τα αντισώματα που στοχεύουν σε αυτή χαρακτηρίζονται ως bnAbs. Κάποια από αυτά, το μονοκλωνικό αντίσωμα 2F5 που αναγνωρίζει τον επίτοπο ^{662}ELDKWA^{666} εξουδετερώνει το 80-100% μεταδιδόμενων υποτύπων του HIV-1 [2] και το μονοκλωνικό αντίσωμα 4E10 που αναγνωρίζει τον επίτοπο ^{671}NWFDIT^{676} εξουδετερώνει περίπου το 100% [3]. Ωστόσο, και τα δύο

εμφανίζουν κάποια μειονεκτήματα, όπως είναι η αντίδραση με αυτοαντιγόνα και το γεγονός ότι ο εμβολιασμός με τους αντίστοιχους επιτόπους, χρησιμοποιώντας διάφορες στρατηγικές, έχει αποτύχει μέχρι στιγμής να προκαλέσει την παραγωγή αντίστοιχων bnAbs in vivo [4].

Η ***επιλογή του πλάσματος EC26*** που χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση επιτόπων του HIV-1, ήταν αποτέλεσμα μελέτης που πραγματοποιήθηκε σε μία μικρή ομάδα ECs, με σκοπό να προσδιοριστεί η εξουδετερωτική ικανότητα του πλάσματος των ασθενών αυτών. Ο προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με την μέτρηση της εξουδετερωτικής δράσης του κάθε πλάσματος σε κύτταρα TZM-bI μολυσμένα με ψευδοϊό. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι το πλάσμα από τον EC26 είχε την καλύτερη εξουδετερωτική δράση απέναντι στα στελέχη του ιού που χρησιμοποιήθηκαν. Στη συνέχεια, επιβεβαιώθηκε το εύρος δράσης των nAbs του πλάσματος EC26 σε διάφορους υποτύπους του HIV (A, B, C και CRF BC). Από τα αποτελέσματα προέκυψε ευρεία εξουδετερωτική δραστηριότητα του πλάσματος EC26, και για το λόγο αυτό επιλέχθηκε το συγκεκριμένο για την ταυτοποίηση των αντίστοιχων επιτόπων που είναι οι στόχοι των bnAbs.

Η ***επιλογή των επιτόπων*** που αναγνωρίζουν bnAbs στο πλάσμα EC26 έγινε με τη βοήθεια της τεχνολογίας παρουσίασης στην επιφάνεια φάγων (phage display technology). Συγκεκριμένα, διαφορετικά πεπτιδικά τμήματα που προέρχονται από ολόκληρη την αλληλουχία της πρόδρομης γλυκοπρωτεΐνης 160 του φακέλου (Env) του HIV-1 κλωνοποιούνται στο φαγικό γονιδίωμα σαν τμήμα του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη του καλύμματος του φάγου pIII. Η διαδικασία της διαλογής (biopanning), ξεκινά με αρνητική διαλογή με ακινητοποιημένα IgGs από πλάσμα αρνητικό σε HIV και ακολουθεί θετική διαλογή της απεμπλουτισμένης βιβλιοθήκης με IgGs από το πλάσμα EC26. Μετά από δύο γύρους αρνητικής και θετικής διαλογής, προέκυψαν 150 κλώνοι φάγων οι οποίοι αναλύθηκαν με ELISA ώστε να καθοριστεί η εξειδικευμένη δέσμευση με τα EC26 IgGs. Οι 22 πιο δραστικοί κλώνοι υποβλήθηκαν σε ανάλυση αλληλουχίας και υστέρα από σύγκριση με την αλληλουχία του φακέλου του HIV-1ADA κατατάχθηκαν σε 5 διακριτές ομάδες. Έτσι επιλέχτηκε ο κλώνος EC26-2A4, που η αλληλουχία του αντιστοιχίζεται στην MPER περιοχή της gp41, μετατοπισμένη προς το N-τελικό άκρο. Η αλληλουχία του κλώνου EC26-2A4 όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 10.1** περιέχει ολόκληρο τον επίτοπο 2F5, ενώ ο επίτοπος 4E10 περιλαμβάνεται εν μέρει στο C-τελικό άκρο.



Εικόνα 10.1. Σχηματική απεικόνιση των επιτόπων EC26-2A4, 2F5 και 4E10 που προκαλούν εξουδετερωτικά αντισώματα στην MPER περιοχή της gp41. Επίσης, διακρίνεται ο πυρήνας του επιτόπου EC26-2A4 που αντιστοιχεί στην ελάχιστη απαραίτητη αλληλουχία που αντιδρά με αντισώματα που έχουν απομονωθεί από το πλάσμα EC26.

Η κεντρική αλληλουχία του επιτόπου EC26-2A4 που αναγνωρίζεται από εξουδετερωτικά αντισώματα χαρακτηρίστηκε λεπτομερώς, συγκρίνοντας την δραστικότητα σε σετ αλληλεπικαλυπτόμενων πεπτιδίων μετατοπισμένων κατά ένα αμινοξύ, με mAb 2F5 και καθαρισμένα EC26-2A4-IgG. Αποδείχθηκε, όπως και από άλλες μελέτες ότι ο βασικός πυρήνας του επιτόπου που αναγνωρίζει το mAb 2F5 είναι η αλληλουχία LDKW, ενώ πυρήνας του επιτόπου για τα EC16-2A4-IgG φαίνεται να είναι η αλληλουχία ^{659}ELLELDKW^{666} που μερικώς επικαλύπτει τον επίτοπο 2F5. Το αμινοξύ W^{666} κρίνεται απαραίτητο για την δραστικότητα με το mAb 2F5, ενώ η απουσία του εξασθενεί την δραστικότητα με το EC26-2A4-IgG, χωρίς ωστόσο, να την καταργεί τελείως. Για τους λόγους αυτούς στην παρούσα εργασία επιλέχτηκαν επιπλέον, οι αλληλουχίες *EQELLELDKW* και *NEQELLELDK* με σκοπό να προσδιοριστεί με μεγαλύτερη ακρίβεια ο βασικός πυρήνας του ισχυρού επίτοπου EC26-2A4.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να μελετηθεί η ανοσογονικότητα των επιτόπων αυτών συζευγμένων με το φορέα SOC_4, ώστε να δημιουργηθεί ένα ισχυρό μοντέλο για την πραγματοποίηση ανοσοποιήσεων. Η πρόσδεση των επιτόπων στον φορέα, επιτρέπει την διατήρηση της αρχικής τους διαμόρφωσης και την παρουσίαση σε περισσότερα αντίγραφα, επάγοντας έτσι ισχυρότερη ανοσολογική απόκριση.

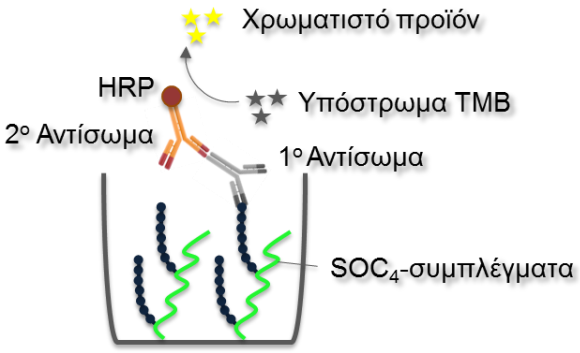
10.2 Πειραματική πορεία ELISA

Τα βιολογικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν με την δοκιμασία ELISA και χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω SOC-συμπλέγματα και ο φορέας SOC_4:

1. **SOC_4-EC26-2A4-EW: Ac-SOC_4-[EQELLELDKWK(CH=N-O)]$_4$-NH_2**
2. **SOC_4-EC26-2A4-NK: Ac-SOC_4-[NEQELLELDKK(CH=N-O)]$_4$-NH_2**
3. **SOC_4-EC26-2A4: Ac-SOC_4{Ac_2,[IEESQNQQEKNEQELLELDKWK ASLWNWFDK(CH=N-O)]$_2$}-NH_2**
4. **Ac-SOC_4-(Ac_4)-NH_2**

Ως αντιγόνα χρησιμοποιήθηκαν τα συμπλέγματα (1), (2) και (3) και ο φορέας (4). Ως δείγματα αρνητικού ελέγχου (negative control) χρησιμοποιήθηκαν οροί από υγιείς δότες.

Πλάκες μικροτιτλοδότησης ELISA 96-φρεατίων επιστρώθηκαν με τα συμπλέγματα (1), (2) και (3) και τον φορέα (4), αραιωμένα σε τελική συγκέντρωση 1ng × μL^{-1} PBS και αφέθηκαν στους 4^{o}C overnight σε ήπια ανακίνηση. Στη συνέχεια, οι πλάκες ξεπλύθηκαν τρεις φορές με 300 μL PBS-T (PBS/ 0.05 % (v/v) Tween 20) και επωάστηκαν με 250 μL MPBS-T (PBS/ 5 % (w/v) Skim Milk Powder/ 0.05 % (v/v) Tween 20) για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου σε ήπια ανακίνηση, έτσι ώστε να δεσμευτούν όλα τα μη ειδικά σημεία πρόσδεσης. Ακολούθησε επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα, δηλαδή τον EC26 ορό αραιωμένο 1:100 σε MPBS-T και με το μονοκλωνικό αντίσωμα 2F5, αραιωμένο 1:1000 σε MPBS-T για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανακίνηση. Ως αρνητικό control χρησιμοποιήθηκαν οροί από 10 υγιείς δότες αραιωμένοι 1:100 σε MPBS-T. Αφού πραγματοποιήθηκαν τρεις εκπλύσεις με 300 μL PBS-T, ακολούθησε επώαση με το συζευγμένο με ένζυμο δευτερογενές αντίσωμα α-human IgG-HRP, αραιωμένο 1:5000 σε PBS-T, για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανακίνηση. Οι πλάκες ξεπλύθηκαν όπως και πριν και η οπτικοποίηση του σήματος επιτεύχθηκε μετά από προσθήκη 60 μL υποστρώματος TMB Peroxidase (3,3’,5,5’ τετραμεθυλβενζιδίνης) για 10 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Στην **Εικόνα 10.2** παρουσιάζεται το περιεχόμενο ενός φρεατίου πλάκας ELISA. Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη 60 μL θειικού οξέος για 2 min σε θερμοκρασία δωματίου και η ανάπτυξη του χρώματος μετρήθηκε φωτομετρικά στα 450 nm.



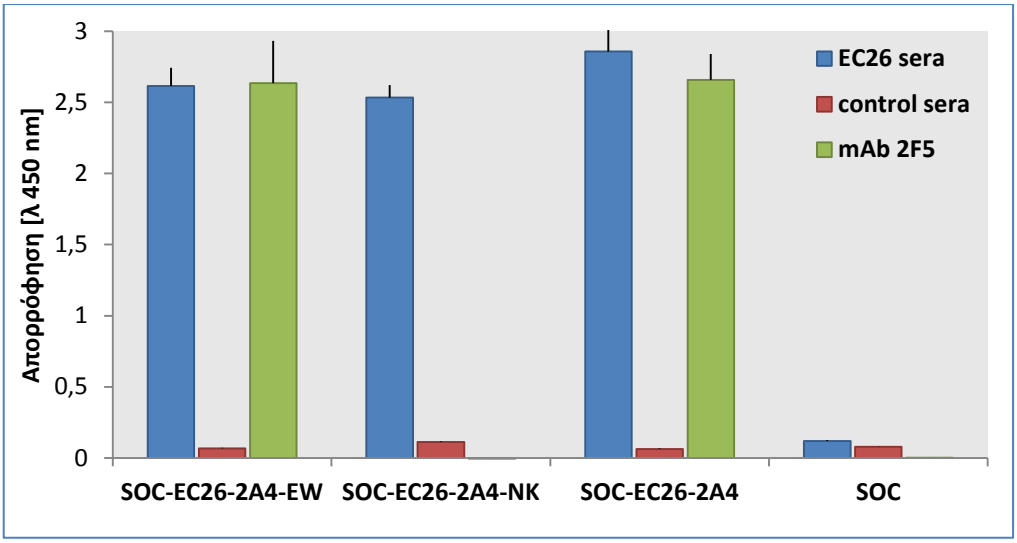
Εικόνα 10.2. Σχηματική αναπαράσταση των αντιδράσεων σε ένα φρεάτιο (well) στην δοκιμασία ELISA.

10.2.1 Δραστικότητα των SOC_4-συμπλεγμάτων με τον ορό EC26 και το mAb 2F5

Τα πειράματα ELISA πραγματοποιήθηκαν με στόχο τη διερεύνηση της δεσμευτικής δραστικότητας των συμπλεγμάτων (1), (2) και (3) με τα αντισώματα που υπήρχαν στον ορό EC26 και με το μονοκλωνικό αντίσωμα 2F5, το οποίο παρουσιάζει μεγάλη εξουδετερωτική δράση.

Τα SOC_4-συμπλέγματα μελετήθηκαν ως προς την δραστικότητα τους με τον ορό EC26, με σκοπό να προσδιοριστεί αν αποτελούν μέρος συντηρημένων επιτόπων της gp41 ικανών να αντιδρούν με αντισώματα που περιέχονται στους ορούς ασθενών. Επιπλέον, διερευνήθηκε η ικανότητα των SOC_4-συμπλεγμάτων να αναγνωρίζονται από εξουδετερωτικά αντισώματα με μεγάλο εύρος δράσης έναντι του HIV-1, όπως το mAb 2F5.

Επίσης, αξιολογήθηκε και η δραστικότητα του φορέα Ac-SOC_4-(Ac_4)-NH_2 με δείγματα ορών και με το mAb 2F5 για να διαπιστωθεί αν παρουσιάζει κάποια δραστικότητα.



Σχήμα 10.1. Δραστικότητα των συμπλεγμάτων (1), (2) και (3) καθώς και του φορέα SOC_4 (4) με τον ορό EC26 και με το μονοκλωνικό αντίσωμα 2F5. Ως δείγματα αρνητικού ελέγχου (negative control) χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρωμένα δείγματα ορών από 10 υγιείς δότες

Από το **Σχήμα 10.1** προκύπτει ότι τα συμπλέγματα SOC4-EC26-2A4-EW (1), SOC_4-EC26-2A4-NK (2) και SOC_4-EC26-2A4 (3) εμφάνισαν παραπλήσια ισχυρή δραστικότητα με τον ορό EC26. Η ισχυρή αντίδραση των συμπλεγμάτων με τον ορό EC26 επιβεβαιώνει την αναγνώριση τους από τα αντισώματα που περιέχονται στον ορό και επομένως, θεωρούμε ότι τα συμπλέγματα είναι ισχυρά ανοσογόνα.

Επιπλέον, τα συμπλέγματα (1) και (3) εμφάνισαν μεγάλη δραστικότητα με το mAb 2F5, γεγονός που υποδηλώνει ότι μπορεί να αποτελέσουν ισχυρά ανοσογόνα, ικανά να επάγουν εξουδετερωτικά αντισώματα κατά του HIV-1. Ωστόσο, το σύμπλεγμα (2) δεν εμφάνισε καμία δραστικότητα με το mAb 2F5, πιθανότατα διότι ο επίτοπος που περιέχει (NEQELL***ELDK)*** δεν περιλαμβάνει ολόκληρη την αλληλουχία που αναγνωρίζει το mAb 2F5 (***ELDKW)***. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την καθοριστική σημασία του αμινοξέος W^{666} για την επαγωγή εξουδετερωτικών αντισωμάτων, αντίστοιχων του mAb 2F5. Επομένως, το σύμπλεγμα (2) αδυνατεί πιθανώς να προκαλέσει την παραγωγή εξουδετερωτικών αντισωμάτων κατά του HIV-1.

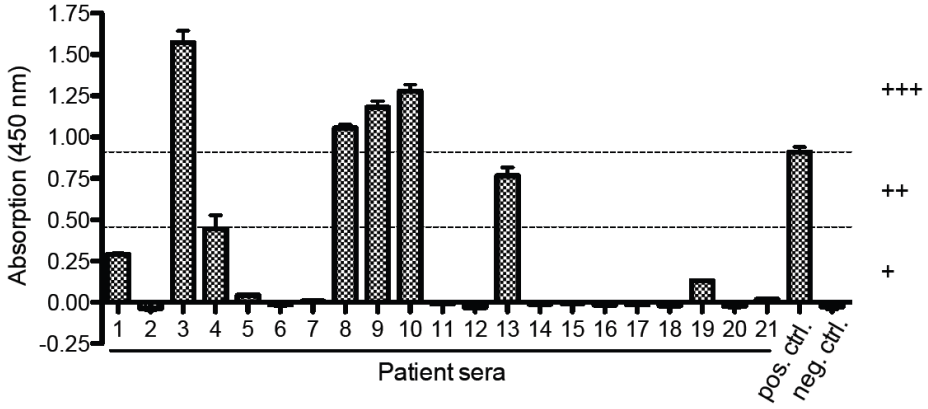
Ο φορέας (4) δεν εμφάνισε καμία σημαντική δραστικότητα ούτε με τον ορό EC26, ούτε με το mAb 2F5.

10.2.2 Αξιολόγηση ειδικών Abs EC26-2A4 στο πλάσμα μολυσμένων ατόμων με HIV-1 που επάγονται από το σύμπλεγμα SOC_4-EC26-2A4 μέσω ELISA

Το σύμπλεγμα SOC_4-EC26-2A4 (3) έδειξε συνολικά την καλύτερη δραστικότητα τόσο με τον ορό EC26, όσο και με το mAb 2F5 και για το λόγο αυτό διερευνήθηκε περαιτέρω η ικανότητα του να αναγνωρίζεται από ένα μεγαλύτερο αριθμό μολυσμένων με HIV-1 ατόμων, ώστε να αξιολογηθεί η ανοσογόνος δράση του σε μεγαλύτερη κλίμακα.

Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα ELISA, στα οποία αναλύθηκε η δραστικότητα μεταξύ του συμπλέγματος SOC_4-EC26-2A4 και των ορών από 147 ασθενείς μολυσμένους με HIV-1.

Η πορεία που ακολουθήθηκε στη δοκιμή ELISA περιγράφηκε παραπάνω. Το σύμπλεγμα (3) χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 0,25 ng × μL^{-1} PBS, ως δείγμα θετικού ελέγχου (positive control) χρησιμοποιήθηκε ο ορός EC26, ενώ ως δείγμα αρνητικού ελέγχου (negative control) οροί από υγιείς δότες. Όλα τα δείγματα ορών ήταν αραιωμένα 1:100 σε MPBS-T.



Tested patient sera	- (λ450 ≤ neg. ctrl)	+ (λ450 ≤ ½ pos. ctrl)	++ (λ450 = pos. ctrl)	+++ (λ450 ≥ pos. ctrl)
147	44	63	15	25

Σχήμα 10.2. Δραστικότητα του συμπλέγματος SOC_4-EC26-2A4 με ορούς 147 ασθενών μολυσμένων με HIV-1. Ισχυρή δραστικότητα μεγαλύτερη του θετικού control υποδεικνύεται με (**+++**), δραστικότητα που είναι ίση με αυτή του θετικού control με (**++)** και η ασθενέστερη δραστικότητα με (**++)**. Η αρνητική δραστικότητα υποδεικνύεται με (**-**) και αντιστοιχεί σε δραστικότητα χαμηλότερη του αρνητικού control.

Από το **Σχήμα 10.2** διαπιστώνουμε ότι το σύμπλεγμα (3) παρουσίασε δραστικότητα με το μεγαλύτερο ποσοστό των δειγμάτων ορών που εξετάσθηκαν. Περίπου το 70% των δειγμάτων έδειξαν ειδική δέσμευση με το σύμπλεγμα (3). Από αυτά τα δεδομένα συμπεραίνουμε ότι το SOC_4-EC26-2A4 αναγνωρίζεται από ειδικά αντισώματα στον ορό ενός αντιπροσωπευτικού ποσοστού μολυσμένων ατόμων και ως εκ τούτου αποτελεί ένα ισχυρό ανοσογόνο το οποίο μπορεί να αποτελέσει την βάση για την ανάπτυξη προστατευτικής ανοσίας κατά τον εμβολιασμό. Το επόμενο βήμα προς αυτή την κατεύθυνση είναι μελέτες σε ζωικά μοντέλα ώστε να διαπιστωθεί η ικανότητα παραγωγής εξουδετερωτικών αντισωμάτων in vivo.

10.3 Μελέτη της ενζυμικής διάσπασης του δεσμού οξίμης στην χημειοεκλεκτική σύνδεση από τα μικροσωμάτια χοιρινού συκωτιού

Από πολλές έρευνες έχει αποδειχθεί η αναγωγή παράγωγων οξίμης στα αντίστοιχα παράγωγα ιμίνης μέσω του ενζυμικού συστήματος των μικροσωματίων χοιρινού συκωτιού που αποτελείται από NADH κυτοχρωμική b5-ρεδουκτάση, κυτόχρωμα b5 και ένα ισοένζυμο του κυτοχρώματος P450 υποοικογένειας 2D (CYP2D). Τα μικροσωμιακά ένζυμα, που περιέχονται στα μικροσωμάτια καταλύουν ένα μεγάλο αριθμό οξειδωτικών, αναγωγικών και υδρολυτικών αντιδράσεων. Στην παρούσα εργασία διερευνάται η ικανότητα διάσπασης του δεσμού οξίμης από το παραπάνω ενζυμικό σύστημα με στόχο την πιθανή εφαρμογή στην ενδοκυττάρια μεταφορά και απελευθέρωση δραστικών βιομορίων και φαρμάκων προσδεδεμένων στον SOC_4-φορέα.

Τα μικροσωμάτια είναι σωματίδια με μορφή κυστιδίων που σχηματίζονται από τμήματα του ενδοπλασματικού δικτύου κατά το σπάσιμο των ευκαρυωτικών κυττάρων στην διαδικασία της ομογενοποίησης. Εξ ορισμού, συνήθως, δεν είναι παρόντα σε ζωντανά κύτταρα. Η απομόνωση τους από τα άλλα οργανίδια του κυττάρου επιτυγχάνεται με διαφορική φυγοκέντρηση. Τα άθραυστα κύτταρα, οι πυρήνες και τα μιτοχόνδρια καθιζάνουν στα 10,000g, ενώ διαλυτά ένζυμα και το κατακερματισμένο ενδοπλασματικό δίκτυο, που περιέχει το κυτόχρωμα P450 παραμένουν στο διάλυμα. Στα 100,000g το ενδοπλασματικό δίκτυο από το οποίο σχηματίζονται τα μικροσωμάτια καθιζάνει, ενώ τα διάφορα διαλυτά ένζυμα παραμένουν στο υπερκείμενο. Τα μικροσωμάτια είναι άφθονα στο ήπαρ ποντικών, χοίρων και ανθρώπων αλλά υπάρχουν και σε όλα τα άλλα όργανα

όπως και σε άλλους οργανισμούς. Έχουν κόκκινο-καφέ χρώμα που οφείλεται στις αιμοπρωτεΐνες, κυτόχρωμα b5 και κυτόχρωμα P450, που περιέχουν.

Τα μικροσωμάτια είναι ένα πολύτιμο εργαλείο για την διερεύνηση του μεταβολισμού διάφορων ενώσεων και των αλληλεπιδράσεων μεταξύ φαρμάκων, καθώς μιμούνται τη δραστηριότητα του ενδοπλασματικού δικτύου in vitro.

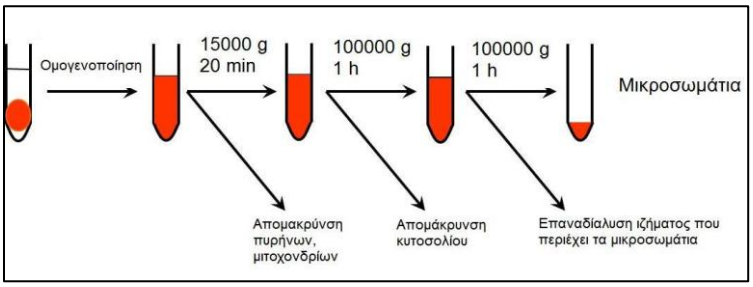
Το χοιρινό συκώτι, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για την απομόνωση των μικροσωματίων, επιλέχθηκε διότι το ενζυμικό σύστημα που περιέχει παρουσιάζει ομοιότητες με το ανθρώπινο CYP450 σύστημα μεταβολισμού [5].

10.3.1 Απομόνωση μικροσωματίων με διαφορική φυγοκέντρηση

Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε για την απομόνωση των μικροσωματίων **(Εικόνα 10.3)**. από το χοιρινό συκώτι είναι η εξής:

- Ομογενοποίηση του συκωτιού σε μπλέντερ με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος K_2HPO_4-KH_2PO_4 pH 7,4 που περιείχε σουκρόζη 0,25M.
- Φυγοκέντρηση στα 15000 g για 20 min, όπου καθιζάνουν οι πυρήνες, τα μιτοχόνδρια, άθραυστα κύτταρα και ιστοί.
- Το υπερκείμενο της προηγούμενης φυγοκέντρησης υπερφυγοκεντρήθηκε στα 100,000g για 60 min. Το υπερκείμενο που περιείχε το κυτοσόλιο απορρίφθηκε, ενώ το ίζημα επαναδιαλύθηκε στο ρυθμιστικό διάλυμα.
- Το ίζημα υπερφυγοκεντρήθηκε ξανά στα 100000 g για 60 min. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε, ενώ το ίζημα που αποτελεί τα μικροσωμάτια επαναδιαλύθηκε στο buffer και ομογενοποιήθηκε, ώστε να προκύψει το τελικό διάλυμα με τα μικροσωμάτια.

Όλες οι διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 0-4 ^oC.



Εικόνα 10.3. Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε για την απομόνωση των μικροσωματίων.

10.3.2 Προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο BCA [6]

Αρχή της μεθόδου

Τα ιόντα Cu^{2+} ανάγονται αρχικά από τις πρωτεΐνες σε αλκαλικό περιβάλλον, προς ιόντα Cu^{+}, κάθε ένα από τα οποία σχηματίζει στη συνέχεια έγχρωμο υδατοδιαλυτό σύμπλοκο με δύο μόρια δισιχρονικού οξέος, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση, το προϊόν της οποίας απορροφά στα 562 nm.

$$\textbf{Πρωτεΐνη (πεπτιδικοί δεσμοί)} + Cu^{2+} \xrightarrow{OH^-} \textbf{τετραχηλικό σύμπλοκο πρωτεΐνης-}Cu^{1+}$$

$$Cu^{1+} + \textbf{2 δισιχρονικό οξύ (BCA)} \longrightarrow \textbf{BCA-}Cu^{1+} \textbf{ (μωβ χρώμα)}$$

Αντιδραστήρια – Όργανα

Ο προσδιορισμός γίνεται με τη χρήση εμπορικής συσκευασίας BCA Protein Assay Kit που περιλαμβάνει τα παρακάτω αντιδραστήρια και με τη βοήθεια των παρακάτω οργάνων:

- *Αντιδραστήριο Α*: Μίγμα ανθρακικού νατρίου, διττανθρακικού νατρίου, δισιχρονικού οξέος και ταρταρικού νατρίου σε 0,2 N NaOH
- *Αντιδραστήριο Β*: Διάλυμα 4% $CuSO_4$
- *Πρότυπο διάλυμα 2 mg/ml BSA σε 0,9% NaCl και 0,05% NaN_3*
- *Πλακίδιο ELISA 96 θέσεων (Sarstedt)*
- *Μετρητής microELISA (Spectra MAX 190, Molecular Devices)*

Διαλύματα εργασίας

- *Διάλυμα εργασίας:* Το διάλυμα εργασίας προκύπτει από την ανάμιξη των αντιδραστηρίων Α και Β σε κατ΄ όγκο αναλογία 50:1. Το αντιδραστήριο παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του
- *Πρότυπα διαλύματα BSA:* Παρασκευάζονται με κατάλληλη αραίωση του διαλύματος 2 mg/ml BSA, έτσι ώστε να προκύψουν τα διαλύματα 0,25, 0,50, 0,75, 1,0, 1,25 και 1,5 mg/ml BSA

Πειραματική πορεία

Σε πλακίδιο ELISA 96 θέσεων τοποθετούνται 20 μl από κάθε πρότυπο διάλυμα BSA (πρότυπη καμπύλη) καθώς και 5 μl δείγματος (μικροσωματίων). Στη συνέχεια, προστίθενται 200 μl του διαλύματος εργασίας σε κάθε θέση του πλακιδίου. Το πλακίδιο ανακινείται ήπια και επωάζεται στους 37^{o}C για 30 min. Έπειτα εισάγεται στον μετρητή microELISA όπου καταγράφεται η απορρόφηση στα 562 nm.

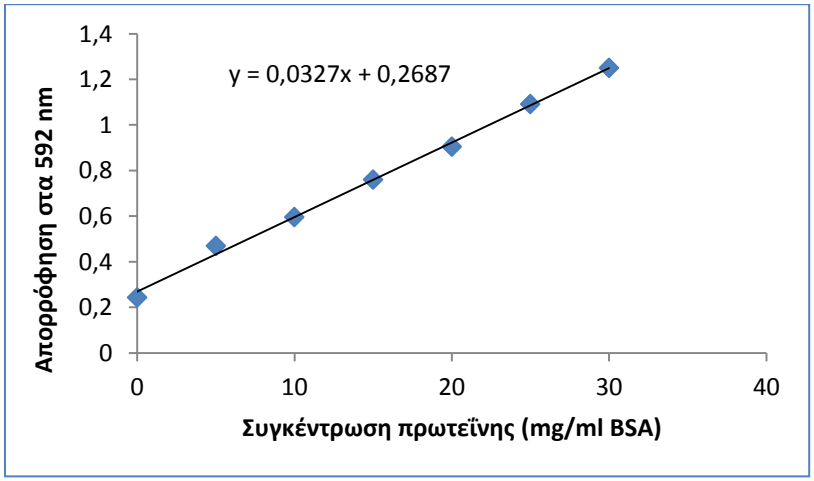
Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Με βάση τις απορροφήσεις των προτύπων δειγμάτων σχεδιάζεται η βέλτιστη ευθεία που έχει στον άξονα των Χ τις συγκεντρώσεις των προτύπων σε BSA και στον άξονα τον Ψ τις απορροφήσεις των προτύπων **(Σχήμα 10.3)**. Από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης:

$$\textit{Απορρόφηση} = \alpha \times \textit{συγκέντρωση} + b$$

όπου a και b οι συντελεστές της ευθείας γραμμής

και από τις απορροφήσεις των δειγμάτων υπολογίζονται τα mg/ml πρωτεΐνης που περιέχουν τα δείγματα.



Σχήμα 10.3. Γραφική παράσταση της πρότυπης καμπύλης της πρωτεΐνης BSA.

Η απορρόφηση του δείγματος μετρηθηκέ 1,219 και η συγκέντρωση της ενεργής μικροσωμιακής πρωτεΐνης υπολογίστηκε ***5,81 μg/μl***.

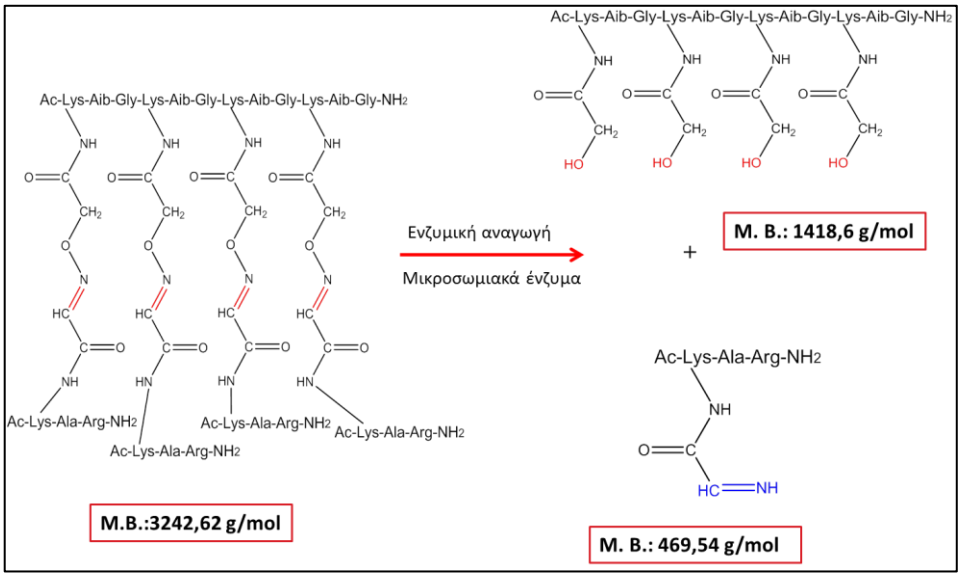
10.3.3 Επώαση του συμπλέγματος Ac-SOC$_4$-[Ac-Lys(CH=N-O)-Ala-Arg]$_4$-NH$_2$ με τα μικροσωμάτια

Για τη μελέτη της ενζυμικής διάσπασης του δεσμού οξίμης στη χημειοεκλεκτική σύνδεση έγινε επώαση του συμπλέγματος Ac-SOC$_4$-[Ac-Lys(CH=N-O)-Ala-Arg]$_4$-NH$_2$ 3 mM με τελικό όγκο διαλύματος 150 μl με 50 μl (290 μg ενεργής πρωτεΐνης) από το διάλυμα των μικροσωματίων σε υδρόλουτρο θερμοκρασίας 37^{o}C (ανά διαστήματα ανάδευση). Η πορεία των αντιδράσεων παρακολουθήθηκε με ESI-MS σε χρονικά διαστήματα των 30 min, 60 min, 120 min και 24 ωρών με λήψη 20 μl δείγματος από το μίγμα της αντίδρασης.

Η αντίδραση αναγωγικής διάσπασης του συμπλέγματος απεικονίζεται στο **Σχήμα 10.4**, όπως και τα προϊόντα που αναμένουμε, τα οποία είναι τα εξής:

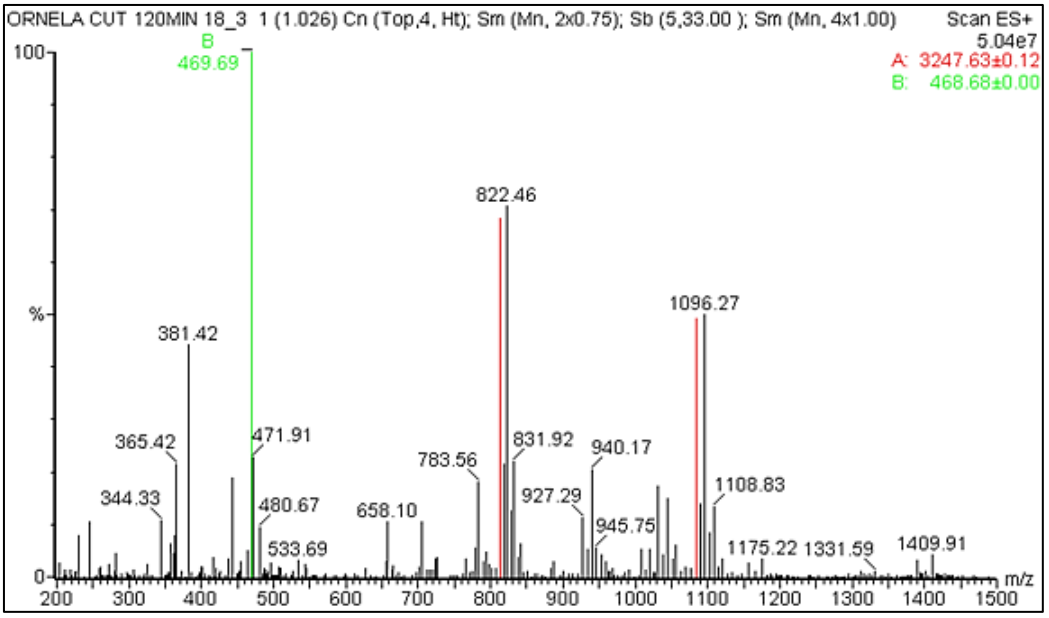
- **Ac-Lys(CO-HC=NH)-Ala-Arg-NH$_2$**
  M.T.: C$_{19}$H$_{35}$N$_9$O$_5$
  M.B.: 469,54 g/mol

- **Ac-SOC$_4$-(CO-CH$_2$-OH)$_4$-NH$_2$**
  M.T.: C$_{58}$H$_{104}$N$_{20}$O$_{21}$
  M.B.: 1418,6 g/mol

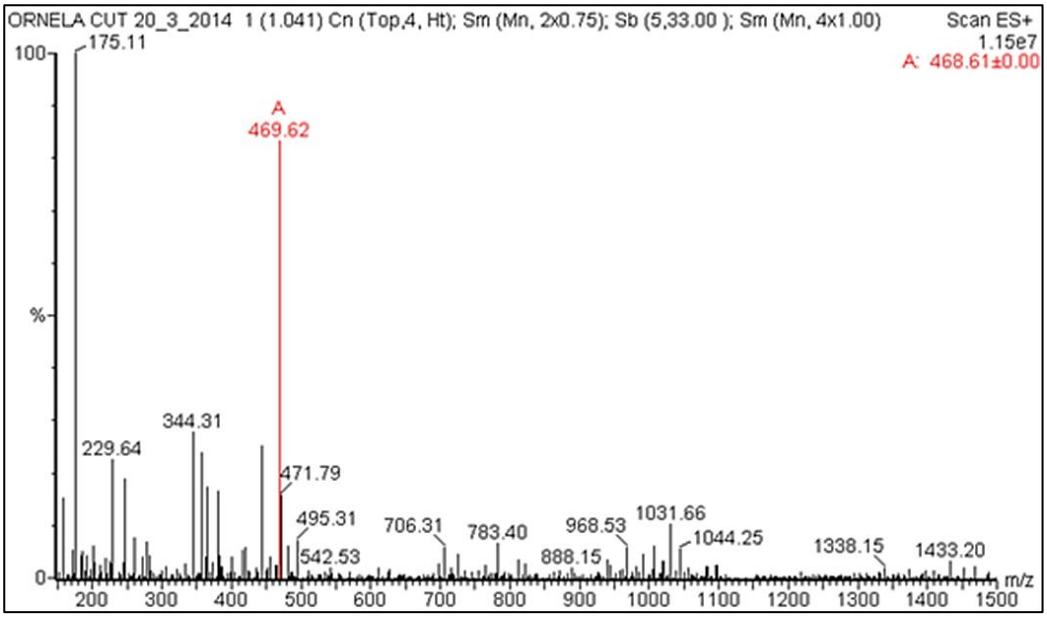


Σχήμα 10.4. Αντίδραση ενζυμικής διάσπασης από τα μικροσωμιακά ένζυμα. Απεικονίζονται τα τελικά προϊόντα διάσπασης και τα μοριακά τους βάρη (M.B.).

Ο δεσμός του συμπλέγματος που αναμένεται να διασπαστεί από τα μικροσωμιακά ένζυμα, είναι ο δεσμός N-O του συμπλέγματος Ac-SOC_4-[Ac-Lys(CH=N-O)-Ala-Arg]$_4$-NH_2.



Σχήμα 10.5. Φάσμα μάζας ESI δείγματος από το μίγμα της αντίδρασης μετά από επώαση 120 min. Ευρεθέν μοριακό βάρος 468.68, υπολογισθέν 469,54.



Σχήμα 10.6. Φάσμα μάζας ESI δείγματος από το μίγμα της αντίδρασης μετά από επώαση 24 ωρών. Ευρεθέν μοριακό βάρος 468.61, υπολογισθέν 469,54.

Από τα παραπάνω φάσματα ESI παρατηρούμε ότι στο **Σχήμα 10.5** ανιχνεύεται το επιθυμητό προϊόν Ac-Lys(CO-HC=NH)-Ala-Arg-NH_2 με μοριακό βάρος 469,54, όπως και ολόκληρο το σύμπλεγμα Ac-SOC_4-[Ac-Lys(CH=N-O)-Ala-Arg]$_4$-NH_2 με μοριακό βάρος 3242,62 μετά από επώαση 120 min. Επομένως, θεωρούμε ότι πραγματοποιήθηκε αναγωγική διάσπαση του δεσμού οξίμης σε κάποιο βαθμό. Στο **Σχήμα 10.6** παρουσιάζεται το φάσμα ESI μετά από επώαση 24 h και παρατηρούμε ότι ανιχνεύεται μόνο το μοριακό ιόν 469,62 $[M+H]^+$ που αντιστοιχεί στο επιθυμητό ανηγμένο προϊόν Ac-Lys(CO-HC=NH)-Ala-Arg-NH_2. Επίσης, δεν εντοπίζεται κορυφή που να αντιστοιχεί σε ολόκληρο το σύμπλεγμα.

Τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν την αναγωγή του δεσμού οξίμης, ωστόσο για την εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων απαιτούνται περαιτέρω πειράματα. Επιπλέον, αξίζει να αναφερθεί ότι τα καλύτερα αποτελέσματα αναγωγής του δεσμού ήταν μετά από επώαση 120 min και 24 ωρών.

Κεφάλαιο 11

Συμπεράσματα-Συζήτηση

Σήμερα, περίπου 34 εκατομμύρια άνθρωποι ζουν μολυσμένοι από τον ιό της ανθρώπινης ανοσοεπάρκειας (HIV) παρά τις μεγάλες προσπάθειες θεραπείας με την εξαιρετικά δραστική αντιρετροϊκή θεραπεία (HAART). Ειδικά η εισαγωγή των αντιικών φαρμάκων στις χώρες που εμφανίζουν τα περισσότερα επιδημικά κρούσματα, οδήγησε στη μείωση της εξάπλωσης νέων κρουσμάτων. Παρόλα αυτά, περίπου 1700 άτομα μολύνονται με τον HIV-1 κάθε μέρα. Επιπλέον, οι παρενέργειες της HAART, τα ιικά αποθέματα στον οργανισμό όπου τα φάρμακα δεν έχουν πρόσβαση και το τεράστιο κόστος που προκύπτει από την ανάγκη για δια βίου θεραπεία, καθιστούν επιτακτική την ανάπτυξη θεραπευτικών και προφυλακτικών στρατηγικών κατά του HIV-1.

Η διαλεύκανση των φυσικών μηχανισμών που επιτρέπουν τον έλεγχο της μόλυνσης χωρίς θεραπεία για πολλά χρόνια σε μια μειοψηφία ατόμων μολυσμένων με HIV (Elite Controllers, ECs), θα ήταν πολύτιμη για την κατανόηση της λειτουργίας των προστατευτικών μηχανισμών και για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων και εμβολίων. Η παρούσα εργασία βασίστηκε στην μελέτη των εξουδετερωτικών αντισωμάτων και των επιτόπων που αυτά αναγνωρίζουν στους ECs. Αρχικά, εξετάστηκε το πλάσμα των ECs για την παρουσία εξουδετερωτικών αντισωμάτων με in vitro δοκιμασίες εξουδετέρωσης. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια της τεχνολογίας παρουσίασης στην επιφάνεια φάγων (phage display technology) ταυτοποιήθηκαν οι επίτοποι που αναγνωρίζονται από τα αντισώματα που περιέχονται στο πλάσμα τους, ύστερα από διαλογή μέσω αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες του φακέλου του ιού. Με τον τρόπο αυτό επιλέχθηκαν και οι επίτοποι που συντέθηκαν στην παρούσα εργασία. Ο βασικός επίτοπος που ταυτοποιήθηκε είναι ο EC26-2A4, και ανήκει στην περιοχή MPER της γλυκοπρωτεΐνης gp41 του ιού. Οι επίτοποι EC26-2A4-EW και EC26-2A4-NK αποτελούν μέρος της αλληλουχίας του EC26-2A4 και επιλέχθηκαν με στόχο να προσδιοριστεί ο βασικός πυρήνας του επιτόπου που προκαλεί την παραγωγή εξουδετερωτικών αντισωμάτων.

Επιπλέον, συντέθηκε ο Επαναλαμβανόμενος Ολιγοπεπτιδικός Φορέας SOC_4, στον οποίο προσδέθηκαν οι πεπτιδικοί επίτοποι με σκοπό να αυξηθεί η ανοσολογική απόκριση. Οι επίτοποι EC26-2A4-EW και EC26-2A4-NK προσδέθηκαν σε τέσσερα αντίγραφα, ενώ ο επίτοπος EC26-2A4 σε δύο αντίγραφα. Ο SOC_4 φορέας αποτελεί ιδανικό υπόστρωμα για την πρόσδεση πεπτιδικών επιτόπων καθώς υιοθετεί κανονική δευτεροταγή δομή (κεκαμένη 3_{10} έλικα), η οποία επιτρέπει στα προσδεδεμένα μόρια να μην αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, ούτε με το φορέα και να διατηρούν την αρχική τους διαμόρφωση. Έτσι εξασφαλίζεται ο ελικοειδής χαρακτήρας των SOC-συμπλεγμάτων. Κυρίως στην περίπτωση μικρών πεπτιδίων, που αδυνατούν να επάγουν ισχυρή ανοσολογική απόκριση,

η πρόσδεση τους σε μόρια-φορείς, όπως ο φορέας SOC_4, οδηγεί στην παραλαβή σταθερών διακλαδισμένων συμπλεγμάτων, που αυξάνουν την ανοσολογική απόκριση. Τα διακλαδισμένα συμπλέγματα που συντέθηκαν στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1**.

Πίνακας 1. Τα SOC-συμπλέγματα που παρασκευάσθηκαν με χημειοεκλεκτική σύνδεση.

Πεπτιδικά Ανάλογα	Μοριακό Βάρος (Da)
1. SOC_4- EC26-2A4-EW: Ac-SOC_4-[EQELLELDKWK(CH=N-O)]$_4$-NH_2	7303,10
2. SOC_4- EC26-2A4-NK: Ac-SOC_4-[NEQELLELDKK(CH=N-O)]$_4$-NH_2	7014,66
3. SOC_4- EC26-2A4: Ac-SOC_4{Ac_2,[IEESQNQQEKNEQELLELDKWKASLW NWFDK(CH=N-O)]$_2$}-NH_2	9002,93

Τα παραπάνω συμπλέγματα συντέθηκαν με ομοιοπολική σύνδεση των επιλεγμένων επιτόπων της gp41 του HIV-1, μέσω σχηματισμού δεσμού οξίμης σε μια χημειοεκλεκτική αντίδραση. Για να επιτευχθεί η αντίδραση, οι αλληλουχίες των επιλεγμένων επιτόπων, προηγουμένως, τροποποιήθηκαν με την προσθήκη μιας λυσίνης στο καρβόξυ-τελικό άκρο τους, και μιας σερίνης στην παράπλευρη ε-αμινομάδα της λυσίνης. Η τροποποίηση αυτή έγινε για να προκύψει η αλδεϋδομάδα μετά από οξείδωση της παράπλευρης ομάδας της σερίνης, με την οποία αντιδρά η αμινοοξυακετυλομάδα του φορέα.

Με τα SOC-συμπλέγματα των πεπτιδομιμητικών επιτόπων πραγματοποιήθηκαν βιολογικά πειράματα, στα οποία μελετήθηκε η δραστικότητα των συμπλεγμάτων με τον ορό του elite controller, EC26, και με το μονοκλωνικό αντίσωμα 2F5, ώστε να προσδιοριστεί η ύπαρξη συντηρημένου επιτόπου.

Από τις ανοσολογικές μελέτες, προέκυψε ότι και τα τρία συμπλέγματα εμφάνισαν ισχυρή δραστικότητα με τον ορό EC26, γεγονός που επιβεβαιώνει την αναγνώριση τους από τα αντισώματα που περιέχονται στον ορό. Επομένως, τα συμπλέγματα αποτελούν ισχυρά ανοσογόνα. Τα συμπλέγματα (1) και (3) εμφάνισαν μεγάλη δραστικότητα με τα mAb 2F5, γεγονός που υποδηλώνει ότι μπορεί να αποτελέσουν ισχυρά ανοσογόνα, ικανά να επάγουν εξουδετερωτικά αντισώματα κατά HIV-1.

Το σύμπλεγμα (2) δεν εμφάνισε καμία δραστικότητα με το mAb 2F5, πιθανώς διότι περιέχει τον επίτοπο NEQELL*ELDK*, η αλληλουχία του οποίου δεν περιλαμβάνει

ολόκληρη την αλληλουχία που αναγνωρίζει το mAb 2F5 (*ELDKW*). Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την καθοριστική σημασία του αμινοξέος W^{666} στην αλληλουχία του πεπτιδομιμητικού επιτόπου για την επαγωγή εξουδετερωτικών αντισωμάτων. Επομένως, θεωρούμε ότι το σύμπλεγμα αυτό, έχει λιγότερες πιθανότητες να προκαλέσει την παραγωγή εξουδετερωτικών αντισωμάτων καθώς ο επίτοπος που περιέχει δεν αναγνωρίζεται από το μονοκλωνικό εξουδετερωτικό αντίσωμα 2F5.

Για την διερεύνηση της ανοσογονικής δράσης του συμπλέγματος (3) που εμφάνισε την ισχυρότερη δραστικότητα με τον ορό EC26 και το mAb2F5, πραγματοποιήθηκε έρευνα σε έναν αριθμό ατόμων μολυσμένων με HIV-1, στα οποία η νόσος εξελίσσεται κανονικά (HIV-1-progressors), ώστε να εξακριβωθεί η αναγνώριση του συμπλέγματος από αντισώματα που περιέχονται στο πλάσμα τους. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν 147 δείγματα ορών και το σύμπλεγμα SOC_4-EC26-2A4 (3) αναγνωρίστηκε από το 70 % περίπου των ασθενών, επιβεβαιώνοντας έτσι, την ισχυρή ανοσογονικότητα του συμπλέγματος. Επομένως, το σύμπλεγμα (3) μπορεί να αποτελέσει την βάση για την ανάπτυξη ενός υποψήφιου εμβολίου, με επόμενα βήματα προς σε αυτήν την κατεύθυνση, τις μελέτες σε ζωικά μοντέλα ώστε να διαπιστωθεί η ικανότητα παραγωγής εξουδετερωτικών αντισωμάτων in vivo και τη διερεύνηση της εξουδετερωτικής δράσης των παραγόμενων αντισωμάτων έναντι διάφορων στελεχών του HIV-1.

Συνοψίζοντας, τα γενικά συμπεράσματα που προκύπτουν από την παρούσα εργασία είναι τα εξής:

- Συντέθηκαν με επιτυχία και σε καλές αποδόσεις, τόσο οι επίτοποι της γλυκοπρωτεΐνης gp41 του HIV-1 που επιλέχθηκαν με τη τεχνολογία παρουσίασης στην επιφάνεια φάγων (phage display technology), όσο και ο N^{ε}-αμινοοξυακέτυλο φορέας SOC_4.
- Παρασκευάστηκαν σε καλές αποδόσεις τα αλδεϋδικά παράγωγα των επιτόπων της gp41, αφού γίνει κατάλληλη τροποποίηση του C- τελικού τους άκρου και ακολούθως οξείδωση σε υγρή φάση.
- Παρασκευάστηκαν με χημειοεκλεκτική σύνδεση μέσω δεσμού οξίμης σε υγρή φάση, διακλαδισμένα πεπτιδικά μακρομόρια με μοριακά βάρη που κυμαίνονται από 1,4 Da έως 6,1 Da, μεταξύ του N^{ε}-αμινοοξυακέτυλο φορέα SOC_4 και των κατάλληλα τροποποιημένων επιτόπων (αλδεϋδικά παράγωγα), σε ικανοποιητικές αποδόσεις και υψηλή καθαρότητα.
- Από ανοσολογικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, προκύπτει ότι :
  - τα συμπλέγματα (1) και (3) αντιδρούν ισχυρά με τον ορό EC26 και το mAb 2F5
  - το σύμπλεγμα (2) αντιδρά με τον ορό EC26 άλλα όχι με το mAb 2F5

- το κατάλοιπο W^{666} κρίνεται απαραίτητο για τον βασικό πυρήνα της αλληλουχίας του επιτόπου για την επαγωγή εξουδετερωτικών αντισωμάτων καθώς όταν δεν περιλαμβάνεται στην αλληλουχία του επιτόπου, αυτός δεν αναγνωρίζεται από το ευρέως χαρακτηρισμένο mAb 2F5
- το σύμπλεγμα (3) αναγνωρίστηκε σε ποσοστό περίπου 70 % από ορούς ασθενών HIV-progressors

- Το σύμπλεγμα SOC_4-EC26-2A4 (3) είχε την καλύτερη δραστικότητα τόσο με τον ορό EC26, όσο και με το mAb 2F5. Επιπλέον, αναγνωρίστηκε από ένα ικανοποιητικό ποσοστό ασθενών HIV-progressors. Τα δεδομένα αυτά είναι αρκετά ενθαρρυντικά και υποδηλώνουν ότι ο επίτοπος EC26-2A4 αποτελεί έναν συντηρημένο επίτοπο της gp41 και το σύμπλεγμα (3) είναι ικανό να χρησιμοποιηθεί στην ανάπτυξη προστατευτικής ανοσίας και κατ΄ επέκταση ενός εμβολίου.
- Για την μελέτη της ενζυμικής διάσπασης του δεσμού οξίμης στην χημειοεκλεκτική σύνδεση από τα μικροσωμάτια χοιρινού συκωτιού, συντέθηκε το σύμπλεγμα Ac-SOC_4-[Ac-Lys(CH=N-O)-Ala-Arg]$_4$-NH_2, η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε βασίστηκε σε προηγούμενες έρευνες που αποδεικνύουν την αναγωγή παράγωγων οξίμης στα αντίστοιχα παράγωγα ιμίνης μέσω του ενζυμικού συστήματος που περιέχεται στα μικροσωμάτια χοιρινού συκωτιού και αποτελείται από NADH κυτοχρωμική b5-ρεδουκτάση, κυτόχρωμα b5 και το κυτόχρωμα P450. Τα προκαταρκτικά πειράματα υποδεικνύουν την αναγωγική διάσπαση του δεσμού οξίμης, ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω πειράματα για την εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων.

Παράρτημα

Ι. Περίληψη

Το σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome) που προκαλείται από τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus) εξακολουθεί να αποτελεί σοβαρή απειλή για τη δημόσια υγεία λόγω της έλλειψης αποτελεσματικών θεραπευτικών μέσων. Συγκεκριμένα, από την αναγνώριση του το 1981, έχει προκαλέσει περίπου 36 εκατομμύρια θανάτους παγκοσμίως. Αναφορικά το 2012, υπολογίστηκαν περίπου 35,3 εκατομμύρια άνθρωποι μολυσμένοι με τον HIV-1 σε παγκόσμιο επίπεδο. Από τα δεδομένα αυτά, ο HIV/ AIDS θεωρείται πανδημία και η ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού και ασφαλούς εμβολίου κατά του ιού αποτελεί πρωταρχικό στόχο της ερευνητικής κοινότητας.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο σχεδιασμός, η σύνθεση και η ανοσολογική μελέτη υποψήφιων πεπτιδομιμητικών επιτόπων της γλυκοπρωτεΐνης gp41 του HIV-1, με στόχο την ανάπτυξη προστατευτικής ανοσίας και κατ΄επέκταση ενός αποτελεσματικού εμβολίου.

Για να ενισχυθεί η ανοσογονικότητα των πεπτιδικών επιτόπων συνδέθηκαν με μόρια φορείς. Ειδικότερα, οι πεπτιδομιμητικοί επίτοποι προσδέθηκαν στον επαναλαμβανόμενο ολιγοπεπτιδικό φορέα SOC_4 (Sequential Oligopeptide Carrier). Ο SOC_4 φορέας αποτελείται από το επαναλαμβανόμενο μοτίβο (-Lys-Aib-Gly-) και η πρόσδεση των πεπτιδικών επιτόπων πραγματοποιείται στην ε-αμινομάδα των λυσινών. Από προηγούμενες μελέτες έχει βρεθεί ότι ο φορέας λαμβάνει ελικοειδή μορφή η οποία επιτρέπει στα προσδεδεμένα πεπτίδια να λαμβάνουν καθορισμένο προσανατολισμό στο χώρο χωρίς να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους ή με τον φορέα και να διατηρούν την αρχική τους διαμόρφωση.

Οι πεπτιδικοί επίτοποι επιλέχθηκαν με τη βοήθεια της τεχνολογίας παρουσίασης στην επιφάνεια φάγων (phage display technology) από τον ορό ασθενή elite controller (EC26). Οι επίτοποι ανήκουν στην MPER (membrane proximal external region) περιοχή της gp41 του HIV-1. Οι πεπτιδικοί επίτοποι προσδέθηκαν στον N^{ε}-αμινοοξυακέτυλο φορέα SOC_4 σε τέσσερα και δύο αντίγραφα μέσω χημειοεκλεκτικής σύνδεσης σχηματισμού δεσμού οξίμης σε τρία στάδια. Πρώτον, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση των επιτόπων και του φορέα με SPPS. Δεύτερον, πραγματοποιήθηκε ο σχηματισμός αλδεϋδομάδας στους επιτόπους μέσω οξείδωσης και τρίτον, έγινε η σύνδεση των αλδεϋδικών επιτόπων με τον N^{ε}-αμινοοξυακέτυλο φορέα SOC_4.

Τα SOC-συμπλέγματα που παρασκευάστηκαν, χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα διασταυρωτής αντίδρασης με ορό ασθενή EC26 και με το mAb 2F5. Το σύμπλεγμα SOC_4-EC26-2A4 παρουσίασε την ισχυρότερη δραστικότητα με τον ορό EC26 και το mAb 2F5 με αποτέλεσμα ο επίτοπος EC26-2A4 να αποτελεί συντηρημένο επίτοπο της gp41 του HIV-1. Επιπλέον, το σύμπλεγμα σε πειράματα ELISA με ορούς ασθενών HIV-progressors από 147 δοτές αναγνωρίστηκε περίπου από το 70% των ασθενών. Από τα δεδομένα αυτά προκύπτει ότι ο επίτοπος EC26-2A4 αποτελεί συντηρημένο επίτοπο της gp41 του HIV-1 και το σύμπλεγμα SOC_4-EC26-2A4 αποτελεί ένα υποσχόμενο υποψήφιο ανοσογόνο για την ανάπτυξη προστατευτικής ανοσίας και πιθανώς ενός εμβολίου.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε επιπλέον, με στόχο την πιθανή εφαρμογή στην ενδοκυττάρια μεταφορά και απελευθέρωση δραστικών βιομορίων και φαρμάκων προσδεδεμένων στον SOC_4-φορέα, η ενζυμική διάσπαση του δεσμού οξίμης στην χημειοεκλεκτική σύνδεση, από το ενζυμικό σύστημα NADH κυτοχρωμική b5-ρεδουκτάση, κυτόχρωμα b5 και το κυτόχρωμα P450 που περιέχεται στα μικροσωμάτια του χοιρινού συκωτιού. Για το σκοπό αυτό συντέθηκε το σύμπλεγμα Ac-SOC_4-[Ac-K(CH=N-O)AR]$_4$-NH_2. Προκαταρκτικά πειράματα υπέδειξαν την αναγωγική διάσπαση του δεσμού, ωστόσο επιβάλλεται η διεξαγωγή επιπλέον πειραμάτων για πιο αξιόπιστα αποτελέσματα.

II. Summary

Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) caused by human immunodeficiency virus (HIV) continue to pose a major threat to public health due to the absence of effective therapeutic means. More specific, since its discovery in 1981, AIDS has caused an estimated 36 million deaths worldwide. As of 2012, approximately 35,3 million people were living with HIV globally. Thus, HIV/AIDS is considered a pandemic and the development of an effective and safe vaccine against the HIV virus is a high priority on research.

The aim of the present study is the design, synthesis and the immunogenic evaluation of candidate peptide epitopes of the HIV-1 transmembrane protein gp41 in order to develop protective immunity and finally a vaccine.

In order to enhance the immunogenicity of peptide epitopes, they were conjugated to carrier-molecules. Therefore, the peptide mimetic epitopes were anchored to an artificial Sequential Oligopeptide Carrier (SOC_4 carrier). The SOC_4-I carrier is formed by the repetitive motif (-Lys-Aib-Gly-) where the peptide epitopes are anchored on the Lys-$N^{\varepsilon}H_2$ groups. It is confirmed that the helical conformation of the tetrameric SOC_4 induces a favorable arrangement of the conjugated epitopes without interacting with each other or with the carrier and also retain their initial "active" conformation.

Peptide mimics of epitopes for specific antibodies present in an HIV-1 elite controller (EC) were selected based on the phage display technology. The epitopes are localizing to the membrane proximal external region (MPER) of the HIV-1 transmembrane protein gp41. These epitopes were coupled on the N^{ε}-aminooxyacetylated SOC_4-I carrier in four and two copies by chemoselective oxime bond formation in three steps. In the first step, the synthesis of the peptide epitopes and the SOC carrier was performed by SPPS. At the second step, the creation of aldehyde groups on the epitopes was performed by oxidation and at the third step the ligation of the aldehyde epitope on the carrier was performed by oxime bond formation.

Cross-reactivity experiments of the SOC-conjugates with sera of an elite controller (EC26) and the mAb 2F5, showed that the SOC_4-EC26-2A4 conjugate reacted strongly with both of them, confirming the possible existence of conserved epitope. Moreover, evaluation of specific EC26-2A4 Abs in plasma samples of 147 HIV-1 infected patients with SOC_4-EC26-2A4 indicated that approximately 70 % of tested patient sera samples

showed a specific binding of the EC26-2A4 epitope. These preliminary results are quiet promising, suggesting that the SOC_4-EC26-2A4 conjugate is a promising candidate in view of vaccine development and protective immune.

In addition, in this study, aiming the intracellular delivery and release of bioactive peptides and drugs coupled to the SOC_4 carrier, was investigated the reductive cleavage of the oxime bond by a pig liver microsomal enzyme system of NADH cytochrome b5-reductase, cytochrome b5 and an isoenzyme of the cytochrome P450 2D subfamily CYP2D. For this purpose, the conjugate Ac-SOC_4-[Ac-Lys (CH=N-O)-Ala-Arg]$_4$-NH_2 was synthesized. Preliminary experiments suggest the reduction of oxime bond, nevertheless further investigation is required.

III. Βιβλιογραφία

Κεφάλαιο 1

1. Barre-Sinoussi, F., Chermann J. C., Rey F., Nugeyre M. T., Chamaret S., Gruest J., Dauguet C., Axler-Blin C., Vézinet-Brun F., Rouzioux C., Rozenbaum W., Montagnier L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science 1983;220(4599):865-7.
2. Gallo R. C., Sarin P. S., Gelmann E. P., Robert-Guroff M., Richardson E., Kalyanaraman V. S., Mann D., Sidhu G. D., Stahl R. E., Zolla-Pazner S., Leibowitch J., Popovic M. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science 1983;220(4599):865-7.
3. Thomson M., Pérez-Alvarez L., Nájera R. Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. Lancet Infectious Diseases 2002;2(8):461–471.
4. Perrin L., Kaiser L., Yerly S. Travel and the spread of HIV-1 genetic variants. Lancet Infectious Diseases 2003;3(1):22–27.
5. Montaner J. S., Hogg R., Wood E., Kerr T., Tyndall M., Levy A. R., Harrigan P. R. The case for expanding access to highly active antiretroviral therapy to curb the growth of the HIV epidemic, Lancet 2006;368:531-536.
6. Quinn T.C.,. Wawer M.J, Sewankambo N., Serwadda D., Li C., Wabwire- Mangen F., Meehan M. O., Lutalo T., Gray R. H. Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group, N. Engl. J. Med. 2000;342:921-929.
7. Korenromp E. L., White R.G, Orroth K.K., Bakker R., Kamali A., Serwadda D., Gray R. H., Grosskurth H., Habbema J. D., Hayes R. J., Determinants of the impact of sexually transmitted infection treatment on prevention of HIV infection: a synthesis of evidence from the Mwanza, Rakai, and Masaka intervention trials. Journal of Infection Diseases 2005;191(Suppl 1) S168-S178.
8. Arthur L. O., Bess J. W. Jr, Sowder R. C. 2nd, Benveniste R. E., Mann D. L., Chermann J. C., Henderson L. E. Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines. Science 1992;258(5090):1935-8.
9. Bounou S., Dumais N., Tremblay M. J. Attachment of human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) particles bearing host-encoded B7-2 proteins leads to nuclear factor-kappa

B- and nuclear factor of activated T cells-dependent activation of HIV-1 long terminal repeat transcription. The Journal of Biological Chemistry 2001;276(9):6359-69.

10. Cantin R., Fortin J. F., Lamontagne G., Tremblay M. The presence of host-derived HLA-DR1 on human immunodeficiency virus type 1 increases viral infectivity. Journal of Virology 1997;71(3):1922-30.
11. Chinen J., Shearer W. T. Molecular virology and immunology of HIV infection. Journal of Allergy and Clinical Immunology 2002;110(2):189-98.
12. Mushahwar I. K. Human Immunodeficiency Viruses: Molecular Virology, pathogenesis, diagnosis and treatment. Perspectives in Medical Virology 2007;13:75-87.
13. Mushahwar I. K. Human Immunodeficiency Viruses: Molecular Virology, pathogenesis, diagnosis and treatment. Perspectives in Medical Virology 2007;13:75-87.
14. Hout D. R., Mulcahy E. R., Pacyniak E., Gomez L. M., Gomez M. L., Stephens E. B. Vpu: a multifunctional protein that enhances the pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1. Current HIV Research 2004;2(3):255-70.
15. Le Rouzic E., Benichou S. The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle. Retrovirology 2005;2:11.
16. Fackler O. T., Alcover A., Schwartz O. Modulation of the immunological synapse: a key to HIV-1 pathogenesis? Nature Reviews Immunology 2007;7(4):310-317.
17. Smith P. D., Li L., Meng G. Mucosal events in the pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection. The Journal of Infectious Disease 1999;179(Suppl 3):S436-40.
18. Dalgleish A. G., Beverley P. C., Clapham P. R., Crawford D. H., Greaves M. F., Weiss R. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. Nature 1984;312(5996):763-767.
19. Moore J. P., Trkola A., Dragic T. Co-receptors for HIV-1 entry. Current Opinion in Immunology 1997;9(4):551-562.
20. Berson J. F., Long D., Doranz B. J., Rucker J., Jirik F. R., Doms R. W. A seven-transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains. Journal of Virology 1996;70(9):6288-6295.
21. Roderiquez G., Oravecz T., Yanagishita M., Bou-Habib D. C., Mostowski H., Norcross M. A. Mediation of human immunodeficiency virus type 1 binding by

interaction of cell surface heparan sulfate proteoglycans with the V3 region of envelope gp120-gp41. Journal of Virology 69(4):2233-2239.

22. van't Wout A. B., Kootstra N. A., Mulder-Kampinga G. A., Albrecht-van Lent N., Scherpbier H. J., Veenstra J., Boer K., Coutinho R. A., Miedema F., Schuitemaker H. Macrophage-tropic variants initiate human immunodeficiency virus type 1 infection after sexual, parenteral, and vertical transmission. The Journal of Clinical Investigation 1994;94(5):2060-2067.
23. Moore J. P. Coreceptors: implications for HIV pathogenesis and therapy. Science 1997;276(5309):51-52.
24. Schuitemaker H., Koot M., Kootstra N. A., Dercksen M. W., de Goede R. E., van Steenwijk R. P., Lange J. M., Schattenkerk J. K., Miedema F., Tersmette M. Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytotropic to T-cell-tropic virus population. Journa of Virology 1992;66(3):1354-1360.
25. de Roda Husman A. M., van Rij R. P., Blaak H., Broersen S., Schuitemaker H. Adaptation to promiscuous usage of chemokine receptors is not a prerequisite for human immunodeficiency virus type 1 disease progression. The Journal of Infectious Diseases 1999;180(4):1106-1115.
26. Richman D. D., Bozzette S. A. The impact of the syncytium-inducing phenotype of human immunodeficiency virus on disease progression. The Journal of Infectious Diseases 1994;169(5):968-974.
27. Leonard CK1, Spellman MW, Riddle L, Harris RJ, Thomas JN, Gregory TJ. Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamsterovary cells. The Journal of Biological Chemistry 1990;265(18):10373-10382.
28. Yang X., Farzan M., Wyatt R., Sodroski J. Characterization of stable, soluble trimers containing complete ectodomains of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. Journal of Virology 2000;74(12):5716-5725.
29. Stabilization of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein trimers by disulfide bonds introduced into the gp41 glycoprotein ectodomain. Journal of Virology 1998;72(9):7620-7625.

30. Rizzuto C. D., Wyatt R., Hernández-Ramos N., Sun Y., Kwong P. D., Hendrickson W. A., Sodroski J. A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. Science 1998;280(5371):1949-1953.
31. Olshevsky U., Helseth E., Furman C., Li J., Haseltine W., Sodroski J. Identification of individual human immunodeficiency virus type 1 gp120 amino acids important for CD4 receptor binding. Journal of Virology 1990;64(12):5701-7. KAI Kwong PD1, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. Nature 1998;393(6686):648-659.
32. Sullivan N., Sun Y., Sattentau Q., Thali M., Wu D., Denisova G., Gershoni J., Robinson J., Moore J., Sodroski J. CD4-Induced conformational changes in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein: consequences for virus entry and neutralization. Journal of Virology 1998;72(6):4694-4703.
33. Baritaki S., Zafiropoulos A., Sioumpara M., Politis M., Spandidos D. A., Krambovitis E. Ionic interaction of the HIV-1 V3 domain with CCR5 and deregulation of T lymphocyte function. Biochem Biophys Res Commun. 2002 Nov 8;298(4):574-580.
34. Chan, D. C., Kim, P. S. HIV entry and its inhibition. Cell 1998;93(5):681–684.
35. Lu M., Blacklow S. C., Kim P. S. A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. Nature Structural and Molecular Biology 1995;2(12):1075-1082.
36. Weissenhorn W., Dessen A., Harrison S. C., Skehel J. J., Wiley D. C. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. Nature 1997;387(6631):426-430.
37. Freed E. O., Mouland A. J. The cell biology of HIV-1 and other retroviruses. Retrovirology. 2006 Nov 3;3:77.
38. Cen S., Khorchid A., Javanbakht H., Gabor J., Stello T., Shiba K., Musier-Forsyth K., Kleiman L. Incorporation of lysyl-tRNA synthetase into human immunodeficiency virus type 1. Journal of Virology 2001;75(11):5043-5048.
39. Tantillo C., Ding J., Jacobo-Molina A., Nanni R. G., Boyer P. L., Hughes S. H., Pauwels R., Andries K., Janssen P. A., Arnold E. Locations of anti-AIDS drug binding sites and resistance mutations in the three-dimensional structure of HIV-1 reverse transcriptase. Implications for mechanisms of drug inhibition and resistance. Journal of Molecular Biology 1994;243(3):369-87.
40. Farnet C. M., Bushman F. D. HIV cDNA integration: molecular biology and inhibitor development. AIDS 1996;10 (Suppl A):S3-11.

41. Wei P., Garber M. E., Fang S. M., Fischer W. H., Jones K. A. A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. Cell 1998;92(4):451-62.
42. Fornerod M., Ohno M., Yoshida M., Mattaj I. W. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. Cell. 1997;90(6):1051-1060.
43. Neville M., Stutz F., Lee L., Davis L. I., Rosbash M. The importin-beta family member Crm1p bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export. Current Biology 1997;7(10):767-775.
44. Tritel M., Resh M. D. The late stage of human immunodeficiency virus type 1 assembly is an energy-dependent process. Journal of Virology 2001;75(12):5473-81.
45. Cunningham A., Donaghy H., Harman A., Kim M., Turville S. Manipulation of dendritic cell function by viruses. Current opinion in microbiology 2010;13(4):524–529.
46. Garg H., Mohl J., Joshi A. HIV-1 induced bystander apoptosis. Viruses 2012;4(11):3020–3043.
47. Kumar, Vinay (2012). Robbins Basic Pathology (9th ed.). p. 147.
48. Douek D. C., Picker L. J., Koup R. A. T cell dynamics in HIV-1 infection. Annual Review of Immunology 2003;21:265-304.
49. Kaufmann G. R., Cunningham P., Kelleher A. D., Zaunders J., Carr A., Vizzard J., Law M., Cooper D. A. Patterns of viral dynamics during primary human immunodeficiency virus type 1 infection. The Sydney Primary HIV Infection Study Group. The Journal of Infectious Diseases 1998;178(6):1812-5.
50. Altfeld M., Rosenberg E. S., Shankarappa R., Mukherjee J. S., Hecht F. M., Eldridge R. L., Addo M. M., Poon S. H., Phillips M. N., Robbins G. K., Sax P. E., Boswell S., Kahn J. O., Brander C., Goulder P. J., Levy J. A., Mullins J. I., Walker B. D. Cellular immune responses and viral diversity in individuals treated during acute and early HIV-1 infection. The Journal of Experimental Medicine 2001;193(2):169-80.
51. Ramratnam B., Bonhoeffer S., Binley J., Hurley A., Zhang L., Mittler J. E., Markowitz M., Moore J. P., Perelson A. S., Ho D. D. Rapid production and clearance of HIV-1 and hepatitis C virus assessed by large volume plasma apheresis. Lancet 1999;354(9192):1782-1785.
52. Fauci A. S., Pantaleo G., Stanley S., Weissman D. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. Annals of Internal Medicine 1996;124(7):654-663.

53. De Keersmaecker B., Thielemans K., L. Aerts J. Fighting with the Enemy's Weapons? The Role of Costimulatory Molecules in HIV. Current Molecular Medicine 2011;11(3):172-196.
54. Munier M. L., Kelleher A. D. Acutely dysregulated, chronically disabled by the enemy within: T-cell responses to HIV-1 infection. Immunology and Cell Biology 2007;85:6–15.
55. Ahmad A., Menezes J. Antibody-dependent cellular cytotoxicity in HIV infections. The FASEB Journal 1996;10(2):258-66.
56. De Clercq E. Antiviral drugs in current clinical use. Journal of Clinical Virology 2004;30(2):115-33.
57. Zapor M. J., Cozza K. L., Wynn G. H., Wortmann G. W., Armstrong S. C. Antiretrovirals, Part II: focus on non-protease inhibitor antiretrovirals (NRTIs, NNRTIs, and fusion inhibitors). Psychosomatics 2004;45(6):524-35.
58. Dunn B. M., Goodenow M. M., Gustchina A., Wlodawer A. Retroviral proteases. Genome Biology 2002; 3(4): reviews3006.1–reviews3006.7.
59. Shattock R. J., Moore J. P. Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection. Nature Reviews Microbiology 2003;1(1):25-34.
60. Saag M., Goodrich J., Fätkenheuer G., Clotet B., Clumeck N., Sullivan J., Westby M., van der Ryst E. A Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Maraviroc in Treatment-Experienced Patients Infected with Non-R5 HIV-1. The Journal of Infectious Diseases 2009;199(11):1638-1647.
61. Nair V. HIV integrase as a target for antiviral chemotherapy. Reviews in Medical Virology 2002;12(3):179-193.

Κεφάλαιο 2

1. Noe A., Plum J., Verhofstede C.. The latent HIV-1 reservoir in patients undergoing HAART: an archive of pre-HAART drug resistance. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2005;55:410–412.
2. Johnson B. K., Stone G. A., Godec M. S. Asher D. M., Gajdusek D. C., Gibbs C. J. Jr. Long-term observations of human immunodeficiency virus-infected chimpanzees. AIDS Research and Human Retroviruses 1993;9(4):375–378.
3. Gamble L. J., Matthews Q. L. Current progress in the development of a prophylactic vaccine for HIV-1. Drug Design, Development and Therapy 2010;5:9-26.

4. Rerks-Ngarm S., Pitisuttithum P., Nitayaphan S. et al. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. The New England Journal of Medicine 2009;361:2209-2220.
5. Deeks S. G., Walker B. D. Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. Immunity 2007;27(3):406-16.
6. Deacon N. J., Tsykin A., Solomon A., Smith K., Ludford-Menting M., Hooker D. J., McPhee D. A., Greenway A. L., Ellett A., Chatfield C., Lawson V. A., Crowe S., Maerz A., Sonza S., Learmont J., Sullivan J. S., Cunningham A., Dwyer D., Dowton D., Mills J. Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. Science. 1995;270(5238):988-91.
7. Goepfert P. A., Lumm W., Farmer P., Matthews P., Prendergast A., Carlson J. M., Derdeyn C. A., Tang J., Kaslow R. A., Bansal A., Yusim K., Heckerman D., Mulenga J., Allen S., Goulder P. J. R., Hunter E. Transmission of HIV-1 Gag immune escape mutations is associated with reduced viral load in linked recipients. The Journal of Experimental Medicine 2008;205(5):1009-1017.
8. Lassen K. G., Lobritz M. A., Bailey J. R., Johnston S., Nguyen S., Lee B., Chou T., Siliciano R. F., Markowitz M., Arts E. J. Elite Suppressor–Derived HIV-1 Envelope Glycoproteins Exhibit Reduced Entry Efficiency and Kinetics. Plos Pathogens 2009;5(4):e1000377.
9. Pereyra F., Jia X., et al. The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation. Science. 2010;330(6010):1551-1557.
10. Chen H., Li C., Huang J., Cung T., Seiss K., Beamon J., Carrington M. F., Porter L. C., Burke P. S., Yang Y., Ryan B. J., Liu R., Weiss R. H., Pereyra F., Cress W. D., Brass A. L., Rosenberg E. S., Walker B. D., Yu X. G., Lichterfeld M. CD4+ T cells from elite controllers resist HIV-1 infection by selective upregulation of p21. The Journal of Clinical Investigation 2011;121(4):1549-1560.
11. van Grevenynghe J., Procopio F. A., et al. Transcription factor FOXO3a controls the persistence of memory CD4(+) T cells during HIV infection. Nature Medicine 2008;14(3):266-274.
12. Thèze J., Chakrabarti L. A., Vingert B., Porichis F., Kaufmann D. E. HIV controllers: a multifactorial phenotype of spontaneous viral suppression. Clinical Immunology 2011;141(1):15-30.

13. Kwong P. D., Mascola J. R. Human antibodies that neutralize HIV-1: identification, structures, and B cell ontogenies. Immunity 2012;37(3):412–425.
14. Mikell I., Sather D. N., Kalams S. A., Altfeld M., Alter G., Stamatatos L. Characteristics of the earliest cross-neutralizing antibody response to HIV-1. PLOS Pathogens 2011;7(1):e1001251.
15. Humbert M., Antoni S., Brill B. Landersz M., Rodes B., Soriano V., Wintergerst U., Knechten H., Staszewski S., von Laer D., Dittmar M. T., Dietrich U. Mimotopes selected with antibodies from HIV-1-neutralizing long-term non-progressor plasma. European Journal of Immunology 2007;37(2):501-515.
16. Zhou M., Meyer T., Koch S., Koch J., von Briesen H., Benito J. M., Soriano V., Haberl A., Bickel M., Dübel S., Hust M., Dietrich U. Identification of a new epitope for HIV-neutralizing antibodies in the gp41 membrane proximal external region by an Env-tailored phage display library. European Journal of Immunology 2013;43(2):499-509.
17. Zhou M., Kostoula I., Brill B., Panou E., Sakarellos-Daitsiotis M., Dietrich U. Prime boost vaccination approaches with different conjugates of a new HIV-1 gp41 epitope encompassing the membrane proximal external region induce neutralizing antibodies in mice. Vaccine 2012;30(11):1911-1916.
18. Pantophlet R., Burton D. R. GP120: target for neutralizing HIV-1 antibodies. Annual Reviews Immunology 2006;24:739-769.
19. Zolla-Pazner S. Identifying epitopes of HIV-1 that induce protective antibodies. Nature Reviews Immunology 2004;4(3):199-210.
20. Wu L., Paxton W. A., Kassam N., Ruffing N., Rottman J. B., Sullivan N., Choe H., Sodroski J., Newman W., Koup R. A., Mackay C. R. CCR5 levels and expression pattern correlate with infectability by macrophage-tropic HIV-1, in vitro. The Journal of Experimental Medicine 1997;185(9):1681-91.
21. Khurana S., Kennedy M., King L. R., Golding H. Identification of a Linear Peptide Recognized by Monoclonal Antibody 2D7 Capable of Generating CCR5-Specific Antibodies with Human Immunodeficiency Virus-Neutralizing Activity. Journal of Virology 2005;79(11):6791–6800.
22. Königs C., Rowley M. J., Thompson P., Myers M. A., Scealy M., Davies J. M., Wu L., Dietrich U., Mackay C. R., Mackay I. R. Monoclonal antibody screening of a phage-displayed random peptide library reveals mimotopes of chemokine receptor CCR5: implications for the tertiary structure of the receptor and for an N-terminal binding site for HIV-1 gp120. European Journal of Immunology 2000;30(4):1162-1171.

23. Dennis R. B., Robin A. W. A Boost for HIV Vaccine Design. Science 2010;329(5993):770-773.
24. Zhu P., Chertova E., Bess J. Jr, Lifson J. D., Arthur L. O., Liu J., Taylor K. A., Roux K. H. Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2003;100;15812-12817.
25. Ahmad R., Sindhu S. T., Toma E., Morisset R., Vincelette J., Menezes J., Ahmad A. Evidence for a correlation between antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediating anti-HIV-1 antibodies and prognostic predictors of HIV infection. Journal of Clinical Immunology 2001;21(3):227-233.
26. Verrier F., Moog C., Barre-Sinoussi F., Van der Ryst E., Spenlehauer C., Girard M. Macaque immunization with virions purified from a primary isolate of the human immunodeficiency virus type 1 induced enhancement antibodies. Bulletin de L'Academie Nationale de Medecine 2000;184(1):67-84.
27. Wyatt R., Kwong P. D., Desjardins E., Sweet R. W., Robinson J., Hendrickson W. A., Sodroski J. G. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. Nature. 1998;393(6686):705-711.
28. Rizzuto C., Sodroski J. Fine definition of a conserved CCR5-binding region on the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein 120. AIDS Research and Human Retroviruses 2000;16(8):741-749.
29. Wyatt R., Sodroski J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. Science 1998;280(5371):1884-1888.
30. Nyambi P. N., Mbah H. A., Burda S., Williams C., Gorny M. K., Nádas A., Zolla-Pazner S. Conserved and exposed epitopes on intact, native, primary human immunodeficiency virus type 1 virions of group M. Journal of Virology 2000;74(15):7096-7107.
31. Mc Cann C. M., Song R. J., Ruprecht R. M. Antibodies: can they protect against HIV infection? Current Drug Targets - Infect Disorders 2005;5(2):95-111.
32. Trkola A., Kuster H., Rusert P., Joos B., Fischer M., Leemann C., Manrique A., Huber M., Rehr M., Oxenius A., Weber R., Stiegler G., Vcelar B., Katinger H., Aceto L., Günthard H. F. Delay of HIV-1 rebound after cessation of antiretroviral therapy through passive transfer of human neutralizing antibodies. Nature Medicine 2005;11(6):615-622.

33. Ruppach H., Nara P., Raudonat I., Elanjikal Z., Rübsamen-Waigmann H., Dietrich U. Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Positive Sera Obtained Shortly after Seroconversion Neutralize Autologous HIV Type 1 Isolates on Primary Macrophages but Not on Lymphocytes. Journal of Virology 2000;74:5403-5411.
34. Spenlehauer C., Kirn A., Aubertin A., Moog C. Antibody-Mediated Neutralization of Primary Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates: Investigation of the Mechanism of Inhibition. Journal of Virology 2001;75:2235-2245.
35. Broliden K., Hinkula J., Devito C., Kiama P., Kimani J., Trabbatoni D., Bwayo J. J., Clerici M., Plummer F., Kaul R. Functional HIV-1 specific IgA antibodies in HIV-1 exposed, persistently IgG seronegative female sex workers. Immunoly Letters 2001;79(1-2):29-36.
36. Devito C., Hinkula J., Kaul R., Lopalco L., Bwayo J. J., Plummer F., Clerici M., Broliden K. Mucosal and plasma IgA from HIV-exposed seronegative individuals neutralize a primary HIV-1 isolate. AIDS 2000;14(13):1917-1920.
37. Scarlatti G., Albert J., Rossi P., Hodara V., Biraghi P., Muggiasca L., Fenyö E. M. Mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1: correlation with neutralizing antibodies against primary isolates. The Journal of Infectious Diseases 1993;168(1):207-210.
38. Barouch D. H., Whitney J. B., Moldt B., Klein F., Oliveira T. Y., et al. Therapeutic efficacy of potent neutralizing HIV-1-specific monoclonal antibodies in SHIV-infected rhesus monkeys. Nature 2013;503(7475):224–228.
39. Shingai M., Nishimura Y., Klein F., Mouquet H., Donau O. K., et al. (2013) Antibody-mediated immunotherapy of macaques chronically infected with SHIV suppresses viraemia. Nature 503 (7475): 277–280.
40. Corti D., Lanzavecchia A. Broadly neutralizing antiviral antibodies. Annual Review of Immunology 2013;31:705–742.
41. Scheid J. F., Mouquet H., Feldhahn N., Seaman M. S., Velinzon K., et al. Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. Nature 2009;458(7238):636–640.
42. Pilgrim A., Pantaleo G. Neutralizing antibody responses to HIV-1 in primary infection and long-term nonprogressive infection. The Journal of Diseases 1997;176:924-932.
43. Carotenuto P., Looij D., Keldermans L., de Wolf F., Goudsmit J. Neutrilizng antibodies are positively associated with $CD4^+$ T-cell counts and T-cell function in long-term AIDS-free infection. AIDS 1998; 12:1591-1600.

44. MvMichael A., Hanke T. HIV vaccines 1983-2003. Nature Medicine 2001; 9:874-880.
45. Reiter J., Means R., Desrosiers R. A role for carbohydrates in immune evasion in AIDS. Nature Medicine 1988;4:679-684.
46. Graham B. Clinicals trials of HIV vaccines. Annual Reviews Medicine 2001;53:207-221.
47. Barbato G., Bianchi E., Ingallinella P., Hurni W. H., Miller M. D., Ciliberto G., Cortese R., Bazzo R., Shiver J. W., Pessi A. Structural analysis of the epitope of the anti-HIV antibody 2F5 sheds light into its mechanism of neutralization and HIV fusion. Journal of Molecular Biology 2003;330(5):1101-1015.
48. Ofek G., Tang M., Sambor A., Katinger H., Mascola J. R., Wyatt R., Kwong P. D. Structure and mechanistic analysis of the anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2F5 in complex with its gp41 epitope. Journal of Virology 2004;78(19):10724-10737.
49. Scala G., Chen X., Liu W., Telles J. N., Cohen O. J., Vaccarezza M., Igarashi T., Fauci A. S. Selection of HIV-specific immunogenic epitopes by screening random peptide libraries with HIV-1-positive sera. The Journal of Immunology 1999;162(10):6155-61.
50. Chen X., Scala G., Quinto I., Liu W., Chun T. W., Justement J. S., Cohen O. J., vanCott T. C., Iwanicki M., Lewis M. G., Greenhouse J., Barry T., Venzon D., Fauci A. S. Protection of rhesus macaques against disease progression from pathogenic SHIV-89.6PD by vaccination with phage-displayed HIV-1 epitopes. Nature Medicine 2001;7(11):1225-1231.
51. Sun Z. Y., Oh K. J., Kim M., Yu J., Brusic V., Song L., Qiao Z., Wang J. H., Wagner G., Reinherz E. L. HIV-1 broadly neutralizing antibody extracts its epitope from a kinked gp41 ectodomain region on the viral membrane. Immunity 2008;28:52–63.
52. Pietzsch J., Scheid J. F., Mouquet H., Seaman M. S., Broder C. C., Nussenzweig M. C. Anti- gp41 antibodies clone from HIV-infected patients with broadly neutralizing serologic activity. Journal of Virology 2010;84(10):5032–5042.
53. Mehandru S, Wrin T, Galovich J, Stiegler G, Vcelar B, Hurley A, Hogan C., Vasan S., Katinger H., Petropoulos C. J., and Markowitz M. Neutralization Profiles of Newly Transmitted Human Immunodeficiency Virus Type 1 by Monoclonal Antibodies 2G12, 2F5, and 4E10. Journal of Virology 2004;78(24):14039–14042.
54. Binley J. M., Wrin T., Korber B., Zwick M. B., Wang M., Chappey C., Stiegler G., Kunert R., Zolla-Pazner S. Katinger H., Petropoulos C. J., Burton D. R. Comprehensive

Cross-Clade Neutralization Analysis of a Panel of Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 Monoclonal Antibodies. Journal of Virology 2004;78(23):13232–13252.

55. Song L., Sun Z. Y., Coleman K. E., Zwick M. B., Gach J. S., Wang J. H., Reinherz E. L., Wagner G., Kim M. Broadly neutralizing anti-HIV-1 antibodies disrupt a hinge-related function of gp41 at the membrane interface. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2009;106(22):9057-9062.

Κεφάλαιο 3

1. Stryer L. Βιοχημεία 2009;Τόμος Ι, 5η Έκδοση, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
2. McMurry J. Οργανική Χημεία 2002;Τόμος ΙΙ, 3η Έκδοση, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
3. Merrifield R.B. Solid Phase Synthesis, I. The synthesis of a Tetrapeptide. Journal of American Chemical Society 1963;85(14):2149-2154.
4. Wang S. p-Alcoxybenzyl Alcohol Resin and p-Alcobenzylcarbonylhydrazid Resin for Solid Phase Synthesis of Protected Fragments. Journal of American Chemical Society 1973;95(4):1328-1333.
5. Mitchell A.R., Kent S. B. H., Engelhard M., Merrifield R. B. A new synthetic route to tert-butyloxycarbonylaminoacyl-4-(oxymethyl)phenylacetamidomethyl-resin, an improved support for solid-phase peptide synthesis. The Journal of Organic Chemistry 1978;43(14):2485-2852.
6. Barlos K., Chatzi O., Gatos D., Stavropoulos G. 2-Chlorotrityl chloride resin. Studies on anchoring of Fmoc-amino acids and peptide cleavage. International Journal of Peptide and Protein Research 1991;37(6):513-520.
7. Barlos K., Gatos D., Kutsogianni S., Papaphotiou G., Poulos C., Tsegenidis T. Solid phase synthesis of partially protected and free peptides containing disulphide bonds by simultaneous cysteine oxidation-release from 2-chlorotrityl resin. International Journal of Peptide and Protein Research 1991;38(6):562-568.
8. Barlos K., Gatos D., Kapolos S., Poulos C., Schäfer W., Yao W.Q. Application of 2-chlorotrityl resin in solid phase synthesis of (Leu15)-gastrin I and unsulfated cholecystokinin octapeptide. Selective O-deprotection of tyrosine. International Journal of Peptide and Protein Research 1991;38(6):555-561.

9. Gairí M., Lloyd-Williams P., Albericio F., Giralt E. Convergent solid-phase peptide synthesis. 12. Chromatographic techniques for the purification of protected peptide segments. International Journal of Peptide and Protein Research 1995;46(2):119-133.
10. Matsueda G. R., Stewart J. M. A p-Methylbenzhydrylamine resin for improved solid-phase synthesis of peptide amides. Peptides 1981;2(1):45-50.
11. Rink H. Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin. Tetrahedron Letters 1987;28(33): 3787–3790.
12. Carpino L. The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Function, A New Base-Sensitive Amino-Protecting Group. Journal of American Chemical Society 1970;92(19):5748-5749.
13. Caprino L., Han G. Y. The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-Protecting Group. The Journal of Organic Chemistry 1972;37(22):3404-3409.
14. Carpino L. Oxidative Reactions of Hydrazines. IV. Elimination of Nitrogen from 1,1-Disubstituted-2-arenesulfonhydrazides. Journal of the American Chemical Society 1957;79(16):4427–4431.
15. Caprino L. A., Shroff H., Triolo S. A., Mansour ESME, Wenschuh H., Albericio F. The 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl group (Pbf) as arginine side chain protectant. Tetrahedron Letters 1993;34(49):7829-7832.
16. Ramage R., Green J., Blake A. J. An acid labile arginine derivative for peptide synthesis: NG-2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulphonyl-L-arginine. Tetrahedron 1991;47(32):6353–6370
17. Fujino M., Wakimasu M., Kitada C. 4-Methoxy-2,3,6-trimethylbenzenesulphonyl (Mtr): Anew amino-protecting group in peptide synthesis. Journal of the Chemical society, Chemical Communications 1982(8):445-446.
18. Isidro A., Latassa D., Giraud M., Alvarez M., Albericio F. 1,2-Dimethylindole-3-sulfonyl (MIS) as protecting group for the side chain of arginine. Organic & Biomolecular Chemistry 2009;7:2565–2569.
19. Mazur R. H., Plume G. Improved synthesis of bradykinin. Experienta 1968;24(7):661.
20. Ramachandran J., Li C. H. Preparation of crystalline NG-tosylarginine derivatives. Journal of Organic Chemistry 1962;27(11):4006-4009.
21. Yajima H., Takeyama M., Kanaki J., Mitani K. The mesitylene-2-sulphonyl group, an acidolytically removable NG-protecting group for arginine. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications 1978(11):482-483.

22. Carpino L. A., Nasr K., Abdel-Maksoud A., El-Faham A., Ionescu D., Henklein P., Wenschuh H., Beyermann M., Krause E., Bienertd M. The Dicyclopropylmethyl (Dcpm) Peptide Backbone Protectant. Organic Letters 2009;11(16):3718–3721.
23. Quesnel A., Briand J. P. Incomplete trifluoroacetic acid deprotection of asparagine-trityl-protecting group in the vicinity of a reduced peptide bond. The Journal of Peptide Research 1998;52(2):107-11.
24. Sieber P., Riniker B. Protection of carboxamide functions by the trityl residue. Application to peptide synthesis. Tetrahedron Letters 1991;32(6):739-742.
25. Chang C. D., Waki M., Ahmad M., Meienhofer J., Lundell E. O., Haug J. D. Preparation and properties of Nalpha-9-fluorenylmethyloxycarbonylamino acids bearing tert.-butyl side chain protection. International Journal of Peptide and Protein Research 1980;15(1):59-66.
26. Tam J. P., Wong T. W., Riemen M. W., Tjoeng F., Merrifield R. B. Cyclohexyl ester as a new protecting group for aspartyl peptides to minimize aspartimide formation in acidic and basic treatments. Tetrahedron Letters 1979;20(42): 4033–4036
27. Dangles O., Guibe F., Balavoine G., Lavielle S., Marquet A. Selective cleavage of the allyl and (allyloxy)carbonyl groups through palladium-catalyzed hydrostannolysis with tributyltin hydride. Application to the selective protection-deprotection of amino acid derivatives and in peptide synthesis. The Journal of Organic Chemistry 1987;52(22):4984–4993.
28. McCurdy S.N. The investigation of Fmoc-cysteine derivatives in solid phase peptide synthesis. Peptide research 1989;2(1):147-152.
29. Barlos K., Gatos D., Hatzi O., Koch N., Koutsogianni S. Synthesis of the very acid-sensitive Fmoc-Cys(Mmt)-OH and its application in solid-phase peptide synthesis. International Journal of Peptide and Protein Research 1996;47(3):148-153.
30. Sieber P., Riniker B. Protection of histidine in peptide synthesis: A Reassessment of the trityl group. Tetrahedron Letters 1987;28(48): 6031–6034.
31. Sakakibara S., Fujii T. Synthesis and use of N-im-tosyl-L-histidine. Bulletin of the Chemical Society of Japan 1969;42(5):1466.
32. Chillemi F., Merrifield R. B. Use of Nim-dinitrophenylhistidine in the solid-phase synthesis of the tricosapeptides 124-146 of human hemoglobin .beta. chain. Biochemistry 1969;8(11):4344–4346.

33. Erickson B. W., Merrifield R. B. Use of chlorinated benzyloxycarbonyl protecting groups to eliminate N -branching at lysine during solid-phase peptide synthesis. Journal of the American Chemical Society 1973;95(11):3757-3763.
34. Bycroft B. W., Chan W. C., Chhabra S. R., Hone N. D. A novel lysine-protecting procedure for continuous flow solid phase synthesis of branched peptides. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications 1993(9):778-779.
35. Chhabra S. R., Hothi B., Evans D. J., White P. D., Bycroft B. W., Chan W. C. An appraisal of new variants of Dde amine protecting group for solid phase peptide synthesis. Tetrahedron Letters 1998;39(12): 1603–1606
36. Matysiak S., Böldicke T., Tegge W., Frank R. Evaluation of monomethoxytrityl and dimethoxytrityl as orthogonal amino protecting groups in Fmoc solid phase peptide synthesis. Tetrahedron Letters 1998;39(13): 1733–1734
37. Atherton E., Woolley V., Sheppard R. C. Internal association in solid phase peptide synthesis. Synthesis of cytochrome C residues 66–104 on polyamide supports. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications 1980;(20):970-971.
38. Matsueda G. R. Deprotectum of Nin-formyl tryptophan using 1,2-ethanedithiol in liquid hydrogen fluoride. International Journal of Peptide and Protein Research 1982;20(1):26-34.
39. Adamson J. G., Blaskovich M. A., Groenevelt H., Lajoie G. A. Simple and convenient synthesis of tert-butyl ethers of Fmoc-serine, Fmoc-threonine, and Fmoc-tyrosine. Journal of Organic Chemistry 1991;56(10):3447-3449.
40. Erickson B. W., Merrifield R. B. Acid stability of several benzylic protecting groups used in solid-phase peptide synthesis. Rearrangement of O-benzyltyrosine to 3-benzyltyrosine. Journal of the American Chemical Society 1973;95(11):3750-3756.
41. Mizoguchi T., Levin G., Woolley D. W., Stewart J. M. O-Benzyl-N-tert-butyloxycarbonyl-L-threonine. Journal of Organic Chemistry 1968;33(2):903–904.
42. Sugano H., Miyoshi M. A convenient synthesis of N-tert-butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-serine. Journal of Organic Chemistry 1976;41(13):2352-2353.
43. Barlos K., Gatos D., Koutsogianni S., Schafer W., Stavropoulos G., Wenqing Y. Demonstration and employment of N-Fmoc-O-Trt hydroxyaminoacid derivatives in the solid-phase synthesis of peptides. Tetrahedron Letters 1991;32(4):471-474.
44. Konig W, Geiger R. Racemization in peptide syntheses. Racemisierung bei Peptidsynthesen 1970;103(7):2024-33.

45. Bodanszky M. Peptide Chemistry: A practical Textbook. 1993, 2nd edition, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
46. Carpino L. A, El-Faham A. The diisopropylcarbodiimide/ 1-hydroxy-7-azabenzotriazole system: Segment coupling and stepwise peptide assembly. Tetrahedron 1999;55(22): 6813–6830.
47. Carpino L. A, El-Faham A., Albericiob F. Racemization studies during solid-phase peptide synthesis using azabenzotriazole-based coupling reagents. Tetrahedron Letters 1994;35(15): 2279–2282.
48. Izdebski J., Pachulska M., Orlowska A. "N-Cycloexyl-N'-isopropylcarbodiimide - A hybrid that combines the structural features of DCC and DIC", International journal of peptide and protein research 1994; 44(5):414-419.
49. Castro B., Dourtoglou B., Dormoy J.R., Evin G., Selve C., Ziegler J.C. Peptide coupling reagents. VI. A novel, cheaper preparation of benzotriazolyloxytris [dimethylamino] phosphonium hexafluorophosphate (BOP reagent). Synthesis 1976;18:751-2.
50. Steinauer R., Chen F.M.F., Benoiton N.L. Studies on racemization associated with the use of benzotriazol-1-yl-tris (dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP). International Journal of Peptide and Protein Research 1989;34(4):295-298.
51. Coste J., Le-Nguyen D., Castro B. PyBOP: A new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product. Tetrahedron Letters 1990;31(2):205–208.
52. Albericio F, Cases M., Alsina J., Triolo S. A., Carpino L. A., Kates S. A. On the use of PyAOP, a phosphonium salt derived from HOAt, in solid-phase peptide synthesis. Tetrahedron Letters 1997;38(27):4853–4856.
53. Auvin-Guette C., Frérot E., Coste J., Rebuffat S., Jouin P., Bodo B. Z-Gln(Trt)-Aib-Aib-Aib-OMe synthesis using UNCA and BOP/PyBroP coupling methods. Tetrahedron Letters 1993;34(15):2481–2482.
54. Knorr R., Trzeciak A., Bannawarth W., Gillsen D. New coupling reagents in peptide chemistry. Tetrahedron Letters 1989;30:1927-30.
55. Dourtoglou V., Gross B. O-benzotriazol-N,N,N’,N’-tetramethyluronium hexafluorophosphate as coupling reagent for the synthesis of peptides of biological interest. Synthesis 1984;NO. 7:572-574.
56. Carpino L. 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive. Journal of the American Chemical Society 1993;115(10):4397–4398

57. Albericio F, Bofill J. M., El-Faham A., Kates S. A. Use of Onium Salt-Based Coupling Reagents in Peptide Synthesis. Journal of Organic Chemistry 1998;63:9678-9683.
58. Marder O., Albericio F. Industrial application of coupling reagents in peptides. Chimica Oggi 2002;37.
59. Kaiser E., Colescott R. L., Bossinger C. D., Cook P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. Analytical Biochemistry 1970;34(2):595–598.
60. Fontenot J. D., Ball J. M., Miller M. A., David C. M., Montelaro R. C. A survey of potential problems and quality control in peptide synthesis by the fluorenylmethoxycarbonyl procedure. Peptide Research 1991;4(1):19-25.
61. König W., Geiger R. A new method for synthesis of peptides: activation of the carboxyl group with dicyclohexylcarbodiimide using 1-hydroxybenzotriazoles as additives. Chemische Berichte 1970;103(3):788-98.
62. Jarrett J. T., Lansbury P. T. Jr. Improved coupling of protected peptides on the kaiser oxime resin using bop activation. Tetrahedron Letters 1990;32(32):4561–4564.
63. Michael W., Pennington, Byrnes M. E. Procedures to Improve Difficult Couplings in Methods in Molecular Biology, Peptide Synthesis Protocols, Edited by Pennington M. W. and Dunn B. M., 1994;35:1-16.
64. Milton R. C. L., Milton S. C. F., Adams P. A. Prediction of difficult sequences in solid-phase peptide synthesis. Journal of the American Chemical Society 1990;112(16):6039-6046.
65. Gisin B.F., Merrifield R.B. Carboxyl-catalyzed intramolecular aminolysis. A side reaction in solid-phase peptide synthesis. Journal of the American Chemical Society 1972;94(9):3102-3106.
66. Pedroso E., Grandas A., Heras X., Eritja R., Giralt E. Diketopiperazine formation in solid phase peptide synthesis using p-alkoxybenzyl ester resins and Fmoc-amino acids. Tetrahedron Letters 1986;27(6):743-746.
67. Fischer P. M. Diketopiperazines in peptide and combinatorial chemistry. Journal of Peptide Science 2003;9(1):9-35.
68. Chiva C, Vilaseca M, Giralt E., Albericio F. An HPLC-ESMS study on the solid-phase assembly of C-terminal proline peptides. Journal of Peptide Science 1999;5(3):131-140.
69. Nicolás E., Pedroso E., Girald E. Formation of aspartimide peptides in Asp-Gly sequences. Tetrahedron Letters 1989;30(4):497-500.

70. Lauer J. L., Fields C. G., Fields G. B. Sequence dependence of aspartimide formation during 9-fluorenylmethoxycarbonyl solid-phase peptide synthesis. Letters in Peptide Science 1995;1(4):197-205.
71. Palasek S.A., Cox Z.J., Collins J.M. Limiting racemization and aspartimide formation in microwave-enhanced Fmoc solid phase peptide synthesis. Journal of Peptide Science 2007;13(3):143-148.
72. King D.S., Fields C.G., Fields G.B., A cleavage method which minimizes side reactions following Fmoc solid phase peptide synthesis. International journal of peptide and protein research 1990;36(3):255-266.
73. Atherton E., Sheppard R.C. Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, 1989, Oxford University Press.
74. Sieber P., Modification of tryptophan residues during acidolysis of 4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzenesulfonyl groups. Effects of scavengers. Tetrahedron Letters 1987;28(15):1637-1640.
75. Choi H., Aldrich J.V. Comparison of methods for the Fmoc solid-phase synthesis and cleavage of a peptide containing both tryptophan and arginine. International journal of peptide and protein research 1993;42(1):58-63.
76. Fields C.G., Fields G.B. Minimization of tryptophan alkylation following 9-fluorenylmethoxycarbonyl solid-phase peptide synthesis Tetrahedron Letters 1993;34(42): 6661–6664.
77. Beck-Sickinger A.G., Schnorrenberg G, Metzger J, Jung G. Sulfonation of arginine residues as side reaction in Fmoc-peptide synthesis. International Journal of Peptide and Protein Research 1991;38(1):25-31.
78. Jaeger E., Remmer H.A., Jung G., Metzger J., Oberthür W., Rücknagel K.P., Schäfer W., Sonnenbichler J., Zetl I. Side reactions in peptide synthesis. V. O-sulfonation of serine and threonine during removal of pmc- and mtr-protecting groups from arginine residues in fmoc-solid phase synthesis Biological Chemistry Hoppe-Seyler 1993;374(5):349-362.
79. Pearson D.A., Blanchette M, Baker M.L., Guindon C.A. Trialkylsilanes as scavengers for the trifluoroacetic acid deblocking of protecting groups in peptide synthesis. Tetrahedron Letters 1989;30(21): 2739–2742.
80. Sole N.A., Barany G. Optimization of solid-phase synthesis of [Ala8]-dynorphin A. The Journal of Organic Chemistry 1992; 57 (20):5399–5403.

81. Carr D. The Handbook of the Analysis and Purification of Peptides and Proteins by Reversed-Phase HPLC. Third Edition, 2002.
82. Wilm M., Mann M. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. Analytical Chemistry 1996;68(1):1-8.
83. Fenn J. B. Mann M., Meng C. K., Wong S. F., Whitehouse C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. Science. 1989;246(4926):64-71.
84. Kebarle P. A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. Journal of Mass Spectrometry 2000;35(7):804-817
85. Kebarle P., Verkerk U. H. Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. Mass Spectrometry Reviews 2009;28(6):898-917.
86. March, R.E. and J.F.J. Todd, Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry. 2nd ed. 2005, New York: Wiley-Interscience

Κεφάλαιο 4

1. Tam J. M. Synthetic peptide vaccine design: Synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1988;85:5409-5413.
2. Sadler K., Tam J. M. Peptide dendrimers: applications and synthesis. Reviews in Molecular Biotechnology 2002;90(3–4):195–229.
3. Mutter M., Tuchscherer G. Non-native architectures in protein design and mimicry. Cellular and Molecular Life Sciences 1997;53(11-12):851-63
4. Tsikaris V., Sakarellos C., Cung M. T., Marraud M., Sakarellos-Daitsiotis M. Concept and design of a new class of sequential oligopeptide carriers (SOC) for covalent attachment of multiple antigenic peptides. Biopolymers 1996;38(3):291-293.
5. Tsikaris V., Sakarellos C., Sakarellos-Daitsiotis M., Orlewski P., Marraud M., Cung M. T., Vatzaki E., Tzartos S. Construction and application of a new class of sequential oligopeptide carriers (SOCn) for multiple anchoring of antigenic peptides--application to the acetylcholine receptor (AChR) main immunogenic region. International Journal of Biological Macromolecules 1996;19(3):195-205.
6. Sakarellos-Daitsiotis M., Tsikaris V., Vlachoyiannopoulos P. G., Tzioufas A. G., Moutsopoulos H. M., Sakarellos C. Peptide carriers: A helicoid-type sequential

oligopeptide carrier (SOC(n)) for multiple anchoring of antigenic/immunogenic peptides. Methods 1999;19(1):133-141.

7. Sakarellos-Daitsiotis M., Tsikaris V., Sakarellos C., Vlachoyiannopoulos P. G., Tzioufas A. G. A new helicoid-type sequential oligopeptide carrier (SOCn) for developing potent antigens and immunogens. Vaccine 2000;8(3-4):302-310.
8. Sakarellos-Daitsiotis M., Krikorian, D., Panou-Pomonis, E., Sakarellos C. Artificial Carriers: A Strategy for Constructing Antigenic/Immunogenic Conjugates. Current Topics in Medicinal Chemistry 2006;6(16):1715-1735.
9. Sakarellos C., Tsikaris V., Panou-Pomonis E., Alexopoulos C., Sakarellos-Daitsiotis M., Petrovas C, Vlachoyiannopoulos P. G., M. Moutsopoulos H. M. The PPGMRPP repetitive epitope of the Sm autoantigen: Antigenic specificity induced by conformational changes. Application of the Sequential Oligopeptide Carriers (SOCs). Letters in Peptide Science 1997;4(4-6):447-454.
10. Sakarellos-Daitsiotis M., Tsikaris V., Vlachoyiannopoulos P. G., Tzioufas A. G., Moutsopoulos H. M., Sakarellos C. Peptide Carriers: A Helicoid-Type Sequential Oligopeptide Carrier (SOCn) for Multiple Anchoring of Antigenic/Immunogenic Peptides. Methods 1999;19:131-141.
11. Alexopoulos C., Tsikaris V., Rizou C., Sakarellos-Daitsiotis M., Sakarellos C., Cung M. T., Marraud M., Vlachoyiannopoulos P. G., Moutsopoulos H. M. The position of the LysN epsilon H2-grafted antigens along the sequential oligopeptide carrier, Ac-(Aib-Lys-Aib-Gly)n (SOCn-II), influences the antibody recognition: application to the Sm main autoimmune epitope. Biopolymers 2000;54(1):1-10.
12. Tam J. P. Synthetic peptide vaccine design: Synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1988;85(15):5409-5413.
13. Nardin E. H., Oliveira G. A., Calvo-Calle J. M., Nussenzweig R. S. The Use of Multiple Antigen Peptides in the Analysis and Induction of Protective Immune Responses against Infectious Diseases. Advances in Immunology 1995;60:105-149.
14. Cruz L., Cabrales A., Iglesias E., Aguilar J., González L. J., Reyes O. Enhanced immunogenicity and cross-reactivity of HIV-1 V3-peptide and multiple antigen peptides conjugated to distinct carrier proteins. International Immunopharmacology 2009;9(12):1452–1459.

15. Wang Y., Wang M., Wang G., Pang A., Fu B., Yin H., Zhang D. Increased survival time in mice vaccinated with a branched lysine multiple antigenic peptide containing B- and T-cell epitopes from T. Gondii antigens. Vaccine 2011;29:8619–8623.
16. Tuchscherer G., Mutter M. Templates in protein de novo design. Journal of Biotechnology 1995;41(2-3):197-210.
17. Altamann K. H., Mutter M. A general strategy for the de novo design of proteins-template assembled synthetic proteins. International Journal of Biochemistry 1990;22(9):947-956.

Κεφάλαιο 5

1. Tam J. P., Xu J., Eom K. D. Methods and strategies of peptide ligation. Biopolymers 2001;60(3):194-205.
2. Krenek K., Gazák R., Daskhan G. C., Garcia J., Fiore M., Dumyb P., Šulc M., Kren V., Renaudet O. Access to bifunctionalized biomolecular platforms using oxime ligation. Carbohydrate Research 2014;393:9–14.
3. Zeng W., Ghosh S., Macris M., Pagnon J., Jackson D. C. Assembly of synthetic peptide vaccines by chemoselective ligation of epitopes: influence of different chemical linkages and epitope orientations on biological activity. Vaccine 2001;19(28-29):3843-52.
4. Beekman N. J., Schaaper W. M., Langeveld J. P., Boshuizen R. S., Meloen R. H. The nature of the bond between peptide and carrier molecule determines the immunogenicity of the construct. Journal of Peptide Research 2001;58(3):237-245.
5. Rose K. Facile synthesis of homogeneous artificial proteins. Journal of the American Chemical Society 1994;115(1):30-33.
6. Pochon S. Buchegger F., Pélegrin A., Mach J-P., Offord R. E., Ryser J. E., Rose K. A novel derivative of the chelon desferrioxamine for site-specific conjugation to antibodies. International Journal of Cancer 1989;43(6):1188-1194.
7. Cervigni S. E., Dumy P., Mutter M. Synthesis of Glycopeptides and Lipopeptides by Chemoselective Ligation. Angewandte Chemie International Edition in English 1996;35(11):1230-1232.
8. Mikola H., Hanninen E. Introduction of aliphatic amino and hydroxy groups to keto steroids using O-substituted hydroxylamines. Bioconjugate Chemistry 1992;3(2):182–186.

9. Rose K., Zeng W., Regamey P. O., Chernushevich I. V., Standing K. G., Gaertner H. F. Natural peptides as building blocks for the synthesis of large protein-like molecules with hydrazone and oxime linkages. Bioconjugate Chemistry 1996;7(5):552-556.
10. Geoghegan K. F., Stroh J. G. Site-directed conjugation of nonpeptide groups to peptides and proteins via periodate oxidation of a 2-amino alcohol. Application to modification at N-terminal serine. Bioconjugate Chemistry 1992;3(2):138–146.
11. El-Mahdi O., Melnyk O. α-Oxo aldehyde or glyoxylyl group chemistry in peptide bioconjugation. Bioconjugate Chemistry 2013;24(5):735-765.
12. Gaertner H. F., Rose K., Cotton R., Timms D., Camble R., Offord R. E. Construction of protein analogs by site-specific condensation of unprotected fragments. Bioconjugate Chemistry 1992;3 (3):262–268.
13. Vilaseca L. A., Rose K., Werlen R., Meunier A., Offord R. E., Nichols C. L., Scott W. L. Protein conjugates of defined structure: synthesis and use of a new carrier molecule. Bioconjugate Chemistry 1993;4(6):515-520.
14. Chelius D., Shaler T. A. Capture of peptides with N-terminal serine and threonine: a sequence-specific chemical method for Peptide mixture simplification. Bioconjugate Chemistry 2003;14(1):205-211.
15. Poethko T., Schottelius M., Thumshirn G., Hersel U., Herz M., Henriksen G., Kessler H., Schwaiger M., Wester H. J. Two-step methodology for high-yield routine radiohalogenation of peptides: (18)F-labeled RGD and octreotide analogs. The Journal of Nuclear Medicine 2004;45(5):892-902.
16. Buré C., Lelièvre D., Delmas A. Identification of by-products from an orthogonal peptide ligation by oxime bonds using mass spectrometry and tandem mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry 2000;14(23):2158-2164.
17. Orbán E., Mezo G., Schlage P., Csík G., Kulić Z., Ansorge P., Fellinger E., Möller H. M., Manea M. In vitro degradation and antitumor activity of oxime bond-linked daunorubicin-GnRH-III bioconjugates and DNA-binding properties of daunorubicin-amino acid metabolites. Amino Acids. 2011;41(2):469-483.
18. Clement B, Lomb R, Moller W. Isolation and characterization of the protein components of the liver microsomal O2-insensitive NADH-benzamidoxime reductase. The Journal of Biological Chemistry 1997;272:19615–19620.
19. Heberling S., Girreser U., Wolf S., Clement B. O xygen-insensitive enzymatic reduction of oximes to imines. Biochemical Pharmacology 2006;71:354-365.

20. Clement B., Demesmaeker M., Linne S. Microsomal catalyzed N-hydroxylation of guanabenz and reduction of the N-hydroxylated metabolite: characterization of the two reactions and genotoxic potential of guanoxabenz. Chemical Research in Toxicology 1996;9(4):682-688.
21. Kargakis M., Zevgiti S., Krikorian D., Sakarellos-Daitsiotis M., Sakarellos C., Panou-Pomonis E. A palmitoyl-tailed sequential oligopeptide carrier for engineering immunogenic conjugates. Vaccine. 2007;25(37-38):6708-6712.

Κεφάλαιο 10

1. Haynes B. F., Fleming J., St. Clair E. W., Katinger H., Stiegler G., Kunert R. et al. Cardiolipin polyspecific autoreactivity in two broadly neutralizing HIV-1 antibodies. Science 2005;308(5730):1906-1908.
2. Mehandru, T. Wrin, J. Galovich, G. Stiegler, B. Vcelar, A. Hurley, et al. Neutralization profiles of newly transmitted human immunodeficiency virus type 1 by monoclonal antibodies 2G12, 2F5, and 4E10. Journal of Virology 2004;78(24):14039–14042
3. J.M. Binley, T. Wrin, B. Korber, M.B. Zwick, M. Wang, C. Chappey, et al. Comprehensive cross-clade neutralization analysis of a panel of anti-human immunodeficiency virus type 1 monoclonal antibodies. Journal of Virology 2004;78(23):13232–13252.
4. Zwick MB, Labrijn AF, Wang M, Spenlehauer C, Saphire EO, Binley JM, et al. Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41. Journal of Virology 2001;75(22):10892–10905.
5. Myers M. J., Farrell D. E., Howard K. D., Kawalek J. C. Identification of multiple constitutive and inducible hepatic cytochrome P450 enzymes in market weight swine. Drug Metabolism and Disposition 2001;29(6):908-915.
6. Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J., Klenk D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Analytical Biochemistry 1985;150(1):76-85.

IV. Συντομεύσεις

Acm: ακεταμιδομεθυλομάδα

Aib: αμινο-ισοβουτυρικό

AIDS: Acquired Immunodeficiency Syndrome: Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας

Ala (A): αλανίνη

Alloc: Αλλυλοξυ-καρβονυλομάδα

Aoa: aminooxyacetic acid: αμινοοξικό οξύ

Arg (R): αργινίνη

Asn (N): ασπαραγίνη

Asp (D): ασπαρτικό οξύ

Boc: t-βουτοξυ-καρβονυλομάδα

BSA: Bovine Serum Albumin: αλβουμίνη βοός

BOP: βενζοτριαζολ-1-υλ-οξυ-τρισ-(διμεθυλαμινο)-φωσφονικοεξαφορο φωσφορικό άλας

Bzl: βενζυλομάδα

CD: Cluster Designation: ομάδα διάκρισης

cDNA: complementary DNA: συμπληρωματικό DNA

CTLs: Cytotoxic T Lymphocyte: κυτταροτοξικό Τ λεμφοκύτταρο

Cys (C): κυστεΐνη

DCC: N,N-δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμίδιο

DCM: διχλωρομεθάνιο

Dde: 1-(4,4-διμεθυλο-2,6- διοξο-κυκλοεξ-1-υλιδεν)αιθυλομάδα

DIC: N,N-διισοπροπυλοκαρβοδιιμίδιο

DMF: διμεθυλοφορμαμίδιο

DIEA: διισοπροπυλοαιθυλαμίνη

DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο

DMS: διμεθυλοσουλφίδιο

Dmcp: 1-κυκλοπροπυλ-1-μεθυλαιθυλομάδα

DNA: Deoxyribonucleic acid: δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ

Dnp: 2,4-δινιτροφαινυλομάδα

EDT: αιθανεδιθειόλη

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay, Ανοσοπροσροφητική ανάλυση στερεάς φάσεως με σύνδεση ενζύμου

env: envelope: γονίδιο φάκελος

EG: αιθυλενογλυκόλη

ESI-MS: Electrospray Ionization-Mass Spectrometry, φασματομετρία μάζας ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό

Fmoc: 9-Φλουορενυλο-μεθυλοξυ-καρβονυλομάδα

gag:group specific antigen: αντιγλονο ειδικό για ομάδα

gp: glycoprotein: γλυκοπρωτεΐνη

Gln (Q): γλουταμίνη

Glu (E): γλουταμινικό οξύ

Gly (G): γλυκίνη

HBTU: ο-βενζοτριαζολυλο-τετραμεθυλο-ισοουρανικό εξαφθοροφωσφορικό άλας

HCTU: 6-χλωρο-ο-βενζοτριαζολυλο τετραμεθυλο-ισοουρονικό εξαφθοροξικό άλας

HF: υδροφθόριο

His (H): ιστιδίνη

HIV: Human Immunodeficiency Virus: Ιός της Ανθρώπινης Ανοσοανεπάρκειας

HOBt: 1-υδροξυβενζοτριαζόλιο

HPLC: Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Ig:ανοσοσφαιρίνες

Ile (I): ισολευκίνη

Leu (L): λευκίνη

Lys (K): λυσίνη

mAg: monoclonal antibody: μονοκλωνικό αντίσωμα

MAPs: Multiple Antigen Peptide System: σύστημα πολλαπλών αντιγονικών πεπτιδίων

MeOH: μεθανόλη

mRNA: messenger RNA: αγγελιοφόρο RNA

Met (M): μεθειονίνη

Mmt: 4-μεθοξυ-τριτυλομάδα

Mtr: 2,4,6-τριμεθυλοφαινυλο-σουλφονυλομάδα

Mts: 2,4,6-τριμεθυλοφαινυλο-σουλφονυλομάδα

Mtt: 4-μεθυλο-τριτυλομάδα

MHC: Major Histocompatibility Complex, Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας

NADH: Nicotinamide adenine dinucleotide, Νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο

NK:natural killer cells:φυσικά φονικά κύτταρα

NMP: Ν-μεθυλο-πυρολιδίνη

OAll: αλλυλομάδα

OBzl: βενζυλοξυομάδα

OcHx: κυκλοεξυλοξυομάδα

OtBu: t-βουτοξυομάδα

Pbf: 2,2,4,6,7-πενταμεθυλο-διϋδροβενζοφουρανο-σουλφονυλομάδα

PBS: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών

Phe (F): φαινυλαλανίνη

pI: Isoelectric point: ισοηλεκτρικό σημείο

pol: polymerase:γονίδιο πολύμεράση

Pro (P): προλίνη

PyBOP: βενζοτριαζολ-1-υλ-οξυ-τρισ-πυρολιδινο-φωσφονικό εξαφθορο φωσφορικό άλας

PyBrop: βρωμο-τρις-πυρολιδινο-φωσφονικό εξαφθορο φωσφορικό άλας

Ser (S): σερίνη

rev: regulator of viral protein synthesis:ρυθμιστής ικής πρωτεϊνικής σύνθεσης

RNA: Ribonucleic acid: ριβονουκλεϊνικό οξύ

Sequential Oligopeptide Carriers: SOC_n : Επαναλαμβανόμενοι Ολιγοπεπτιδικοί Φορείς

SIV: Simian immunodeficiency viruses: Ιοί ανοσοανεπάρκειας πιθήκων

ssRNA: single stranded: μονόκλωνο RNA

SPPS: Solid Phase Peptide Synthesis, πεπτιδική σύνθεση στερεής φάσης

tat: transactivator protein: πρωτεΐνη ενεργοποιητής μεταγραφής

TASPs: Template-Assembled Synthetic Proteins: σύστημα πρόσδεσης πεπτιδίων

TBTU: ο-βενζοτριαζολυλο-τετραμεθυλο-ισοουρανικό τετραφθοροβορικό άλας

TFA: τριφθοροξικό οξύ

Tfa: τριφθορο-ακετυλομάδα

TFMSA: τριφθορομεθανοσουλφονικό οξύ

tBu: t-βουτυλομάδα

Thr (T): θρεονίνη

TMS: Tetramethylsilane:Τετραμεθυλοσιλάνιο

TIS: τριισοπροπυλοσιλάνιο

Tos: π-τολουολο-σουλφονυλομάδα

Trp (W): τρυπτοφάνη

Trt: Τριτυλομάδα (τριφαινυλο-μεθυλομάδα)

Tyr (Y): τυροσίνη

Val (V): βαλίνη

Vpr: Viral protein R: ιική πρωτεΐνη R

Xan: ξανθυλομάδα

Z: βενζυλοξυκαρβονυλομάδα

2-Cl-Z: 2-χλωρο-βενζυλοξυκαρβονυλομάδα