

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΣΤΥΛΙΑΝΗ Φ. ΖΕΥΓΙΤΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ, ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΥΧΟΣ ΜΔΕ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΟΛΙΓΟΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ
ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΥΣ ΕΛΕΓΧΟΥΣ ΚΑΙ ΕΜΒΟΛΙΑ ΕΝΑΝΤΙ
ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΓΡΙΠΗΣ ΤΩΝ ΠΤΗΝΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ



ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2009



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000321954

1. /
Επ
2. /
επ
3. /
ου
4.
ε.
5.
επ
6. /
ε.
7. /
ε.



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΣΤΥΛΙΑΝΗ Φ. ΖΕΥΓΙΤΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ, ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΥΧΟΣ ΜΔΕ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΟΛΙΓΟΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ
ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΥΣ ΕΛΕΓΧΟΥΣ ΚΑΙ ΕΜΒΟΛΙΑ ΕΝΑΝΤΙ
ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΓΡΙΠΗΣ ΤΩΝ ΠΤΗΝΩΝ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

που εκπονήθηκε στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ευγενία Πάνου-Πομώνη-Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων-
Επιβλέπουσα Καθηγήτρια
2. Καθηγητής Βασίλειος Τσίκαρης -Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων-Μέλος συμβουλευτικής
επιτροπής
3. Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Άννα-Ειρήνη Κούκκου-Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων-Μέλος
συμβουλευτικής επιτροπής
4. Καθηγητής Αλέξανδρος Τσελέπης-Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων-Μέλος εξεταστικής
επιτροπής
5. Καθηγητής Λάζαρος Χατζηαράπογλου-Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων-Μέλος εξεταστικής
επιτροπής
6. Αναπληρωτής Καθηγητής Ιωάννης Ελεμές-Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων-Μέλος
εξεταστικής επιτροπής
7. Αναπληρωτής Καθηγητής Δημόκριτος Τσουκάτος-Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων-Μέλος
εξεταστικής επιτροπής

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2009





Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ευγενία Πάνου-Πομόνη
E-mail: epanou@cc.uoi.gr
Τηλ.: +2651098393 FAX: +2651098799, Γραμματεία: +2651098388

Προς το Τμήμα Χημείας
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Θέμα: «Απονομή του τίτλου του Διδάκτορα στην κ. Στυλιανή Ζευγίτη»

Η επταμελής Εξεταστική Επιτροπή που ορίστηκε για την κρίση της Διδακτορικής Διατριβής της κ. Στυλιανής Ζευγίτη, Χημικού, συνήλθε σε συνεδρίαση στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων στις 03 Ιουνίου 2009, όπου παρακολούθησε την υποστήριξη της εργασίας με τίτλο: «ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΟΛΙΓΟΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΥΣ ΕΛΕΓΧΟΥΣ ΚΑΙ ΕΜΒΟΛΙΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΓΡΙΠΗΣ ΤΩΝ ΠΤΗΝΩΝ»

Η Επιτροπή έκρινε ομόφωνα ότι η εργασία είναι πρωτότυπη και αποτελεί ουσιαστική συμβολή στην πρόοδο της Επιστήμης. Κατόπιν αυτού η επιτροπή αποφάσισε να απονεμίσει τον τίτλο του Διδάκτορα του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στην κ. Στυλιανή Ζευγίτη με βαθμό **Άριστα**

Τα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής

1. Ευγενία Πάνου-Πομόνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Επιβλέπουσα

2. Τσούκαλης Βασίλειος, Καθηγητής

3. Άννα-Ειρήνη Κούκκου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

4. Αλέξανδρος Τσελέπης, Καθηγητής

5. Λάζαρος Χατζηαρράπογλου, Καθηγητής

6. Ιωάννης Ελεμέ, Αναπληρωτής Καθηγητής

7. Δημόκριτος Τσουκάτος, Αναπληρωτής Καθηγητής



Ημερομηνία: 1971
 Προς τους γονείς μου Φώτη και Ευτέρπη
 και στην αδερφή μου Αριστέα

Ημερομηνία: 1971
 Προς τους γονείς μου Φώτη και Ευτέρπη
 και στην αδερφή μου Αριστέα

Ημερομηνία: 1971
 Προς τους γονείς μου Φώτη και Ευτέρπη
 και στην αδερφή μου Αριστέα

**Στους γονείς μου Φώτη και Ευτέρπη
και στην αδερφή μου Αριστέα**

Ημερομηνία: 1971
 Προς τους γονείς μου Φώτη και Ευτέρπη
 και στην αδερφή μου Αριστέα

Ημερομηνία: 1971
 Προς τους γονείς μου Φώτη και Ευτέρπη
 και στην αδερφή μου Αριστέα

Ημερομηνία: 1971
 Προς τους γονείς μου Φώτη και Ευτέρπη
 και στην αδερφή μου Αριστέα

Επιστολή μου
 1971



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Χημείας Πεπτιδίων του Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κατά το χρονικό διάστημα Ιούνιος 2005 – Μάϊος 2009.

Η ανάθεση και καθοδήγηση του θέματος έγινε από τριμελή συμβουλευτική επιτροπή αποτελούμενη από την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Ευγενία Πάνου-Πομόνη, ως επιβλέπουσα καθηγήτρια, τον Καθηγητή κ. Βασίλειο Τσίκαρη και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Άννα-Ειρήνη Κούκκου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Καθηγήτρια κ. Μαρία Σακαρέλλου-Δαϊτσιώτου για την άμεση επίβλεψη και καθοδήγηση κατά την εκπόνηση αυτής της διατριβής, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για την πολύτιμη βοήθειά της τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο.

Ευχαριστώ, επίσης, θερμά τον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Σακαρέλλο και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Ευγενία Πάνου-Πομόνη για το συνεχές ενδιαφέρον, τις πολύτιμες συμβουλές τους και την ουσιαστική υποστήριξη που μου παρείχαν κατά την εκπόνηση της διατριβής μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Βασίλειο Τσίκαρη και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Άννα-Ειρήνη Κούκκου για το ενδιαφέρον τους και τις πολύτιμες συμβουλές του.

Θα ήθελα, επιπλέον, να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Δρ. Δημήτρη Κρικοριάν για τη συνεχή του στήριξη. Η συμπαράστασή του όλα αυτά τα χρόνια υπήρξε καθοριστική για την ολοκλήρωση αυτής της διατριβής.

Ευχαριστώ θερμά τους συναδέλφους μου στο Εργαστήριο Χημείας Πεπτιδίων για την πολύ καλή συνεργασία και την πολύτιμη βοήθειά τους.

Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί ότι το μεγαλύτερο μέρος αυτής της διατριβής εντάσσεται στα πλαίσια χρηματοδοτούμενου από την Ευρωπαϊκή Κοινότητα ερευνητικού προγράμματος και ως εκ τούτου ευχαριστιέται εκφράζονται στους ερευνητές-συμμετέχοντες στο πρόγραμμα Δρ. Ursula Dietrich και Δρ. Ayub Darji καθώς και στον Καθηγητή Δρ. Oliver Planz για την διεξαγωγή των βιολογικών πειραμάτων.

Στυλιανή Ζευγίτη
Ιωάννινα, 2009



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Θεωρητικό Μέρος

Κεφάλαιο 1

ΓΡΙΠΗ

Εισαγωγή	17
Η γρίπη των πτηνών στα πτηνά	17
Η γρίπη των πτηνών στον άνθρωπο	18
Ο υπότυπος H5N1 του ιού της γρίπης των πτηνών	19
Εξελικτική ικανότητα του ιού της γρίπης: Αντιγονική παραλλαγή	21
Ο ρόλος των αποδημητικών πτηνών	22
Κλινικά χαρακτηριστικά - συμπτώματα	22
Εργαστηριακή διάγνωση γρίπης	22
Θεραπεία της γρίπης	23
Πρόληψη - εμβόλια	23

Κεφάλαιο 2

Ο ΙΟΣ ΤΗΣ ΓΡΙΠΗΣ

Εισαγωγή: Τύποι, υπότυποι και στελέχη	25
Δομή-Μορφολογία	27
Πρωτεΐνες του ιού	28
Αναδιπλασιασμός και διάδοση του ιού (viral propagation)	31

Κεφάλαιο 3

Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΑΙΜΟΣΥΓΚΟΛΛΗΤΙΝΗ ΗΑ-Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΤΗ ΜΕΤΑΔΟΣΗ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΓΡΙΠΗΣ

Εισαγωγή	33
Η πρόδρομη αιμοσυγκολλητίνη ΗΑ0	33
Θέση αποκοπής - Δομή του cleavage site	34
Δομή της ΗΑ0	35
Θέση πρόσδεσης στον υποδοχέα (Receptor Binding Domain)	37
Ο υποδοχέας της ΗΑ	38
Προστατευτική ανοσολογική απόκριση έναντι της γρίπης	39
Β-κυτταρικοί επίτοποι	40
Τ-κυτταρικοί επίτοποι	40
Θέσεις γλυκοζυλίωσης	41
Πεπτιδίο σύντηξης	42
Ο ρόλος της ΗΑ στη μόλυνση του κυττάρου ξενιστή από τον ιό γρίπης - Σύντηξη μεμβρανών	43

Κεφάλαιο 4

ΣΥΝΘΕΤΙΚΟΙ ΠΕΠΤΙΔΙΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ

Εισαγωγή	45
Φορέας πολλαπλών αντιγονικών πεπτιδίων (Multiple Antigenic Peptides, MAPs)	46
Μοντέλο TASP (Template Assembled Synthetic Protein)	47



Επαναλαμβανόμενοι Ολιγοπεπτιδικοί Φορείς (Sequential Oligopeptide Carriers, SOC _n)	48
--	----

Κεφάλαιο 5

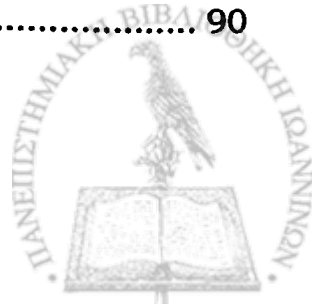
ΠΕΠΤΙΔΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ

Πεπτιδικός Δεσμός	51
Σχηματισμός Πεπτιδικού Δεσμού	52
Σύνθεση πεπτιδίων	53
Σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση	54
Πολυμερικά υποστρώματα στην πεπτιδική σύνθεση στερεής φάσης	55
Προστασία και αποπροστασία N ^α -αμινομάδας	60
Προστασία των παράπλευρων δραστικών ομάδων των αμινοξέων	61
Προστασία της γουανιδινομάδας της αργινίνης	67
Προστασία της N ^ε -αμινομάδας της λυσίνης	67
Προστασία του ιμιδαζολικού δακτυλίου της ιστιδίνης	68
Προστασία του ινδολικού δακτυλίου της τρυπτοφάνης	69
Προστασία της καρβοξαμιδικής ομάδας της ασπαραγίνης/γλουταμίνης	70
Προστασία της καρβοξυλικής ομάδας του ασπαρτικού/γλουταμινικού οξέος	70
Προστασία της υδροξυλομάδας της σερίνης/θρεονίνης/τυροσίνης	71
Προστασία της θειολομάδας της κυστεΐνης	71
Αντιδραστήρια σύζευξης	72
Ανεπιθύμητες αντιδράσεις στην πεπτιδική σύνθεση	74
Ρακεμοποίηση	74
Σχηματισμός ασπαρτιμιδίου	76
Σχηματισμός δικετοπιπεραζίνης	78
Αποκοπή του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές	79
Αποκοπή με τη χρήση υγρού HF	80
Αποκοπή με τη χρήση TFA	80

Κεφάλαιο 6

ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ-ΓΛΥΚΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ-ΝΕΟΓΛΥΚΟΠΕΠΤΙΔΙΑ

A. ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ	81
Εισαγωγή	81
Απεκόνιση μονοσακχαριτών, D και L σάκκαρα	81
Κυκλικές δομές μονοσακχαριτών: σχηματισμός ημιακεταλών	82
Ανωμερή μονοσακχαριτών: πολυστροφισμός	83
Διαμορφώσεις μονοσακχαριτών	84
Ολιγοσακχαρίτες-Πολυσακχαρίτες	85
Αναγωγικά σάκκαρα	85
Σιαλικά οξέα	86
B. ΓΛΥΚΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	87
Εισαγωγή	87
Είδη γλυκοπρωτεϊνών	88
Ετερογένεια-γλυκομορφές	88
Στρατηγικές σύνθεσης γλυκοπεπτιδίων/γλυκοπρωτεϊνών	89
Γ. ΝΕΟΓΛΥΚΟΠΕΠΤΙΔΙΑ	90
Εισαγωγή	90



Σύνθεση γλυκοπεπτιδικών μιμητικών αναλόγων με χημειοεκλεκτικές μεθόδους	90
α) Μη φυσικός δεσμός μεταξύ πεπτιδίου-σικκάρου.....	91
β) Μη φυσικός δεσμός μεταξύ σακκάρου-σακκάρου	94

Κεφάλαιο 7

ΧΗΜΕΙΟΕΚΛΕΚΤΙΚΗ ΣΥΝΔΕΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ - ΓΛΥΚΟΠΕΠΤΙΔΙΩΝ:

ΔΕΣΜΟΣ ΟΞΙΜΗΣ

A. Χημειοεκλεκτική σύνδεση πεπτιδίων	95
Εισαγωγή	95
Ο δεσμός οξίμης.....	97
Στερεοχημεία δεσμού οξίμης.....	98
Σταθερότητα δεσμού οξίμης	98
Εκλεκτική εισαγωγή της αμινοξυακετυλομάδας.....	99
Εκλεκτική εισαγωγή της καρβονυλομάδας	99
B. Χημειοεκλεκτική σύνδεση γλυκοπεπτιδίων: Νεογλυκοπεπτιδία	101

Κεφάλαιο 8

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΚΥΚΛΙΚΟΥ ΔΙΧΡΩΪΣΜΟΥ (CD)

Εισαγωγή	105
Μελέτη της διαμόρφωσης πεπτιδίων με φασματοσκοπία CD.....	106
α-έλικα	108
β-διάταξη πτυχωτού φύλλου.....	109
β-στροφή	110
Τυχαία διαμόρφωση	112
Οργανολογία	113

Κεφάλαιο 9

ΕΠΙΤΟΠΟΣ	115
----------------	-----

Πειραματικό Μέρος

Κεφάλαιο 10

ΣΥΝΘΕΣΗ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ Τ-ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΕΠΙΤΟΠΩΝ ΤΗΣ ΗΑ

Εισαγωγή	123
Αντιδραστήρια	123
Γενική πορεία σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση	126
Τεχνικές καθαρισμού και ταυτοποίησης	129
Πειραματική πορεία σύνθεσης, καθαρισμού και ταυτοποίησης των Τ-κυτταρικών επιτόπων της ΗΑ.....	129
Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του επιτόπου H5VIN1cor54-69: DC(Acm)SVAGWLLGNPMC(Acm)DE-NH ₂	129
Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του επιτόπου T1: VLMENERTLK(Ser)A-NH ₂	133
Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του επιτόπου T3: ASFFRNVVWLK(Ser)-NH ₂	135



Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του επιτόπου T5: FHDSNVKLNK(Ser)-NH ₂ ...	137
Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του επιτόπου T7: NFESNGNFIK(Ser)-NH ₂	139

Κεφάλαιο 11

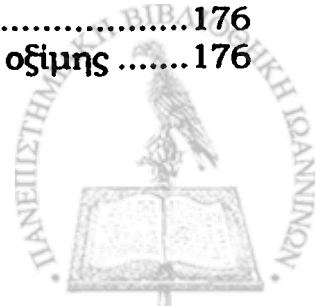
ΣΥΝΘΕΣΗ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΚΑΤΑΛΛΗΛΩΝ ΓΙΑ ΧΗΜΕΙΟΕΚΛΕΚΤΙΚΗ ΣΥΝΔΕΣΗ

Εισαγωγή.....	143
Γενική πορεία σύνθεσης	143
Σύνθεση διακλαδισμένων πεπτιδίων	143
Σύνθεση του N ^ε -αμινοοξυακέτυλο φορέα SOC ₄ -I.....	144
Σύνθεση τροποποιημένων T επιτόπων	144
Οξειδωση 2-άμινο-αλκοόλης προς αλδεΐδη παρουσία NaIO ₄	144
Αντιδραστήρια.....	145
Πειραματική πορεία σύνθεσης, καθαρισμού και ταυτοποίησης	147
Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του N ^ε -αμινοοξυακέτυλο φορέα SOC ₄ -I: H-SOC ₄ (Aoa) ₄ -NH ₂	147
Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του N ^ε -αμινοοξυακέτυλο (λυσίνες 1 και 7) φορέα SOC ₄ -I: Ac-SOC ₄ (Ac ₂ , Aoa ₂)-NH ₂	151
Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του αλδεΐδικού παραγώγου του επιτόπου T1:	
VLMENERTLK(CHOCO)A-NH ₂	155
Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του αλδεΐδικού παραγώγου του επιτόπου T3:	
ASFFRNVVWLK(CHOCO)-NH ₂	159
Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του αλδεΐδικού παραγώγου του επιτόπου T5:	
FHDSNVKLNK(CHOCO)-NH ₂	161
Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του αλδεΐδικού παραγώγου του επιτόπου T7:	
NFESNGNFIK(CHOCO)-NH ₂	163

Κεφάλαιο 12

ΣΥΝΘΕΣΗ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΗΣ HA Η5

Εισαγωγή.....	167
Αντιδραστήρια.....	167
I. Βήμα προς βήμα σύνθεση πεπτιδικών αναλόγων της HA Η5.....	170
Γενική πορεία βήμα προς βήμα σύνθεσης	170
Πειραματική πορεία βήμα προς βήμα σύνθεσης	173
Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του Ac-SOC ₄ [Ac ₂ , (H5VIN1cor54-69) ₂]-OH.....	173
II. Σύνθεση πεπτιδικών αναλόγων της HA Η5 με χημειοεκλεκτική σύνδεση μέσω δεσμού οξίμης των αλδεΐδικών παραγώγων των T επιτόπων και του N ^ε -αμινοοξυακέτυλο φορέα SOC ₄ -I	176
Χημειοεκλεκτική σύνθεση σε υγρή φάση-σχηματισμός δεσμού οξίμης	176



Πειραματική πορεία σύνθεσης	178
Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του Ac-SOC ₄ {Ac ₂ , [T1(CH=N-O)] ₂ }-NH ₂	178
Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του Ac-SOC ₄ {Ac ₂ , [T3(CH=N-O)] ₂ }-NH ₂	180
Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του Ac-SOC ₄ {Ac ₂ , [T5(CH=N-O)] ₂ }-NH ₂	182
Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του Ac-SOC ₄ {Ac ₂ , [T7(CH=N-O)] ₂ }-NH ₂	184

Κεφάλαιο 13

ΣΥΝΘΕΣΗ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΓΛΥΚΟΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ ΣΙΑΛΟ-ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΗΣ ΗΑ

Εισαγωγή	187
Αντιδραστήρια	187
Γενική πορεία σύνθεσης.....	188
Χημειοεκλεκτική σύνθεση σε υγρή φάση-σχηματισμός δεσμού οξίμης.....	188
Πειραματική πορεία σύνθεσης	189
Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του γλυκοπεπτιδικού αναλόγου H-SOC ₄ (SA-Aoa) ₄ -NH ₂	189
Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του γλυκοπεπτιδικού αναλόγου Ac-SOC ₄ [Ac ₂ , (SA-Aoa) ₂]-NH ₂	191
Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του γλυκοπεπτιδικού αναλόγου Ac-SOC ₄ [Ac ₂ , (3'SL-Aoa) ₂]-NH ₂	194
Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του γλυκοπεπτιδικού αναλόγου Ac-SOC ₄ [Ac ₂ , (6'SL-Aoa) ₂]-NH ₂	196

Κεφάλαιο 14

ΔΙΑΜΟΡΦΩΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΠΕΠΤΙΔΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΚΥΚΛΙΚΟΥ ΔΙΧΡΩΪΣΜΟΥ

Εισαγωγή	199
Φάσματα κυκλικού διχρωΪσμού των γλυκοπεπτιδικών αναλόγων και του N ^c -αμινοοξυακέτυλο φορέα SOC ₄ -I	200
Ανάλυση φασμάτων κυκλικού διχρωΪσμού	203

Κεφάλαιο 15

ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ - ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Εισαγωγή	207
Διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης του συμπλέγματος Ac-SOC ₄ -[Ac ₂ , (H5VIN1cor54-69) ₂]-OH αντι-H5 και αντι-H6 AIV ορούς μολυσμένων κοτόπουλων	207
Διερεύνηση της ανοσογονικότητας του επιτόπου H5VIN1cor54-69	208
Πείραμα ανοσοποίησης.....	208
Αποτελέσματα	209
Διερεύνηση της ανοσογονικότητας (προστατευτική ανοσία) σε ποντίκια των επιτόπων T1, T3, T5 και T7 της αιμοσυγκολλητίνης H5 του ιού της γρίπης των πτηνών	211



<i>Εισαγωγή</i>	211
<i>Πείραμα ανοσοποίησης με τα SOC-συμπλέγματα των επιτόπων T1, T3, T5 και T7</i>	211
<i>Αποτελέσματα</i>	212
Μελέτη πρόσδεσης των γλυκοπεπτιδικών αναλόγων του σιαλο-υποδοχέα στην αιμοσυγκολλητίνη H5 του ιού της γρίπης	213
<i>Εισαγωγή</i>	213
<i>Πειραματική πορεία</i>	213
<i>Αποτελέσματα</i>	214
Κεφάλαιο 16 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	217
Κεφάλαιο 17 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	225
Κεφάλαιο 18 SUMMARY	227
Κεφάλαιο 19 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	229
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	243
Συνομογραφίες	245
Βιογραφικό Σημείωμα	249



Από την εποχή που ο άνθρωπος άρχισε να χρησιμοποιεί εργαλεία, η εργασία έγινε ο βασικός παράγοντας της ανάπτυξης της κοινωνίας. Η εργασία οδήγησε στην ανάπτυξη της τεχνολογίας, της επιστήμης και της πολιτιστικής κληρονομιάς. Η εργασία είναι ο βασικός παράγοντας της ανάπτυξης της κοινωνίας. Η εργασία οδήγησε στην ανάπτυξη της τεχνολογίας, της επιστήμης και της πολιτιστικής κληρονομιάς. Η εργασία είναι ο βασικός παράγοντας της ανάπτυξης της κοινωνίας.

Η εργασία είναι ο βασικός παράγοντας της ανάπτυξης της κοινωνίας. Η εργασία οδήγησε στην ανάπτυξη της τεχνολογίας, της επιστήμης και της πολιτιστικής κληρονομιάς. Η εργασία είναι ο βασικός παράγοντας της ανάπτυξης της κοινωνίας. Η εργασία οδήγησε στην ανάπτυξη της τεχνολογίας, της επιστήμης και της πολιτιστικής κληρονομιάς. Η εργασία είναι ο βασικός παράγοντας της ανάπτυξης της κοινωνίας.

Θεωρητικό Μέρος

Η εργασία είναι ο βασικός παράγοντας της ανάπτυξης της κοινωνίας. Η εργασία οδήγησε στην ανάπτυξη της τεχνολογίας, της επιστήμης και της πολιτιστικής κληρονομιάς. Η εργασία είναι ο βασικός παράγοντας της ανάπτυξης της κοινωνίας. Η εργασία οδήγησε στην ανάπτυξη της τεχνολογίας, της επιστήμης και της πολιτιστικής κληρονομιάς. Η εργασία είναι ο βασικός παράγοντας της ανάπτυξης της κοινωνίας.

Η εργασία είναι ο βασικός παράγοντας της ανάπτυξης της κοινωνίας. Η εργασία οδήγησε στην ανάπτυξη της τεχνολογίας, της επιστήμης και της πολιτιστικής κληρονομιάς. Η εργασία είναι ο βασικός παράγοντας της ανάπτυξης της κοινωνίας. Η εργασία οδήγησε στην ανάπτυξη της τεχνολογίας, της επιστήμης και της πολιτιστικής κληρονομιάς. Η εργασία είναι ο βασικός παράγοντας της ανάπτυξης της κοινωνίας.



Εισαγωγή

Κατά καιρούς, νέοι αντιγονικοί υπότυποι ιών γρίπης εισάγονται στον ανθρώπινο πληθυσμό προκαλώντας μεγάλης κλίμακας παγκόσμιο ξέσπασμα της νόσου που συνοδεύεται από υψηλά επίπεδα θανάτου. Η πιο ολέθρια πανδημία γρίπης στη σύγχρονη ιστορία, γνωστή ως «Ισπανική γρίπη», συνέβη κατά τα έτη 1918-1919, σκοτώνοντας πάνω από 100 εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως. Άλλες λιγότερο καταστρεπτικές πανδημίες κατά τον προηγούμενο αιώνα συνέβησαν το 1957 (Ασιατική γρίπη) και το 1968 (γρίπη του Χονγκ Κονγκ).

Οι ιοί γρίπης τύπου Α των πτηνών είναι το κλειδί στην εμφάνιση ανθρώπινων πανδημιών γρίπης. Τα στελέχη του ιού που ενοχοποιούνται για τις πανδημίες γρίπης του 20^{ου} αιώνα προήλθαν κατευθείαν από ιούς γρίπης των πτηνών, είτε μέσω γενετικής ανταλλακτικής ανακατάταξης (*reassortment*) μεταξύ στελεχών γρίπης του ανθρώπου και των πτηνών (1957 και 1968) ή, πιθανότατα, μέσω προσαρμογής στον άνθρωπο στελεχών που προέρχονται από τα πτηνά (1918). Για μεγάλο διάστημα επικρατούσε η άποψη ότι το περιορισμένο εύρος ξενιστή των ιών γρίπης των πτηνών απέκλειε άμεση μετάδοση σε ανθρώπους, και ότι η εμφάνιση πανδημικών στελεχών απαιτούσε γενετική ανταλλακτική ανακατάταξη μεταξύ στελεχών που προσβάλλουν ανθρώπους και στελεχών που προσβάλλουν πτηνά. Όμως, τα τελευταία χρόνια, αναφέρονται όλο και πιο συχνά περιπτώσεις άμεσης μετάδοσης ιών γρίπης πτηνών από πτηνά σε ανθρώπους, με αποκορύφωμα το ξέσπασμα της γρίπης τύπου Α (H5N1) σε πουλερικά σε διάφορες Ασιατικές χώρες, η οποία συνδέεται και με ανθρώπινες μολύνσεις. Αυτές οι άνευ προηγουμένου εξελίξεις έχουν σαν αποτέλεσμα αυξημένη παγκόσμια ανησυχία σχετικά με το πανδημικό ενδεχόμενο αυτών των ιών [1].

Η γρίπη των πτηνών στα πτηνά

Τα άγρια υδρόβια πτηνά είναι οι φυσικοί ξενιστές όλων των γνωστών υποτύπων ιών γρίπης τύπου Α. Τα πτηνά αυτά φέρουν τον ιό στο εντερικό τους σύστημα χωρίς να εκδηλώνουν συμπτώματα νόσου, ενώ με το σάλιο, τις ρινικές εκκρίσεις και τα περιττώματά τους αποβάλλουν τον ιό στο περιβάλλον. Άλλα πτηνά μολύνονται όταν έρχονται σε επαφή με μολυσμένες εκκρίσεις ή απεκκρίσεις ή με μολυσμένες επιφάνειες.



Ιδιαίτερα ευπαθή σε μόλυνση από ιούς γρίπης των πτηνών θεωρούνται τα οικόσιτα πουλερικά (κοτόπουλα, πάπιες και γαλοπούλες) στα οποία μια τέτοια μόλυνση μπορεί να εκδηλωθεί με μια από τις δυο μορφές της νόσου, που έχουν να κάνουν με την τοξικότητα (λοιμογόνο δύναμη) του στελέχους που προκάλεσε τη μόλυνση. Η χαμηλής παθογένειας μορφή της νόσου συνήθως προκαλεί μόνο ήπια συμπτώματα (αλλοιώσεις των φτερών και μείωση φωτοκίας) και ενδέχεται να μη διαγνωστεί καν. Αντίθετα, στην υψηλής παθογένειας μορφή της, η νόσος εξαπλώνεται ταχύτατα μεταξύ των πουλερικών και μπορεί να προκαλέσει γενικευμένη λοίμωξη που προσβάλλει διάφορα όργανα και προκαλεί το θάνατο σχεδόν στο 100% των περιπτώσεων, συχνά εντός 48 ωρών.

Γενικά, όλα τα στελέχη των ιών γρίπης τύπου Α, που απαντώνται στα πτηνά, είναι χαμηλής παθογένειας (*Low Pathogenic Avian Influenza Virus, LPAIV*) και μόνο συγκεκριμένοι υπότυποι είναι ικανοί να προκαλέσουν υψηλής παθογένειας γρίπη σε πουλερικά. Μέχρι σήμερα υψηλής παθογένειας (*Highly Pathogenic Avian Influenza Virus, HPAIV*) θεωρούνται οι Η5 και Η7 υπότυποι γρίπης Α. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, γενικά, ακόμα και στελέχη αυτών των υποτύπων δεν προκαλούν νόσο στα υδρόβια πτηνά αλλά μεταλλάσσονται σε υψηλής παθογένειας αφού εισαχθούν ως LPAIV σε πουλερικά [2]. Επιπλέον, χαρακτηριστικό των HPAIV είναι η τάση τους να μην μεταδίδονται εύκολα μεταξύ των πτηνών σε σχέση με τους LPAIV, γεγονός που πιθανότατα οφείλεται στον εξαιρετικά γρήγορο θάνατο που επιφέρουν οι HPAIV με αποτέλεσμα σχετικά λίγο υικό φορτίο να απελευθερώνεται από την αναπνευστική ή εντερική οδό [2].

Εκτός από το ότι είναι άκρως μεταδοτικοί μεταξύ των πουλερικών, οι LPAIV ιοί γρίπης των πτηνών μεταδίδονται από αγρόκτημα σε αγρόκτημα με τη μετακίνηση ζωντανών πτηνών, ανθρώπων (μέσω των υποδημάτων και των ενδυμάτων) και οχημάτων, εξοπλισμού, τροφής και κλουβιών. Οι υψηλής παθογένειας ιοί μπορούν να επιβιώσουν για μεγάλες περιόδους στο περιβάλλον, ειδικά κάτω από χαμηλές θερμοκρασίες. Επί παραδείγματι, ο υψηλής παθογένειας ιός Η5Ν1 μπορεί να επιζήσει στα περιττώματα των πτηνών τουλάχιστον για 35 ημέρες στους 4° C, ενώ σε υψηλότερη θερμοκρασία 37° C για 6 ημέρες [3].

Η γρίπη των πτηνών στον άνθρωπο

Η γρίπη τύπου Α μπορεί να προσβάλει μια μεγάλη ποικιλία ειδών του ευρύτερου ζωικού βασιλείου, από θηλαστικά (χοίρους, σκύλους, άλογα, φάλαινες, ακόμα και τον άνθρωπο) μέχρι πτηνά (πάπιες, χήνες, κοτόπουλα, γαλοπούλες). Με εξαίρεση τα πτηνά τα οποία, όπως προαναφέρθηκε προσβάλλονται από όλους τους υπότυπους γρίπης Α, οι ιοί γρίπης είναι κατά



κανόνα άκρως ειδικοί (species-specific) υπό την έννοια ότι ιοί που προσβάλλουν ένα συγκεκριμένο είδος, μόνο σε σπάνιες περιπτώσεις δύνανται να προκαλέσουν μόλυνση σε άλλο.

Από την αρχική δεξαμενή, την οποία συνιστούν τα υδρόβια πτηνά, ιοί μεταδίδονται ενίοτε σε άλλα ζώα συμπεριλαμβανομένων θηλαστικών και οικόσιτων πουλερικών, προκαλώντας πρόσκαιρες μολύνσεις και ξεσπάσματα. Με προσαρμογή μέσω μετάλλαξης ή γενετικής ανταλλακτικής ανακατάταξης, κάποιοι από αυτούς τους ιούς ενδέχεται να καθιερώσουν ειδικές μόνιμες γενιές ιών γρίπης τύπου Α, και να προκαλέσουν επιδημίες ή επιζωοτικές ασθένειες στον καινούριο ξενιστή. Στον ανθρώπινο πληθυσμό, πριν από την εδραίωση αυτών των γενιών τον 20^ο αιώνα προηγήθηκαν πανδημίες γρίπης. Μετάδοση ιών και πρόσκαιρες μολύνσεις ενδέχεται επίσης να συμβούν μεταξύ των νέων ξενιστών π.χ. μεταξύ ανθρώπων και χοίρων ή κοτόπουλων και ανθρώπων.

Αν και όλοι οι ΗΑ και ΝΑ υπότυποι απαντώνται στα υδρόβια πτηνά, ο αριθμός των υποτύπων που έχουν ξεπεράσει το φράγμα των ειδών και έχουν καθιερώσει σταθερές γενιές σε θηλαστικά είναι περιορισμένος. Από το 1918, μόνο τρεις ΗΑ και δυο ΝΑ υπότυποι κυκλοφορούν και προκαλούν νόσο στους ανθρώπους και αυτοί είναι οι Η1Ν1, Η1Ν2, Η2Ν2 και Η3Ν2. Από αυτούς, οι υπότυποι Η1Ν1 και Η3Ν2 έχουν επίσης απομονωθεί και από χοίρους, ένδειξη του ότι μεταδόθηκαν, κατά αντίστοιχο τρόπο, κάποια στιγμή από τον άνθρωπο στο χοίρο και εξάπλωσαν την ασθένεια από το ένα είδος στο άλλο.

Αν και σπάνια, η μετάδοση μεταξύ των ειδών πραγματικά συμβαίνει, ωστόσο υπάρχουν περιορισμοί στο εύρος του ξενιστή, όπως εξηγείται σε επόμενο κεφάλαιο.

Οι ιοί γρίπης των πτηνών συνήθως δεν μεταδίδονται άμεσα τον άνθρωπο ούτε αναπαράγονται αποτελεσματικά σε αυτόν τον ξενιστή. Η μετάδοση επιτυγχάνεται μάλλον μέσω επαφής με μολυσμένα πουλερικά ή επιφάνειες επιμολυσμένες από μολυσμένα πτηνά ή μέσω ενός ενδιάμεσου ξενιστή όπως είναι ο χοίρος [1]. Εξαίρεση στον κανόνα αυτό φαίνεται πως αποτελεί, τουλάχιστον, ο υπότυπος Η5Ν1.

Ο υπότυπος Η5Ν1 του ιού της γρίπης των πτηνών

Τα πρόσφατα ξεσπάσματα γρίπης των πτηνών υψηλής παθογένειας, που ξεκίνησαν από την Νοτιοανατολική Ασία στα μέσα του 2003, είναι τα μεγαλύτερα και πιο σοβαρά που έχουν ποτέ καταγραφεί. Ποτέ άλλοτε στην ιστορία αυτής της ασθένειας δεν έχουν τόσες πολλές χώρες προσβληθεί ταυτόχρονα με αποτέλεσμα απώλειες τόσο πολλών πτηνών.

Ο ιός H5N1, που αποτελεί τον αιτιολογικό παράγοντα αυτού του φαινομένου, έχει αποδειχθεί εξαιρετικά επίμονος και ανθεκτικός. Για πρώτη φορά απομονώθηκε σε μια επαρχία της Κίνας το 1996 (A/Goose/Guangdong/1/96), ενώ το πρώτο ξέσπασμα σημειώθηκε το 1997 στο Χονγκ Κονγκ [1, 4]. Παρά το θάνατο ή την προληπτική σφαγή περίπου 150 εκατομμυρίων πτηνών, ο ιός θεωρείται πλέον ενδημικός σε πολλά μέρη της Ινδονησίας και του Βιετνάμ και σε κάποια μέρη της Καμπότζης, της Κίνας, της Ταϊλάνδης, και πιθανώς στο Λάος. Επιπλέον, αποδεικνύεται πως το στέλεχος αυτό μπορεί να προκαλέσει νόσο και θάνατο και σε άγρια υδρόβια αποδημητικά πτηνά, αφού για πρώτη φορά απομονώθηκε από αυτά.

Προς το παρόν, ο ιός H5N1 της γρίπης των πτηνών παραμένει κατά κύριο λόγο μια νόσος των πτηνών, για την ακρίβεια των πουλερικών, αλλά εμπνέει σοβαρή ανησυχία για την ανθρώπινη υγεία, όπως εξηγείται στη συνέχεια.

Το πρώτο ανθρώπινο κρούσμα μόλυνσης από το στέλεχος H5N1 σημειώθηκε το 1997 στο Χονγκ Κονγκ [1], ενώ από τότε μέχρι σήμερα ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας έχει επιβεβαιώσει συνολικά περισσότερα από 400 κρούσματα, με ποσοστό θνησιμότητας μεγαλύτερο από 60%.

Η εκτεταμένη επιμονή του H5N1 σε πληθυσμούς πουλερικών εγκυμονεί δυο σημαντικούς κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία.

Πρώτον, τον κίνδυνο άμεσης μόλυνσης όταν ο ιός περάσει από τα πουλερικά στον άνθρωπο, με αποτέλεσμα πολύ σοβαρή νόσο. Από τους λίγους ιούς γρίπης των πτηνών που έχουν περάσει το φράγμα των ειδών και μολύνουν ανθρώπους, ο H5N1 έχει προκαλέσει το μεγαλύτερο αριθμό σοβαρών κρουσμάτων και θανάτων στους ανθρώπους. Αντίθετα από την κανονική εποχική γρίπη, όπου η μόλυνση προκαλεί μόνο ήπια αναπνευστικά συμπτώματα στους περισσότερους ανθρώπους, η νόσος που προκαλείται από τον H5N1 ακολουθεί έναν ασυνήθιστα επιθετικό κλινικό κύκλο, με ταχεία επιδείνωση και υψηλή θνησιμότητα. Πρωτογενής ιϊκή πνευμονία και πολυ-οργανική ανεπάρκεια είναι κοινά χαρακτηριστικά. Στο τρέχον ξέσπασμα, περισσότεροι από τους μισούς από όσους μολύνθηκαν από τον ιό έχουν πεθάνει. Τα περισσότερα κρούσματα έχουν σημειωθεί σε υγιή παιδιά και νεαρούς ενήλικες.

Δεύτερος κίνδυνος, και πιο σημαντικός, είναι ο ιός – αν του δοθούν αρκετές ευκαιρίες – να αλλάξει σε μια μορφή που θα είναι άκρως μολυσματική για τους ανθρώπους και θα εξαπλώνεται εύκολα από άνθρωπο σε άνθρωπο. Μια τέτοια αλλαγή θα σηματοδοτήσει την έναρξη μιας πανδημίας. Για την ώρα, ο ιός δεν εξαπλώνεται εύκολα από τα πτηνά στον άνθρωπο ούτε και από άνθρωπο σε άνθρωπο. Τα ανθρώπινα κρούσματα είναι πολύ λίγα σε σχέση με τον τεράστιο αριθμό των πτηνών που έχουν προσβληθεί και τις πολυάριθμες



ευκαιρίες για ανθρώπινη έκθεση στον ιό που αυτό συνεπάγεται, ειδικά σε περιοχές όπου τα κατοικίδια στις αυλές των σπιτιών είναι πολύ διαδεδομένα.

Μια πανδημία γρίπης μπορεί να ξεκινήσει όταν εκπληρώνονται τρεις συνθήκες:

- ✓ Ένας νέος υπότυπος ιού γρίπης εμφανίζεται
- ✓ Ο υπότυπος αυτός μολύνει ανθρώπους προκαλώντας σοβαρή ασθένεια σε αυτούς, και
- ✓ Εξαπλώνεται εύκολα μεταξύ των ανθρώπων.

Ο ιός H5N1 εκπληρώνει τις πρώτες δυο προϋποθέσεις: είναι ένας νέος ιός για τους ανθρώπους (οι H5N1 δεν έχουν ποτέ κυκλοφορήσει ευρέως στον ανθρώπινο πληθυσμό), και έχει μολύνει πάνω από 400 άτομα, σκοτώνοντας περισσότερους από τους μισούς, ενώ απομένει να εκπληρωθεί και η τρίτη προϋπόθεση ώστε να ξεκινήσει μια πανδημία γρίπης από το στέλεχος H5N1. Δηλαδή, η καθιέρωση αποτελεσματικής και εκτεταμένης μετάδοσης του ιού από άνθρωπο σε άνθρωπο. Ο κίνδυνος ο ιός να αποκτήσει αυτή την ικανότητα θα παραμένει, όσο παραμένουν και οι ευκαιρίες για ανθρώπινες μολύνσεις. Με τη σειρά τους, αυτές οι ευκαιρίες θα παραμένουν όσο ο ιός συνεχίζει να κυκλοφορεί στα πουλιά.

Εξελικτική ικανότητα του ιού της γρίπης: Αντιγονική παραλλαγή

Δυο είναι οι μηχανισμοί που συνεισφέρουν στην εξελικτική επιτυχία του ιού γρίπης. Μέσω αυτών των μηχανισμών ο ιός μπορεί να τροποποιηθεί αποκτώντας καινούριες ιδιότητες και χαρακτηριστικά, όπως υψηλή μεταδοτικότητα μεταξύ των ανθρώπων.

Ο πρώτος αφορά στην ανάμειξη γενετικού υλικού από ιούς των ανθρώπων και των πτηνών στην περίπτωση ταυτόχρονης μόλυνσης ενός ανθρώπου ή χοίρου από δυο τέτοιους ιούς (αντιγονική αλλαγή ή μετατόπιση, *antigenic shift*). Ο τύπος αυτός αντιγονικής παραλλαγής προκύπτει ως αποτέλεσμα της τμηματικής φύσης του γονιδιώματος του ιού, η οποία επιτρέπει την γενετική ανταλλακτική ανακατάταξη (*genetic reassortment*) τμημάτων του RNA γονιδιώματος και τη δημιουργία ενός νέου ιού που φέρει τελείως τροποποιημένες εσωτερικές ή επιφανειακές πρωτεΐνες (γενετικό υβρίδιο).

Ο δεύτερος συνιστά μια πιο σταδιακή διαδικασία επίκτητης μετάλλαξης, ως αποτέλεσμα της αποτυχίας αποτελεσματικής διόρθωσης των αντιγραφικών λαθών από την RNA πολυμεράση. Έτσι, υψηλός ρυθμός μεταγραφικών λαθών οδηγεί σε υποκαταστάσεις αμινοξέων στις επιφανειακές γλυκοπρωτεΐνες που επιτρέπουν στον ιό να ξεφεύγει των μηχανισμών χυμικής ανοσίας και να μολύνει άνοσους πληθυσμούς (αντιγονική παρέκκλιση ή διολίσθηση, *antigenic drift*) [4-6]

Ο ρόλος των αποδημητικών πτηνών

Κατά το 2005, κατέστη προφανής και μια επιπρόσθετη και σημαντική πηγή διεθνούς εξάπλωσης του ιού στα πτηνά. Οι επιστήμονες διαρκώς πείθονται ότι τουλάχιστον κάποια αποδημητικά υδρόβια πτηνά φέρουν τώρα τον ιό H5N1 στην υψηλής παθογένειας μορφή του, συχνά κατά μήκος μεγάλων αποστάσεων, και τον εισάγουν σε πουλερικά στις περιοχές που βρίσκονται κατά μήκος των μεταναστευτικών τους δρόμων. Αν αυτός ο ρόλος των αποδημητικών πτηνών επιβεβαιωθεί επιστημονικά, θα σηματοδοτήσει μια αλλαγή στη σχέση μεταξύ του ιού H5N1 και της φυσικής δεξαμενής του – τα άγρια πτηνά [3].

Κλινικά χαρακτηριστικά – συμπτώματα

Στους ανθρώπους τα κοινά συμπτώματα της γρίπης είναι πυρετός, πόνος στον λαιμό, μυϊκοί πόνοι, έντονος πονοκέφαλος, βήχας, αδυναμία και γενική αδιαθεσία. Σε σοβαρές περιπτώσεις η γρίπη προκαλεί πνευμονία, που μπορεί να είναι θανατηφόρα, ειδικά σε μικρά παιδιά και ηλικιωμένους. Μερικές φορές την μπερδεύουμε με το κοινό κρυολόγημα, αλλά η γρίπη είναι πολύ πιο σοβαρή ασθένεια και προκαλείται από διαφορετικό τύπο ιών. Εκτός από αναπνευστικά συμπτώματα, ένα μεγάλο ποσοστό ασθενών εμφανίζουν και γαστρεντερικά συμπτώματα, όπως διάρροια, εμετό και κοιλιακό πόνο, τα οποία είναι κοινά σε παιδιά αλλά όχι σε ενήλικες.

Η H5N1 γρίπη στους ανθρώπους είναι ελάχιστα κατανοητή. Από τα έως τώρα κλινικά δεδομένα προκύπτει ότι μόλυνση από τον ιό H5N1 προκαλεί αρχικά τα γνωστά συμπτώματα αλλά στη συνέχεια εξελίσσεται ταχύτατα σε σοβαρή αναπνευστική νόσο που οδηγεί τελικά στο θάνατο. Αξιοσημείωτα είναι, τέλος, τα κλινικά συμπτώματα που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό και το κεντρικό νευρικό σύστημα τα οποία υποδεικνύουν γενικευμένο τροπισμό (εκτεταμένη ιστική αναπαραγωγή) του H5N1 ιού στον ανθρώπινο οργανισμό [2, 7, 8].

Εργαστηριακή διάγνωση γρίπης

Σε περιοχές όπου κυκλοφορούν ταυτόχρονα ιοί γρίπης A ανθρώπων και πτηνών, η διαθεσιμότητα δοκιμασιών ταχείας διάγνωσης, που κάνουν διάκριση μεταξύ των υποτύπων γρίπης, είναι ουσιώδης.

Η απομόνωση ιού, από εμβρυϊκά αυγά ή καλλιέργεια κυττάρων, αποτελεί αδιαμφισβήτητη την καλύτερη μέθοδο διάγνωσης και χαρακτηρισμού ενός ιού γρίπης.



Ωστόσο, είναι χρονοβόρα διαδικασία, απαιτεί εργαστηριακό εξοπλισμό επιπέδου βιοασφάλειας 3 και επομένως δεν ενδείκνυται για γρήγορη διάγνωση.

Άλλες πιο γρήγορες τεχνικές ρουτίνας αποτελούν η ανοσοχρωματογραφική ή ανοσοφθορισμομετρική ανίχνευση ικών αντιγόνων καθώς και η ανίχνευση ικών νουκλεϊνικών οξέων με RT PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής) σε αναπνευστικά δείγματα.

Ορολογική επιβεβαίωση μιας μόλυνσης από ιό γρίπης Α μπορεί να ληφθεί με εμπορικά διαθέσιμα ELISA kits (δοκιμασίες εξουδετέρωσης ή δοκιμασίες αναστολής αιμοσυγκόλλησης) που ανιχνεύουν αντισώματα έναντι διατηρημένων ικών αντιγόνων, όπως η νουκλεοπρωτεΐνη [1]. Το μειονέκτημα αυτών των τεχνικών είναι η αδυναμία εφαρμογής τους για άμεση διάγνωση καθώς αντισώματα ειδικά για έναν υπότυπο δεν μπορούν να ανιχνευθούν πριν την πάροδο κάποιων ημερών, που για τον H5N1 φθάνουν ακόμα και τις 14 [8].

Θεραπεία της γρίπης

Δυο κατηγορίες αντι-ικών φαρμάκων είναι διαθέσιμες προς το παρόν και δίδονται για την αντιμετώπιση μιας μόλυνσης από ιό γρίπης. Η πρώτη αφορά αναστολείς της δραστηριότητας ιοντικού καναλιού της M2 μεμβρανικής πρωτεΐνης (amantadine και rimantadine). Το πρόβλημα με αυτά τα φάρμακα είναι η νευροτοξικότητα που επιφέρουν, η ταχεία ανάπτυξη ανθεκτικότητας και η μη διαθεσιμότητά τους στα περισσότερα μέρη του κόσμου. Η δεύτερη κατηγορία αφορά αναστολείς της νευραμινιδάσης (oseltamivir και zanamivir) οι οποίοι αποδεικνύονται αποτελεσματικοί στη θεραπεία της γρίπης όταν χορηγούνται στα πρώιμα στάδια εκδήλωσης της ασθένειας.

Για την αντιμετώπιση μιας μόλυνσης από H5N1 ιό, η αποτελεσματικότητα αυτών των αντι-ικών φαρμάκων δεν έχει ακόμα επιβεβαιωθεί. Η χορήγησή τους, ωστόσο, κρίνεται προληπτικά απαραίτητη, τουλάχιστον για τη μετρίαση των συμπτωμάτων [1].

Πρόληψη – εμβόλια

Ο εμβολιασμός αποτελεί το κύριο μέσο καταπολέμησης της επίδρασης της γρίπης. Τα αντιγριπικά εμβόλια που κυκλοφορούν συνίστανται από αδρανοποιημένο ιό γρίπης που αναπτύσσεται σε εμβρυϊκά αυγά κότας και μπορεί να είναι ολόκληρος ιός, προϊόν διαχωρισμού (split-product) ή επιφανειακό αντιγόνο. Εμβόλια ολόκληρου ιού σχετίζονται με αυξημένες ανεπιθύμητες ενέργειες, ειδικά σε παιδιά, και χρησιμοποιούνται ελάχιστα. Τα



περισσότερα εμβόλια γρίπης είναι εμβόλια προϊόντων διαχωρισμού, που παράγονται από επεξεργασμένο με απορρυπαντικά, πολύ καθαρό ιό γρίπης [π.χ. ιοσωμάτια (virosomes)] [9], ή εμβόλια επιφανειακών αντιγόνων που περιέχουν καθαρή αιμοσυγκολλητίνη και νευραμινιδάση.

Τα εμβόλια είναι συνήθως τριδύναμα και περιέχουν 15μg από κάθε έναν από δυο υπότυπους γρίπης A (H1N1 και H3N2) και από ένα στέλεχος γρίπης B. Επάγουν χυμική απόκριση σχετικά ειδική για κάθε στέλεχος, έχουν μειωμένη δραστηριότητα έναντι ιών αντιγονικής παρέκκλισης και είναι αναποτελεσματικά έναντι μη σχετικών στελεχών. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) αναθεωρεί ανά εξάμηνο τη σύσταση του αντιγριπικού εμβολίου και εκσυγχρονίζει το αντιγονικό περιεχόμενο με βάση τους επικρατέστερους υπότυπους γρίπης που κυκλοφορούν. Όταν υπάρχει καλό αντιγονικό ταίριασμα μεταξύ των στελεχών του εμβολίου και αυτών που κυκλοφορούν στον πληθυσμό, επιτυγχάνεται προστατευτική δραστηριότητα στο 70-95% των υγιών νεαρών ενηλίκων [4, 9].

Ένας νεοεμφανιζόμενος πανδημικός ιός γρίπης θα επιφέρει παγκόσμια ζήτηση εμβολίων και ίσως χρειαστούν νέες προσεγγίσεις στρατηγικών ανοσοποίησης ώστε να εξασφαλιστεί μέγιστη προστασία, σε μια περίοδο που το αντιγόνο του εμβολίου θα είναι μάλλον περιορισμένο. Η παραγωγή εμβολίων από παθογενείς ιούς γρίπης πτηνών (π.χ. H5N1) με τις παραδοσιακές μεθόδους δεν είναι εφικτή για λόγους ασφάλειας αλλά και από τεχνικής πλευράς. Σε μια τέτοια περίπτωση, εναλλακτικές στρατηγικές ανάπτυξης εμβολίων χρειάζεται να εφαρμοστούν, όπως χρήση τεχνικών αντίστροφης γενετικής για τη δημιουργία στελεχών που έχουν υποστεί ανταλλακτική ανακατάταξη, χρήση αιμοσυγκολλητίνης εκφρασμένης σε βακουλιοΐ ή αδενοΐο [10], χρήση αντιγονικά παρόμοιων, μη παθογόνων στελεχών γρίπης πτηνών, χρήση DNA-εμβολίων [11], καθώς και χρήση ανοσοενισχυτικών (π.χ. άλατα αλουμινίου). Σε κλινικές δοκιμές, συμβατικά εμβόλια γρίπης επιφανειακών αντιγόνων ιών των πτηνών έχουν αποδειχθεί ελάχιστα ανοσογονικά σε ανοσολογικά πρωτόγονους (naïve) πληθυσμούς, επομένως απαιτείται βελτίωση της ανοσογονικότητας με χρήση ανοσοενισχυτικών ή ολόκληρου ιού. Τέλος, πολύ αποτελεσματικά αποδεικνύονται τα DNA-εμβόλια, αφού φαίνεται πως εξασφαλίζουν χυμικές και κυτταροτοξικές ανοσολογικές αποκρίσεις [4, 8, 12].



Εισαγωγή: Τύποι, υπότυποι και στελέχη

Υπάρχουν τρεις τύποι ιών γρίπης: οι A, B και C, που διαφοροποιούνται με βάση τις αντιγονικές διαφορές της νουκλεοπρωτεΐνης και της matrix πρωτεΐνης αυτών. Μόνο οι ιοί γρίπης A ταξινομούνται περαιτέρω σε υποτύπους με βάση τις δυο κύριες επιφανειακές γλυκοπρωτεΐνες, αιμοσυγκολλητίνη (HA) και νευραμινιδάση (NA) (σχήμα 1). Οι υπότυποι των ιών γρίπης A και οι ιοί γρίπης B ταξινομούνται επιπλέον και σε στελέχη.

Οι άνθρωποι είναι δυνατόν να μολυνθούν από ιούς γρίπης τύπου A, B και C. Οι υπότυποι γρίπης A που τώρα κυκλοφορούν στον ανθρώπινο πληθυσμό παγκοσμίως είναι οι H1N1, H1N2 και H3N2.

Τα άγρια πτηνά είναι ο φυσικός ξενιστής για όλους τους γνωστούς υποτύπους ιών γρίπης A. Τυπικά, τα άγρια πτηνά δεν νοσούν όταν μολύνονται με ιούς γρίπης A. Παρόλα αυτά, τα οικόσιτα πουλερικά, όπως γαλοπούλες και κοτόπουλα, μπορούν να νοσήσουν βαριά και να πεθάνουν από γρίπη των πτηνών και μερικοί ιοί γρίπης A των πτηνών μπορούν επίσης να προκαλέσουν σοβαρή νόσο και θάνατο σε άγρια πτηνά.

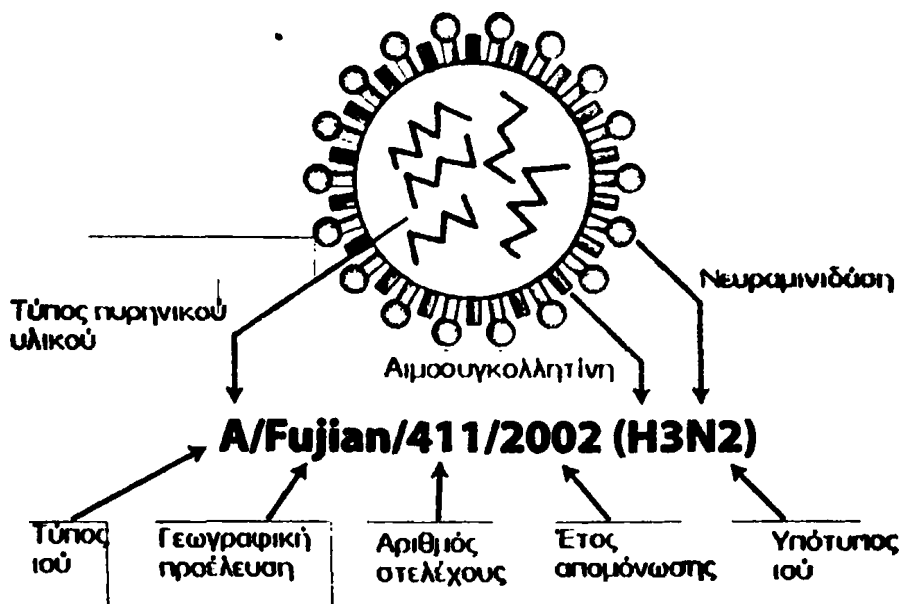
Γενικά, άμεση ανθρώπινη μόλυνση από ιούς γρίπης πτηνών συμβαίνει πολύ σπάνια και συνδέεται μόνο με άμεση επαφή (π.χ. άγγιγμα) μολυσμένων άρρωστων ή νεκρών πτηνών (οικόσιτων πουλερικών).

Οι ιοί γρίπης είναι δυναμικοί και συνεχώς εξελίσσονται. Μπορούν να αλλάξουν μέσα από δυο διαφορετικούς τρόπους, την αντιγονική παρέκκλιση (antigenic drift) και την αντιγονική αλλαγή (antigenic shift). Μέσω αντιγονικής παρέκκλισης αλλάζουν συνέχεια, αλλά αντιγονική αλλαγή συμβαίνει μόνο σποραδικά. Ιοί γρίπης τύπου A υφίστανται και των δυο ειδών αλλαγές, ενώ ιοί γρίπης τύπου B αλλάζουν μόνο μέσω της πιο σταδιακής διαδικασίας της αντιγονικής παρέκκλισης.

➤ Γρίπη τύπου A και υπότυποί της

Ιοί γρίπης τύπου A μπορούν να μολύνουν ανθρώπους, πτηνά, χοίρους, άλογα, και άλλα ζώα, αλλά τα άγρια πτηνά είναι οι φυσικοί ξενιστές για αυτούς τους ιούς.

Ιοί γρίπης τύπου A χωρίζονται σε υποτύπους και ονομάζονται με βάση δυο πρωτεΐνες στην επιφάνεια του ιού: την αιμοσυγκολλητίνη (HA) και την νευραμινιδάση (NA).



Σχήμα 1. Σχηματική απεικόνιση ενός σωματιδίου ιού γρίπης και κανόνες ονοματολογίας των διαφόρων στελεχών.

Για παράδειγμα, ο χαρακτηρισμός «H7N2» προσδιορίζει έναν υπότυπο γρίπης τύπου A ο οποίος έχει μια HA 7 πρωτεΐνη και μια NA 2 πρωτεΐνη. Ομοίως, ένας «H5N1» έχει μια HA 5 και μια NA 1 πρωτεΐνη. Υπάρχουν 16 γνωστοί HA υπότυποι και 9 NA. Πολλοί διαφορετικοί συνδυασμοί των HA και NA είναι πιθανοί. Μόνο μερικοί υπότυποι γρίπης A (οι H1N1, H1N2 και H3N1) βρίσκονται προς το παρόν σε γενική κυκλοφορία στον ανθρώπινο πληθυσμό. Άλλοι υπότυποι βρίσκονται συνήθως σε άλλα είδη ζώων. Για παράδειγμα, H7N7 και H3N8 ιοί προκαλούν ασθένεια σε άλογα, και ο H3N8 έχει επίσης πρόσφατα δειχθεί ότι προκαλεί ασθένεια σε σκύλους.

Μόνο ιοί γρίπης A μολύνουν πτηνά, και όλοι οι γνωστοί υπότυποι ιών γρίπης A μπορούν να μολύνουν πτηνά. Όμως, υπάρχουν ουσιαστικές γενετικές διαφορές μεταξύ των υποτύπων γρίπης A που τυπικά μολύνουν πτηνά και αυτών που μολύνουν τόσο ανθρώπους όσο και πτηνά. Τρεις χαρακτηριστικοί υπότυποι των ιών γρίπης A των πτηνών οι οποίοι είναι γνωστό ότι μολύνουν τόσο πτηνά όσο και ανθρώπους είναι οι H5, H7 και H9.

► Γρίπη τύπου B

Ιοί γρίπης τύπου B συνήθως απαντώνται μόνο σε ανθρώπους. Αντίθετα με τους ιούς γρίπης A, αυτοί οι ιοί δεν ταξινομούνται σε υπότυπους. Ιοί γρίπης B μπορούν να προκαλέσουν νοσηρότητα και θνησιμότητα μεταξύ των ανθρώπων, αλλά γενικά συνδέονται



με λιγότερο σοβαρές επιδημίες από ότι οι ιοί γρίπης Α. Αν και ιοί γρίπης τύπου Β μπορούν να προκαλέσουν ανθρώπινες επιδημίες, δεν έχουν προκαλέσει πανδημίες.

➤ *Γρίπη τύπου C*

Ιοί γρίπης τύπου C προκαλούν ήπια ασθένεια σε ανθρώπους και δεν προκαλούν επιδημίες ή πανδημίες. Αυτοί οι ιοί δεν ταξινομούνται σε υπότυπους.

➤ *Στελέχη*

Ιοί γρίπης Β και υπότυποι του ιού γρίπης Α χαρακτηρίζονται περαιτέρω σε στελέχη. Υπάρχουν πολλά διαφορετικά στελέχη ιών γρίπης Β και υποτύπων γρίπης Α. Νέα στελέχη ιών γρίπης εμφανίζονται και αντικαθιστούν παλιότερα στελέχη. Αυτή η διαδικασία συμβαίνει μέσω αντιγονικής παρέκκλισης. Όταν αναδύεται ένα καινούριο στέλεχος ανθρώπινου ιού γρίπης, η προστασία από αντισώματα που μπορεί να έχει αναπτυχθεί μετά από μόλυνση ή εμβολιασμό με ένα παλιότερο στέλεχος ίσως και να μην παρέχει προστασία ενάντια στο καινούριο στέλεχος. Επομένως, το εμβόλιο της γρίπης «εκσυγχρονίζεται» σε ετήσια βάση ώστε να συμβαδίζει με τις αλλαγές στους ιούς γρίπης [13].

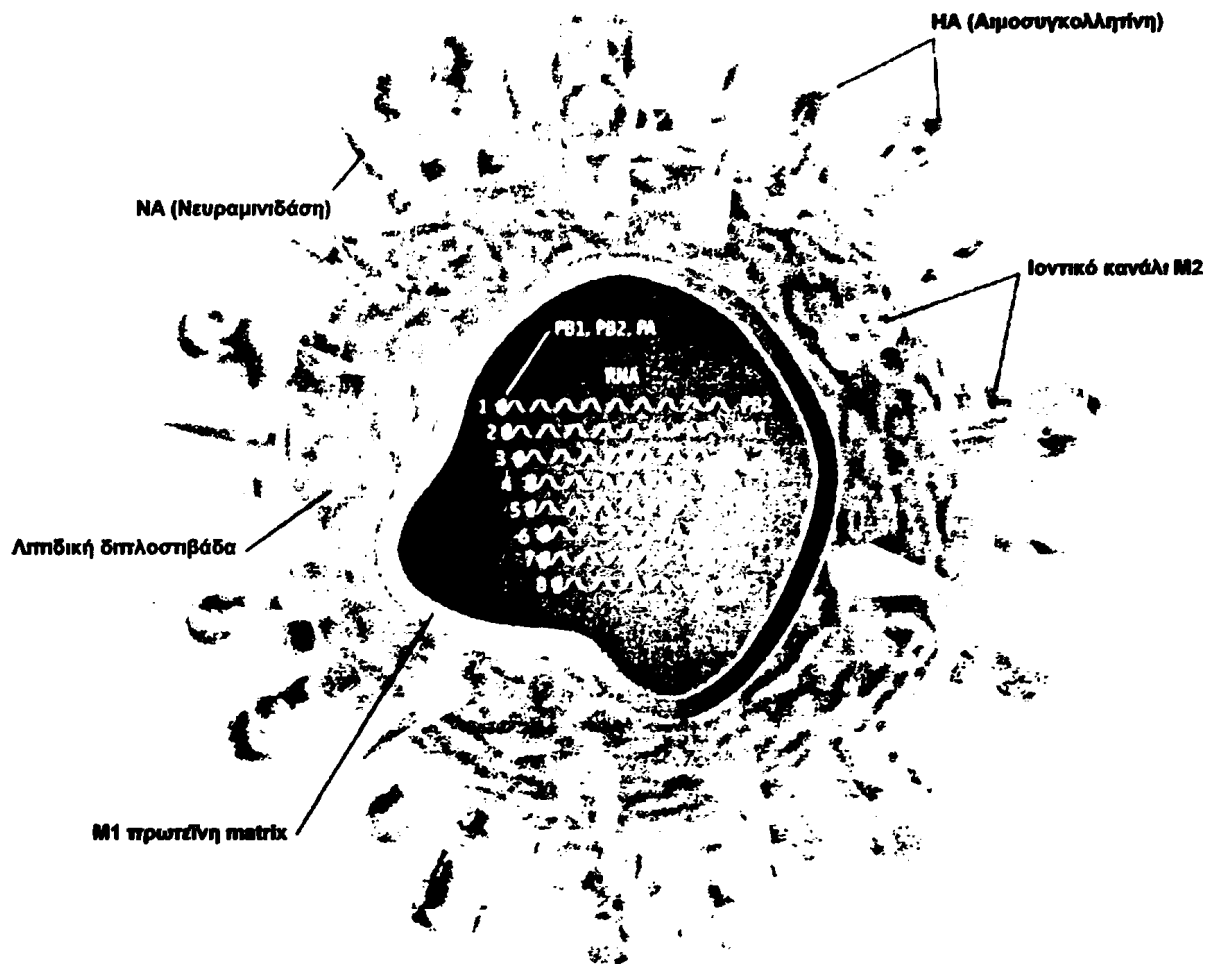
Δομή-Μορφολογία

Ο ιός της γρίπης ανήκει στο γένος *orthomyxovirus* της οικογένειας *orthomyxoviridae* (ορθοβλεννοϊοί). Πρόκειται για έναν RNA ιό με κατατετημημένο γονιδίωμα αποτελούμενο από 8 γραμμικά, μονόκλωνα «αρνητικά» RNA μόρια (negative sense), τα οποία κωδικοποιούν για 10 πρωτεΐνες (σχήμα 2). Τα τμήματα RNA βρίσκονται συνδεδεμένα με τη νουκλεοπρωτεΐνη (NP) και τρεις υπομονάδες της ιικής πολυμεράσης (PA, PB1 και PB2). Το σύμπλεγμα αυτό ριβονουκλεοπρωτεΐνης (RNP) συνιστά το νουκλεοκαψίδιο του ιού και είναι υπεύθυνο για την αντιγραφή και τη μεταγραφή του RNA. Μέσα στο νουκλεοκαψίδιο περιέχονται και οι πρωτεΐνες M2 και NEP (nuclear export protein), ενώ αυτό περιβάλλεται εξωτερικά και από έναν επενδύτη (envelope) που ουσιαστικά είναι μια μεμβράνη αποτελούμενη από διπλοστιβάδα λιπιδίων η οποία περιέχει ειδικές ιικές πρωτεΐνες (αιμοσυγκολλητίνη, HA και νευραμινιδάση, NA). Έτσι, ο ιός της γρίπης ανήκει στην κατηγορία των επενδεδυμένων ιών.

Πρωτεΐνες του ιού

Οι πρωτεΐνες του ιού χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες:

- στις επιφανειακές (μεμβρανικές) πρωτεΐνες, στις οποίες ανήκουν η αιμοσυγκολλητίνη (hemagglutinin, HA), η νευραμινιδάση (neuraminidase, NA) και η matrix 2 (M2) πρωτεΐνη



Σχήμα 2. Το γονιδίωμα του ιού συνίσταται από οκτώ ξεχωριστά τμήματα RNA εκ των οποίων τα τμήματα 1, 2 και 3 κωδικοποιούν για ιική πολυμεράση, PB1, PB2 και PA αντίστοιχα, το 4 για αιμοσυγκολλητίνη (HA), το 5 για νουκλεοπρωτεΐνη, το 6 για νευραμινιδάση (NA), το 7 για matrix πρωτεΐνη (M1) και πρωτεΐνες μεμβρανικών καναλιών (M2) και, τέλος, το τμήμα 8 κωδικοποιεί για μη-δομικές πρωτεΐνες (NS1 και NS2).

- στις εσωτερικές πρωτεΐνες, στις οποίες περιλαμβάνονται οι τρεις πολυμεράσες PA, PB1 και PB2, η νουκλεοπρωτεΐνη, η matrix 1 πρωτεΐνη (M1) και η μη-δομική πρωτεΐνη 2 (non-structural, NS2), και
- στις μη-δομικές πρωτεΐνες (non-structural, NS1), που δεν είναι πακεταρισμένες μέσα στο ιικό σωματίο, αν και παράγονται σε μεγάλες ποσότητες στα μολυσμένα κύτταρα.

Η αιμοσυγκολλητίνη, η νευραμινιδάση και η M2 πρωτεΐνες περιέχονται στον επενδύτη του ιού. Η τριτοταγής δομή των HA και NA έχει προσδιοριστεί. Η HA υφίσταται ως ομοτριμερές και η NA ως ομοτετραμερές. Και οι δυο αυτές πρωτεΐνες εμπλέκονται στην παθογένεια του ιού, τη μολυσματικότητά του και στον τροπισμό ξενιστή και ιστού. Όταν σωματίδια του ιού εξετάζονται με δοκιμασίες χρώσης, η HA και η NA εμφανίζονται ως «ακίδες» («καρφιά») στην επιφάνειά του. Συνολικά, η HA αντιπροσωπεύει περίπου το 25% της πρωτεΐνης του ιού, η NA το 5%, ενώ η πρωτεΐνη M2 των ιοντικών καναλιών είναι παρούσα σε μικρές ποσότητες, μόνο σε λίγα αντίγραφα ανά σωματίδιο.

Η αιμοσυγκολλητίνη διαμεσολαβεί στην πρόσδεση του ιού στα κύτταρα και στη συνέχεια στη διείσδυση των ιικών συστατικών μέσα σε αυτά. Η HA αποτελεί κύριο αντιγόνο και επάγει ισχυρή ανοσολογική απόκριση. Σε όλους τους ιούς γρίπης A, η HA συντίθενται ως μια πολυπεπτιδική αλυσίδα ~550 αμινοξέων με μοριακό βάρος 77kD [2]. Κάθε μονομερές της ενεργοποιημένης HA αποτελείται από δυο αλυσίδες, τις HA1 και HA2, που συνδέονται με έναν δισουλφιδικό δεσμό. Ανάλογα με το στέλεχος του ιού, τον τύπο του κυττάρου ξενιστή και τις συνθήκες ανάπτυξης, η πρόδρομη πρωτεΐνη HA0 μπορεί να διασπαστεί πρωτεολυτικά (από πρωτεάσες του κυττάρου ξενιστή, μετα-μεταφραστικά) στις HA1 και HA2. Αυτή η αποκοπή αναφέρεται ως απαραίτητη για τη μολυσματικότητα του ιού. Η ευαισθησία της HA0 στις πρωτεάσες του ξενιστή καθορίζεται από τη σύσταση σε αμινοξέα της θέσης πρωτεόλυσης (εξωτερική θηλιά) του μορίου HA0 που συνδέει τις HA1 και HA2 και αποτελεί κριτήριο κατάταξης ενός ιού στην κατηγορία LPAIV ή HPAIV. Αυτή η θηλιά τυπικά περιέχει είτε ένα και μόνο κατάλοιπο Arg/Lys (μονοβασική θέση αποκοπής, LPAIV) είτε αρκετά κατάλοιπα Lys ή/και Arg, σε ένα μοτίβο R-X-K/R-R, συνιστώντας μια πολυβασική θέση αποκοπής (HPAIV). Ιοί γρίπης A με πολυβασικές θέσεις αποκοπής (μόνο H5 και H7 υπότυποι) μπορούν να είναι πιο μολυσματικοί (virulent) και να προκαλούν συστηματική μόλυνση σε ξενιστές (HPAIV) από ότι οι ίδιοι ιοί (όλοι οι άλλοι ιοί γρίπης A) (LPAIV) με μονοβασική θέση αποκοπής. Επιπλέον, LPAIV περιορίζονται στην αποκοπή από εξωκυττάρια πρωτεΐνες του ξενιστή, όπως ένζυμα που μοιάζουν με θρυψίνη, και για αυτό η



αντιγραφή τους εντοπίζεται σε θέσεις στον ξενιστή όπου βρίσκονται τέτοια ένζυμα, όπως στο αναπνευστικό και εντερικό σύστημα. Αντίθετα, ΗΡΑΙV υφίστανται πρωτεόλυση από ενδοκυττάρειες πανταχού παρούσες πρωτεάσες, όπως φουρίνη, και είναι ικανοί να μεταγραφούν σε κάθε μέρος του ξενιστή καταστρέφοντας ζωτικά όργανα και ιστούς και οδηγώντας έτσι σε ασθένεια και θάνατο.

Η νευραμινιδάση κωδικοποιείται από το 6^ο γονιδιακό τμήμα και είναι το δεύτερο κύριο επιφανειακό αντιγόνο. Παίζει αποφασιστικό ρόλο στα προχωρημένα στάδια της μόλυνσης απομακρύνοντας το σιαλικό οξύ από σιαλυολιγισακχαρίτες, απελευθερώνοντας τα νεοσχηματισθέντα ιικά σωματίδια από την κυτταρική επιφάνεια και εμποδίζοντας τη συσσωμάτωση των σωματιδίων του ιού. Η πρωτεΐνη αυτή έχει βρεθεί πως είναι ένα τετραμερές, συνδεδεμένο με δισουλφιδικούς δεσμούς. Τα αμινοξικά κατάλοιπα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου είναι καλά διατηρημένα μεταξύ διαφορετικών υποτύπων ΝΑ. Οι αναστολείς της ΝΑ έχει δειχθεί πως έχουν αντικές δράσεις ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα ιών γρίπης. Μερικοί δραστικοί και επιλεκτικοί αναστολείς που χρησιμοποιούνται ιατρικά, είναι το oseltamivir carboxylate (Tamiflu, Ro64-0802, GS4071) και το zanamivir (Relenza, GG167).

Η πρωτεΐνη M2 σχηματίζει ένα ειδικό για πρωτόνια διαμεμβρανικό ιοντικό κανάλι και ενεργοποιείται σε όξινο pH. Παίζει σημαντικό ρόλο στα αρχικά αλλά και στα τελικά στάδια της μόλυνσης από τον ιό.

Η πρωτεΐνη matrix M1 είναι το κύριο δομικό συστατικό στο εσωτερικό του ιοσώματος (virion) και σχηματίζει μια στιβάδα γύρω από τις ιικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες. Επιπρόσθετα, θεωρείται η κατευθυντήρια δύναμη για την «εκβλάστηση» (budding) του ιού.

Οι ριβονουκλεοπρωτεΐνες (RNP) αποτελούνται από 4 πρωτεΐνες: τη νουκλεοπρωτεΐνη, nucleoprotein (NP) και τις τρεις υπομονάδες της πολυμεράσης (πρωτεΐνες PB1, PB2 και PA) και συνδέονται με κάθε ένα από τα ιικά μόρια RNA σχηματίζοντας συμπλέγματα ριβονουκλεοπρωτεΐνης (RNP complexes).

Τέλος, οι άλλες δυο πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από το 8^ο τμήμα RNA και ονομάζονται μη-δομικές πρωτεΐνες, non-structural (NS1 και NS2). Κύρια λειτουργία της NS1 είναι να προάγει τον αναδιπλασιασμό του ιού μέσα στο κύτταρο του ξενιστή, ανταγωνιζόμενη την αντιϊκή δραστηριότητα (σύστημα INF) του κυττάρου. Η NS2, η οποία αναφέρεται, επίσης, και ως nuclear export protein (NEP), θεωρείται απαραίτητη για την εξαγωγή των νεοσχηματισθέντων ιικών RNP συμπλεγμάτων από τον πυρήνα [14].



Αναδιπλασιασμός και διάδοση του ιού (viral propagation)

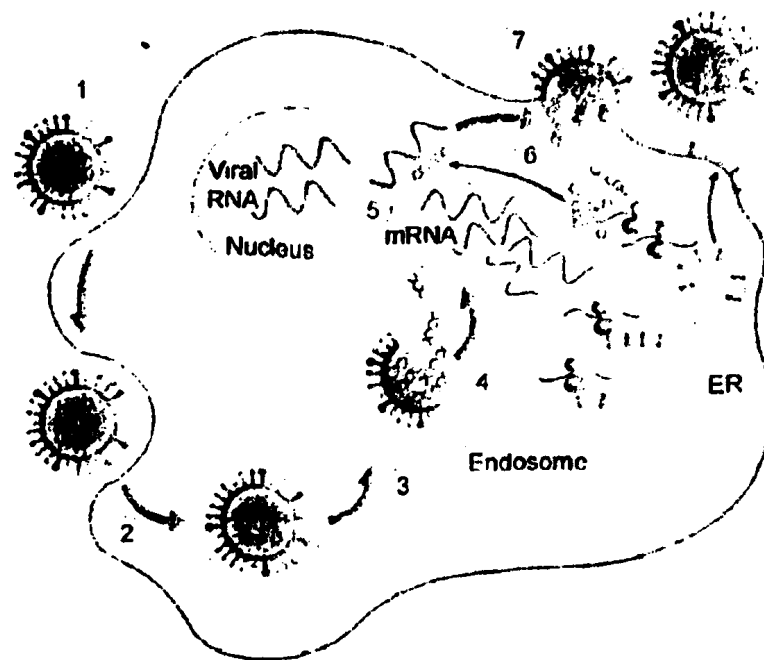
Ο ιός της γρίπης εμφανίζει χημική συγγένεια κυρίως για κύτταρα στο εσωτερικό επιθήλιο της αναπνευστικής βλεννογόνου και χρειάζεται να μολύνει αυτά τα κύτταρα για να αναπαράγει τον εαυτό του. Αρχίζει τη μόλυνση με πρόσδεση στην επιφάνεια του κυττάρου ξενιστή η οποία ακολουθείται από σύντηξη των μεμβρανών του ιού και του κυττάρου [7].

Ο βιολογικός κύκλος του ιού της γρίπης περιλαμβάνει μια σειρά βημάτων τα οποία συνοπτικά απεικονίζονται στο σχήμα 3. Στο πρώτο στάδιο της μόλυνσης του κυττάρου στόχου, ο ιός προσδένεται στην κυτταρική επιφάνεια και εγκολπώνεται σε ενδοσωμάτια. Ακολουθεί σύντηξη των μεμβρανών ιού και ενδοσωμάτιου, το ιικό RNA μεταφέρεται στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή, ο ιός χρησιμοποιεί τους κυτταρικούς μηχανισμούς για τον αναδιπλασιασμό του και, τέλος, νέα ιικά σωματίδια ελευθερώνονται, ικανά να μολύνουν και άλλα κύτταρα συμβάλλοντας στην διάδοση του ιού [9].

Τα αρχικά στάδια μιας μόλυνσης από ιό γρίπης επιτυγχάνονται με μεσολάβηση της επιφανειακής γλυκοπρωτεΐνης αιμοσυγκολλητίνη (HA), η οποία προσδένεται σε σιαλικά οξέα της κυτταρικής επιφάνειας του κυττάρου στόχου, όπως περιγράφεται αναλυτικά σε επόμενο κεφάλαιο. Στη συνέχεια, ο ιός της γρίπης εισέρχεται στο κύτταρο μέσω ενδοκυττάρωσης που διαμεσολαβείται από τον υποδοχέα.

Η μεταγραφή λαμβάνει χώρα μέσα στον πυρήνα. Μετά την απελευθέρωση των RNPs στο κυτταρόπλασμα, αυτές μεταναστεύουν στον πυρήνα όπου η πολυμεράση του ιού κατευθύνει τη μεταγραφή του «αρνητικού» (negative sense) RNA σε «θετικό» (positive sense) RNA, το οποίο αποτελεί το εκμαγείο είτε για ιικά αγγελιαφόρα RNAs (vmRNAs) είτε για αυτο-αντιγραφή. Τα vmRNAs μετακινούνται προς το κυτταρόπλασμα διαμέσου των πυρηνικών πόρων. Το vmRNA κατευθύνει τη σύνθεση των νουκλεοπρωτεϊνών, των matrix πρωτεϊνών και των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών (HA και NA), και στη συνέχεια οι πρώτες ξαναγυρίζουν στον πυρήνα.

Η παραγωγή των HA και NA ξεκινά στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και εξελίσσεται διαμέσου της συσκευής Golgi, πριν αυτές παρουσιαστούν στην κυτταρική επιφάνεια. Ως αποτέλεσμα, αυτές οι μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες υφίστανται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών και γλυκοζυλίωση. Ο σχηματισμός ολιγομερών γίνεται στο pre-Golgi και η πρωτεΐνη υφίσταται «κλάδεμα» των υδατανθρακικών αλυσίδων στο σύστημα Golgi.



Σχήμα 3. Κύκλος αντιγραφής ενός ιού γρίπης (1) πρόσδεση του ιού σε έναν υποδοχέα που φέρει σιαλικό οξύ, (2) εγκόλλωση του ιοσώματος από την κυτταρική πλασματική μεμβράνη και σχηματισμός ενός ενδοκυτταρικού κυστιδίου (ενδοσωμάτιο), (3) μεταφορά του ιού στο κυτταρόπλασμα, (4) σύντηξη της ιικής μεμβράνης με τη μεμβράνη του ενδοσωμάτιου, επαγόμενη από το ασθενώς όξινο pH της κοιλότητας του ενδοσωμάτιου, (5) μεταφορά του ιικού RNA στον πυρήνα, σύνθεση αγγελιαφόρου RNA (mRNA) και αντιγραφή του ιικού RNA, (6) σύνθεση ιικών πρωτεϊνών στο κυτταρικό κυτοσόλιο (εσωτερικές πρωτεΐνες) και στο ενδοπλασματικό δίκτυο (μεμβρανικές πρωτεΐνες), και (7) συναρμολόγηση των απόγονων ιών

Στον πυρήνα, το «θετικό» (positive sense) RNA αντιγράφεται για να δημιουργήσει επιπλέον αντίγραφα του ιικού γονιδιώματος. Αυτά τα νέα «αρνητικά» (negative sense) RNAs συνενώνονται με νουκλεοπρωτεΐνες και κάποιες matrix πρωτεΐνες που έχουν μεταναστεύσει στον πυρήνα. Το όλο σύμπλεγμα εγκαταλείπει τον πυρήνα διαμέσου πυρηνικών πόρων.

Το τελευταίο στάδιο στη μορφογένεση του ιού περιλαμβάνει «εκβλάστηση» (budding) και απελευθέρωση του ιού στο εξωκυττάριο μέσο. Στο σημείο αυτό, τα ιικά συστατικά (HA, NA, M2 που σχηματίζουν τον επενδύτη του ιού, η matrix πρωτεΐνη M1 και η ιική RNP) αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και, τελικά, η πλασματική μεμβράνη κάμπτεται, προκαλώντας μια προς τα έξω καμπύλωση, και αποκόβεται, ελευθερώνοντας το απόγονο σωματίδιο του ιού στο εξωκυττάριο μέσο.

Η πρωτεΐνη αιμοσυγκολλητίνη HA και ο ρόλος της στη μετάδοση του ιού της γρίπης

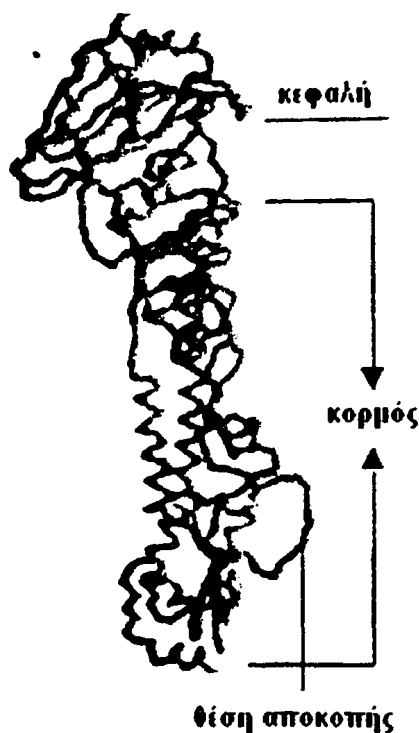
Εισαγωγή

Οι ιοί που φέρουν φάκελο εισάγονται στα κύτταρα μέσω μεμβρανικής σύντηξης. Κάποιοι τέτοιοι ιοί συντήκονται με την πλασματική μεμβράνη στην κυτταρική επιφάνεια, ενώ άλλοι πρώτα «συλλαμβάνονται» με ενδοκύτωση, που μεσολαβείται από υποδοχείς, και ακολούθως συντήκονται με τη μεμβράνη των ενδοσωματίων παρακινούμενοι από το όξινο pH που επικρατεί μέσα στο ενδοσωμάτιο. Ο ιός της γρίπης ανήκει στη δεύτερη ομάδα.

Η κύρια γλυκοπρωτεΐνη στην επιφάνεια του ιού της γρίπης, η αιμοσυγκολλητίνη HA, προσδένεται σε κατάλοιπα σιαλικού οξέος (υποδοχείς) στην επιφάνεια του κυττάρου ξενιστή καθιστώντας δυνατή την είσοδο του ιού μέσα στο κύτταρο στόχο διαμέσου ενδοκυττάρωσης (ενδοκύτωσης) και επακόλουθης μεμβρανικής σύντηξης, η οποία ενεργοποιείται από δραματική διαμορφωτική αλλαγή στην οποία υπόκειται η HA όταν το pH πέφτει κάτω από την τιμή ~5.3 μέσα στο ενδοσωμάτιο [15].

Η πρόδρομη αιμοσυγκολλητίνη HA0

Η HA συντίθεται ως ένα πρόδρομο μόριο (~75kDa), την HA0, το οποίο συγκροτείται μη ομοιοπολικά ως ομοτριμερές, στο ενδοπλασματικό δίκτυο και μεταφέρεται διαμέσου της συσκευής Golgi στην επιφάνεια του κυττάρου. Στην ενεργή μορφή του και σε ουδέτερο pH (σχήμα 1), το κάθε μονομερές της πρωτεΐνης HA αποτελείται από δυο υπομονάδες, την HA1 και την HA2, οι οποίες προκύπτουν ύστερα από αποκοπή της αρχικής πολυπεπτιδικής αλυσίδας με τη δράση πρωτεολυτικών ενζύμων του ξενιστή και οι οποίες συγκρατούνται μεταξύ τους μέσω ενός δισουλφιδικού δεσμού. Η αποκοπή της HA0 δημιουργεί το C-τελικό άκρο της HA1 (κατάλοιπο 328 της HA0 (H3)) και το N-τελικό άκρο της HA2 και επιπλέον είναι επιβεβλημένη για τη σύντηξη των μεμβρανών και τη μολυσματικότητα του ιού [16].



Σχήμα 1. Τριτοταγής δομή της εξωτερικής περιοχής (ectodomain) του μονομερούς της HA σε ουδέτερο pH. Με πράσινο χρώμα απεικονίζεται η HA1, με γαλάζιο η HA2, ενώ με κόκκινο η θέση αποκοπής (cleavage site).

Θέση αποκοπής - Δομή του cleavage site

Στις HA0 των 13 από τους 15 HA υπότυπους, οι HA1 και HA2 πολυπεπτιδικές αλυσίδες χωρίζονται μεταξύ τους με ένα και μόνο κατάλοιπο Arg, το οποίο, μετά την αποκοπή, αφαιρείται από το C-άκρο της HA1 με τη δράση μιας καρβοξυπεπτιδάσης. Για τις HA0 των H1, H2 και H3 υποτύπων ιών που έχουν προκαλέσει επιδημίες, η αποκοπή είναι εξωκυττάρια και ενδέχεται να μεσολαβείται από τη σερινοπρωτεϊνάση tryptase Clara (θρυπτάση) που παράγεται από κύτταρα Clara του λεπτοβρογχικού (bronchiolar) επιθηλίου. Αυτό το ένζυμο δείχνει εξειδικευμένη αναγνώριση για την αλληλουχία Q/E-X-R που βρίσκεται στις θέσεις αποκοπής αυτών των HA πρωτεϊνών.

Για κάποιες από τις HA των H5 και H7 ιών των πτηνών (υψηλής παθογένειας), οι HA1 και HA2 πολυπεπτιδικές αλυσίδες χωρίζονται με πολυβασικές αλληλουχίες που περιέχονται στη θέση αποκοπής. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η αποκοπή είναι ενδοκυττάρια και εμπλέκει ένζυμα τύπου σαμπτιλισίνης (subtilisin). Η αλληλουχία R-X-R/K-R αναγνώρισης από φουρίνη (furin) είναι κοινό γνώρισμα των παρεμβαλλόμενων πολυβασικών αλληλουχιών. Η ευρεία ιστική κατανομή ενζύμων τύπου φουρίνης και η ικανότητα για

ενδοκυττάρια αντί για εξωκυττάρια αποκοπή φαίνεται να σχετίζονται με τις ευρέως διαδεδομένες συστηματικές λοιμώξεις που προκαλούνται από τους H5 και H7 ιούς στα πτηνά και για το ξέσπασμα σοβαρής αναπνευστικής μόλυνσης από έναν H5 ιό σε ανθρώπους, στο Χονγκ-Κονγκ το 1997 [17].

Όπως έχει δειχθεί αναλύοντας τη δομή της HA0 (H3) του στελέχους A/Χονγκ Κονγκ/68, 19 κατάλοιπα, τα HA1 323-328, R329Q και HA2 1-12 σχηματίζουν μια θηλιά που προβάλλει τα 8 κατάλοιπα της θέσης αποκοπής, HA1 327 έως HA2 5, μακριά από την επιφάνεια του μορίου επιτρέποντας την πρόσβαση των πρωτεολυτικών ενζύμων για να λάβει χώρα η αποκοπή.

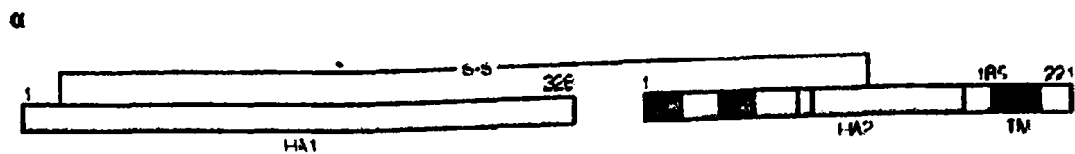
Δομή της HA0

Το κάθε μονομερές της αιμοσυγκολλητίνης (HA) του ιού γρίπης Α αποτελείται από τρεις περιοχές (σχήμα 2):

- μια εξωκυττάρια, αποτελούμενη από την υπομονάδα HA1 και μέρος της υπομονάδας HA2 προς το N-τελικό άκρο
- μια διαμεμβρανική, κυρίως ελικοειδή, αποτελούμενη από περίπου 26 αμινοξικά κατάλοιπα της HA2 υπομονάδας, η οποία «αγκυροβολεί» την πρωτεΐνη στην ικκή μεμβράνη και
- μια κυτοπλασματική ουρά, που συνιστά το C-τελικό άκρο της HA2 υπομονάδας, περίπου 10 αμινοξικών καταλοίπων.

Ως προς τη δομή, το εξωκυττάριο τμήμα (ectodomain) του κάθε μονομερούς, και κατά συνέπεια το τριμερές της πρωτεΐνης, χαρακτηρίζεται από τις εξής δομικές περιοχές (domains):

- μια απομακρυσμένη από τη μεμβράνη σφαιρική κεφαλή, που αποτελείται μόνο από κατάλοιπα της HA1 υπομονάδας και περιέχει τη θέση πρόσδεσης στον υποδοχέα – Receptor Binding Domain/Site-,
- μια πλησιέστερη στη μεμβράνη περιοχή, που συνιστά τον κορμό του μορίου, αποτελείται από την υπόλοιπη HA1 και από την HA2 υπομονάδα και περιέχει ένα χαρακτηριστικό, τρίκλωνο, υπερελικωμένο στέλεχος α-ελίκων (κατάλοιπα αποκλειστικά από την HA2) που σταθεροποιούνται με ηλεκτροστατικές, υδρόφοβες και άλλες μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις, καθώς και το πεπτίδιο σύντηξης (N-τελικό άκρο της HA2).



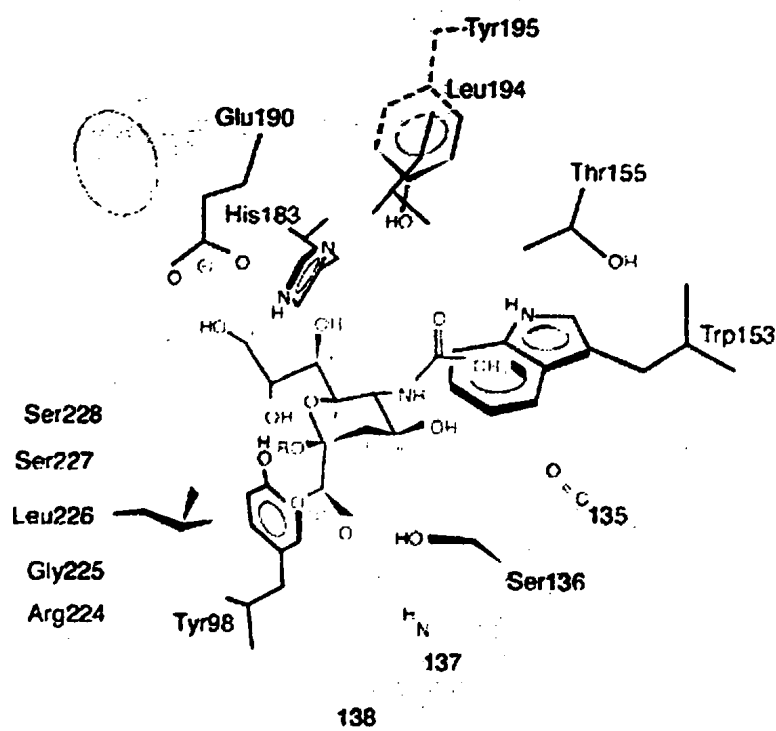
β



Σχήμα 2. α) Πρωτοταγής δομή της HA, όπου φαίνεται και ο δισουλφιδικός δεσμός μεταξύ των καταλοίπων 14 της HA1 και 137 της HA2, και β) τεταρτοταγής δομή (ectodomain) της HA (τριμερές), σε ουδέτερο pH. Απεικονίζεται η HA1 (κίτρινο) και τα πρώτα 175 κατάλοιπα της HA2 (γαλάζιο). Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται τα πρώτα 20 κατάλοιπα του πεπτιδίου σύντηξης, με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται το τμήμα 55-76, το οποίο σε αυτό το pH σχηματίζει δομή θηλιάς, ενώ κατά τη διαδικασία της σύντηξης γίνεται ελικοειδές, και, τέλος, με πορτοκαλί χρώμα διακρίνονται τα κατάλοιπα 106-112, εδώ σε ελικοειδή δομή, που μετατρέπεται σε θηλιά κατά τη σύντηξη.

Θέση πρόσδεσης στον υποδοχέα (Receptor Binding Domain)

Η θέση πρόσδεσης στον υποδοχέα (receptor binding domain/site, RBD) βρίσκεται στο απομακρυσμένο από τη μεμβράνη άκρο (HA1) του κάθε HA μονομερούς. Σε γενικές γραμμές, οι HA πρωτεΐνες όλων των στελεχών ιού γρίπης έχουν παρόμοια σχηματισμένα RBDs, αποτελούμενα το κάθε ένα από τρία χαρακτηριστικά δομικά στοιχεία. Πρόκειται για μια α -έλικα (έλικα-190, HA1 190-198) και δυο θηλιές (θηλιά-130, HA1 135-138, και θηλιά-220, HA1 221-228), που «οριοθετούν» τις πλευρές των θέσεων πρόσδεσης, και για ορισμένα διατηρημένα κατάλοιπα (Tyr⁹⁸, Trp¹⁵³, His¹⁸³ και Tyr¹⁹⁵), που συνιστούν τη «βάση» των θέσεων πρόσδεσης (σχήμα 3).



Σχήμα 3. Σχηματική απεικόνιση των καταλοίπων της HA που σχηματίζουν τη θέση πρόσδεσης στον υποδοχέα, σε σύμπλεξη με αυτόν.

Ο υποδοχέας της ΗΑ

Οι υποδοχείς στους οποίους προσδέεται η ΗΑ του ιού της γρίπης είναι σιαλικά οξέα επιφανειακών γλυκοπρωτεϊνών και γλυκολιπιδίων του κυττάρου ξενιστή, όπου αποτελούν την τελευταία σακχαριτική μονάδα Ν-συνδεδεμένων ολιγοσακχαριτικών αλυσίδων. Το προτελευταίο σάκχαρο αυτών των ολιγοσακχαριτών είναι πάντα μια γαλακτόζη. Το είδος του γλυκοζιτικού δεσμού που συνδέει το σιαλικό οξύ με τη γαλακτόζη και η προτίμηση μιας ΗΑ για το ένα ή το άλλο είδος δεσμού είναι καθοριστικής σημασίας και σχετίζεται με την εξειδίκευση κάθε υποτύπου γρίπης Α για έναν ξενιστή. Συνήθως, ο δεσμός που συνδέει τα δυο αυτά σάκχαρα είναι α2,3 ή α2,6 γλυκοζιτικός δεσμός.

Οι ΗΑ όλων των αντιγονικών υποτύπων που απαντώνται στους ιούς γρίπης των πτηνών προσδέονται με σιαλικό οξύ το οποίο συνδέεται με δεσμό α2,3 με γαλακτόζη και είναι αυτή η μορφή σιαλοσακχαρίτη που επικρατεί στο εντερικό σύστημα των πτηνών που αντιγράφονται αυτοί οι ιοί.

Ανθρώπινοι ιοί των υποτύπων Η1, Η2 και Η3, που ως γνωστόν έχουν προκαλέσει τις πανδημίες του 1918, 1957 και 1968, αντίστοιχα, αναγνωρίζουν σιαλικό οξύ συνδεδεμένο μέσω α2,6 δεσμού με γαλακτόζη, μορφή που απαντάται στα κύτταρα του αναπνευστικού συστήματος των ανθρώπων.

Υπάρχουν και υπότυποι του ιού, που είναι γνωστό ότι μεταδίδονται μεταξύ ζώων όπως ο χοίρος, οι οποίοι αναγνωρίζουν τόσο α2,6 όσο και α2,3 δεσμούς σιαλικού οξέος-γαλακτόζης και πράγματι και οι δυο μορφές έχουν ανιχνευθεί στην τραχεία των χοίρων.

Καθώς είναι γενικά παραδεκτό ότι οι ΗΑ πρωτεΐνες των ιών των ανθρώπων και των χοίρων έχουν προέλθει από τις ΗΑ των πτηνών, αυτό σημαίνει ότι απαιτούνται αλλαγές στην εξειδίκευση πρόσδεσης των ΗΑ για τον υποδοχέα, ώστε να είναι εφικτή η ικανότητα μόλυνσης και νέων ειδών. Ο μηχανισμός που έχουν χρησιμοποιήσει οι ιοί για να πετύχουν αυτές τις αλλαγές διαφέρει για κάθε υπότυπο. Εκτός από την αντιγονική παρέκκλιση και την αντιγονική αλλαγή που επιφέρουν καταρχήν μικρής ή μεγάλης έκτασης μεταλλάξεις στην αμινοξική αλληλουχία των ΗΑ, μεγάλη σημασία έχει και η δομή που προσλαμβάνουν οι προκύπτουσες ΗΑ, γενικά, και οι θέσεις πρόσδεσης αυτών στον υποδοχέα, ειδικότερα, καθώς ακόμα και χωρίς μεταλλάξεις των καταλοίπων της θέσης πρόσδεσης, η προτίμηση για τον ένα ή τον άλλο υποδοχέα μπορεί να αλλάξει, διευρύνοντας το φάσμα των ξενιστών που ένας συγκεκριμένος υπότυπος μπορεί να προσβάλλει [18-22].

Πρόσφατες μελέτες φέρνουν στο φως νέα στοιχεία που συμβάλουν στην κατανόηση της εξειδίκευσης μιας ΗΑ πρωτεΐνης για τον υποδοχέα και φέρνουν τους επιστήμονες πιο



κοντά στην πρόβλεψη των χαρακτηριστικών που ενδεχομένως θα έχει το στέλεχος του ιού γρίπης που θα προκαλέσει την επόμενη πανδημία στον ανθρώπινο πληθυσμό.

Έγινε πλέον κατανοητό ότι δεν αρκεί μόνο η παρουσία μιας σύνδεσης σιαλικού οξέος-γαλακτόζης για να καθορίσει την εξειδίκευση μιας HA για τον ένα ή τον άλλο υποδοχέα, αλλά σημαντικό ρόλο παίζουν και τα υπόλοιπα σάκχαρα που συνιστούν τον ολιγοσακχαριτικό υποδοχέα, και πιο συγκεκριμένα η σχετική μεταξύ τους θέση (τοπολογία). Έτσι, φαίνεται πως σε α2,3 ή βραχίες α2,6 σιαλογλυκάνες, οι σακχαριτικές μονάδες διευθετούνται μεταξύ τους έτσι ώστε να καταλαμβάνουν ένα χώρο που περιγράφεται ως κώνος. Αντίθετα, στις μεγαλύτερου μήκους α2,6 σιαλογλυκάνες, οι σακχαριτικές μονάδες διευθετούνται μεταξύ τους με τρόπο ώστε να καταλαμβάνουν ένα χώρο που περιγράφεται ως ανοιχτή ομπρέλα. Και πράγματι, αποδεικνύεται ότι η πρώτη περίπτωση δομής υποδοχέα αναγνωρίζεται από HA πτηνών και χοίρων ενώ η δεύτερη από HA ανθρώπων [23, 24].

Προστατευτική ανοσολογική απόκριση έναντι της γρίπης

Η HA, το κύριο αντιγόνο στην επιφάνεια του ιού, αποτελεί τον πρωταρχικό στόχο για αντισώματα εξουδετέρωσης της μολυσματικότητας του ιού και αποτροπής μόλυνσης από αντιγονικά συγγενικούς ιούς γρίπης (B-κυτταρικοί επίτοποι, χυμική ανοσία). Επιπλέον, ένας άλλος μηχανισμός καταπολέμησης του ιού είναι μέσω ανάπτυξης κυτταροτοξικών T-λεμφοκυτάρων (CTLs) ειδικών για διάφορες ιικές πρωτεΐνες, τόσο εσωτερικές όσο και επιφανειακές, άρα και της HA συμπεριλαμβανομένης. Αυτή η CTL, ειδική για T-κυτταρικούς επιτόπους των παραπάνω πρωτεϊνών, είναι υπεύθυνη για τη μείωση της εξάπλωσης του ιού και επομένως για την ταχεία ανάρρωση από τη γρίπη [25].

Αντισώματα έναντι της HA είναι αποτελεσματικά στο να παρέχουν μακράς διάρκειας προστασία, υπό τον όρο απουσίας αντιγονικής παρέκκλισης ή αλλαγής (ομοτυπική ανοσία). Αυτό όμως είναι γενικά αδύνατο και διαπιστώνεται ότι μόλυνση από έναν υπότυπο γρίπης επάγει μικρή ή καθόλου ανοσία έναντι άλλων υποτύπων.

Αντίθετα, μια CTL απόκριση κατευθύνεται έναντι γενικά διατηρημένων T-κυτταρικών επιτόπων, εσωτερικών και επιφανειακών ιικών πρωτεϊνών, οπότε σε κάποιο βαθμό μπορεί να προσφέρει προστασία εκδηλώνοντας διασταυρωτή αντίδραση στην αναγνώριση από διαφορετικούς υποτύπους ιών (ετεροτυπική ανοσία) [26, 27].

B-κυτταρικοί επίτοποι

Οι αντιγονικές θέσεις των διαφόρων HA πρωτεϊνών έχουν χαρτογραφηθεί για τις H1, H2, H3, H5 και H9. Γενικά, εντοπίζονται στην απομακρυσμένη από τη μεμβράνη σφαιρική κεφαλή της HA (HA1), σε γειτνίαση με τη θέση πρόσδεσης της πρωτεΐνης στον σιαλο-υποδοχέα, και είναι αυτές στις οποίες εντοπίζονται οι μείζονες μεταλλάξεις που καθορίζουν τους διάφορους αντιγονικούς υποτύπους γρίπης.

Για πρώτη φορά, η ταυτοποίηση και χαρτογράφηση B-κυτταρικών επιτόπων έγινε για την H3 πρωτεΐνη, για την οποία ήταν γνωστή και η δομή [28, 29]. Σε αυτή τη μελέτη, προτάθηκαν πέντε θέσεις πρόσδεσης αντισωμάτων:

Θέση A: μια προεξέχουσα θηλιά (κατάλοιπα 133-137 και 140-146) αποτελεί το κεντρικό κομμάτι της πιο προφανούς θέσης πρόσδεσης αντισωμάτων, η οποία υφίσταται μεταλλάξεις μεταξύ των διαφόρων υποτύπων και στελεχών αλλά, γενικά, περικλείεται από διατηρημένα κατάλοιπα.

Θέση B: περιλαμβάνει μια θηλιά (κατάλοιπα 155-160), τα εξωτερικά κατάλοιπα 187-196 μιας α-έλικας, καθώς και γειτονικά κατάλοιπα της θέσης πρόσδεσης στον υποδοχέα.

Θέση C: ένα «εξόγκωμα» στην τριτοταγή δομή στο δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ των καταλοίπων Cys52 και Cys277, 60Å από την κορυφή του μορίου.

Θέση D: σε αντίθεση με τις προαναφερθείσες θέσεις που συνιστούν εξωτερικές και άμεσα προσβάσιμες περιοχές της πρωτεΐνης, η θέση αυτή εντοπίζεται στη διεπιφάνεια των τριών μονομερών αλυσίδων του τριμερούς μορίου.

Θέση E: εντοπίζεται κοντά στη βάση της σφαιρικής κεφαλής, μεταξύ των θέσεων A και C.

Αυτό λοιπόν που χαρακτηρίζει τις θέσεις πρόσδεσης αντισωμάτων είναι η δομή θηλιάς που προσλαμβάνουν καθώς και η παρουσία υδατανθρακικών αλυσίδων (γλυκοζυλίωση).

Γενικά, παρόμοιες θέσεις πρόσδεσης αντισωμάτων έχουν προταθεί και για τις H1 [30], H2 [31] και H5 [32] πρωτεΐνες, ενώ η κατάσταση είναι αρκετά διαφορετική για την H9 [33]. Εδώ, προτείνονται οι θέσεις I (κατάλοιπα από τις θέσεις A και B της H3) και II (κατάλοιπα από τις θέσεις A, B και D) (σχήμα 4).

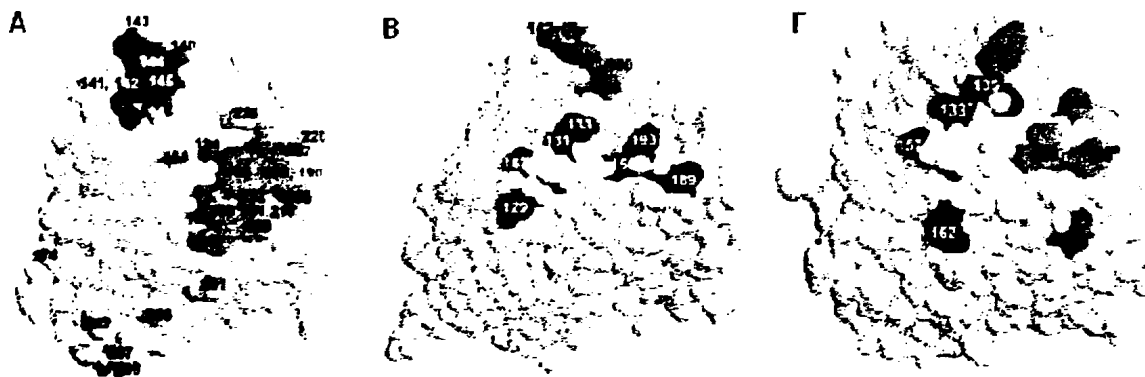
T-κυτταρικοί επίτοποι

Πεπτιδία που προέρχονται από ενδογενή αντιγόνα της γρίπης, που συντίθενται μέσα στα μολυσμένα κύτταρα, αποτελούν στόχους για κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα (CTLs) τα οποία καταστρέφουν τα μολυσμένα κύτταρα που παρουσιάζουν τα σύμπλοκα πεπτιδίων-



MHC τάξης I μορίων. Μεταξύ των ενδογενών αντιγόνων, τα εσωτερικά είναι οι κύριοι στόχοι για CTL απόκριση, αν και αυτή μπορεί επίσης να κατευθυνθεί και έναντι των επιφανειακών γλυκοπρωτεϊνών HA και NA [25].

Όσον αφορά στην HA, έχουν προταθεί στη βιβλιογραφία T-κυτταρικοί επίτοποι, ικανοί να επάγουν CTL απόκριση, οι οποίοι άλλοτε εντοπίζονται στην ίδια περιοχή με τους B-κυτταρικούς επιτόπους και άλλοτε όχι [34].



Σχήμα 4. Αντιγονικές θέσεις στη σφαιρική κεφαλή της HA των H3 (A), H5 (B) και H9 (Γ) υποτύπων χαρτογραφημένες στην τρισδιάστατη δομή του μορίου (H3 αρίθμηση) [33].

Θέσεις γλυκοζυλίωσης

Η HA υπόκειται σε μετα-μεταφραστική γλυκοζυλίωση που εξαρτάται από το κύτταρο-ξενιστή και σκοπό έχει να συμβάλει στη σωστή πτύχωση της πρωτεΐνης και στο σχηματισμό του τριμερούς. Αν και όλα τα HA μόρια είναι γλυκοζυλιωμένα, η τοποθεσία και ο αριθμός (5 έως 11) των ενδεχόμενων θέσεων γλυκοζυλίωσης δεν είναι διατηρημένα μεταξύ των στελεχών και υποτύπων γρίπης. Παρόλα αυτά τείνουν να συνωστίζονται γύρω από τις αντιγονικές θέσεις. Η παρουσία ή απουσία ενός υδατανθρακικού τμήματος μπορεί να διαμορφώσει την αντιγονικότητα του μορίου της HA εμποδίζοντας την πρόσδεση αντισωμάτων εξουτεδέρωσης ή καλύπτοντας επιτόπους που αναγνωρίζονται από CD4⁺ T-κύτταρα. Με αυτό τον τρόπο, η απόκτηση υδατανθρακικών τμημάτων παρέχει ένα μηχανισμό διαφυγής από το ανοσοποιητικό σύστημα [35, 36]. Επιπλέον, τμήματα της επιφάνειας της HA καλύπτονται από παράπλευρες αλυσίδες ολιγοσακχαριτών οι οποίες συντίθενται από κυτταρικά ένζυμα και επομένως θεωρούνται «ίδια αντιγόνα» έναντι των οποίων αναπτύσσεται ανοχή [17].

Πεπτίδιο σύντηξης

Το πεπτίδιο σύντηξης συνίσταται από τα πρώτα 20-25 αμινοξέα του N-τελικού άκρου της HA2 αλυσίδας που σχηματίζεται με την αποκοπή της HA0. Μεταξύ των διαφόρων αντιγονικών υποτύπων της HA, το πεπτίδιο αυτό είναι άκρως διατηρημένο και αυτό κυρίως αφορά τα πρώτα 11 κατάλοιπα από το N-τελικό άκρο της HA2 (σχήμα 5).

	330	340	350
H1 (A/PR8/34)	SIQ---	YRGLFGAIAGFIEGGWTGMIDGWY	
H2 (A/Jap/305/57)	Q.E....	S.....	Q..V....
H3 (A/Aichi/2/68)	EK-QTR.--	N..E.....
H4 (A/Minnesota/80)	EK-ATR.--	N..Q.L....
H5 (A/HongKong/97)	HRERRRKK	Q..V....
H6 (A/Netherlands/1)	Q.E....	T..I.....	
H7 (A/FPV/Rostock/34)	EPSKKREK	N..E.LV....
H9 (A/Korea/S22/04)	AAS....	G.....	P.LVA....
H10 (A/Sweden/84)	ENVQGR.--	N..E..V....
H11 (A/NJ/14172-14/94)	A.A....	K.....	P.L.N....
H13 (A/Sibena/272PF/98)	A.S....	N..L.....	P.L.N....
H14 (A/Astrakhan/263/82)	GK-QAK.--	N..Q.L....
H15 (A/West Australia/2576/79)	EKIRTR.--	N..E.L....
	(1)	(8)	(11)

Σχήμα 5. Σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας των HA πρωτεϊνών 15 διαφορετικών υποτύπων ιού γρίπης A, όπου φαίνεται η ομολογία όσον αφορά στο πεπτίδιο σύντηξης

Τα πιο αξιοσημείωτα χαρακτηριστικά αυτής της διατηρημένης πεπτιδικής αλληλουχίας είναι η υδροφοβικότητα, οφειλόμενη σε μεγάλο αριθμό υδρόφοβων αμινοξέων με ογκώδεις παράπλευρες αλυσίδες, καθώς και το ότι είναι πλούσιο σε κατάλοιπα Gly που παρέχουν μεγαλύτερη ευελιξία [37].

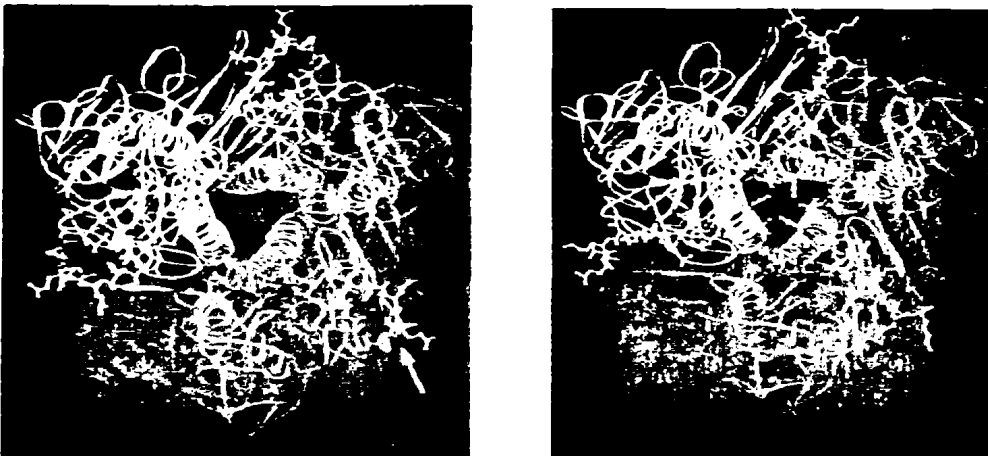
Ο ρόλος του πεπτιδίου αυτού είναι αποφασιστικής σημασίας στη σύντηξη των μεμβρανών κατά τη μόλυνση από τον ιό και για το λόγο αυτό έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλών μελετών που αφορούν στη δομή και τη λειτουργία του [15, 38].

Αν και το πεπτίδιο σύντηξης έχει παρατηρηθεί σε δομή τυχαίας διαμόρφωσης, α-έλικας και β-φύλλου ανάλογα με το περιβάλλον, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η ελικοειδής μορφή είναι αυτή που προάγει την σύντηξη. Τα μεταλλάγματα που αναστέλλουν τη σύντηξη είναι λιγότερο ελικοειδή και έχουν την τάση να αυτο-οργανώνονται σε β-φύλλα.



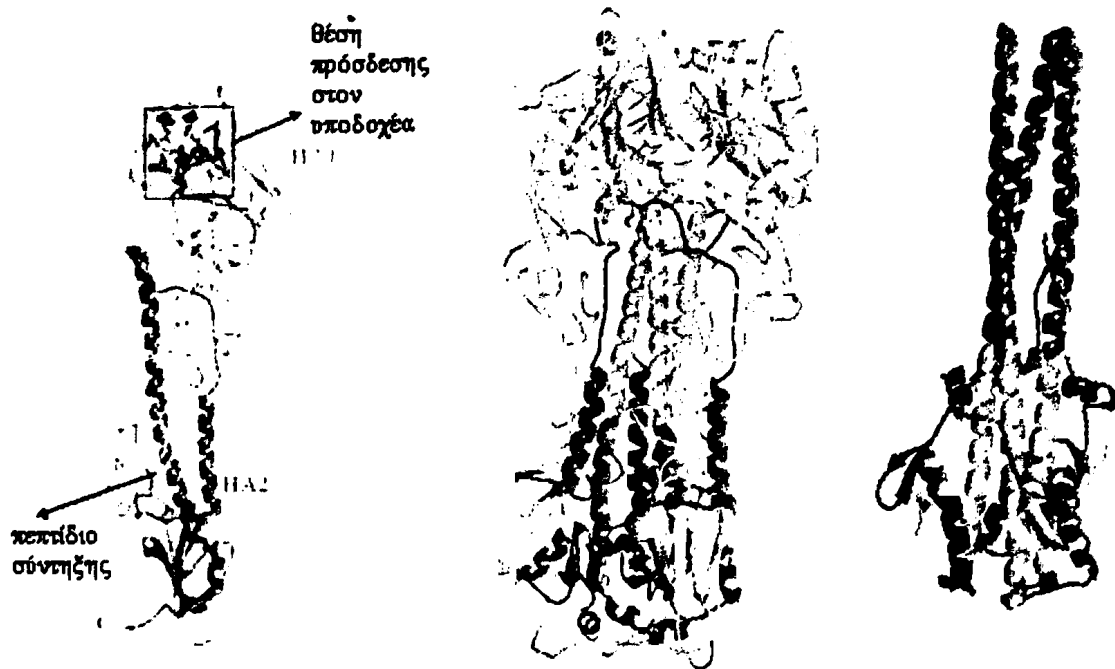
Ο ρόλος της HA στη μόλυνση του κυττάρου ξενιστή από τον ιό γρίπης – Σύντηξη μεμβρανών

Η αποκοπή της HA0 είναι απαραίτητη για τη μολυσματικότητα του ιού καθώς ενεργοποιεί τη δυνατότητα σύντηξης των μεμβρανών. Αυτό πραγματοποιείται με δυο τρόπους. Πρώτον, με την αποκοπή δημιουργείται το N-τελικό άκρο της HA2, δηλαδή το πεπτίδιο σύντηξης, που εισάγεται μέσα σε μια αρνητικά φορτισμένη εσοχή στο εσωτερικό του τριμερούς, και δεύτερον, λαμβάνουν χώρα διαμορφωτικές αλλαγές στο μόριο, συγκεκριμένα επανατοποθέτηση καταλοίπων της HA1 και της HA2 (σχήμα 6), που του επιτρέπουν να προσλάβει δομή που να μπορεί στη συνέχεια, και με έναυσμα το χαμηλό pH των ενδοσωμάτων, να υποστεί τις μοριακές επαναδιευθετήσεις που απαιτούνται για σύντηξη [39] (σχήμα 7).



Σχήμα 6. Κάτοψη του τριμερούς της HA πριν (αριστερά) και μετά την αποκοπή (δεξιά). Το κάθε μονομερές απεικονίζεται με λευκό, πράσινο και μπλε χρώμα, ενώ τα κατάλοιπα που μετατοπίζονται μετά την αποκοπή απεικονίζονται με κίτρινο για την HA1 και πορτοκαλί για την HA2. Το βέλος υποδεικνύει την θέση αποκοπής της HA0, ενώ διακρίνεται και η μετατόπιση του N-τελικού άκρου της HA2 στο εσωτερικό του τριμερούς μετά την αποκοπή.

Μετά την εσωτερικευση των σωματιδίων του ιού, στο όξινο περιβάλλον των ενδοσωμάτων, εκτός από το ότι το πεπτίδιο σύντηξης εξέρχεται από την εσοχή (cavity) του εσωτερικού του τριμερούς και καθίσταται πλέον εκτεθειμένο και έτοιμο προς αλληλεπίδραση, συμβαίνουν και κάποιες δομικές αναδιατάξεις, οι οποίες συνοπτικά έχουν ως εξής:



Σχήμα 7. Συγκριτική παρουσίαση της HA στις διάφορες μορφές της (από αριστερά προς τα δεξιά): μονομερές, τριμερές στη φυσική μορφή του σε ουδέτερο pH και τριμερές στη μορφή χαμηλού pH

-οι απομακρυσμένες από τη μεμβράνη περιοχές που προσδέονται στον υποδοχέα διατηρούν τη δομή τους αλλά αποτριμερίζονται, ενώ

-το ελικοειδές κεντρικό τμήμα κατά κάποιον τρόπο επεκτείνεται και συστρέφεται έτσι ώστε τελικά το C-τελικό του άκρο (που καταλήγει στη μεμβράνη του ιού) και το N-τελικό του άκρο (πεπτιδίο σύντηξης) έρχονται προς την ίδια μεριά φέρνοντας σε στενή εγγύτητα τις δυο μεμβράνες (ιού και ενδοσωμάτιου) για να αρχίσει η σύντηξη [40, 41].

Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια, η χρήση συνθετικών πεπτιδίων σε ποικιλία βιοχημικών και βιοιατρικών εφαρμογών έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα δημοφιλής εξαιτίας των πλεονεκτημάτων που αυτά προσφέρουν:

- μπορούν εύκολα να συντεθούν και να ληφθούν σε καθαρή μορφή με ικανοποιητική απόδοση
- μπορούν να μιμηθούν γραμμικούς και σε σημαντικό βαθμό διαμορφωτικούς επιτόπους αντιγονικών πρωτεϊνών
- μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε δοκιμασίες στερεής φάσης αντί για πολύπλοκες πρωτεΐνες
- η σχέση δομής-βιολογικής δράσης μπορεί λεπτομερώς να μελετηθεί επιτρέποντας το σχεδιασμό και την παρασκευή νέων, τροποποιημένων πεπτιδικών αναλόγων με βελτιωμένες ιδιότητες
- προσομοιάζουν με αρκετή ομοιότητα μικρές εκτεθειμένες περιοχές στην επιφάνεια μακρομοριακών συμπλεγμάτων που εμπλέκονται σε μοριακή αναγνώριση [42].

Ειδικότερα, η χρήση συνθετικών πεπτιδικών επιτόπων για ανοσολογικές μελέτες, όπως ανάπτυξη εμβολίων και ανοσοδιαγνωστικών τεχνικών, τυγχάνει ευρύτατης εφαρμογής και συγκεντρώνει ολοένα και μεγαλύτερο ερευνητικό ενδιαφέρον.

Το βασικό πρόβλημα στη χρήση πεπτιδικών επιτόπων για ανοσολογικούς σκοπούς είναι το μικρό τους μέγεθος που τα καθιστά ελάχιστα έως καθόλου ανοσογονικά. Για την ενίσχυση της αντιγονικότητας/ανοσογονικότητάς τους απαιτείται η πρόσδεση αυτών σε μια πρωτεΐνη-φορέα. Για το σκοπό αυτό, έχουν κατά καιρούς χρησιμοποιηθεί διάφορες πρωτεΐνες όπως οι Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH), Bovine Serum Albumin (BSA) ή ovalbumin (OVA). Παρά την ευρεία χρήση τους, αυτού του είδους τα συμπλέγματα πρωτεϊνών-πεπτιδικών επιτόπων εμφανίζουν σοβαρά μειονεκτήματα, όπως ανεπιθύμητη ανάπτυξη αντισωμάτων έναντι του μορίου της πρωτεΐνης-φορέα και αλλαγή των βιολογικών ιδιοτήτων και της ενεργού διαμόρφωσης του επιτόπου κατά την πρόσδεσή του στο φορέα.

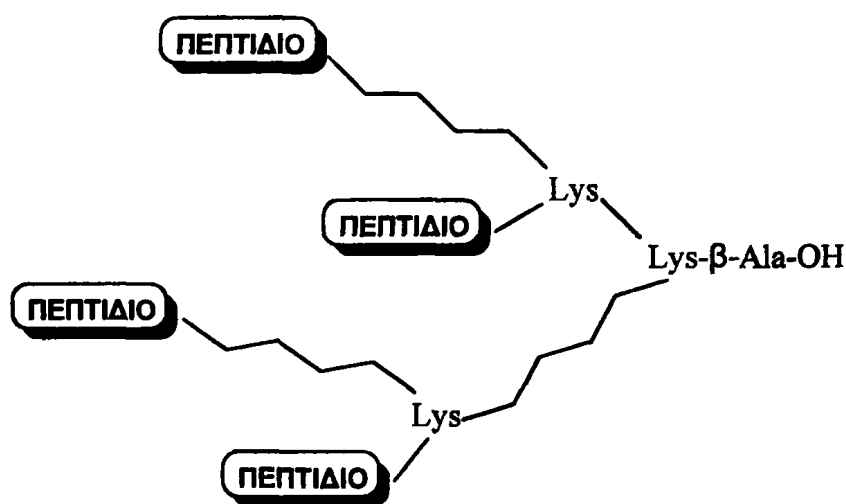
Για την αντιμετώπιση των παραπάνω προβλημάτων, οι πρωτεϊνικοί φορείς άρχισαν σταδιακά να αντικαθίστανται από συνθετικούς πεπτιδικούς φορείς, οι κυριότεροι τύποι των οποίων περιγράφονται αναλυτικά στη συνέχεια.



Φορέας πολλαπλών αντιγονικών πεπτιδίων (Multiple Antigenic Peptides, MAPs)

Το μοντέλο των MAPs, γνωστό και ως «το δέντρο της λυσίνης» εισήχθη από τον J.P.Tam και τους συνεργάτες του [43] με βασικό στόχο την ανάπτυξη ισχυρών αντιγονικών/ανοσογονικών μορίων.

Πρόκειται για μια μικρή, δομική μονάδα μορίων λυσίνης, που συγκροτούν ένα έως τέσσερα επίπεδα διακλαδώσεων, στις ελεύθερες αμινομάδες των οποίων μπορούν να προσδεθούν πολλαπλά αντιγονικά πεπτίδια. Δεδομένου ότι κάθε λυσίνη φέρει δυο αμινομάδες, κάθε επίπεδο διακλάδωσης περιέχει $2^n - 1$ μόρια λυσίνης και 2^n ελεύθερες αμινομάδες άρα και ισάριθμες θέσεις πρόσδεσης αντιγονικών πεπτιδίων.



Σχήμα 1. Σχηματική αναπαράσταση MAPs (δεύτερο επίπεδο διακλάδωσης, τέσσερις θέσεις πρόσδεσης)

Συνήθως, MAPs δυο ή τριών επιπέδων διακλάδωσης, δηλαδή με τέσσερις ή οκτώ θέσεις πρόσδεσης πεπτιδίων, θεωρούνται κατάλληλα για να σχηματίσουν μια μήτρα μικρού μοριακού βάρους απαραίτητου για ικανοποιητική ανοσολογική απόκριση.

Στα πλεονεκτήματα της χρήσης των MAPs συγκαταλέγονται η υψηλή μοριακή αναλογία αντιγονικών πεπτιδίων έναντι του μορίου του φορέα καθώς και η δυνατότητα πρόσδεσης διαφορετικών αντιγόνων στο ίδιο μόριο με κατάλληλη ορθογωνική προστασία των α- και ε-αμινομάδων των λυσινών του τελευταίου επιπέδου διακλάδωσης.

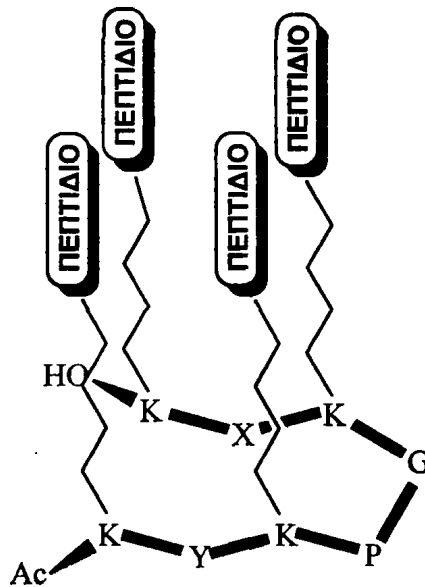
Η χρήση των MAPs περιορίζεται κυρίως λόγω συνθετικών προβλημάτων που προκύπτουν από στεरिकές παρεμποδίσεις και οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα μικρή απόδοση



σύνθεσης και καθαρισμού των μακρομορίων, ιδιαίτερα όταν αυξάνεται ο αριθμός των διακλαδώσεων και το μέγεθος του προσδεμένου πεπτιδίου.

Μοντέλο TASP (Template Assembled Synthetic Protein)

Το μοντέλο TASP, που εισήχθη από τον M.Mutter και τους συνεργάτες του [44], είναι ένα πεπτιδικό εκμαγείο στο οποίο προσδένονται ομοιοπολικά πεπτιδικά τμήματα και έτσι κατευθύνεται η ενδομοριακή τους αναδίπλωση σε μια προκαθορισμένη τριτοταγή διαμόρφωση.



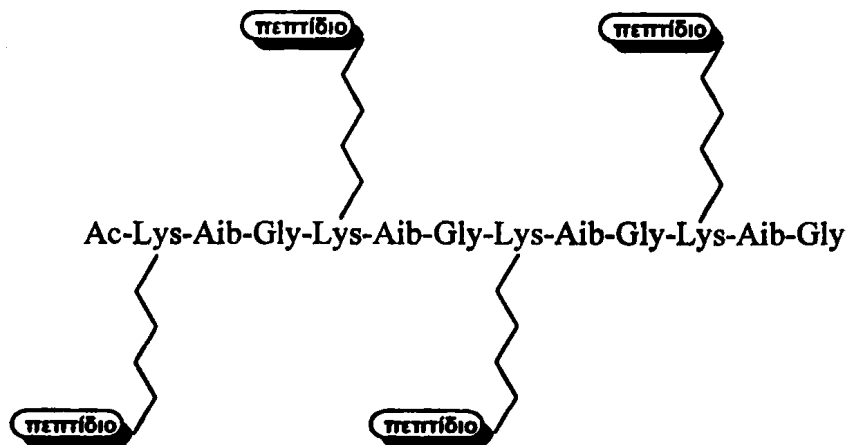
Σχήμα 2. Σχηματική αναπαράσταση ενός άκυκλου μακρομορίου TASP.

Ο φορέας TASP μπορεί να είναι ένα άκυκλο ή κυκλικό εκμαγείο, οκτώ ή δέκα αμινοξέων, αντίστοιχα. Στη πρώτη περίπτωση, περιλαμβάνονται τα αμινοξέα Pro και Gly στις θέσεις $i+1$ και $i+2$ τα οποία ευνοούν το σχηματισμό μιας β -στροφής τύπου II και επομένως ο φορέας λαμβάνει μια χαμηλής ενέργειας διαμόρφωση φουρκέτας. Στην δεύτερη περίπτωση, η προσθήκη δυο κυστεϊνών στα άκρα του πεπτιδίου επιτρέπει την κατασκευή ενός κυκλικού μορίου με περιορισμένη διαμορφωτική ευκινησία μέσω της δημιουργίας ενός δισουλφιδικού δεσμού. Και στις δυο περιπτώσεις, οι παράπλευρες αλυσίδες τεσσάρων μορίων λυσίνης που προσανατολίζονται προς το ίδιο επίπεδο επιτρέπουν την ομοιοπολική πρόσδεση των πεπτιδικών τμημάτων.

Επαναλαμβανόμενοι Ολιγοπεπτιδικοί Φορείς (Sequential Oligopeptide Carriers, SOC_n)

Ο βασικός στόχος στο σχεδιασμό των SOCs ήταν η παρασκευή ενός συνθετικού υποστρώματος με δομική σταθερότητα και κανονικότητα στο οποίο να μπορούν να προσδεθούν, ομοιοπολικά, αντιγονικά πεπτίδια χωρίς διαμορφωτικούς περιορισμούς ή στεरिकές παρεμποδίσεις [45]. Η προκαθορισμένη τρισδιάστατη δομή του φορέα SOC_n επιτρέπει στα προσδεδεμένα πεπτιδικά τμήματα να λάβουν συγκεκριμένο προσανατολισμό στο χώρο.

Ο φορέας SOC-I αποτελείται από την επαναλαμβανόμενη τριπλέτα αμινοξέων Lys-Aib-Gly και έχει γενικό τύπο Ac-(Lys-Aib-Gly)_n-OH. Η εισαγωγή της λυσίνης επιτρέπει την ομοιοπολική πρόσδεση των αντιγονικών πεπτιδίων από την ε-αμινομάδα αυτής, ενώ η γλυκίνη επελέγη λόγω του μικρού στερεοχημικού της όγκου. Η συμμετοχή του α-αμινοϊσοβουτυρικού οξέος είναι καθοριστική για την επαγωγή ελικοειδούς δομής στον πεπτιδικό σκελετό, η οποία επιβάλλεται από τις στεरिकές παρεμποδίσεις των δυο μεθυλομάδων στο α-άτομο άνθρακα. Επιπλέον, καθώς το Aib δεν συγκαταλέγεται στα φυσικά αμινοξέα, πεπτίδια στα οποία αυτό περιέχεται, αναμένεται να εμφανίζουν αυξημένη σταθερότητα έναντι ενζυμικής αποικοδόμησης.

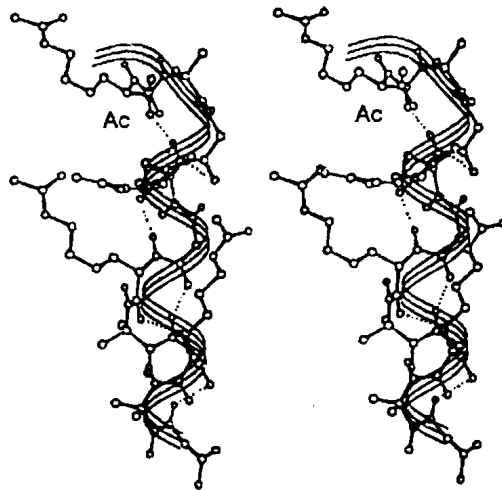


Σχήμα 3. Σχηματική αναπαράσταση ενός μακρομορίου SOC_{4-I}

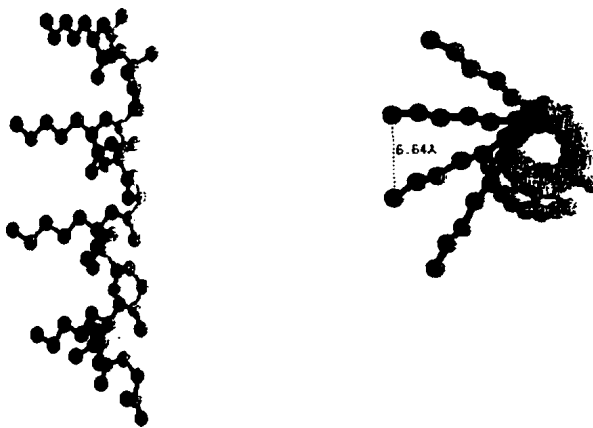
Επιβεβαίωση του σχεδιασμού των SOCs επέτρεψαν οι διαμορφωτικές μελέτες με φασματοσκοπία ¹H-NMR οι οποίες έδειξαν ότι ο φορέας λαμβάνει δομή κεκαμένης 3₁₀ έλικας [42]. Η δομή αυτή επιτρέπει στα πεπτιδικά τμήματα που προσδένονται στις ε-αμινομάδες των λυσινών να διευθετούνται στο χώρο με τρόπο ώστε να μην αλληλεπιδρούν μεταξύ τους ούτε με το μόριο του φορέα και, επιπλέον,



A

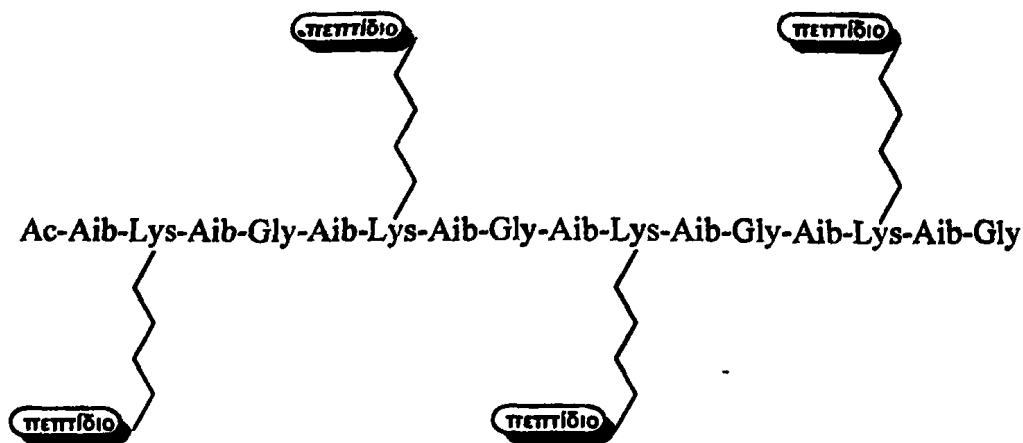


B



Σχήμα 4. (A) Ελαχιστοποιημένη μέση δομή του φορέα SOC_4 , (B) Το SOC_n από δεδομένα NMR και Μοριακής Δυναμικής που δείχνει ότι προσλαμβάνει την δομή της 3_{10} έλικας.

να διατηρούν την «ενεργό» τους διαμόρφωση. Η κανονικότητα αυτή του μορίου καθώς και η απουσία διαμορφωτικών περιορισμών και στερικών παρεμποδίσεων ευνοούν μια βέλτιστη αναγνώριση από αντισώματα και δημιουργούν ισχυρά ανοσογόνα.



Σχήμα 5. Σχηματική αναπαράσταση ενός μακρομορίου SOC_4-II

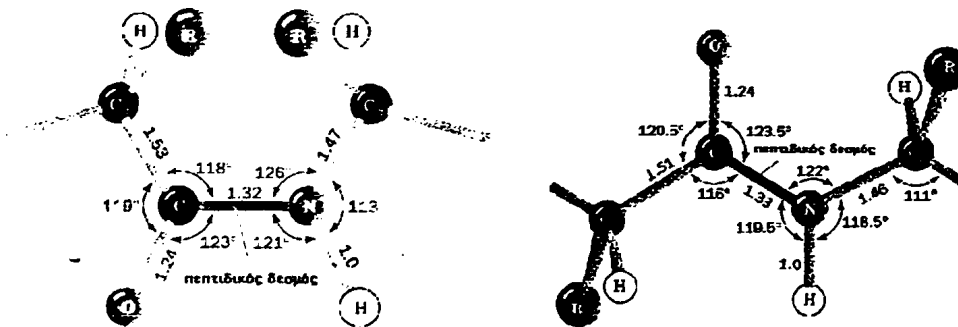
Ο φορέας SOC-II αποτελείται από την επαναλαμβανόμενη αλληλουχία Aib-Lys-Aib-Gly και σχεδιάστηκε με στόχο την αύξηση του ελικοειδούς χαρακτήρα σε σχέση με το φορέα SOC-I. Πράγματι, η διαμορφωτική μελέτη του μορίου αυτού έδειξε ότι προσλαμβάνει δομή κανονικής 3_{10} έλικας γεγονός που αποδίδεται στη μεγάλη περιεκτικότητα της πεπτιδικής αλληλουχίας σε Aib (=50%) [46].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Πεπτιδική Σύνθεση

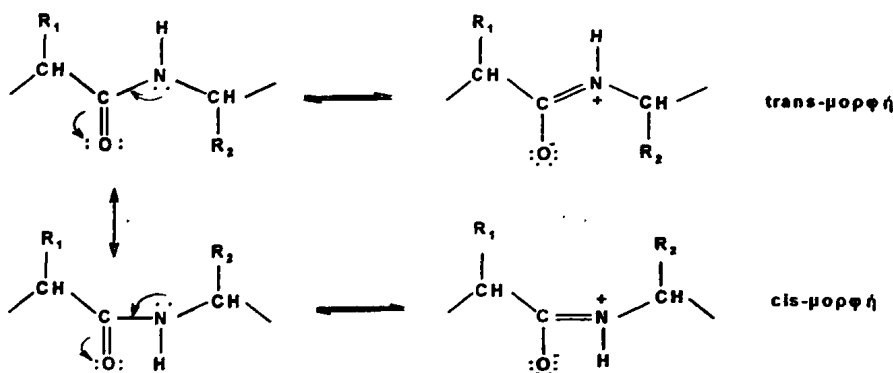
Πεπτιδικός Δεσμός

Ένα πεπτίδιο αποτελείται από μια αλυσίδα αμινοξέων συνδεδεμένων με πεπτιδικούς δεσμούς. Κρυσταλλογραφικές μελέτες έχουν δείξει ότι το μήκος του δεσμού C-N στον πεπτιδικό δεσμό είναι αισθητά μικρότερο, 1.32 Å, από ότι σε έναν απλό δεσμό C-N, 1.47 Å (Σχήμα 1).



Σχήμα 1. Ο πεπτιδικός δεσμός στην cis και trans διαμόρφωση. Οι γωνίες δίνονται σε μοίρες και τα μήκη των δεσμών σε Å. Τα δεδομένα έχουν ληφθεί από κρυσταλλογραφικές μελέτες.

Αυτό οφείλεται στη μεσομέρεια του πεπτιδικού δεσμού, η οποία περιορίζει την ελεύθερη περιστροφή γύρω από το δεσμό C-N και οδηγεί κατά συνέπεια στην ύπαρξη δύο ισομερών μορφών (Σχήμα 2).

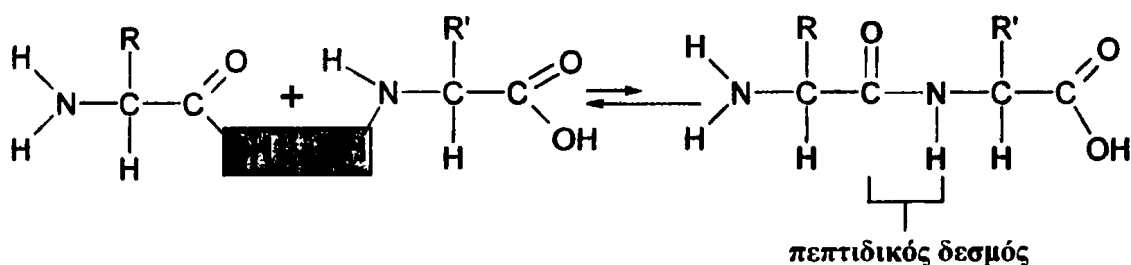


Σχήμα 2. Μεσομέρεια των cis και trans μορφών του πεπτιδικού δεσμού.

Στα φυσικά πεπτίδια και τις πρωτεΐνες υπερισχύει γενικά η trans-μορφή με εξαίρεση την προλίνη και τα N-μεθυλιωμένα αμινοξέα (π.χ. σαρκosίνη), για τα οποία ο πεπτιδικός δεσμός, στον οποίο συμμετέχει η δευτεροταγής αμινομάδα, είναι δυνατόν να έχει την cis και την trans διαμόρφωση [47, 48]. Επίσης, cis ισομερείς μορφές απαντώνται κατ' ανάγκη στις δικετοπιπεραζίνες, οι οποίες είναι τα απλούστερα κυκλικά πεπτίδια που σχηματίζονται από δύο αμινοξέα.

Σχηματισμός Πεπτιδικού Δεσμού

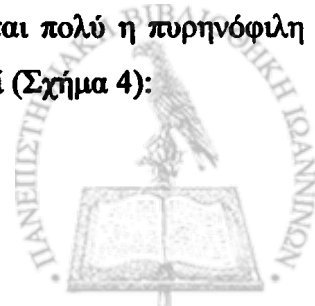
Ο πεπτιδικός δεσμός [49] είναι ένας αμιδικός δεσμός και σχηματίζεται από την καρβοξυλομάδα ενός αμινοξέος και την αμινομάδα ενός άλλου αμινοξέος μέσω μιας αντίδρασης πυρηνόφιλης προσβολής με την ταυτόχρονη απομάκρυνση ενός μορίου νερού (Σχήμα 3):

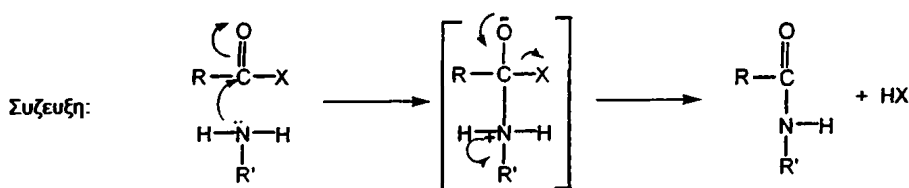


Σχήμα 3. Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού.

Η ισορροπία της αντίδρασης είναι μετατοπισμένη προς την πλευρά της υδρόλυσης κατά την οποία έχουμε απελευθέρωση ενέργειας. Προς την πλευρά σχηματισμού του πεπτιδικού δεσμού απαιτείται κατανάλωση ενέργειας (ενδόθερμη αντίδραση, ~ 4Kcal/mol). Η απλή ανάμιξη δύο αμινοξέων σε διάλυμα οδηγεί στο σχηματισμό άλατος σε θερμοκρασία δωματίου. Για να μετατραπεί αυτό το άλας σε πεπτίδιο απαιτούνται πολύ δραστικές συνθήκες (υψηλές θερμοκρασίες). Τα αμινοξέα όμως είναι πολύ ευαίσθητες ενώσεις και σε αυτές τις συνθήκες καταστρέφονται. Για το λόγο αυτό πρέπει να γίνει ενεργοποίηση σε ένα από τα αντιδρώντα. Συνήθως γίνεται ενεργοποίηση του καρβοξυλίου του ενός αμινοξέος.

Για να μετατραπούν τα καρβοξυλικά οξέα σε ακυλιωτικά μέσα πρέπει οι υδροξυλικές τους ομάδες να αντικατασταθούν από έναν υποκαταστάτη (X) δέκτη ηλεκτρονίων ώστε να αυξηθεί η πολικότητα της καρβονυλικής ομάδας και επομένως ο ηλεκτρονιόφιλος χαρακτήρας του ατόμου άνθρακα. Με αυτόν τον τρόπο διευκολύνεται πολύ η πυρηνόφιλη προσβολή της αμινομάδας, του αμινοξέος, που πρόκειται να ακυλωθεί (Σχήμα 4):





Εχθήμα 4. Ενεργοποίηση του καρβοξυλίου του N-τελικού αμινοξέος και πυρηνόφιλη προσβολή της αμινομάδας του αμινοξέος που θα ακυλωθεί στην ενεργοποιημένη καρβονυλομάδα.

Η ενεργοποίηση του καρβοξυλίου για να ληφθεί το επιθυμητό προϊόν δεν είναι αρκετή, αλλά απαιτείται παροδική προστασία της α-αμινομάδας του N-τελικού αμινοξέος καθώς και του α-καρβοξυλίου του C-τελικού αμινοξέος. Επίσης λόγω της ύπαρξης φραστικών ομάδων στις παράπλευρες αλυσίδες ορισμένων αμινοξέων είναι πιθανό να σχηματιστούν, εκτός του επιθυμητού προϊόντος, και άλλα ανεπιθύμητα πεπτιδία. Για το λόγο αυτό απαιτείται κατάλληλη προστασία. Ιδιαίτερα σημαντική είναι και η επιλογή των μεθόδων που θα εφαρμοστούν για το σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού. Δεδομένου ότι τα αμινοξέα, εκτός της γλυκίνης, περιέχουν ένα ασύμμετρο α-άτομο άνθρακα, θα πρέπει να ληφθούν μέτρα για να αποφευχθεί η ρακεμοποίηση κατά τη διαδικασία της σύζευξης. Η ρακεμοποίηση οδηγεί στη δημιουργία ανεπιθύμητων προϊόντων που δύσκολα μπορούν να διαχωριστούν με τις συνήθεις μεθόδους καθαρισμού. Επομένως, είναι φανερό ότι η σύνθεση πεπτιδίων είναι μια αρκετά πολύπλοκη διαδικασία και απαιτείται μεγάλη προσοχή στο σχεδιασμό (επιλογή προστατευτικών ομάδων, συνθηκών κτλ) και στη διεξαγωγή της.

Σύνθεση πεπτιδίων

Τα στάδια που ακολουθούνται στην πεπτιδική σύνθεση είναι τα εξής:

1. Παροδική προστασία της α-αμινομάδας του N-τελικού αμινοξέος με κατάλληλη ομάδα η οποία μειώνει την πυρηνοφιλία της.
 2. Παροδική προστασία του α-καρβοξυλίου του C-τελικού αμινοξέος.
- στη σύνθεση πεπτιδίων σε υγρή φάση, η προστασία του α-καρβοξυλίου επιτυγχάνεται με στεροποίηση αυτής (μεθυλ-, αιθυλ-, t-βουτυλ- ή βενζυλ-εστέρας), ενώ στη στερεή φάση η προστασία αυτή δεν είναι απαραίτητη διότι το καρβοξύλιο είναι συζευγμένο με το στερεό υπόστρωμα (ρητίνη).

3. Παροδική προστασία των δραστικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων επειδή είναι δυνατόν να αντιδράσουν κατά τη διάρκεια της σύνθεσης.

4. Σχηματισμός του πεπτιδικού δεσμού με ενεργοποίηση του καρβοξυλίου του N-τελικού αμινοξέος και ακολούθως σύζευξη αυτού με την ελεύθερη αμινομάδα του άλλου αμινοξέος ή του πεπτιδίου. Για την ενεργοποίηση χρησιμοποιούνται: η μέθοδος των χλωριδίων, η μέθοδος των αζιδίων, η μέθοδος των ανυδριτών καθώς και η μέθοδος των ενεργών εστέρων. Η χρήση των αντιδραστηρίων σύζευξης είναι σήμερα η επικρατέστερη μέθοδος σχηματισμού του πεπτιδικού δεσμού.

5. Απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων, μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης, με τέτοιο τρόπο ώστε να μην καταστρέφονται οι πεπτιδικοί δεσμοί, και αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη στην περίπτωση της σύνθεσης σε στερεή φάση.

Σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση

Η σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση (Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS) εισήχθη από τον Merrifield με σκοπό να ξεπεραστούν τα προβλήματα της πεπτιδικής σύνθεσης σε υγρή φάση.

Κατά τη σύνθεση των πεπτιδίων σε στερεή φάση, το πεπτίδιο συντίθεται πάνω σε ένα αδιάλυτο πολυμερές υποστήριγμα (ρητίνη). Το C-τελικό αμινοξύ προσδέεται ομοιοπολικά με το καρβοξύλιό του πάνω στη ρητίνη, ενώ η N^α-αμινομάδα του και η παράπλευρη αλυσίδα του είναι κατάλληλα προστατευμένες. Η σύνθεση συνεχίζεται με διαδοχικά βήματα αποπροστασίας της N^α-αμινομάδας και σύζευξης του επόμενου, κατάλληλα προστατευμένου αμινοξέος. Έτσι, το επιθυμητό πεπτίδιο συντίθεται πάνω στη ρητίνη από το C-τελικό προς το N-τελικό άκρο (C→N στρατηγική). Το πεπτίδιο, καθ' όλη τη διάρκεια της σύνθεσης, παραμένει συνδεδεμένο με την αδιάλυτη ρητίνη οπότε η περίσσεια των αντιδραστηρίων και τα παραπροϊόντα απομακρύνονται εύκολα με έκπλυση της ρητίνης με κατάλληλους διαλύτες και διήθηση. Όταν η σύνθεση ολοκληρωθεί, το πεπτίδιο αποκόπτεται από τη ρητίνη με τη χρήση κατάλληλων αντιδραστηρίων.

Η μεθοδολογία αυτή επιτρέπει τη σύνθεση μεγάλων πεπτιδίων, σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα, με υψηλή απόδοση καθώς επίσης και ικανοποιητική καθαρότητα. Το γεγονός ότι κάθε ενδιάμεσο προϊόν δεν απομονώνεται, έχει σαν αποτέλεσμα η ταυτοποίηση του πεπτιδίου να γίνεται μόνο μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης και έτσι αν η αποπροστασία της N^α-αμινομάδας ή/και η αντίδραση σύζευξης δεν γίνουν ποσοτικά, τότε, στο τέλος, μαζί με το επιθυμητό προϊόν λαμβάνονται και παραπροϊόντα που δυσχεραίνουν



τον καθαρισμό. Παρόλα αυτά, η σύνθεση των πεπτιδίων στη στερεή φάση χρησιμοποιείται ευρύτατα διότι τα πλεονεκτήματά της υπερτερούν των μειονεκτημάτων.

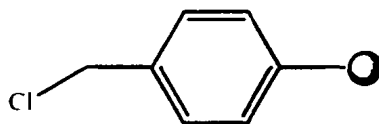
Πολυμερικά υποστρώματα στην πεπτιδική σύνθεση στερεής φάσης

Για να χρησιμοποιηθεί ένα στερεό πολυμερές στη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση (SPPS), πρέπει να έχει συγκεκριμένες ιδιότητες:

- i) Να αποτελείται από σωματίδια κατάλληλου σχήματος και μεγέθους, τα οποία να φέρουν δραστικές ομάδες, πάνω στις οποίες η πεπτιδική αλυσίδα να μπορεί να προσκολληθεί εύκολα με σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού και στο τέλος της σύνθεσης να μπορεί να αποκοπεί εξίσου εύκολα.
- ii) Πρέπει να έχει αρκετά σημεία πρόσδεσης έτσι ώστε να λαμβάνονται ικανοποιητικές αποδόσεις και να ελαχιστοποιούνται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πεπτιδίων που είναι προσκολλημένα σε αυτά.
- iii) Πρέπει να είναι αδιάλυτο στους διαλύτες και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στην SPPS καθώς και να μην αντιδρά με αυτά.
- iv) Να διογκώνεται με τους διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην SPPS και να επιτρέπει την εύκολη διείδυση των αντιδραστηρίων στα σωματίδια καθώς και την εύκολη απομάκρυνση της περίσσειας αυτών και των παραπροϊόντων της αντίδρασης με απλή έκπλυση και διήθηση.

Παρακάτω αναφέρονται συνοπτικά τα κυριότερα πολυμερικά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται στην πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση:

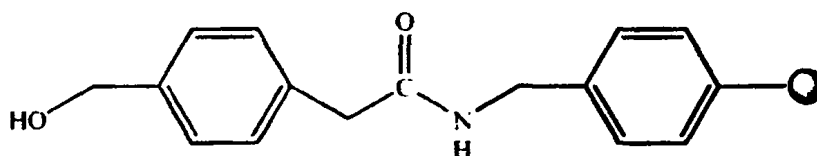
◆ Ρητίνη Merrifield



Η ρητίνη Merrifield, το χλωρομεθυλιωμένο συμπολυμερές στυρολίου-διβινυλοβενζολίου, είναι το πιο συνηθισμένο πολυμερικό υπόστρωμα που χρησιμοποιείται στην πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση κατά την Boc-μεθοδολογία. Η σχάση του εστερικού δεσμού που προκύπτει ανάμεσα στο πεπτίδιο και το πολυμερικό υπόστρωμα επιτυγχάνεται με την κατεργασία της πεπτιδορητίνης με ισχυρά οξέα (συνήθως υγρό υδροφθόριο ή TFMSA), οπότε το πεπτίδιο λαμβάνεται με ελεύθερο το C-τελικό καρβοξύλιο. Η ρητίνη Merrifield χρησιμοποιείται μέχρι σήμερα με πολύ καλά αποτελέσματα στη σύνθεση

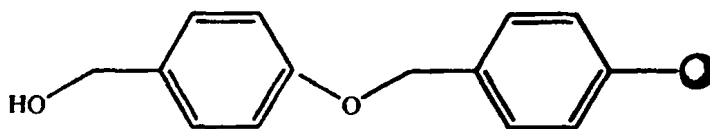
πεπτιδίων μικρού ή μεσαίου μοριακού βάρους ακολουθώντας την Boc-στρατηγική. Αυτή η περιορισμένη χρήση της οφείλεται στη σχετικά μικρή σταθερότητα του εστερικού δεσμού του πεπτιδίου με τη ρητίνη κατά την επαναλαμβανόμενη επεξεργασία με τριφθοροξικό οξύ για την αποκοπή της Boc-ομάδας καθώς και στη δυσκολία στην πρόσδεση του C-τελικού αμινοξέος στη ρητίνη.

◆ Pam ρητίνη



Για τη σύνθεση μεγαλύτερου μεγέθους πεπτιδίων προτιμάται η Pam ρητίνη (4-υδροξυ-μεθυλ-φαινυλ-ακεταμιδο-μεθυλο ρητίνη) [50]. Η φαινυλ-ακεταμιδομεθυλομάδα της Pam ρητίνης σταθεροποιεί τον εστερικό δεσμό ~ 100 φορές περισσότερο από τη ρητίνη Merrifield. Αυτό οφείλεται στην ηλεκτρονιοελκτική δράση της ακεταμιδομάδας που βρίσκεται στην πάρα θέση του βενζολικού δακτυλίου στο οποίο προσδέεται το πεπτίδιο, με συνέπεια μικρή σταθεροποίηση του προκύπτοντος κατιόντος μετά την αποκοπή. Με τον τρόπο αυτό ελαχιστοποιούνται οι απώλειες κατά την επαναλαμβανόμενη επεξεργασία με TFA. Η ρητίνη αυτή είναι συμβατή με την Boc-στρατηγική. Το πεπτίδιο αποκόπτεται από τη ρητίνη με ισχυρά οξέα, συνήθως HF, και στο τέλος παραλαμβάνεται με ελεύθερο το C-τελικό καρβοξύλιο.

◆ Wang ρητίνη

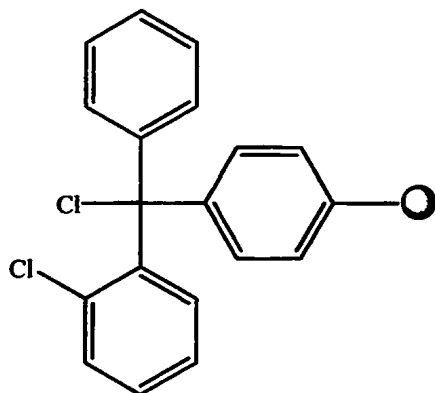


Στην περίπτωση σύνθεσης πεπτιδίων με την Fmoc-στρατηγική, η Wang ρητίνη (παρα-βενζυλοξυ-βενζυλική αλκοολική ρητίνη) χρησιμοποιείται ευρέως για πεπτίδια με ελεύθερο το C-τελικό καρβοξύλιο [51]. Το p-αλκοξυ-υποκατάστατο του τμήματος της βενζυλικής αλκοόλης αυξάνει την ευαισθησία στα οξέα του εστερικού δεσμού μεταξύ πεπτιδίου και



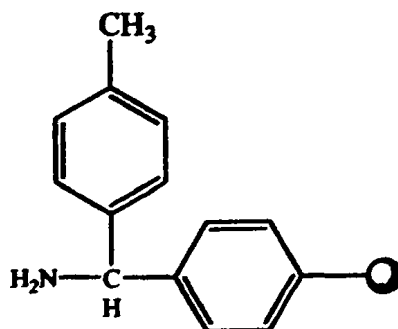
ρητίνης και έτσι ο δεσμός της πρόσδεσης με τη ρητίνη μπορεί να διασπαστεί με TFA. Η απομάκρυνση του πεπτιδίου από τη ρητίνη επιτυγχάνεται ύστερα από κατεργασία της πεπτιδορητίνης με 95% TFA.

◆ 2-Chlorotrityl chloride ρητίνη



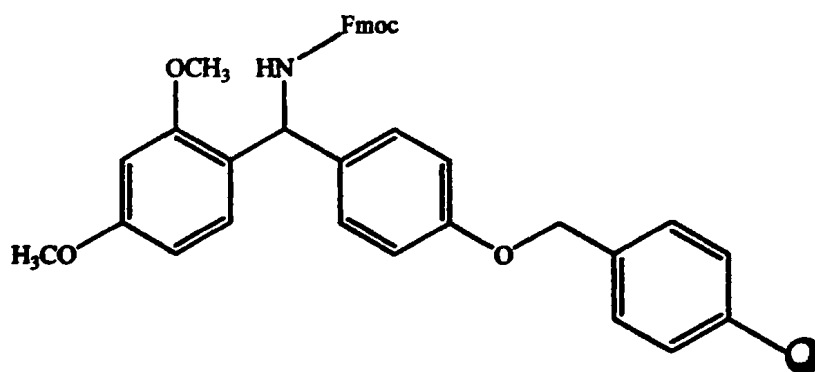
Πρόκειται για μία ρητίνη πολύ ευαίσθητη σε οξέα, κατάλληλη για τη σύνθεση πεπτιδίων αλλά και προστατευμένων πεπτιδικών τμημάτων ακολουθώντας την Fmoc-μεθοδολογία [52]. Η πρόσδεση του πρώτου αμινοξέος λαμβάνει χώρα χωρίς ρακεμοποίηση εξ' αιτίας στερικών παρεμποδίσεων, αναδεικνύοντας αυτή τη ρητίνη κατάλληλη για την πρόσδεση ευαίσθητων στη ρακεμοποίηση αμινοξέων όπως Cys, His [53, 54]. Η ρητίνη χρησιμοποιείται και για την παρασκευή πεπτιδίων που σε μία ή και στις δύο θέσεις του C-τελικού άκρου φέρουν Pro. Με αυτόν τον τρόπο αποφεύγεται ο σχηματισμός δικετοπιπεραζίνης λόγω της στερεοχημικής παρεμπόδισης που επάγουν οι βενζολικοί δακτύλιοι της τριτυλομάδας. Η απομάκρυνση του πεπτιδίου από τη ρητίνη υπό τη μορφή ελεύθερου καρβοξυλικού οξέος γίνεται κάτω από πολύ ήπιες συνθήκες, κατά την κατεργασία με AcOH/TFE/DCM ή 0,5%TFA ή HFIP. Αυτό οφείλεται στη μεγάλη σταθερότητα των τριτυλοκατιόντων που προκύπτουν από τη σχάση, τα οποία είναι πολύ ασθενή ηλεκτρονιόφιλα αντιδραστήρια και έτσι δεν συμμετέχουν σε ανεπιθύμητες αντιδράσεις. Αξίζει να σημειωθεί ότι απαιτείται προσεκτική φύλαξη, χρήση άνυδρων διαλυτών και συσκευών απαλλαγμένων από υγρασία.

◆ MBHA ρητίνη



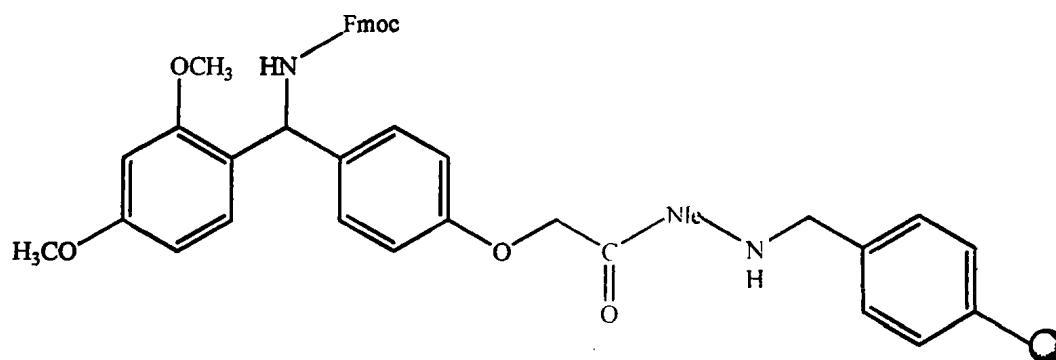
Για τη σύνθεση πεπτιδίων με C-τελικό άκρο σε αμιδική μορφή (-CONH₂) συμβατή τόσο με την Boc- όσο και με την Fmoc-στρατηγική είναι η MBHA ρητίνη [55]. Απομάκρυνση των αμιδίων από το πολυμερικό υπόστρωμα λαμβάνει χώρα κατά την κατεργασία της πεπτιδορητίνης με HF ή TFMSA.

◆ Rink amide ρητίνη



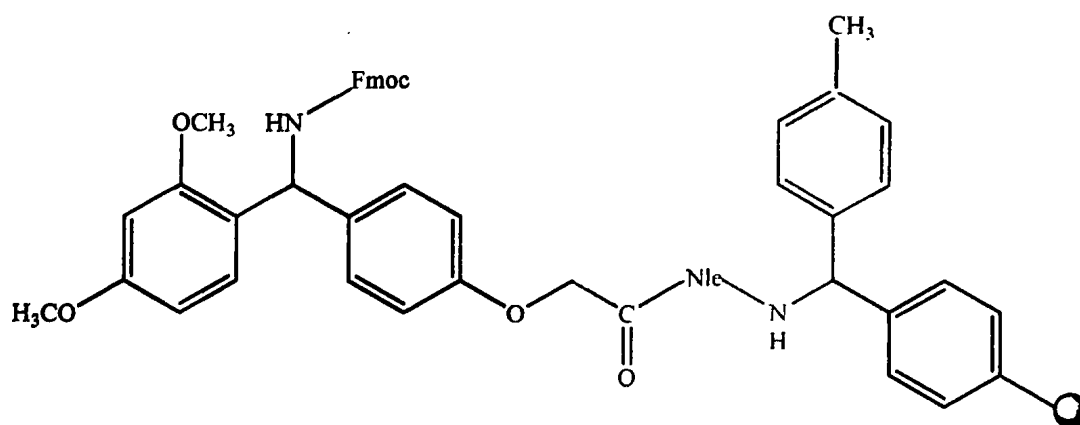
Η Rink Amide είναι μια ευαίσθητη στα οξέα ρητίνη, λόγω της παρουσίας του βενζυλαιθερικού δεσμού, που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση πεπτιδίων στην αμιδική μορφή και είναι συμβατή με την Fmoc-στρατηγική. Η απουσία οποιασδήποτε αμιδικής ομάδας την καθιστά περισσότερο συμβατή κυρίως με ισχυρά αναγωγικά αντιδραστήρια, σε σχέση με τις άλλες Rink Amide ρητίνες. Ωστόσο, το βασικό της μειονέκτημα είναι η διάσπαση του linker κατά τη χρήση υψηλής συγκέντρωσης TFA, γεγονός που οδηγεί στη λήψη παραπροϊόντων [56].

◆ Rink amide AM ρητίνη



Η ρητίνη αυτή αποτελεί παραλλαγή της Rink Amide φέροντας επιπλέον μια αμινομεθυλομάδα, μια νορλευκίνη και μια ακετυλομάδα. Η τροποποίηση αυτή προσφέρει σταθερότητα στο linker έναντι του TFA και άρα καθιστά τη ρητίνη συμβατή με τη χρήση 95% TFA για την αποκοπή του πεπτιδίου.

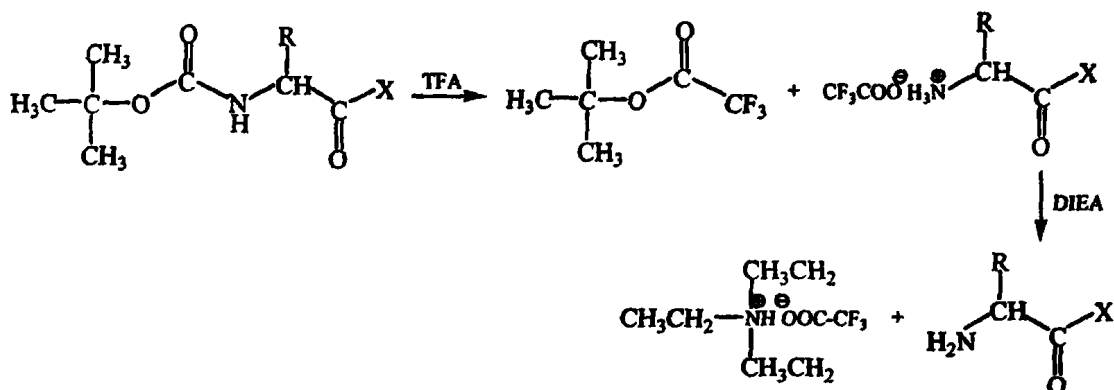
◆ Rink amide MBHA ρητίνη



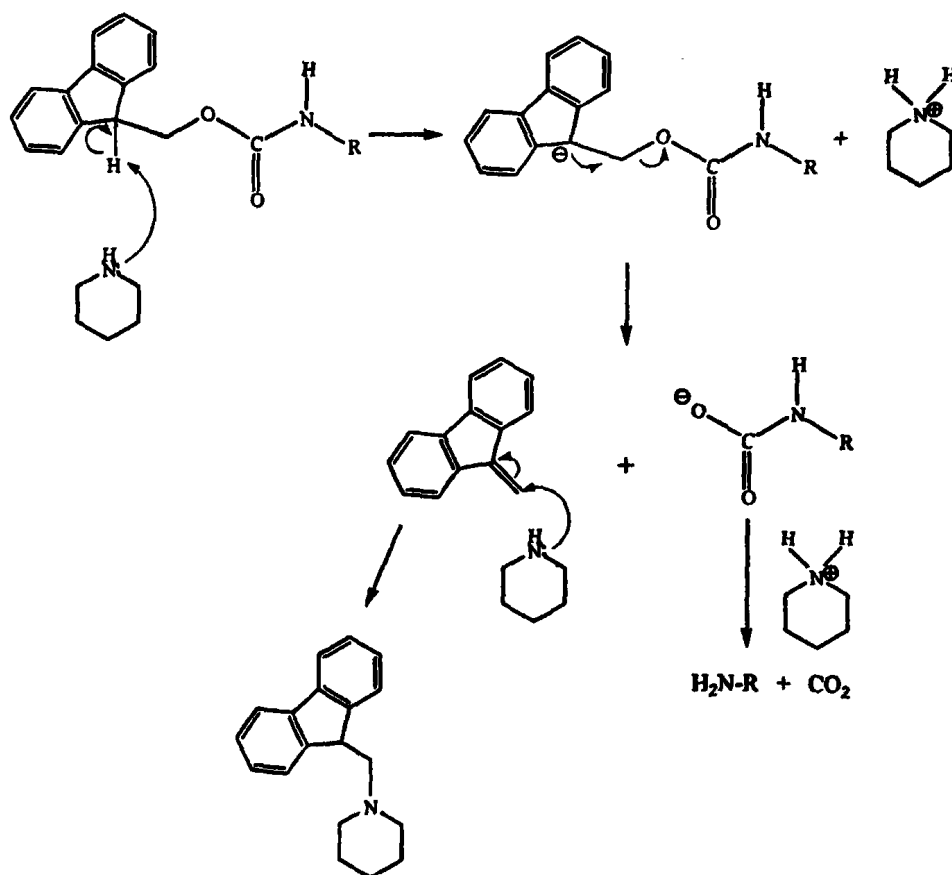
Όπως και η Rink Amide AM, η ρητίνη αυτή προσφέρει σταθερότητα έναντι στα οξέα και είναι συμβατή με την χρήση υψηλών συγκεντρώσεων TFA (95%).

Προστασία και αποπροστασία N^α-αμινομάδας

Για την παροδική προστασία της α-αμινομάδας των αμινοξέων στην πεπτιδική σύνθεση στερεής φάσης χρησιμοποιούνται συνήθως η tert-βουτυλοξυκαρβονυλομάδα (Boc-ομάδα) [57] και η 9-φλουορενυλομεθυλοξυκαρβονυλομάδα (Fmoc-ομάδα) [58].



Σχήμα 5. Αντίδραση απομάκρυνσης Boc-προστατευτικής ομάδας



Σχήμα 6. Αντίδραση απομάκρυνσης Fmoc-προστατευτικής ομάδας

Η Boc-ομάδα είναι ευαίσθητη στα οξέα και η απομάκρυνσή της γίνεται με τριφθοροξικό οξύ (TFA) σε διχλωρομεθάνιο (DCM) (40% v/v).

Με αυτή την κατεργασία, η α-αμινομάδα λαμβάνεται ως άλας του τριφθοροξικού οξέος το οποίο εξουδετερώνεται με διάλυμα διϊσοπροπυλαιθυλαμίνης (DIEA) σε διχλωρομεθάνιο (DCM) (7-10% v/v) (σχήμα 5)

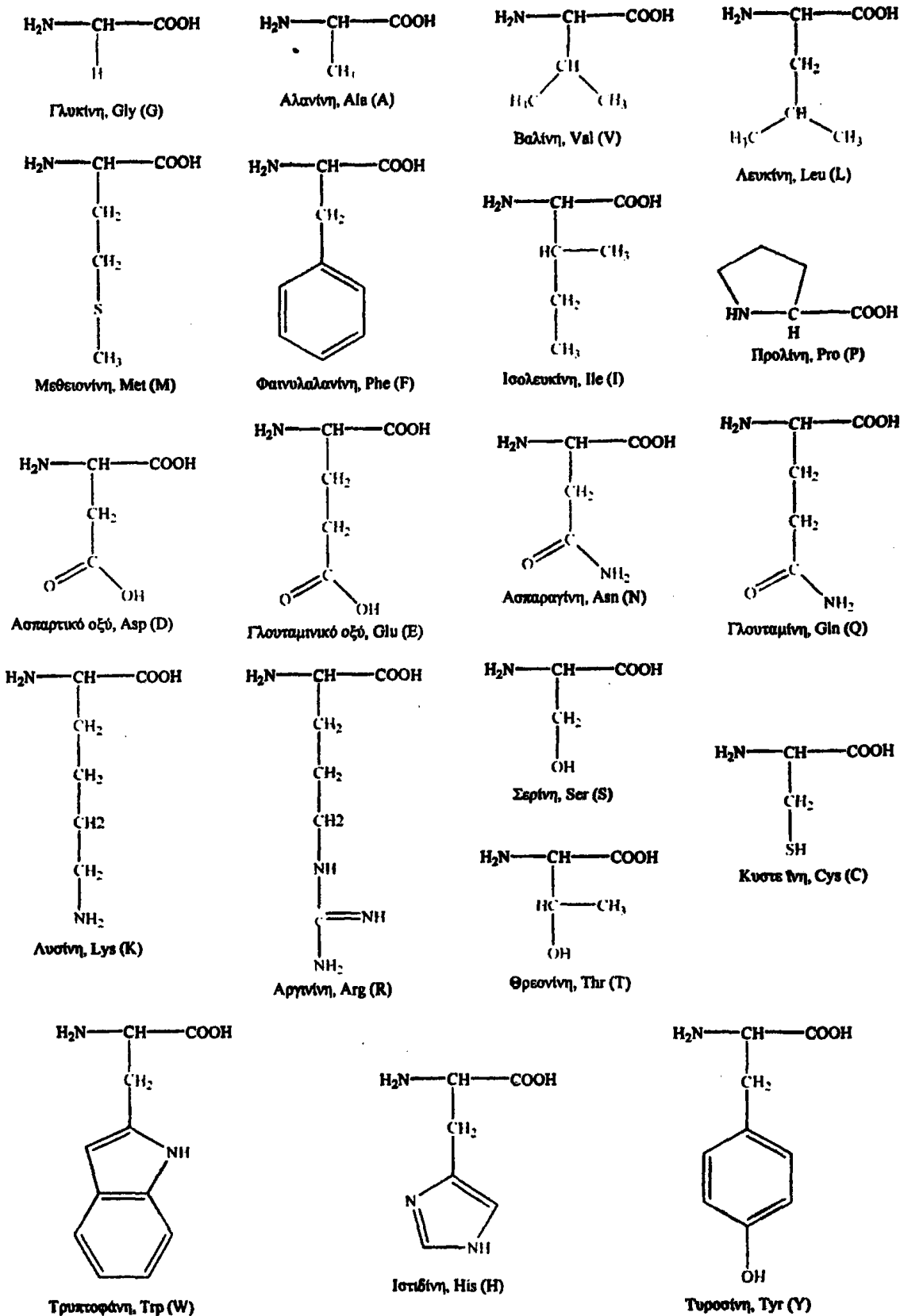
Η Fmoc-ομάδα είναι ευαίσθητη σε ασθενείς βάσεις και η απομάκρυνσή της επιτυγχάνεται με διαλύματα δευτεροταγών αμινών, όπως πιπεριδίνη σε διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) (20% v/v) (σχήμα 6).

Προστασία των παράπλευρων δραστικών ομάδων των αμινοξέων

Η προστασία των δραστικών παράπλευρων ομάδων των αμινοξέων εξαρτάται από τη φύση των ομάδων αυτών καθώς και από τη στρατηγική σύνθεσης που ακολουθείται. 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 από το στερεό πολυμερικό υπόστρωμα ή/και εκλεκτικά όταν αυτό απαιτείται, όπως για παράδειγμα κατά τη σύνθεση διακλαδισμένων πεπτιδικών μορίων.

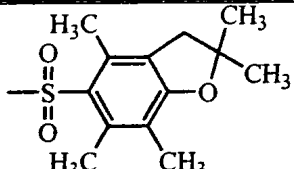
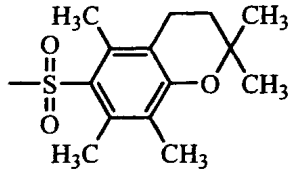
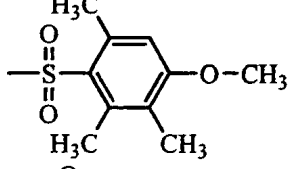
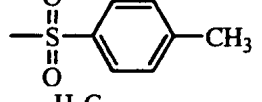
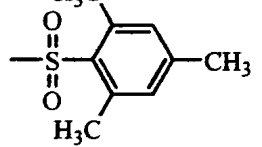
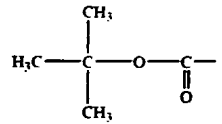
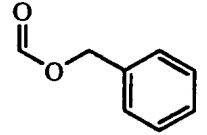
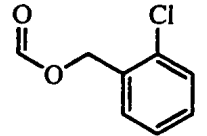
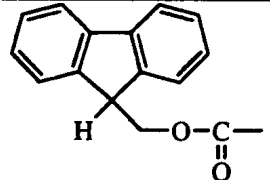
Από τα 20 φυσικά αμινοξέα, οι συντακτικοί τύποι των οποίων φαίνονται στο σχήμα 7, τα αμινοξέα γλυκίνη, αλανίνη, βαλίνη, λευκίνη, ισολευκίνη, φαινυλαλανίνη, προλίνη και μεθειονίνη εισάγονται στην πεπτιδική αλυσίδα χωρίς κάποια προστασία της παράπλευρης αλυσίδας τους διότι δεν φέρουν σε αυτήν καμία δραστική ομάδα που θα μπορούσε να δημιουργήσει προβλήματα στην πεπτιδική σύνθεση. Αντίθετα, τα υπόλοιπα 12 αμινοξέα φέρουν δραστικές ομάδες στην παράπλευρη αλυσίδα τους επομένως η προστασία αυτών κρίνεται επιτακτική για την αποφυγή ανεπιθύμητων παραπροϊόντων.

Οι συνηθέστερες προστατευτικές ομάδες των παράπλευρων δραστικών αλυσίδων των αμινοξέων που χρησιμοποιούνται στη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση φαίνονται στον πίνακα 1, ενώ στη συνέχεια αναπτύσσονται τα κριτήρια επιλογής αυτών των προστατευτικών ομάδων για κάθε αμινοξύ.

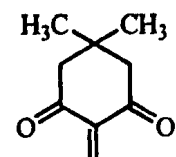
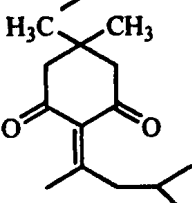
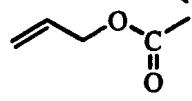
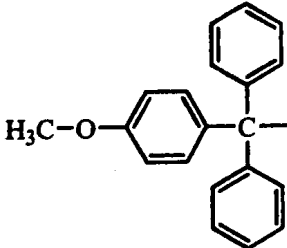
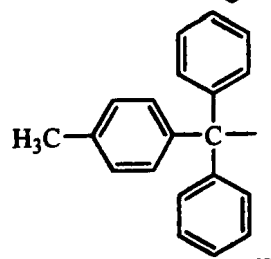


Σχήμα 7. Οι συντακτικοί τύποι των 20 φυσικών αμινοξέων

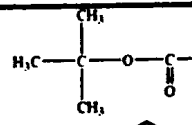
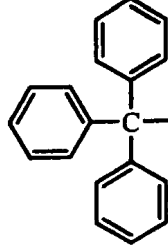
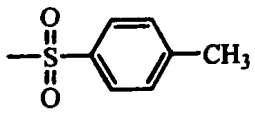
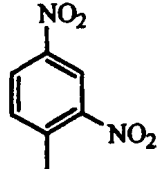
Πίνακας 1. Οι συνηθέστερες προστατευτικές ομάδες που χρησιμοποιούνται για την προστασία των παράπλευρων ομάδων των αμινοξέων στη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση.

Αμινοξύ	Μεθοδολογία	Συνδυασμός	Χημικό Όνομα
Arg		2,2,4,6,7- πενταμεθυλο- διϋδροβενζοφουρανο- 5-σουλφονυλομάδα	Pbf [59] 
	Fmoc	2,2,5,7,8- πενταμεθυλο- χρωμανο-6- σουλφονυλομάδα	Pmc [60] 
		4-μεθοξυ-2,3,6- τριμεθυλοφαινυλο- σουλφονυλομάδα	Mtr [61] 
		π-τολουολο- σουλφονυλομάδα	Tos [62, 63] 
	Boc	2,4,6- τριμεθυλοφαινυλο- σουλφονυλομάδα	Mts [64] 
Lys	Fmoc	t-βουτοξυ- καρβονυλομάδα	Boc 
	Boc	βενζυλοξυ- καρβονυλομάδα	Z [65] 
		2-χλωρο-βενζυλοξυ- καρβονυλομάδα	2-Cl-Z [65] 
	9-φλουορενυλο- μεθυλοξυ- καρβονυλομάδα	Fmoc 	

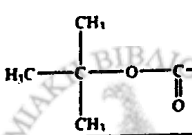
Lys

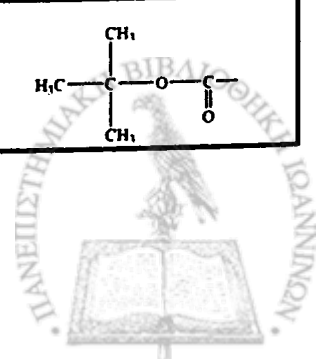
	1-(4,4-διμεθυλο-2,6-διοξο-κυκλοεξ-1-υλιδεν)αιθυλομάδα	Dde [66]	
Fmoc/Boc (εκλεκτική αποπροστασία)	1-(4,4-διμεθυλο-2,6-διοξο-κυκλοεξ-1-υλιδεν)-3-μεθυλβουτυλομάδα	ivDde [67]	
	Αλλυλοξυκαρβονυλομάδα	Alloc	
	4-μεθοξυτριτυλομάδα	Mmt	
Fmoc (εκλεκτική αποπροστασία)	4-μεθυλοτριτυλομάδα	Mtt	

His

	t-βουτοξυκαρβονυλομάδα	Boc	
Fmoc	Τριτυλομάδα (τριφαινυλομεθυλομάδα)	Trt [68]	
Boc	π-τολουολοσουλφονυλομάδα	Tos [69]	
	2,4-δινιτροφαινυλομάδα	Dnp [70]	

Trp

Fmoc	t-βουτοξυκαρβονυλομάδα	Boc	
------	------------------------	-----	---



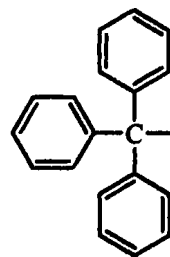
Asn/Gln	Fmoc	Τριτυλομάδα (τριφαινυλο- μεθυλομάδα)	Trt [71]	
	Boc	Ξανθυλομάδα	Xan (Gln)	
Asp/Glu	Fmoc	t-βουτοξυομάδα	OtBu [72]	
	Boc	βενζυλοξυομάδα	OBzl	
		κυκλοεξυλοξυομάδα	OcHex	
Fmoc/Boc (εκλεκτική αποπροστασία)	αλλυλομάδα	OAlI [73]		
Ser/Thr Tyr	Fmoc	t-βουτυλομάδα	tBu [74]	
	Boc	βενζυλομάδα	Bzl [75- 77]	
	Fmoc/Boc (εκλεκτική αποπροστασία)	Τριτυλομάδα (τριφαινυλο- μεθυλομάδα)	Trt [78]	

Cys

Fmoc
(ελεύθερη -
SH ή
κυκλοποίηση
σε SPPS)

Τριτυλομάδα
(τριφαινυλο-
μεθυλομάδα)

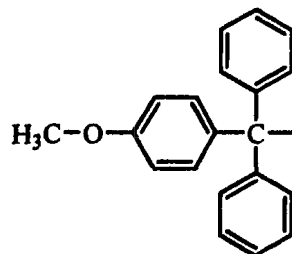
Trt [79]



Fmoc
(τροποποίηση
στην
παράπλευρη
αλυσίδα της
κυστεΐνης)

4-μεθοξυ-
τριτυλομάδα

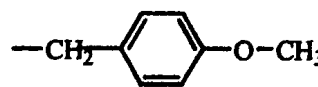
Mmt [80]



Boc
(ελεύθερη -
SH)

p-μεθοξυβενζυλομάδα

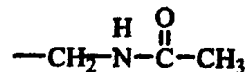
pMeOBzl



Fmoc/Boc
(κυκλοποίηση
σε SPPS ή
υγρή φάση)

ακεταμιδομεθυλομάδα

Acem [79]



➤ Προστασία της γουανιδινομάδας της αργινίνης

Η γουανιδινομάδα της παράπλευρης αλυσίδας της αργινίνης είναι ισχυρά πυρηνόφιλη και ως εκ τούτου εύκολα ακυλιώνεται κατά την πεπτιδική σύνθεση, αν δεν προστατευθεί. Από τα τρία άτομα αζώτου, αυτό που συνήθως προστατεύεται είναι το ω-άζωτο με τη χρήση νίτρο-, ουρεθαν (ακυλ-), αρυλοσουλφονυλ- ή τριτυλ- ομάδων. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες προστατευτικές ομάδες ανήκουν στην αρυλοσουλφονυλο κατηγορία: Tos [62, 63], Mts [64] κατά την Boc στρατηγική, Mtr [61], Pmc [60], και Pbf [59] κατά την Fmoc στρατηγική.

Η πιο διαδεδομένη από όλες είναι η Pbf ομάδα η οποία πλεονεκτεί έναντι της ανάλογης Pmc στο ότι απομακρύνεται 1,2-1,4 φορές ταχύτερα κατά την αποκοπή με TFA και, κυρίως, ελαχιστοποιεί την σουλφονίωση της τρυπτοφάνης, ειδικά όταν αυτή χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με Tpr(Boc) παρουσία σιλανοπαγίδων.

➤ -Προστασία της N^ε-αμινομάδας της λυσίνης

Η ε-αμινομάδα της λυσίνης παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς παρέχει τη δυνατότητα μόνιμης ή/και ημι-μόνιμης (εκλεκτικής ή ορθογωνικής) προστασίας. Η δυνατότητα αυτή είναι χρήσιμη για τη σύνθεση διακλαδισμένων ή τροποποιημένων πεπτιδίων.

Εκτός από τις κλασσικές προστατευτικές ομάδες 2-Cl-Z, Z [65] και Fmoc για την Boc στρατηγική ή Boc για την Fmoc στρατηγική, οι ομάδες που έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια και επιτρέπουν εκλεκτική προστασία της ε-αμινομάδας της λυσίνης είναι οι Dde [66], ivDde [67], Mtt [81], Mmt [82] και Alloc [73].

Η ομάδα Dde κατά την κατεργασία με πιπεριδίνη για την αποκοπή της Fmoc ομάδας μεταναστεύει στις αμινομάδες που ελευθερώνονται καθώς επίσης παρουσιάζεται μερική απώλειά της κατά τη σύνθεση μεγάλων πεπτιδίων.

Η πιο ογκώδης ομάδα ivDde αποτελεί παραλλαγή της Dde που αποτρέπει την εμφάνιση των παραπάνω προβλημάτων. Είναι σταθερή στις συνθήκες αποκοπής των Fmoc(20% πιπεριδίνη), Boc(TFA ή 50% TFA σε DCM) καθώς και DBU (2%) ομάδων, ενώ απομακρύνεται εκλεκτικά με κατεργασία με 2% υδραζίνη σε DMF. Η απομάκρυνσή της θα πρέπει να γίνεται μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του πεπτιδικού σκελετού και διατηρώντας την α-αμινομάδα Boc προστατευμένη καθώς η κατεργασία με υδραζίνη ενδέχεται να προκαλέσει ανεπιθύμητη απομάκρυνση και της Fmoc ομάδας. Ωστόσο,

πλήρης ορθογωνικότητα μεταξύ Fmoc/ivDde επιτυγχάνεται με απομάκρυνση της ivDde με μίγμα υδροξυλαμίνης/υδροχλωρίου/ιμιδαζολίου (1:3:1) σε NMP.

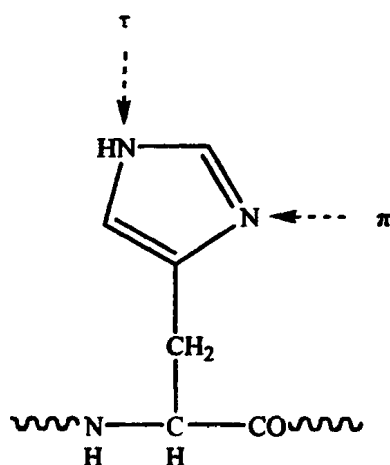
Ανάλογη ορθογωνικότητα παρέχεται και με τη χρήση της Mtt [81] ομάδας, η οποία απομακρύνεται εκλεκτικά κατόπιν κατεργασίας με 1% TFA σε DCM ή με μίγμα DCM/HFIP/TFE/TES (6,5:2:1:0,5), ενώ για ακόμα μεγαλύτερη ευαισθησία σε οξέα χρήσιμη είναι και η Mmt [82] ομάδα.

Τέλος, εκλεκτικά απομακρύνεται και η Alloc προστατευτική ομάδα με ήπια καταλυτική μεταφορά αλλυλίου.

► Προστασία του ιμιδαζολικού δακτυλίου της ιστιδίνης

Τα δυο κύρια προβλήματα που παρουσιάζονται κατά την εισαγωγή της ιστιδίνης σε μια πεπτιδική αλληλουχία είναι η ρακεμοποίηση και η ακυλίωση.

Η ρακεμοποίηση είναι το πιο σοβαρό πρόβλημα κατά τη σύζευξη της ιστιδίνης. Οφείλεται στη δραστηριότητα του ιμιδαζολικού πυρήνα και μπορεί να αποφευχθεί με προστασία του π -αζώτου (σχήμα 8). Ωστόσο, οι πιο χρησιμοποιούμενες ομάδες προστατεύουν το τ -άζωτο και παρόλα αυτά καταστéλλουν την εναντιομερίωση λόγω ηλεκτρονιακών επιδράσεων που μειώνουν τη βασικότητα του π -αζώτου (στερικές επιδράσεις ίσως επίσης παίζουν κάποιο ρόλο).



Σχήμα 8. Τα άτομα αζώτου του ιμιδαζολικού πυρήνα της ιστιδίνης

Ακυλίωση μη προστατευμένης ιστιδίνης κατά τη διάρκεια διαδοχικών κύκλων σύζευξης παρατηρείται όταν χρησιμοποιείται παροδική προστασία αυτής (Boc-His(Boc)-OH)



ή όταν η προστατευτική ομάδα δεν είναι πλήρως σταθερή στις συνθήκες σύζευξης ή αποπροστασίας (Boc-His(Tos)). Παρά τα προβλήματα που σχετίζονται με τη χρήση της τοσυλομάδας, κυριότερα εκ των οποίων είναι η εύκολη απομάκρυνση αυτής με την επίδραση του HOBt κατά τη σύζευξη και η περιορισμένη σταθερότητα του παραγώγου Boc-His(Tos)-OH [69] σε θερμοκρασία δωματίου, ωστόσο, το παράγωγο αυτό ή το σταθερό άλας του με δικυκλοεξυλαμίνη, παραμένει το περισσότερο χρησιμοποιούμενο κατά την Boc/Bzl μεθοδολογία. Εναλλακτικά, το παράγωγο Boc-His(Dnp)-OH [70] μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση των παραπάνω προβλημάτων, αν και δε στερείται ούτε αυτό μειονεκτημάτων. Ως η καλύτερη προστασία για τον ιμιδαζολικό δακτύλιο της ιστιδίνης στην Boc/Bzl μεθοδολογία κρίνεται η βενζυλοξυμεθυλομάδα (Bom) η οποία, προστατεύοντας το π-άζωτο, μειώνει στο ελάχιστο τον κίνδυνο ρακεμοποίησης αλλά, ωστόσο, η χρήση της περιορίζεται λόγω του κόστους σύνθεσης του παραγώγου Boc-His(Bom)-OH

Στην Fmoc/tBu στρατηγική η ιστιδίνη εισάγεται ως Fmoc-His(Boc)-OH ή ως Fmoc-His(Trt)-OH [68]. Η Trt ομάδα είναι πιο αποτελεσματική από τη λιγότερο ογκώδη Boc ομάδα στην καταστολή της ρακεμοποίησης, εκτός από τις περιπτώσεις στις οποίες η σύζευξη είναι αργή λόγω στερικών παρεμποδίσεων ή συσσωμάτωσης. Επιπλέον, είναι σταθερή στις συνθήκες σύζευξης και αποπροστασίας ενώ απομακρύνεται εύκολα με 95% TFA για 1 ώρα στους 20° C.

► Προστασία του ινδολικού δακτυλίου της τρυπτοφάνης

Αν και ο ινδολικός πυρήνας της Trp είναι αρκετά αδρανής, οι παράπλευρες αντιδράσεις που ενδέχεται να λάβουν χώρα είναι η οξείδωση και η αλκυλίωση αυτού από καρβοκατιόντα κατά την αποκοπή από τη ρητίνη. Η χρήση της Fmoc-Trp(Boc)-OH είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στην αντιμετώπιση των παραπάνω προβλημάτων.

Κατά την αποπροστασία με TFA, απομακρύνεται το τμήμα t-βουτυλ της Boc ομάδας αφήνοντας το ινδόλιο προστατευμένο με μια N-καρβοξυ ομάδα, αποτρέποντας έτσι πιθανή αλκυλίωση, επαναπρόσδεση του πεπτιδίου στη ρητίνη, αν η Trp βρίσκεται στο C-άκρο, ή σουλφονίωση. Η τρυπτοφάνη αναγεννάται κατά τη λυοφιλοποίηση καθώς αυτό το ενδιάμεσο καρβαμικό οξύ αποκαρβοξυλιώνεται εύκολα σε όξινα υδατικά μέσα.

Όταν ακολουθείται η Boc/Bzl στρατηγική σύνθεσης, η τρυπτοφάνη χρησιμοποιείται γενικά χωρίς προστασία του ινδολικού δακτυλίου, ενώ ενδείκνυται η χρήση της φορμυλομάδας (For) όταν η προστασία του ινδολίου κρίνεται επιτακτική.

➤ **Προστασία της καρβοξαμιδικής ομάδας της ασπαργίνης/γλουταμίνης**

Τα δύο αυτά αμινοξέα μπορούν να ενσωματωθούν χωρίς προστασία της παράπλευρης ομάδας τους. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι υφίστανται μερικές παράπλευρες αντιδράσεις με πιο σημαντική από αυτές το σχηματισμό νιτριλίου μέσω αφυδάτωσης της καρβοξαμιδικής παράπλευρης αλυσίδας κατά την ακυλίωση. Η αντίδραση αυτή συμβαίνει με ποικιλία αντιδραστηρίων σύζευξης αλλά ευτυχώς μπορεί να ελαχιστοποιηθεί με την προσθήκη του HOBt ή με ακυλίωση μέσω ενεργών εστέρων.

Η χρήση προστατευτικής ομάδας μπορεί επίσης να ελαχιστοποιήσει την αφυδάτωση. Οι ομάδες που χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό είναι κυρίως η Trt [71], κατά την Fmoc μεθοδολογία, και η Xan για την γλουταμίνη, κατά την Boc μεθοδολογία. Τα παράγωγα Fmoc-Asn(Trt)-OH και Fmoc-Gln(Trt)-OH είναι αρκετά διαλυτά σε DMF, ενώ η τριτυλομάδα όταν ελευθερώνεται με TFA δεν αλκυλιώνει την Trp ή άλλες ευαίσθητες παράπλευρες αλυσίδες. Όταν πρόκειται για Asn(Trt) στο N-τελικό άκρο του πεπτιδίου, απαιτείται παρατεταμένος χρόνος αποκοπής με TFA (4 ώρες).

➤ **Προστασία της καρβοξυλικής ομάδας του ασπαρτικού/γλουταμινικού οξέος**

Τα αμινοξέα ασπαρτικό και γλουταμινικό οξύ εισάγονται στην πεπτιδική αλυσίδα με προστατευμένη την καρβοξυλική ομάδα της παράπλευρης αλυσίδας τους προς αποφυγή ανεπιθύμητων αντιδράσεων που θα οδηγούσαν σε λήψη διακλαδισμένων πεπτιδίων. Γενική μέθοδος προστασίας που ακολουθείται είναι η εστεροποίηση, η ακριβής φύση της οποίας προσδιορίζεται επιπλέον και από την ανάγκη περιορισμού της κυκλοποίησης προς σχηματισμό ηλεκτριμιδίων.

Η χρήση της t-βουτοξυ (OtBu) [72] προστατευτικής ομάδας κατά την Fmoc στρατηγική κρίνεται αποτελεσματική για την αποφυγή της κυκλοποίησης. Στην Boc στρατηγική, καταλληλότερη κρίνεται η κυκλοεξυλομάδα (OcHex) για την προστασία του ασπαρτικού οξέος, ενώ για το γλουταμινικό οξύ γίνεται χρήση της OBzl ομάδας.

Επιπλέον, χρήσιμη αποδεικνύεται και η προστασία της καρβοξυλικής ομάδας ασπαρτικού και γλουταμινικού οξέος με την αλλυλομάδα (OAl) [73] διότι αυτή απομακρύνεται εκλεκτικά με καταλυτική μεταφορά αλλυλίου.



➤ **Προστασία της υδροξυλομάδας της σερίνης/θρεονίνης/τυροσίνης**

Η υδροξυλομάδα των αμινοξέων σερίνη, θρεονίνη και τυροσίνη είναι δυνατόν να υποστεί ακυλίωση από το ενεργοποιημένο εισερχόμενο αμινοξύ οπότε η προστασία αυτής κρίνεται απαραίτητη και συνήθως επιτυγχάνεται με μετατροπή αυτής σε έναν αιθέρα. Έτσι τα αμινοξέα αυτά εισάγονται στην πεπτιδική αλυσίδα ως t-βουτυλαιθέρες κατά την Fmoc μεθοδολογία [74] και ως βενζυλαιθέρες κατά την Boc [75-77]. Επιπλέον, η τριτυλομάδα [78] μπορεί να χρησιμοποιηθεί στα πλαίσια ορθογωνικής προστασίας διότι απομακρύνεται εκλεκτικά, υπό ελαφρά όξινες συνθήκες (1,1% TFA σε DCM).

➤ **Προστασία της θειολομάδας της κυστεΐνης**

Η σύνθεση πεπτιδίων που περιέχουν στην αλληλουχία τους κατάλοιπα κυστεΐνης είναι αρκετά πολύπλοκη και συχνά προβληματική. Το σημαντικότερο πρόβλημα προκύπτει από το γεγονός ότι η σουλφυδρυλομάδα υφίσταται πολύ εύκολα οξείδωση προς σχηματισμό δισουλφιδίου (διμερισμός). Επιπλέον, είναι μια αρκετά πυρηνόφιλη ομάδα που μπορεί εύκολα να ακυλωθεί κατά την πεπτιδική σύνθεση άρα θα πρέπει να χρησιμοποιείται προστατευμένη. Η επιλογή της προστατευτικής ομάδας καθορίζεται από τη στρατηγική σύνθεσης που θα ακολουθηθεί (Fmoc ή Boc) καθώς και από το αν η κυστεΐνη στο τελικό πεπτίδιο απαιτείται να φέρει ελεύθερη τη σουλφυδρυλομάδα της ή αυτή να συμμετέχει σε ενδομοριακούς ή διαμοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς. Επιπλέον, όσον αφορά στη δεύτερη περίπτωση, έχει σημασία αν ο δισουλφιδικός δεσμός θα σχηματιστεί στη στερεή φάση ή στην υγρή, μετά την αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη.

Όταν ακολουθείται η Fmoc/tBu στρατηγική, οι προστατευτικές ομάδες που χρησιμοποιούνται συχνότερα είναι οι Ttt και Mmt. Η Ttt ομάδα [79] απομακρύνεται κατά την τελική κατεργασία του πεπτιδίου με TFA οδηγώντας στη λήψη κυστεΐνης με ελεύθερη σουλφυδρυλομάδα ή κατά την κατεργασία της πεπτιδορητίνης με I_2 ή Tl^{3+} /TFA οδηγώντας στην κυκλοποίηση μέσω δισουλφιδικού δεσμού. Η Mmt ομάδα [80] είναι πολύ περισσότερο ευαίσθητη στα οξέα διότι απομακρύνεται εκλεκτικά με 1% TFA/DCM επιτρέποντας έτσι τη χρήση της στη σύνθεση πεπτιδίων που φέρουν διάφορες τροποποιήσεις στην περάπλευρη αλυσίδα καταλοίπων κυστεΐνης (π.χ. δημιουργία θειοαιθερικού δεσμού).

Κατά την Boc/Bzl μεθοδολογία πεπτιδικής σύνθεσης, όταν η κυστεΐνη απαιτείται να ληφθεί με ελεύθερη τη σουλφυδρυλομάδα της τότε εισάγεται στην πεπτιδική αλυσίδα ως Boc-Cys(pMeOBzl)-OH παράγωγο.



Τέλος, πολύ διαδεδομένη είναι η χρήση της Acπn ομάδας για την προστασία της παράπλευρης αλυσίδας της κύστεϊνης τόσο κατά την Fmoc [79] όσο και κατά την Boc στρατηγική. Η ομάδα αυτή είναι σταθερή στην επίδραση οξέων και απομακρύνεται με κατεργασία με I_2 ή Tl^{3+}/TFA προς σχηματισμό δισουλφιδικού δεσμού.

Αντιδραστήρια σύζευξης

Η περισσότερο χρησιμοποιούμενη μέθοδος για το σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού στη σύνθεση των πεπτιδίων είναι αυτή των αντιδραστηρίων σύζευξης, λόγω της απλότητας και της ταχύτητάς της, εφόσον ενεργοποίηση και σύζευξη λαμβάνουν χώρα ταυτόχρονα (in situ coupling reagents).

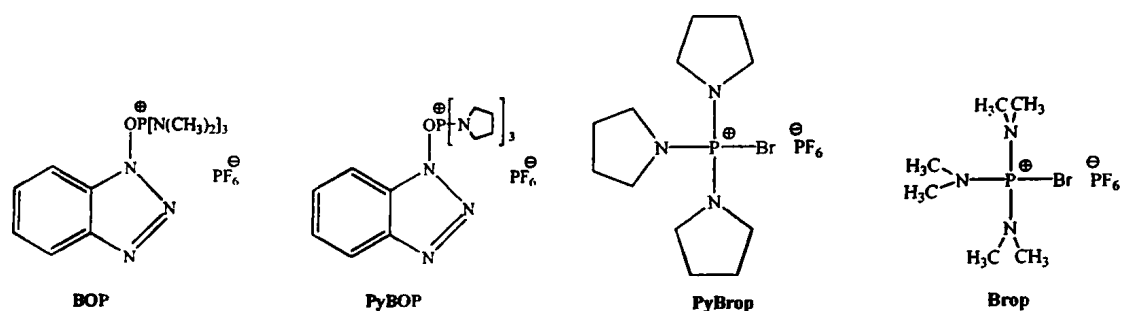
Το N,N-δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμίδιο (DCC) και το διϊσοπροπυλοκαρβοδιϊμίδιο (DIC) είναι τα δυο κλασικά αντιδραστήρια σύζευξης που χρησιμοποιούνται ευρύτατα μέχρι σήμερα. Πιθανή ρακεμοποίηση λόγω της μεγάλης ενεργοποίησης του δραστικού ενδιάμεσου παραγώγου (Ο-ακυλο-ισοουρία) καθώς και σχηματισμός της μη δραστικής N-ακυλοουρίας μέσω ενδομοριακής O→N μετάθεσης στην Ο-ακυλο-ισοουρία συγκαταλέγονται στα μειονεκτήματα της μεθόδου.

Η ρακεμοποίηση και ο σχηματισμός της N-ακυλοουρίας μπορούν να ελαττωθούν με την προσθήκη βοηθητικών πυρηνόφιλων, όπως το 1-υδροξυβενζοτρίαζόλιο (HOBt) [83]. Η προσβολή της πρόσθετης αυτής ουσίας επί του ενεργού ενδιάμεσου παραγώγου, οδηγεί στο σχηματισμό του Ο-ακυλο-1-υδροξυβενζοτρίαζολίου, το οποίο είναι ένα ισχυρό ακυλιωτικό μέσο.

Εκτός από τα καρβοδιϊμίδια, στην πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση χρησιμοποιούνται ευρύτατα τα τελευταία χρόνια φωσφονικά ή ουρονικά παράγωγα ως αντιδραστήρια σύζευξης.

Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα: **BOP** [Castro's reagent, βενζοτρίαζολ-1-υλ-οξυ-τρις-(διμεθυλαμινο)-φωσφονικό εξαφθοροφωσφορικό άλας] [84], **PyBOP** [βενζοτρίαζολ-1-υλ-οξυ-τρις-πυρολιδινο-φωσφονικό εξαφθοροφωσφορικό άλας [85]], **BroP** [βρωμο-τρις-(διμεθυλαμινο)-φωσφονικό εξαφθοροφωσφορικό άλας] [86] και **PyBroP** [βρωμο-τρις-πυρολιδινο-φωσφονικό εξαφθοροφωσφορικό άλας] (σχήμα 9).



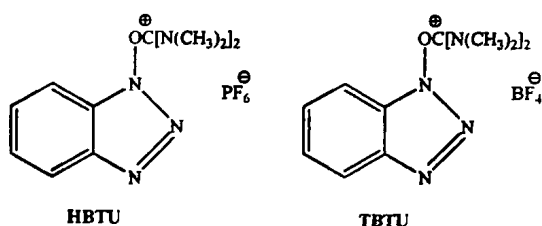


Σχήμα 9. Φωσφονικά παράγωγα που χρησιμοποιούνται ως αντιδραστήρια σύζευξης στην πεπτιδική σύνθεση

Το BOP, παρά τα πλεονεκτήματά του, όπως μικρό ποσοστό ρακεμοποίησης και σύντομος χρόνος σύζευξης, είναι πολύ τοξικό οπότε και αντικαταστάθηκε από το PyBOP.

Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν το ο-βενζοτριαζολυλο-τετραμεθυλο-ισουουρονικό εξαφθοροφωσφορικό άλας (HBTU) [87] και το ο-βενζοτριαζολυλο-τετραμεθυλο-ισουουρονικό τετραφθοροβορικό άλας (TBTU) [88] (σχήμα 10).

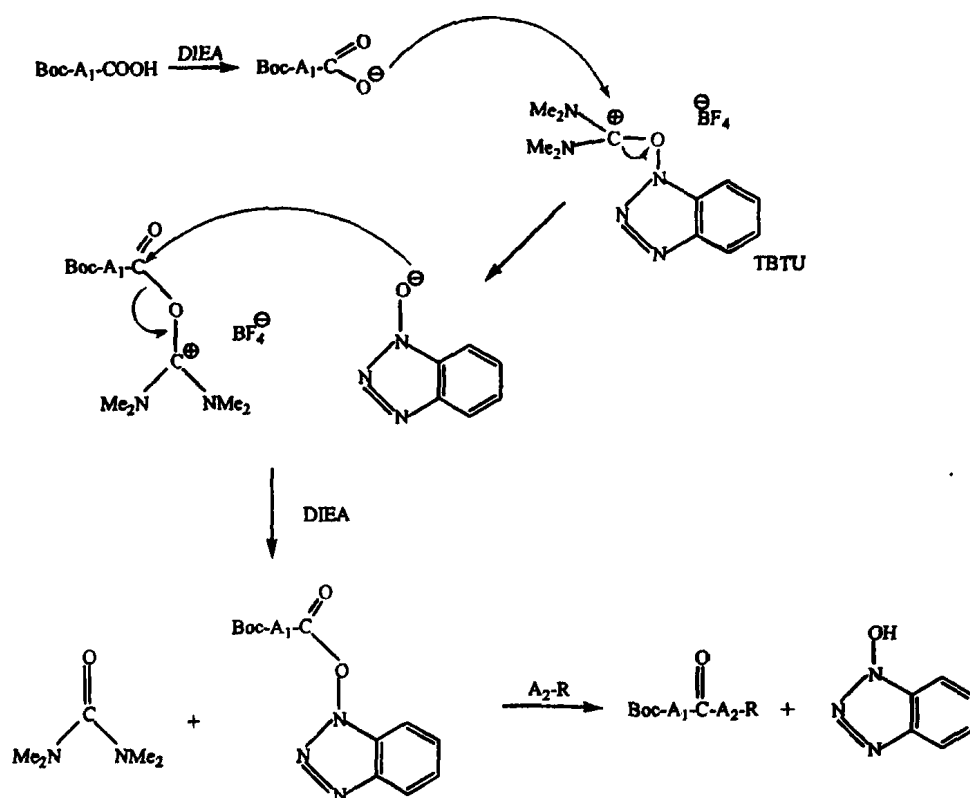
Πλεονεκτήματα αυτών των αντιδραστηρίων σύζευξης είναι το πολύ μικρό ποσοστό ρακεμοποίησης, ο μικρός χρόνος της αντίδρασης (~15min) και οι υψηλές αποδόσεις. Στο σχήμα 11 φαίνεται ένας προτεινόμενος μηχανισμός για το σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού με την χρήση των αντιδραστηρίων TBTU και HOBT.



Σχήμα 10. Ουρονικά παράγωγα που χρησιμοποιούνται ως αντιδραστήρια σύζευξης στην πεπτιδική σύνθεση

Αντίθετα με τα καρβοδιϊμίδια και τα φωσφονικά άλατα, τα ουρονικά παράγωγα αντιδρούν με την αμινομάδα στις συνθήκες που διεξάγεται συνήθως η πεπτιδική σύνθεση σχηματίζοντας τετραμεθυλογουανιδίνο παράγωγα. Μη αντιστρεπτή δέσμευση του αμινο-στατικού έχουμε όταν το αντιδραστήριο προστίθεται απευθείας στο μίγμα της αντίδρασης. Για να αποφευχθεί αυτό, η ενεργοποίηση του καρβοξυλίου με τα ουρονικά αντιδραστήρια

πρέπει να λαμβάνει χώρα πριν από την προσθήκη αυτού στο μίγμα της αντίδρασης για την πραγματοποίηση της σύζευξης.



Σχήμα 11. Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού με τη χρήση TBTU ως αντιδραστήριου σύζευξης.

Ανεπιθύμητες αντιδράσεις στην πεπτιδική σύνθεση

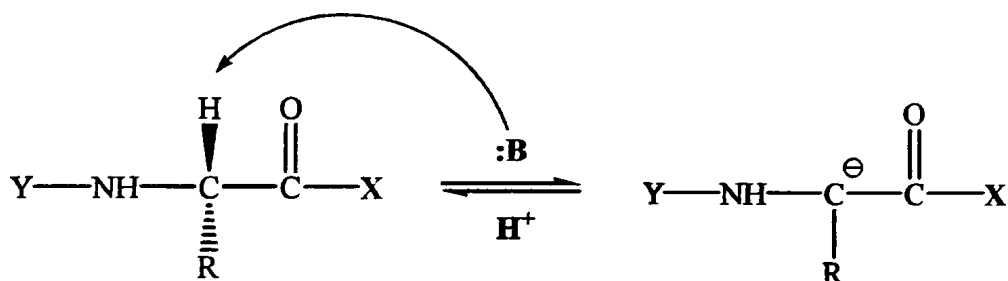
Ρακεμοποίηση

Εκτός από τη γλυκίνη, τα υπόλοιπα 19 αμινοξέα που αποτελούν συστατικά των πρωτεϊνών περιέχουν ένα χειρικό (οπτικώς ενεργό) κέντρο στο α -άτομο άνθρακα (ασύμμετρο άτομο). Η ισολευκίνη και η θρεονίνη περιέχουν ένα επιπλέον χειρικό κέντρο στην παράπλευρη αλυσίδα τους. Τα «πρωτεϊνικά» αμινοξέα απαντούν αποκλειστικά στην L-διαμόρφωση (L-εναντιομερή). Οι ιδιότητες των πρωτεϊνών και των πεπτιδίων εξαρτώνται σημαντικά 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 η ρακεμοποίηση επιβάλλεται να ελαχιστοποιείται κατά τη διάρκεια της πεπτιδικής σύνθεσης. Επιπλέον, ο διαχωρισμός μίγματος διαστερομερών είναι δύσκολος έως και αδύνατος.



Ουσιαστικά, για να συμβεί ρακεμοποίηση ενός αμινοξέος απαιτείται προηγουμένως απόσπαση του H^a πρωτονίου από μια βάση που οδηγεί στο σχηματισμό ενός ενδιάμεσου καρβανιόντος το οποίο στη συνέχεια επαναπροσλαμβάνει ένα πρωτόνιο αλλά με απώλεια της οπτικής καθαρότητας.

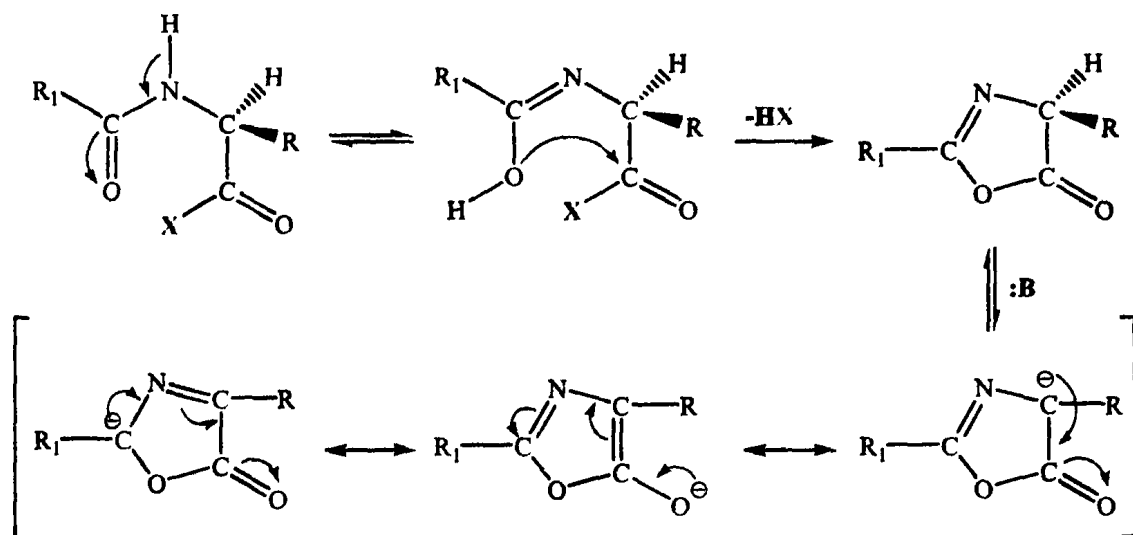
Στην SPPS η ρακεμοποίηση πραγματοποιείται πριν ακόμα λάβει χώρα η αντίδραση σύζευξης, κατά την ενεργοποίηση των N^a - προστατευμένων αμινοξέων. Η παρουσία της ηλεκτρονιοελκτικής ομάδας, που χρησιμοποιείται για την ενεργοποίηση του καρβοξυλίου, σταθεροποιεί το ενδιάμεσο καρβανιόν που σχηματίζεται κατά τη απόσπαση του H^a από τη βάση, που επίσης είναι παρούσα στο μίγμα της αντίδρασης. Υπό αυτές τις συνθήκες, η απόσπαση του H^a ευνοείται και το σχηματιζόμενο καρβανιόν, που μπορεί να υποστεί μεταβολή στερεοχημικής διάταξης σε μεγάλο ποσοστό, στη συνέχεια επαναπροσλάβει ένα πρωτόνιο οδηγώντας στη λήψη μίγματος L- και D- εναντιομερών (ρακεμικό μείγμα) και επομένως σε απώλεια της οπτικής καθαρότητας του σχηματιζόμενου πεπτιδίου.



Σχήμα 12. Προτεινόμενος μηχανισμός ρακεμοποίησης του νεοεισερχομένου αμινοξέος κατά τη διάρκεια της σύζευξης: απόσπαση πρωτονίου και σχηματισμός καρβανιόντος που σταθεροποιείται από την παρουσία της ηλεκτρονιοελκτικής ομάδας X.

Η εναντιομερίωση του εισερχομένου αμινοξέος είναι πιο πιθανή μέσω σχηματισμού ενός δακτυλίου αζλακτόνης ο οποίος προκύπτει από κυκλοποίηση των ενεργοποιημένων ακυλοαμινοξέων σε βασικές συνθήκες. Στο κυκλικό αυτό ενδιάμεσο της αζλακτόνης είναι δυνατόν να συμβεί απόσπαση πρωτονίου από μια βάση γεγονός που ευνοείται διότι το ενδιάμεσο καρβανιόν σταθεροποιείται με μεσομέρεια. Ο δακτύλιος μπορεί στη συνέχεια να ανοίξει ξανά προκαλώντας ρακεμοποίηση γύρω από τον C^a . Η εναντιομερίωση με σχηματισμό αζλακτόνης συμβαίνει συχνότερα στη συμπύκνωση τμημάτων, ωστόσο, κάποια

N-ουρεθано προστατευμένα αμινοξέα, και κυρίως η ιστιδίνη και η κυστεΐνη, έχει βρεθεί να είναι ευαίσθητα σε αυτή την αντίδραση [49, 89].



Σχήμα 13. Προτεινόμενος μηχανισμός ρακεμοποίησης του νεοεισερχομένου αμινοξέος κατά τη διάρκεια της σύζευξης: απόσπαση πρωτονίου μέσω σχηματισμού αζλακτόνης και σταθεροποίηση με μεσομέρεια του προκύπτοντος καρβανιόντος.

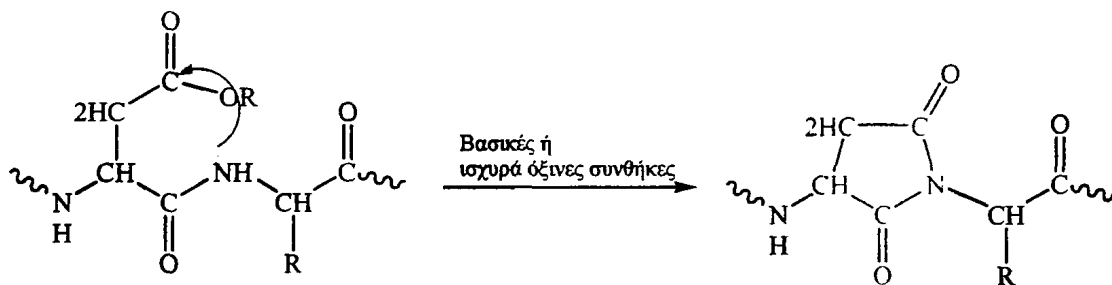
Η ταχύτητα της ρακεμοποίησης εξαρτάται από την ηλεκτρονιο-ελκτική επίδραση της παράπλευρης αλυσίδας του αμινοξέος, τη θερμοκρασία της αντίδρασης, το διαλύτη και τη βάση που χρησιμοποιείται για ενεργοποίηση. Στην SPPS, χρησιμοποιούνται στερικά παρεμποδισμένες τεταρτοταγείς αμίνες σε μια προσπάθεια να ελαχιστοποιηθεί η βασικά καταλυόμενη απόσπαση του πρωτονίου του C^α. Επιπλέον, αποφεύγονται οι πολύ πολικοί διαλύτες όπως είναι το DMF και αντί αυτού προτιμάται μίγμα DMF/DCM (1/1), ενώ, ταυτόχρονα, δίνεται έμφαση και στην προσθήκη βοηθητικών πυρηνόφιλων (HOBt) στο διάλυμα σύζευξης.

Σχηματισμός ασπαρτιμιδίου

Ο καταλυόμενος από βάση σχηματισμός ασπαρτιμιδίου είναι μια συνηθισμένη παράπλευρη αντίδραση που παρατηρείται στην SPPS κατά την Fmoc στρατηγική. Λαμβάνει χώρα κατά την αντίδραση απομάκρυνσης της Fmoc προστατευτικής ομάδας, ενώ απαντάται συχνότερα σε αλληλουχίες του τύπου Asp-AA, όπου AA=Gly, Asn, Ser ή Ala. Η αντίδραση περιλαμβάνει την πυρηνόφιλη προσβολή του καρβονυλικού άνθρακα της παράπλευρης αλυσίδας του ασπαρτικού οξέος από το ζεύγος ηλεκτρονίων του αμιδικού αζώτου του



επόμενου αμινοξέος στην αλληλουχία που έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός μιδικού δακτυλίου [89]. Αν και η ανεπιθύμητη αυτή αντίδραση ευνοείται περισσότερο στις βασικές συνθήκες που επικρατούν κατά την απομάκρυνση της Fmoc ομάδας, ωστόσο, παρατηρείται και κατά την Boc/Bzl στρατηγική, στο στάδιο της αποκοπής του πεπτιδίου από τη ρητίνη όπου επικρατούν ισχυρά όξινες συνθήκες.



Σχήμα 14. Σχηματισμός δακτυλίου ασπαρτιμιδίου.

Εκτός από την μεθοδολογία πεπτιδικής σύνθεσης που ακολουθείται, ο σχηματισμός ασπαρτιμιδίου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό και από τους εξής παράγοντες:

- Την προστατευτική ομάδα της παράπλευρης αλυσίδας του ασπαρτικού οξέος. Ογκώδεις προστατευτικές ομάδες, δότες ηλεκτρονίων περιορίζουν σημαντικά το κλείσιμο του δακτυλίου, όπως η tert-βουτυλομάδα (-OtBu) κατά την Fmoc στρατηγική [90-92] ή η κυκλοεξυλομάδα (-OcHx) κατά την Boc στρατηγική [93].

- Από τα αντιδραστήρια αποκοπής της Fmoc ομάδας.

Στο στάδιο αυτό που είναι και το πιο κρίσιμο για το σχηματισμό του ασπαρτιμιδίου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ασθενέστερες βάσεις από την πιπεριδίνη που δύνανται να περιορίσουν την έκταση του φαινομένου. Εναλλακτικές επιλογές για την αποκοπή της Fmoc ομάδας αποτελούν η πιπεραζίνη [89] ή η μορφολίνη. Επιπλέον, η προσθήκη 1-υδροξυβενζοτρίαζολίου (0,1M) ή 2,4-δινιτροφαινόλης στο διάλυμα αποκοπής της Fmoc ομάδας έχει προταθεί πως συμβάλει θετικά στον περιορισμό του ασπαρτιμιδίου.

- Από τη θέση του ασπαρτικού οξέος στην πεπτιδική αλληλουχία.

Όταν μια επιρρεπής στο σχηματισμό ασπαρτιμιδίου αλληλουχία, όπως οι Asp-AA, όπου AA=Arg, Asn, Asp, Cys, Ser, Ala, Gly, βρίσκεται προς το C-τελικό άκρο του πεπτιδίου, το ποσοστό ασπαρτιμιδίου που λαμβάνεται είναι μεγαλύτερο σε σχέση με την περίπτωση που μια τέτοια αλληλουχία βρίσκεται πιο κοντά στο N-τελικό άκρο [94].

✱ Τέλος, για τον περιορισμό της έκτασης του σχηματιζόμενου ασπαρτιμιδίου έχει προταθεί στη βιβλιογραφία η χρήση προστατευτικής ομάδας για το αμιδικό άτομο αζώτου που έπεται του ασπαρτικού στην πεπτιδική αλληλουχία. Για το σκοπό μπορούν να χρησιμοποιηθούν ογκώδεις ομάδες που εμποδίζουν το κλείσιμο του πενταμελούς δακτύλιου όπως η 2-υδροξυ-4-μεθοξυ-βενζυλομάδα (Hmb) [95], η 2,4-διμεθοξυ-βενζυλομάδα (Dmb), η 2,4,6-τριμεθοξυ-βενζυλομάδα (Tmb) και η 2-νιτρο-βενζυλομάδα (Nbzl). Η επιλογή αυτή αποδεικνύεται ιδιαίτερα αποτελεσματική μόνο στην περίπτωση της Gly η οποία ταυτόχρονα είναι και το πιο επικίνδυνο αμινοξύ για το σχηματισμό ασπαρτιμιδίου.

Ο σχηματιζόμενος δακτύλιος του ασπαρτιμιδίου είναι δυνατόν να ανοίξει ύστερα από προσβολή πυρηνόφιλων σε έναν από τους δυο καρβονυλικούς άνθρακες οδηγώντας στο σχηματισμό μίγματος παραπροϊόντων. Πιο συγκεκριμένα, τα πυρηνόφιλα που μπορεί να προσβάλουν το δακτύλιο είναι η πιπεριδίνη [94], κατά την αποκοπή της Fmoc ομάδας, η μεθανόλη [96], κατά τις εκπλύσεις της πεπτιδορητίνης, αλλά και το νερό [97], κατά τον καθαρισμό του πεπτιδίου με HPLC, οδηγώντας στη λήψη μίγματος α-, β-πεπτιδίων, α-, β-πιπεριδιδίων και α-, β-μεθυλεστέρων, αντίστοιχα.

Παρά το ότι τα παραπροϊόντα της επίδρασης της πιπεριδίνης ή της μεθανόλης μπορούν να διαχωριστούν από το επιθυμητό πεπτίδιο και να ταυτοποιηθούν, λόγω της διαφοράς στο μοριακό βάρος και στο χρόνο κατακράτησης στην στήλη της HPLC, εντούτοις, τα α- και β-πεπτίδια είναι δύσκολο να διαχωριστούν ή να ταυτοποιηθούν διότι έχουν ακριβώς το ίδιο μοριακό βάρος.

Σχηματισμός δικετοπιπεραζίνης

Μια ακόμα ανεπιθύμητη αντίδραση που ενδέχεται να λάβει χώρα κατά την πεπτιδική σύνθεση είναι ο σχηματισμός κυκλικών διπεπτιδίων γνωστών ως δικετοπιπεραζίνες (DKP). Πιο συγκεκριμένα, η παράπλευρη αυτή αντίδραση παρατηρείται κατά την απομάκρυνση της N^α-αμινο προστατευτικής ομάδας του δεύτερου (από το C-τελικό άκρο) αμινοξέος ή κατά τη σύζευξη του τρίτου αμινοξέος και συνίσταται στο ότι η ελεύθερη αμινομάδα του προσδεδεμένου στη ρητίνη διπεπτιδίου προσβάλλει ενδομοριακά τον καρβονυλικό άνθρακα που συνδέει το πεπτίδιο με τη ρητίνη και έχει σαν αποτέλεσμα την αποκοπή από τη ρητίνη ενός κυκλικού διπεπτιδίου (DKP) [98]. Οι ομάδες που ελευθερώνονται κατά αυτόν τον τρόπο στην ρητίνη θα συζευχθούν στη συνέχεια με το τρίτο κατά σειρά αμινοξύ και μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης εκτός από το επιθυμητό πεπτίδιο θα ληφθεί και ένα παραπροϊόν που αντιστοιχεί στο επιθυμητό πεπτίδιο χωρίς τα δύο C-τελικά αμινοξέα.



Ο σχηματισμός DKP είναι εφικτός τόσο κατά την Fmoc/tBu [99] όσο και κατά την Boc/Bzl στρατηγική, ενώ η έκταση του φαινομένου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το είδος του δεσμού που συνδέει το πεπτιδίο με τη ρητίνη [100] και από τη φύση των δυο C-τελικών αμινοξέων, με τη γλυκίνη και την προλίνη να θεωρούνται τα πιο «επικίνδυνα» αμινοξέα. Η γλυκίνη ευνοεί το σχηματισμό DKP λόγω απουσίας παράπλευρης αλυσίδας, ενώ στην περίπτωση της προλίνης ο πλευρικός δακτύλιος βρίσκεται στο επίπεδο του μορίου της DKP και έτσι δεν παρεμποδίζει κατά το κλείσιμο του δακτυλίου.

Για την αντιμετώπιση της παράπλευρης αυτής αντίδρασης ενδείκνυται η χρησιμοποίηση ρητινών που φέρουν ογκώδεις υποκαταστάτες, όπως η 2-chlorotriptyl chloride ρητίνη, η εισαγωγή των C-τελικών αμινοξέων προστατευμένων με ογκώδεις ομάδες στην παράπλευρη αλυσίδα τους αλλά και η εισαγωγή του 2^{ου} και 3^{ου} αμινοξέος ως προστατευμένο διπεπτιδίο, μεθοδολογία που όμως παρουσιάζει σημαντικά προβλήματα.

Αποκοπή του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές

Όταν ολοκληρωθεί η σύνθεση του πεπτιδίου πάνω στο στερεό πολυμερές ακολουθεί η αποκοπή αυτού με τη χρήση του κατάλληλου αντιδραστήριου. Οι συνθήκες πρέπει να είναι τέτοιες που να επιτρέπουν την αποκοπή του πεπτιδίου, χωρίς την καταστροφή αυτού. Η χημική μέθοδος που χρησιμοποιείται συνήθως, είναι η επεξεργασία της πεπτιδορητίνης με ισχυρά οξέα. Η επιλογή ενός τέτοιου οξέος εξαρτάται από το είδος της ρητίνης, από τον τρόπο σύνδεσης του C-τελικού αμινοξέος με το πολυμερές καθώς και από το αν θέλουμε το πεπτιδίο να είναι πλήρως, μερικώς ή καθόλου προστατευμένο.

Για την αποκοπή πεπτιδίων που συντίθενται με την Boc-στρατηγική απαιτείται η χρησιμοποίηση πολύ ισχυρών οξέων όπως είναι το υγρό υδροφθόριο (HF), ή το τριφθορομεθανοσουλφονικό οξύ (TFMSA). Για τα πεπτιδία που συντίθενται με την Fmoc-στρατηγική χρησιμοποιούνται για την αποκοπή τους πιο ήπια οξέα όπως είναι το τριφθοροξικό οξύ (TFA). Κατά την αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη, γίνεται και η απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων. Ως συνέπεια αυτού, το μίγμα της αντίδρασης αποκοπής είναι πλούσιο σε ηλεκτρονιόφιλες αλκυλιωτικές ομάδες. Για την αποφυγή παράπλευρων αντιδράσεων του πεπτιδίου με αυτές τις ομάδες, η αποκοπή γίνεται πάντα παρουσία μορίων-παγίδων (scavengers) που έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν τις ομάδες αυτές. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα μόρια παγίδες είναι η ανισόλη, η φαινόλη και παράγωγα θειολών.



Αποκοπή με τη χρήση HF

Το HF είναι πολύ τοξικό και ισχυρά διαβρωτικό. Για τους λόγους αυτούς, η διαδικασία πρέπει να γίνεται με μεγάλη προσοχή και σε ειδική συσκευή. Για την αποκοπή 1g πεπτιδορηνίνης απαιτούνται 10ml HF, 1ml ανισόλης και 0,5 g φαινόλης.

Ανάλογα με την αλληλουχία των αμινοξέων του πεπτιδίου προστίθενται στο μίγμα της αντίδρασης και κάποια άλλα μόρια παγίδες. Όταν υπάρχει Met προστίθεται διμεθυλοσουλφίδιο (DMS) για την αποφυγή της οξειδωσης της σε σουλφοξειδίο (MetO). Στην περίπτωση της Tyr, για την αποφυγή C-αλκυλίωσης του αρωματικού δακτυλίου χρησιμοποιείται θειοανισόλη, η οποία όμως θα πρέπει να αποφεύγεται στην περίπτωση που στην αλληλουχία περιέχεται και Trp, οπότε συμβαίνει αλκυλίωση του αζώτου του ινδολικού δακτυλίου. Γενικά, η ανισόλη, σε συνδυασμό με DMS και π-θειοκρεσόλη στην περίπτωση Met και Cys, παραμένει το περισσότερο χρησιμοποιούμενο μόριο-παγίδα κατά την αποκοπή με HF. Η αντίδραση αποκοπής αφήνεται αρχικά στους -7 έως -10 °C για 30 λεπτά. Αυτό γίνεται για την απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων και τη δέσμευσή τους ευκολότερα από τα μόρια παγίδες. Στην συνέχεια, η αντίδραση αφήνεται για 1 ώρα στους 0 °C όπου έχουμε την αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη. Εάν στο πεπτίδιο υπάρχει Arg(Tos), τότε η αντίδραση αφήνεται για 2 ώρες για την πλήρη απομάκρυνση της Tos-ομάδας.

Αποκοπή με τη χρήση TFA

Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι το TFA είναι λιγότερο τοξικό και ισχυρό οξύ από το HF, με αποτέλεσμα η διαδικασία αποκοπής του πεπτιδίου από την ρητίνη να γίνεται εύκολα και γρήγορα. Και σε αυτή την μέθοδο ανάλογα με τα αμινοξέα του πεπτιδίου απαιτείται η χρήση μορίων-παγίδων όπως: θειοανισόλη, φαινόλη, αιθανοδιθειώλη (EDT), αιθυλομεθυλοσουλφίδιο (EMS), H₂O, τριϊσοπροπυλοσιλάνιο (TIS) [101], τριαιθυλοσιλάνιο (TES). Για την πλειονότητα των πεπτιδίων, το περισσότερο διαδεδομένο και αποτελεσματικό διάλυμα αντιδραστηρίων αποκοπής είναι αυτό που αποτελείται από 95% TFA, 2,5% TIS και 2,5% H₂O. Προσθήκη επιπλέον κατάλληλων μορίων-παγίδων επιβάλλεται στην περίπτωση που ευαίσθητα σε αλκυλίωση αμινοξέα είναι παρόντα στην αμινοξική αλληλουχία, όπως Cys, Met, Trp ή Tyr. Πριν την αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη πρέπει να γίνεται η απομάκρυνση της Fmoc-ομάδας. Ο χρόνος της αντίδρασης αποκοπής ποικίλει ανάλογα με τα αμινοξέα και τις προστατευτικές ομάδες αυτών, από 2 έως 6 ώρες.



A. ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ**Εισαγωγή**

Οι υδατάνθρακες, μια από τις τέσσερις κύριες κατηγορίες βιομορίων, είναι από τα πιο διαδεδομένα συστατικά των ζωικών και φυτικών οργανισμών. Αποτελούν πηγές και αποθήκες ενέργειας, απαντούν στα μόρια του DNA που μεταφέρουν γενετικές πληροφορίες, αποτελούν δομικά στοιχεία στα κυτταρικά τοιχώματα βακτηρίων και φυτών και στο κέλυφος των οστρακοειδών ενώ, τέλος, απαντούν ως βασικά συστατικά των γλυκοπρωτεϊνών στις κυτταρικές επιφάνειες εμπλεκόμενοι έτσι σε πλήθος σημαντικών βιολογικών διεργασιών.

Ο όρος *υδατάνθρακας* αναφέρεται σε μια ευρεία κατηγορία πολυυδροξυλιωμένων αλδεϋδών και κετονών που ονομάζονται κοινώς *σάκχαρα*, λόγω τις γλυκιάς γεύσης που έχουν ορισμένοι από αυτούς.

Οι υδατάνθρακες ταξινομούνται σε δυο γενικές κατηγορίες, στους απλούς και στους σύνθετους. Τα απλά σάκχαρα ή μονοσακχαρίτες δεν μπορούν να υδρολυθούν σε απλούστερες ενώσεις. Οι σύνθετοι υδατάνθρακες απαρτίζονται από δυο ή περισσότερα απλά σάκχαρα συνδεδεμένα μεταξύ τους. Συνήθως έως δέκα απλά σάκχαρα συνιστούν ολιγοσακχαρίτες, ενώ περισσότερες από δέκα υδατανθρακικές μονάδες συγκροτούν τους πολυσακχαρίτες που μπορεί να είναι όμοιο- ή έτερο-πολυσακχαρίτες, ευθύγραμμης ή διακλαδισμένης αλυσίδας.

Οι μονοσακχαρίτες μπορούν περαιτέρω να ταξινομηθούν σε αλδόζες, αν περιέχουν στο μόριό τους μια αλδεϋδική ομάδα, και κετόζες, αν περιέχουν μια κετο ομάδα. Επιπλέον, ο αριθμός των ατόμων άνθρακα σε έναν μονοσακχαρίτη υποδηλώνεται από τα προθέματα τρι-, τετρ-, πεντ- και εξ-. Για παράδειγμα, η γλυκόζη, ο πιο συνηθισμένος μονοσακχαρίτης, είναι μια αλδοεξόζη, δηλαδή ένα σάκχαρο με έξι άτομα άνθρακα και μια αλδεϋδομάδα. Τα περισσότερα από τα συνήθη σάκχαρα είναι είτε αλδοπεντόζες είτε αλδοεξόζες [102-104].

Απεικόνιση μονοσακχαριτών, D και L σάκχαρα

Η αρίθμηση των αλδοζών και κετοζών γίνεται με βάση την αρίθμηση της αλδεϋδομάδας και κετομάδας, αντίστοιχα, θεωρώντας ότι η αλδεϋδομάδα των αλδοζών βρίσκεται στην θέση 1 και η καρβονυλομάδα των κετοζών στη θέση 2.

Ο απλούστερος υδατάνθρακας είναι η γλυκεραλδεϋδη που έχει ένα ασύμμετρο άτομο άνθρακα (στερεογονικό κέντρο) και απαντά σε δυο στερεοϊσομερή, την D- και την L-



γλυκεραλδεύδη (κατοπτρικά είδωλα ή εναντιομερή), όπου οι χαρακτήρες D και L αναφέρονται στην απόλυτη διαμόρφωση των υποκαταστατών γύρω από τον ασύμμετρο άνθρακα (στο D ισομερές η υδροξυλομάδα βρίσκεται στην δεξιά πλευρά της προβολής κατά Fischer ενώ στο L στην αριστερή)[102].

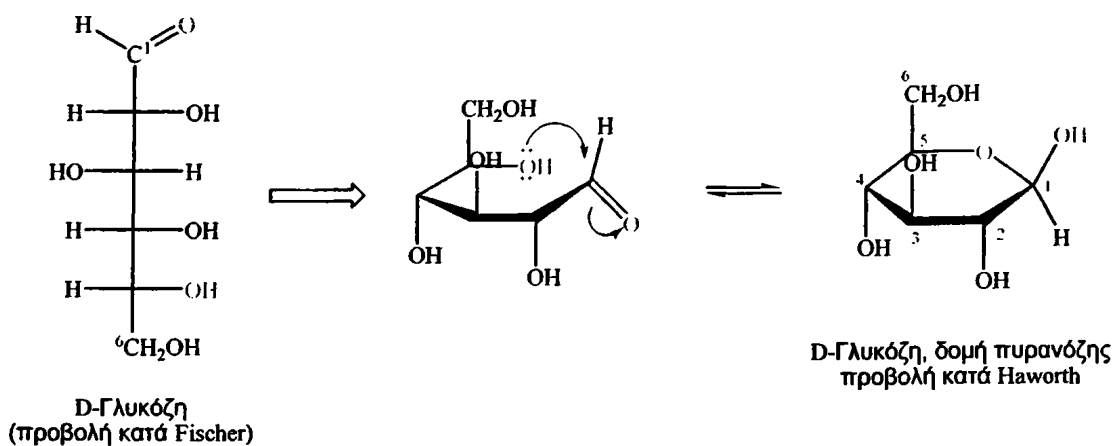
Για τις αλδόζες και τις κετόζες ο αριθμός των οπτικά ενεργών μορίων (στερεοϊσομερή και πιο συγκεκριμένα οπτικά ισομερή ή εναντιομερή) είναι 2^n , όπου n είναι ο αριθμός των ασύμμετρων ατόμων άνθρακα. Για σάκχαρα με περισσότερα του ενός ασύμμετρα άτομα άνθρακα, τα σύμβολα D και L αναφέρονται στην απόλυτη διαμόρφωση του ασύμμετρου άνθρακα που βρίσκεται μακρύτερα από την αλδεϋδική ή κετονική ομάδα. Έτσι, οι αλδοτετρόζες που έχουν τέσσερα άτομα άνθρακα και δυο στερεογονικά κέντρα υφίστανται ως $2^2=4$ στερεοϊσομερή ή δυο ζεύγη D, L εναντιομερών που το κάθε ένα περιέχει δυο διαστερομερείς μεταξύ τους ενώσεις. Ανάλογα, οι αλδοπεντόζες με πέντε άτομα άνθρακα και τρία στερεογονικά κέντρα απαντούν ως $2^3=8$ στερεοϊσομερή ή τέσσερα ζεύγη εναντιομερών, κοκ.

Κυκλικές δομές μονοσακχαριτών: σχηματισμός ημιακεταλών

Γενικά, μια αλδεϋδη αντιδρά με μια αλκοόλη για να σχηματίσει μια ημιακετάλη. Εάν η υδροξυλομάδα και το καρβονύλιο βρίσκονται στο ίδιο μόριο, λαμβάνει χώρα ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσθήκη που οδηγεί στο σχηματισμό μιας κυκλικής ημιακετάλης.

Οι πενταμελείς και εξαμελείς κυκλικές ημιακετάλες είναι ιδιαίτερα σταθερά μόρια και για το λόγο αυτό αρκετοί υδατάνθρακες απαντούν σε κατάσταση ισορροπίας ανάμεσα στις δομές ανοικτής και κλειστής αλυσίδας. Για παράδειγμα, η γλυκόζη σε υδατικό διάλυμα απαντά με τη δομή του εξαμελούς δακτυλίου της πυρανόζης, που οφείλεται στην ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσβολή του -OH του C5 στον καρβονυλικό άνθρακα (C1) (σχήμα 1). Ανάλογα, η φρουκτόζη απαντά κυρίως με τη δομή πενταμελούς δακτυλίου φουρανόζης [104].



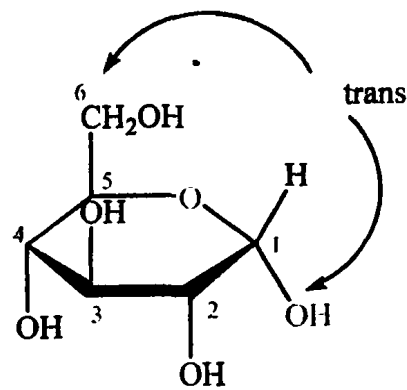


Σχήμα 1. Ισορροπία δομών γλυκόζης

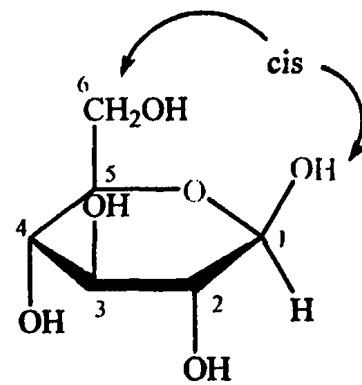
Ανωμερή μονοσακχαριτών: πολυστροφισμός

Όταν η ανοικτή αλυσίδα ενός μονοσακχαρίτη υποστεί κυκλοποίηση, αποκτώντας τη δομή πυρανόζης ή φουρανόζης, σχηματίζεται ένα νέο στερεογονικό κέντρο στη θέση του πρώην καρβονυλικού άνθρακα. Στα δυο νέα διαστερομερή, α και β, η κατεύθυνση της υδροξυλομάδας του C1 καθορίζει την α ή β μορφή του σακχάρου: α σημαίνει ότι το υδροξύλιο του C1 βρίσκεται κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου ή αλλιώς σε θέση trans ως προς τον υποκαταστάτη -CH₂OH ενώ στο β βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου ή σε θέση cis ως προς την -CH₂OH. Τα α και β διαστερομερή ονομάζονται *ανωμερή* και ο ημιακεταλικός άνθρακας *ανωμερής* ή *ανωμερικό κέντρο* (σχήμα 2).

Σε υδατικό διάλυμα, η α-D-γλυκοπυρανόζη και η β-D-γλυκοπυρανόζη αλληλομετατρέπονται μέσω της μορφής ανοικτής αλυσίδας. Αυτή η αλληλομετατροπή παρατηρήθηκε με πολωσιμετρία (μέτρηση της στροφής του επίπεδα πολωμένου φωτός), μια φασματοσκοπική τεχνική πολύ ευαίσθητη στη μοριακή συμμετρία. Με αυτή την τεχνική παρατηρήθηκε ότι σε υδατικό διάλυμα μίγματος των δυο ανωμερών ή καθαρού α ή β ανωμερούς η ειδική στροφή μεταβάλλεται σταδιακά με το χρόνο μέχρις ότου επιτευχθεί μια τιμή ισορροπίας που για τη γλυκόζη είναι +52,7°. Αυτή η αλλαγή, που καλείται *πολυστροφισμός*, είναι αποτέλεσμα του σχηματισμού ενός μίγματος ισορροπίας που στην περίπτωση της γλυκόζης περιέχει περίπου 1/3 ανωμερές α και 2/3 ανωμερές β. Υπάρχει επίσης και μικρό ποσοστό άκυκλης γλυκόζης (αλδεύδομορφή).



α -D-Γλυκοπυρανόζη



β -D-Γλυκοπυρανόζη

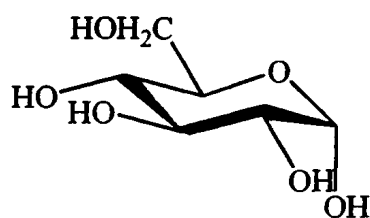
Σχήμα 2. Ανωμερή γλυκόζης

Εν τούτοις, η ισορροπία μεταξύ άκυκλης και κυκλικών μορφών μπορεί να μετατοπιστεί προς γρήγορη παραγωγή της άκυκλης αλδεύδομορφής όταν αυτή συμμετέχει σε μια αντίδραση οπότε απομακρύνεται γρήγορα από την ισορροπία και παράγεται συνεχώς λόγω της μετατόπισης της ισορροπίας προς αυτή τη μορφή [103, 104].

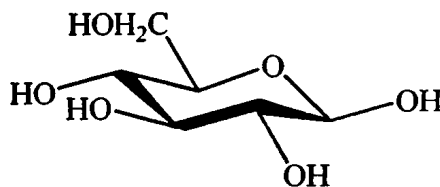
Διαμορφώσεις μονοσακχαριτών

Ο εξαμελής δακτύλιος της πυρανόζης δεν είναι δυνατόν να είναι επίπεδος, λόγω της τετραεδρικής γεωμετρίας των κορεσμένων ατόμων άνθρακα. Αντίθετα, μπορεί να υιοθετήσει στερεοδιάταξη ανάκλιντρου ή λουτήρα με αξονικούς και ισημερινούς υποκαταστάτες [103].

Γενικά, η μορφή ανάκλιντρου είναι αυτή που ευνοείται στερεοχημικά επομένως είναι και η επικρατέστερη διότι όλες οι αξονικές θέσεις, που αποτελούν και τις πιο στερεοχημικά παρεμποδισμένες, καταλαμβάνονται από άτομα υδρογόνου. Έτσι, οι ογκωδέστερες ομάδες –OH και –CH₂OH προβάλλουν στην περιφέρεια του δακτυλίου (ισημερινές θέσεις) με μικρή στερεοχημική παρεμπόδιση (σχήμα 3).



α -D-Γλυκοπυρανόζη



β -D-Γλυκοπυρανόζη

Σχήμα 3. Στερεοδιάταξη ανακλίντρου των ανωμερών D-γλυκόζης

Ολιγοσακχαρίτες-Πολυσακχαρίτες

Κατά την αντίδραση της ημιακετάλης ενός μονοσακχαρίτη με μια αλκοόλη (ROH) σχηματίζεται ένας γλυκοζίτης, στον οποίο η ανωμερική ομάδα $-OH$ έχει αντικατασταθεί από τον υποκαταστάτη $-OR$. Εάν το αλκοολικό υδροξύλιο ανήκει σε ένα μονοσακχαρίτη, τότε το γλυκοζιτικό προϊόν είναι ένας δισακχαρίτης. Ο δεσμός που δημιουργείται μεταξύ του ανωμερούς άνθρακα (C1) του ενός σακχάρου και του ατόμου οξυγόνου ενός οποιουδήποτε υδροξυλίου του άλλου σακχάρου καλείται γλυκοζιτικός. Τα σάκχαρα είναι σε θέση να ενώνονται μεταξύ τους με O-γλυκοζιτικούς δεσμούς, με ταυτόχρονη απομάκρυνση μορίων νερού, για να σχηματίσουν ολιγοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες.

Πολύ συνηθισμένη είναι η περίπτωση κατά την οποία υπάρχει ένας γλυκοζιτικός δεσμός ανάμεσα στον C1 του ενός σακχάρου και στο $-OH$ που βρίσκεται στον C4 του άλλου σακχάρου. Αυτού του είδους ο δεσμός ονομάζεται 1,4' (συμβολίζεται επίσης και 1,4 ή 1-4' ή 1 \rightarrow 4). Επιπλέον, αρκετά συχνά απαντάται και ο δεσμός 1,6'. Ο γλυκοζιτικός δεσμός στον ανωμερή άνθρακα μπορεί να είναι α ή β [104].

Ο ανωμερής άνθρακας ενός σακχάρου είναι σε θέση να ενωθεί και με το άζωτο μιας αμίνης με έναν N-γλυκοζιτικό δεσμό. Τέτοιου είδους δεσμοί απαντώνται στις γλυκοπρωτεΐνες, όπως θα δούμε στη συνέχεια. Οι N-γλυκοζιτικοί δεσμοί σε όλα τα φυσικά μακρομόρια έχουν στερεοδιάταξη β .

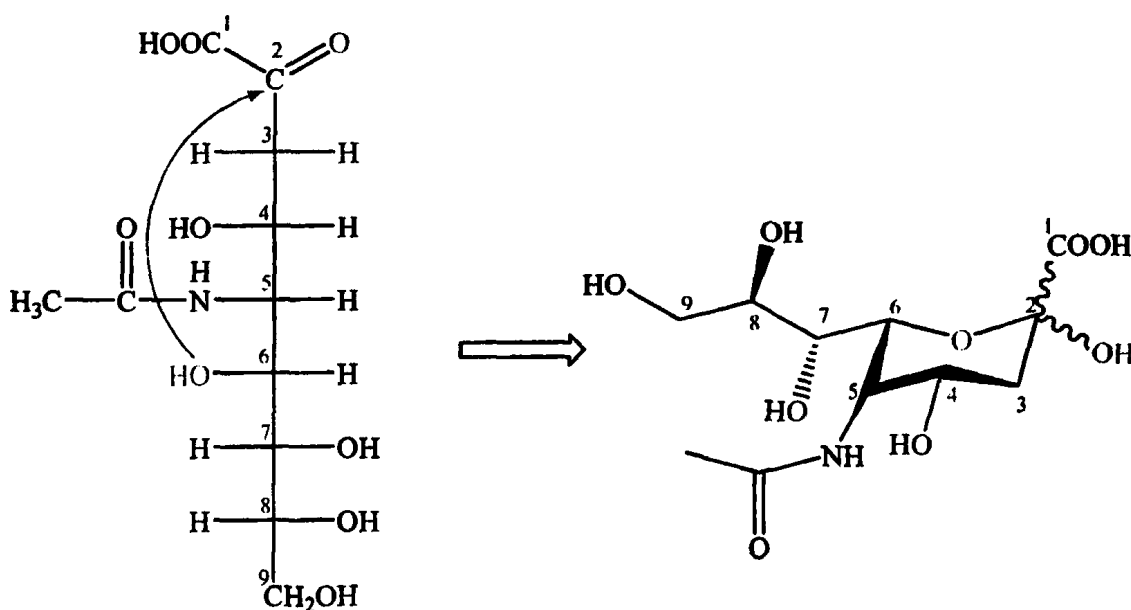
Αναγωγικά σάκχαρα

Είναι τα σάκχαρα που περιέχουν μια ελεύθερη αλδεϋδική ή κετονική ομάδα και ανάγουν δείκτες, όπως σύμπλοκα ιόντων δισθενούς χαλκού σε μονοσθενή χαλκό. Ο αναγωγικός παράγοντας σε αυτές τις αντιδράσεις είναι η μορφή ανοικτής αλυσίδας της αλδόζης ή κετόζης.

Σιαλικά οξέα

Δομή

Τα σιαλικά οξέα είναι μια οικογένεια όξινων κετοζών που περιέχουν εννέα άτομα άνθρακα και είναι ακετυλιωμένα παράγωγα του νευραμινικού οξέος. Εκτός της N-ακετυλομορφής, απαντούν και στην N-γλυκολυλο-μορφή και είναι δυνατόν να περιέχουν ακετυλομάδες στα άτομα C4, C7, C8 και C9. Απελευθερώνονται από τους ολιγοσακχαρίτες που τα περιέχουν μέσω ήπιας όξινης υδρόλυσης με 0,05 N H₂SO₄ (80°C, 1h) ή με ένζυμα όπως η σιαλιδάση και η N-ακετυλονευραμινική λυάση [102].



Σχήμα 4. N-ακετυλο-νευραμινικό οξύ (ή Neu5Ac ή NAN ή Sia ή σιαλικό οξύ)

Λειτουργία

Τα σιαλικά οξέα απαντούν ευρέως στους ζωικούς ιστούς σαν συστατικά πολυσακχαριτών και γλυκοπρωτεϊνών. Το πιο κοινό σιαλικό οξύ είναι το N-ακετυλονευραμινικό οξύ (Neu5Ac) (σχήμα 4).

Συμμετέχουν σε ποικιλία γλυκοζιτικών δεσμών με επικρατέστερους τους α2,3 και α2,6 δεσμούς με γαλακτόζη ή λακτόζη καθώς επίσης και α2,8 και α2,9 σε ομοπολυμερή Neu5Ac (πολυσιαλικό οξύ).



Εντοπίζονται κυρίως στο μη αναγωγικό άκρο των προσδεδεμένων σε γλυκοπρωτεΐνες ολιγοσακχαριτών, το οποίο είναι και το πιο εκτεθειμένο, όπου παίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική φυσιολογία λαμβάνοντας μέρος σε ποικιλία διακυτταρικών και ενδοκυτταρικών διεργασιών.

Επιπλέον, πολλά παθολογικά μικρόβια χρησιμοποιούν τα σιαλικά οξέα για να επιτύχουν τη μόλυνση του κυττάρου-ξενιστή, όπως για παράδειγμα ο ιός της γρίπης που προσδένεται στο κύτταρο-στόχο μέσω της αιμοσυγκολλητίνης του, μιας λεκτίνης που φέρει στην επιφάνειά του και η οποία είναι ειδική για σιαλικά οξέα.

Τέλος, συγκεκριμένοι τύποι καρκινικών όγκων εκφράζουν γαγγλιοζίτες (σειρές GM 4 και GD), μια σημαντική τάξη αντιγονικών γλυκοτόπων που περιέχουν σιαλικά οξέα, καθώς και συγκεκριμένα σιαλο-γλυκοπεπτίδια (sTn) επιλεκτικά στην κυτταρική τους επιφάνεια.

Αυτή η ειδική έκφραση υδατανθρακικών αντιγόνων έχει στρέψει το ενδιαφέρον προς τη σύνθεση σιαλοσυμπλεγμάτων (sialoconjugates) ως βιολογικών διαγνωστικών, αναστολέων και συστατικών πολυδύναμων εμβολίων [105].

Β. ΓΛΥΚΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Εισαγωγή

Οι περισσότερες φυσικές πρωτεΐνες τροποποιούνται μετα-μεταφραστικά με την πρόσδεση ομάδων υδατανθράκων, συνήθως ολιγοσακχαριτών, στις παράπλευρες αλυσίδες αμινοξέων κι έτσι παράγονται οι γλυκοπρωτεΐνες. Η διαδικασία αυτή καλείται γλυκοζυλίωση. Το ποσοστό των υδατανθράκων στο βάρος των γλυκοπρωτεϊνών είναι πολύ μικρότερο από ότι στις πρωτεογλυκάνες, στις οποίες οι προσδεδεμένοι υδατάνθρακες είναι αλυσίδες πολυσακχαριτών.

Οι ολιγοσακχαρίτες δεν επηρεάζουν μόνο τις δομές, τις χημικές, φυσικές και βιοχημικές ιδιότητες των πρωτεϊνών, αλλά επίσης και τις λειτουργίες τους, καθώς αποτελούν μια σημαντική τάξη μορίων βιολογικής αναγνώρισης. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα οι γλυκοπρωτεΐνες να διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο σε ποικιλία βιολογικών διαδικασιών όπως είναι η συγκόλληση, η διαφοροποίηση και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων. Επιπλέον, κατέχουν πρωταγωνιστικό ρόλο σε διάφορες παθολογικές διαδικασίες, καθώς βακτήρια, ιοί και παράσιτα προσκολλώνται σε μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες για να εισέλθουν στα κύτταρα του ξενιστή τους και να ξεκινήσει έτσι η διαδικασία της μόλυνσης. Τέλος, ανώμαλη γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών συσχετίζεται με αυτοάνοσες και μολυσματικές ασθένειες αλλά και με τον καρκίνο.



Ως αποτέλεσμα, το ερευνητικό ενδιαφέρον για τις γλυκοπρωτεΐνες αυξάνεται συνεχώς. Μελέτες σε αυτόν τον τομέα αναμένεται να προσφέρουν νέα, εξειδικευμένα μέσα για έγκαιρη διάγνωση και αποτελεσματική θεραπεία ανθρώπινων ασθενειών [106, 107].

Είδη γλυκοπρωτεϊνών

Ένας τεράστιος αριθμός φυσικών γλυκοπρωτεϊνών με εξαιρετικά ποικίλες δομές ολιγοσακχαριτών έχουν ταυτοποιηθεί, αλλά οι συνδέσεις μεταξύ των ολιγοσακχαριτών και των πολυπεπτιδικών σκελετών είναι μάλλον διατηρημένες. Μεταξύ των διαφόρων τύπων γνωστών συνδέσεων, συμπεριλαμβανομένων C-, N-, O- και S-συνδέσεων, οι N- και O-συνδεδεμένες γλυκοπρωτεΐνες είναι αυτές που πιο συχνά συναντώνται και που έχουν πιο εκτενώς ερευνηθεί.

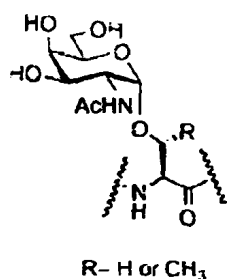
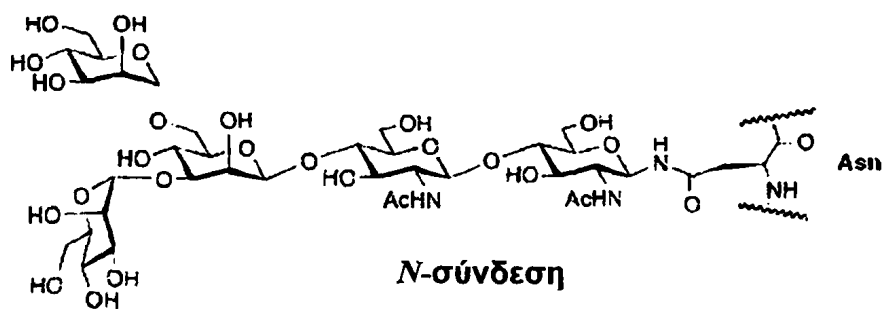
Στις N-συνδεδεμένες γλυκοπρωτεΐνες, οι ολιγοσακχαρίτες προσδένονται μέσω του αναγωγικού τους άκρου στην αμιδική ομάδα της παράπλευρης αλυσίδας μιας ασπαραγίνης. In vino, η N-γλυκοζυλίωση λαμβάνει χώρα μόνο σε κατάλοιπα ασπαραγίνης που αποτελούν μέρος μιας αλληλουχίας του τύπου Asn-Xxx-Ser/Thr, όπου Xxx μπορεί να είναι οποιοδήποτε αμινοξύ εκτός από προλίνη. Διάφορες ενζυμικές αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα για να σχηματιστεί κατά περίπτωση η τελική υδατανθρακική δομή, αλλά η βασική μονάδα σακχάρου σε αυτές τις N- γλυκοπρωτεΐνες είναι πάντα ο ίδιος πεντασακχαρίτης (σχήμα 5).

Στις O-συνδεδεμένες γλυκοπρωτεΐνες, οι ολιγοσακχαρίτες συνήθως προσδένονται στην παράπλευρη αλυσίδα σερίνης και θρεονίνης και πιο σπάνια τυροσίνης. Στο σχήμα 5 απεικονίζεται η βασική δομική μονάδα αυτών των γλυκοπρωτεϊνών πάνω στην οποία με ενζυμική δράση οικοδομείται η τελική δομή του ολιγοσακχαρίτη [106].

Ετερογένεια-γλυκομορφές

Μια σημαντική και μοναδική ιδιότητα των φυσικών γλυκοπρωτεϊνών είναι η μικροετερογένειά τους ως αποτέλεσμα του γεγονότος ότι η βιοσύνθεση των ολιγοσακχαριτών περιλαμβάνει μια σειρά ενζυμικών αντιδράσεων που δεν καθοδηγούνται από ένα εκμαγείο ούτε ελέγχονται μεταγραφικά. Επομένως, η διαδικασία αυτή μπορεί εύκολα να επηρεαστεί από συνθήκες όπως το επίπεδο της ενζυμικής δραστηριότητας ή η διαθεσιμότητα του υποστρώματος και τελικά κάθε γλυκοπρωτεΐνη μπορεί να έχει πολλές διαφορετικές γλυκομορφές οι οποίες διαφέρουν μόνο στη δομή του ολιγοσακχαρίτη. Οι γλυκομορφές αυτές διαχωρίζονται εξαιρετικά δύσκολα οπότε είναι σχεδόν αδύνατο να ληφθούν ομογενείς γλυκομορφές φυσικών γλυκοπρωτεϊνών [106].





α-O-GlcNAc-Ser/Thr

O-σύνδεση

Σχήμα 5. Οι βασικές δομικές μονάδες N- και O-συνδεδεμένων γλυκοπρωτεϊνών

Στρατηγικές σύνθεσης γλυκοπεπτιδίων/γλυκοπρωτεϊνών

Η ανάγκη για καλά καθορισμένες, ομογενείς γλυκομορφές οδήγησε στην ανάπτυξη μεθόδων σύνθεσης γλυκοπεπτιδίων και γλυκοπρωτεϊνών. Αν και έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος προς την κατεύθυνση αυτή, η χημική σύνθεση παραμένει μια διαδικασία αρκετά πολύπλοκη, επίπονη και χρονοβόρα απαιτώντας τη χρήση και τον επιδέξιο χειρισμό προστατευτικών ομάδων, τόσο στο πεπτιδικό όσο και στο υδατανθρακικό τμήμα, για τοπο- και στερεοεκλεκτικές γλυκοζυλιώσεις. Τα πράγματα περιπλέκονται ακόμα περισσότερο αν λάβει κανείς υπόψη του την ευαισθησία των γλυκοζιτικών δεσμών στα οξέα και την αυξημένη δυσκολία σύνθεσης και πρόσδεσης σε μια πεπτιδική αλυσίδα σύνθετων ολιγοσακχαριτών.

Η ενζυμική σύνθεση αποτελεί μια εναλλακτική λύση αντιμετώπισης κάποιων από τα παραπάνω προβλήματα όμως και αυτή υπόκειται σε περιορισμούς προερχόμενους κυρίως από τον περιορισμένο αριθμό διαθέσιμων, κατάλληλων ενζύμων. Ωστόσο, ο συνδυασμός

συνθετικών και ενζυμικών τεχνικών αποδεικνύεται αρκετά αποτελεσματικός στην παρασκευή γλυκοπρωτεϊνών αξιοσημείωτης πολυπλοκότητας.

Γ. ΝΕΟΓΛΥΚΟΠΕΠΤΙΔΙΑ

Εισαγωγή

Δεδομένων των δυσκολιών που προαναφέρθηκαν για τη σύνθεση φυσικών γλυκοπεπτιδίων/γλυκοπρωτεϊνών και εξετάζοντας το θέμα από θεραπευτική σκοπιά (οι φυσικές γλυκοπρωτεΐνες είναι πιθανό να στερούνται σταθερότητας ή βιοδιαθεσιμότητας διότι αποικοδομούνται γρήγορα από ένζυμα, ενώ είναι ασταθείς στο ισχυρά όξινο γαστρικό περιβάλλον) αντιλαμβάνεται κανείς ότι η ανάπτυξη γλυκοπεπτιδικών μιμητικών αναλόγων αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική προσέγγιση.

Τα ανάλογα αυτά, τα οποία καλούνται συχνά και νεογλυκοπεπτιδία, θεωρούνται μιμητικά διότι φέρουν έναν ή περισσότερους μη-φυσικούς δεσμούς είτε μεταξύ σακχάρου-πεπτιδίου είτε μεταξύ των σακχάρων του ολιγοσακχαρίτη. Θεωρείται, επίσης, ότι πλεονεκτούν έναντι των αντίστοιχων φυσικών δομών ως θεραπευτικά μέσα και αυτό γιατί μπορούν να σχεδιαστούν έτσι ώστε να είναι πιο σταθερά έναντι αποικοδομητικών ενζύμων, να έχουν βελτιωμένη βιοδιαθεσιμότητα και πιθανόν μεγαλύτερη συγγένεια και εκλεκτικότητα για τους σχετικούς υποδοχείς, ενώ πολύ συχνά μπορούν να συντεθούν με αξιόλογη απλότητα και ευκολία. Όσον αφορά στη σύνθεση των γλυκοπεπτιδομιμητικών, οι χημειοεκλεκτικές μέθοδοι σύνδεσης τυχάνουν ευρείας εφαρμογής καθώς παρέχουν πολλές δυνατότητες και εναλλακτικές μεθοδολογίες, αποδεικνυόμενες έτσι ιδιαίτερα εύχρηστες και αποτελεσματικές [108-111].

Σύνθεση γλυκοπεπτιδικών μιμητικών αναλόγων με χημειοεκλεκτικές μεθόδους

Οι χημειοεκλεκτικές τεχνικές που έχουν αναπτυχθεί για τη σύνθεση νεογλυκοπεπτιδίων κατατάσσονται σε δυο μεγάλες κατηγορίες: σε αυτές που περιλαμβάνουν την αντίδραση μιας καρβονυλομάδας (αλδεϋδης ή κετόνης) με ισχυρά πυρηνόφιλα και σε αυτές που λαμβάνει χώρα προσθήκη ενός θειο-πυρηνόφιλου σε ποικιλία ηλεκτρονιόφιλων ομάδων [108]. Στη συνέχεια, περιγράφονται αναλυτικά οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα για τη σύνθεση γλυκοπεπτιδίων που φέρουν μη φυσικούς δεσμούς που μιμούνται τόσο τις N- και O-συνδέσεις πεπτιδίων-σακχάρων όσο και τους γλυκοζιτικούς δεσμούς σακχάρων-σακχάρων μεταξύ των δομικών μονάδων ενός ολιγοσακχαρίτη.

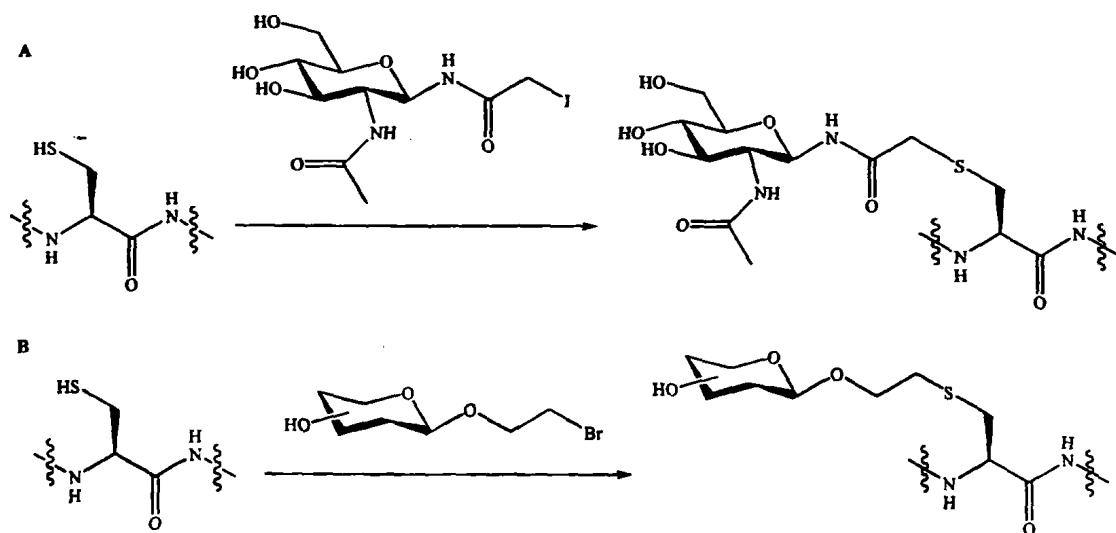


ε) Μη φυσικός δεσμός μεταξύ πεπτιδίου-σακχάρου

Πεπτίδια που φέρουν Cys(-SH)

1 Ηλεκτρονιόφιλοι γλυκοζίτες, σχηματισμός θειοαιθέρα ή θειοεστέρα

Η πυρηνόφιλη προσθήκη μιας σουλφυδρυλικής ομάδας ενός καταλοίπου κυστεΐνης σε έναν ηλεκτρονιόφιλο υδατάνθρακα οδηγεί στο σχηματισμό ενός θειοαιθερικού ή θειοεστερικού δεσμού μεταξύ πεπτιδίου-σακχάρου. Ο ηλεκτρονιόφιλος υδατάνθρακας μπορεί να είναι ένας βρωμοαιθύλο γλυκοζίτης ή πιο συχνά ένας α-αλογονοακεταμίδο γλυκοζίτης που εκκλύπτει εύκολα από μη προστατευμένους, ελεύθερους ολιγοσακχαρίτες μέσω ενδιάμεσων γλυκοζυλαμινών [109, 112, 113].



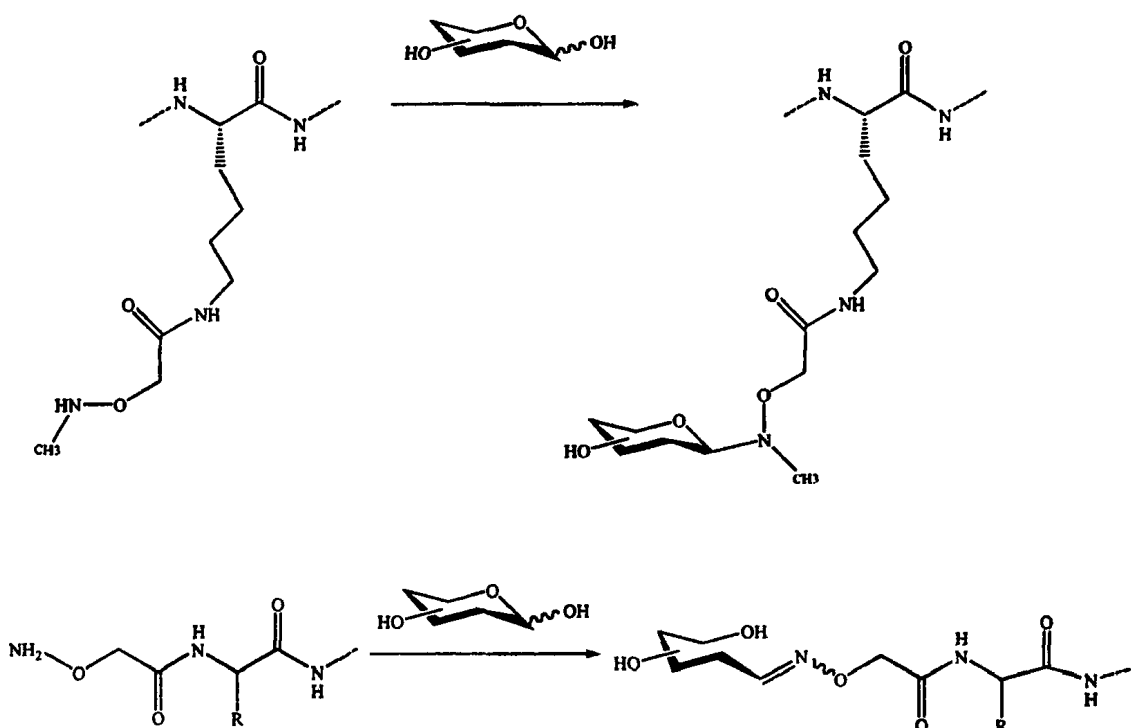
Σχήμα 6. Χημειοεκλεκτική τροποποίηση παράπλευρης αλυσίδας κυστεΐνης στη συγκρότηση γλυκοπεπτιδικών μιμητικών. (A) Αλκυλίωση κυστεΐνης με α-αλογονοακεταμιδοσάκχαρα. (B) Αλκυλίωση κυστεΐνης με βρωμοαιθυλογλυκοζίτες.

2. Πεπτίδια τροποποιημένα με Πυρηνόφιλες ομάδες

Πεπτίδια που φέρουν σε επιλεγμένες θέσεις πυρηνόφιλες ομάδες που δεν υπάρχουν στις φυσικές πρωτεΐνες, όπως αμινοοξυ- ή υδραζινο-ομάδες μπορούν να αντιδράσουν εκλεκτικά με σάκχαρα, όπως περιγράφεται στις επόμενες δυο παραγράφους, προς σχηματισμό γλυκοπεπτιδίων μέσω δεσμών οξίμης ή υδραζόνης, αντίστοιχα.

□ Ελεύθερο αναγωγικό σάκχαρο/ολιγοσακχαρίτης

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα αναγωγικά σάκχαρα, λόγω του φαινομένου του πολυστροφισμού, βρίσκονται σε ισορροπία μεταξύ κυκλικής ημιακεταλικής μορφής και της δομής ανοικτής αλυσίδας, όπου φέρουν στον ανωμερικό άνθρακα μια αλδεϋδομάδα. Η αλδεϋδομάδα αυτή μπορεί να αντιδράσει εκλεκτικά με μια αμινοοξυ- ή υδραζινο- πεπτιδική ομάδα προς σχηματισμό γλυκοπεπτιδικών αναλόγων με δεσμό οξίμης ή υδραζόνης στο σημείο πρόσδεσης σακχάρου-πεπτιδίου [114, 115]. Η περίπτωση αυτή εξετάζεται διεξοδικά στο Κεφάλαιο 7.



Σχήμα 7. Συγκρότηση γλυκοπεπτιδικών αναλόγων με σχηματισμό δεσμού οξίμης μεταξύ ενός ελεύθερου αναγωγικού σακχάρου και (Α) μιας N-μεθυλοαμινοοξυακετυλο τροποποιημένης παράπλευρης αλυσίδας λυσίνης, και (Β) μιας αμινοοξυακετυλο τροποποιημένης α-αμινομάδας

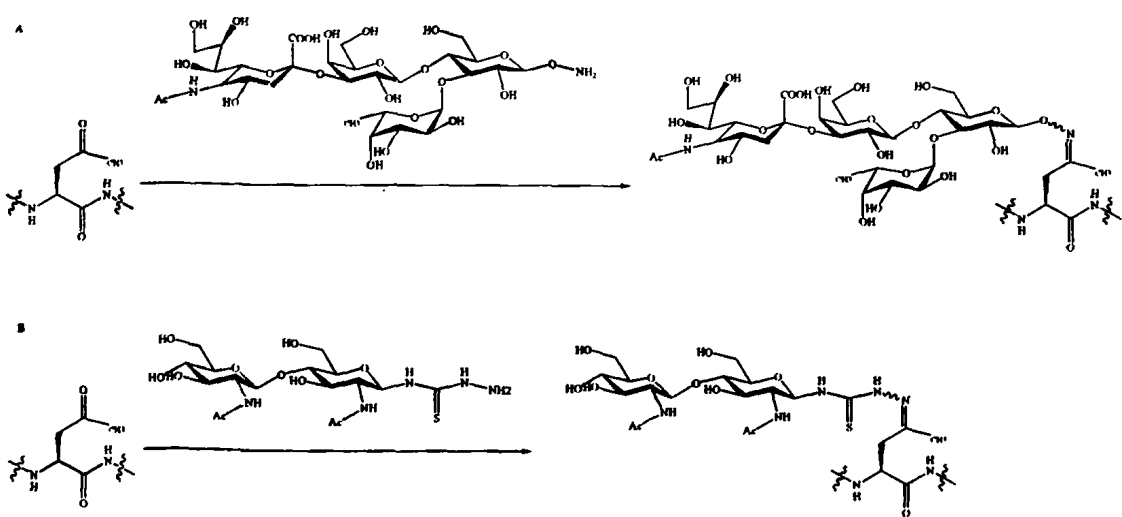
□ C-γλυκοζίτης

Ένα σάκχαρο μπορεί να μετατραπεί σε έναν C-γλυκοζίτη όπου ο O-γλυκοζιτικός δεσμός έχει αντικατασταθεί από έναν πιο σταθερό C-γλυκοζιτικό δεσμό ο οποίος μπορεί να ενώνει ένα σάκχαρο με μια καρβονυλομάδα. Η αντίδραση μιας τέτοιας ομάδας με μια αμινοοξυ ή υδραζινο ομάδα ενός πεπτιδίου οδηγεί στο σχηματισμό O- και N-γλυκοπεπτιδικών αναλόγων

που ο φυσικός γλυκοζιτικός δεσμός έχει αντικατασταθεί από έναν δεσμό οξίμης ή υδραζόνης [116-118].

β. Πεπτίδια τροποποιημένα με Ηλεκτρονιόφιλες ομάδες

Αυτή η περίπτωση αποτελεί αντιστροφή της προηγούμενης και συνίσταται στην εισαγωγή σε ένα πεπτίδιο μιας ηλεκτρονιόφιλης ομάδας, συνήθως μιας καρβονυλομάδας, η οποία δεν απαντάται φυσικά στα πεπτίδια και τις πρωτεΐνες, και η οποία μπορεί να αντιδράσει εκλεκτικά με σάκχαρα ή ολιγοσακχαρίτες που φέρουν αμινοξυ, υδραζίδιο ή θειοσεμικαρβαζίδιο πυρηνόφιλες ομάδες στην ανωμερική θέση. Τα παράγωγα αυτά μπορούν εύκολα να ληφθούν μέσω ενδιάμεσων γλυκοζυλαμίνης από μη προστατευμένους, ελεύθερους ολιγοσακχαρίτες οι οποίοι με τη σειρά τους μπορούν να απομονωθούν από φυσικές πηγές [119-121].



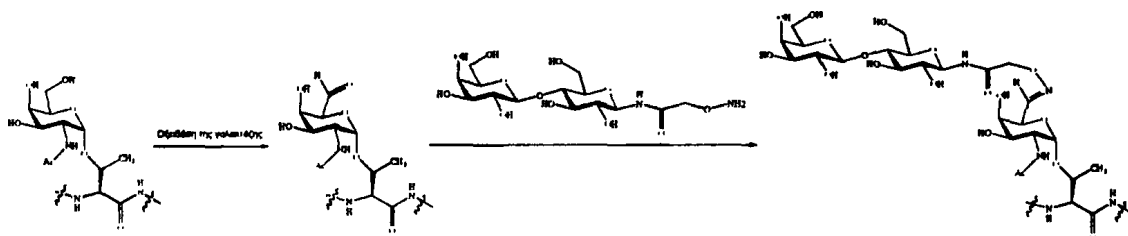
Σχήμα 8. Χημειοεκλεκτική συγκρότηση γλυκοπεπτιδικών αναλόγων με σχηματισμό (Α) δεσμού οξίμης μέσω πεπτιδικής καρβονυλομάδας και αμινοξυ-τροποποιημένου σακχάρου στην ανωμερική θέση, και (Β) δεσμού θειοσεμικαρβαζόνης μέσω πεπτιδικής καρβονυλομάδας και θειοσεμικαρβαζιδιο-τροποποιημένου σακχάρου στην ανωμερική θέση

β) Μη φυσικός δεσμός μεταξύ σακχάρου-σακχάρου

Αν και η σχέση δομής (διαμόρφωσης)-βιολογικής δράσης, όσον αφορά στην αντικατάσταση φυσικών δεσμών σακχάρων-πεπτιδίων από μη φυσικούς, δεν έχει σε βάθος μελετηθεί, υπάρχουν μελέτες που αποδεικνύουν ότι μια τέτοια αντικατάσταση δεν επιφέρει δραματικές αλλαγές στη λειτουργία των γλυκοπεπτιδίων ή των γλυκοπρωτεϊνών.

Σε μερικές περιπτώσεις, η απώλεια του φυσικού τρόπου σύνδεσης σακχάρου-πεπτιδίου μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη βιοδραστικότητα της γλυκοπρωτεΐνης διότι αυτή η απώλεια μπορεί να επηρεάζει τη δομή του ολιγοσακχαρίτη αυτού καθαυτού ή του πεπτιδικού τμήματος στο οποίο είναι προσδεμένος αυτός ο ολιγοσακχαρίτης.

Οι παρατηρήσεις αυτές έχουν στρέψει το ενδιαφέρον στην παρασκευή γλυκοπεπτιδομιμητικών όπου ένας μη φυσικός δεσμός αντικαθιστά έναν γλυκοζιτικό δεσμό μεταξύ των σακχαρικών μονάδων ενός ολιγοσακχαρίτη, με τρόπους ανάλογους με αυτούς που περιγράφηκαν παραπάνω. Ένα τέτοιο παράδειγμα δίνεται στο σχήμα 9 [109, 111].



Σχήμα 9. Σύνθεση γλυκοπεπτιδικού μιμητικού όπου μια χημειοεκλεκτική σύνδεση αντικαθιστά έναν γλυκοζιτικό δεσμό: δημιουργία αλδεϋδης στην C-6 θέση μιας N-ακετυλο-γαλακτόζης με δράση του ενζύμου οξειδάση της γαλακτόζης ακολουθούμενη από σύζευξη με ένα αμινοοξυτροποποιημένο σάκχαρο προς σχηματισμό προϊόντος οξίμης.

Οι χημειοεκλεκτικές στρατηγικές που βασίζονται στις αντιδράσεις καρβονυλομάδων με πυρηνόφιλα είναι τοπο-εκλεκτικές (site-selective) δεδομένου ότι αυτές οι ομάδες δεν υπάρχουν φυσικά στις πρωτεΐνες οπότε από τη στιγμή που θα εισαχθούν σε μια συγκεκριμένη θέση μπορούν ελεγχόμενα να γλυκοζυλιωθούν. Επιπλέον, αυτές οι αντιδράσεις είναι ορθογωνικές ως προς τις θειο-αλκυλιώσεις επιτρέποντας την ταυτόχρονη πρόσδεση δυο διαφορετικών ολιγοσακχαριτών σε καρβονυλο- και σουλφυδρυλομάδες που συνυπάρχουν σε ένα πεπτίδιο.



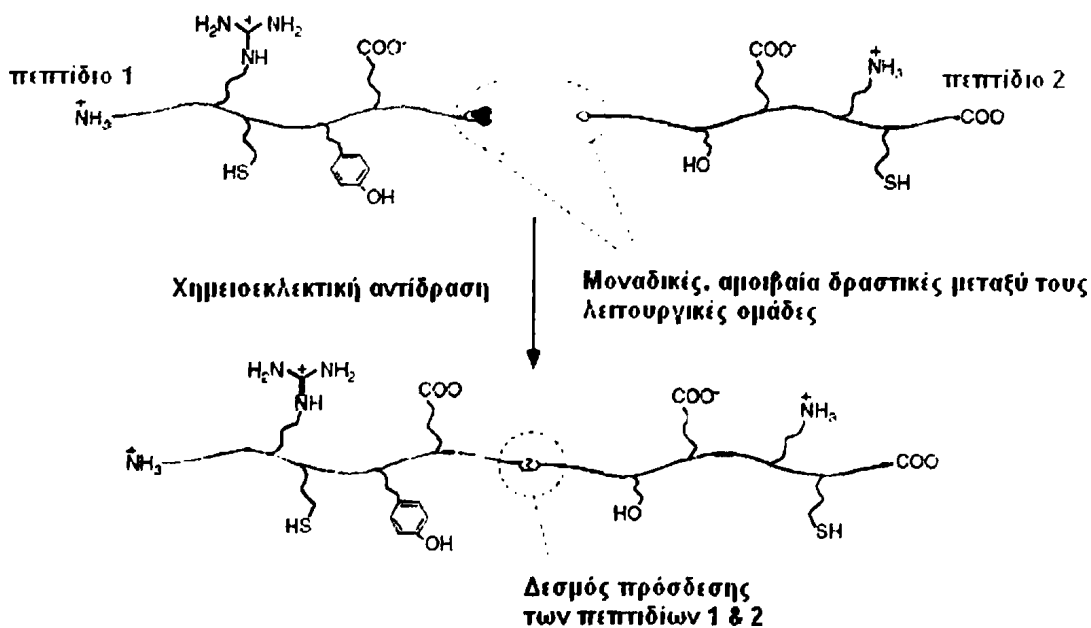
Χημειοεκλεκτική Σύνδεση Πεπτιδίων - Γλυκοπεπτιδίων:
Δεσμός Οξίμης

A. Χημειοεκλεκτική σύνδεση πεπτιδίων

Εισαγωγή

Η ανάγκη σύνθεσης και μελέτης πολύπλοκων πρωτεϊνικών μορίων, συνήθως μεγέθους 50 ή και περισσότερων αμινοξέων, καθιστά τις κλασικές μεθόδους πεπτιδικής σύνθεσης ανεπαρκείς, κυρίως λόγω του γεγονότος ότι επιτρέπουν τη λήψη του επιθυμητού προϊόντος με πολύ χαμηλή συνήθως απόδοση. Προκειμένου να παρακαμφθεί αυτό το σοβαρό μειονέκτημα, η σύνθεση μεγάλων πρωτεϊνών βασίστηκε σε χημειοεκλεκτικές αντιδράσεις σύνδεσης (chemoselective ligation) μη-προστατευμένων πεπτιδικών τμημάτων.

Η χημική σύνθεση πεπτιδίων και πρωτεϊνών μέσω χημειοεκλεκτικών αντιδράσεων (σχήμα 1) βασίζεται σε δυο αρχές. Πρώτον, στη χρήση μη προστατευμένων πεπτιδικών τμημάτων και δεύτερον στην αξιοποίηση χημειοεκλεκτικών αντιδράσεων για τη σύνδεση αυτών των τμημάτων μεταξύ τους με σκοπό τη λήψη τελικά μεγαλύτερων και πιο πολύπλοκων πολυπεπτιδικών αλυσίδων.



Σχήμα 1. Αρχή χημειοεκλεκτικής σύνδεσης (chemoselective ligation)

Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος βασίζεται στη χρήση μοναδικών (unique), αμοιβαία (mutually) δραστικών μεταξύ τους λειτουργικών ομάδων που δεν απαντώνται φυσιολογικά στα πεπτίδια ή στις πρωτεΐνες και που επιτρέπουν έτσι την τοπο-ειδική σύνδεση πλήρως απροστάτευτων πεπτιδικών τμημάτων που οδηγεί στη σύνθεση μεγάλου μήκους πολυπεπτιδικών αλυσίδων [122-125]. Οι αντιδράσεις αυτές λαμβάνουν χώρα σε υδατικά διαλύματα, συνήθως ρυθμιστικά διαλύματα παρουσία και οργανικών διαλυτών για τη βελτίωση της διαλυτότητας των πεπτιδίων.

Τα πρόδρομα πεπτιδικά μόρια που συντίθενται χωριστά έχουν μικρότερο μοριακό βάρος και αυτό αφενός μεν μειώνει κατά πολύ τα παραπροϊόντα κατά τη σύνθεσή τους, αφετέρου δε λαμβάνονται σε υψηλή σχετικά απόδοση μετά τον καθαρισμό τους με χρωματογραφικές τεχνικές. Επιπλέον, το γεγονός ότι δεν φέρουν προστατευτικές ομάδες αυξάνει σημαντικά τη διαλυτότητά τους σε υδατικά διαλύματα, γεγονός που είναι πολύ σημαντικό για τη χημειοεκλεκτική αντίδραση στην οποία θα λάβουν μέρος στη συνέχεια. Τέλος, στα πλεονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλέγεται και το γεγονός ότι στις χημειοεκλεκτικές αντιδράσεις δεν υφίσταται το πρόβλημα της ρακεμοποίησης.

Το κόστος που συνεπάγεται η ευκολία και η ευρύτατη εφαρμογή της μεθόδου, είναι η παρουσία ενός μη φυσικού πεπτιδικού δεσμού στο σημείο της πρόσδεσης των πεπτιδικών τμημάτων. Ακόμα και αυτό όμως δεν αποτελεί τελικά ιδιαίτερο πρόβλημα καθώς μελέτες έχουν δείξει πως οι πρωτεΐνες που συντίθενται με αυτόν τον τρόπο παραμένουν εξίσου δραστικές [126-128]. Υπάρχει και μια κατηγορία αντιδράσεων αυτού του τύπου οι οποίες οδηγούν τελικά στη δημιουργία αμιδικού δεσμού στο σημείο σύνδεσης των πεπτιδικών τμημάτων, μέσω μιας ενδομοριακής μετάθεσης ακυλίου (Native Ligation) [129-131].

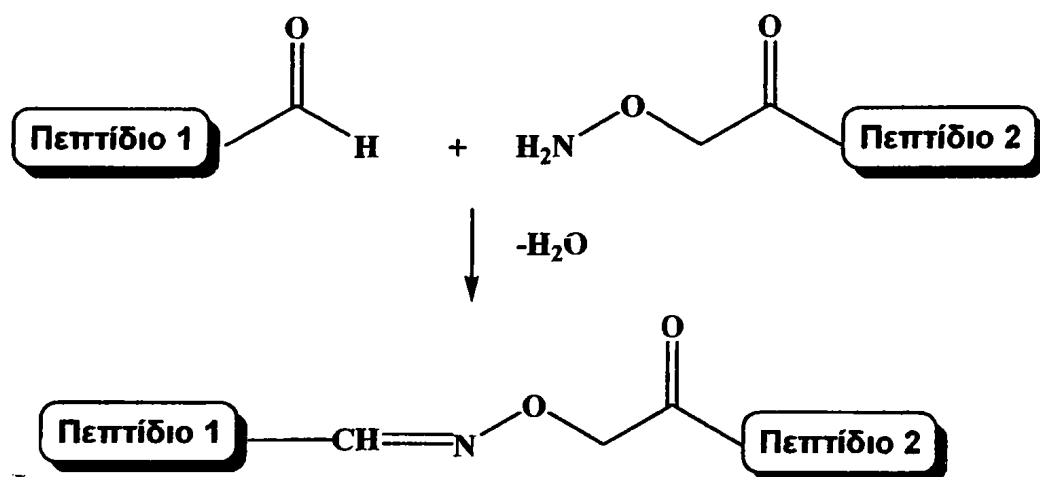
Τελικά, οι παράμετροι που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη και που αποτελούν κατά κάποιο τρόπο περιορισμούς της μεθόδου είναι η δυσδιαλυτότητα ορισμένων πεπτιδίων, που παρόλα αυτά πολλές φορές υπάρχει, καθώς και η επιλογή των αμινοξικών καταλοίπων στη θέση σύνδεσης των δυο πεπτιδικών τμημάτων.

Μια μεγάλη ποικιλία αντιδράσεων χημειοεκλεκτικής σύνδεσης έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στη χημική σύνθεση πολυπεπτιδίων και πρωτεϊνών και οδηγούν στο σχηματισμό δεσμών οξίμης [132-138], υδραζόνης [139], θειοαιθέρα [140-142], θειοεστέρα [143], θειαζολιδίνης [144] κλπ.



Ο δεσμός οξίμης

Ο δεσμός οξίμης (-CH=N-O-) είναι ένας ψευδο-πεπτιδικός δεσμός, ψ(-CH=N-O-), που σχηματίζεται μεταξύ μιας καρβονυλικής ομάδας αλδεύδης ή κετόνης και ενός παραγώγου υδροξυλαμίνης, συνήθως μιας αμινοξυακετυλιωμένης ομάδας (NH₂-O-CH₂CO-).



Σχήμα 2. Σχηματισμός δεσμού οξίμης

Στην περίπτωση που οι παραπάνω χαρακτηριστικές ομάδες έχουν εισαχθεί κατάλληλα σε δυο πεπτιδικά τμήματα, τότε η μεταξύ τους αντίδραση οδηγεί στη χημιοεκλεκτική πρόσδεση των πεπτιδικών τμημάτων με σχηματισμό ενός δεσμού οξίμης μεταξύ αυτών. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατόν να ληφθούν σχετικά εύκολα, γρήγορα και με ικανοποιητική απόδοση πρωτεϊνικά μακρομόρια που φέρουν έναν ή περισσότερους δεσμούς οξίμης αντί για πεπτιδικούς δεσμούς στα σημεία πρόσδεσης των πεπτιδικών τμημάτων.

Ο δεσμός της οξίμης δημιουργείται εκλεκτικά σε ελαφρά όξινο (pH 4,0-5,5) έως αρκετά όξινο (pH 2,0-3,0) διάλυμα σε μια αντίδραση πυρηνόφιλης προσθήκης στον καρβονυλικό άνθρακα της αλδεϋδικής ομάδας. Σε αυτές τις συνθήκες pH όλες οι ισχυρώς βασικές, πυρηνόφιλες ομάδες των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων, που συναγωνίζονται με την αμινοξυ-ομάδα, παραμένουν πρωτονιωμένες και επομένως μη δραστικές (καθίστανται ασθενή έως καθόλου πυρηνόφιλα). Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η μόνη διαθέσιμη πυρηνόφιλη ομάδα για να αντιδράσει με την ηλεκτρονιόφιλη καρβονυλομάδα είναι, η ασθενώς βασική αμινοξυακετυλομάδα, που παραμένει μη πρωτονιωμένη. Με άλλα λόγια, το γειτονικό ηλεκτρονιοελεκτικό άτομο οξυγόνου (alpha effect) καθιστά το πυρηνόφιλο

άτομο αζώτου της αμινοξυ-ομάδας λιγότερο βασικό αλλά περισσότερο πυρηνόφιλο από μια αμινο-ομάδα. [112].

Η αντίδραση σχηματισμού οξίμης λαμβάνει χώρα σχετικά γρήγορα και ανάλογα με το μέγεθος και την πολυπλοκότητα των πεπτιδικών τμημάτων μπορεί κατά περίπτωση να βελτιστοποιηθεί αν παράλληλα με το ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιηθούν και οργανικοί συνδιαλύτες ή μίγματα οργανικών συνδιαλυτών (CH_3CN , DMSO, DMF, υδροχλωρική γουανιδίνη). Επιπλέον, το pH του διαλύματος καθώς και η ελαφρά θέρμανση αποτελούν παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση της αντίδρασης [145].

Στερεοχημεία δεσμού οξίμης

Καθώς ο σχηματιζόμενος διπλός δεσμός $\text{C}=\text{N}$ περιορίζει την ελεύθερη περιστροφή των υποκαταστατών γύρω από αυτόν, τα πεπτίδια οξίμης υφίστανται ως syn- και anti-ισομερή. Η αντίδραση σχηματισμού οξίμης μάλλον δεν είναι στερεοειδική ή, καλύτερα, η στερεοεκλεκτικότητα της αντίδρασης εξαρτάται από τις συνθήκες. Το πιθανότερο είναι ότι λαμβάνεται ένα μίγμα των δυο ισομερών, γεγονός που μπορεί να γίνει αντιληπτό στην RP-HPLC με την εμφάνιση δυο γειτονικών κορυφών που αντιστοιχούν, κατόπιν ταυτοποίησης με φασματομετρία μάζας, στο ίδιο μοριακό βάρος.

Μελέτες σε πεπτιδικά μοντέλα με φασματοσκοπία IR και NMR έδειξαν ότι γενικά λαμβάνεται το E- ή anti- ισομερές το οποίο όμως μπορεί προοδευτικά και κάτω από την επίδραση ισχυρά όξινων συνθηκών να μετατραπεί στο Z- ή syn- ισομερές [146]. Προφανώς, η ύπαρξη των δυο ισομερών έχει ως αποτέλεσμα και τη διαφορετική διαμόρφωση στο χώρο (δευτεροταγής δομή) του συνολικού πεπτιδικού-πρωτεϊνικού μορίου.

Σταθερότητα δεσμού οξίμης

Ο δεσμός της οξίμης είναι σταθερός στην περιοχή pH όπου δημιουργείται (4,0-5,5), ενώ έχει προταθεί στη βιβλιογραφία ότι πολύ καλά αποτελέσματα λαμβάνονται ακόμα και σε χαμηλότερες τιμές pH, έως την τιμή 2,1 [147]. Επιπλέον, ο δεσμός που σχηματίζεται έχει δείξει πως δεν είναι σταθερός σε υψηλές τιμές pH (>8), ενώ δεν υπάρχουν ενδείξεις μη σταθερότητας στη φυσιολογική περιοχή (pH~7).



Εκλεκτική εισαγωγή της αμινοξυακετυλομάδας

Η αμινοξυακετυλομάδα εισάγεται σε ένα πεπτιδίο με μια αντίδραση ακετυλίωσης με τρόπο παρόμοιο με την εισαγωγή προστατευμένων αμινοξέων, σύμφωνα με τις αρχές της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση.

Το παράγωγο που συνήθως χρησιμοποιείται για αυτό το σκοπό είναι το Boc-προστατευμένο αμινοξυ-οξικό οξύ (Boc-NHOCH₂COOH ή Boc-Aoa-OH) σε συνδυασμό με N,N-δισοπροπυλοκαρβοδιιμίδιο/1-υδροξυβενζοτριάζολιο (DIC/HOBt) για την ενεργοποίηση του καρβοξυλίου [148]. Με τον τρόπο αυτό λαμβάνει χώρα ακετυλίωση της επιθυμητής αμινομάδας, είτε αυτή βρίσκεται στο αμινο-άκρο του πεπτιδίου είτε στην παράπλευρη αλυσίδα μιας λυσίνης.

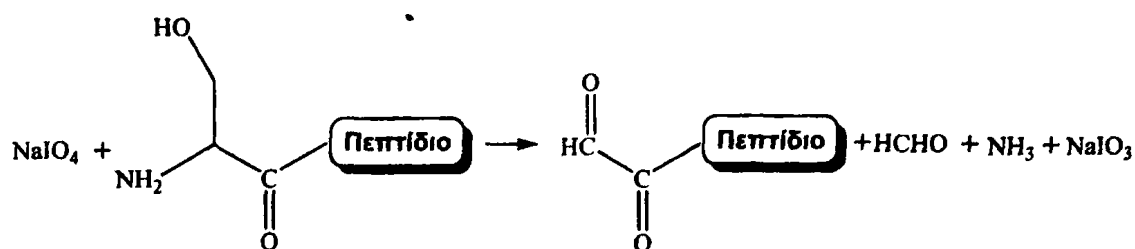
Εναλλακτικά, η αμινοξυακετυλομάδα είναι δυνατό να εισαχθεί στην πεπτιδική αλυσίδα κάνοντας χρήση του ηλεκτριμιδικού εστέρα του Boc-προστατευμένου αμινοξυ-οξικού οξέος (Boc-NHOCH₂COOSu) παρουσία N-μεθυλομορφολίνης [137].

Η χρήση του παραγώγου Boc-Aoa-OH είναι συμβατή τόσο με την Fmoc/tBu όσο και με την Boc/Bzl μεθοδολογία σύνθεσης πεπτιδίων. Η απομάκρυνση της Boc-προστατευτικής ομάδας πραγματοποιείται κατά την αποκοπή του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερικό υπόστρωμα με διάλυμα TFA ή HF, αντίστοιχα, και η αμινοξυακετυλομάδα που ελευθερώνεται με αυτόν τον τρόπο αντιδρά γρήγορα και εκλεκτικά με την καρβονυλική ομάδα αλδευδών ή κετονών προς σχηματισμό δεσμού οξίμης. Η αντίδραση αυτή είναι πολύ ευαίσθητη και για το λόγο αυτό πρέπει να δίνεται μεγάλη προσοχή στην αποφυγή ανεπιθύμητων αντιδράσεων με ίχνη αλδευδών ή κετονών που απαντώνται στους διαλύτες, που παραμένουν στα εργαστηριακά σκεύη κατά τον καθαρισμό ή που συνυπάρχουν ως παραπροϊόντα κατά τη σύνθεση των αλδευδικών πεπτιδικών τμημάτων [149].

Εκλεκτική εισαγωγή της καρβονυλομάδας

Η καρβονυλομάδα που απαιτείται να αντιδράσει με την αμινοξυακετυλομάδα ώστε να δημιουργηθεί ο δεσμός οξίμης, συνήθως προέρχεται από μια αλδεύδη και σπανιότερα από κετόνη. Το γεγονός αυτό πιθανότατα οφείλεται στην ευκολία με την οποία είναι δυνατόν να δημιουργηθεί η αλδευδική ομάδα σε μια πεπτιδική αλυσίδα, προερχόμενη από την οξειδωση ενός καταλοίπου σερίνης ή θρεονίνης στο αμινο-άκρο του πεπτιδίου. Η μέθοδος στηρίζεται στην πολύ γρήγορη οξειδωση της 2-αμινο-αλκοολικής ομάδας αυτών των καταλοίπων από το υπεριοδικό ανιόν προς σχηματισμό μιας αλδευδικής ομάδας (Σχήμα 3) [150].





Σχήμα 3. Οξείδωση σερίνης από υπεριωδικό νάτριο.

Η 2-αμινο-αλκοολική ομάδα στην οποία μπορεί να επιδράσει το υπεριωδικό υφίσταται σε ένα πεπτίδιο όταν η σερίνη ή η θρεονίνη βρίσκονται στο N-άκρο του πεπτιδίου ή όταν αυτά τα αμινοξέα είναι προσδεμένα στην παράπλευρη αλυσίδα μιας λυσίνης, η οποία μπορεί να βρίσκεται σε οποιαδήποτε θέση στην πεπτιδική αλληλουχία με επικρατέστερη το C-άκρο ενός πεπτιδίου. Η δεύτερη προσέγγιση τυγχάνει ευρείας εφαρμογής στη σύνθεση πρωτεϊνικών μακρομορίων διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής.

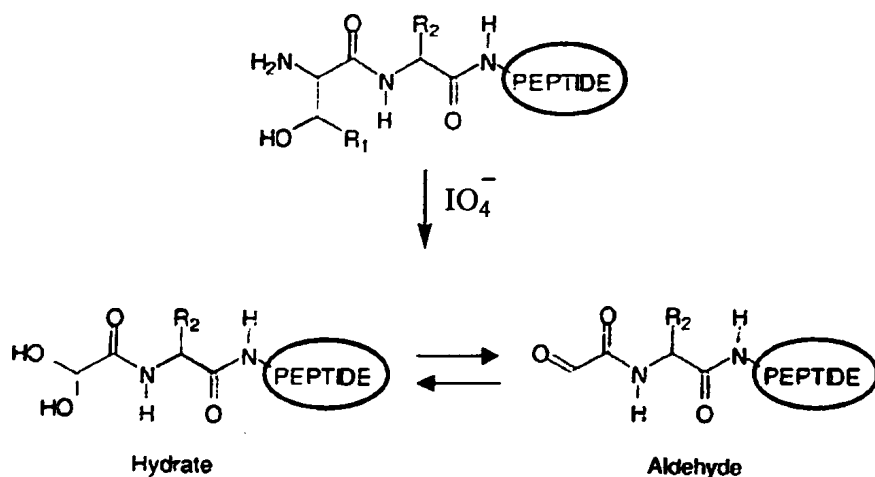
Η οξείδωση της 2-αμινο-αλκοολικής ομάδας από το IO_4^- είναι μια πολύ γρήγορη και εκλεκτική αντίδραση παρόλο που και άλλες παράπλευρες ομάδες δυνητικά υπόκεινται σε οξείδωση. Μεταξύ των πιο ευαίσθητων στην οξείδωση αμινοξέων (τυροσίνη, τρυπτοφάνη, ιστιδίνη, μεθειονίνη, κυστεΐνη) η κυστεΐνη είναι σχεδόν σίγουρο ότι πολύ γρήγορα θα οξειδωθεί και για το λόγο αυτό είναι προτιμότερο να μην είναι παρούσα στην πεπτιδική αλληλουχία. Ο θειοαιθέρας της μεθειονίνης υπόκειται επίσης οξείδωση από το υπεριωδικό προς το αντίστοιχο σουλφοξείδιο όμως η ανεπιθύμητη αυτή αντίδραση μπορεί να περιοριστεί σε ήπιες συνθήκες οξείδωσης. Έτσι λοιπόν, έχει βρεθεί ότι σε ουδέτερο pH και χρησιμοποιώντας πολύ μικρή μοριακή αναλογία (<2) υπεριωδικού:πεπτιδίου ο σχηματισμός του σουλφοξειδίου είναι περίπου 40 φορές πιο αργός από την οξείδωση της σερίνης ή της θρεονίνης οπότε, αν και δεν μπορεί να αποκλειστεί, ωστόσο αυτή η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε μικρό βαθμό [150, 151]. Όσον αφορά στα υπόλοιπα ευαίσθητα σε οξείδωση αμινοξέα (Tyr, Trp, His), αυτά μπορούν να συνυπάρχουν στην πεπτιδική αλληλουχία χωρίς να υφίστανται αξιόλογη επίδραση από το υπεριωδικό ανιόν.

Η αντίδραση οξείδωσης λαμβάνει χώρα σε ουδέτερο pH, συνήθως σε ρυθμιστικό διάλυμα ιμιδαζολίου-HCl pH 6,9. Το NaIO_4 χρησιμοποιείται σε διπλάσια μοριακή περίσσεια ως προς κάθε 2-αμινο-αλκοολική ομάδα που πρόκειται να οξειδωθεί, ενώ η αντίδραση



ολοκληρώνεται σε διάστημα λίγων λεπτών (1-10) οπότε προστίθεται διάλυμα αιθυλενογλυκόλης για τη δέσμευση της περίσσειας του NaIO_4 [151, 152].

Κατά την απομόνωση του οξειδωμένου πεπτιδίου (γλυοξυλυλοπεπτίδιο), αυτό ανιχνεύεται στην RP-HPLC ως μια κορυφή, ενώ κατά την ταυτοποίηση με φασματομετρία μάζας το μοναδικό αυτό προϊόν εμφανίζει δυο κορυφές, μια που αντιστοιχεί στο επιθυμητό μοριακό ιόν και μια που διαφέρει κατά +18Da. Το φαινόμενο αυτό προκύπτει ως αποτέλεσμα της ισορροπίας μεταξύ της αλδεϋδης και της ένυδρης μορφής της, μιας διόλης, όπως φαίνεται στο σχήμα 4 [150, 153].



Σχήμα 4. Ισορροπία ένυδρης και άνυδρης αλδεϋδης

B. Χημειοεκλεκτική σύνδεση γλυκοπεπτιδίων: Νεογλυκοπεπτίδια

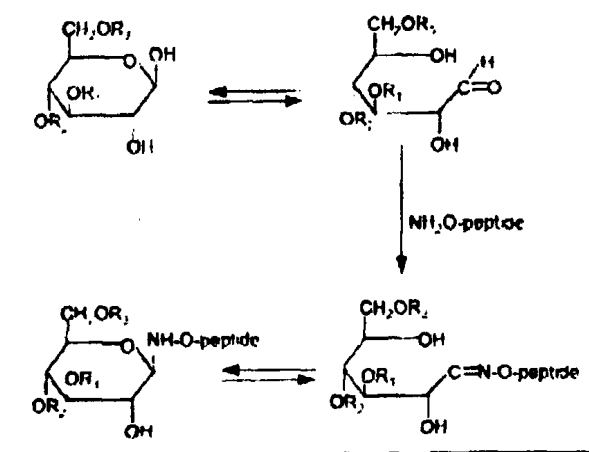
Η αντίδραση χημειοεκλεκτικής σύνδεσης με σχηματισμό δεσμού οξίμης μεταξύ της πολύ δραστηκής αμινομάδας ενός αμινοξυακετυλο-πεπτιδίου και του αναγωγικού άκρου ενός ολιγοσακχαρίτη έχει αποδειχθεί πως είναι μια εξαιρετικά αποτελεσματική προσέγγιση όσον αφορά στα γλυκοσυμπλέγματα.

Η καρβονυλομάδα (συνήθως αλδεϋδομάδα) που υφίσταται στην άκυκλη μορφή των σακχάρων ή των ολιγοσακχαριτών στο αναγωγικό τους άκρο μπορεί χημειοεκλεκτικά να συζευχθεί με μια αμινοξυακετυλομάδα ενός πεπτιδίου οδηγώντας στη λήψη γλυκοπεπτιδικών αναλόγων που φέρουν έναν N-γλυκοζιτικό δεσμό ο οποίος μιμείται τον αντίστοιχο N-

γλυκοζιτικό δεσμό των φυσικών πρωτεϊνών. Τα γλυκοπεπτίδια αυτά ονομάζονται νεογλυκοπεπτίδια ακριβώς επειδή πρόκειται για μιμητικά ανάλογα.

Η μέθοδος αυτή τυγχάνει ευρείας αποδοχής και πληθώρα εφαρμογών της έχει αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία. Όπως όλες οι χημειοεκλεκτικές μέθοδοι σύνθεσης, λαμβάνει χώρα σε υδατικά διαλύματα, χωρίς την παρουσία προστατευτικών ομάδων τόσο στο πεπτιδικό όσο και στο σακχαριτικό τμήμα και χωρίς να απαιτείται οποιαδήποτε ενεργοποίηση.

Το σημαντικό μειονέκτημα που παρουσιάζει αυτή η μεθοδολογία είναι η διαμορφωτική ετερογένεια που εμφανίζουν τα σχηματιζόμενα με αυτόν τον τρόπο γλυκοσυμπλέγματα. Πιο συγκεκριμένα, έχει διαπιστωθεί ότι το παραγόμενο γλυκοπεπτίδιο υφίσταται σε μια ισορροπία μεταξύ της κυκλικής και γραμμικής (κλειστής ή ανοιχτής, αντίστοιχα) μορφής του σακχάρου οι οποίες επιπλέον είναι δυνατόν να βρίσκονται στη μορφή του α- ή β- γλυκοζιτικού δεσμού, όσον αφορά στην κλειστή δομή, καθώς και στη μορφή των E/Z (syn/anti) ισομερών του δεσμού οξίμης, όσον αφορά στην ανοικτή δομή. Γίνεται αντιληπτό, λοιπόν, πως δυνητικά πρόκειται για μια ισορροπία μεταξύ τεσσάρων ισομερών η οποία πιθανά επηρεάζει σημαντικά τη δράση αυτών των αναλόγων και κατ'επέκταση περιορίζει τις εφαρμογές τους.

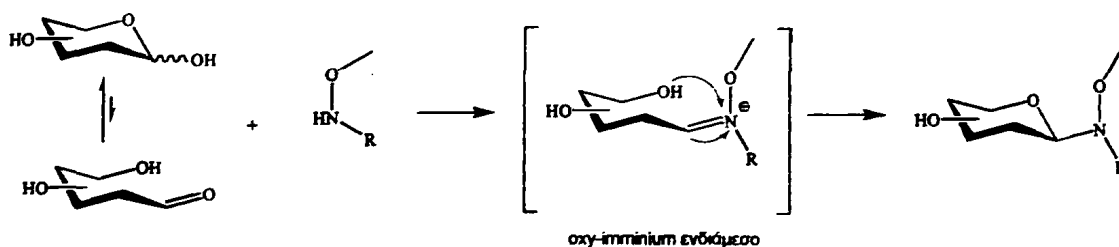


Σχήμα 5. Αρχή μεθόδου χημειοεκλεκτικής πρόσδεσης σακχάρων σε αμινοξυακετυλιωμένα πεπτίδια με σχηματισμό δεσμού οξίμης μεταξύ τους. Όπου R_1 , R_2 , R_3 είναι σάκχαρα προσδεδεμένα στον μονοσακχαρίτη του αναγωγικού άκρου. Χάριν απλότητας, η ομάδα OH-1 και ο γλυκοζιτικός δεσμός που σχηματίζεται απεικονίζεται μόνο σε α στερεοδιάταξη.



Βέβαια, αυτό που πρακτικά συμβαίνει, όπως προκύπτει από μελέτες με πειράματα IR και NMR, είναι να υπερισχύει η δομή ανοικτής αλυσίδας του σακχάρου όπου παρατηρούνται τα δυο ισομερή οξίμης (E/Z ή syn/anti), ενώ σε μικρό ποσοστό να συνυπάρχει και η δομή κλειστής αλυσίδας στην οποία τις περισσότερες φορές ο σχηματιζόμενος γλυκοζιτικός δεσμός βρίσκεται σε β στερεοδιάταξη [154-157].

Εντούτοις, το πρόβλημα που μόλις περιγράφηκε, δηλαδή της μη διατήρησης της κυκλικής δομής πυρανόζης του πρώτου σακχάρου που προσδένεται μέσω οξίμης σε ένα πεπτίδιο, μπορεί να αντιμετωπιστεί [109]. Όπως προτάθηκε από τον Mutter και τους συνεργάτες του [115], η χρήση της N-μεθυλο-αμινοοξακετυλομάδας αντί της απλής αμινοοξακετυλομάδας έχει σαν αποτελέσματα τη διατήρηση της πυρανόζης στο αναγωγικό άκρο, δηλαδή στο πρώτο σάκχαρο που προσδένεται στο πεπτίδιο, και τη γλυκοζυλίωση του πεπτιδίου στην θέση αυτή με υψηλή ανωμερική στερεοεκλεκτικότητα, με τον παραγόμενο N-νεογλυκοζιτικό δεσμό να λαμβάνεται σχεδόν αποκλειστικά σε β στερεοδιάταξη, ανάλογα και με το είδος του σακχάρου [114, 115]. Ο μηχανισμός που προτείνεται για να εξηγηθεί η παρατηρούμενη στερεοεκλεκτικότητα της αντίδρασης απεικονίζεται στο σχήμα 6.



Σχήμα 6. Προτεινόμενος μηχανισμός στερεοεκλεκτικής αντίδρασης γλυκοζυλίωσης με διατήρηση της δομής πυρανόζης του αναγωγικού σακχάρου παρουσία μιας N-μεθυλο-αμινοοξακετυλομάδας.

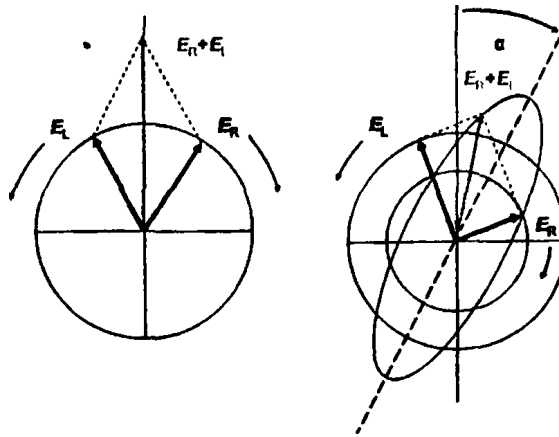
Στο oxy-imminium ενδιάμεσο που σχηματίζεται, το OH-5 προσβάλλει το θετικά φορτισμένο άτομο άνθρακα οδηγώντας σε κλείσιμο του δακτυλίου σε μια θερμοδυναμικά ευνοούμενη διαδικασία [108, 112, 115].

Εισαγωγή

Όταν μια ακτινοβολία διέρχεται μέσα από ένα υλικό, το ηλεκτρικό της πεδίο αλληλεπιδρά με τα ηλεκτρόνια των ατόμων αυτού του υλικού με αποτέλεσμα την ελάττωση της ταχύτητας μετάδοσής της και τη μείωση του πλάτους του ανύσματος E αυτής. Η ελάττωση της ταχύτητας μετάδοσης μιας ακτινοβολίας λέγεται διάθλαση και περιγράφεται από τον δείκτη διάθλασης n . Η μείωση του πλάτους του ανύσματος E οφείλεται σε απορρόφηση και περιγράφεται από τον συντελεστή μοριακής απορρόφησης ϵ της ουσίας. Τόσο το n όσο και το ϵ εξαρτώνται από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας και η εξάρτηση αυτή αντανακλά την ηλεκτρονιακή δομή και τη γεωμετρία του μορίου μέσα από το οποίο διέρχεται η ακτινοβολία.

Στις περισσότερες ενώσεις, η αλληλεπίδρασή τους με ακτινοβολία, ακόμη και πολωμένη, εκφράζεται με απλή διάθλαση και απλή απορρόφηση της ακτινοβολίας. Οι ενώσεις, όμως, που είναι οπτικώς ενεργές αλληλεπιδρούν με την επίπεδα πολωμένη ακτινοβολία και δείχνουν διαφορετικό δείκτη διάθλασης n_R και n_L και διαφορετικό συντελεστή μοριακής απορρόφησης ϵ_R και ϵ_L για την δεξιόστροφη και την αριστερόστροφη κυκλικά πολωμένη συνιστώσα του επίπεδα πολωμένου φωτός (Σχήμα 1). Οι διαφορετικοί δείκτες διάθλασης υποδηλώνουν ότι οι συνιστώσες επιβραδύνονται διαφορετικά με αποτέλεσμα στην έξοδό τους να διαφέρουν ως προς τη φάση, το δε άνυσμα E της συνισταμένης του επίπεδα πολωμένου φωτός που προκύπτει να αλλάζει προσανατολισμό σε σχέση με το επίπεδο της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Επέρχεται, δηλαδή, στροφή του επιπέδου του πολωμένου φωτός. Η γραφική παράσταση της εξάρτησης της στροφικής ικανότητας από το μήκος κύματος αποτελεί το φάσμα Οπτικής Στροφικής Διασποράς (ORD).

Στην περιοχή απορρόφησης, οι ακτίνες του δεξιόστροφου E_R και του αριστερόστροφου E_L κυκλικά πολωμένου φωτός δεν διαδίδονται μόνο με διαφορετικές ταχύτητες ($n_R \neq n_L$) μέσα στα ασύμμετρα μόρια, αλλά απορροφώνται διαφορετικά, δηλαδή τα ανύσματα E_R και E_L γίνονται συγχρόνως και άνισα οπότε η συνισταμένη τους διαγράφει ελλειπτική τροχιά και το φως που εξέρχεται είναι ελλειπτικά πολωμένο.



Σχήμα 1. Φαινόμενο κυκλικού διχρωϊσμού

Η διαφορά αυτή απορρόφησης $\epsilon_L - \epsilon_R = \Delta\epsilon$ συναρτήσει του μήκους κύματος λ ονομάζεται κυκλικός διχρωϊσμός (CD) και δίνεται από την σχέση:

$$\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R = (A_L - A_R) / cl \quad (1)$$

Όπου ϵ : ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης, A : η απορρόφηση του φωτός από το μόριο, c : η μοριακή συγκέντρωση (M) και l : η απόσταση που διανύει το φως.

Τα περισσότερα, εμπορικά διαθέσιμα όργανα μέτρησης CD μετρούν τη διαφορά απορρόφησης $\Delta A = A_L - A_R$ η οποία εύκολα μετατρέπεται σε μοριακή διχρωϊκή απορρόφηση $\Delta\epsilon$ από τη σχέση (1). Όμως, τα περισσότερα όργανα είναι βαθμονομημένα με όρους μοριακής ελλειπτικότητας. Η ελλειπτικότητα είναι μέτρο γωνίας (angular measure) και η σχέση που την συνδέει με το ΔA είναι:

$$\theta = 32.98 \Delta A \quad (2)$$

όπου θ σε degrees(βαθμοί). Για να εξαλειφθούν οι επιδράσεις του μήκους της κυψελίδας και της συγκέντρωσης, η μοριακή ελλειπτικότητα ορίζεται ως:

$$[\theta] = 100 \theta / cl = 3298 \Delta\epsilon \quad (3)$$

Οι μονάδες της μοριακής ελλειπτικότητας είναι degrees $\text{cm}^2 / \text{dmol}$.

Μελέτη της διαμόρφωσης πεπτιδίων με φασματοσκοπία CD.

Για να μελετηθεί μια ουσία με φασματοσκοπία CD θα πρέπει να διαθέτει χρωμοφόρες ομάδες. Χρωμοφόρες είναι ομάδες ατόμων μέσα σε ένα μόριο οι οποίες απορροφούν ενέργεια μιας ορισμένης ακτινοβολίας, με αποτέλεσμα να αναγνωρίζονται εύκολα με κάποια φασματοσκοπική μέθοδο. Μια πρωτεΐνη περιλαμβάνει πολλές χρωμοφόρες ομάδες. Στην



φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού το αποτέλεσμα εξαρτάται από τη σχετική θέση των διαφόρων χρωμοφόρων ομάδων.

Οι χρωμοφόρες ομάδες μπορούν να ταξινομηθούν στις εξής δυο κατηγορίες:

- 1) Αυτές που από μόνες τους είναι ασύμμετρες
- 2) Αυτές που είναι συμμετρικές αλλά τοποθετούνται σε ένα ασύμμετρο περιβάλλον.

Η καρβονυλομάδα των α-αμινοξέων αποτελεί το πιο γνωστό παράδειγμα της δεύτερης κατηγορίας χρωμοφόρων. Στην περίπτωση ενός αμιδικού δεσμού, η παρουσία ενός ασύμμετρου κέντρου (α-άτομο άνθρακα) εισάγει μια ασυμμετρία στην ηλεκτρονιακή κατανομή.

Μια άλλη χρωμοφόρος ομάδα, η οποία είναι συμμετρική, αλλά συχνά βρίσκεται σε ασύμμετρο περιβάλλον, είναι ο φαινολικός δακτύλιος της τυροσίνης.

Στα πεπτιδία και τις πρωτεΐνες η χρωμοφόρος ομάδα που συνήθως μελετάται με CD είναι ο αμιδικός δεσμός στον οποίο αντιστοιχούν δυο μεταπτώσεις στην περιοχή 250-180 nm:

1) Η μετάπτωση $\pi\pi^*$, χαρακτηριστική του καρβονυλίου, που οφείλεται στην ανύψωση ενός ηλεκτρονίου του μονήρους ζεύγους του καρβονυλικού οξυγόνου από το n τροχιακό στο αντιδεσμικό π^* τροχιακό της αμιδικής ομάδας. Το μονήρες ζεύγος στο n τροχιακό είναι υψηλής ενέργειας και παρά το ότι η μετάπτωση $\pi\pi^*$ είναι απαγορευμένη, διότι τα n ηλεκτρόνια βρίσκονται σε κάθετο επίπεδο ως προς τα π ηλεκτρόνια, στην πραγματικότητα αυτή εμφανίζεται με μικρή ένταση γύρω στα 220 nm. Το ακριβές μήκος κύματος της αμιδικής μετάπτωσης $\pi\pi^*$ επηρεάζεται από τη φύση του διαλύτη και κυμαίνεται από ~225nm σε μη πολικούς διαλύτες έως ~215nm σε πολικούς διαλύτες που σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου.

2) Η μετάπτωση $\pi\pi^*$, στην οποία ένα ηλεκτρόνιο από το π τροχιακό ανυψώνεται στο αντιδεσμικό π^* τροχιακό. Παρατηρείται κοντά στα 190nm για τα δευτεροταγή αμιδία και κοντά στα 200nm για τα τριτοταγή. Η ένταση και το μήκος κύματος στο οποίο συμβαίνει η $\pi\pi^*$ μετάπτωση στα αμιδία εξαρτάται από το διαλύτη [158] και η επίδραση αυτή είναι μικρότερη σε σχέση με την $\pi\pi^*$. Για παράδειγμα, η μεταφορά ενός δευτεροταγούς αμιδίου από το κυκλοεξάνιο ή το χλωροφόρμιο στο νερό οδηγεί σε μια μετατόπιση κατά 2-3nm προς μεγαλύτερα μήκη κύματος (red shift).

Το φαινόμενο του κυκλικού διχρωϊσμού είναι πολύ ευαίσθητο στη δευτεροταγή δομή πεπτιδίων και πρωτεϊνών, δίνοντας φάσματα χαρακτηριστικά για διαφορετικούς τύπους δευτεροταγούς δομής. Επομένως, η ανάλυση ενός φάσματος κυκλικού διχρωϊσμού μπορεί να δώσει χρήσιμες πληροφορίες για τη δευτεροταγή δομή βιολογικών μακρομορίων.

α-έλικα

Η δεξιόστροφη α-έλικα αποτελεί μια κανονική δευτεροταγή δομή που απαντάται συχνά σε πρωτεϊνικά μόρια. Σταθεροποιείται με δεσμούς υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ της ομάδας CO κάθε αμιδικού δεσμού και της ομάδας NH του τέταρτου κατά σειρά αμινοξέος, προς το C-τελικό άκρο, οπότε σχηματίζονται 13μελείς δακτύλιοι (Σχήμα 2). Έτσι, όλες οι ομάδες CO και NH της κύριας αλυσίδας συμμετέχουν σε σχηματισμό δεσμών υδρογόνου, οι οποίοι είναι παράλληλοι προς τον νοητό άξονα της έλικας, ενώ οι παράπλευρες ομάδες των αμινοξέων κατευθύνονται προς το εξωτερικό της έλικας. Κάθε κατάλοιπο απέχει από το προηγούμενο κατά 1,5 Å, κατά μήκος του άξονα, γεγονός που οδηγεί στην ύπαρξη 3,6 αμινοξέων ανά στροφή της έλικας. Το βήμα της έλικας (γινόμενο της μετατόπισης και του αριθμού των καταλοίπων ανά στροφή) είναι 5,4 Å.

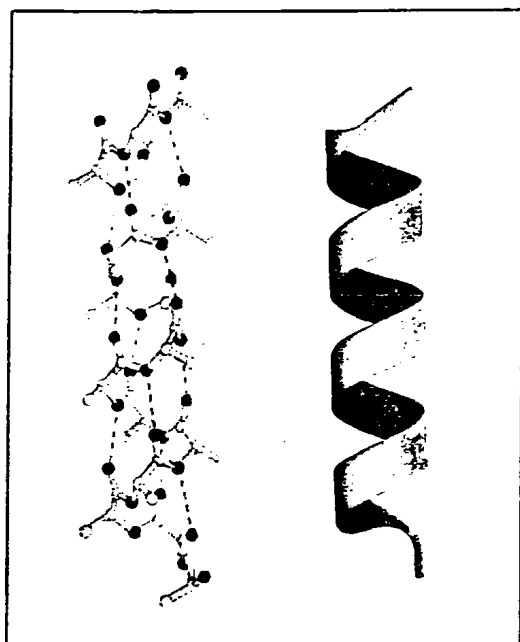
Η διαμόρφωση α-έλικας ευνοείται σε πολυπεπτιδικές αλυσίδες που περιέχουν κυρίως Ala, Leu και Met ενώ αποσταθεροποιείται όταν περιέχεται Gly, Ile, Ser, Thr, Lys και Arg, καθώς επίσης, Pro και Hyp.

Το φάσμα CD πολυπεπτιδίων με διαμόρφωση α-έλικας, αν και υπάρχουν διαφορές στο ακριβές πλάτος και μήκος κύματος των κορυφών, ανάλογα με το διαλύτη και τις παράπλευρες ομάδες, είναι αρκετά χαρακτηριστικό [159, 160]. Διακρίνονται τρεις ξεχωριστές κορυφές: δυο αρνητικές στα 222nm και 208nm και μια θετική στα 192nm. Η κορυφή στα 222nm αποδίδεται στην ππ* αμιδική μετάπτωση ενώ η αρνητική στα 208nm και η θετική στα 192nm αποδίδονται στην παράλληλα και κάθετα πολωμένη, αντίστοιχα, ππ* αμιδική μετάπτωση.

Αν και, όπως αναφέρθηκε, το φάσμα CD είναι ποιοτικά παρόμοιο για πολυπεπτίδια με διάφορες πλευρικές αλυσίδες σε διάφορους διαλύτες, ωστόσο οι τιμές των κορυφών ποικίλουν σημαντικά. Εκτός από την επίδραση των διαλυτών, και οι παράπλευρες αλυσίδες συνεισφέρουν σε αυτήν την ποσοτική ποικιλομορφία. Έτσι, οι μη αρωματικές παράπλευρες ομάδες επιφέρουν αλλαγές στη γεωμετρία του σκελετού της έλικας ενώ οι αρωματικές παράπλευρες ομάδες διαταράσσουν το φάσμα CD λόγω αλληλεπιδράσεων των αρωματικών και αμιδικών διεγέρσεων. Αρωματικοί υποκαταστάτες πέρα από το β-άτομο άνθρακα επιφέρουν αμελητέες διαταραχές στο φάσμα.

Όσον αφορά στην εξάρτηση του φάσματος CD της α-έλικας από το μήκος της αλυσίδας, έχει βρεθεί ότι η αρνητική κορυφή στα 222nm είναι σχετικά ανεπηρέαστη από το μήκος της αλυσίδας [159, 161] και παραμένει αρνητική από το διμερές μέχρι την άπειρη





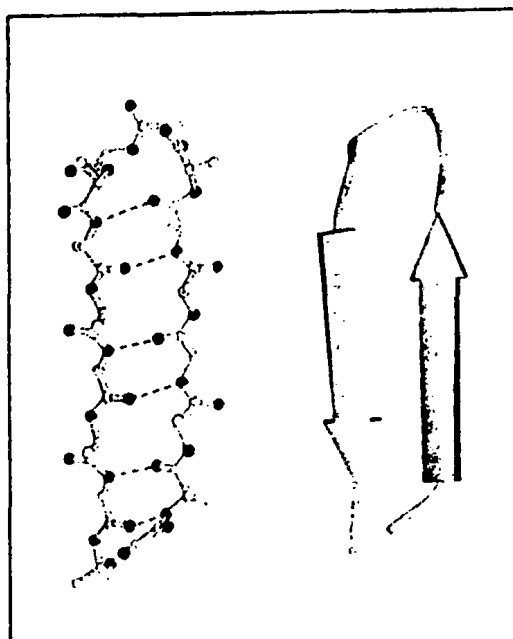
Σχήμα 2. Διαμόρφωση α-έλικας

έλικα, με μια μονότονη αύξηση του μεγέθους της που γίνεται βραδεία μετά από 7-10 πεπτιδικές μονάδες. Αντίθετα, η κορυφές στα 208 και 192 nm επηρεάζονται σημαντικά από το μήκος της αλυσίδας. Πιο συγκεκριμένα, η κορυφή στα 192 nm εμφανίζεται για όλα τα μήκη των αλυσίδων με ένταση που αυξάνει με το μήκος ενώ για την κορυφή στα 208nm υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι δεν εμφανίζεται σε έλικες με λιγότερες από 10 πεπτιδικές μονάδες και μελέτες που υποστηρίζουν ότι εμφανίζεται και σε έλικες με το πολύ μια στροφή [162].

β-διάταξη πτυχωτού φύλλου

Αντίθετα με την α-έλικα, την διαμόρφωση β-πτυχωτού φύλλου σταθεροποιούν διαμοριακοί δεσμοί υδρογόνου μεταξύ όλων των ομάδων CO και NH, οι οποίοι είναι κάθετοι στον άξονα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Αυτό συμβαίνει διότι οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες είναι εκτεταμένες, παράλληλες ή αντιπαράλληλες, οπότε προκύπτουν επίπεδες επιφάνειες. Η απόσταση μεταξύ γειτονικών αμινοξέων είναι 3,5 Å. Οι παράπλευρες αλυσίδες των αμινοξέων προεξέχουν πάνω και κάτω από το επίπεδο του πτυχωτού φύλλου (Σχήμα 3).

Το φάσμα CD πολυπεπτιδίων με διαμόρφωση β-διάταξης χαρακτηρίζεται γενικά από μια αρνητική κορυφή στα 216nm, μια θετική στα 195-200nm και μια αρνητική στα 175nm [163].



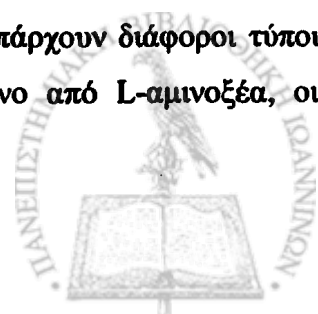
Σχήμα 3. Διαμόρφωση β-φύλλου

Η μορφή του φάσματος [164], δηλαδή το εύρος, η αναλογία και το ακριβές μήκος κύματος των κορυφών, ποικίλει σημαντικά για τα διάφορα πολυπεπίδια καθώς εξαρτάται από πλήθος παραγόντων όπως ο διαλύτης, οι παράπλευρες ομάδες, το μήκος και πλάτος του φύλλου. Ουσιαστικά, οι παράγοντες αυτοί καθορίζουν το είδος του β-φύλλου, δεδομένης της δυνατότητας σχηματισμού παράλληλου ή αντι-παράλληλου φύλλου διαμοριακά, μέσω δεσμών υδρογόνου, αντι-παράλληλου ενδομοριακά, μέσω διασταυρώσεων και μιγμάτων αυτών. Επιπλέον, εκτός από επίπεδες (planar), οι παραπάνω δομές μπορεί να συστρέφονται (twisted) εν μέρει, όπως παρατηρείται πολύ συχνά σε πρωτεΐνες. Έτσι, είναι δύσκολο να αποδοθεί συγκεκριμένο φάσμα CD σε κάθε μια από τις παραπάνω πιθανές δομές.

Ένα σημείο, στο οποίο έχει δοθεί ιδιαίτερη βαρύτητα από τους διάφορους ερευνητές [165-168], είναι το σημείο τομής της καμπύλης με τον άξονα των χ (nm) (crossover point) και αυτό διότι το σημείο αυτό συσχετίζεται με τη διάκριση μεταξύ παράλληλου και αντι-παράλληλου β-φύλλου και πολύ περισσότερο με την ύπαρξη twisted ή planar φύλλων.

β-στροφή

Η β-στροφή είναι ένα δομικό στοιχείο της διαμόρφωσης των πεπτιδίων και των πρωτεϊνών που συναντάται αρκετά συχνά, σε συνδυασμό με διάφορες άλλες διαμορφώσεις. Συχνά συνδέει αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες. Επιπλέον, υπάρχουν διάφοροι τύποι β-στροφών. Στα πεπίδια και τις πρωτεΐνες που συνίστανται μόνο από L-αμινοξέα, οι

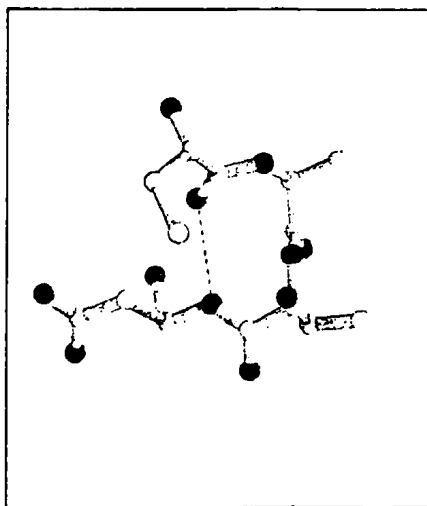


κυριότερες είναι οι τύπου I και II β-στροφές. Παραλλαγές αυτών αποτελούν οι τύποι III και II'.

Η β-στροφή είναι μια διαμόρφωση στην οποία συμμετέχουν τέσσερα αμινοξέα και η οποία υποχρεώνει την πεπτιδική αλυσίδα να κάνει στροφή 180° γύρω από το κεντρικό τμήμα των δύο εκ των τεσσάρων αμινοξέων. Επιπλέον, μια τέτοια διάταξη σταθεροποιείται από έναν δεσμό υδρογόνου μεταξύ της ομάδας CO του αμινοξέος στη θέση i και της ομάδας NH του αμινοξέος στη θέση $i+3$. Έτσι, σχηματίζεται ένας 10μελής δακτύλιος.

Αμινοξέα που απαντούν συχνά σε β-στροφή είναι Asn, Cys και Asp στην θέση i , Pro, Ser και Tyr στη θέση $i+1$, Asn, Asp και Gly στη θέση $i+2$ και Trp, Gly και Tyr στη θέση $i+3$.

Οι β-I και β-II στροφές προβλέφθηκε και επιβεβαιώθηκε [169, 170] ότι δίνουν φάσμα CD που μοιάζει με αυτό του β-φύλλου, με τη διαφορά ότι οι κορυφές είναι μετατοπισμένες κατά 5-10 nm προς μεγαλύτερα μήκη κύματος. Έτσι, προκύπτει το τάξης B CD φάσμα (class B) που χαρακτηρίζεται από μια ασθενή αρνητική κορυφή στα 220-230nm, οφειλόμενη στην $\pi\pi^*$ διέγερση, μια θετική στα 200-210nm, οφειλόμενη στην $\pi\pi^*$ διέγερση, και, τέλος, από μια ισχυρή αρνητική στα 180-190nm.



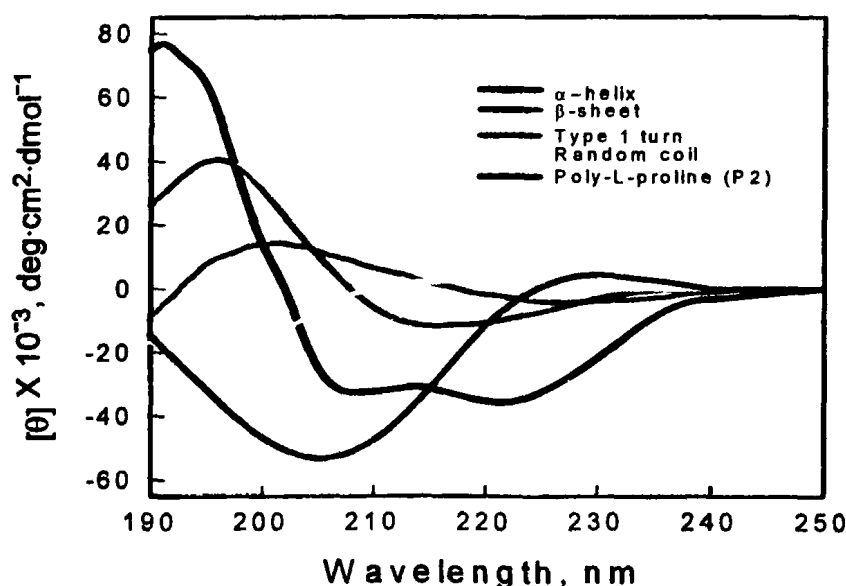
Σχήμα 4. Διαμόρφωση β-στροφής

Εκτός από το τάξης B φάσμα, μπορεί να υπάρξει μιας άλλης μορφής φάσμα CD, αυτό της τάξης C (class C) που, όπως προβλέφθηκε, προκύπτει από τύπου β-II' στροφές. Χαρακτηριστικό αυτού του φάσματος είναι ότι μοιάζει με αυτό της α-έλικας και κάτι τέτοιο πράγματι επιβεβαιώθηκε από διάφορες μελέτες [169, 170].

Άλλες μελέτες έρχονται να αντικρούσουν τα παραπάνω δεδομένα, ισχυριζόμενες ότι αυτό που είναι σίγουρο είναι ότι μόνο η τύπου II β-στροφή δίνει τάξης B φάσμα CD ενώ η τύπου I β-στροφή, και η β-III στροφή, δίνουν τάξης C φάσμα CD.

Τυχαία διαμόρφωση

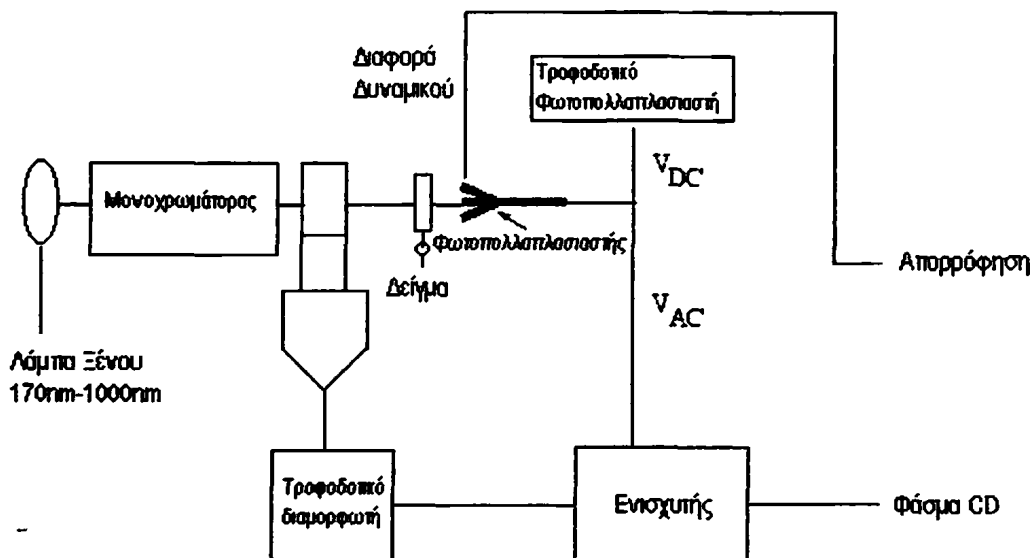
Όπως είναι αναμενόμενο, πεπτίδια των οποίων η διαμόρφωση δεν παρουσιάζει κάποια κανονικότητα εμφανίζουν αρκετά μεταβλητό φάσμα CD. Ωστόσο, σε γενικές γραμμές, το φάσμα πολυπεπτιδίων με τυχαία διαμόρφωση χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη μιας ισχυρά αρνητικής κορυφής κοντά στα 200nm καθώς και μιας ασθενούς κορυφής γύρω στα 220nm, η οποία μπορεί να είναι είτε αρνητική είτε θετική [171]. Στα πολυπεπτίδια που εμφανίζουν θετική κορυφή στα 220nm στο CD φάσμα τους, περιλαμβάνονται και τα καλά μελετημένα μοντέλα τυχαίας διαμόρφωσης poly(Lys) και poly(Glu) σε ουδέτερο pH. Το φάσμα CD αυτών μοιάζει με της poly(pro) II και η ομοιότητα αυτή αποδόθηκε στο ότι ιοντισμένα ομοπολυμερή συνίστανται από σύντομες και συχνά διακοπτόμενες περιοχές αριστερόστροφης έλικας με τρία αμινοξέα ανά στροφή (3-fold helix) σε κανονικές θερμοκρασίες.



Σχήμα 5. Χαρακτηριστικά φάσματα CD των διαφόρων δευτεροταγών δομών.



Πολυπεπίδια τυχαίας διαμόρφωσης με αρνητική κορυφή στα 220nm στο CD φάσμα τους έχουν τοπικές διαμορφώσεις που αντιστοιχούν σε μεγάλο βαθμό στις περιοχές της α-έλικας και της β-δομής του χάρτη Ramachandran.



Σχήμα 9. Τυπική διάταξη CD φασματοφωτομέτρου.

Οργανολογία

Το φαινόμενο του κυκλικού διχρωϊσμού, που παρατηρείται όταν μια οπτικώς ενεργή ουσία απορροφά σε διαφορετικό βαθμό το αριστερά και δεξιά πολωμένο φως, καταγράφεται με τη βοήθεια ενός CD φασματοφωτομέτρου (Σχήμα 9)

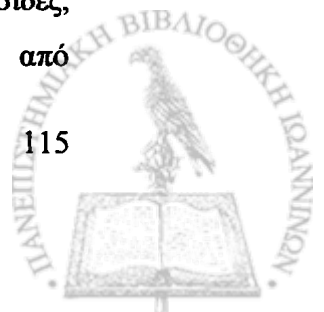
Το όργανο πρέπει να είναι ικανό να μετρά με ακρίβεια στο μακρινό UV (200-300nm), σε μήκη κύματος μεγαλύτερα της περιοχής 190-170nm. Οι πιο διαδεδομένες συσκευές είναι τα μοντέλα Jasco και Jobin Yvon. Στον οπτικό θάλαμο διοχετεύεται ξηρό άζωτο, απαλλαγμένο από οξυγόνο ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός όζοντος σε μικρά μήκη κύματος. Βασικά τμήματα ενός CD φασματοφωτομέτρου είναι:

- Λάμπα ξένου υψηλής πίεσης
- Μονοχρωμάτορας
- Τμήμα ηλεκτρονικού ελέγχου

Η γρίπη θεωρείται σήμερα ως μια από τις πλέον σοβαρές απειλές για την ανθρώπινη υγεία. Μετά το 1997, όπου για πρώτη φορά ένας υψηλής παθογένειας ιός γρίπης των πτηνών έκανε την εμφάνισή του στην Κεντρική και Ανατολική Ασία, ο υπότυπος H5N1 ενοχοποιείται για το ξέσπασμα πανδημίας γρίπης που έχει καταφέρει μέχρι σήμερα να εξαπλωθεί και σε άλλες περιοχές του πλανήτη, φτάνοντας ακόμα και μέχρι την Ευρώπη και την Δυτική Αφρική. Η άνευ προηγουμένου εξάπλωση του υποτύπου αυτού στα πουλερικά και τα άγρια υδρόβια πτηνά είχε σαν αποτέλεσμα απώλεια εκατομμυρίων πτηνών, ενώ έχει συνδεθεί και με μικρό, ευτυχώς, αριθμό ανθρώπινων κρουσμάτων. Η παγκόσμια ανησυχία εστιάζεται στην ενδεχόμενη μετάλλαξη που θα υποστεί αυτός ο υπότυπος ιού γρίπης και η οποία θα του επιτρέψει να μπορεί να μεταδοθεί εύκολα μεταξύ των ανθρώπων. Στην περίπτωση αυτή η πανδημία γρίπης δεν θα περιορίζεται μόνο στα πτηνά, όπως ισχύει μέχρι σήμερα, αλλά θα πρόκειται για μια ανθρώπινη πανδημία γρίπης με ολέθριες συνέπειες.

Από τα ανθρώπινα κρούσματα που έχουν ως τώρα σημειωθεί προκύπτει ότι πρόκειται για μια πολύ επικίνδυνη μόλυνση που οδηγεί γρήγορα στην καταστροφή σημαντικών λειτουργικών οργάνων επιφέροντας το θάνατο. Η έλλειψη φυσικής ανοσίας στον άνθρωπο πληθυσμό ενάντια σε υψηλής παθογένειας στελέχη ιού γρίπης των πτηνών έχει σαν αποτέλεσμα τα ήδη υπάρχοντα εμβόλια κατά της εποχικής γρίπης να θεωρούνται ανεπαρκή για την αντιμετώπιση του H5N1, ενώ δεν έχει βρεθεί ακόμα εμβόλιο κατά αυτού του υποτύπου γρίπης. Επιπλέον, συνεχώς εμφανίζονται νέα μεταλλαγμένα στελέχη του H5N1, ανθεκτικά στα υπάρχοντα αντιϊκά φάρμακα. Καθίσταται, λοιπόν, σαφές πόσο επιτακτική είναι η ανάγκη για γρήγορη και εξειδικευμένη διάγνωση, για αποτελεσματικό εμβόλιο και για νέα δραστικά αντιϊκά φάρμακα για την πρόληψη και την καταπολέμηση μιας ενδεχόμενης επιδημίας ή/και πανδημίας γρίπης των πτηνών στον άνθρωπο.

Προς την κατεύθυνση αυτή, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει μια από τις πρωτεΐνες του ιού της γρίπης, η αιμοσυγκολλητίνη (HA), καθώς είναι αυτή που εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση του ιού με το κύτταρο-ξενιστή και, επιπλέον, αποτελεί το κύριο αντιγόνο επιφανείας κατά του οποίου στρέφεται το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή προκειμένου να αντιμετωπίσει τη μόλυνση από τον ιό. Πρόκειται για μια επιφανειακή γλυκοπρωτεΐνη που υφίσταται ως τριμερές, αποτελούμενο από τρεις πανομοιότυπες πολυπεπτιδικές αλυσίδες, κάθε μια εκ των οποίων αποτελείται από δυο υπομονάδες και διακρίνεται από



χαρακτηριστικές λειτουργικές περιοχές. Πιο συγκεκριμένα, εξαιρετικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η υπομονάδα HA1 της αιμοσυγκολλητίνης, η οποία φέρει την περιοχή που είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση στον υποδοχέα του ξενιστή, αλλά και συγκεντρώνει τις πιο χαρακτηριστικές αντιγονικές θέσεις.

Ο υποδοχέας στον οποίο προσδένεται η HA του ιού της γρίπης είναι ένα κατάλοιπο σιαλικού οξέος που απαντάται πάντα ως η τελευταία σακχαριτική μονάδα N-συνδεδεμένων ολιγοσακχαριτικών αλυσίδων σε επιφανειακές γλυκοπρωτεΐνες και γλυκολιπίδια του κυττάρου ξενιστή. Το προτελευταίο σάκχαρο αυτών των ολιγοσακχαριτών είναι πάντα μια γαλακτόζη. Έτσι, το «σημείο αναγνώρισης» μεταξύ ιού-ξενιστή αποτελεί ένα σχεδόν διατηρημένο μοτίβο μεταξύ των ειδών, με μόνη διαφορά το είδος του γλυκοζιτικού δεσμού που συνδέει τα δυο αυτά σάκχαρα και ο οποίος μπορεί να είναι ένας α2,6 ή α2,3 γλυκοζιτικός δεσμός, ανάλογα με την προέλευση (άνθρωπος ή πτηνά) του κυττάρου-ξενιστή. Επομένως, η μελέτη αυτού του υποδοχέα αποτελεί μια εναλλακτική θεραπευτική ή/και διαγνωστική προσέγγιση κατά μιας ποικιλίας στελεχών ιού γρίπης, απαλλαγμένης από τον κίνδυνο εμφάνισης νέων ανθεκτικών στελεχών.

Με στόχο τη συμβολή στην ανάπτυξη διαγνωστικής μεθοδολογίας για την ανίχνευση του ιού της γρίπης καθώς επίσης και στην εύρεση αποτελεσματικού εμβολίου κατά του υποτύπου H5N1 του ιού της γρίπης των πτηνών, η παρούσα διατριβή αναφέρεται στη σύνθεση γλυκοπεπτιδικών αναλόγων του υποδοχέα της HA και στη μελέτη της ικανότητας αυτών να προσδένονται και άρα να αναγνωρίζουν τον ιό, όπως επίσης αναφέρεται και στη σύνθεση και ανοσογονική μελέτη πεπτιδικών αναλόγων της αιμοσυγκολλητίνης (HA) H5 του ιού της γρίπης.

Πιο συγκεκριμένα, η παρούσα διατριβή πραγματεύεται:

- τη σύνθεση και το χαρακτηρισμό πεπτιδικών αναλόγων της H5 HA, που συνίστανται από προσδεδεμένους T-κυτταρικούς επιτόπους στον Επαναλαμβανόμενο Ολιγοπεπτιδικό Φορέα SOC₄-I
- τη μελέτη της ανοσογονικότητας αυτών των αναλόγων κατόπιν ανοσοποίησης πειραματοζώων (ποντίκια και κοτόπουλα) με τα SOC₄-παράγωγα.
- τη σύνθεση και το χαρακτηρισμό γλυκοπεπτιδικών αναλόγων του υποδοχέα της HA, που συνίστανται από σιαλικό οξύ και άλλους σιαλο-ολιγοσακχαρίτες προσδεδεμένους στον Επαναλαμβανόμενο Ολιγοπεπτιδικό Φορέα SOC₄-I
- τον έλεγχο της ικανότητας πρόσδεσης του ιού γρίπης σε αυτά τα γλυκοπεπτιδικά μοντέλα του υποδοχέα της HA



- τη διαμορφωτική μελέτη των γλυκοπεπτιδικών αναλόγων του υποδοχέα της HA

Η προσέγγιση του θέματος πραγματοποιήθηκε ως εξής:

- πιθανοί T-κυτταρικοί επίτοποι της αιμοσυγκολλητίνης H5 ιού γρίπης επιλέχθηκαν με υπολογιστικές μεθόδους. Με τον τρόπο αυτό προέκυψαν οι ακόλουθες αλληλουχίες:

1. H5VIN1cor54-69: DC(Acm)SVAGWLLGNPMC(Acm)DE-NH₂
2. T1: VLMENERTL
3. T3: ASFFRNVVWL
4. T5: FHDSNVKNL
5. T7: NFESNGNFI

- ο πρώτος επίτοπος, αφού συντέθηκε αρχικά ως πεπτίδιο-ελέγχου, στη συνέχεια προσδέθηκε και στην παράπλευρη αλυσίδα της πρώτης και τέταρτης λυσίνης του φορέα SOC₄-I, με βήμα προς βήμα πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση, επιτρέποντας με τον τρόπο αυτό τη λήψη του πρώτου πεπτιδικού αναλόγου της HA:



- οι υπόλοιπες τέσσερις αλληλουχίες τροποποιήθηκαν με πρόσθεση στο C-άκρο ενός καταλοίπου λυσίνης στην παράπλευρη αλυσίδα της οποίας προστέθηκε ένα κατάλοιπο σερίνης, έτσι ώστε στη θέση αυτή να καταστεί δυνατή η δημιουργία, μέσω οξειδωσης, μιας αλδεϋδικής ομάδας. Έτσι, συντέθηκαν με βήμα προς βήμα πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση οι τροποποιημένοι T-επίτοποι



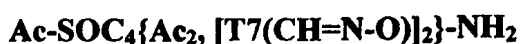
- οι οποίοι στη συνέχεια οξειδώθηκαν, σε υγρή φάση, για να ληφθούν τα αλδεϋδικά παράγωγα αυτών



- Συντέθηκε, επίσης, ο φορέας SOC₄-I στον οποίο έχει προστεθεί η αμινοοξυακέτυλο ομάδα στις παράπλευρες αλυσίδες των τεσσάρων αλλά και των δυο (πρώτη και τρίτη) λυσινών αυτού:

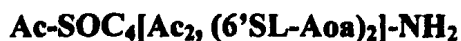
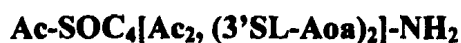
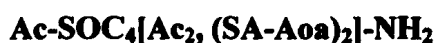


- Η χημειοεκλεκτική αντίδραση, σε υγρή φάση, μέσω σχηματισμού δεσμού οξίμης μεταξύ του N^ε-αμινοοξυακέτυλο φορέα SOC₄-I: Ac-SOC₄[Ac₂, (Aoa)₂]-NH₂ και καθενός από τα αλδεϋδικά παράγωγα των T-επιτόπων T1, T3, T5 και T7, επέτρεψε την παρασκευή των πεπτιδικών αναλόγων της HA:



- Τα παραπάνω πέντε συνθετικά πεπτιδικά ανάλογα – SOC₄-αντιγονικά συμπλέγματα ελέγχθηκαν ως προς την ανοσογονικότητά τους και την παραγωγή αντισωμάτων εξουδετέρωσης της μόλυνσης από τον ιό γρίπης, κατόπιν ανοσοποίησης πειραματόζωων (ποντίκια ή κοτόπουλα) με αυτά τα συμπλέγματα και επακόλουθης μόλυνσης αυτών με ιό γρίπης H5N1.

- Συντέθηκαν σε υγρή φάση τα γλυκοπεπτιδικά ανάλογα του ανθρώπινου υποδοχέα [6'-σιαλυλακτόζη, (6'SL)] της HA του ιού γρίπης αλλά και του υποδοχέα των πτηνών [3'-σιαλυλακτόζη (3'SL)] για αυτήν την πρωτεΐνη:



με χημειοεκλεκτική αντίδραση σχηματισμού δεσμού οξίμης μεταξύ του N^ε-αμινοοξυακέτυλο φορέα SOC₄-I και των σακχάρων σιαλικό οξύ (SA), 3'-σιαλυλακτόζη (3'SL) και 6'-σιαλυλακτόζη (6'SL).

- Τα παραπάνω γλυκοπεπτιδικά ανάλογα ελέγχθηκαν σε πειράματα ELISA ως προς την ικανότητά τους να προσδένονται εξειδικευμένα σε ιό γρίπης ανθρώπων ή πτηνών, με απώτερο σκοπό την ανάπτυξη μιας ειδικής διαγνωστικής δοκιμασίας ταυτοποίησης διαφόρων υποτύπων και στελεχών ιού γρίπης, αλλά και τη χρησιμοποίηση της δοκιμασίας αυτής για τον έλεγχο πιθανών πεπτιδικών αναστολέων της πρόσδεσης του ιού στον υποδοχέα.
- Τέλος, μελετήθηκαν οι διαμορφωτικές ιδιότητες των γλυκοπεπτιδικών αναλόγων του υποδοχέα της HA με φασματοσκοπία Κυκλικού Διχρωϊσμού (CD).

Πειραματικό Μέρος



Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση T-κυτταρικών επιτόπων της HA H5

Εισαγωγή

Στην παρούσα εργασία συντέθηκαν και μελετήθηκαν οι εξής T-κυτταρικοί επίτοποι της πρωτεΐνης HA H5:

1. **H5VIN1cor54-69:** H-DC(Acm)SVAGWLLGNPMC(Acm)DE-NH₂
2. **T1:** H-VLMENERTLK(Ser)A-NH₂
3. **T3:** H-ASFFRNVVWLK(Ser)-NH₂
4. **T5:** H-FHDSNVKNLK(Ser)-NH₂
5. **T7:** H-NFESNGNFIK(Ser)-NH₂

Η σύνθεση των πεπτιδίων 1-5 πραγματοποιήθηκε βήμα προς βήμα σύμφωνα με τις αρχές της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση κατά Merrifield ακολουθώντας την Boc/Bzl ή την Fmoc/tBu στρατηγική και χρησιμοποιώντας ως πολυμερικά υποστρώματα τις ρητίνες 4-μεθυλοβενζυδρυλαμίνη και Rink Amide AM.

Αντιδραστήρια

Για την πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση χρησιμοποιήθηκαν τα εξής πολυμερικά υποστρώματα:

- 4-μεθυλοβενζυδρυλαμίνη (MBHA ρητίνη)
- 4-[2',4'-διμεθοξυ-φαινυλ-(9-φλουορενυλμεθοξυκαρβονυλ)-αμινομεθυλ]-φαινοξυακεταμιδο-νορλευκυλαμινομεθυλ-ρητίνη (Rink Amide AM ρητίνη)

Ως αντιδραστήρια σύζευξης των αμινοξέων χρησιμοποιήθηκαν τα:

- ο-βενζοτρίαζολυλο-τετραμεθυλο-ισοουρονικό τετραφθοροβορικό άλας (TBTU),

[Neosystem Laboratoire (Strasbourg, France) ή GL Biochem (Shanghai, China)].

- ο-βενζοτρίαζολυλο-τετραμεθυλο-ισοουρονικό εξαφθοροφωσφορικό άλας (HBTU), [Neosystem Laboratoire (Strasbourg, France) ή GL Biochem (Shanghai, China)].

- HATU [GL Biochem (Shanghai, China)]

- N,N-διϊσοπρόπυλο καρβοδιϊμίδιο (DIC), [Fluka (Schnelldorf, Germany)]

- N,N-δικυκλοέξυλο καρβοδιϊμίδιο (DCC), [Sigma (Germany)]

Ως βοηθητικό πυρηνόφιλο χρησιμοποιήθηκε το 1-υδροξυβενζοτρίαζόλιο (HOBt), [GL Biochem (Shanghai, China)].



Τα N^α-Boc και N^α-Fmoc προστατευμένα παράγωγα αμινοξέων που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των πεπτιδίων καταγράφονται στον πίνακα 1.

Στη σύνθεση και τον καθαρισμό των πεπτιδίων χρησιμοποιήθηκαν οι διαλύτες:

- μεθανόλη [MeOH, analytical reagent και HPLC grade, LABSCAN (Ireland)]
- διχλωρομεθάνιο [DCM, LABSCAN (Ireland)]
- διμεθυλοφορμαμίδιο [DMF, LABSCAN (Ireland)], αποθηκευμένο υπεράνω μοριακών κόσκινων (molecular sieves) 4Å για την απομάκρυνση της υγρασίας
- εξάνιο [LABSCAN (Ireland)], κατά τη συμύκνωση του TFA μετά την αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη
- διαιθυλαιθέρας [Riedel (Germany)], καταβύθιση του πεπτιδίου μετά τη συμύκνωση του TFA
- οξικό οξύ [MB: 60,05, d: 1,048 g/ml, Panreac (Spain)], για την παραλαβή του πεπτιδίου μετά την καταβύθιση
- ακετονιτρίλιο [CH₃CN, HPLC grade, LABSCAN (Ireland)], κατά τον καθαρισμό των πεπτιδίων με HPLC

ενώ άλλα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη σύνθεση των πεπτιδίων είναι τα:

- διίσοπροπυλοαιθυλαμίνη [DIEA, Merck-Schuchardt (Germany)], για τη σύζευξη των αμινοξέων
- τριφθοροξικό οξύ [TFA, Fluka (Germany)], για την απομάκρυνση της Boc αμινοπροστατευτικής ομάδας και την αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη
- οξικός ανυδρίτης [Ac₂O, Merk (Germany)] και πυριδίνη [Fluka (Germany)], για την ακετυλίωση των ελεύθερων αμινομάδων
- πιπεριδίνη [Fluka (Germany)], για την αποπροστασία της Fmoc-ομάδας
- τριίσοπροπυλοσιλάνιο [TIS, Sigma (USA)]
- τριφθοροξικό οξύ [HF, Fluka (Germany)], για την αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη



Πίνακας 1. N-προστατευμένα παράγωγα αμινοξέων που χρησιμοποιήθηκαν στη σύνθεση

<i>N-προστατευμένα παράγωγα αμινοξέων</i>	<i>Μοριακό Βάρος</i>	<i>Προμηθευτής</i>
Boc-Glu(OBzl)-OH	337,4	GL Biochem (Shanghai, China)
Boc-Asp(OcHx)-OH	315,4	GL Biochem (Shanghai, China)
Boc-Cys(Acm)-OH	292,4	GL Biochem (Shanghai, China)
Boc-Met-OH	249,3	GL Biochem (Shanghai, China)
Boc-Pro-OH	215,3	GL Biochem (Shanghai, China)
Boc-Asn-OH	232,2	GL Biochem (Shanghai, China)
Boc-Gly-OH	175,2	GL Biochem (Shanghai, China)
Boc-Leu-OH.H ₂ O	249,3	GL Biochem (Shanghai, China)
Boc-Trp-OH	304,4	GL Biochem (Shanghai, China)
Boc-Ala-OH	189,2	GL Biochem (Shanghai, China)
Boc-Val-OH	217,3	GL Biochem (Shanghai, China)
Boc-Ser(Bzl)-OH	295,3	GL Biochem (Shanghai, China)
Fmoc-Ala-OH	311,3	GL Biochem (Shanghai, China)
Fmoc-Lys(Mtt)-OH	624,8	CBL Patras-Barlos GL Biochem (Shanghai, China)
Fmoc-Leu-OH	353,4	GL Biochem (Shanghai, China)
Fmoc-Thr(tBu)-OH	397,5	GL Biochem (Shanghai, China)
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	648,8	GL Biochem (Shanghai, China)
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	425,5	GL Biochem (Shanghai, China)
Fmoc-Asn(Trt)-OH	596,7	GL Biochem (Shanghai, China)
Fmoc-Met-OH	371,5	GL Biochem (Shanghai, China)
Fmoc-Val-OH	339,4	GL Biochem (Shanghai, China)
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383,4	GL Biochem (Shanghai, China)
Fmoc-Phe-OH	387,4	GL Biochem (Shanghai, China)
Fmoc-Trp(Boc)-OH	526,6	GL Biochem (Shanghai, China)
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468,5	GL Biochem (Shanghai, China)
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	411,5	GL Biochem (Shanghai, China)
Fmoc-His(Trt)-OH	619,7	GL Biochem (Shanghai, China)
Fmoc-Ile-OH	353,4	GL Biochem (Shanghai, China)
Fmoc-Gly-OH	297,3	GL Biochem (Shanghai, China)

Γενική πορεία σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση

Η γενική πορεία σύνθεσης των πεπτιδίων απεικονίζεται στα σχήματα 1 και 2, για κάθε πολυμερικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε και ανάλογα με τη μεθοδολογία, Boc ή Fmoc, που ακολουθήθηκε.

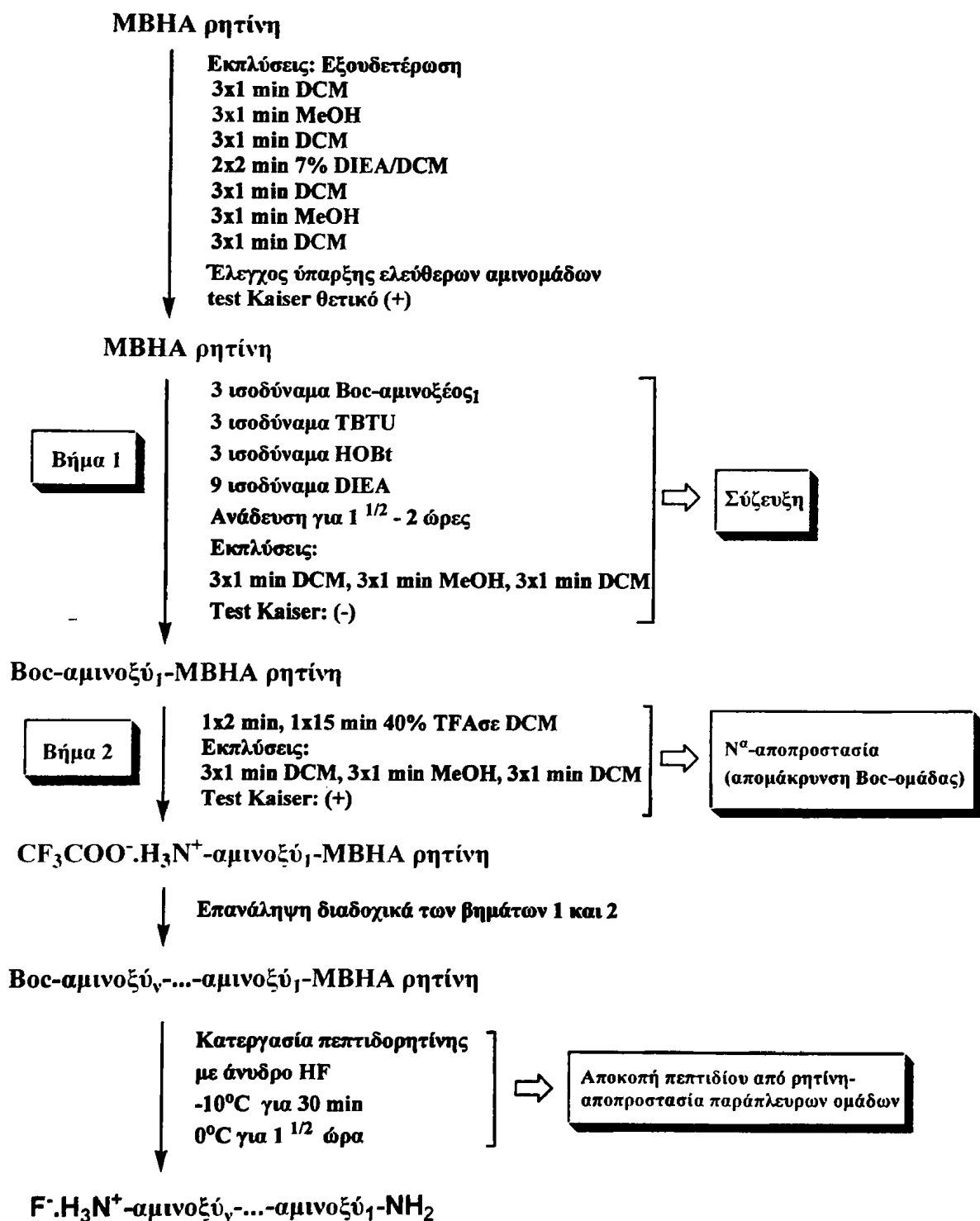
Ο έλεγχος ολοκλήρωσης της σύζευξης (απουσία ελεύθερων αμινομάδων στην πεπτιδορητίνη) έγινε με το τεστ νινυδρίνης (Kaiser).

Η απομάκρυνση των πεπτιδίων από τη ρητίνη και η τελική αποπροστασία των παράπλευρων δραστικών ομάδων των αμινοξέων έγινε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης με άνυδρο HF, κατά την Boc στρατηγική, ή με μίγμα TFA/TIS/H₂O 95/2,5/2,5 v/v, κατά την Fmoc στρατηγική.

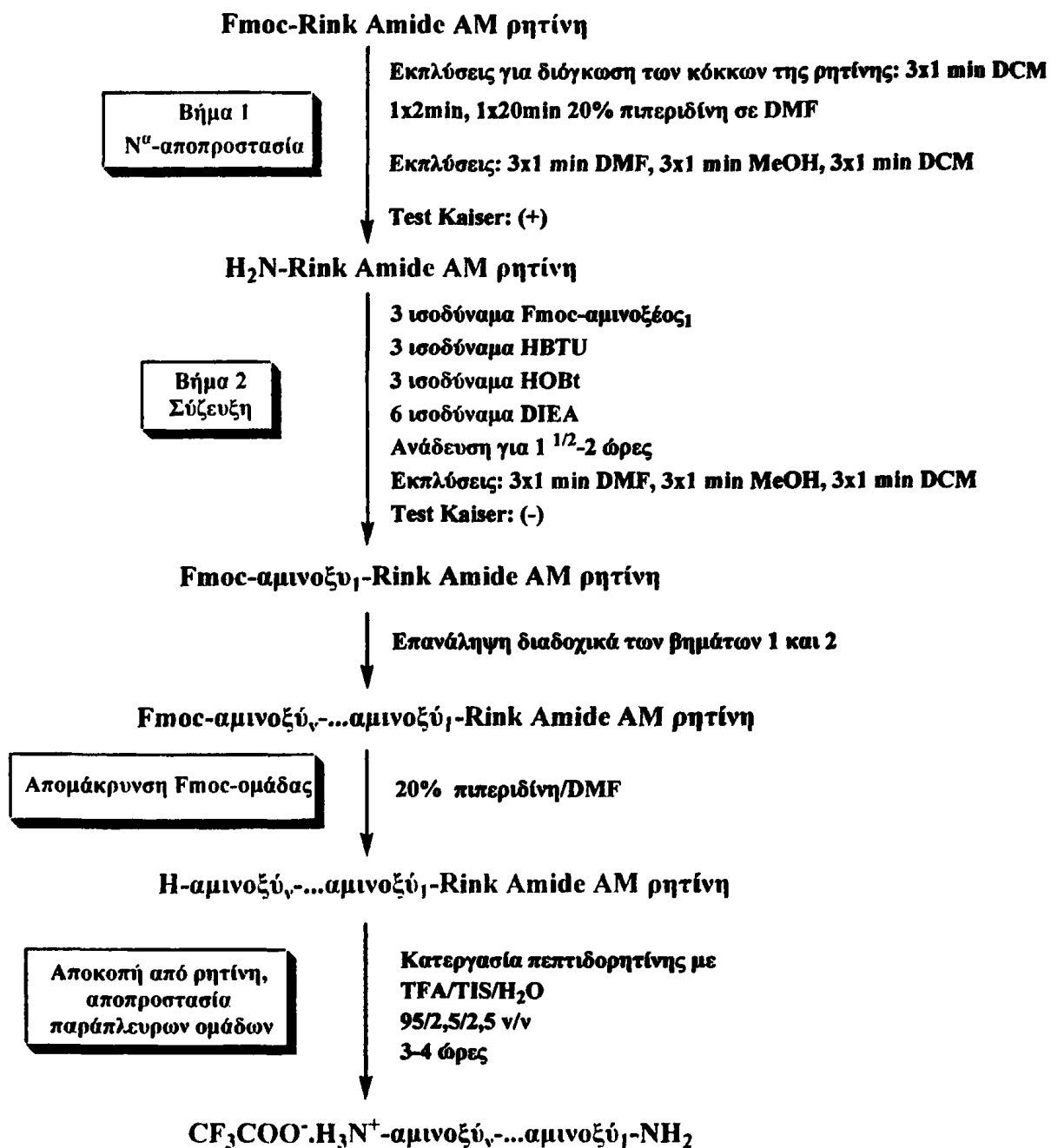
Στην πρώτη περίπτωση, η πεπτιδορητίνη κατεργάζεται με 10ml δισαπεσταγμένου HF για κάθε g αυτής, παρουσία 1ml π-θειοκρεσόλης και 1ml DMS ως scavengers (παγίδες κατιόντων), για 30 min στους -10°C και για 1 ½ ώρα στους 0°C. Στη συνέχεια το HF απομακρύνεται υπό κενό, το υπόλειμμα εκπλένεται με διαιθυλαιθέρα για την απομάκρυνση των μορίων-παγίδων και διηθείται ενώ το πεπτίδιο παραλαμβάνεται τελικά με υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 2N και λυοφιλοποιείται.

Στην δεύτερη περίπτωση, η πεπτιδορητίνη κατεργάζεται με 10-25ml/g μίγματος TFA/TIS/H₂O 95/2,5/2,5 v/v για 3-4 ώρες. Στη συνέχεια, το TFA συμπυκνώνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και στο ελαιώδες υπόλειμμα προστίθεται παγωμένος διαιθυλαιθέρας για την καταβύθιση του πεπτιδίου. Μετά από διήθηση, το πεπτίδιο παραλαμβάνεται με υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 2N και λυοφιλοποιείται.





Σχήμα 1. Πορεία σύνθεσης πεπτιδίων σε ρητίνη 4-μεθυλοβενζυδρυλαμίνη (MBHA), Boc-μεθοδολογία.



Σχήμα 2. Πορεία σύνθεσης πεπτιδίων σε ρητίνη Rink Amide AM, Fmoc-μεθοδολογία.



Τεχνικές καθαρισμού και ταυτοποίησης

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

- **Ημιπαρασκευαστική Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης Ανάστροφης Φάσης** (Semipreparative High Performance Liquid Chromatography – Reversed Phase, RP – HPLC, Shimadzu LC-10AD VP, SCL-10A VP) σε στήλη Discovery C₁₈ 25cm x 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, Waters 600s) σε στήλη Discovery C₁₈ 25cm x 3mm, 5μm (SUPELCO), με ανιχνευτή UV/Vis (Waters 996 Photodiode Array Detector)

- **Φασματομετρία Μάζας** Electrospray Ionization (ESI –MS) Micromass Platform LC Quadrupole.

Πειραματική πορεία σύνθεσης, καθαρισμού και ταυτοποίησης των T-κυτταρικών επιτόπων της HA H5

1. Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του επιτόπου H5VIN1cor54-69:

H-Asp-Cys(Acm)-Ser-Val-Ala-Gly-Trp-Leu-Leu-Gly-Asn-Pro-Met-Cys(Acm)-Asp-Glu-NH₂

MB: 1851,12

MT: C₇₇H₁₁₉N₂₁O₂₆S₃

Για τη σύνθεση του πεπτιδίου 1 χρησιμοποιήθηκαν 0,527 g ρητίνης 4-μέθυλο-βενζυδρυλαμίνης (MBHA) με υποκατάσταση 0,95 mmol/g. Η σύνθεση ολοκληρώθηκε όπως περιγράφεται στο σχήμα 3 χρησιμοποιώντας τα εξής παράγωγα αμινοξέων: Boc-Glu(OBzl)-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Cys(Acm)-OH, Boc-Met-OH, Boc-Pro-OH, Boc-Asn-OH, Boc-Gly-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Trp-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Val-OH και Boc-Ser(Bzl)-OH.

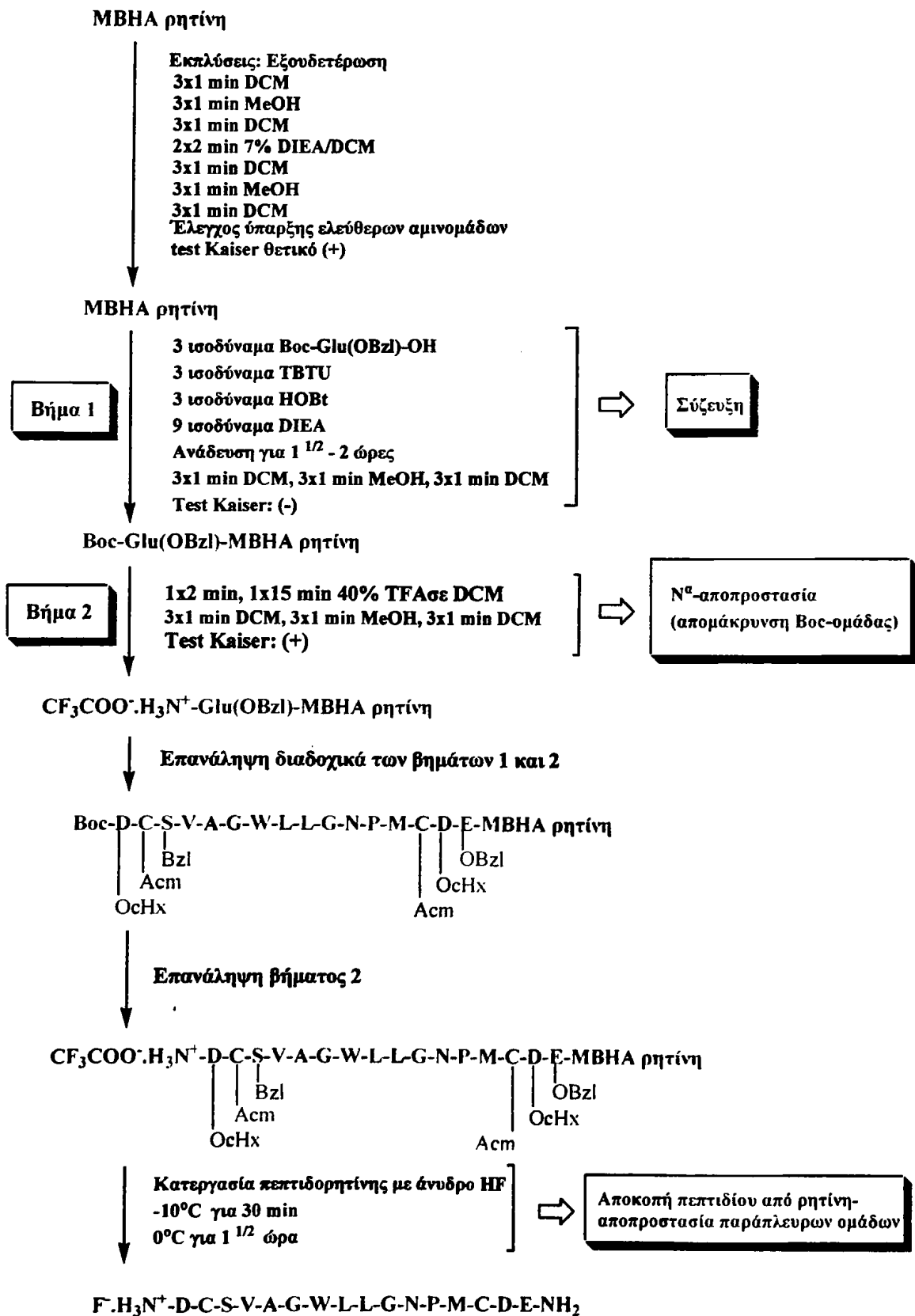
Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης η πεπτιδορητίνη ξηράνθηκε υπεράνω P₂O₅ σε ξηραντήρα κενού (απόδοση σύνθεσης 77%) και στη συνέχεια έγινε αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη με κατεργασία με υγρό HF. Συγκεκριμένα, 0,79 g πεπτιδορητίνης μεταφέρθηκαν στο ειδικό δοχείο για τη συσκευή του HF όπου προστέθηκαν 10 ml υγρού HF

και ως παγίδες κατιόντων 0,5 ml π-θειοκρεσόλη και 0,5 ml DMS. Η αντίδραση αποκοπής πραγματοποιήθηκε στους -10°C για 30 min και στους 0°C για $1\frac{1}{2}$ ώρα. Μετά από καταβύθιση με διαιθυλαιθέρα και διήθηση το πεπτιδιο παρελήφθη με υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 2N και λυοφιλοποιήθηκε (απόδοση 71%).

Ο καθαρισμός του πεπτιδίου έγινε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC χρησιμοποιώντας βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης 20% έως 60% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%\text{TFA}$ σε $\text{H}_2\text{O}/0.1\%\text{TFA}$ με ταχύτητα ροής 4.7ml/min για 40 min, ανίχνευση στα 214nm (απόδοση 23%)

Η ταυτοποίηση του κύριου κλάσματος έγινε με φασματομετρία μάζας ESI-MS (Σχήμα 4), ενώ η καθαρότητα επιβεβαιώθηκε με αναλυτική RP-HPLC (Σχήμα 5).

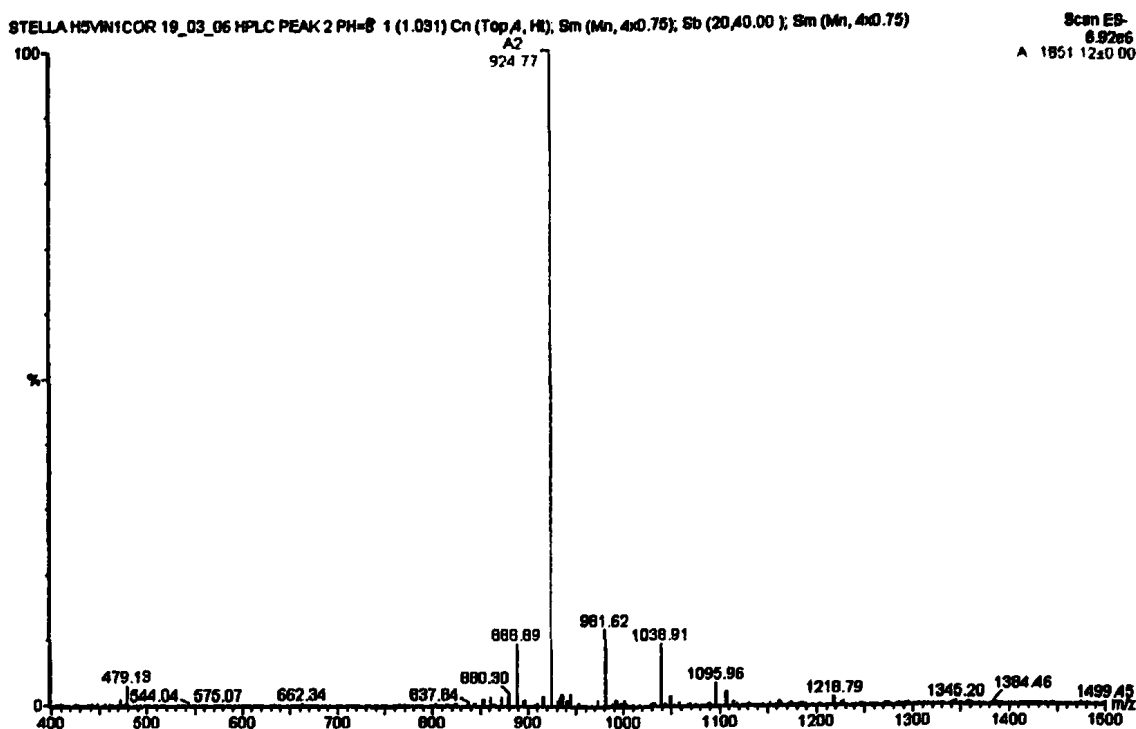




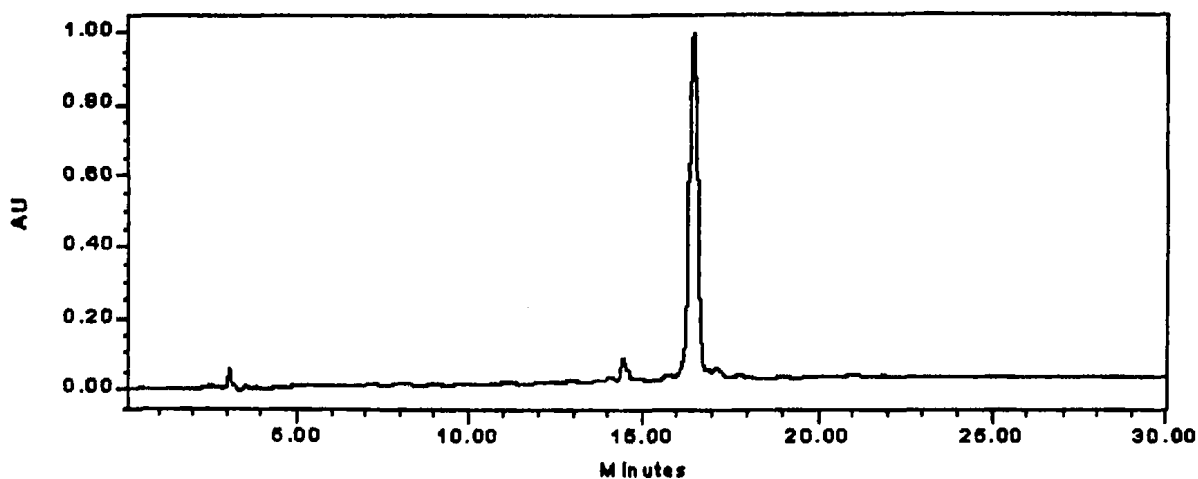
57

Σχήμα 3. Πορεία σύνθεσης του πεπτιδίου H5VIN1cor(54-69) σε ρητίνη 4-μέθυλο-βενζυδρολαμίνη (MBHA).





Σχήμα 4. Φάσμα μάζας ESI του καθαρού πεπτιδίου H5VIN1cor(54-69). Ευρεθέν μοριακό βάρος 1851.12, υπολογισθέν μοριακό βάρος 1851.12.



Σχήμα 5. Χρωματογράφημα Αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού πεπτιδίου H5VIN1cor(54-69). Βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης 20% έως 60% CH₃CN/0.1%TFA σε H₂O/0.1%TFA, ταχύτητα ροής 1ml/min για 30 min, ανίχνευση στα 214nm.

2. Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του επιτόπου T1:



$\text{C}_{59}\text{H}_{104}\text{N}_{18}\text{O}_{19}\text{S}$

M.B.: 1389,63

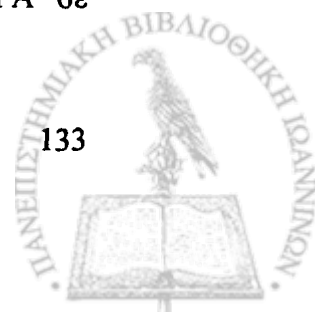
Για τη σύνθεση του πεπτιδίου 2 χρησιμοποιήθηκαν 0,75 g ρητίνης Fmoc-Rink Amide AM με υποκατάσταση 0,67 mmol/g, ενώ ακολουθήθηκε η γενική πορεία σύνθεσης που περιγράφεται στο σχήμα 2.

Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του γραμμικού τμήματος του πεπτιδίου (κατάλοιπα 1-11) και χωρίς να πραγματοποιηθεί αποπροστασία της α-αμινομάδας του τελευταίου καταλοίπου (Val^1), έγινε εκλεκτική απομάκρυνση της Mtt ομάδας από την ε-αμινομάδα της λυσίνης με χρήση διαλύματος 1,8% TFA σε DCM, (9 x 3 λεπτά), όπου στη συνέχεια προστέθηκε το παράγωγο Fmoc-Ser(tBu)-OH. Για τη σύζευξη του παραγώγου αυτού χρησιμοποιήθηκαν 9 ισοδύναμα DIEA και όχι 6 ισοδύναμα που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύζευξη των άλλων αμινοξέων του πεπτιδίου, διότι απαιτείται επιπλέον ποσότητα για να εξουδετερωθεί το άλας TFA της ε-αμινομάδας της λυσίνης που σχηματίζεται κατά την απομάκρυνση της Mtt ομάδας. Τέλος, η Fmoc ομάδα απομακρύνθηκε ταυτόχρονα από τις α-αμινομάδες των καταλοίπων βαλίνης (Val^1) και σερίνης (Ser^{12}).

Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης αυτής, η πεπτιδορητίνη ξηράνθηκε υπεράνω P_2O_5 σε ξηραντήρα κενού (απόδοση σύνθεσης 92%).

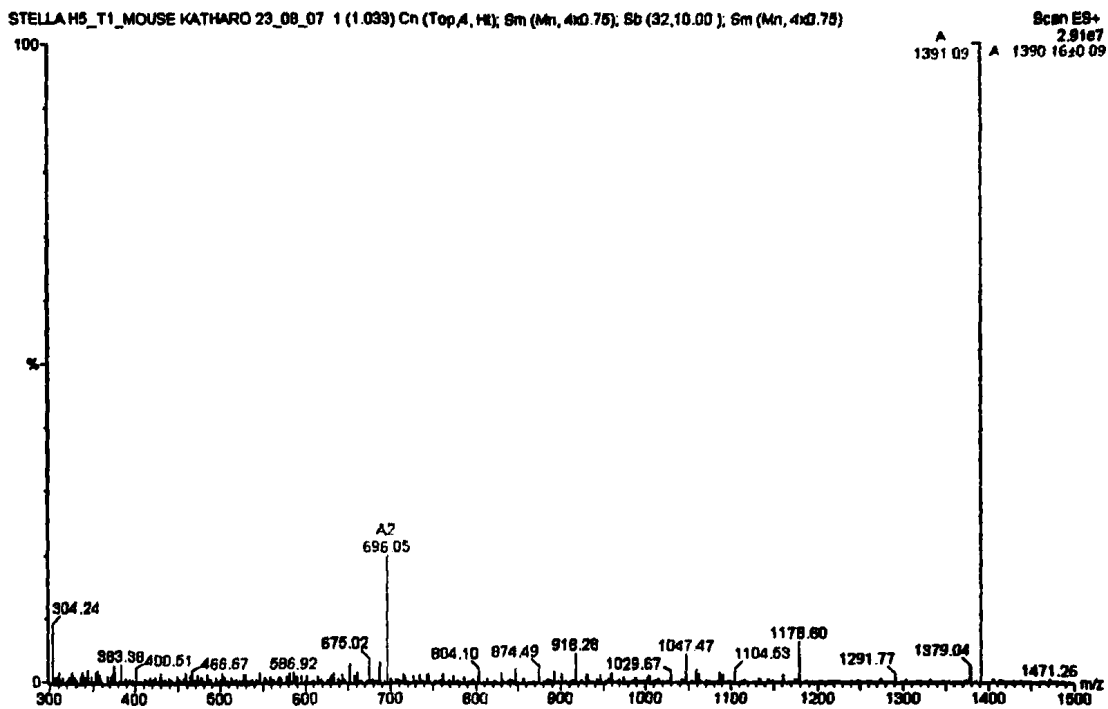
Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη με ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων πραγματοποιήθηκε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης (1,55 g) με 10 ml διαλύματος 92.5% TFA : 2.5% TIS : 2.5% H_2O : 2.5% DMS (v/v) για 4 ώρες υπό συνεχή μαγνητική ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε διήθηση υπό κενό για την απομάκρυνση της ρητίνης, συμπύκνωση του διηθήματος μέχρι ξηρού, εκπλύσεις με άγμα DCM/εξάνιο 1:1 (v/v), καταβύθιση του πεπτιδίου με διαιθυλαιθέρα υπό ψύξη, διήθηση και τέλος παραλαβή αυτού με υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 2N και λυοφιλοποίηση (απόδοση 98%).

Ο καθαρισμός του πεπτιδίου έγινε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC χρησιμοποιώντας βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης 10% έως 70% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%\text{TFA}$ σε

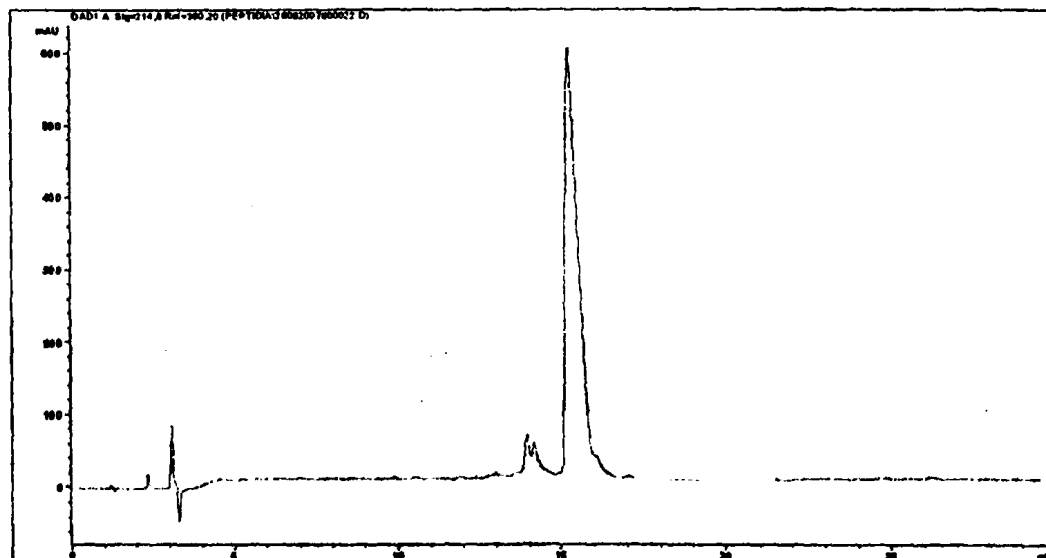


H₂O/0.1%TFA με ταχύτητα ροής 4.7ml/min για 30 min, ανίχνευση στα 214nm (απόδοση 65%)

Η ταυτοποίηση του κύριου κλάσματος έγινε με φασματομετρία μάζας ESI-MS (Σχήμα 6) ενώ η καθαρότητα επιβεβαιώθηκε με αναλυτική RP-HPLC (Σχήμα 7).



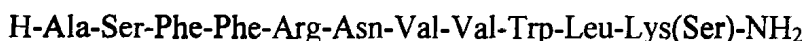
Σχήμα 6. Φάσμα μάζας ESI του καθαρού πεπτιδίου T1. Ευρεθέν μοριακό βάρος 1390,16, υπολογισθέν μοριακό βάρος 1389,63.



Σχήμα 7. Χρωματογράφημα Αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού πεπτιδίου T1. Βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης 10% έως 50% CH₃CN/0.1%TFA σε H₂O/0.1%TFA με ταχύτητα ροής 1ml/min για 30 min, ανίχνευση στα 214nm.



3. Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του επιτόπου T3:



MB: 1452,74

MT: C₇₀H₁₀₅N₁₉O₁₅

Για τη σύνθεση του πεπτιδίου 3 χρησιμοποιήθηκαν 0,597 g ρητίνης Fmoc-Rink Amide AM με υποκατάσταση 0,67 mmol/g, ενώ ακολουθήθηκε η γενική πορεία σύνθεσης που περιγράφεται στο σχήμα 2.

Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του γραμμικού τμήματος του πεπτιδίου (κατάλοιπα 1-11) και χωρίς να πραγματοποιηθεί αποπροστασία της α-αμινομάδας του τελευταίου καταλοίπου (Ala¹), έγινε εκλεκτική απομάκρυνση της Mtt ομάδας από την ε-αμινομάδα της λυσίνης, με χρήση διαλύματος 1,8% TFA σε DCM, (9 x 3 λεπτά), όπου στη συνέχεια προστέθηκε το παράγωγο Fmoc-Ser(tBu)-OH. Για τη σύζευξη του παραγώγου αυτού χρησιμοποιήθηκαν 9 ισοδύναμα DIEA και όχι 6 ισοδύναμα που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύζευξη των άλλων αμινοξέων του πεπτιδίου, διότι απαιτείται επιπλέον ποσότητα για να εξουδετερωθεί το άλας TFA της ε-αμινομάδας της λυσίνης που σχηματίζεται κατά την απομάκρυνση της Mtt ομάδας. Τέλος, η Fmoc ομάδα απομακρύνθηκε ταυτόχρονα από τις α-αμινομάδες των καταλοίπων αλανίνης (Ala¹) και σερίνης (Ser¹²).

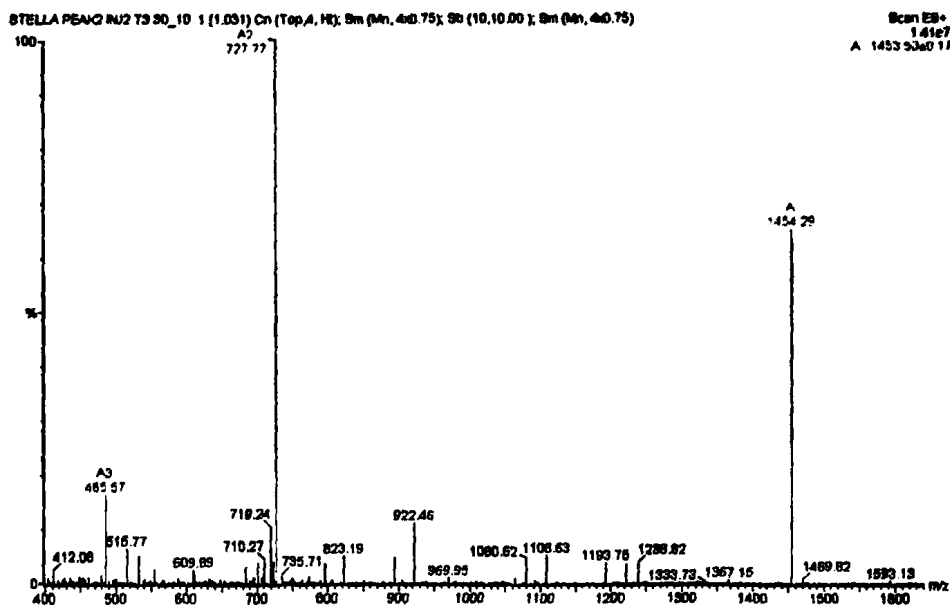
Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης αυτής, η πεπτιδορητίνη ξηράνθηκε υπεράνω υδρού (H₂O) σε ξηραντήρα κενού (απόδοση σύνθεσης 89%).

Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη με ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων πραγματοποιήθηκε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης (1,21 g) με 10 ml διαλύματος 95% TFA : 2.5% TIS : 2.5% H₂O (v/v) για 4 ώρες υπό συνεχή μαγνητική ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε διήθηση υπό κενό για την απομάκρυνση της ρητίνης, συμπύκνωση του διηθήματος μέχρι ξηρού, εκκλύσεις με μίγμα DCM/εξάνιο 1:1 (v/v), καταβύθιση του πεπτιδίου με διαιθυλαιθέρα υπό ψύξη, διήθηση και τέλος παραλαβή του με υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 2N και λυοφιλοποίηση (απόδοση 92%).

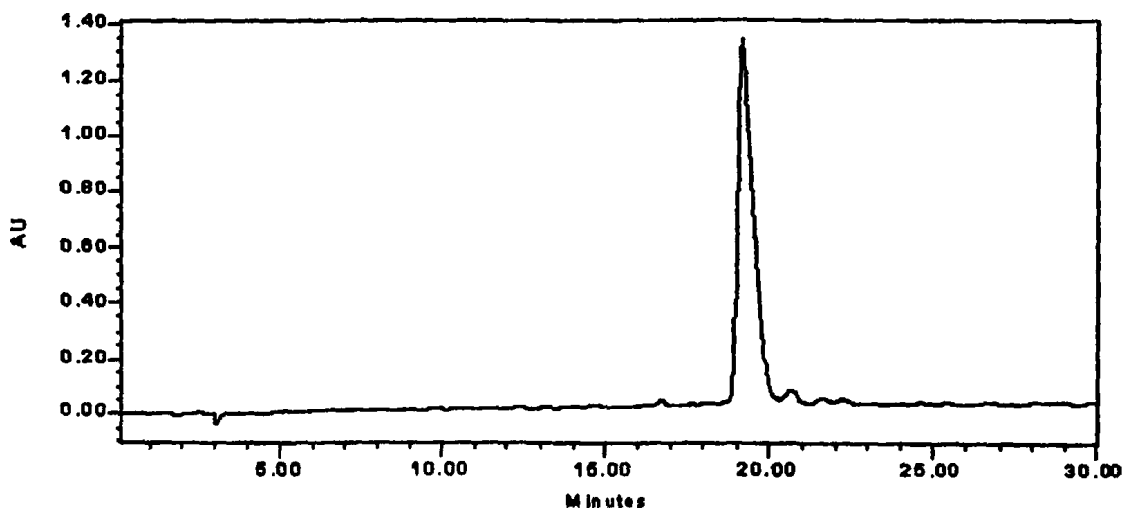
Ο καθαρισμός του πεπτιδίου έγινε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC χρησιμοποιώντας βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης 20% έως 80% CH₃CN/0.1%TFA σε H₂O/0.1%TFA με ταχύτητα ροής 4.7ml/min για 30 min, ανίχνευση στα 214nm (απόδοση 92%).



Η ταυτοποίηση του κύριου κλάσματος έγινε με φασματομετρία μάζας ESI-MS (Σχήμα 8) ενώ η καθαρότητα επιβεβαιώθηκε με αναλυτική RP-HPLC (Σχήμα 9).

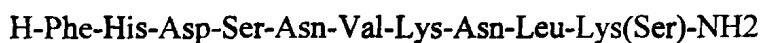


Σχήμα 8. Φάσμα μάζας ESI του καθαρού πεπτιδίου T3. Ευρεθέν μοριακό βάρος 1453,50, υπολογισθέν μοριακό βάρος 1452,74.



Σχήμα 9. Χρωματογράφημα Αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού πεπτιδίου T3. Βαθμιδακό σύστημα έκλουσης 10% έως 50% CH₃CN/0.1%TFA σε H₂O/0.1%TFA με ταχύτητα ροής 1ml/min για 30 min, ανίχνευση στα 214nm.

4. Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του επιτόπου T5:



MB: 1287, 44

MT: C₅₆H₉₀N₁₈O₁₇

Για τη σύνθεση του πεπτιδίου 4 χρησιμοποιήθηκαν 0,597 g ρητίνης Fmoc-Rink Amide AM με υποκατάσταση 0,67 mmol/g, ενώ ακολουθήθηκε η γενική πορεία σύνθεσης που περιγράφεται στο σχήμα 2.

Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του γραμμικού τμήματος του πεπτιδίου (κατάλοιπα 1-10) και χωρίς να πραγματοποιηθεί αποπροστασία της α-αμινομάδας του τελευταίου καταλοίπου (Phe¹), έγινε εκλεκτική απομάκρυνση της Mtt ομάδας από την ε-αμινομάδα της λυσίνης με χρήση διαλύματος 1,8% TFA σε DCM, (9 x 3 λεπτά), όπου στη συνέχεια προστέθηκε το παράγωγο Fmoc-Ser(tBu)-OH. Για τη σύζευξη του παραγώγου αυτού χρησιμοποιήθηκαν 9 ισοδύναμα DIEA και όχι 6 ισοδύναμα που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύζευξη των άλλων αμινοξέων του πεπτιδίου, διότι απαιτείται επιπλέον ποσότητα για να εξουδετερωθεί το άλας TFA της ε-αμινομάδας της λυσίνης που σχηματίζεται κατά την απομάκρυνση της Mtt ομάδας. Τέλος, η Fmoc ομάδα απομακρύνθηκε ταυτόχρονα από τις α-αμινομάδες των καταλοίπων φαινυλαλανίνης (Phe¹) και σερίνης (Ser¹¹).

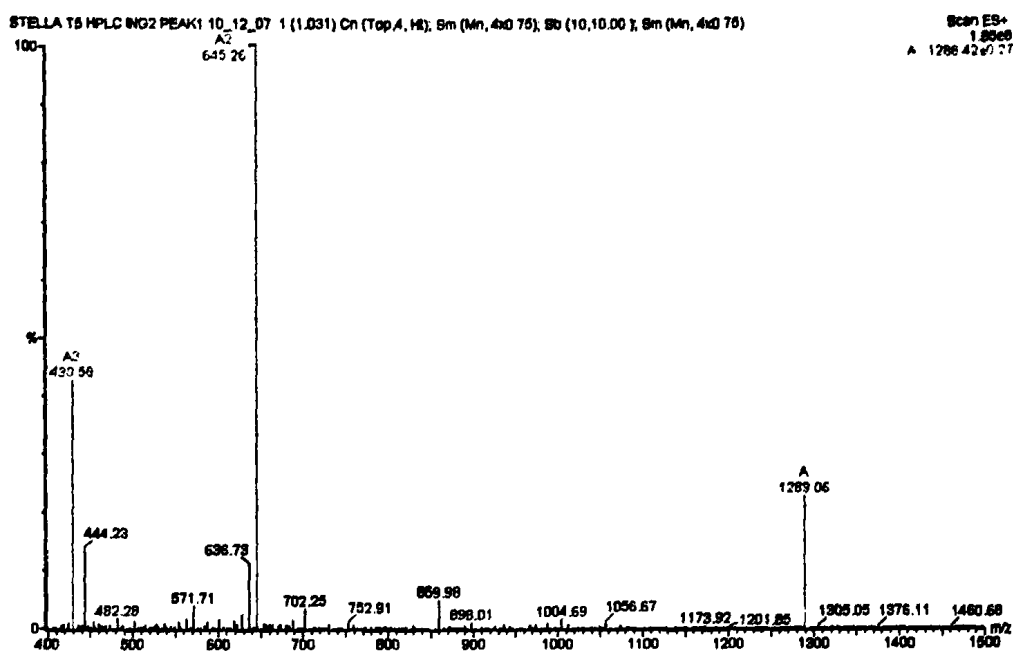
Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης αυτής, η πεπτιδορητίνη ξηράνθηκε υπεράνω H₂O₅ σε ξηραντήρα κενού (απόδοση σύνθεσης 84%).

Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη με ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων πραγματοποιήθηκε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης (1,19 g) με 10 ml διαλύματος 95% TFA : 2.5% TIS : 2.5% H₂O (v/v) για 4 ώρες υπό συνεχή μαγνητική ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε διήθηση υπό κενό για την απομάκρυνση της ρητίνης, συμπύκνωση του διηθήματος μέχρι ξηρού, εκκλύσεις με μίγμα DCM/εξάνιο 1:1 (v/v), καταβύθιση του πεπτιδίου με διαιθυλαιθέρα υπό ψύξη, διήθηση και τέλος παραλαβή αυτού με υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 2N και λυοφιλοποίηση (απόδοση 98%).

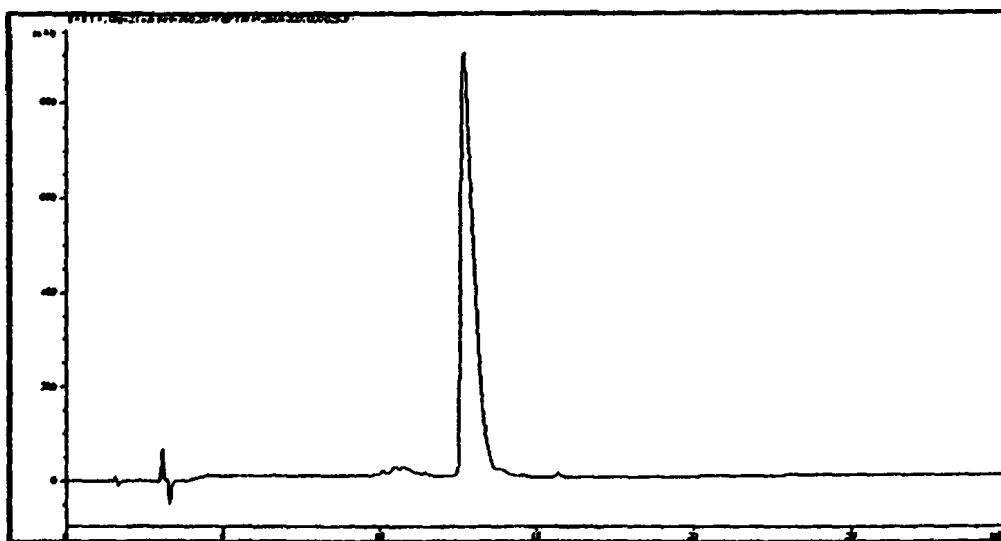
Ο καθαρισμός του πεπτιδίου έγινε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC χρησιμοποιώντας βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης 10% έως 60% CH₃CN/0.1%TFA σε H₂O/0.1%TFA με ταχύτητα ροής 4.7ml/min για 30 min, ανίχνευση στα 214nm (απόδοση 98%)



Η ταυτοποίηση του κύριου κλάσματος έγινε με φασματομετρία μάζας ESI-MS (Σχήμα 10) ενώ η καθαρότητα επιβεβαιώθηκε με αναλυτική RP-HPLC (Σχήμα 11).



Σχήμα 10. Φάσμα μάζας ESI του καθαρού πεπτιδίου T5. Ευρεθέν μοριακό βάρος 1288,42, υπολογισθέν μοριακό βάρος 1287,44.



Σχήμα 11. Χρωματογράφημα Αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού πεπτιδίου T5. Βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης 10% έως 50% CH₃CN/0.1%TFA σε H₂O/0.1%TFA με ταχύτητα ροής 1ml/min για 30 min, ανίχνευση στα 214nm.

5. Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του επιτόπου T7:



MB: 1255, 36

MT: $\text{C}_{55}\text{H}_{81}\text{N}_{16}\text{O}_{18}$

Για τη σύνθεση του πεπτιδίου 5 χρησιμοποιήθηκαν 0,597 g ρητίνης Fmoc-Rink Amide AM με υποκατάσταση 0,67 mmol/g, ενώ ακολουθήθηκε η γενική πορεία σύνθεσης που περιγράφεται στο σχήμα 2.

Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του γραμμικού τμήματος του πεπτιδίου (κατάλοιπα 1-10) και χωρίς να πραγματοποιηθεί αποπροστασία της α-αμινομάδας του τελευταίου καταλοίπου (Asn^1), έγινε εκλεκτική απομάκρυνση της Mtt ομάδας από την ε-αμινομάδα της λυσίνης με χρήση διαλύματος 1,8% TFA σε DCM, (9 x 3 λεπτά), όπου στη συνέχεια προστέθηκε το παράγωγο Fmoc-Ser(tBu)-OH. Για τη σύζευξη του παραγώγου αυτού χρησιμοποιήθηκαν 9 ισοδύναμα DIEA και όχι 6 ισοδύναμα που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύζευξη των άλλων αμινοξέων του πεπτιδίου, διότι απαιτείται επιπλέον ποσότητα για να εξουδετερωθεί το άλας TFA της ε-αμινομάδας της λυσίνης που σχηματίζεται κατά την απομάκρυνση της Mtt ομάδας. Τέλος, η Fmoc ομάδα απομακρύνθηκε ταυτόχρονα από τις α-αμινομάδες των καταλοίπων ασπαραγίνης (Asn^1) και σερίνης (Ser^{11}).

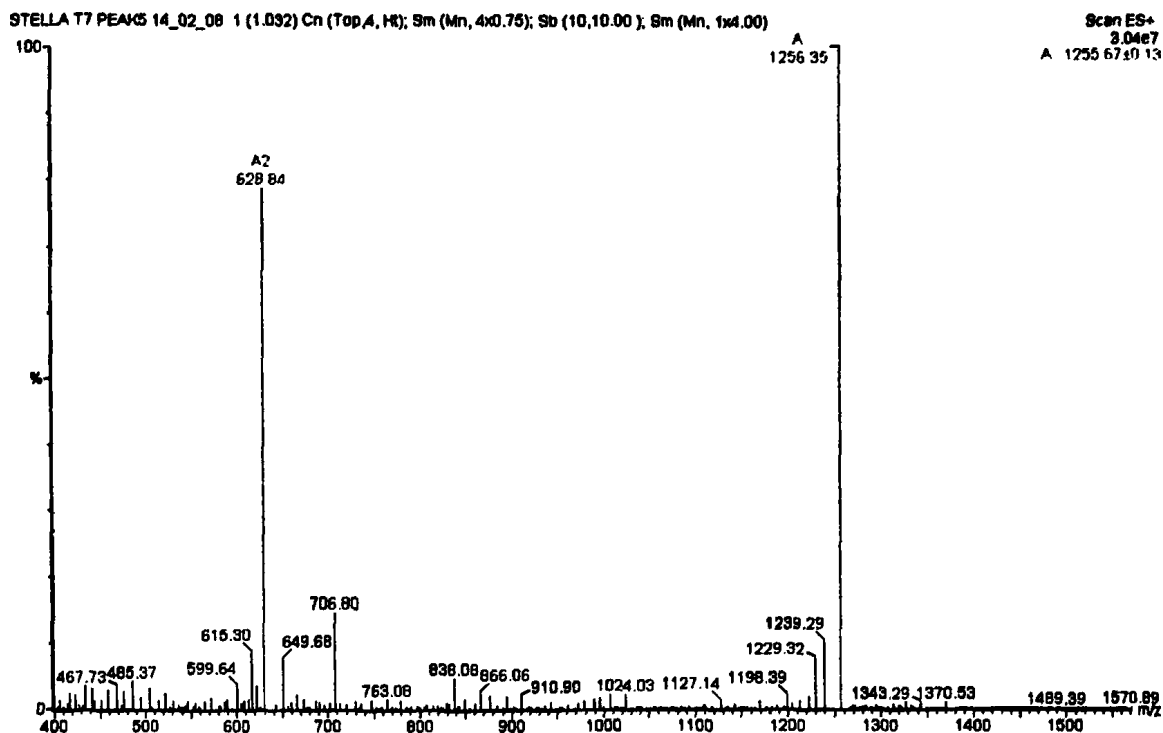
Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης αυτής, η πεπτιδορητίνη ξηράνθηκε υπεράνω P_2O_5 σε ξηραντήρα κενού (απόδοση σύνθεσης 82%).

Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη με ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων πραγματοποιήθηκε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης (1,12 g) με 10 ml διαλύματος 95% TFA : 2.5% TIS : 2.5% H_2O (v/v) για 4 ώρες υπό συνεχή μαγνητική ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε διήθηση υπό κενό για την απομάκρυνση της ρητίνης, συμπύκνωση του διηθήματος μέχρι ξηρού, εκκλύσεις με μίγμα DCM/εξάνιο 1:1 (v/v), καταβύθιση του πεπτιδίου με διαιθυλαιθέρα υπό ψύξη, διήθηση και τέλος παραλαβή αυτού με υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 2N και λυοφιλοποίηση (απόδοση 97%).

Ο καθαρισμός του πεπτιδίου έγινε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC χρησιμοποιώντας βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης 10% έως 60% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%\text{TFA}$ σε $\text{H}_2\text{O}/0.1\%\text{TFA}$ με ταχύτητα ροής 4.7ml/min για 30 min, ανίχνευση στα 214nm (απόδοση 92%).



Η ταυτοποίηση του κύριου κλάσματος έγινε με φασματομετρία μάζας ESI-MS (Σχήμα 12) ενώ η καθαρότητα επιβεβαιώθηκε με αναλυτική RP-HPLC (Σχήμα 13).



Σχήμα 12. Φάσμα μάζας ESI του καθαρού πεπτιδίου T7. Ευρεθέν μοριακό βάρος 1255,67, υπολογισθέν μοριακό βάρος 1255,36.



Σχήμα 13. Χρωματογράφημα Αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού πεπτιδίου T7. Βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης 10% έως 60% CH₃CN/0.1%TFA σε H₂O/0.1%TFA με ταχύτητα ροής 1ml/min για 30 min, ανίχνευση στα 214nm.



τέλος, στον πίνακα 2 συνοψίζονται οι αποδόσεις σύνθεσης και καθαρισμού των T-κυτταρικών επιτόπων της HA H5 που παρασκευάστηκαν σε στερεή φάση κατά Merrifield.

Πίνακας 2. Απόδοση σύνθεσης και καθαρισμού των T-κυτταρικών επιτόπων της HA H5 που παρασκευάστηκαν σε στερεή φάση κατά Merrifield

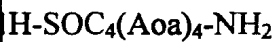
T-ΕΠΙΤΟΠΟΙ	ΑΠΟΔΟΣΗ ΣΥΝΘΕΣΗΣ	ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ
H5VIN1cor54-69: H-DC(Acm)SVAGWLLGNPMC(Acm)DE- NH ₂	71 %	23 %
T1: H-VLMENERTLK(Ser)A-NH ₂	92 %	65 %
T3: H-ASFFRNVVWLK(Ser)-NH ₂	89 %	69 %
T5: H-FHDSNVKNLK(Ser)-NH ₂	84 %	53 %
T7: H-NFESNGNFIK(Ser)-NH ₂	82 %	52 %

Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση πεπτιδικών παραγώγων κατάλληλων για χημειοεκλεκτική σύνδεση

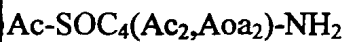
Εισαγωγή

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

1. N^ε-αμινοοξυακέρυλο φορέας SOC₄-I:



2. N^ε-αμινοοξυακέρυλο φορέας SOC₄-I:



3. Αλδεϋδικό παράγωγο του επιτόπου T1:



4. Αλδεϋδικό παράγωγο του επιτόπου T3:



5. Αλδεϋδικό παράγωγο του επιτόπου T5:



6. Αλδεϋδικό παράγωγο του επιτόπου T7:



Γενική πορεία σύνθεσης

Σύνθεση διακλαδισμένων πεπτιδίων

Η σύνθεση διακλαδισμένων πεπτιδίων, όπως για παράδειγμα η πρόσδεση επιτόπων στην παράπλευρη αλυσίδα των λυσινών του ολιγοπεπτιδικού φορέα SOC, απαιτεί ορθογωνική προστασία των καταλοίπων λυσίνης με μια προστατευτική ομάδα η οποία να μπορεί να απομακρυνθεί εκλεκτικά, μετά την ολοκλήρωση σύνθεσης του γραμμικού κλάσματος του φορέα. Για το σκοπό αυτό, στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το παράγωγο της λυσίνης Fmoc-Lys(Mtt)-OH. Η Mtt ομάδα απομακρύνεται εκλεκτικά, σε ελαφρώς όξινες συνθήκες, χωρίς να παρατηρείται αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη, και αυτό επιτρέπει τη συνέχιση της σύνθεσης από την ε-αμινομάδα της λυσίνης.



Σύνθεση του N^ε-αμινοξυακέτυλο φορέα SOC₄-I

Κατά τη σύνθεση του φορέα SOC₄-I, τα κατάλοιπα λυσίνης εισήχθησαν ως Fmoc-Lys(Mtt)-OH. Μετά την ολοκλήρωση σύνθεσης του μορίου του φορέα, η ομάδα Mtt απομακρύνθηκε από την ε-αμινομάδα της λυσίνης με διάλυμα 1,8% TFA σε DCM (9x3 min). Στη συνέχεια, το παράγωγο Boc-NHOCH₂COOH (Boc-aminooxy acetic acid) συζεύχθηκε στην ελεύθερη ε-αμινομάδα της λυσίνης με χρήση του DIC ως αντιδραστηρίου σύζευξης και παρουσία HOBt ως βοηθητικού πυρηνόφιλου. Η Boc προστατευτική ομάδα απομακρύνθηκε κατά την αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη.

Σύνθεση τροποποιημένων T επιτόπων

Προκειμένου οι T επίτοποι, που προβλέφθηκαν για την πρωτεΐνη H5 του ιού της γρίπης, να προσδεθούν χημειοεκλεκτικά μέσω δημιουργίας δεσμού οξίμης με τον N^ε-αμινοξυακέτυλο φορέα SOC₄-I, απαιτείται η τροποποίηση αυτών έτσι ώστε να προκύψει μια αλδεϋδική ομάδα η οποία αντιδρά εκλεκτικά με την αμινο-όξυ ομάδα σε όξινο περιβάλλον.

Για το σκοπό αυτό, στο C-άκρο του επιτόπου προστίθεται μια λυσίνη προστατευμένη με την Mtt ομάδα στην ε-αμινομάδα. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του επιτόπου, η Mtt ομάδα απομακρύνεται με διάλυμα 1,8% TFA σε DCM (9x3 min) και στην ελεύθερη ε-αμινομάδα προστίθεται μια σερίνη, ως Fmoc-Ser(tBu)-OH. Η Fmoc ομάδα απομακρύνεται από την α-αμινομάδα της σερίνης και από την α-αμινομάδα του τελευταίου αμινοξέος του επιτόπου με 20% πιπεριδίνη σε DMF και τέλος το πεπτίδιο αποκόπτεται από τη ρητίνη.

Με την εισαγωγή μιας σερίνης στην παράπλευρη αλυσίδα της λυσίνης εξασφαλίζεται η ύπαρξη μιας ελεύθερης 2-άμινο-αλκοολικής ομάδας στο πεπτίδιο η οποία σχεδόν εκλεκτικά οξειδώνεται με NaIO₄ προς αλδεΐδη.

Οξείδωση 2-άμινο-αλκοόλης προς αλδεΐδη παρουσία NaIO₄

Η αντίδραση οξείδωσης της 2-άμινο-αλκοολικής ομάδας της σερίνης προς αλδεΐδη με την επίδραση NaIO₄ λαμβάνει χώρα σε ρυθμιστικό διάλυμα ιμιδαζολίου-HCl pH 7. Το NaIO₄ χρησιμοποιείται σε μοριακή αναλογία 2:1 ως προς την 2-άμινο-αλκοολική ομάδα ενώ η αντίδραση ολοκληρώνεται ταχύτατα, ακόμα και εντός 2 min. Η περίσσεια του NaIO₄ δεσμεύεται από διάλυμα αιθυλενογλυκόλης (100mM σε νερό) η οποία προστίθεται σε μοριακή αναλογία 2:1 ως προς το NaIO₄.



Αντιδραστήρια

Για την πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση των πεπτιδίων 1 και 2 χρησιμοποιήθηκε ως πολυμερικό υπόστρωμα η 4-[2',4'-διμεθοξυ-φαινυλ-(9-φλουορενυλμεθοξυκαρβονυλ)-αμινομεθυλ]-φαινοξυ ακεταμιδο-νορλευκυλαμινομεθυλ-ρητίνη (Rink Amide AM ρητίνη).

Ως αντιδραστήρια σύζευξης των αμινοξέων χρησιμοποιήθηκαν τα:

- ο-βενζοτριαζολυλο-τετραμεθυλο-ισοουρονικό τετραφθοροβορικό άλας (TBTU),

[Neosystem Laboratoire (Strasbourg, France) ή GL Biochem (Shanghai, China)].

- ο-βενζοτριαζολυλο-τετραμεθυλο-ισοουρονικό εξαφθοροφωσφορικό άλας

(HBTU), [Neosystem Laboratoire (Strasbourg, France) ή GL Biochem (Shanghai, China)].

- N,N-διϊσοπρόπυλο καρβοδιϊμίδιο (DIC), [Fluka (Schnelldorf, Germany)]

Ως βοηθητικό πυρηνόφιλο χρησιμοποιήθηκε το 1-υδροξυβενζοτριαζόλιο (HOBT), [GL

Biochem (Shanghai, China)].

Τα N^ε-Fmoc προστατευμένα παράγωγα αμινοξέων που χρησιμοποιήθηκαν για τη

σύνθεση των πεπτιδίων καταγράφονται στον πίνακα 1.

Στη σύνθεση και τον καθαρισμό των πεπτιδίων χρησιμοποιήθηκαν οι διαλύτες:

- μεθανόλη [MeOH, analytical reagent και HPLC grade, LABSCAN (Ireland)]

- διχλωρομεθάνιο [DCM, LABSCAN (Ireland)]

- διμεθυλοφορμαμίδιο [DMF, LABSCAN (Ireland)], αποθηκευμένο υπεράνω μοριακών κόσκινων (molecular sieves) 4Å για την απομάκρυνση της υγρασίας

- εξάνιο [LABSCAN (Ireland)], κατά την συμπύκνωση του TFA μετά την αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη

- διαιθυλαιθέρας [Riedel (Germany)], καταβύθιση του πεπτιδίου μετά τη συμπύκνωση του TFA

- οξικό οξύ [MB: 60,05, d: 1,048 g/ml, Panreac (Spain)], για την παραλαβή του πεπτιδίου μετά την καταβύθιση

- ακετονιτρίλιο [CH₃CN, HPLC grade, LABSCAN (Ireland)], κατά τον καθαρισμό των πεπτιδίων με HPLC

Ενώ άλλα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη σύνθεση των πεπτιδίων είναι τα:

- διϊσοπροπυλοαιθυλαμίνη [DIEA, Merck-Schuchardt (Germany)], για τη σύζευξη των αμινοξέων

- τριφθοροξικό οξύ [TFA, Fluka (Germany)], για την απομάκρυνση της Boc αμινο-προστατευτικής ομάδας και την αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη



- οξικός ανυδρίτης [Ac_2O , Merk (Germany)] και πυριδίνη [Fluka (Germany), για την ακετυλίωση των ελεύθερων αμινομάδων
- πιπεριδίνη [Fluka (Germany)], για την αποπροστασία της Fmoc-ομάδας
- τριϊσοπροπυλοσιλάνιο [TIS, Sigma (USA)]
- τριφθοροοξικό οξύ [HF, Fluka (Germany)], για την αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη

Πίνακας 1. *N*-προστατευμένα παράγωγα αμινοξέων που χρησιμοποιήθηκαν στη σύνθεση των πεπτιδίων 1 και 2

<i>N</i> -προστατευμένα παράγωγα αμινοξέων	Μοριακό Βάρος	Προμηθευτής
Fmoc-Gly-OH	297,3	GL Biochem (Shanghai, China)
Fmoc-Aib-OH	325,4	GL Biochem (Shanghai, China)
Fmoc-Lys(Ac)-OH	410,5	GL Biochem (Shanghai, China)
Fmoc-Lys(Mtt)-OH	624,8	CBL Patras-Barlos GL Biochem (Shanghai, China)

Για τη σύνθεση σε υγρή φάση των πεπτιδίων 3, 4, 5 και 6 χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια και διαλύτες:

- tert-βουτυλοξυκαρβονυλ-αμινοοξυ-οξικό οξύ [Boc-NHOCH₂COOH, Fluka (Schnelldorf, Germany)]
- υπερωδικό νάτριο [NaIO_4 , M.B.: 213,89, Fluka (Schnelldorf, Germany)]
- ιμιδαζόλιο [$\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2$, M.B.: 68,08, Fluka (Schnelldorf, Germany)]
- υδροχλωρικό οξύ [HCl, M.B.: 36,46, d: 1,18g/ml, Fluka (Schnelldorf, Germany)]
- αιθυλενογλυκόλη [$\text{C}_2\text{H}_4(\text{OH})_2$, M.B.: 62,07, d: 1,11g/ml, Fluka (Schnelldorf, Germany)]

Διαλύματα εργασίας

Διάλυμα Α (υδατικό διάλυμα ιμιδαζολίου 0,2M): σε ογκομετρική φιάλη των 50ml εισάγονται 0,6808g ιμιδαζολίου και προστίθεται νερό μέχρι τη χαραγή.

Διάλυμα Β (υδατικό διάλυμα υδροχλωρίου 0,1M): σε ογκομετρική φιάλη των 250ml εισάγονται 0,77ml πυκνού υδροχλωρίου και προστίθεται νερό μέχρι τη χαραγή.

Ρυθμιστικό διάλυμα ιμιδαζολίου-υδροχλωρίου 50mM, pH 6,9:

25ml διαλύματος Α και 25,4ml διαλύματος Β εισάγονται σε ογκομετρική φιάλη των 100ml και ο όγκος συμπληρώνεται με νερό ως τη χαραγή.



Υδατικό διάλυμα αιθυλενογλυκόλης 100mM:

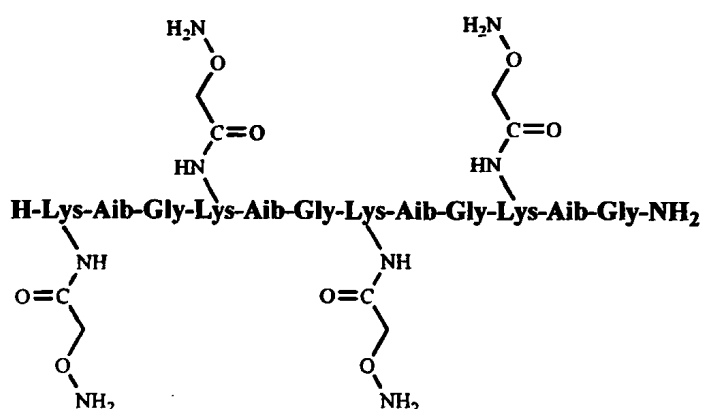
0,56ml αιθυλενογλυκόλης εισάγονται σε ογκομετρική φιάλη των 100ml και ο όγκος συμπληρώνεται με νερό μέχρι τη χαραγή.

Τα διαλύματα φυλάσσονται στους 4°C.

Πειραματική πορεία σύνθεσης, καθαρισμού και ταυτοποίησης

1. Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του N^E-αμινοεξακετύλο φορέα SOC₄-I:

H-SOC₄(Aoa)₄-NH₂



MB: 1390,56

MT: C₅₆H₁₀₃N₂₁O₂₀

Για τη σύνθεση του πεπτιδίου 1 χρησιμοποιήθηκε 1,00 g ρητίνης Fmoc-Rink Amide AM με υποκατάσταση 0,4 mmol/g. Η σύνθεση ολοκληρώθηκε σε δυο στάδια.

Αρχικά, έγινε η σύνθεση του φορέα SOC₄-I, που φέρει την Fmoc ομάδα στην α-αμινομάδα της τελευταίας λυσίνης και την Mtt ομάδα στην ε-αμινομάδα των τεσσάρων λυσινών, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στο σχήμα 2, Κεφάλαιο 10. Στη συνέχεια, έγινε απομάκρυνση της Mtt ομάδας από την ε-αμινομάδα των λυσινών και εισαγωγή της αμινοεξακετυλομάδας, όπως περιγράφεται αναλυτικά στο σχήμα 1. Ακολούθησε απομάκρυνση της Fmoc ομάδας από την α-αμινομάδα της τελευταίας λυσίνης και ξήρανση της πεπτιδορητίνης (απόδοση 91%).

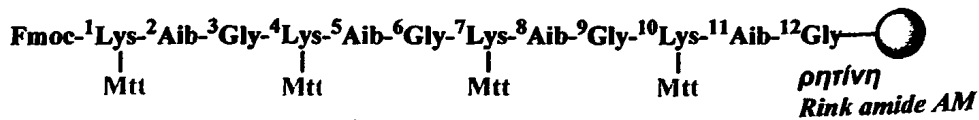
Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη με ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων πραγματοποιήθηκε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης (0,74 g) με

20 ml διαλύματος 95% TFA : 2.5% TIS : 2.5% H₂O (v/v) για 4 ½ ώρες υπό συνεχή μαγνητική ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε διήθηση υπό κενό για την απομάκρυνση της ρητίνης, συμπύκνωση του διηθήματος μέχρι ξηρού, εκπλύσεις με μίγμα DCM/εξάνιο 1:1 (v/v), καταβύθιση του πεπτιδίου με διαιθυλαιθέρα υπό ψύξη, διήθηση και τέλος παραλαβή αυτού με υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 2N και λυοφιλοποίηση (απόδοση αποκοπής 97%).

Ο καθαρισμός του πεπτιδίου έγινε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC χρησιμοποιώντας βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης 10% έως 50% CH₃CN/0.1%TFA σε H₂O/0.1%TFA με ταχύτητα ροής 4.7ml/min για 30 min, ανίχνευση στα 214nm (απόδοση 45%)

Η ταυτοποίηση του κύριου κλάσματος έγινε με φασματομετρία μάζας ESI-MS (Σχήμα 2) ενώ η καθαρότητα επιβεβαιώθηκε με αναλυτική RP-HPLC (Σχήμα 3).





Απομάκρυνση Mtt ομάδας από Lys-N^εH₂

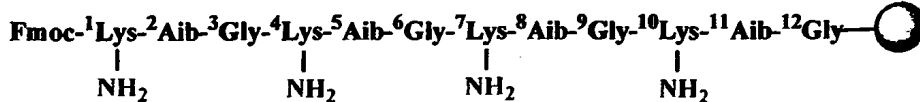
1,8% TFA/DCM, 9x3min

Εκπλύσεις: 3x1 DCM. 3x1 MeOH. 3x1 DCM

Εξουδετέρωση άλατος TFA της Lys-N^εH₂

2x2 7% DIEA/DCM

test Kaiser: (+)



Σύζευξη

3 ισοδύναμα Boc-NH-O-CH₂COOH (*Boc-Aaa-OH*)

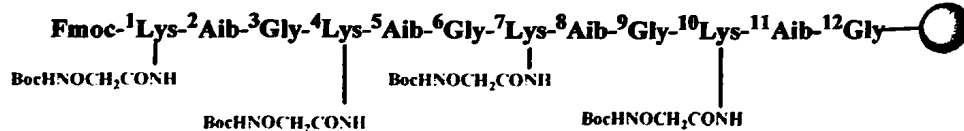
3 ισοδύναμα HOBt

3 ισοδύναμα DIC

Ανάδευση για 2x6-8 ώρες

Εκπλύσεις: 3x1 DCM. 3x1 MeOH, 3x1 DCM

test Kaiser: (-)

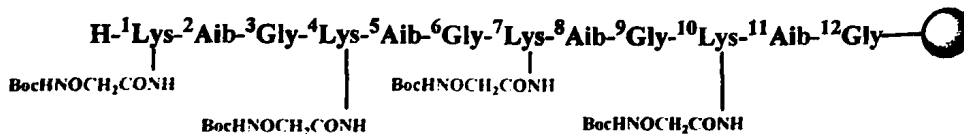


Απομάκρυνση Fmoc ομάδας από Lys-N^αH₂

20% πιπεριδίνη/DMF, 1x2, 1x15 min

Εκπλύσεις: 3x1 DMF, 3x1 MeOH, 3x1 DCM

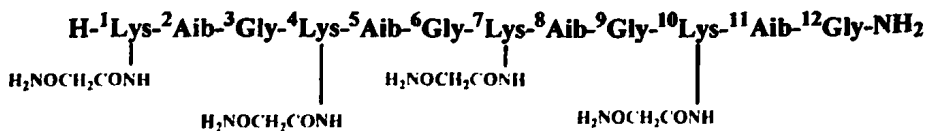
test Kaiser: (+)



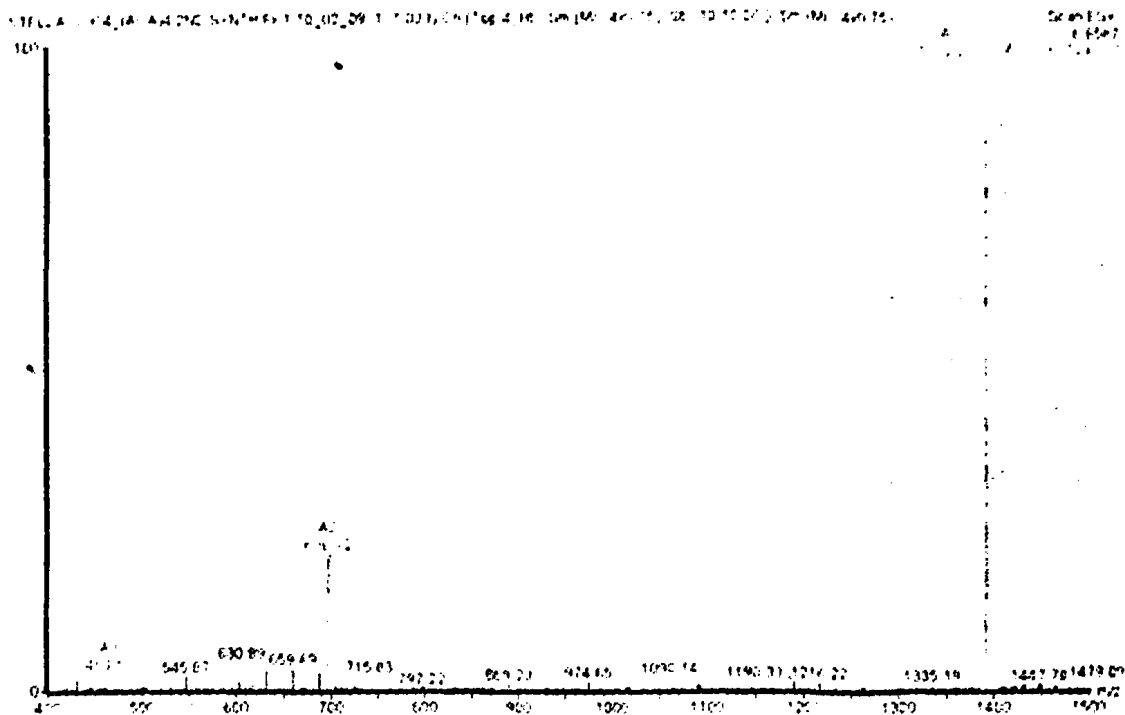
Αποκοπή από ρητίνη και απομάκρυνση Boc ομάδων

95%TFA / 2.5%TIS / 2.5%H₂O

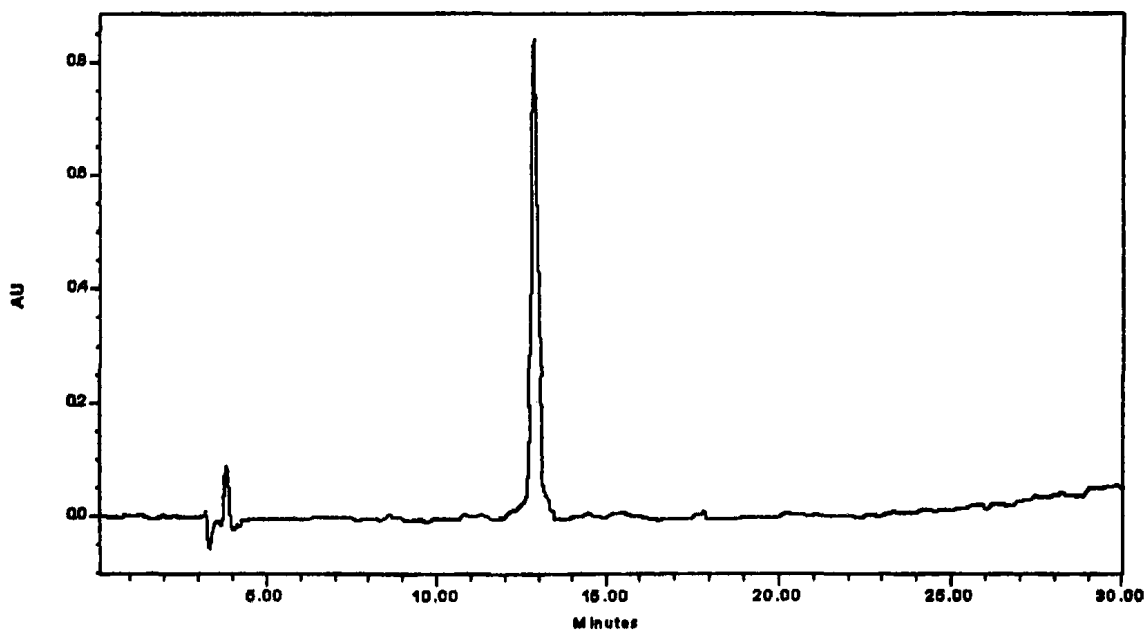
4 1/2 ώρες



Εχίμα 1. Πορεία σύνθεσης του N^ε-αμινοοξακέτυλο φορέα SOC₄-I σε ρητίνη Fmoc-Rink amide AM.



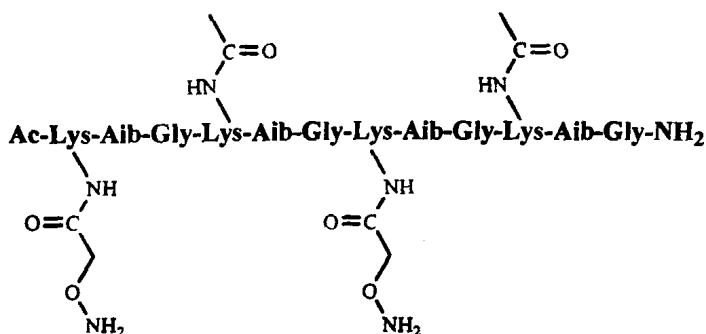
Σχήμα 2. Φάσμα μάζας ESI του καθαρού N⁶-αμινοοξακέτυλο φορέα SOC₄-I. Ευρεθέν μοριακό βάρος 1391.12, υπολογισθέν μοριακό βάρος 1390.56.



Σχήμα 3. Χρωματογράφημα Αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού N⁶-αμινοοξακέτυλο φορέα SOC₄-I. Βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης 5% έως 70% CH₃CN/0.1%TFA σε H₂O/0.1%TFA με ταχύτητα ροής 1ml/min για 30 min, ανίχνευση στα 214nm.

2. Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του N^ε-αμινοξυακέτυλο (λυσίνες 1 και

7) φορέα SOC₄-I:



MB: 1370,57

MT: C₅₈H₁₀₃N₁₉O₁₉

Για τη σύνθεση του πεπτιδίου 2 χρησιμοποιήθηκε 1,00 g ρητίνης Fmoc-Rink Amide AM με υποκατάσταση 0,67 mmol/g. Η σύνθεση ολοκληρώθηκε όπως περιγράφεται στο σχήμα 2, κεφάλαιο 10 χρησιμοποιώντας τα εξής παράγωγα αμινοξέων: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Aib-OH, Fmoc-Lys(Mtt)-OH και Fmoc-Lys(Ac)-OH.

Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης η πεπτιδορητίνη ξηράνθηκε υπεράνω P₂O₅ σε ξηραντήρα κενού (απόδοση σύνθεσης 80%).

Στη συνέχεια, σε μέρος της πεπτιδορητίνης (0,86 g), μετά την απομάκρυνση της Fmoc ομάδας από την α-αμινομάδα της τελευταίας λυσίνης, έγινε ακετυλίωση της πεπτιδορητίνης με 1,52 ml οξικού ανυδρίτη (30 ισοδύναμα) σε 30 ml πυριδίνη, 2 φορές από 20 min, απομάκρυνση της Mtt ομάδας από την ε-αμινομάδα της πρώτης και τρίτης λυσίνης και παραγωγή της αμινοξυακέτυλο ομάδας όπως περιγράφεται αναλυτικά στο σχήμα 4 (απόδοση 64%).

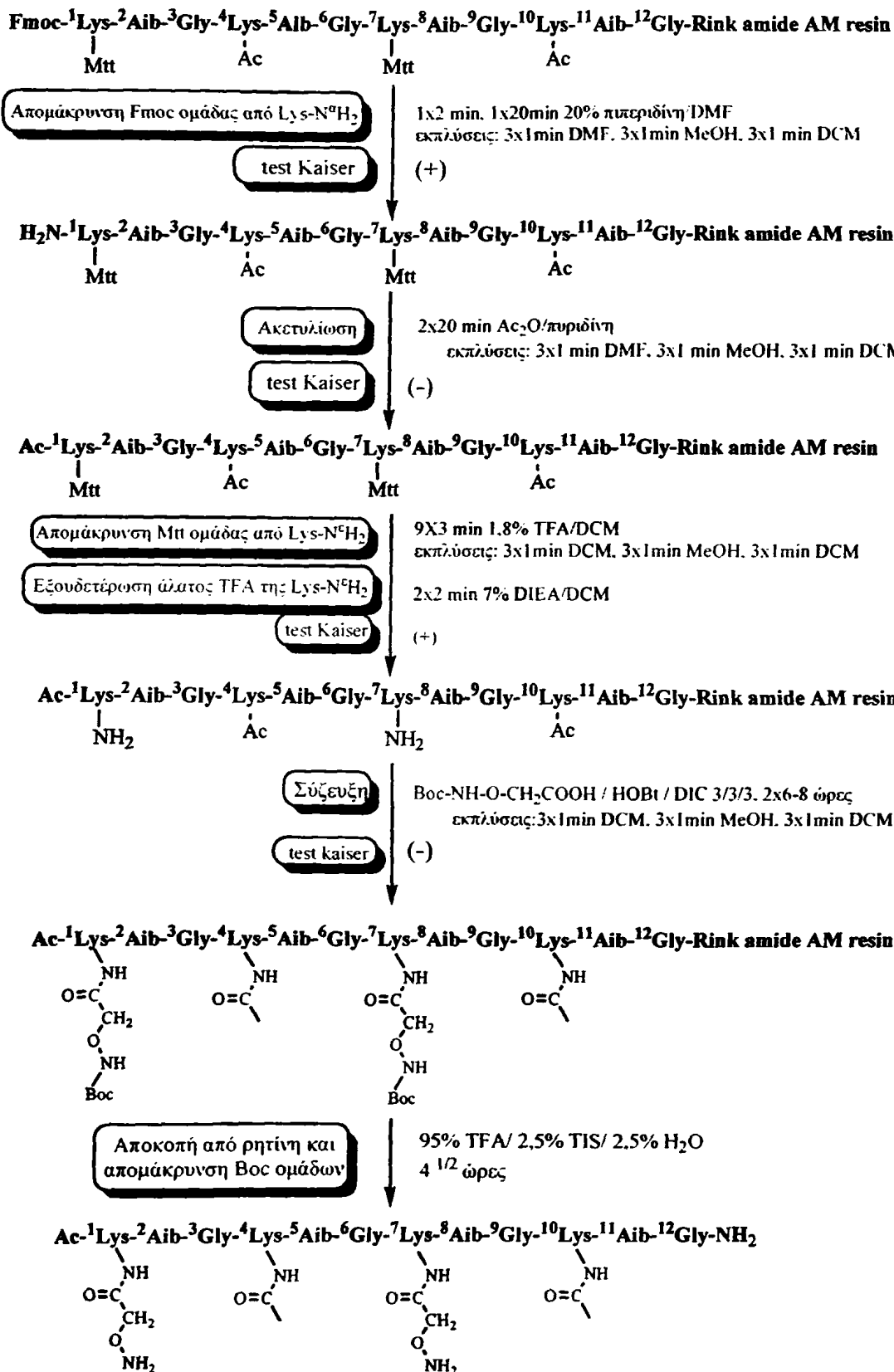
Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη με ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων πραγματοποιήθηκε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης (0,32 g) με 10 ml διαλύματος 95% TFA : 2.5% TIS : 2.5% H₂O (v/v) για 4 ½ ώρες υπό συνεχή μηχανική ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε διήθηση υπό κενό για την απομάκρυνση της ρητίνης, συμπύκνωση του διηθήματος μέχρι ξηρού, εκκλύσεις με μίγμα CH₂Cl₂/εξάνιο 1:1 (v/v), καταβύθιση του πεπτιδίου με διαιθυλαιθέρα υπό ψύξη, διήθηση και

τέλος παραλαβή αυτού με υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 2N και λυοφιλοποίηση (απόδοση αποκοπής 84%).

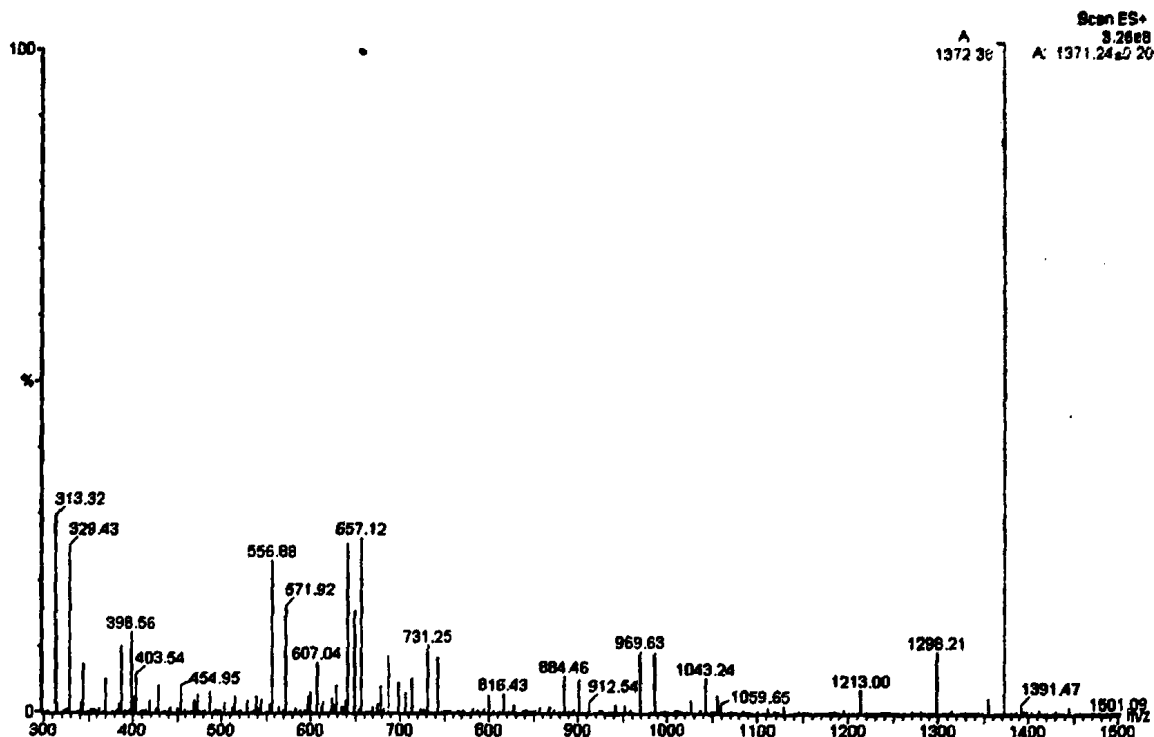
Ο καθαρισμός του πεπτιδίου έγινε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC χρησιμοποιώντας βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης 10% έως 40% CH₃CN/0.1%TFA σε H₂O/0.1%TFA με ταχύτητα ροής 4.7ml/min για 30 min, ανίχνευση στα 214nm (απόδοση 38%).

Η ταυτοποίηση του κύριου κλάσματος έγινε με φασματομετρία μάζας ESI-MS (Σχήμα 5) ενώ η καθαρότητα επιβεβαιώθηκε με αναλυτική RP-HPLC (Σχήμα 6).

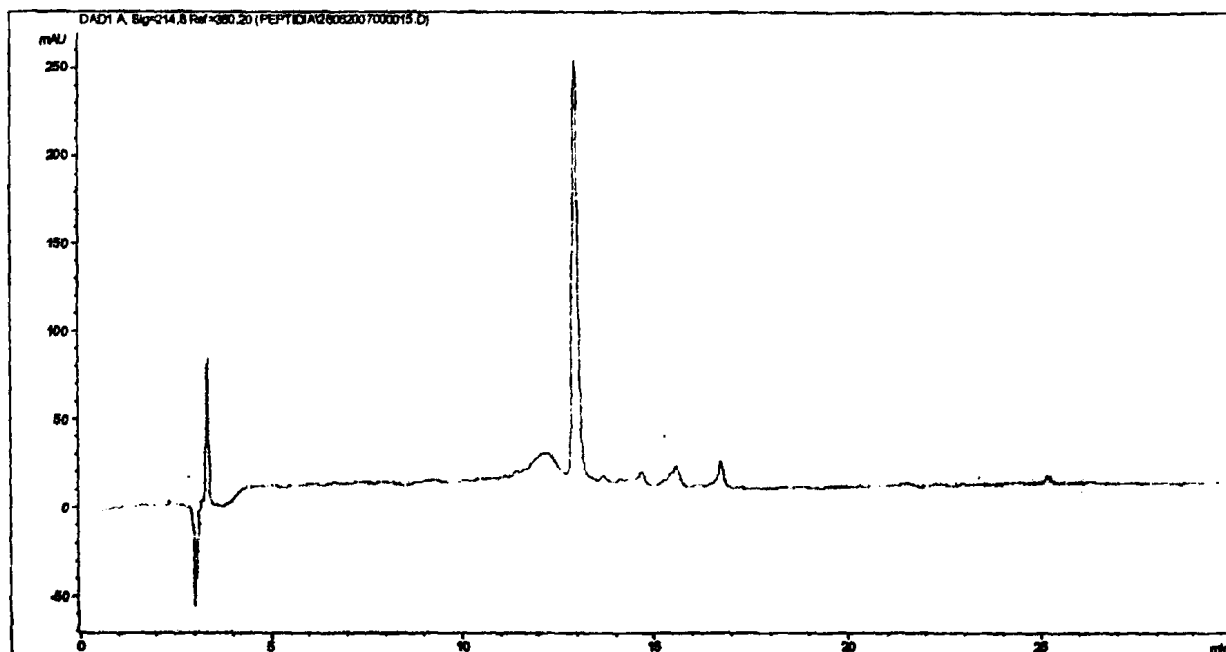




σχήμα 4. Πορεία σύνθεσης του Νε-αμινοοζυακέτυλο (λυσίνες 1 και 7) φορέα SOC4-1 σε ρητίνη Rink Amide Am



Σχήμα 5. Φάσμα μάζας ESI του καθαρού N^ε-αμινοοξακέτυλο (λυσίνες 1 και 7) φορέα SOC₄-I. Ευρεθέν μοριακό βάρος 1371.24, υπολογισθέν μοριακό βάρος 1370.57.



Σχήμα 6. Χρωματογράφημα Αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού N^ε-αμινοοξακέτυλο (λυσίνες 1 και 7) φορέα SOC₄-I. Βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης 10% έως 50% CH₃CN/0.1%TFA σε H₂O/0.1%TFA με ταχύτητα ροής 1ml/min για 30 min, ανίχνευση στα 214nm.

3. Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του αλδεϋδικού παραγώγου του επιτόπου

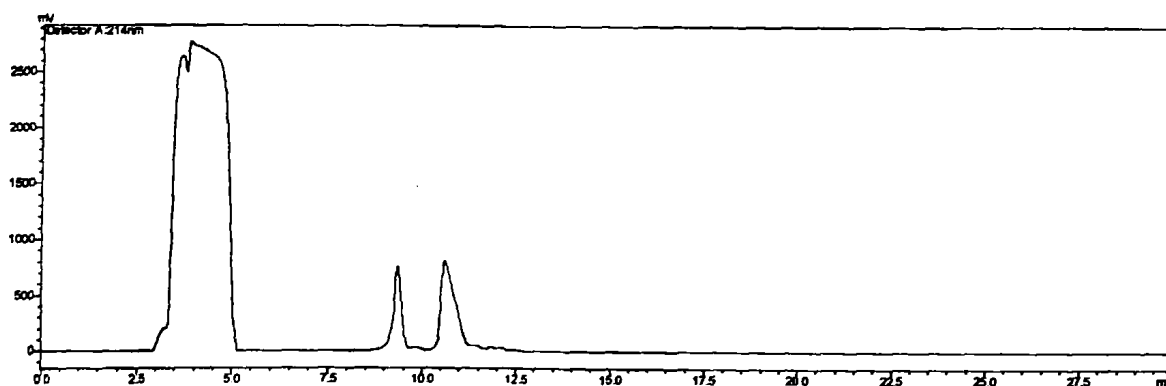
T1: H-Val-Leu-Met-Glu-Asn-Glu-Arg-Thr-Leu-Lys(CHOCO)-Ala-NH₂

M.B.: 1358,57

M.T.: C₅₇H₉₉N₁₇O₁₉S

12,35 mg του πεπτιδίου VLMENERTLK(Ser)A-NH₂ (8,9 μmol) διαλύονται σε 0,89 ml H₂O σε σφαιρική φιάλη και αραιώνονται με 7,12 ml ρυθμιστικού διαλύματος ιμιδαζολίου-HCl 50 mM pH6,9. Στο υπό ανάδευση διάλυμα προστίθεται διάλυμα NaIO₄ (3,8 mg, 17,8 μmol) σε 0,89 ml H₂O. Η αντίδραση οξείδωσης αφήνεται για 6min οπότε τερματίζεται με προσθήκη διαλύματος αιθυλενογλυκόλης 100 mM (35,6 μmol, 356 μl).

Το επιθυμητό πεπτίδιο 3 απομονώνεται με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC χρησιμοποιώντας βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης 10% έως 70% CH₃CN/0.1%TFA σε H₂O/0.1%TFA με ταχύτητα ροής 4.7ml/min για 30 min, ανίχνευση στα 214nm.

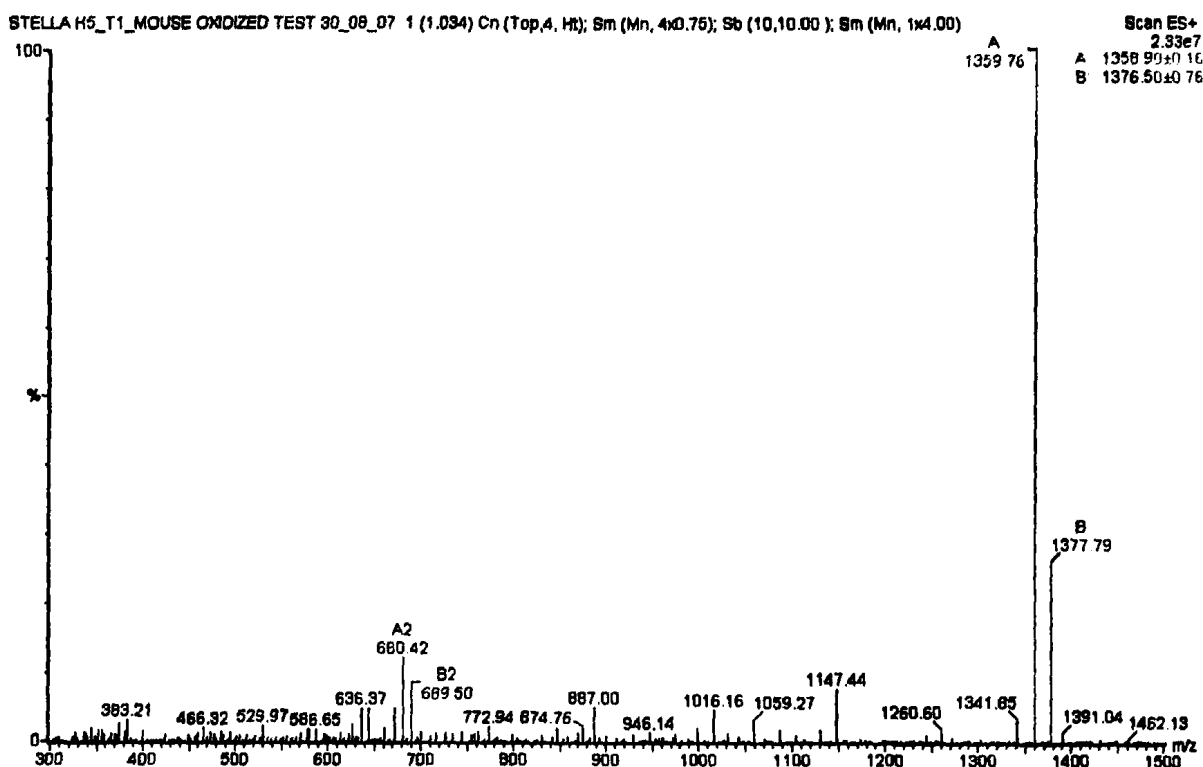


Σχήμα 7. Χρωματογράφημα ημιπαρασκευαστικής HPLC δείγματος από την αντίδραση οξείδωσης του επιτόπου T1. Βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης 10% έως 70% CH₃CN/0.1%TFA σε H₂O/0.1%TFA με ταχύτητα ροής 4.7ml/min για 30 min, ανίχνευση στα 214nm.

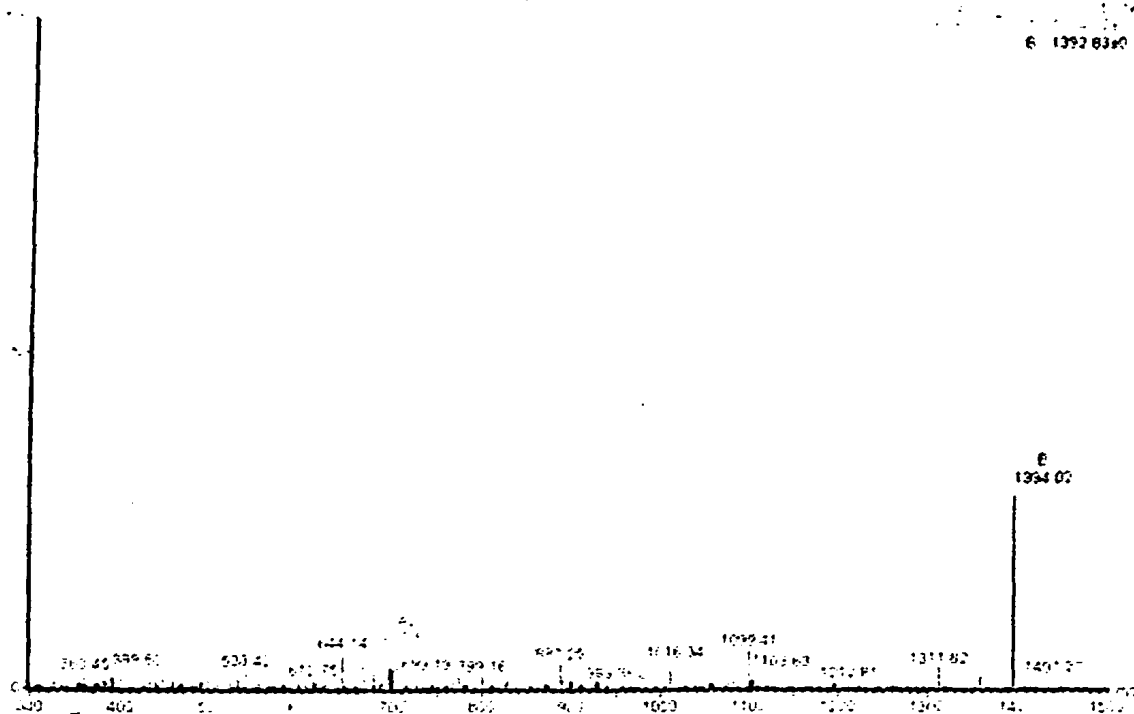
Όπως φαίνεται και από το σχήμα 7, με τη διαδικασία αυτή απομονώθηκαν δυο κύριες κορυφές, οι οποίες, όπως προκύπτει μετά από ταυτοποίηση με ESI-MS, αντιστοιχούν η μεν πρώτη (~9,4 min) στο επιθυμητό οξειδωμένο πεπτίδιο (σχήμα 8) η δε δεύτερη (~10,7 min) σε ένα προϊόν του οποίου το μοριακό βάρος διαφέρει από αυτό του επιθυμητού κατά +16Da. Η παραφορά αυτή υποδηλώνει ότι πρόκειται για το επιθυμητό πεπτίδιο το οποίο έχει επιπλέον ποσεί οξείδωση και στη μεθειονίνη στη θέση 3 (σχήμα 9). Επιπλέον, θα πρέπει να σημειωθεί ότι ανιχνεύονται και τα μοριακά ιόντα που αντιστοιχούν στην ένυδρη μορφή της

αλδεΰδης (+18Da), ως αποτέλεσμα της ισορροπίας των δυο μορφών (ένυδρη – άνυδρη) σε υδατικό διάλυμα.

Προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η ανεπιθύμητη οξείδωση του θειοαιθέρα της μεθειονίνης, πραγματοποιήθηκαν δοκιμαστικά πειράματα οξείδωσης σε διάφορες συνθήκες ώστε να επιλεγούν αυτές που ευνοούν την οξείδωση της 2-αμινο-αλκοόλης σε αλδεΰδη και ταυτόχρονα οδηγούν στην ελάχιστη οξείδωση της περιεχόμενης μεθειονίνης. Οι δοκιμές που έγιναν αφορούσαν στο χρόνο οξείδωσης και στην περίσσεια του NaIO_4 ως προς το πεπτίδιο (πίνακας 2).



Σχήμα 8. Φάσμα μάζας ESI του πεπτιδίου που εκλύεται σε χρόνο 9,4 min. Τα κόκκινα χρωματισμένα μοριακά ιόντα αντιστοιχούν στο επιθυμητό πεπτίδιο (αλδεΰδικό παράγωγο του επιτόπου T1), με ευρεθέν μοριακό βάρος 1358,90 και υπολογισθέν μοριακό βάρος 1358,57. Τα μπλε χρωματισμένα μοριακά ιόντα αντιστοιχούν στην ένυδρη μορφή του επιθυμητού αλδεΰδικού παραγώγου (+18Da).



Σχήμα 9. Φάσμα μάζας ESI του πεπτιδίου που εκλύεται σε χρόνο 10,7 min και αντιστοιχεί στο παραπροϊόν της οξείδωσης (πεπτίδιο που έχει υποστεί οξείδωση προς την επιθυμητή αλδεύδη και, επιπλέον, οξείδωση του θειοαιθέρα της μεθειονίνης). Ευρεθέν μοριακό βάρος 1374,82, υπολογισθέν μοριακό βάρος 1374,57. Τα μπλε χρωματισμένα μοριακά ιόντα αντιστοιχούν στην ένυδρη μορφή της αλδεύδης (+18Da).

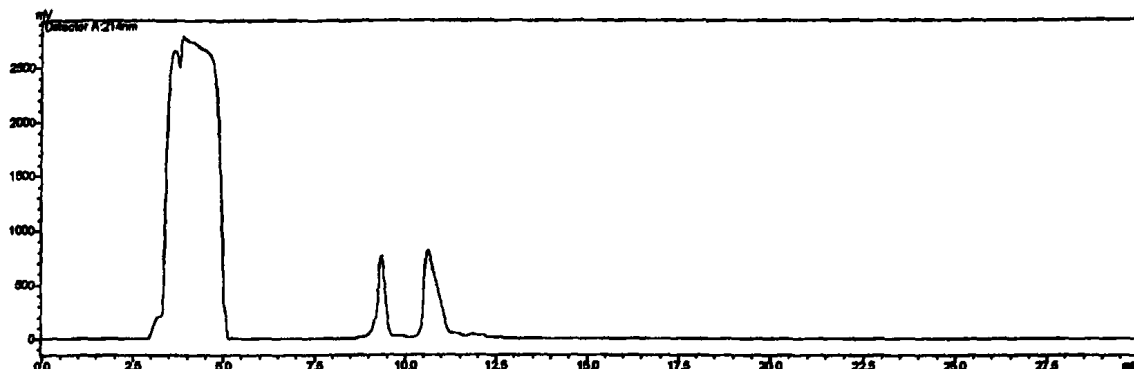
Πίνακας 2. Συνθήκες οξείδωσης που δοκιμάστηκαν

Πείραμα οξείδωσης	Χρόνος οξείδωσης	Αναλογία NaIO ₄ : πεπτίδιο (μmol)
1	6 min	2 : 1
2	3 min	1,2 : 1
3	2 min	1,1 : 1

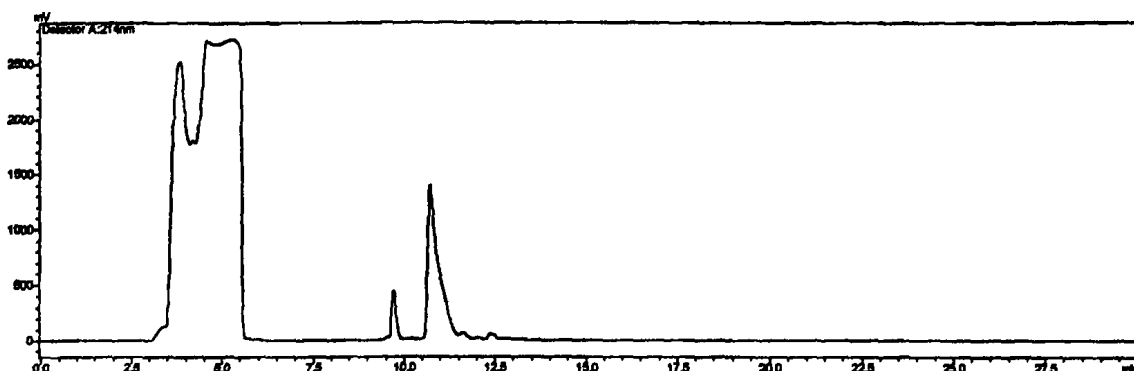
Στο σχήμα 10 φαίνονται συνοπτικά τα χρωματογραφήματα HPLC που λήφθηκαν από τα τρία δοκιμαστικά πειράματα οξείδωσης. Από αυτά προκύπτει ότι καλύτερα αποτελέσματα, που αφορούν στην λήψη της ελάχιστης δυνατής ποσότητας του παραπροϊόντος (οξειδωμένη μεθειονίνη), λαμβάνονται όταν χρησιμοποιείται NaIO₄ σε μοριακή περίσσεια 1,2 ως προς το πεπτίδιο και η αντίδραση οξείδωσης αφήνεται για 3 min. Επομένως, οι συνθήκες αυτές

λαμβάνονται ως βέλτιστες και εφαρμόζονται στα πειράματα οξείδωσης που ακολουθούν, ανεξάρτητα από την ύπαρξη ή μη μεθειονίνης στο πεπτίδιο που πρόκειται να οξειδωθεί.

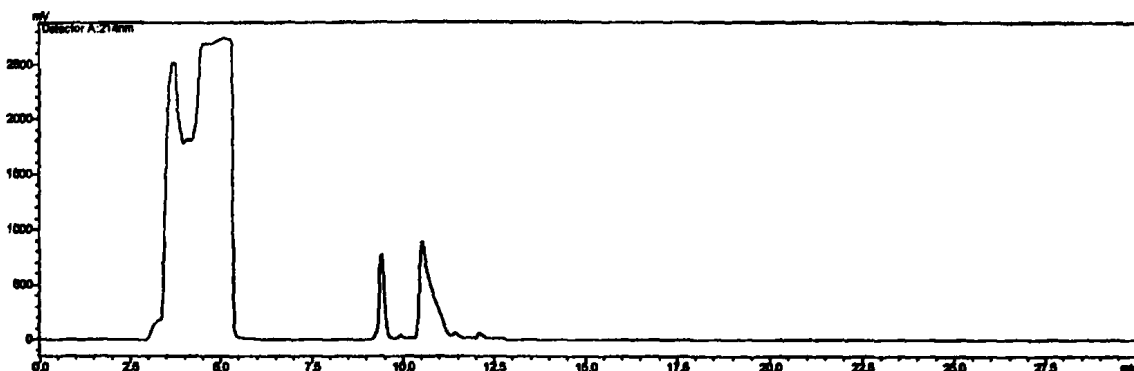
A



B



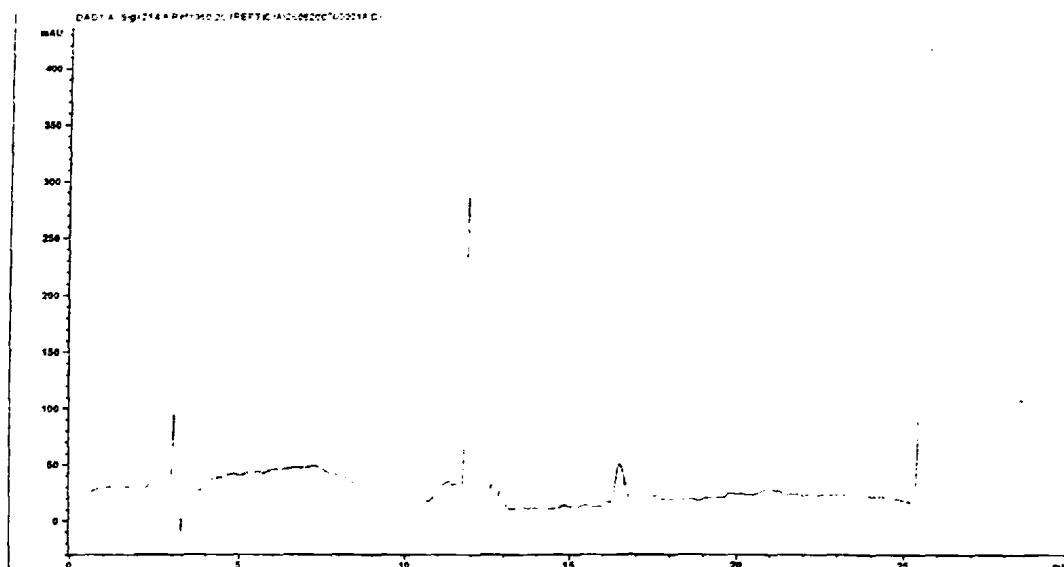
Γ



Σχήμα 10. Χρωματογραφήματα ημιπαρασκευαστικής HPLC που λήφθησαν κατά τα τρία δοκιμαστικά πειράματα οξείδωσης του επιτόπου T1. A) NaIO_4 : πεπτίδιο 2 : 1, χρόνος οξείδωσης 6 min, B) NaIO_4 : πεπτίδιο 1,2 : 1, χρόνος οξείδωσης 3 min, Γ) NaIO_4 : πεπτίδιο 1,1 : 1, χρόνος οξείδωσης 2 min. Βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης 10% έως 70% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%\text{TFA}$ σε $\text{H}_2\text{O}/0.1\%\text{TFA}$ με ταχύτητα ροής 4.7ml/min για 30 min, ανίχνευση στα 214nm.



Η ταυτοποίηση του επιθυμητού προϊόντος έγινε με φασματομετρία μάζας ESI-MS (Σχήμα 8), ενώ η καθαρότητα επιβεβαιώθηκε με αναλυτική RP-HPLC (Σχήμα 11).



Σχήμα 11. Χρωματογράφημα Αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού αλδεϋδικού παραγώγου του επιτόπου T1. Βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης 10% έως 70% CH₃CN/0.1%TFA σε H₂O/0.1%TFA με ταχύτητα ροής 1ml/min για 30 min, ανίχνευση στα 214nm.

4. Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του αλδεϋδικού παραγώγου του επιτόπου

T3: H-Ala-Ser-Phe-Phe-Arg-Asn-Val-Val-Trp-Leu-Lys(CHOCO)-NH₂

MB: 1421,66

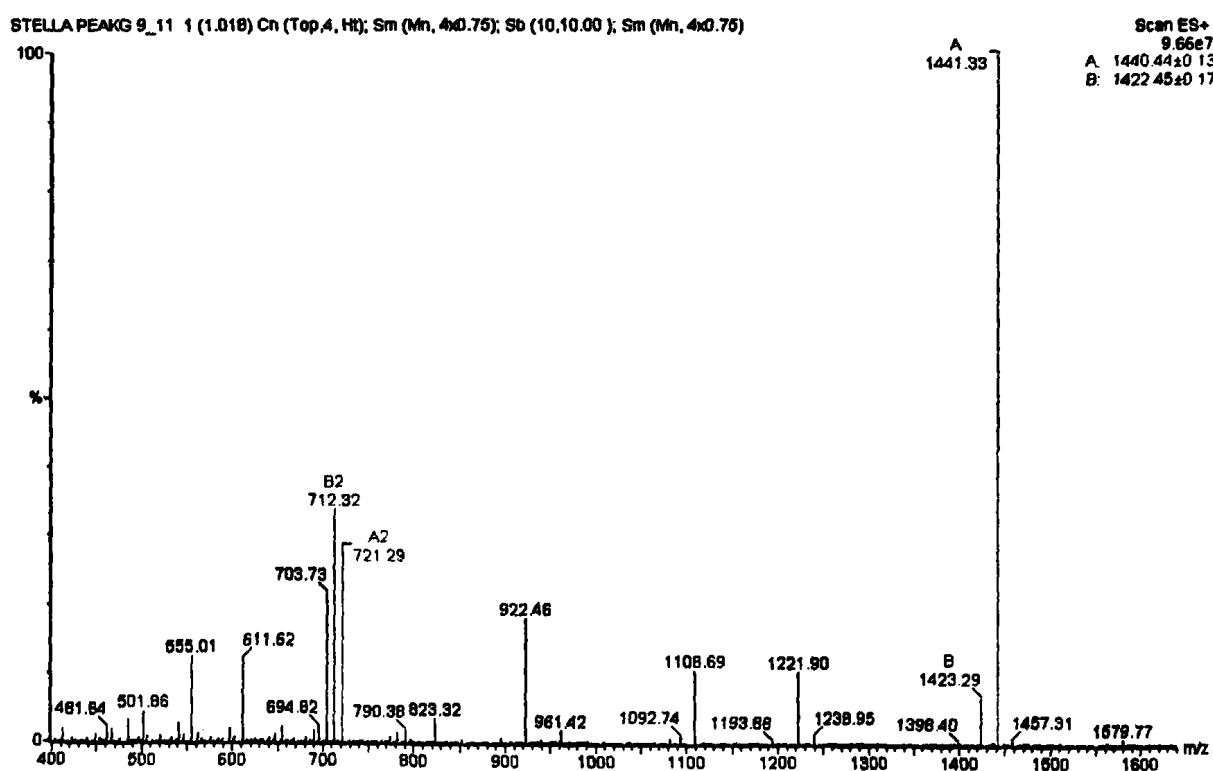
MT: C₆₉H₁₀₀N₁₈O₁₅

12,37 mg του πεπτιδίου ASFFRNVWLK(CHOCO)-NH₂ (8,52 μmol) διαλύονται σε 0,852 ml H₂O σε σφαιρική φιάλη και αραιώνονται με 6,816 ml H₂O. Από δοκιμαστικά πειράματα που προηγήθηκαν προέκυψε ότι το συγκεκριμένο πεπτίδιο δεν διαλύεται στο φυσιολογικό διάλυμα ιμιδαζολίου-HCl 50 mM pH6,9 που συνήθως χρησιμοποιείται για να λάβει χώρα η αντίδραση οξείδωσης. Έτσι, το H₂O επιλέχθηκε ως διαλύτης για αυτήν την αντίδραση. Στο υπό ανάδευση διάλυμα προστίθενται 0,852 ml υδατικού διαλύματος NaIO₄ 0 mM (17,04 μmol). Η αντίδραση οξείδωσης αφήνεται για 30 min οπότε τερματίζεται με

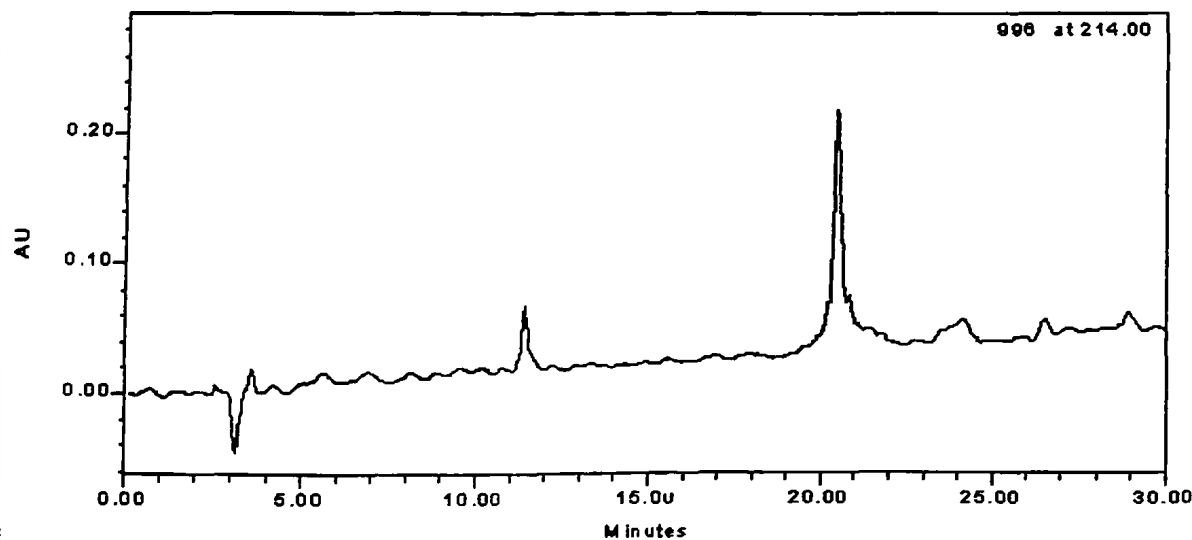
προσθήκη 341 μl υδατικού διαλύματος αιθυλενογλυκόλης 100 mM. Ο παρατεταμένος χρόνος αντίδρασης επιλέχθηκε διότι τα δοκιμαστικά πειράματα έδειξαν ότι τα 2min αντίδρασης οδηγούν στη λήψη πολύ μικρού ποσοστού από το επιθυμητό οξειδωμένο πεπτίδιο.

Το επιθυμητό πεπτίδιο 4 απομονώνεται με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC χρησιμοποιώντας βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης 20% έως 60% CH₃CN/0.1%TFA σε H₂O/0.1%TFA με ταχύτητα ροής 4.7ml/min για 30 min, ανίχνευση στα 214nm (απόδοση 66%).

Η ταυτοποίηση του επιθυμητού προϊόντος έγινε με φασματομετρία μάζας ESI-MS (Σχήμα 12), ενώ η καθαρότητα επιβεβαιώθηκε με αναλυτική RP-HPLC (Σχήμα 13).



Σχήμα 12. Φάσμα μάζας ESI του καθαρού αλδεϋδικού παραγώγου του επιτόπου T3. Ευρεθέν μοριακό βάρος 1422,45, υπολογισθέν μοριακό βάρος 1421,66 (μπλε χρωματισμένα μοριακά ιόντα). Τα κόκκινα χρωματισμένα μοριακά ιόντα αντιστοιχούν στην ένυδρη μορφή της αλδεϋδης (+18Da).



Σχήμα 13. Χρωματογράφημα Αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού αλδεϋδικού παραγώγου του επιτόπου T3. Βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης 10% έως 70% CH₃CN/0.1%TFA σε H₂O/0.1%TFA με ταχύτητα ροής 1ml/min για 30 min, ανίχνευση στα 214nm.

5. Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του αλδεϋδικού παραγώγου του επιτόπου

T5: H-Phe-His-Asp-Ser-Asn-Val-Lys-Asn-Leu-Lys(CHOCO)-NH₂

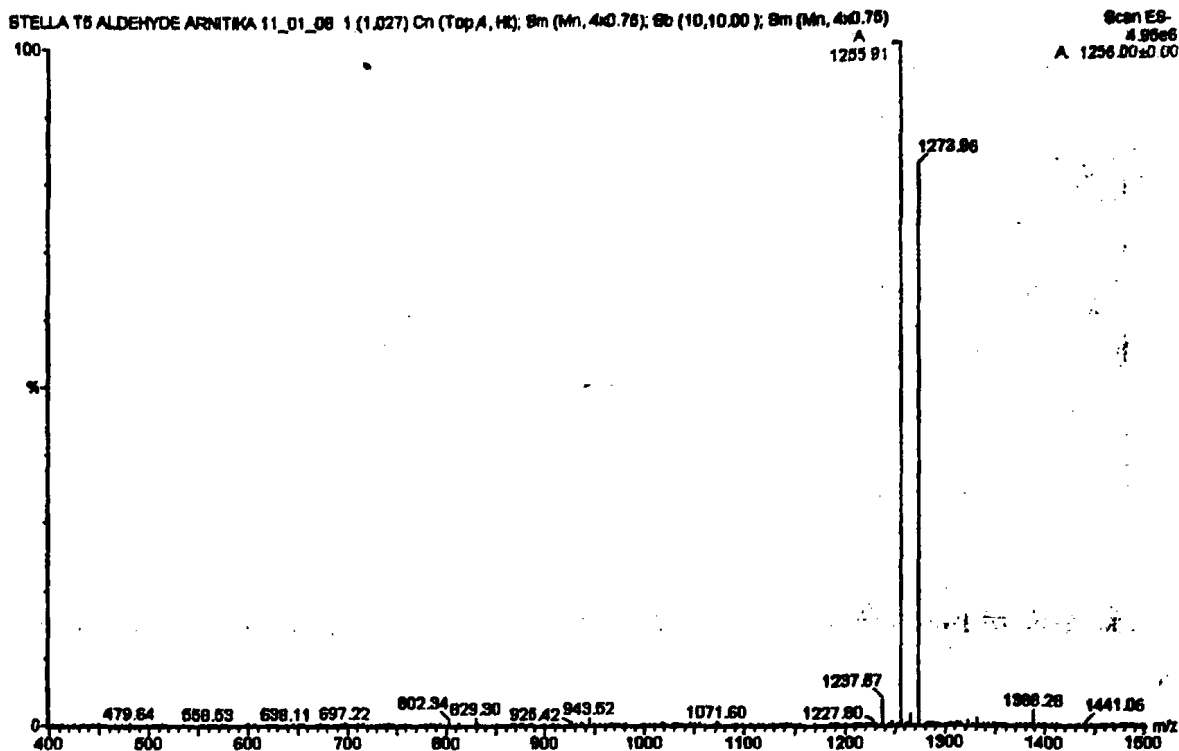
MB: 1256, 38

MT: C₅₅H₈₅N₁₇O₁₇

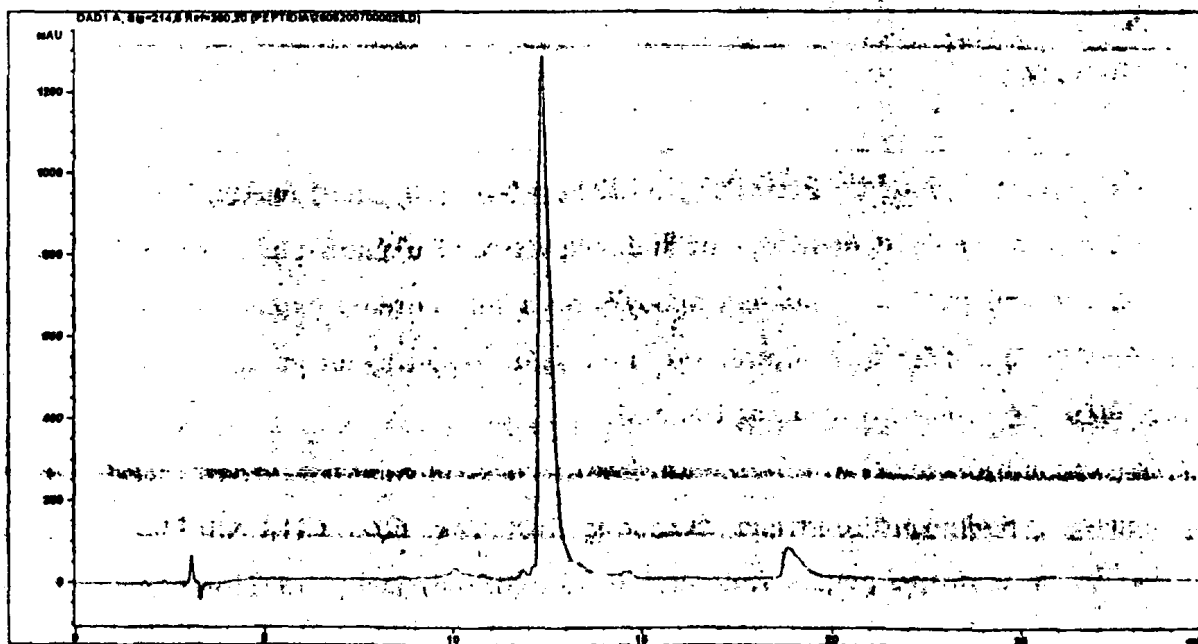
12,87 mg του πεπτιδίου FHDSNVKNLK(Ser)-NH₂ (10 μmol) διαλύονται σε 1 ml H₂O σε σφαιρική φιάλη και αραιώνονται με 8ml ρυθμιστικού διαλύματος μιδαζολίου-HCl 50 mM pH6,9. Στο υπό ανάδευση διάλυμα προστίθεται 1 ml υδατικού διαλύματος NaIO₄ 12 μmol. Η αντίδραση οξειδωσης αφήνεται για 3min οπότε τερματίζεται με προσθήκη 240 μl υδατικού διαλύματος αιθυλενογλυκόλης 100 mM.

Το επιθυμητό πεπτίδιο 5 απομονώνεται με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC χρησιμοποιώντας βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης 10% έως 60% CH₃CN/0.1%TFA σε H₂O/0.1%TFA με ταχύτητα ροής 4.7ml/min για 30 min, ανίχνευση στα 214nm (απόδοση ~70%).

Η ταυτοποίηση του επιθυμητού προϊόντος έγινε με φασματομετρία μάζας ESI-MS (Σχήμα 14), ενώ η καθαρότητα επιβεβαιώθηκε με αναλυτική RP-HPLC (Σχήμα 15).



Σχήμα 14. Φάσμα μάζας ESI του καθαρού αλδεϋδικού παραγώγου του επιτόπου T5. Ευρεθέν μοριακό βάρος 1256,00, υπολογισθέν μοριακό βάρος 1256, 38. Το μοριακό ιόν 1273,96 αντιστοιχεί στην ένυδρη μορφή της αλδεϋδης (+18Da).



Σχήμα 15. Χρωματογράφημα Αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού αλδεϋδικού παραγώγου του επιτόπου T5. Βαθμιδακτό σύστημα έκλουσης 10% έως 50% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\% \text{TFA}$ σε $\text{H}_2\text{O}/0.1\% \text{TFA}$ με ταχύτητα ροής 1ml/min για 30 min, ανίχνευση στα 214nm.

6. Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του αλδεϋδικού παραγώγου του επιτόπου

T7: H-Asn-Phe-Glu-Ser-Asn-Gly-Asn-Phe-Ile-Lys(CHOCO)-NH₂

MB: 1224, 3

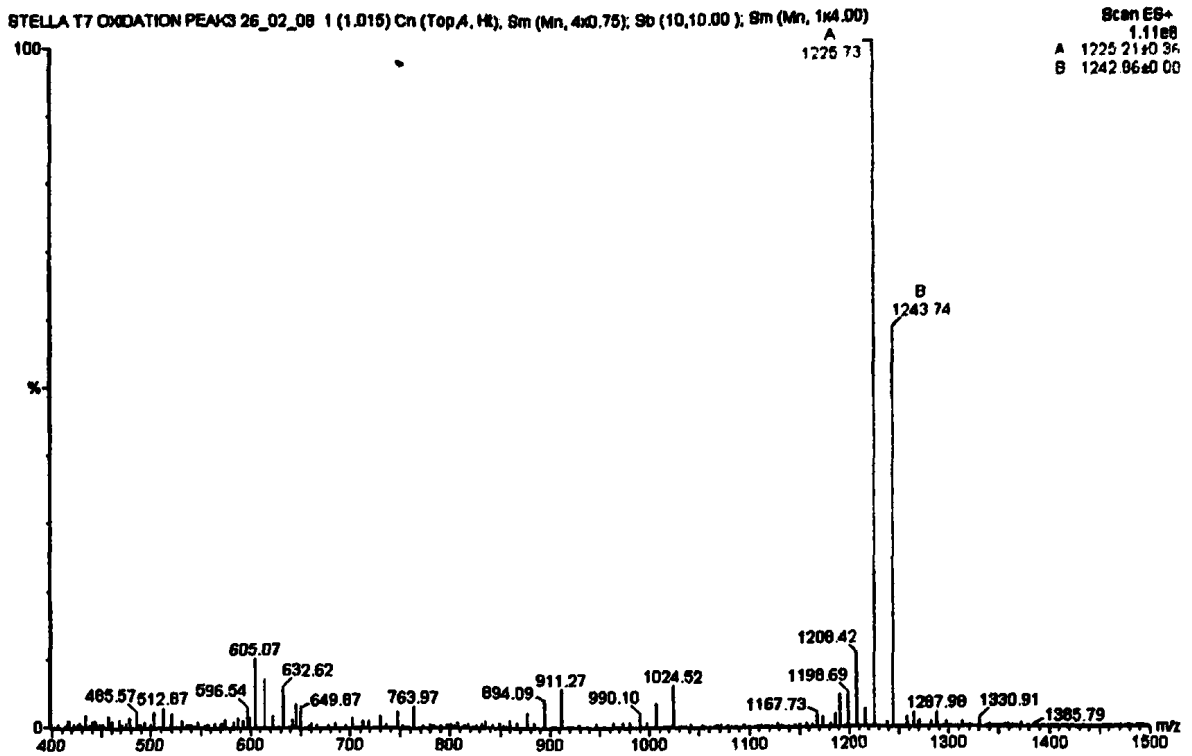
MT: C₅₄H₇₆N₁₅O₁₈

10,07 mg του πεπτιδίου NFESNGNFIK(CHOCO)-NH₂ (8,02 μmol) διαλύονται σε 0,8 ml H₂O σε σφαιρική φιάλη και αραιώνονται με 6,4 ml H₂O, ως αποτέλεσμα της δυσδιαλυτότητας του πεπτιδίου στο ρυθμιστικό διάλυμα υμιδαζολίου-HCl 50 mM pH6,9. Στο υπό ανάδευση διάλυμα προστίθενται 0,802 ml υδατικού διαλύματος NaIO₄ 20 mM (16,04 μmol). Η αντίδραση οξείδωσης αφήνεται για 45min, οπότε τερματίζεται με προσθήκη 240 μl υδατικού διαλύματος αιθυλενογλυκόλης 100 mM. Ο παρατεταμένος χρόνος αντίδρασης επιλέχθηκε διότι τα δοκιμαστικά πειράματα έδειξαν ότι τα 2min αντίδρασης οδηγούν στη λήψη πολύ μικρού ποσοστού από το επιθυμητό οξειδωμένο πεπτίδιο.

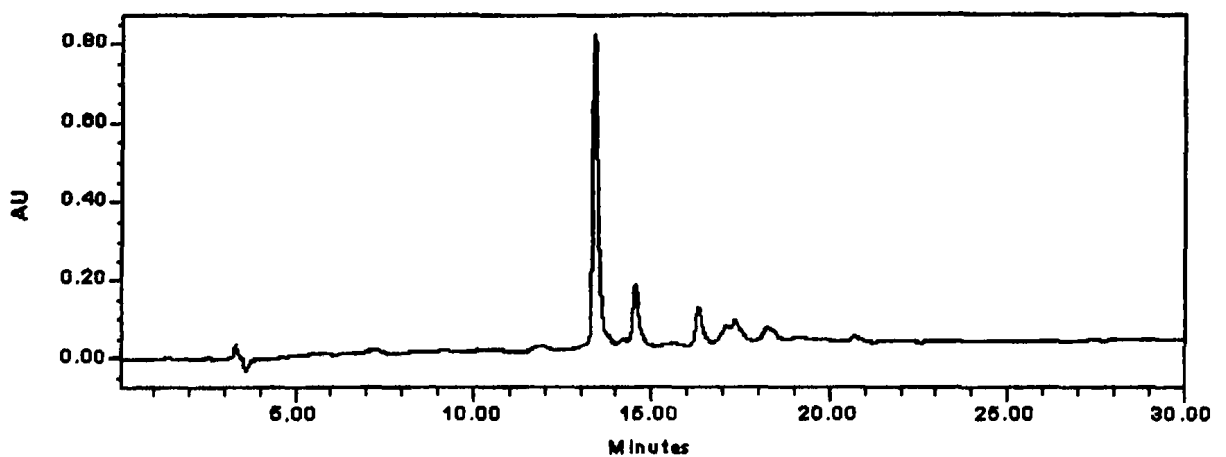
Το επιθυμητό πεπτίδιο 6 απομονώνεται με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC χρησιμοποιώντας βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης 10% έως 50% CH₃CN/0.1%TFA σε H₂O/0.1%TFA με ταχύτητα ροής 4.7ml/min για 30 min, ανίχνευση στα 214nm (απόδοση 70%).

Η ταυτοποίηση του επιθυμητού προϊόντος έγινε με φασματομετρία μάζας ESI-MS (Σχήμα 16), ενώ η καθαρότητα επιβεβαιώθηκε με αναλυτική RP-HPLC (Σχήμα 17).





Σχήμα 16. Φάσμα μάζας ESI του καθαρού αλδεϋδικού παραγώγου του επιτόπου T7. Ευρεθέν μοριακό βάρος 1225,21, υπολογισθέν μοριακό βάρος 1224,3. Τα μπλε χρωματισμένα μοριακά ιόντα αντιστοιχούν στην ένυδρη μορφή της αλδεϋδης (+18Da).



Σχήμα 17. Χρωματογράφημα Αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού αλδεϋδικού παραγώγου του επιτόπου T7. Βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης 10% έως 60% CH₃CN/0.1%TFA σε H₂O/0.1%TFA με ταχύτητα ροής 1ml/min για 30 min, ανίχνευση στα 214nm.

Τέλος, στον πίνακα 3 συνοψίζονται οι αποδόσεις σύνθεσης και καθαρισμού των N^ε-αμινοοξυακέτυλο φορέων H-SOC₄(Aoa)₄-NH₂ και Ac-SOC₄(Ac₂,Aoa₂)-NH₂ που παρασκευάστηκαν σε στερεή φάση κατά Merrifield, ενώ στον πίνακα 4 συνοψίζονται οι αποδόσεις των αντιδράσεων οξείδωσης των T-κυτταρικών επιτόπων προς τα αλδεϋδικά παράγωγα αυτών, που πραγματοποιήθηκαν σε υγρή φάση.

Πίνακας 3. Απόδοση σύνθεσης και καθαρισμού του N^ε-αμινοοξυακέτυλο φορέα H-SOC₄(Aoa)₄-NH₂ καθώς και του N^ε-αμινοοξυακέτυλο φορέα Ac-SOC₄(Ac₂,Aoa₂)-NH₂ (λυσίνες 1 και 7), που παρασκευάστηκαν σε στερεή φάση κατά Merrifield

N ^ε -αμινοοξυακέτυλο φορέας	ΑΠΟΔΟΣΗ ΣΥΝΘΕΣΗΣ	ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ
H-SOC ₄ (Aoa) ₄ -NH ₂	91 %	45 %
Ac-SOC ₄ (Ac ₂ ,Aoa ₂)-NH ₂	84 %	38 %

Πίνακας 4. Απόδοση αντίδρασης οξείδωσης των T-κυτταρικών επιτόπων προς σχηματισμό των αλδεϋδικών παραγώγων αυτών, σε υγρή φάση.

Αλδεϋδικά παράγωγα T-επιτόπων	ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ
Αλδεϋδικό παράγωγο επιτόπου T1: H-VLMENERTLK(CHOCO)A-NH ₂	68 %
Αλδεϋδικό παράγωγο επιτόπου T3: H-ASFFRNVVWLK(CHOCO)-NH ₂	66 %
Αλδεϋδικό παράγωγο επιτόπου T5: H-FHDSNVKNLK(CHOCO)-NH ₂	70 %
Αλδεϋδικό παράγωγο επιτόπου T7: H-NFESNGNFIK(CHOCO)-NH ₂	70 %



Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση πεπτιδικών αναλόγων της HA H5

Εισαγωγή

Στην παρούσα εργασία συντέθηκαν και μελετήθηκαν τα εξής πεπτιδικά ανάλογα της πρωτεΐνης HA:

1. Ac-SOC₄[Ac₂, (H5VIN1cor54-69)₂]-OH
2. Ac-SOC₄{Ac₂, [T1(CH=N-O)]₂}-NH₂
3. Ac-SOC₄{Ac₂, [T3(CH=N-O)]₂}-NH₂
4. Ac-SOC₄{Ac₂, [T5(CH=N-O)]₂}-NH₂
5. Ac-SOC₄{Ac₂, [T7(CH=N-O)]₂}-NH₂

Από αυτά, το πεπτιδικό ανάλογο 1 συντέθηκε βήμα προς βήμα σύμφωνα με τις αρχές της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση κατά Merrifield, ακολουθώντας την Boc/Bzl μεθοδολογία σύνθεσης και χρησιμοποιώντας ως πολυμερικό υπόστρωμα την Pam ρητίνη (Boc-Gly-Pam).

Τα ανάλογα 2, 3, 4 και 5 παρασκευάστηκαν σε υγρή φάση ύστερα από χημειοεκλεκτική σύνδεση μέσω σχηματισμού δεσμού οξίμης του N^ε-αμινοοξακέτυλο φορέα SOC₄-I και των αλδεϋδικών παραγώγων των επιτόπων T1, T3, T5 και T7, η σύνθεση των οποίων περιγράφεται στο Κεφάλαιο 11.

Αντιδραστήρια

Για τη σύνθεση σε στερεή φάση του πεπτιδικού αναλόγου 1 ως αντιδραστήρια σύζευξης χρησιμοποιήθηκαν τα:

ο-βενζοτριαζολυλο-τετραμεθυλο-ισοουρονικό τετραφθοροβορικό άλας (TBTU), Neosystem Laboratoire (Strasbourg, France) ή GL Biochem (Shanghai, China)].

ο-βενζοτριαζολυλο-τετραμεθυλο-ισοουρονικό εξαφθοροφωσφορικό άλας (HBTU), Neosystem Laboratoire (Strasbourg, France) ή GL Biochem (Shanghai, China)].

Ως βοηθητικό πυρηνόφιλο χρησιμοποιήθηκε το 1-υδροξυβενζοτριαζόλιο (HOBt), [GL Biochem (Shanghai, China)].

Τα N^α-Boc προστατευμένα παράγωγα αμινοξέων που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση του πεπτιδικού αναλόγου 1 καταγράφονται στον πίνακα 1.



Στη σύνθεση και τον καθαρισμό του αναλόγου 1 χρησιμοποιήθηκαν οι διαλύτες:

- μεθανόλη [MeOH, analytical reagent και HPLC grade, LABSCAN (Ireland)]
- διχλωρομεθάνιο (DCM, LABSCAN)
- διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF, LABSCAN)
- τριφθοροοξικό οξύ [HF, Fluka (Germany)], για την αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη
- διαιθυλαιθέρας [Riedel (Germany)], απομάκρυνση των μορίων παγίδων μετά την αποκοπή με HF
- οξικό οξύ [MB: 60,05, d: 1,048 g/ml, Panreac(Spain)], για την παραλαβή του πεπτιδίου
- ακετονιτρίλιο [CH₃CN, HPLC grade, LABSCAN (Ireland)], κατά τον καθαρισμό των πεπτιδίων με HPLC

ενώ άλλα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη σύνθεση των πεπτιδίων είναι τα:

- διίσοπροπυλοαιθυλαμίνη [DIEA, Merck-Schuchardt (Germany)], για τη σύζευξη των αμινοξέων
- τριφθοροοξικό οξύ [TFA, Fluka (Germany)], για την απομάκρυνση της Boc αμινοπροστατευτικής ομάδας
- οξικός ανυδρίτης [Ac₂O, Merk (Germany)] και πυριδίνη [Fluka (Germany)], για την ακετυλίωση των ελεύθερων αμινομάδων
- παλμιτικός ανυδρίτης [Fluka (Germany)], για την εισαγωγή της παλμιτόυλο-ομάδας
- πιπεριδίνη [Fluka (Germany)], για την αποπροστασία της Fmoc-ομάδας
- τριίσοπροπυλοσιλάνιο [TIS, Sigma (USA)]
- διμεθλοσουλφίδιο [DMS, C₂H₆S, Fluka (Germany)]
- π-θειοκρεσόλη [Fluka (Germany)]

Για τη σύνθεση σε υγρή φάση των πεπτιδίων 2, 3, 4 και 5 χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια και διαλύτες:

- Οξικό οξύ [CH₃COOH, M.B.: 60,05, d: 1,048 g/ml, Panreac (Spain)]
- Οξικό νάτριο [CH₃COONa, M.B.: 82,04, Fluka (Germany)]

Διαλύματα εργασίας

Διάλυμα A (υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0,2M): σε ογκομετρική φιάλη των 250 ml εισάγονται 2,89 ml πυκνού οξικού οξέος και προστίθεται νερό μέχρι τη χαραγή.

Διάλυμα B (υδατικό διάλυμα οξικού νατρίου 0,2M): σε ογκομετρική φιάλη των 250 ml εισάγονται 4,1 g οξικού νατρίου και προστίθεται νερό μέχρι τη χαραγή.



Ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος-οξικού νατρίου 0,1M, pH 4,6:

25,5 ml διαλύματος A και 24,5 ml διαλύματος B εισάγονται σε ογκομετρική φιάλη των 100ml και ο όγκος συμπληρώνεται με νερό ως τη χαραγή.

Πίνακας 1. *N*^α-προστατευμένα παράγωγα αμινοξέων που χρησιμοποιήθηκαν στη σύνθεση του πεπτιδικού αναλόγου 1

<i>N</i> -προστατευμένα παράγωγα αμινοξέων	Μοριακό Βάρος	Προμηθευτής
Boc-Aib-OH	203,24	Neosystem Laboratoire (Strasbourg, France)
Boc-Lys(Ac)-OH	288,4	
Boc-Lys(Fmoc)-OH	468,6	GL Biochem (Shanghai, China)
Boc-Gly-OH	175,2	GL Biochem (Shanghai, China)
Boc-Glu(OBzl)-OH	337,4	GL Biochem (Shanghai, China)
Boc-Asp(OcHx)-OH	315,4	GL Biochem (Shanghai, China)
Boc-Cys(Acm)-OH	292,4	GL Biochem (Shanghai, China)
Boc-Met-OH	249,3	GL Biochem (Shanghai, China)
Boc-Pro-OH	215,3	GL Biochem (Shanghai, China)
Boc-Asn-OH	232,2	GL Biochem (Shanghai, China)
Boc-Leu-OH.H ₂ O	249,3	GL Biochem (Shanghai, China)
Boc-Trp-OH	304,4	GL Biochem (Shanghai, China)
Boc-Ala-OH	189,2	GL Biochem (Shanghai, China)
Boc-Val-OH	217,3	GL Biochem (Shanghai, China)
Boc-Ser(Bzl)-OH	295,3	GL Biochem (Shanghai, China)



I. Βήμα προς βήμα σύνθεση πεπτιδικού αναλόγου της HA H5

Γενική πορεία βήμα προς βήμα σύνθεσης

Η γενική πορεία σύνθεσης του πεπτιδίου 1 απεικονίζεται στο σχήμα 1. Αρχικά, συντέθηκε το γραμμικό τμήμα του μορίου, που αποτελεί τον ολιγοπεπτιδικό φορέα SOC₄-I, εισάγοντας τα κατάλοιπα λυσίνης στις θέσεις 1 και 10 ως Boc-Lys(Fmoc)-OH, ενώ στις θέσεις 4 και 7 ως Boc-Lys(Ac)-OH. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ακετυλίωση της τελικής αμινομάδας του μορίου του φορέα, ενώ ακολούθησε απομάκρυνση της Fmoc-ομάδας από την ε-αμινομάδα των λυσινών 1 και 10 και ολοκλήρωση της σύνθεσης του μακρομορίου με ταυτόχρονη βήμα προς βήμα σύνθεση του επιτόπου H5VIN1cor54-69 στις θέσεις αυτές. Στο τέλος της σύνθεσης, μέρος της πεπτιδορητίνης κατεργάστηκε με υγρό HF, με το οποίο έγινε η απομάκρυνση όλων των προστατευτικών ομάδων και η αποκοπή από τη ρητίνη οπότε λήφθηκε το πεπτιδικό ανάλογο 1. Το υπόλοιπο της πεπτιδορητίνης φυλάχτηκε για πιθανή μελλοντική χρήση.

Ο έλεγχος ολοκλήρωσης της σύζευξης (απουσία ελεύθερων αμινομάδων στην πεπτιδορητίνη) έγινε με το τεστ νινυδρίνης (Kaiser).

Η απομάκρυνση των πεπτιδίου από τη ρητίνη και η τελική αποπροστασία των παράπλευρων δραστικών ομάδων των αμινοξέων έγινε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης με άνυδρο HF. Για το σκοπό αυτό, η πεπτιδορητίνη κατεργάζεται με 10ml δισαπεσταγμένου HF για κάθε g αυτής, παρουσία 1ml π-θειοκρεσόλης και 1ml DMS ως scavengers (παγίδες κατιόντων), για 30 min στους -10°C και για 1 ½ ώρα στους 0°C. Στη συνέχεια το HF απομακρύνεται υπό κενό, το υπόλειμμα εκπλένεται με διαιθυλαιθέρα για την απομάκρυνση των μορίων-παγίδων και διηθείται ενώ το πεπτίδιο παραλαμβάνεται τελικά με υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 2N και λυοφιλοποιείται.



Boc-Gly-Pam ρητίνη

Βήμα 1

1x2 min, 1x15 min 40% TFA σε DCM
Εκπλύσεις: 3x1 min DCM, 3x1 min MeOH,
3x1 min DCM
Test Kaiser: (+)

⇒ N^α-αποπροστασία
(απομάκρυνση
Boc-ομάδας)

CF₃COO⁻.H₃N⁺-Gly-Pam ρητίνη

Βήμα 2

3 ισοδύναμα Boc-Aib-OH
3 ισοδύναμα HBTU / 3 ισοδύναμα HOBt /
9 ισοδύναμα DIEA
Ανάδευση για 1^{1/2} - 2 ώρες
Εκπλύσεις: 3x1 min DCM, 3x1 min MeOH, 3x1
min DCM
Test Kaiser: (-)

⇒ Σύζευξη

Boc-Aib-Gly-Pam ρητίνη

Επανάληψη διαδοχικά των βημάτων 1 και 2 μέχρι την
ολοκλήρωση του γραμμικού τμήματος του φορέα SOC₄-I

Boc-Lys(Fmoc)-Aib-Gly-Lys(Ac)-Aib-Gly-Lys(Ac)-Aib-Gly-Lys(Fmoc)-Aib-Gly-Pam ρητίνη

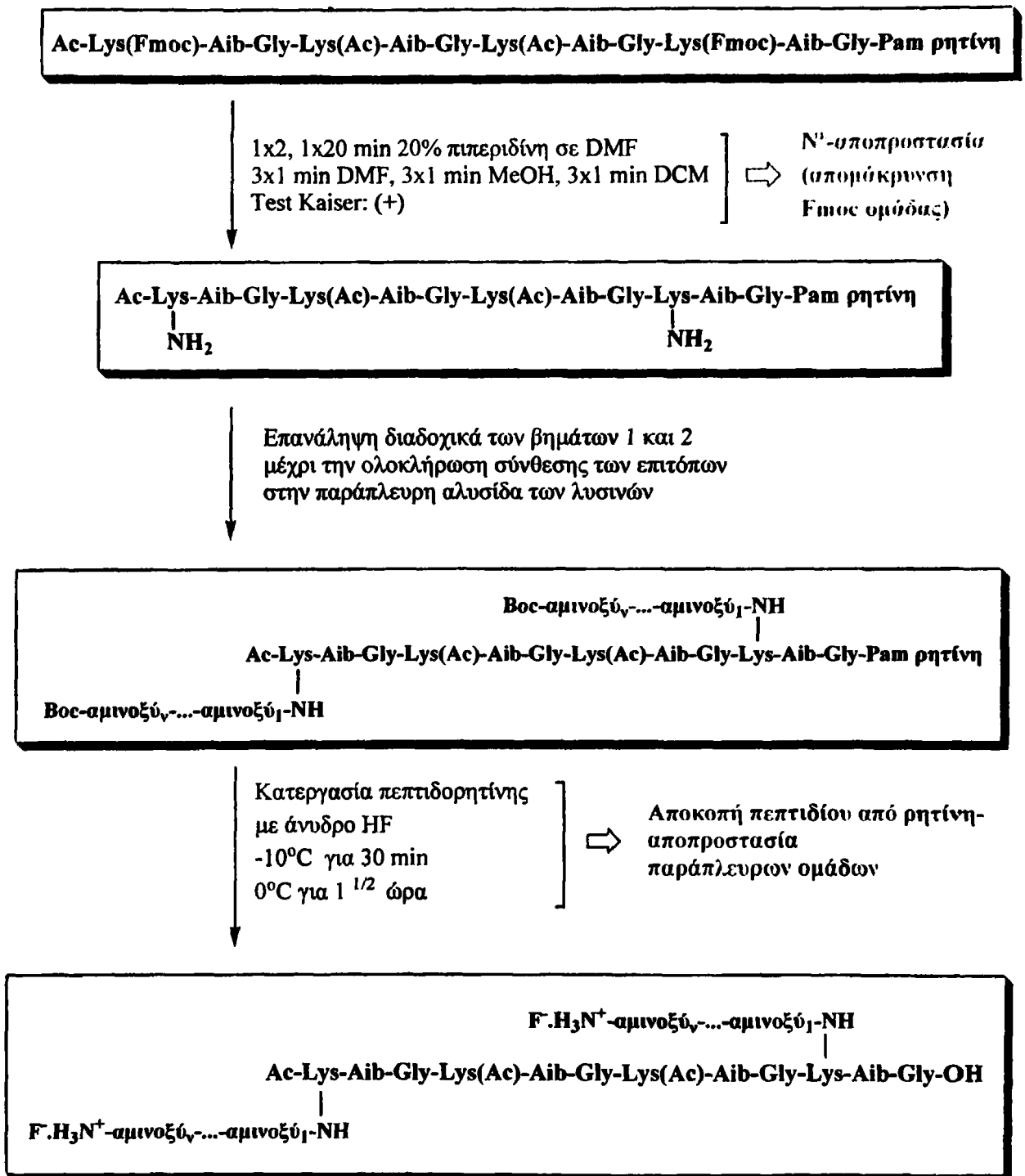
Επανάληψη βήματος 1

CF₃COO⁻.H₃N⁺-Lys(Fmoc)-Aib-Gly-Lys(Ac)-Aib-Gly-Lys(Ac)-Aib-Gly-Lys(Fmoc)-Aib-Gly-Pam ρητίνη

2x20 min 30eq Ac₂O/πυριδίνη
3x1 min DCM, 3x1 min MeOH, 3x1 min DCM
Test Kaiser: (-)

⇒ N^α-ακετυλίωση

Ac-Lys(Fmoc)-Aib-Gly-Lys(Ac)-Aib-Gly-Lys(Ac)-Aib-Gly-Lys(Fmoc)-Aib-Gly-Pam ρητίνη

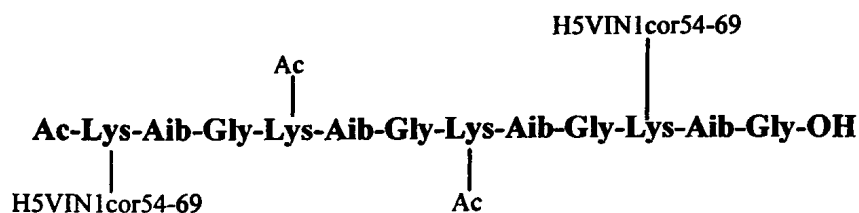


Σχήμα 1. Γενική πορεία βήμα προς βήμα σύνθεσης διακλαδισμένων πεπτιδίων σε ρητίνη 4-υδροξυ-μεθυλ-φαινυλ-ακεταμιδο-μεθυλο (Pam), Boc-μεθοδολογία.



Πειραματική πορεία βήμα προς βήμα σύνθεσης

1. Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του Ac-SOC₄[Ac₂, (H5VIN1cor54-69)₂]-OH



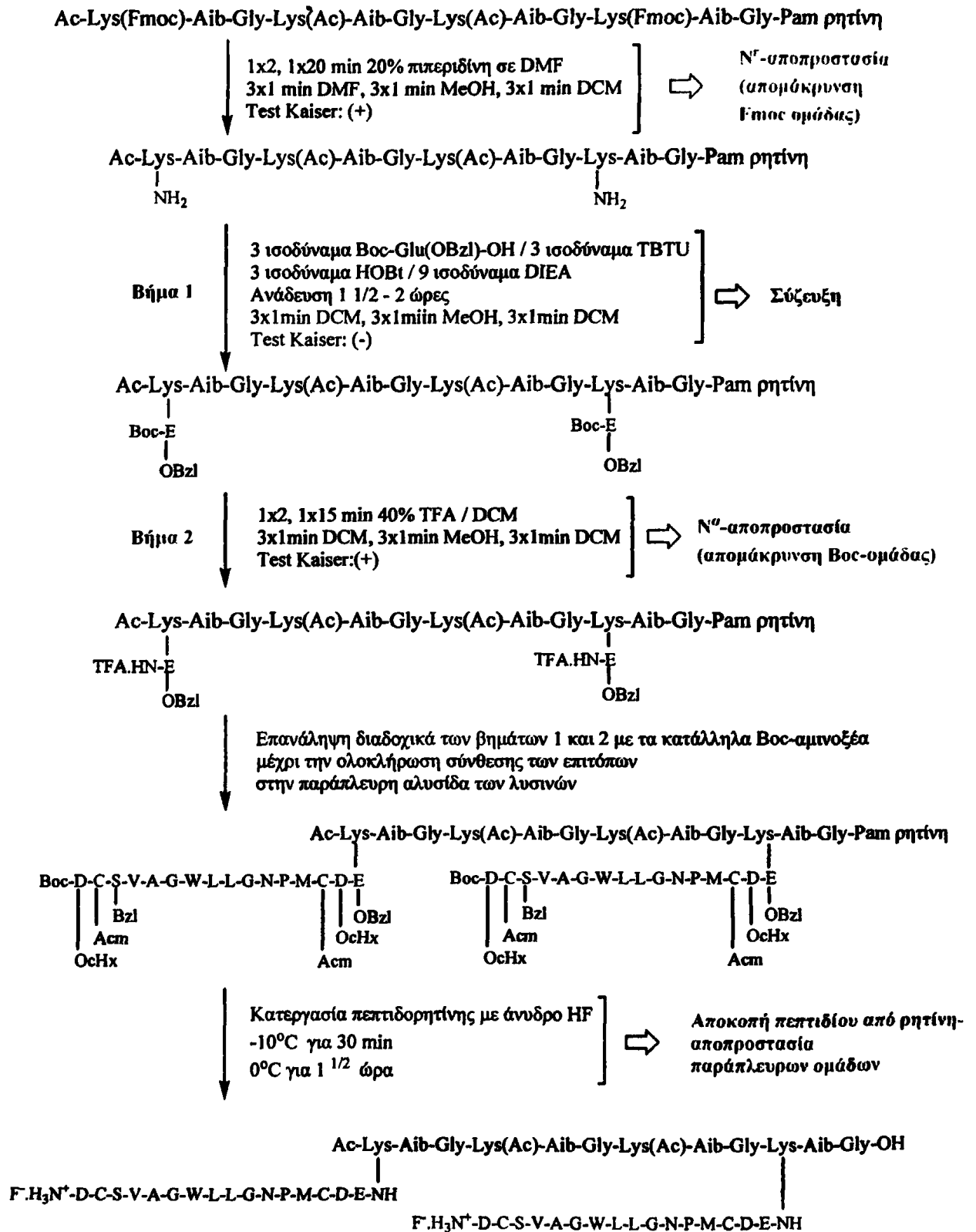
MB: 4893,64

MT: C₂₀₈H₃₂₈N₅₆O₆₈S₆

Για τη σύνθεση του πεπτιδίου 1 χρησιμοποιήθηκαν 1,002 g ρητίνης Boc-Gly-Pam με υποκατάσταση 0,74 mmol/g. Μετά την σύζευξη του δεύτερου αμινοξέος (Boc-Aib-OH) επιτεύχθηκε μείωση της υποκατάστασης της ρητίνης σε 0,34 mmol/g, όπως προέκυψε κατόπιν τιτλοδότησης των αμινομάδων με ποσοτικό προσδιορισμό της Fmoc ομάδας που ελευθερώνεται ύστερα από κατεργασία με 40% πιπεριδίνη σε DMF. Η βήμα προς βήμα σύνθεση του πεπτιδικού μακρομορίου πραγματοποιήθηκε σε δυο στάδια. Αρχικά έγινε η σύνθεση του γραμμικού τμήματος του μακρομορίου (φορέας SOC₄-I), όπως περιγράφεται στο γενικό σχήμα σύνθεσης (σχήμα 1), και στη συνέχεια έγινε η σύνθεση του επιτόπου H5VIN1cor54-69, όπως περιγράφεται αναλυτικά στο σχήμα 2.

Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του φορέα SOC₄-I, χρησιμοποιώντας τα παράγωγα αμινοξέων: Boc-Gly-OH, Boc-Aib-OH, Boc-Lys(Ac)-OH και Boc-Lys(Fmoc)-OH, έγινε απομάκρυνση της Boc προστατευτικής ομάδας και ακετυλίωση της N-τελικής αμινομάδας, ενώ απομακρύνθηκε και η Fmoc προστατευτική ομάδα από την ε-αμινομάδα των λυσινών 1 και 10. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε βήμα προς βήμα η σύνθεση του επιτόπου H5VIN1cor54-69 στις ε-αμινομάδες των λυσινών 1 και 10 χρησιμοποιώντας τα παράγωγα αμινοξέων: Boc-Glu(OBzl)-OH, Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Cys(Acm)-OH, Boc-Met-OH, Boc-Pro-OH, Boc-Asn-OH, Boc-Gly-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Trp-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Val-OH και Boc-Ser(Bzl)-OH.

Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης, η πεπτιδορητίνη τοποθετήθηκε σε ξηραντήρα και στη συνέχεια υπολογίστηκε η απόδοση σύνθεσης (80%).



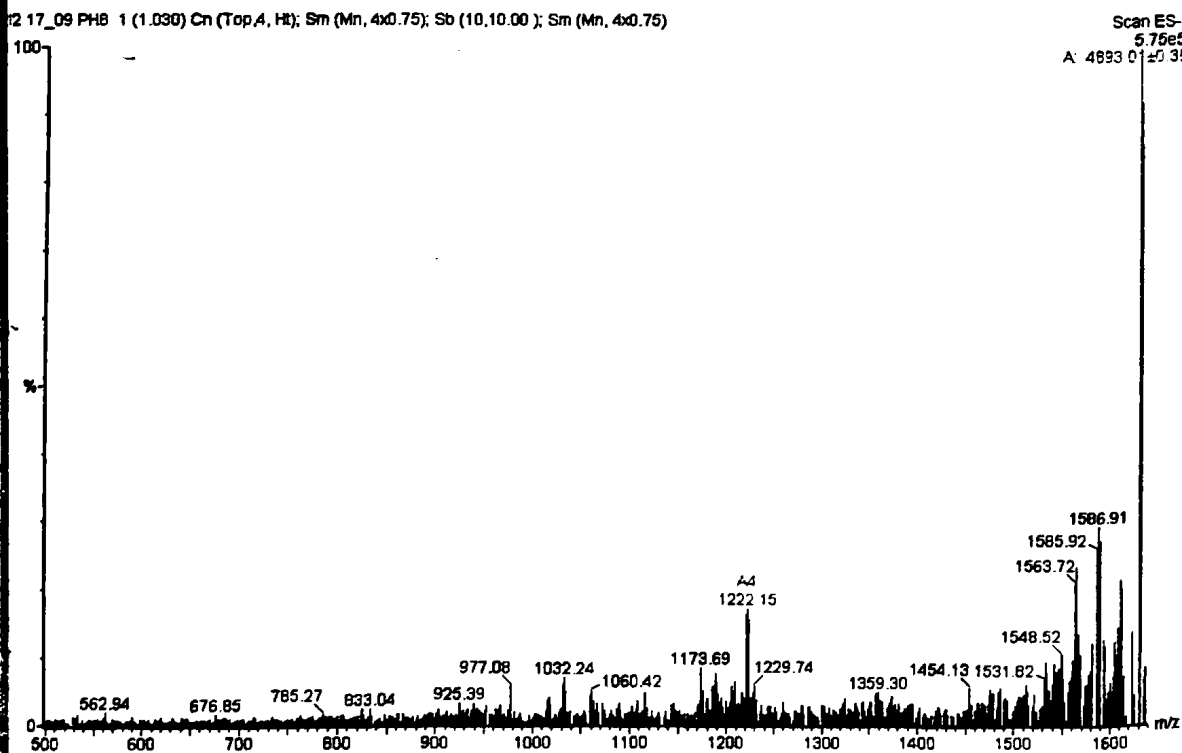
Σχήμα 2. Πορεία σύνθεσης του μακρομορίου Ac-SOC₄[Ac₂, (H5VIN1cor54-69)₂]-OH σε ρητίνη Pam



1,063 g της πεπτιδορρητίνης κατεργάστηκαν με υγρό HF παρουσία π-θειοκρεσόλης και DMS και το προϊόν εκχυλίστηκε με διάλυμα οξικού οξέος 2N και λυοφιλοποιήθηκε (απόδοση 87,5%).

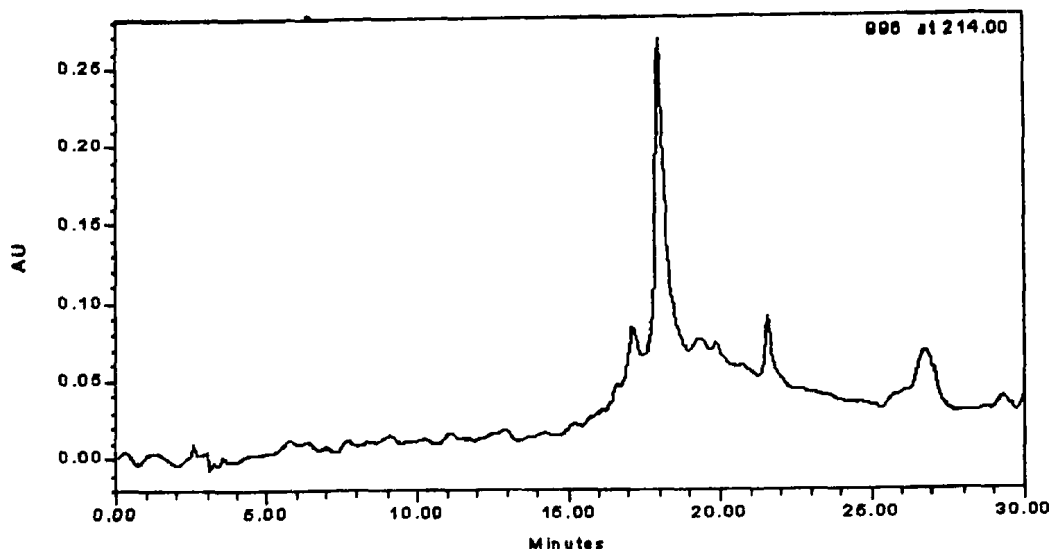
Το πεπτίδιο υποβλήθηκε σε έναν πρώτο καθαρισμό με διαπίδυση έναντι H₂O για 48 ώρες (απόδοση 85%) ενώ καθαρίστηκε περαιτέρω με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC χρησιμοποιώντας βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης 20% έως 70% CH₃CN/0.1%TFA σε H₂O/0.1%TFA με ταχύτητα ροής 1ml/min για 30 min, ανίχνευση στα 214nm (απόδοση 3%)

Η ταυτοποίηση του κύριου κλάσματος έγινε με φασματομετρία μάζας ESI-MS (Σχήμα 3), ενώ η καθαρότητα επιβεβαιώθηκε με αναλυτική RP-HPLC (Σχήμα 4).



Σχήμα 3. Φάσμα μάζας ESI του καθαρού πεπτιδίου Ac-SOC₄[Ac₂, (H5VIN1cor54-69)₂]-OH.

Ευρεθέν μοριακό βάρος 4893,01, υπολογισθέν μοριακό βάρος 4893.63.



Σχήμα 4. Χρωματογράφημα Αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού πεπτιδίου Ac-SOC₄[Ac₂(H5VIN1cor54-69)₂]-OH. Βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης 20% έως 70% CH₃CN/0.1%TFA σε H₂O/0.1%TFA με ταχύτητα ροής 1ml/min για 30 min, ανίχνευση στα 214nm.

II. Σύνθεση πεπτιδικών αναλόγων της HA H5 με χημιοεκλεκτική σύνδεση μέσω δεσμού οξίμης των αλδεϋδικών παραγώγων των T επιτόπων και του N^ε-αμινοοξυακέτυλο φορέα SOC₄-I

Χημιοεκλεκτική σύνθεση σε υγρή φάση-σχηματισμός δεσμού οξίμης

Η σύνθεση των πεπτιδικών αναλόγων της HA 2, 3, 4 και 5 πραγματοποιήθηκε σε υγρή φάση, σύμφωνα με τα πρωτόκολλα των χημιοεκλεκτικών αντιδράσεων σχηματισμού δεσμού οξίμης, μεταξύ πλήρως αποπροστατευμένων πεπτιδικών τμημάτων. Η μεθοδολογία περιελάμβανε τη χημιοεκλεκτική αντίδραση μεταξύ μιας αλδεϋδικής ομάδας στην παράπλευρη αλυσίδα της C-τελικής λυσίνης των T-επιτόπων (πεπτίδια 3, 4, 5 και 6, Κεφάλαιο 11) με τον N^ε-αμινοοξυακετυλιωμένο φορέα SOC₄-I (πεπτίδιο 2, Κεφάλαιο 11).

Ένα κλασικό πρωτόκολλο που ακολουθείται για τη χημιοεκλεκτική αντίδραση σχηματισμού δεσμού οξίμης είναι αυτό κατά το οποίο σε μικρή σφαιρική φιάλη εισάγεται ποσότητα επιτόπου (αλδεϋδικό παράγωγο) και διαλύεται σε H₂O έτσι ώστε να δημιουργηθεί διάλυμα 10 mM. Το αλδεϋδικό παράγωγο βρίσκεται πάντα σε μοριακή περίσσεια (συνήθως x1,5) ως προς την κάθε αμινοοξυακέτυλο ομάδα του φορέα SOC₄-I. Το διάλυμα αυτό



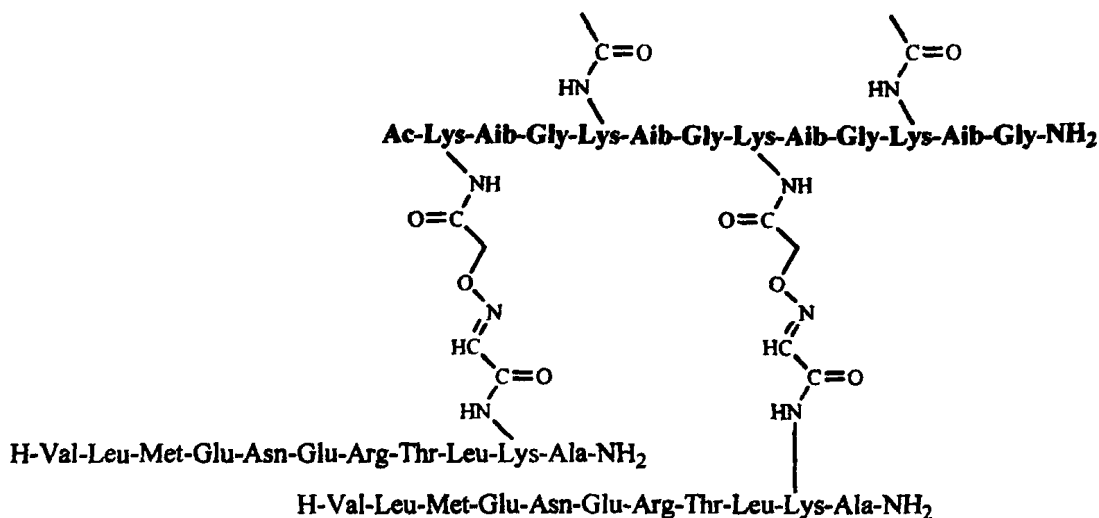
αραιώνεται με βπλάσια ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος 0,1 M οξικού οξέος-οξικού νατρίου pH4,6 και σε αυτό προστίθεται κατάλληλη ποσότητα υδατικού διαλύματος Ν^ε-αμινοοξυακετυλιωμένου φορέα SOC₄-I (10 mM) έτσι ώστε να ικανοποιείται η συνθήκη: μμοί αλδεϋδης = μμοί φορέα x 2 x 1,5. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία ~35°C (τοποθέτηση της σφαιρικής σε υδρόλουτρο), ενώ η εξέλιξή της ελέγχεται με φασματομετρία μάζας ESI-MS. Ο συνολικός χρόνος αντίδρασης κυμαίνεται από 48 έως 96 ώρες, ανάλογα με το πεπτίδιο. Η απομόνωση του επιθυμητού συμπλέγματος επιτυγχάνεται με απευθείας ένεση του μίγματος της αντίδρασης σε ημιπαρασκευαστική HPLC (μετά από κατάλληλες αραιώσεις με τους διαλύτες που χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό) όπου συλλέγονται τα κατάλληλα κλάσματα και λυοφιλοποιούνται ώστε να ληφθεί το προϊόν σε στερεή μορφή.

Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, η χημειοεκλεκτική αντίδραση σχηματισμού δεσμού οξίμης λαμβάνει χώρα τόσο σε ελαφρά όξινο (pH4,6) όσο και σε πολύ όξινο (pH~2) υδατικό περιβάλλον. Ως διαλύτης χρησιμοποιείται συνήθως ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος-οξικού νατρίου ή αραιό υδατικό διάλυμα (0,1%) οργανικού οξέος (οξικού ή τριφθοροξικού οξέος). Η επιλογή του διαλύτη ή του μίγματος διαλυτών στο οποίο θα λάβει χώρα η αντίδραση εξαρτάται σε πολύ μεγάλο βαθμό από τη διαλυτότητα των πεπτιδικών τμημάτων που θα συμπλεχθούν. Έτσι, πολύ συχνά χρησιμοποιούνται και οργανικοί διαλύτες ως συνδιαλύτες. Παρόλα αυτά, κάθε πεπτίδιο έχει διαφορετικές ιδιότητες ως προς τη διαλυτότητά του με αποτέλεσμα να απαιτείται συχνά τροποποίηση του πρωτοκόλλου της αντίδρασης.

Οι παραπάνω περιορισμοί προέκυψαν και κατά τη σύνθεση των συμπλεγμάτων-πεπτιδικών αναλόγων 2-5 της HA με αποτέλεσμα, όπως θα διαπιστωθεί και στη συνέχεια, το κάθε πεπτιδικό ανάλογο να συντεθεί με αρκετά διαφοροποιημένο πρωτόκολλο.

Πειραματική πορεία σύνθεσης

2. Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του Ac-SOC₄{Ac₂, [T1(CH=N-O)]₂}-NH₂

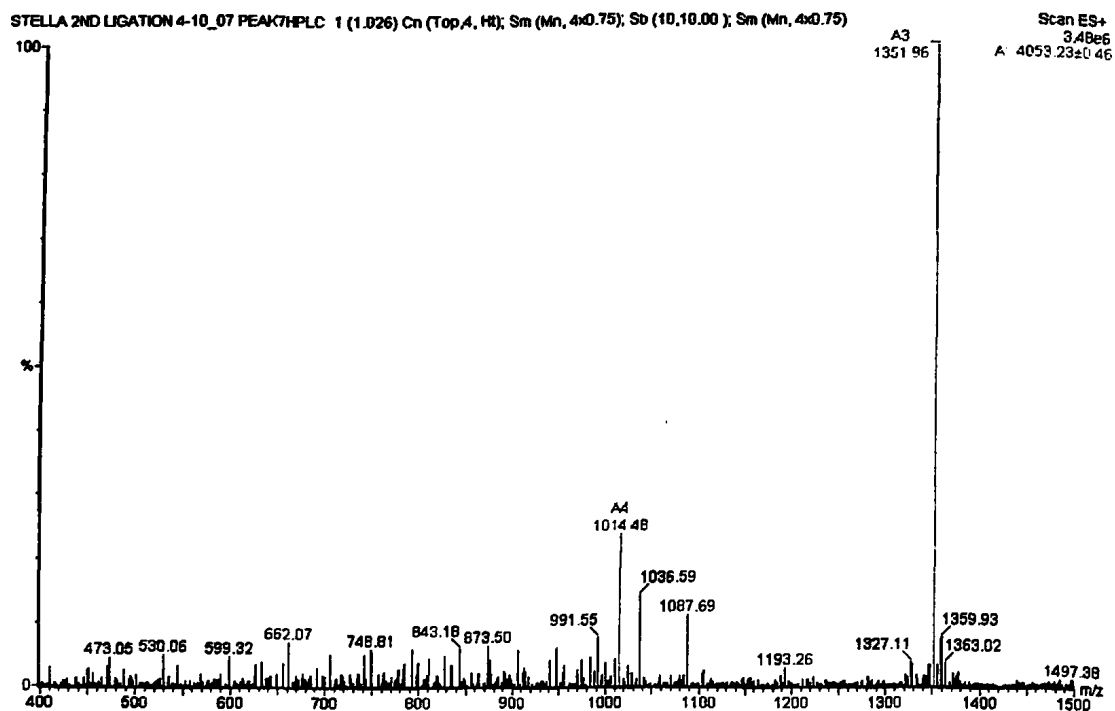


MB: 4051,68

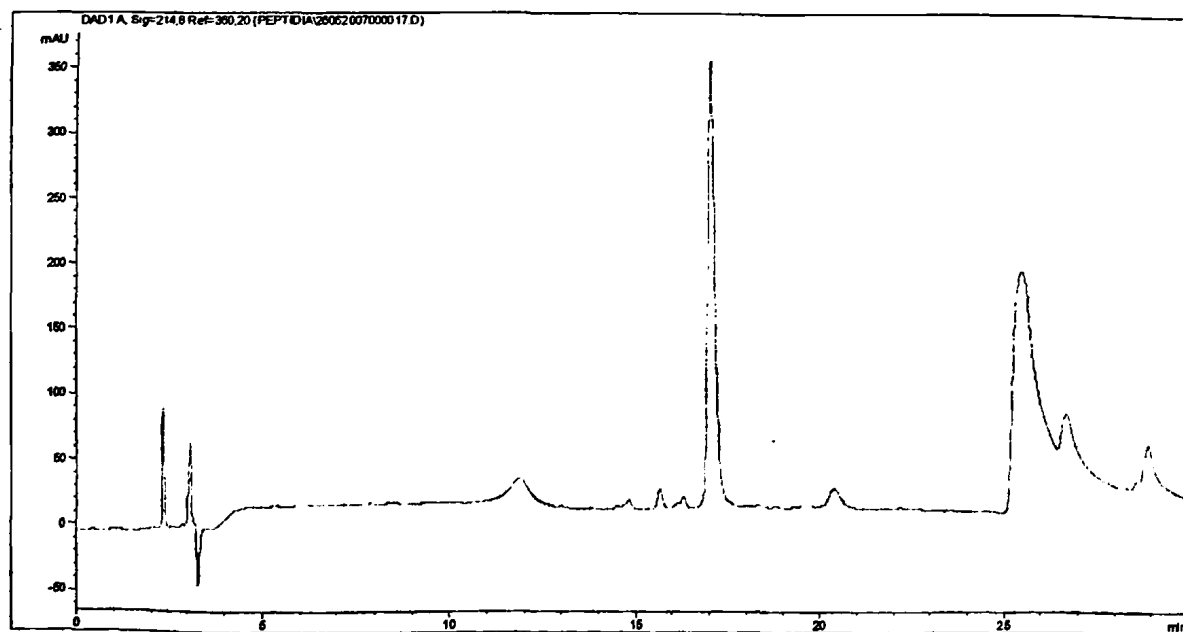
MT: C₁₇₂H₂₉₇N₅₃O₅₅S₂

10,14 mg αλδεϋδικού παραγώγου του επιτόπου T1 (H-VLMENERTLK(CHOCO)A-NH₂) (7,5 μmol) διαλύονται σε 1 ml H₂O/0,1%TFA και 0,2 ml CH₃CN/0,1%TFA σε σφαιρική φιάλη η οποία είναι τοποθετημένη σε υδατόλουτρο 32-35°C. Στο υπό ανάδευση διάλυμα προστίθεται διάλυμα του N^ε-αμινοοξυακέτυλο φορέα SOC₄-I (λυσίνες 1 και 7) (3,43 mg, 2,5 μmol) σε 0,25 ml H₂O. Η εξέλιξη της αντίδρασης ελέγχεται με φασματομετρία μάζας ESI MS. 69 ώρες μετά την έναρξη της αντίδρασης το μίγμα αραιώνεται με 9 ml διαλύματος H₂O/0,1%TFA και το επιθυμητό πεπτίδιο 2 απομονώνεται με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC χρησιμοποιώντας βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης 10% έως 70% CH₃CN/0.1%TFA σε H₂O/0.1%TFA με ταχύτητα ροής 4.7ml/min για 30 min, ανίχνευση στα 214nm. Το επιθυμητό προϊόν λαμβάνεται σε στερεή μορφή μετά από λυοφιλοποίηση του κατάλληλου κλάσματος της HPLC (απόδοση 48%)

Η ταυτοποίηση του επιθυμητού προϊόντος έγινε με φασματομετρία μάζας ESI-MS (Σχήμα 5) ενώ η καθαρότητα επιβεβαιώθηκε με αναλυτική RP-HPLC (Σχήμα 6).

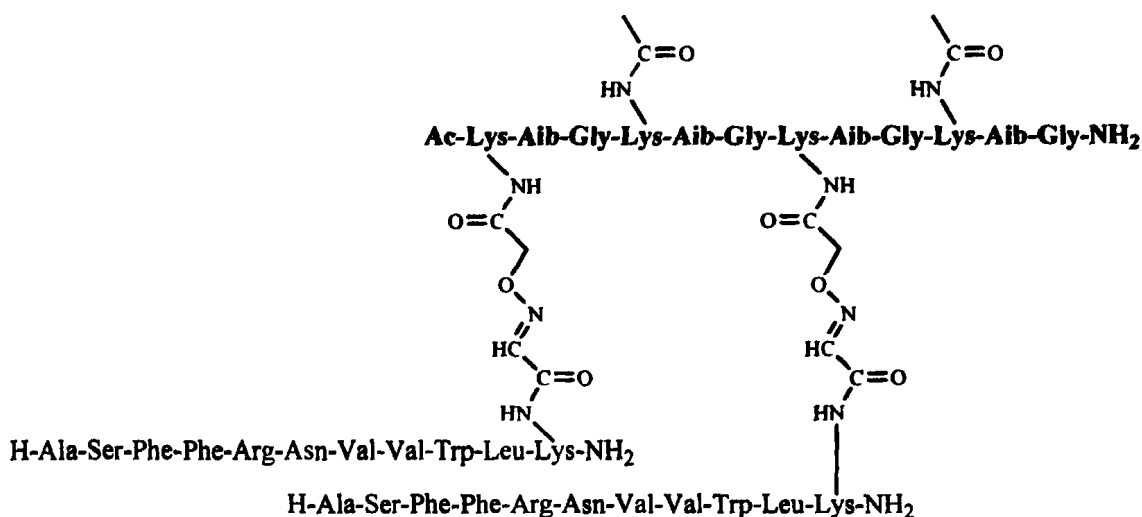


Σχήμα 5. Φάσμα μάζας ESI του καθαρού αναλόγου $Ac-SOC_4\{Ac_2, [Tl(CH=N-O)]_2\}-NH_2$.
Ευρεθέν μοριακό βάρος 4053,23, υπολογισθέν μοριακό βάρος 4051,68.



Σχήμα 6. Χρωματογράφημα Αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού αναλόγου $Ac-SOC_4\{Ac_2, [Tl(CH=N-O)]_2\}-NH_2$. Βαθμιδαυτό σύστημα έκλουσης 10% έως 70% $CH_3CN/0.1\%TFA$ σε $H_2O/0.1\%TFA$, ταχύτητα ροής 1ml/min για 30 min, ανίχνευση στα 214nm.

3. Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του Ac-SOC₄{Ac₂, [T3(CH=N-O)]₂}-NH₂



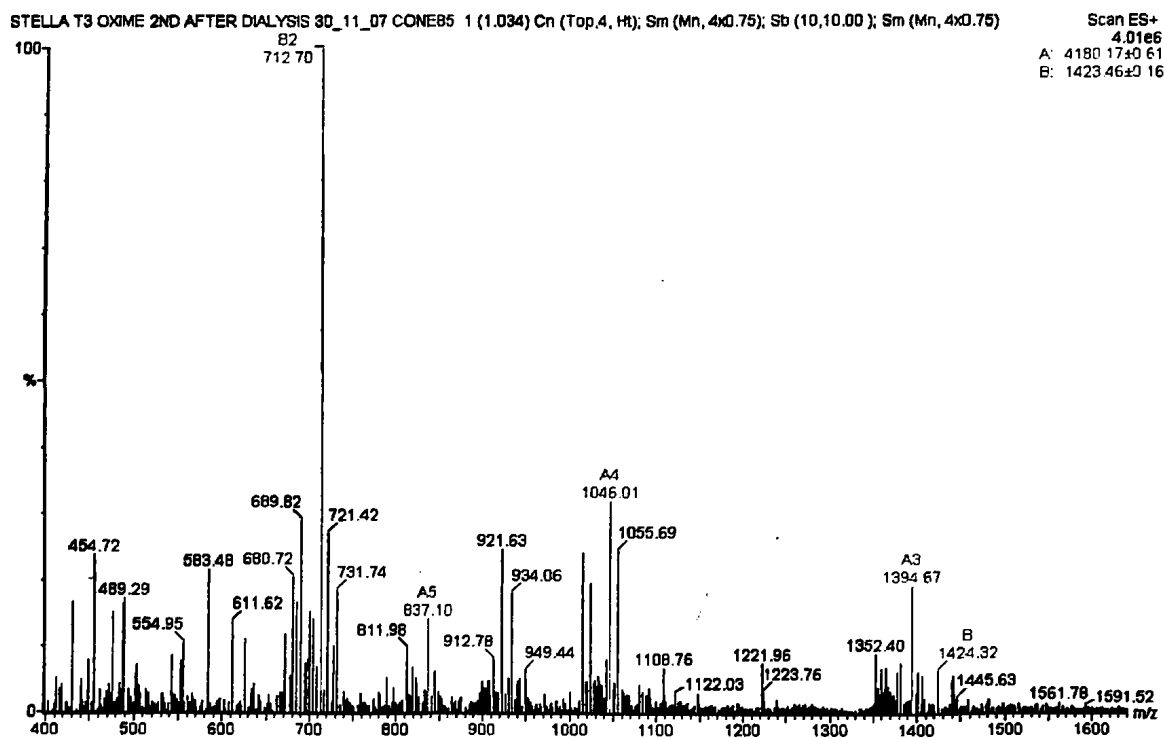
MB: 4177, 86

MT: C₁₉₆H₂₉₉N₅₅O₄₇

Σε σφαιρική φιάλη η οποία είναι τοποθετημένη σε υδατόλουτρο 32-35°C εισάγονται 11,5 mg αλδεϋδικού παραγώγου του επιτόπου T3 (H-ASFFRNVVWLK(CHOCO)-NH₂) (8,1 μmol = 3,19 x 2 x 1,7) όπου προστίθενται 1,4 ml H₂O, 0,7 ml H₂O/0,1%TFA και 0,35 ml CH₃CN. Στο υπό ανάδευση αιώρημα που προκύπτει προστίθεται διάλυμα του N^ε-αμινοοξακέτυλο φορέα SOC₄-I (λυσίνες 1 και 7) (4,37 mg, 3,19 μmol) σε 0,319 ml H₂O. Η αντίδραση αφήνεται να λάβει χώρα στο αιώρημα που προκύπτει λόγω της δυσδιαλυτότητας του επιτόπου και η εξέλιξή της ελέγχεται με φασματομετρία μάζας ESI MS. 78 ώρες μετά την έναρξη της αντίδρασης το μίγμα αραιώνεται με H₂O και λυοφιλοποιείται. Το επιθυμητό πεπτίδιο 3, αν και από το φάσμα μάζας προκύπτει ότι έχει σχηματιστεί, δεν κατέστη δυνατό να απομονωθεί από το μίγμα της αντίδρασης (κυρίως περίσσεια επιτόπου) με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC λόγω πολύ μεγάλης δυσδιαλυτότητας. Για το λόγο αυτό το προϊόν της λυοφιλοποίησης υποβλήθηκε σε διαπίδυση έναντι H₂O σε μεμβράνη από κυτταρίνη, βενζοϋλιωμένη για την μείωση του μεγέθους των πόρων αυτής (dialysis tubing benzoylated, avg. flat width 32mm, SIGMA), η οποία διαχωρίζει ενώσεις με μοριακό βάρος ≤ 1.200 από ενώσεις με μοριακό βάρος > 2.000. Ο καθαρισμός αυτό αποσκοπούσε στην απομάκρυνση της περίσσειας του επιτόπου (MB:1421,66). Μετά από 48 ώρες το περιεχόμενο

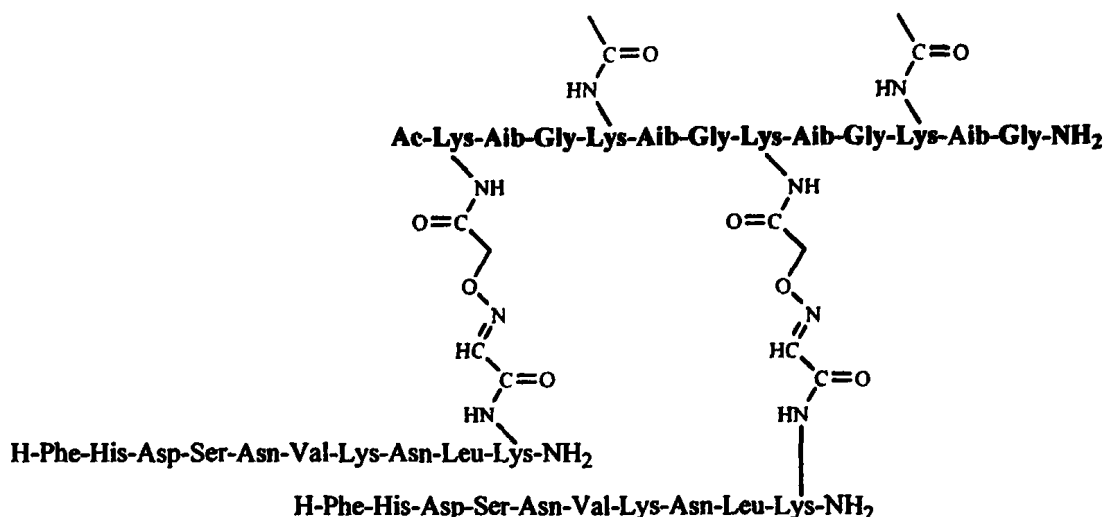


της μεμβράνης λυοφιλοποιήθηκε και το στερεό προϊόν ταυτοποιήθηκε με φασματομετρία μάζας ESI-MS (Σχήμα 7).



Σχήμα 7. Φάσμα μάζας ESI του αναλόγου $Ac-SOC_4(Ac_2, [T3(CH=N-O)]_2)-NH_2$ μετά τον καθαρισμό με διαπίδυση. Ευρεθέν μοριακό βάρος 4180,24, υπολογισθέν μοριακό βάρος 4177,86.

4 Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του Ac-SOC₄{Ac₂, [T5(CH=N-O)]₂}-NH₂

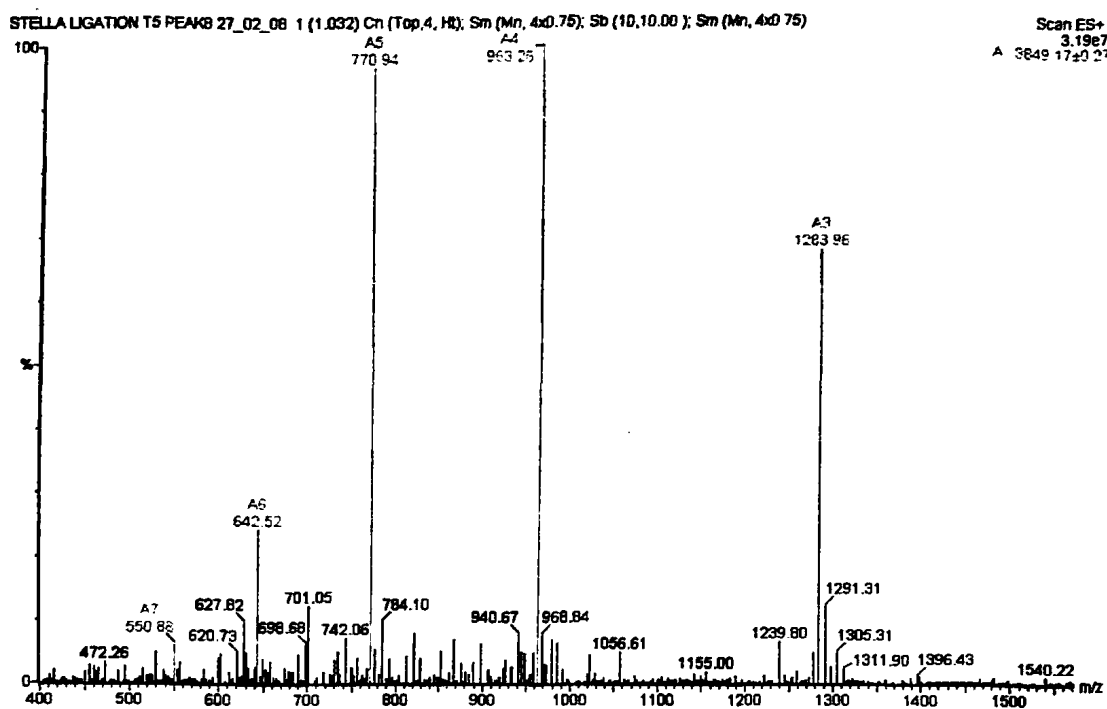


MB: 3847, 3

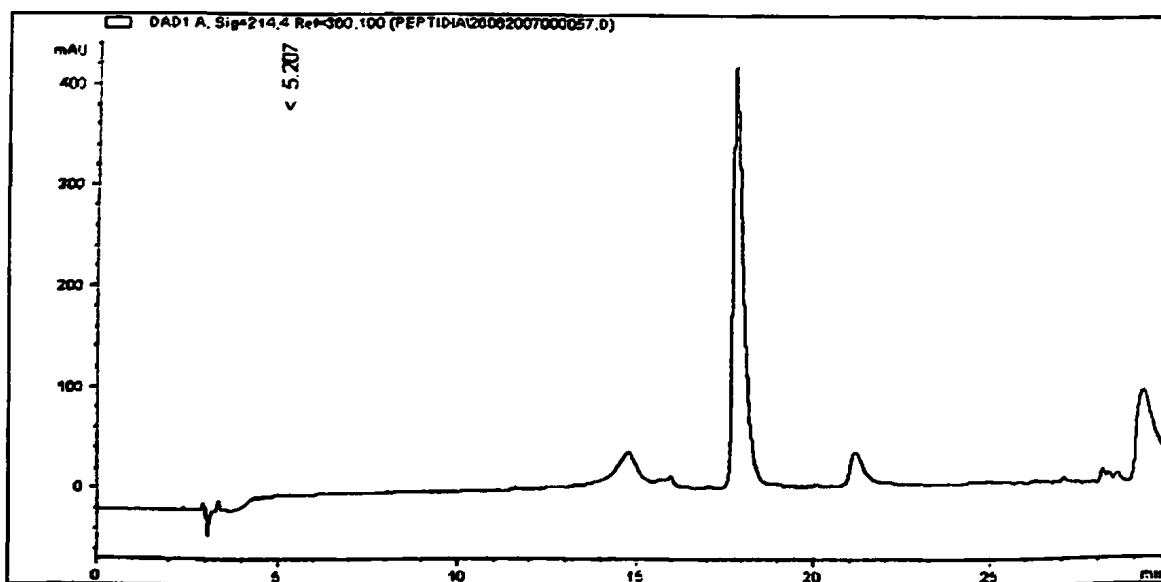
MT: C₁₆₈H₂₆₉N₅₃O₅₁

9,42 mg αλδεϋδικού παραγώγου του επιτόπου T5 (H-FHDSNVKNLK(CHOCO)-NH₂) (13,5 μmol) διαλύονται σε 0,75 ml H₂O σε σφαιρική φιάλη η οποία είναι τοποθετημένη σε υδατόλουτρο 32-35°C. Το διάλυμα αραιώνεται με 4,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος-οξικού νατρίου pH 4,6. Στο υπό ανάδευση διάλυμα προστίθεται διάλυμα του N⁻αμινοοξυακέτυλο φορέα SOC₄-I (λυσίνες 1 και 7) (3,43 mg, 2,5 μmol) σε 0,25 ml H₂O. Η εξέλιξη της αντίδρασης ελέγχεται με φασματομετρία μάζας ESI MS. 46 ώρες μετά την έναρξη της αντίδρασης το μίγμα αραιώνεται με 5 ml διαλύματος H₂O/0,1%TFA και το επιθυμητό πεπτίδιο 4 απομονώνεται με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC χρησιμοποιώντας βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης 10% έως 60% CH₃CN/0.1%TFA σε H₂O/0.1%TFA με ταχύτητα ροής 4.7ml/min για 30 min, ανίχνευση στα 214nm. Το επιθυμητό προϊόν λαμβάνεται σε στερεή μορφή μετά από λυοφιλοποίηση του κατάλληλου κλάσματος της HPLC (απόδοση 66%).

Η ταυτοποίηση του επιθυμητού προϊόντος έγινε με φασματομετρία μάζας ESI-MS (Σχήμα 8) ενώ η καθαρότητα επιβεβαιώθηκε με αναλυτική RP-HPLC (Σχήμα 9).

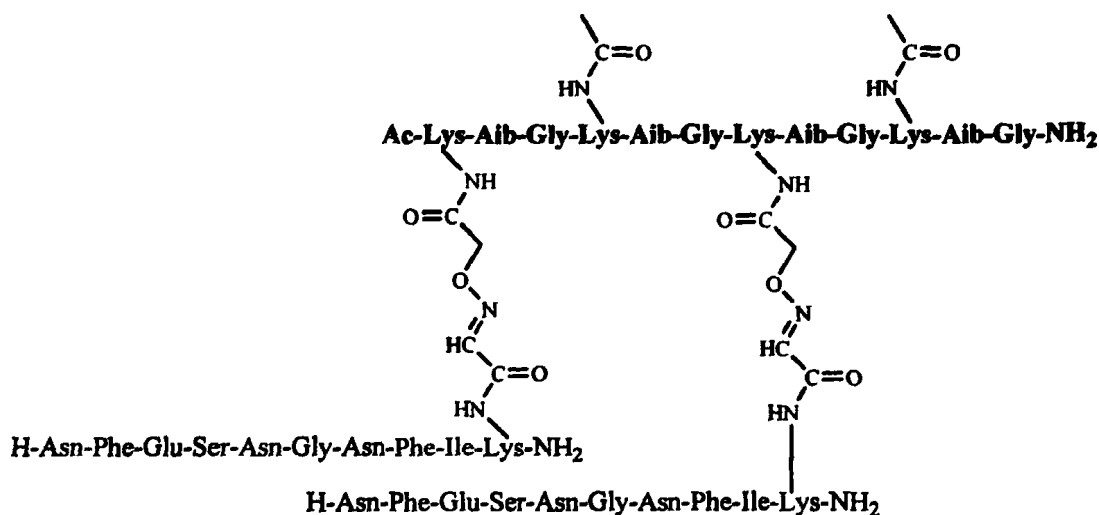


Σχήμα 8. Φάσμα μάζας ESI του καθαρού αναλόγου $Ac-SOC_4\{Ac_2, [T5(CH=N-O)]_2\}-NH_2$. Ευρεθέν μοριακό βάρος 3849,17, υπολογισθέν μοριακό βάρος 3847,3.



Σχήμα 9. Χρωματογράφημα Αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού αναλόγου $Ac-SOC_4\{Ac_2, [T5(CH=N-O)]_2\}-NH_2$. Βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης 10% έως 60% $CH_3CN/0.1\%TFA$ σε $H_2O/0.1\%TFA$, ταχύτητα ροής 1ml/min για 30 min, ανίχνευση στα 214nm.

5. Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του Ac-SOC₄(Ac₂, [T7(CH=N-O)]₂)-NH₂

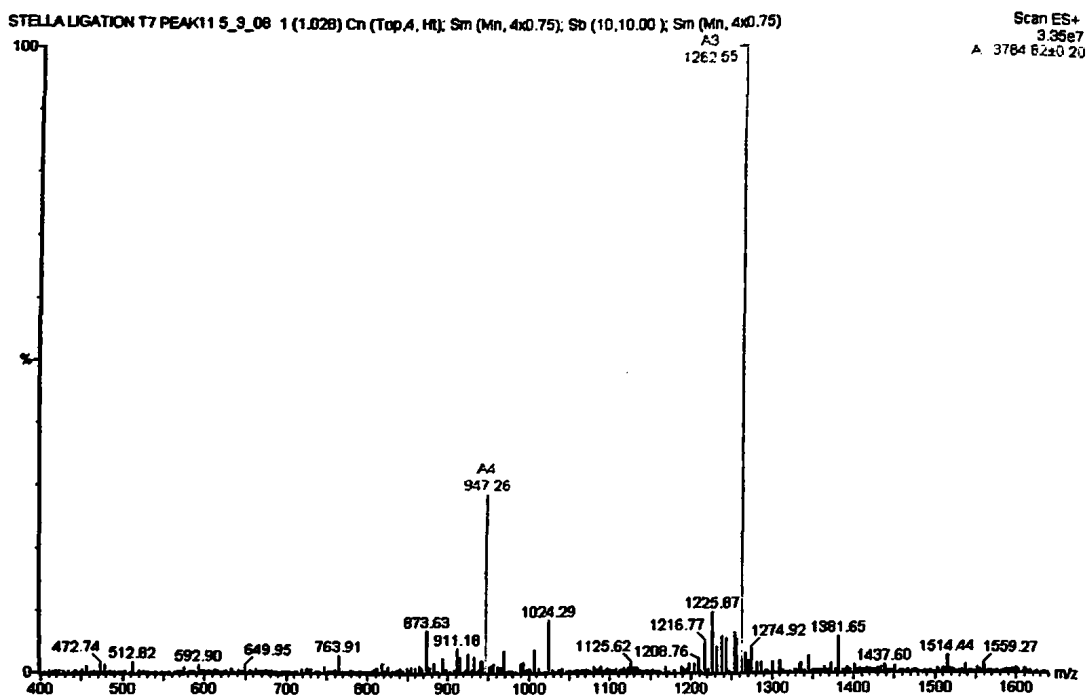


MB: 3783, 14

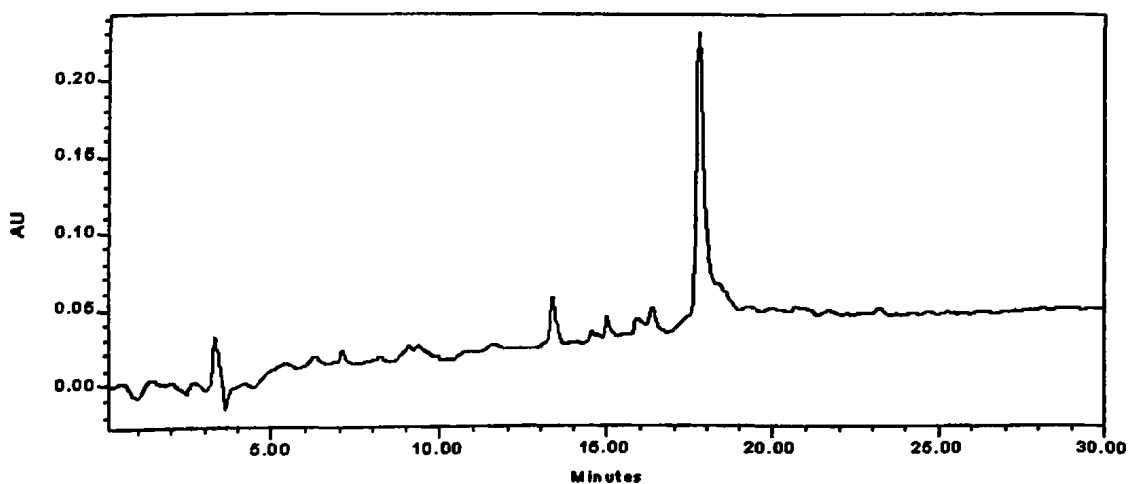
MT: C₁₆₆H₂₅₁N₄₉O₅₃

4,66 mg αλδεϋδικού παραγώγου του επιτόπου T7 (H-NFESNGNFIK(CHOCO)-NH₂) (3,75 μmol) διαλύονται σε 134 μl CH₃CN και 268 μl DMSO σε σφαιρική φιάλη η οποία είναι τοποθετημένη σε υδατόλουτρο 32-35°C. Στο υπό ανάδευση διάλυμα προστίθεται διάλυμα του N^ε-αμινοοξακέτυλο φορέα SOC₄-I (λυσίνες 1 και 7) (1,78 mg, 1,25 μmol) σε 0,045 ml ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος-οξικού νατρίου pH 4,6. Η εξέλιξη της αντίδρασης ελέγχεται με φασματομετρία μάζας ESI MS. 46 ώρες μετά την έναρξη της αντίδρασης το μίγμα αραιώνεται με 4,85 ml διαλύματος H₂O/0,1%TFA και το επιθυμητό πεπτιδίο 5 απομονώνεται με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC χρησιμοποιώντας βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης 10% έως 50% CH₃CN/0.1%TFA σε H₂O/0.1%TFA με ταχύτητα ροής 4.7ml/min για 30 min, ανίχνευση στα 214nm. Το επιθυμητό προϊόν λαμβάνεται σε στερεή μορφή μετά από λυοφιλοποίηση του κατάλληλου κλάσματος της HPLC (απόδοση 37%).

Η ταυτοποίηση του επιθυμητού προϊόντος έγινε με φασματομετρία μάζας ESI-MS (Σχήμα 10) ενώ η καθαρότητα επιβεβαιώθηκε με αναλυτική RP-HPLC (Σχήμα 11).



Σχήμα 10. Φάσμα μάζας ESI του καθαρού αναλόγου $Ac-SOC_4\{Ac_2, [T7(CH=N-O)]_2\}-NH_2$.
Ευρεθέν μοριακό βάρος 3784,82, υπολογισθέν μοριακό βάρος 3783,14.



Σχήμα 11. Χρωματογράφημα Αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού αναλόγου $Ac-SOC_4\{Ac_2, [T7(CH=N-O)]_2\}-NH_2$. Βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης 10% έως 60% $CH_3CN/0.1\%TFA$ σε $H_2O/0.1\%TFA$, ταχύτητα ροής 1 ml/min για 30 min, ανίχνευση στα 214nm.

Τέλος, στον πίνακα 2 συνοψίζονται οι αποδόσεις σύνθεσης των πεπτιδικών αναλόγων της ΗΑ που παρασκευάστηκαν σε στερεή φάση κατά Merrifield (ανάλογο 1) ή σε υγρή φάση με χημιοεκλεκτική αντίδραση σχηματισμού δεσμού οξίμης.

Πίνακας 2. Αποδόσεις σύνθεσης των πεπτιδικών αναλόγων της ΗΑ

Πεπτιδικά ανάλογα της ΗΑ	ΣΤΕΡΕΗ ΦΑΣΗ		ΥΓΡΗ ΦΑΣΗ
	ΑΠΟΔΟΣΗ ΣΥΝΘΕΣΗΣ	ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ	ΑΠΟΔΟΣΗ
(1) Ac-SOC ₄ {Ac ₂ , (H5VIN1cor54-69) ₂ }-OH	80 %	12 %	
(2) Ac-SOC ₄ {Ac ₂ , [T1(CH=N-O)] ₂ }-NH ₂			48 %
(3) Ac-SOC ₄ {Ac ₂ , [T3(CH=N-O)] ₂ }-NH ₂			-
(4) Ac-SOC ₄ {Ac ₂ , [T5(CH=N-O)] ₂ }-NH ₂			66 %
(5) Ac-SOC ₄ {Ac ₂ , [T7(CH=N-O)] ₂ }-NH ₂			37 %



Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση γλυκοπεπτιδικών αναλόγων του σιαλο-υποδοχέα της HA

Εισαγωγή

Στην παρούσα εργασία συντέθηκαν και μελετήθηκαν τα εξής γλυκοπεπτιδικά ανάλογα του υποδοχέα της HA:

1. H-SOC₄(SA-Aoa)₄-NH₂
2. Ac-SOC₄[Ac₂, (SA-Aoa)₂]-NH₂
3. Ac-SOC₄[Ac₂, (3'SL-Aoa)₂]-NH₂
4. Ac-SOC₄[Ac₂, (6'SL-Aoa)₂]-NH₂

Τα ανάλογα αυτά παρασκευάστηκαν σε υγρή φάση ύστερα από χημιοεκλεκτική σύνδεση μέσω σχηματισμού δεσμού οξίμης του N^E-αμινοοξυακέτυλο φορέα SOC₄-I και των υδατανθράκων: σιαλικό οξύ (SA), 3'-σιαλυλ-λακτόζη (3'SL) και 6'-σιαλυλ-λακτόζη (6'SL).

Αντιδραστήρια

Για τη σύνθεση σε υγρή φάση των γλυκοπεπτιδίων 1-4 χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια και διαλύτες:

- N-ακέτυλο-νευραμινικό οξύ [σιαλικό οξύ (SA), C₁₁H₁₉NO₉, MB: 309,27, Fluka (Germany)]
- Αμμωνιακό άλας της 3'-N-ακετυλο-νευραμινυλ-λακτόζης [3'-σιαλυλ-λακτόζη (3'SL), Neu5Acα2,3Galβ1,4Glc, C₂₃H₃₉NO₁₉, MB: 633,6 (άλας 650,63), IsoSep (Sweden)]
- Αμμωνιακό άλας της 6'-N-ακετυλο-νευραμινυλ-λακτόζης [6'-σιαλυλ-λακτόζη 6'SL), Neu5Acα2,6Galβ1,4Glc, C₂₃H₃₉NO₁₉, MB: 633,6 (άλας 650,63), IsoSep (Sweden)]
- Οξικό οξύ [CH₃COOH, M.B.: 60,05, d: 1,048 g/ml, Panreac (Spain)]
- Οξικό νάτριο [CH₃COONa, M.B.: 82,04, Fluka (Germany)]

Διαλύματα εργασίας

Διαλύμα Α (υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0,2M): σε ογκομετρική φιάλη των 250 ml εισάγονται 2,89 ml πυκνού οξικού οξέος και προστίθεται νερό μέχρι τη χαραγή.

Διαλύμα Β (υδατικό διάλυμα οξικού νατρίου 0,2M): σε ογκομετρική φιάλη των 250 ml εισάγονται 4,1 g οξικού νατρίου και προστίθεται νερό μέχρι τη χαραγή.

Ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος-οξικού νατρίου 0,1M, pH 4,0:

41 ml διαλύματος Α και 9 ml διαλύματος Β εισάγονται σε ογκομετρική φιάλη των 100ml και ο όγκος συμπληρώνεται με νερό ως τη χαραγή.

Γενική πορεία σύνθεσης

Χημειοεκλεκτική σύνθεση σε υγρή φάση-σχηματισμός δεσμού οξίμης

Η σύνθεση των γλυκοπεπτιδικών αναλόγων της HA 1-4 πραγματοποιήθηκε σε υγρή φάση, σύμφωνα με τα πρωτόκολλα των χημειοεκλεκτικών αντιδράσεων σχηματισμού δεσμού οξίμης, μεταξύ της καρβονυλικής ομάδας στο αναγωγικό άκρο των παραπάνω σακχάρων και του N^ε-αμινοοξακετυλιωμένου φορέα SOC₄-I (πεπτίδιο 2, Κεφάλαιο 11).

Είναι γνωστό ότι τα σάκχαρα είναι πολυδροξυλιωμένες αλδεύδες ή κετόνες. Σε υδατικό περιβάλλον, τα σάκχαρα βρίσκονται σε ισορροπία μεταξύ των δομών ανοικτής και κλειστής αλυσίδας (πολυστροφισμός). Η δεύτερη δομή προκύπτει όταν η ανοικτή αλυσίδα ενός σακχάρου υποστεί κυκλοποίηση, λόγω ενδομοριακής πυρηνόφιλης προσβολής του καρβονυλικού άνθρακα από ένα -OH, γεγονός που ευνοείται λόγω αύξησης της σταθερότητας του μορίου.

Η σύνθεση γλυκοπεπτιδίων μέσω σχηματισμού δεσμού οξίμης ουσιαστικά βασίζεται στον «καρβονυλικό χαρακτήρα» των σακχάρων ο οποίος τους επιτρέπει να αντιδρούν χημειοεκλεκτικά με μια πυρηνόφιλη ομάδα, όπως είναι η αμινοοξακέτυλο-ομάδα.

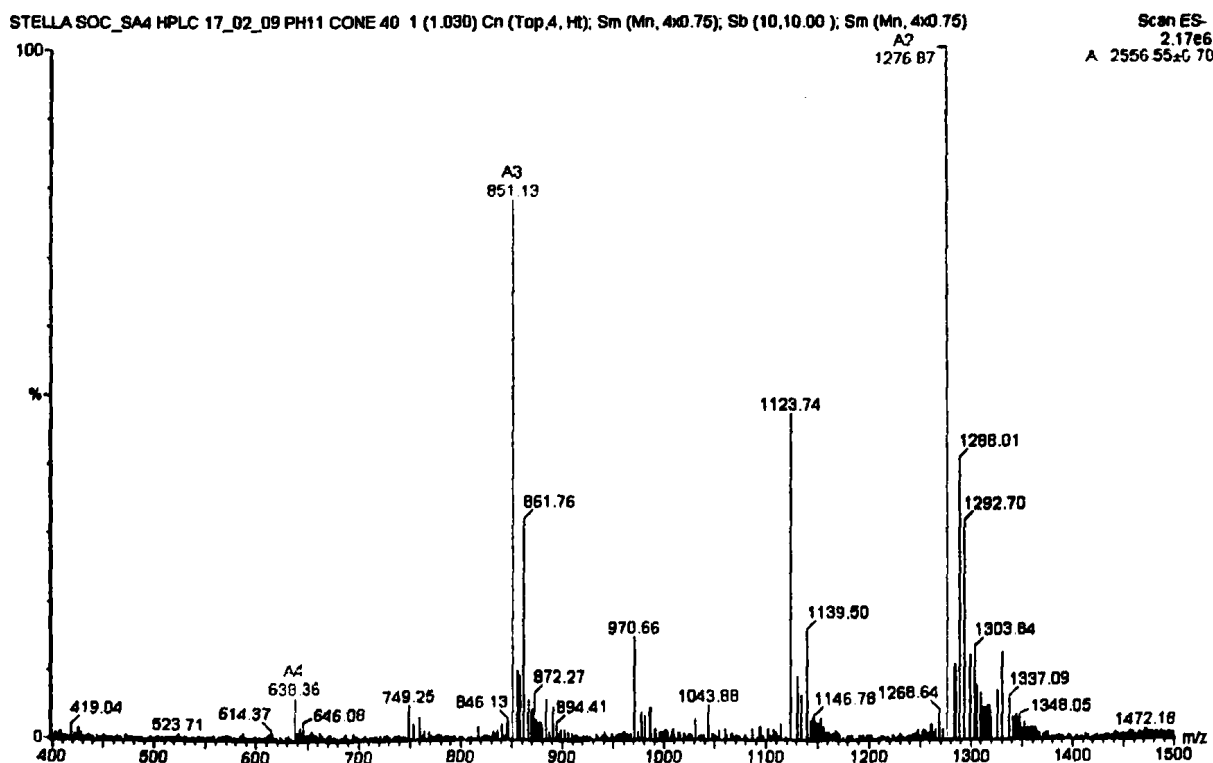
Η μεθοδολογία που ακολουθείται γενικά για τη σύνθεση γλυκοπεπτιδίων με χημειοεκλεκτική αντίδραση σχηματισμού δεσμού οξίμης περιλαμβάνει τη διάλυση ποσότητας N^ε-αμινοοξακετυλιωμένου φορέα SOC₄-I σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος-οξικού νατρίου 0,1 M, pH 4 (C = 10 mM), μέσα σε μικρή σφαιρική φιάλη, υπό συνεχή μαγνητική ανάδευση και θέρμανση (υδρόλουτρο 35-40°C). Ποσότητα σακχάρου ($\mu\text{mol}_{\text{σακχάρου}} = \mu\text{mol}_{\text{φορέα}} \times 2,5_{\text{eq}} \times 2_{\text{αμινοοξακέτυλο-ομάδες}}$) διαλύεται σε ίσο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος-οξικού νατρίου 0,1 M, pH 4 και το διάλυμα αυτό προστίθεται σταδιακά στη σφαιρική για να ξεκινήσει η αντίδραση σχηματισμού οξίμης. Μετράται το pH του διαλύματος της αντίδρασης (μετά την προσθήκη της συνολικής ποσότητας του σακχάρου) και αν χρειάζεται ρυθμίζεται στην τιμή pH 3 με προσθήκη αραιού διαλύματος NaOH. Η εξέλιξη της αντίδρασης ελέγχεται με φασματομετρία ESI-MS, ενώ γενικά ο συνολικός χρόνος αντίδρασης φτάνει μέχρι και τις 3 ημέρες, ανάλογα και με το μέγεθος του σακχάρου.



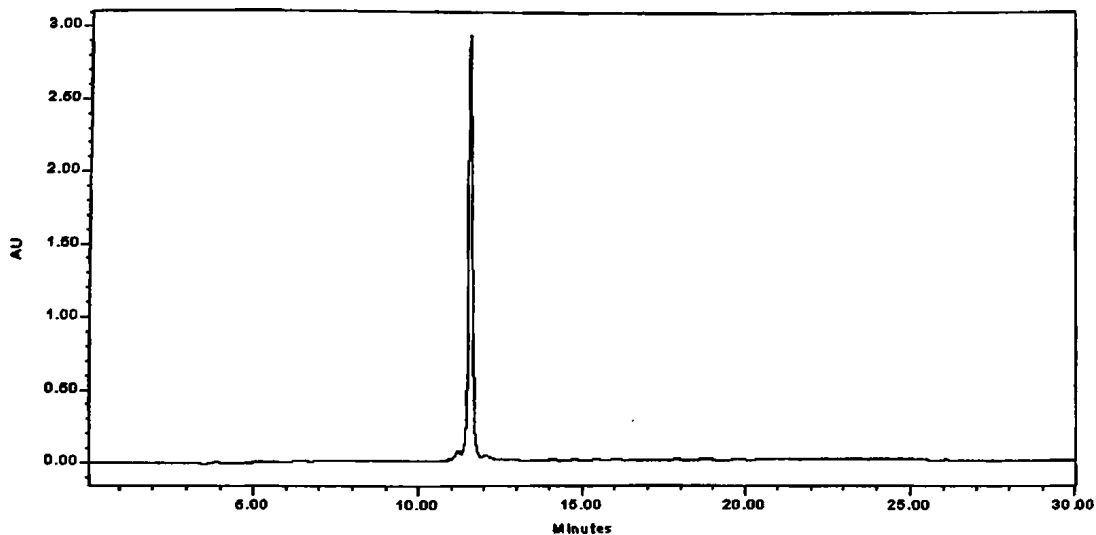
118,3 mg σιαλικού οξέος ($95,4 \times 4 = 381,6 \mu\text{mol}$) διαλύονται σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος-οξικού νατρίου 0,1M, pH 4 σε σφαιρική φιάλη η οποία είναι τοποθετημένη σε υδατόλουτρο ($35-40^\circ\text{C}$). Στο υπό ανάδευση διάλυμα προστίθεται στάγδην διάλυμα N^e-αμινοοξυακετυλιωμένου φορέα SOC₄-I (13,26 mg, 9,5 μmol , 1 ml) σε μίγμα ακετονιτριλίου, ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος-οξικού νατρίου 0,1M, pH 4,0 (1/1v/v). Το pH του τελικού διαλύματος ρυθμίζεται στην τιμή 3 με διάλυμα NaOH 0,5 N.

Η εξέλιξη της αντίδρασης ελέγχεται με φασματομετρία μάζας ESI MS. 145 ώρες μετά την έναρξη, το μίγμα της αντίδρασης λυοφιλοποιείται και το επιθυμητό γλυκοπεπτίδιο 6 απομονώνεται με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC χρησιμοποιώντας βαθμιδωτό σύστημα έκλυσης 10% έως 50% CH₃CN/0.1%TFA σε H₂O/0.1%TFA με ταχύτητα ροής 4.7ml/min για 30 min, ανίχνευση στα 214nm (απόδοση 25 %)

Η ταυτοποίηση του επιθυμητού προϊόντος έγινε με φασματομετρία μάζας ESI-MS (Σχήμα 1) ενώ η καθαρότητα επιβεβαιώθηκε με αναλυτική RP-HPLC (Σχήμα 2).

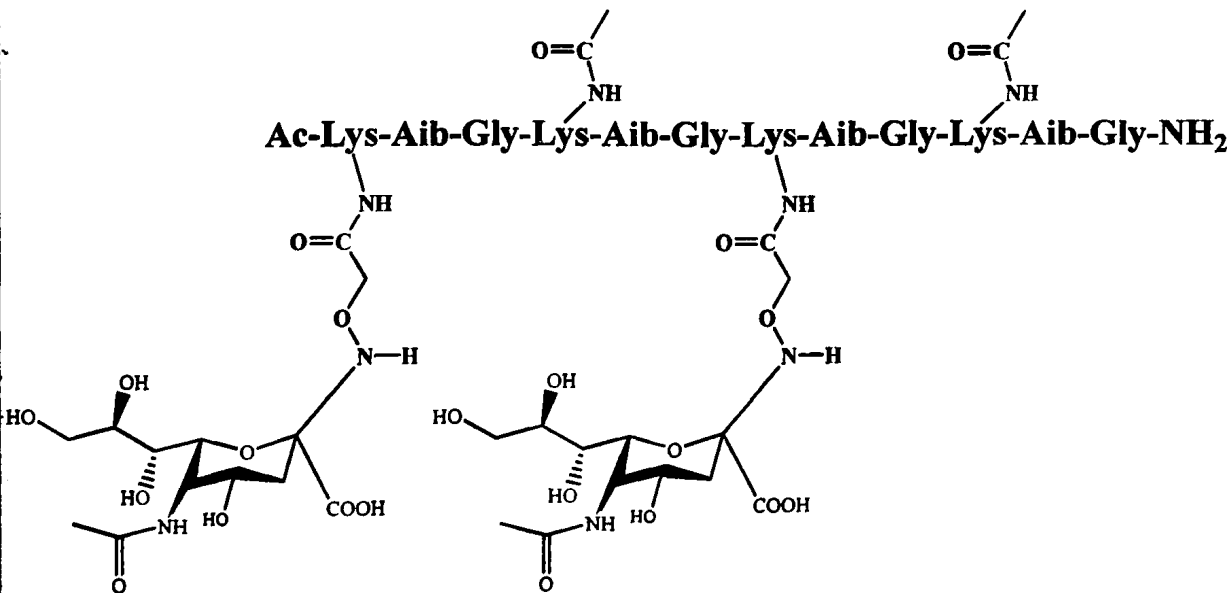
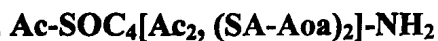


Σχήμα 1. Φάσμα μάζας ESI του καθαρού γλυκοπεπτιδίου H-SOC₄(SA-Aoa)₄-NH₂. Ευρεθέν μοριακό βάρος 2556,55, υπολογισθέν μοριακό βάρος 2555,59.



Σχήμα 2. Χρωματογράφημα Αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού γλυκοπεπτιδίου H-SOC₄(SA-Aoa)₄-NH₂. Βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης 5% έως 70% CH₃CN/0.1%TFA σε H₂O/0.1%TFA με ταχύτητα ροής 1ml/min για 30 min, ανίχνευση στα 214nm.

2. Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του γλυκοπεπτιδικού αναλόγου:



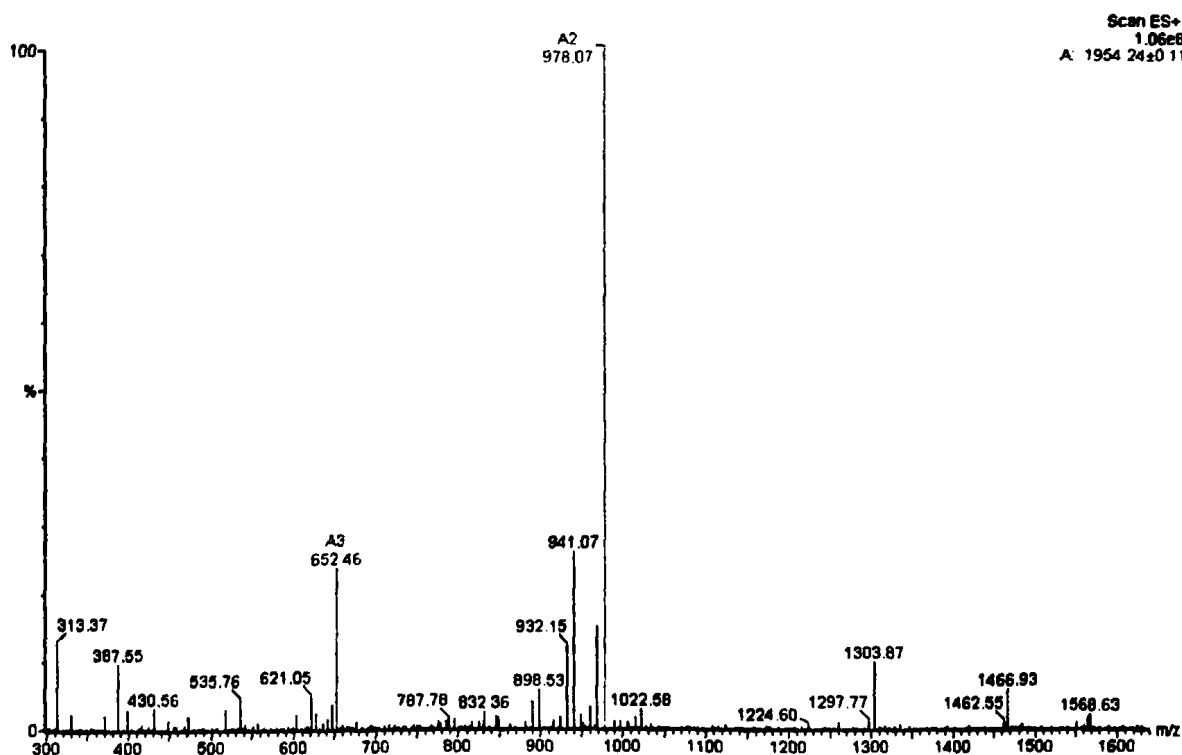
MB: 1953,08

MT: C₈₀H₁₃₇N₂₁O₃₅

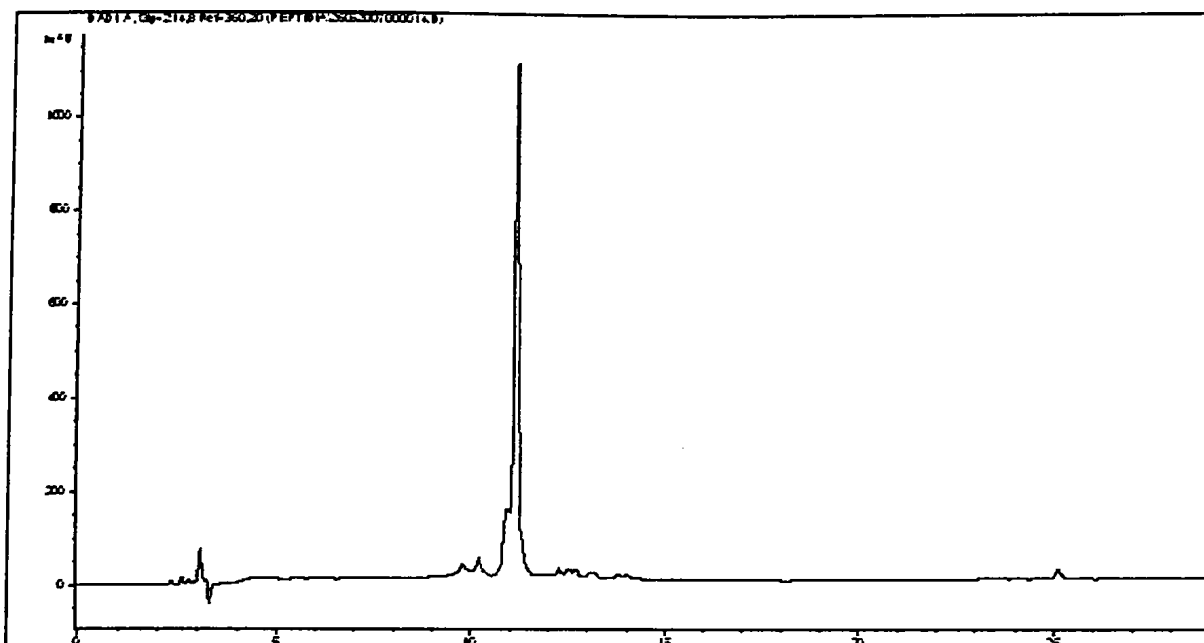
13,7 mg (10 μ mol) N^c-αμινοοξυακετυλιωμένου φορέα SOC₄-I διαλύονται σε 1ml ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος-οξικού νατρίου 0,1M, pH 4 σε σφαιρική φιάλη η οποία είναι τοποθετημένη σε υδατόλουτρο (35-40°C). Στο υπό ανάδευση διάλυμα προστίθεται στάγδην διάλυμα σιαλικού οξέος (15,59 mg, 50 μ mol) σε 1ml ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος-οξικού νατρίου 0,1M, pH 4. Το pH του τελικού διαλύματος ρυθμίζεται στην τιμή 3 με διάλυμα NaOH 0,25 N.

Η εξέλιξη της αντίδρασης ελέγχεται με φασματομετρία μάζας ESI MS. 24 ώρες μετά την έναρξη, το μίγμα της αντίδρασης λυοφιλοποιείται και το επιθυμητό γλυκοπεπτίδιο 2 απομονώνεται με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC χρησιμοποιώντας βαθμιδωτό σύστημα έκλυσης 10% έως 60% CH₃CN/0.1%TFA σε H₂O/0.1%TFA με ταχύτητα ροής 4.7ml/min για 30 min, ανίχνευση στα 214nm (απόδοση 56 %).

Η ταυτοποίηση του επιθυμητού προϊόντος έγινε με φασματομετρία μάζας ESI-MS (Σχήμα 3) ενώ η καθαρότητα επιβεβαιώθηκε με αναλυτική RP-HPLC (Σχήμα 4).

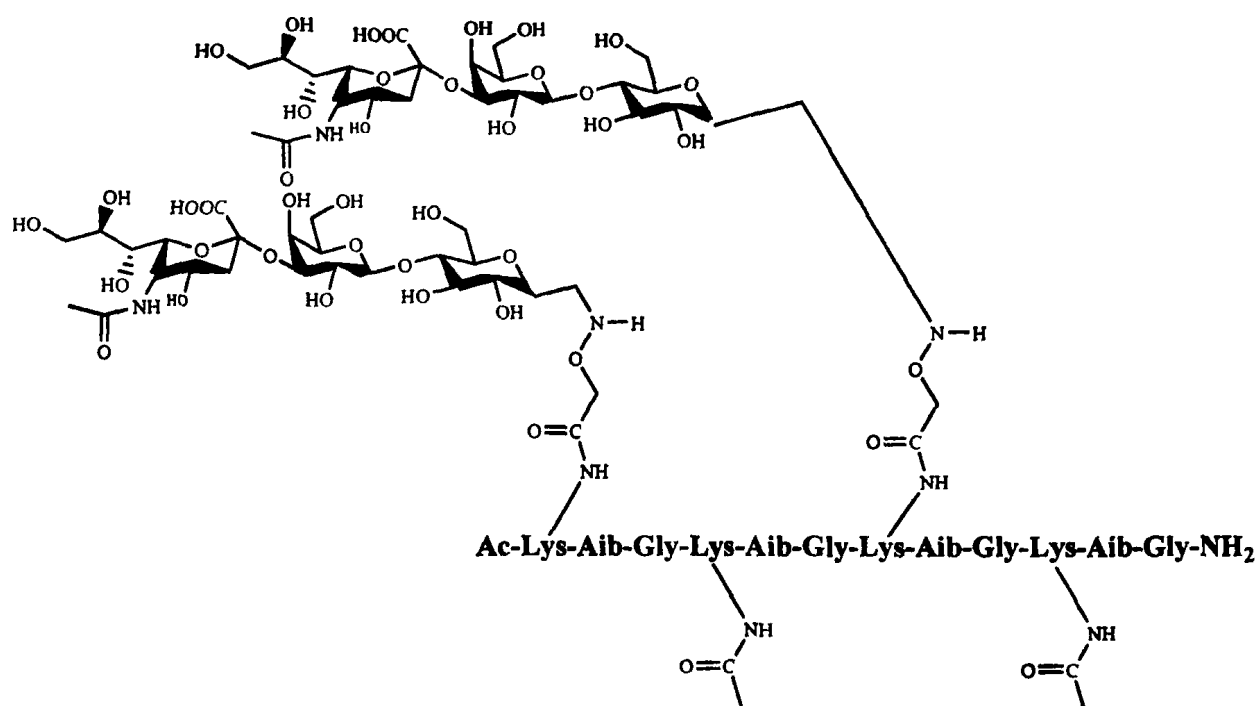
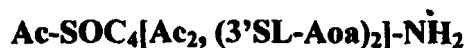


Σχήμα 3. Φάσμα μάζας ESI του καθαρού γλυκοπεπτιδίου Ac-SOC₄[Ac₂, (SA-Aoa)₂]-NH₂. Ευρεθέν μοριακό βάρος 1954,24, υπολογισθέν μοριακό βάρος 1953,08.



Σχήμα 4. Χρωματογράφημα Αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού γλυκοπεπτιδίου $Ac-SOC_4[Ac_2(SA-Aoa)_2]-NH_2$. Βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης 10% έως 50% $CH_3CN/0.1\%TFA$ σε $H_2O/0.1\%TFA$, ταχύτητα ροής 1ml/min για 30 min, ανίχνευση στα 214nm.

3. Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του γλυκοπεπτιδικού αναλόγου:



MB: 2601,65

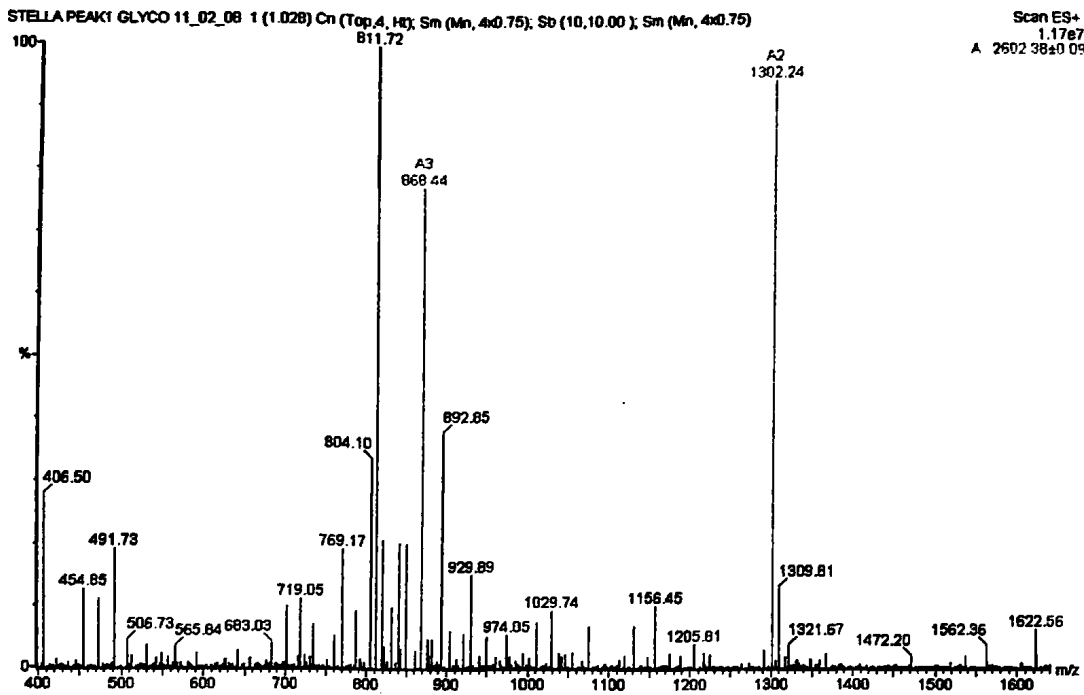
MT: $\text{C}_{104}\text{H}_{177}\text{N}_{21}\text{O}_{55}$

3,42 mg (2,5 μmol) N^{ϵ} -αμινοοξυακετυλιωμένου φορέα $\text{SOC}_4\text{-I}$ διαλύονται σε 0,25 ml ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος-οξικού νατρίου 0,1M, pH 4 σε σφαιρική φιάλη η οποία είναι τοποθετημένη σε υδατόλουτρο (35-40°C). Στο υπό ανάδευση διάλυμα προστίθεται στάγδην διάλυμα 3'-σιαλυλ-λακτόζης (8,13 mg, 12,5 μmol) σε 0,25 ml ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος-οξικού νατρίου 0,1M, pH 4.

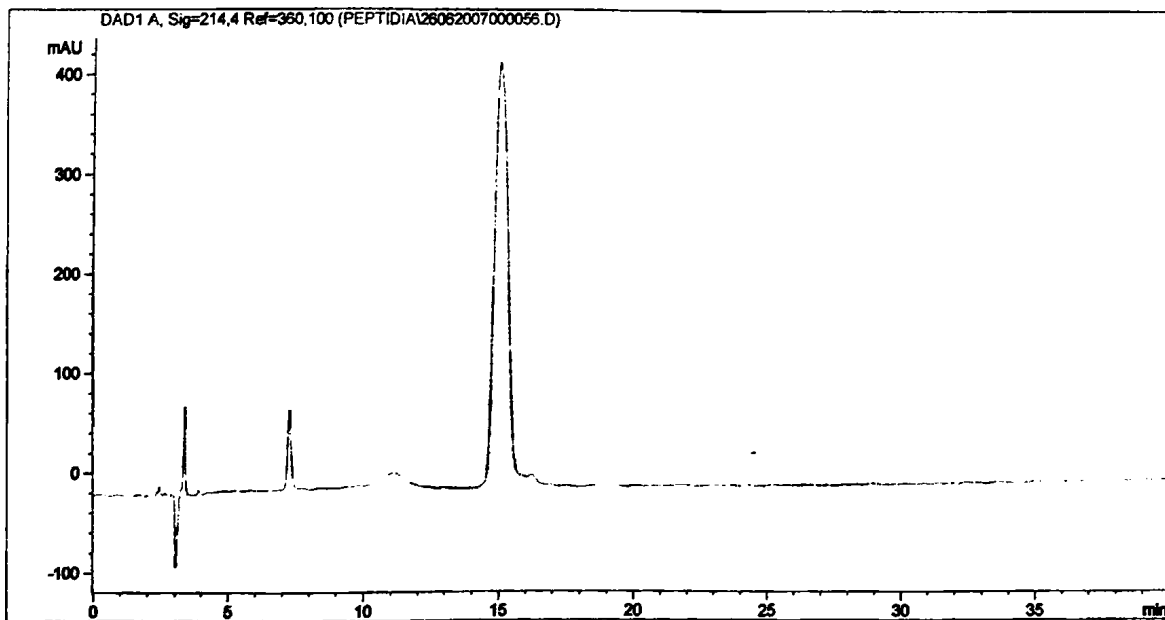
Η εξέλιξη της αντίδρασης ελέγχεται με φασματομετρία μάζας ESI MS. 72 ώρες μετά την έναρξη, το μίγμα της αντίδρασης αραιώνεται με ποσότητα $\text{H}_2\text{O}/0,1\%\text{TFA}$ και το επιθυμητό γλυκοπεπτίδιο 3 απομονώνεται με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC χρησιμοποιώντας βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης 10% έως 60% $\text{CH}_3\text{CN}/0,1\%\text{TFA}$ σε $\text{H}_2\text{O}/0,1\%\text{TFA}$ με ταχύτητα ροής 4.7ml/min για 30 min, ανίχνευση στα 214nm (απόδοση 18%).

Η ταυτοποίηση του επιθυμητού προϊόντος έγινε με φασματομετρία μάζας ESI-MS (Σχήμα 5) ενώ η καθαρότητα επιβεβαιώθηκε με αναλυτική RP-HPLC (Σχήμα 6).



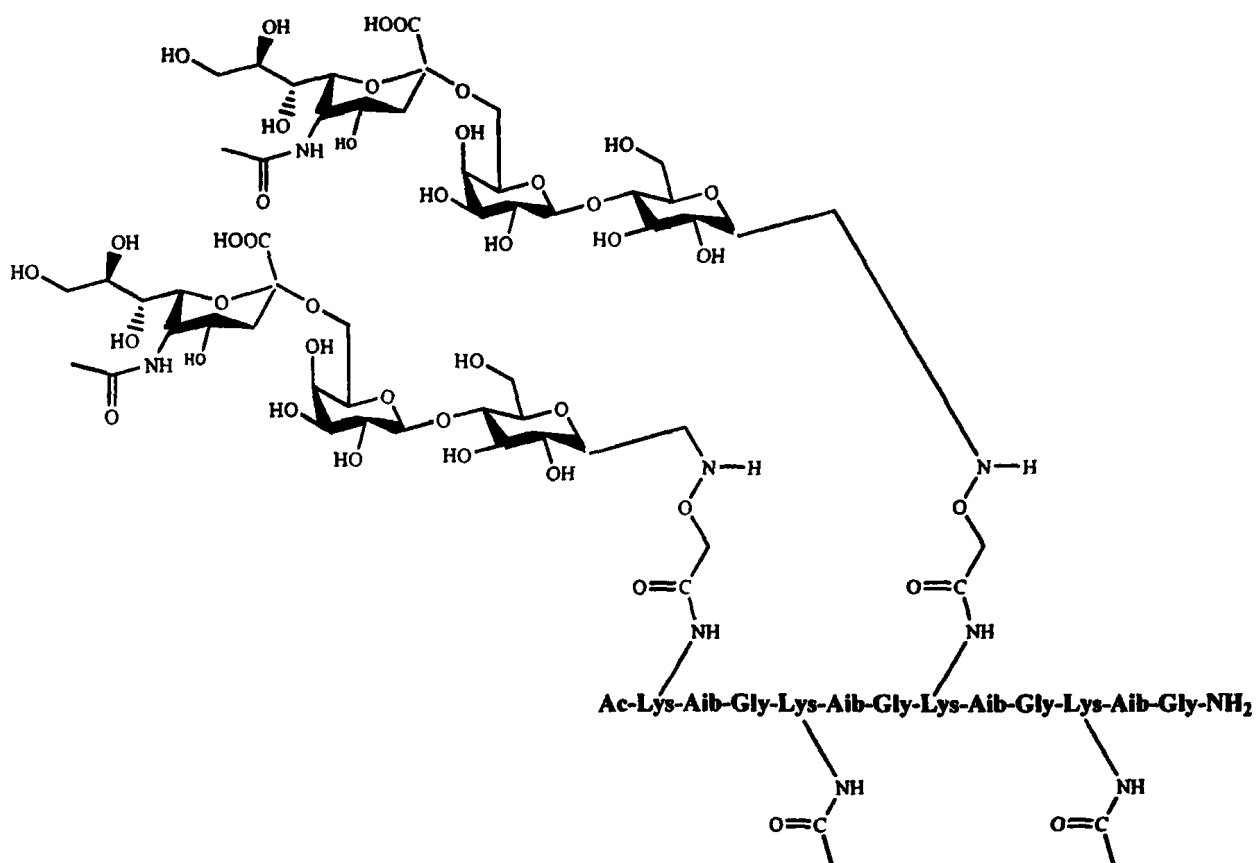
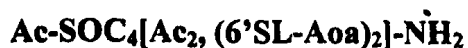


Σχήμα 5. Φάσμα μάζας ESI του καθαρού γλυκοπεπτιδίου $Ac-SOC_4[Ac_2, (3'SL-Aoa)_2]-NH_2$. Ευρεθέν μοριακό βάρος 2602,38, υπολογισθέν μοριακό βάρος 2601,65.



Σχήμα 6. Χρωματογράφημα Αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού γλυκοπεπτιδίου $Ac-SOC_4[Ac_2, (3'SL-Aoa)_2]-NH_2$. Βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης 10% έως 50% $CH_3CN/0.1\%TFA$ σε $H_2O/0.1\%TFA$, ταχύτητα ροής 1ml/min για 30 min, ανίχνευση στα 214nm.

4. Σύνθεση, καθαρισμός και ταυτοποίηση του γλυκοπεπτιδικού αναλόγου:



MB: 2601,65

MT: $\text{C}_{104}\text{H}_{177}\text{N}_{21}\text{O}_{55}$

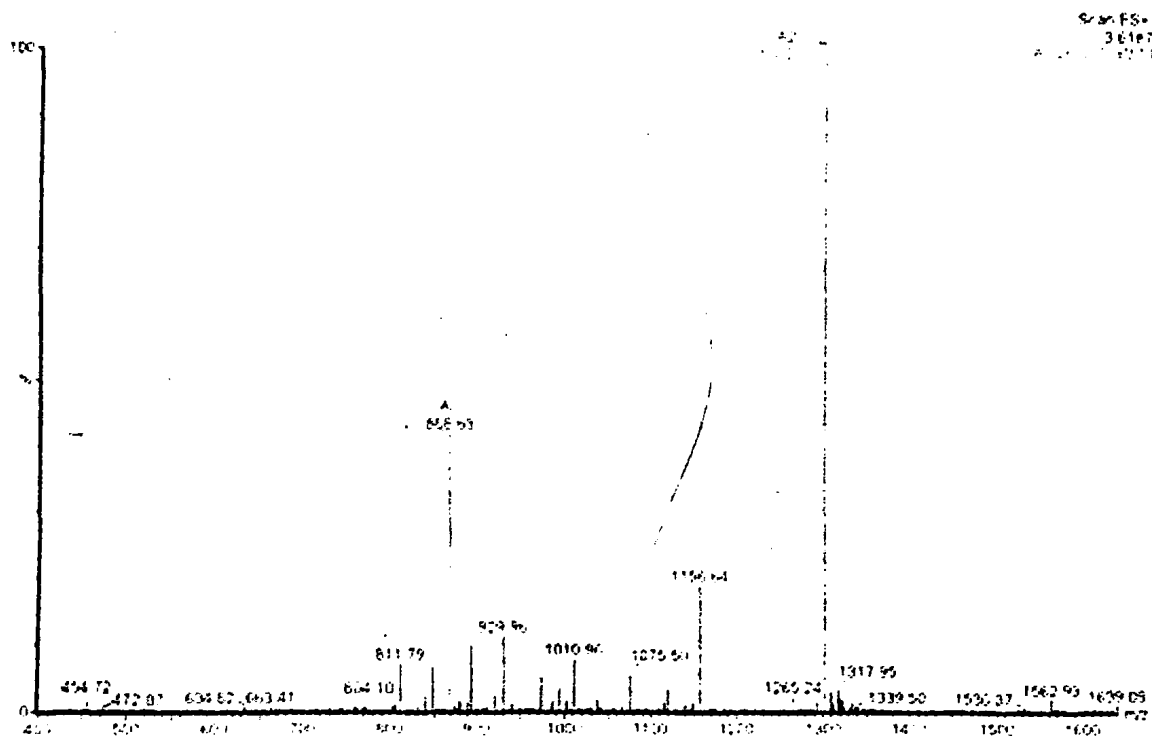
3,43 mg (2,5 μmol) N^{ϵ} -αμινοοξυακετυλιωμένου φορέα $\text{SOC}_4\text{-I}$ διαλύονται σε 0,25 ml ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος-οξικού νατρίου 0,1M, pH 4 σε σφαιρική φιάλη η οποία είναι τοποθετημένη σε υδατόλουτρο (35-40°C). Στο υπό ανάδευση διάλυμα προστίθεται στάγδην διάλυμα 6'-σιαλυλ-λακτόζης (5 mg, 7,68 μmol) σε 0,25 ml ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος-οξικού νατρίου 0,1M, pH 4.

Η εξέλιξη της αντίδρασης ελέγχεται με φασματομετρία μάζας ESI MS. 48 ώρες μετά την έναρξη, το μίγμα της αντίδρασης αραιώνεται με ποσότητα $\text{H}_2\text{O}/0,1\%\text{TFA}$ και το επιθυμητό γλυκοπεπτίδιο 4 απομονώνεται με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC χρησιμοποιώντας βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης 10% έως 30% $\text{CH}_3\text{CN}/0,1\%\text{TFA}$ σε

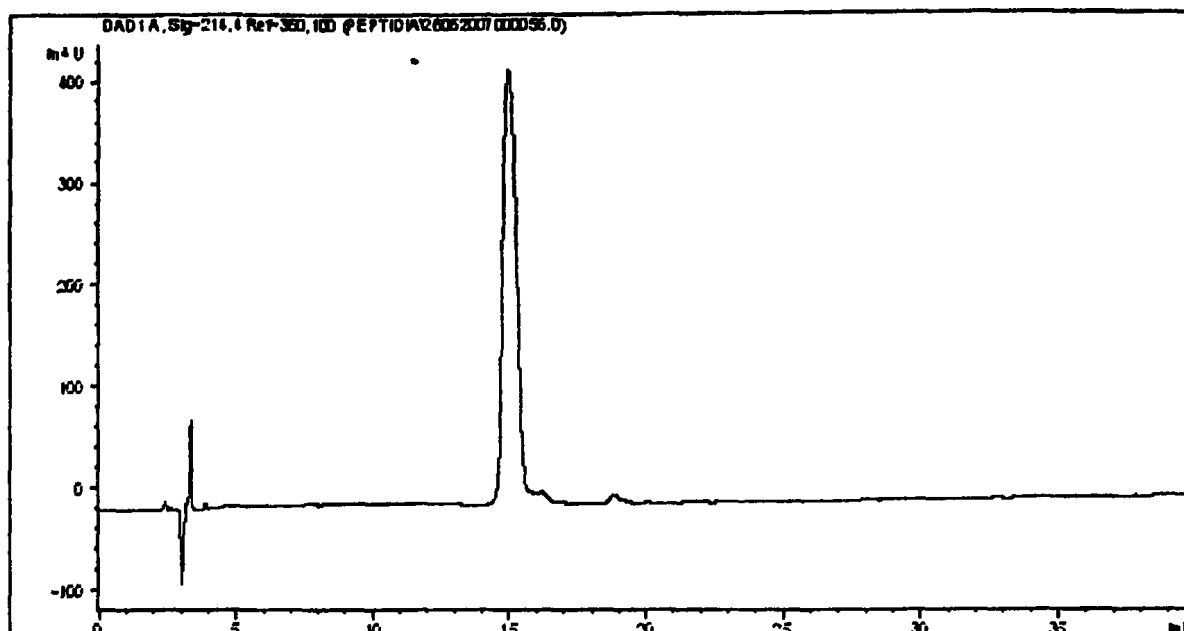


H₂O/0.1%TFA με ταχύτητα ροής 4.7ml/min για 40 min, ανίχνευση στα 214nm (απόδοση 29%).

Η ταυτοποίηση του επιθυμητού προϊόντος έγινε με φασματομετρία μάζας ESI-MS (Σχήμα 7) ενώ η καθαρότητα επιβεβαιώθηκε με αναλυτική RP-HPLC (Σχήμα 8).



Σχήμα 7. Φάσμα μάζας ESI του καθαρού γλυκοπεπτιδίου $Ac-SOC_4[Ac_2, (6'SL-Aoa)_2]-NH_2$. Ευρεθέν μοριακό βάρος 2602,73, υπολογισθέν μοριακό βάρος 2601,65.



Σχήμα 8. Χρωματογράφημα Αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού γλυκοπεπτιδίου $Ac-SOC_4[Ac_2, (6'SL-Aoa)_2]-NH_2$. Βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης 10% έως 50% $CH_3CN/0.1\%TFA$ σε $H_2O/0.1\%TFA$, ταχύτητα ροής 1ml/min για 30 min, ανίχνευση στα 214nm.

Τέλος, στον πίνακα 1 συνοψίζονται οι αποδόσεις σύνθεσης των γλυκοπεπτιδικών αναλόγων που παρασκευάστηκαν σε υγρή φάση με χημειοεκλεκτική αντίδραση σχηματισμού δεσμού οξίμης

Πίνακας 1. Απόδοση σύνθεσης των γλυκοπεπτιδικών αναλόγων που παρασκευάστηκαν σε υγρή φάση με χημειοεκλεκτική αντίδραση σχηματισμού δεσμού οξίμης

Γλυκοπεπτιδικό ανάλογο	ΑΠΟΔΟΣΗ ΣΥΝΘΕΣΗΣ
$H-SOC_4(SA-Aoa)_4-NH_2$	25 %
$Ac-SOC_4[Ac_2, (SA-Aoa)_2]-NH_2$	56 %
$Ac-SOC_4[Ac_2, (3'SL-Aoa)_2]-NH$	18 %
$Ac-SOC_4[Ac_2, (6'SL-Aoa)_2]-NH_2$	29 %



Διαμορφωτική μελέτη των γλυκοπεπτιδικών αναλόγων
με φασματοσκοπία Κυκλικού Διχρωϊσμού

Εισαγωγή

Τα φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού των γλυκοπεπτιδικών αναλόγων Ac-SOC₄[Ac₂, (SA-Aoa)₂]-NH₂ και Ac-SOC₄[Ac₂, (6'SL-Aoa)₂]-NH₂ καθώς και του Ac-SOC₄(Ac₂, Aoa₂)-NH₂ (N^ε-αμινοοξυακέτυλο φορέας SOC₄-I) ελήφθησαν σε φασματοφωτόμετρο Jasco J-815 στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Για τη μελέτη των διαμορφωτικών ιδιοτήτων των γλυκοπεπτιδικών αναλόγων και του N^ε-αμινοοξυακέτυλο φορέα SOC₄-I η συγκέντρωση των πεπτιδίων ήταν 100 μΜ σε:

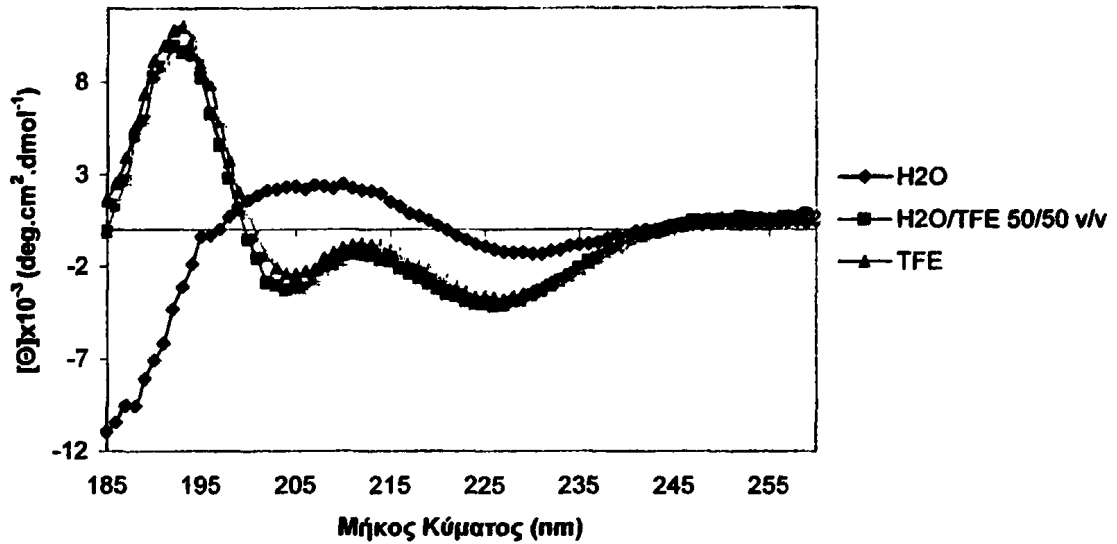
- H₂O
- H₂O/TFE 50/50 (v/v)
- TFE

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε κυψελίδα μήκους διαδρομής 0.1 cm και σε θερμοκρασία 20° C. Η λήψη κάθε φάσματος έγινε στην περιοχή 260-185 nm, ανά 0,2 nm, με επισώρευση (accumulation) 3 σαρώσεις. Η ευαισθησία (sensitivity) που επιλέχθηκε ήταν 100 mdeg, η ταχύτητα σάρωσης (scanning) 50 nm/min, η απόκριση (response) 1 sec και το εύρος ζώνης (band width) 1 nm.

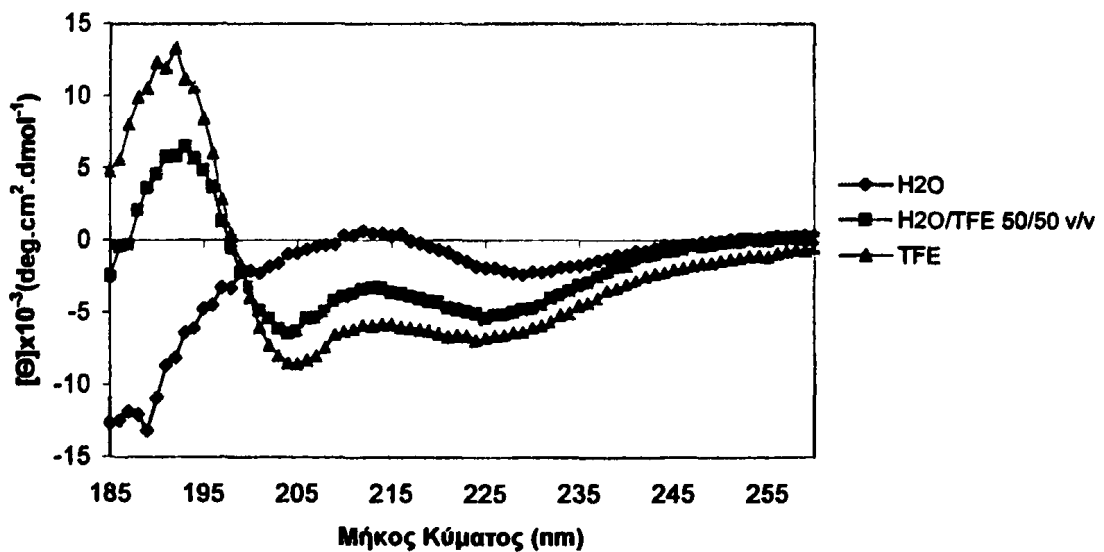
Τα δεδομένα που προέκυψαν από τα πειράματα κυκλικού διχρωϊσμού αναλύθηκαν με το υπολογιστικό πρόγραμμα CDNN, το οποίο παρέχει μια εκτίμηση του ποσοστού κατά το οποίο κάθε δευτεροταγής δομή (έλικα, παράλληλο και αντιπαράλληλο φύλλο, β-στροφή, τυχαία διαμόρφωση) συνεισφέρει στην τελική διαμόρφωση του κάθε μορίου.

Φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού των γλυκοπεπτιδικών αναλόγων και του N^E-αμινοοξυ-ακέτυλο φορέα SOC₄-I

Στα σχήματα 1-3 απεικονίζονται τα φάσματα CD των γλυκοπεπτιδικών αναλόγων και του N^E-αμινοοξυακέτυλο φορέα SOC₄-I στους διάφορους διαλύτες.

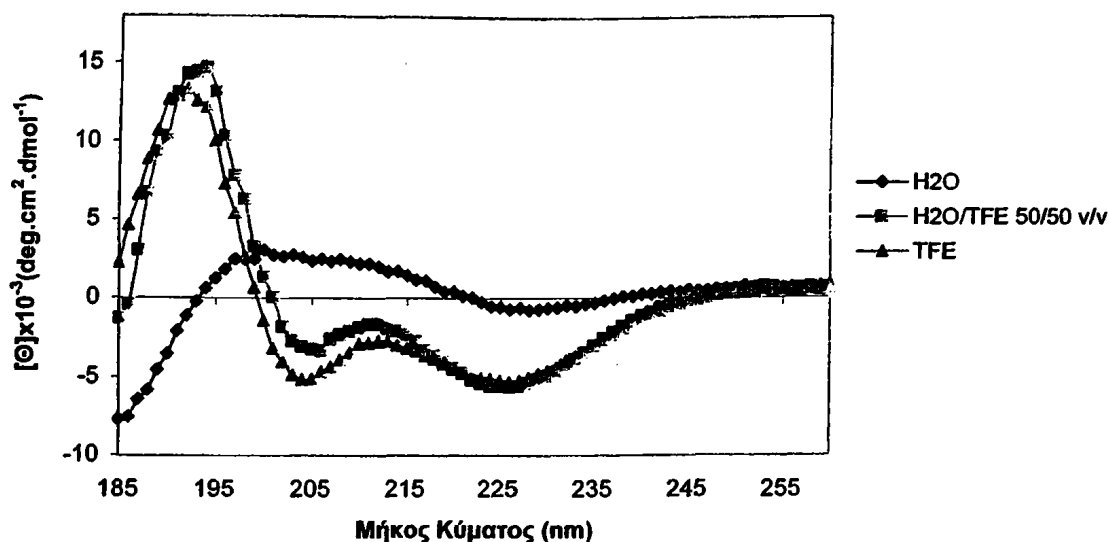


Σχήμα 1. Φάσματα CD του N^E-αμινοοξυακέτυλο φορέα SOC₄-I σε TFE, H₂O/TFE 50/50 (v/v) και H₂O (100 μM, 20°C)



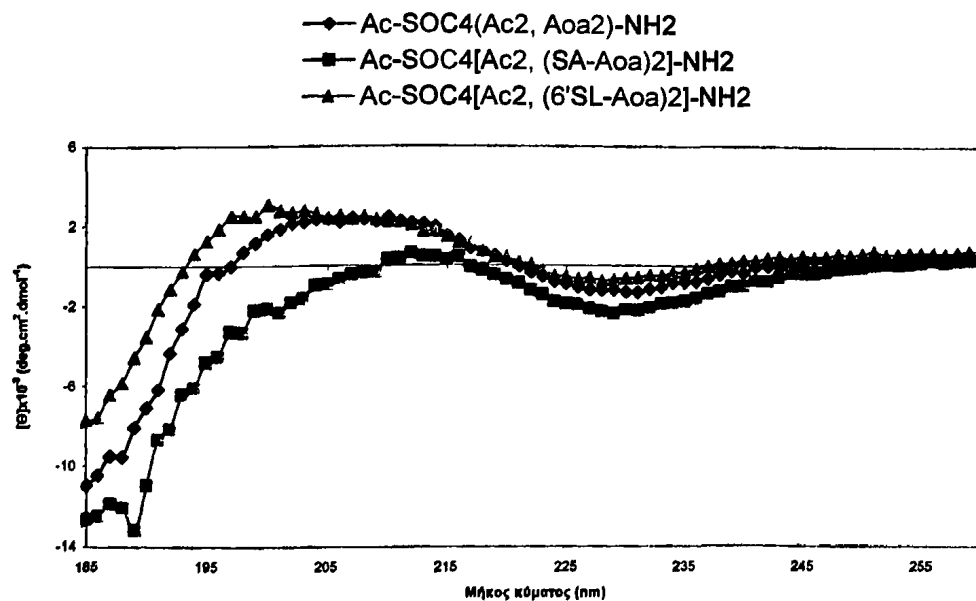
Σχήμα 2. Φάσματα CD του γλυκοπεπτιδικού αναλόγου Ac-SOC₄[Ac₂, (SA-Aoa)₂]-NH₂ σε TFE, H₂O/TFE 50/50 (v/v) και H₂O (100 μM, 20°C)



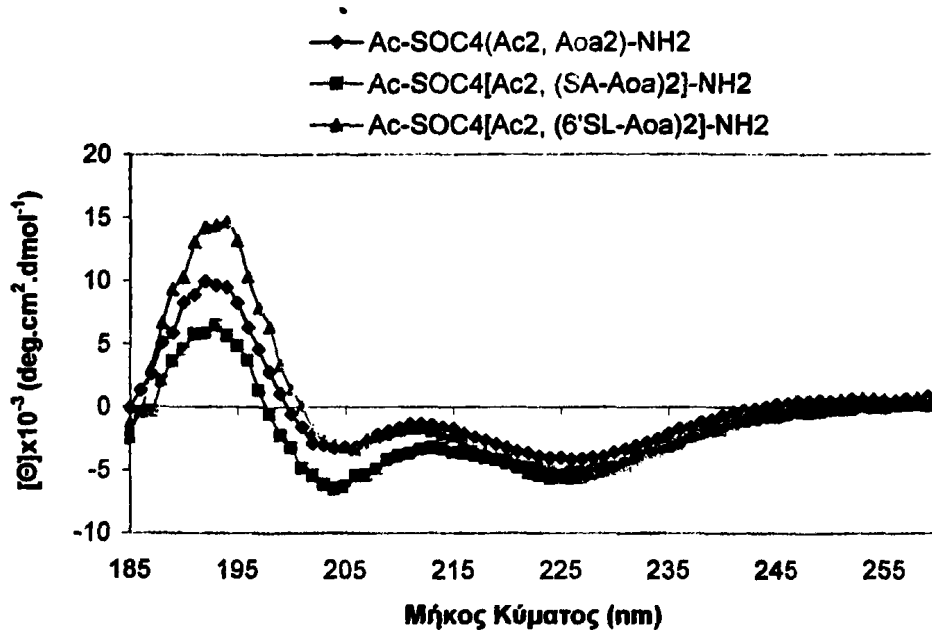


Σχήμα 3. Φάσματα CD του γλυκοπεπτιδικού αναλόγου $Ac-SOC_4[Ac_2, (6'SL-Aoa)_2]-NH_2$ σε TFE, H₂O/TFE 50/50 (v/v) και H₂O (100 μM, 20°C)

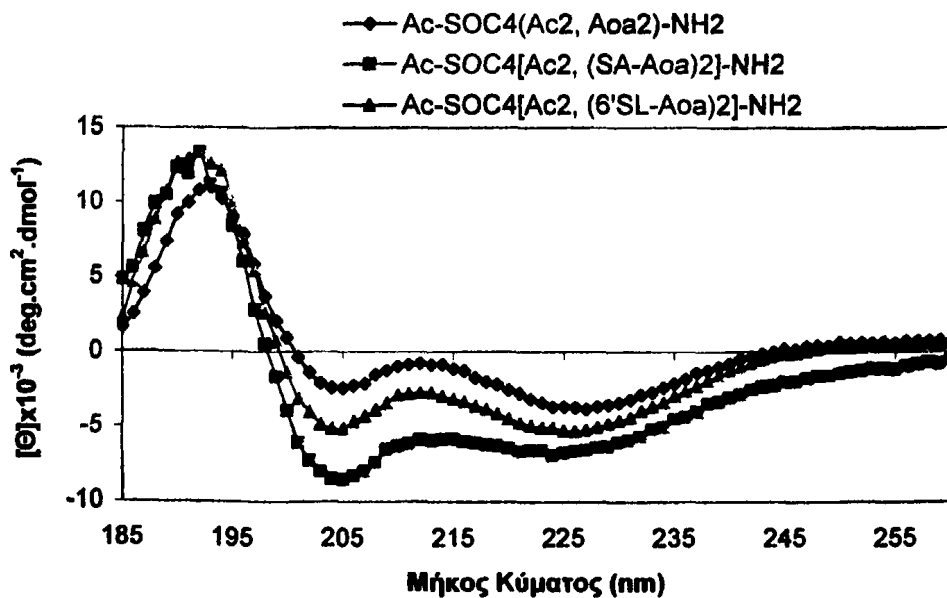
Στα σχήματα 4-6 απεικονίζονται τα φάσματα CD των γλυκοπεπτιδικών αναλόγων και του N^ε-αμινοοξακέτυλο φορέα SOC₄-I σε κάθε έναν από τους τρεις διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν.



Σχήμα 4. Φάσματα CD των γλυκοπεπτιδικών αναλόγων και του N^ε-αμινοοξακέτυλο φορέα SOC₄-I σε H₂O



Σχήμα 5. Φάσματα CD των γλυκοπεπτιδικών αναλόγων και του N^{ϵ} -αμινοοξυακετύλο φορέα SOC_4-I σε H_2O/TFE 50/50 (v/v)



Σχήμα 6. Φάσματα CD των γλυκοπεπτιδικών αναλόγων και του N^{ϵ} -αμινοοξυακετύλο φορέα SOC_4-I σε TFE

Ανάλυση φασμάτων κυκλικού διχρωϊσμού

Για την ανάλυση των δεδομένων κυκλικού διχρωϊσμού των γλυκοπεπτιδικών αναλόγων και του N^ε-αμινοοξυακέτυλο φορέα SOC₄-I χρησιμοποιήθηκε το υπολογιστικό πρόγραμμα CDNN. Σύμφωνα με το πρόγραμμα αυτό, τα προς ανάλυση δεδομένα συγκρίνονται με μια σειρά δεδομένων φασμάτων αναφοράς. Τα φάσματα αναφοράς είναι δεδομένα κυκλικού διχρωϊσμού γνωστών πρωτεϊνών. Ο χρήστης μπορεί να επιλέξει μεταξύ τριών ομάδων βασικών φασμάτων, ανάλογα με την πολυπλοκότητα του προς ανάλυση δείγματος. Το αποτέλεσμα της εφαρμογής αυτού του προγράμματος είναι η παροχή των ποσοστών κατά τα οποία η κάθε δευτεροταγής δομή συνεισφέρει στην τελική διαμόρφωση του μορίου. Τα ποσοστά αυτά θεωρούνται ενδεικτικά καθώς αποτελούν συνισταμένη διαφόρων παραγόντων, όπως το εύρος μήκους κύματος που λαμβάνεται υπόψη, το μοριακό βάρος του μορίου που αναλύεται (πρωτεΐνη, πολυπεπίδιο, πεπίδιο), ο αριθμός των πρωτεϊνών της βάσης δεδομένων που χρησιμοποιείται για την ανάλυση, η απόκλιση του αθροίσματος των δομών από το 100%.

Λαμβάνοντας υπόψη τις παραπάνω παραμέτρους, στους πίνακες που ακολουθούν (Πίνακες 1-3) δίνονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης των φασμάτων κυκλικού διχρωϊσμού των γλυκοπεπτιδικών αναλόγων και του N^ε-αμινοοξυακέτυλο φορέα SOC₄-I.

Πίνακας 1. Ποσοστά δευτεροταγών δομών για τον N^ε-αμινοοξυακέτυλο φορέα SOC₄-I, όπως προκύπτουν μετά από επεξεργασία των δεδομένων κυκλικού διχρωϊσμού με το υπολογιστικό πρόγραμμα CDNN

	H ₂ O	H ₂ O/TFE 50/50 v/v	TFE
	185-260 nm	185-260 nm	185-260 nm
έλικα	9.1 %	13.7 %	13.7 %
αντιπαράλληλο φύλλο	23.7 %	37.6 %	43.6 %
παράλληλο φύλλο	3.6 %	3.8 %	3.9 %
β-στροφή	19.8 %	25.4 %	24.1 %
τυχαία διαμόρφωση	39.8 %	24.4 %	22.5 %
άθροισμα	95.9 %	104.9 %	107.8 %

Από τον Πίνακα 1 προκύπτει ότι στο H₂O ο N^ε-αμινοοξυακέτυλο φορέας SOC₄-I χαρακτηρίζεται κυρίως από τυχαία διαμόρφωση με μεγάλη συνεισφορά αντιπαράλληλου φύλλου, ενώ το ποσοστό έλικας εκτιμάται στο 9%. Σε μίγμα H₂O/TFE 50/50 (v/v) κυριαρχεί η διαμόρφωση αντιπαράλληλου φύλλου, ενώ αυξάνεται το ποσοστό έλικας στο 14%.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα ποσοστά αυτά δεν μεταβάλλονται ακόμα και στο 100% TFE.

Πίνακας 2. Ποσοστά δευτεροταγών δομών για το γλυκοπεπτιδικό ανάλογο Ac-SOC₄[Ac₂, (SA-Aoa)₂]-NH₂, όπως προκύπτουν μετά από επεξεργασία των δεδομένων κυκλικού διχρωϊσμού με το υπολογιστικό πρόγραμμα CDNN

	H ₂ O	H ₂ O/TFE 50/50 v/v	TFE
	185-260 nm	185-260 nm	185-260 nm
<i>έλικα</i>	9.5 %	13.7 %	19.1 %
<i>αντιπαράλληλο φύλλο</i>	14.4 %	30.3 %	23.4 %
<i>παράλληλο φύλλο</i>	3.4 %	3.4 %	4.8 %
<i>β-στροφή</i>	23.0 %	27.9 %	25.7 %
<i>τυχαία διαμόρφωση</i>	45.6 %	27.0 %	26.3 %
<i>άθροισμα</i>	95.8 %	102.3 %	99.2 %

Από τον Πίνακα 2 προκύπτει, ομοίως, ότι στο H₂O το γλυκοπεπτιδικό ανάλογο Ac-SOC₄[Ac₂, (SA-Aoa)₂]-NH₂ χαρακτηρίζεται κυρίως από τυχαία διαμόρφωση ενώ το ποσοστό έλικας εκτιμάται στο 10%. Σε μίγμα H₂O/TFE 50/50 (v/v) κυριαρχεί η διαμόρφωση αντιπαράλληλου φύλλου, ενώ αυξάνεται το ποσοστό έλικας στο 14%. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι, σε αντίθεση με ότι παρατηρείται στον N^ε-αμινοοξυακέτυλο φορέα SOC₄-I (Πίνακας 1), τα ποσοστά των δομών μεταβάλλονται σε 100% TFE έτσι ώστε η έλικα του γλυκοπεπτιδίου αυτού ενισχύεται (19%), ενώ συμμετέχουν σε ίσα ποσοστά όλες οι υπολοιπες δομές.

Πίνακας 3. Ποσοστά δευτεροταγών δομών για το γλυκοπεπτιδικό ανάλογο Ac-SOC₄[Ac₂, (6'SL-Aoa)₂]-NH₂ όπως προκύπτουν μετά από επεξεργασία των δεδομένων κυκλικού διχρωϊσμού με το υπολογιστικό πρόγραμμα CDNN

	H ₂ O	H ₂ O/TFE 50/50 v/v	TFE
	185-260 nm	185-260 nm	185-260 nm
<i>έλικα</i>	9.0 %	18.0 %	16.8 %
<i>αντιπαράλληλο φύλλο</i>	33.8 %	25.9 %	29.9 %
<i>παράλληλο φύλλο</i>	3.7 %	4.2 %	4.4 %
<i>β-στροφή</i>	19.0 %	25.8 %	25.4 %
<i>τυχαία διαμόρφωση</i>	34.3 %	25.2 %	25.0 %
<i>άθροισμα</i>	99.8 %	99.1 %	101.5 %



Από τον Πίνακα 3 προκύπτει ότι στο H₂O το γλυκοπεπτιδικό ανάλογο Ac-SOC₄[Ac₂, (6'SL-Aoa)₂]-NH₂ διατηρεί ακόμα ποσοστό έλικας 9% ενώ χαρακτηρίζεται από ίσα περίπου ποσοστά αντιπαράλληλου φύλλου και τυχαίας διαμόρφωσης. Σε μίγμα H₂O/TFE 50/50 (v/v) τα ποσοστά των διαφόρων δομών είναι περίπου ίσα ενώ το ποσοστό έλικας αυξάνεται στο 18%. Σε 100% TFE τα ποσοστά αυτά δεν μεταβάλλονται σημαντικά.

Βιολογικά Πειράματα – Αξιολόγηση Βιολογικών Αποτελεσμάτων

Εισαγωγή

Τα βιολογικά πειράματα της παρούσας διατριβής διεξήχθησαν: στο Ινστιτούτο Βιοϊατρικής Έρευνας Georg-Spreyer-Haus στη Φρανκφούρτη (Γερμανία), από τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Thomas Haarmann, υπό την επίβλεψη της Δρ. Ursula Dietrich, στο Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA) στη Βαρκελώνη (Ισπανία), από τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Julia Vergara υπό την επίβλεψη του Δρ. Ayub Darji, και στο Ινστιτούτο Ανοσολογίας του Ομοσπονδιακού Ερευνητικού Ινστιτούτου για την Υγεία των Ζώων (Federal Research Institute for Animal Health) Friedrich-Loeffler-Institute στο Τόβινγκεν (Γερμανία), από την Karoline Droebner, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Oliver Planz, και αποτελούν αντικείμενο συνεργασίας του Ερευνητικού Εργαστηρίου Χημείας Πεπτιδίων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων με τα παραπάνω Ινστιτούτα στα πλαίσια Ευρωπαϊκού Ερευνητικού Προγράμματος.

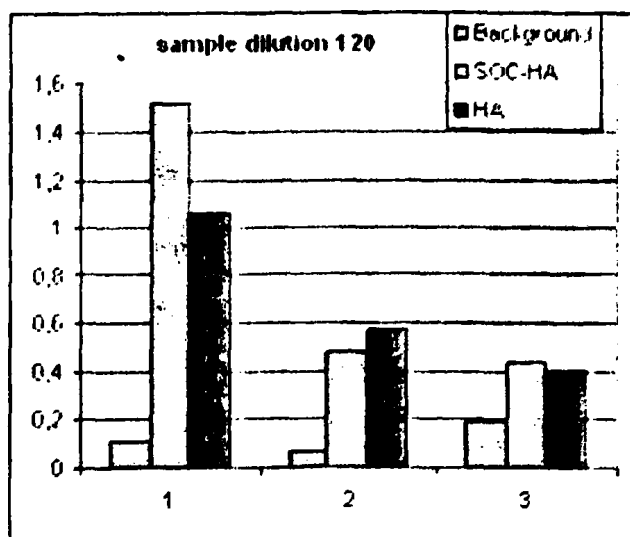
Διερεύνηση της ικανότητας αναγνώρισης του συμπλέγματος Ac-SOC₄-[Ac₂, (H5VIN1cor 54-69)₂]-OH από αντι-H5 AIV και αντι-H6 AIV ορούς μολυσμένων κοτόπουλων

Με σκοπό την επιβεβαίωση του H5VIN1cor54-69 ως διατηρημένου T-επιτόπου της πρωτεΐνης H5 του ιού της γρίπης, ελέγχθηκε η ικανότητα αναγνώρισής του από αντι-ορούς κοτόπουλων μολυσμένων με στελέχη H5 και H6 ιού γρίπης των πτηνών.

Πιο αναλυτικά, το σύμπλεγμα Ac-SOC₄-[Ac₂, (H5VIN1cor54-69)₂]-OH, στο οποίο ο επίτοπος H5VIN1cor54-69 έχει προσδεθεί σε δυο αντίγραφα στο φορέα SOC₄-I, καθώς επίσης και ο επίτοπος H5VIN1cor54-69, δοκιμάστηκαν σε πείραμα ELISA ως προς την ικανότητά τους να αναγνωρίζονται από ορούς κοτόπουλων μολυσμένων με ιό της γρίπης H5 και H6. Ως control χρησιμοποιήθηκε ο φορέας SOC.

Τα αποτελέσματα του πειράματος ELISA φαίνονται στο σχήμα 1.





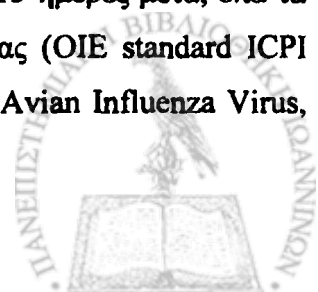
Σχήμα 1. Αποτελέσματα πειράματος ELISA αναγνώρισης του συμπλέγματος $Ac-SOC_4-[Ac_2, (H5VIN1cor54-69)_2]-OH$ και του επιτόπου $H5VIN1cor54-69$ από ορούς κοτόπουλων μολυσμένων με $H5$ και $H6$ ιό της γρίπης των πτηνών. 1: αντι- $H6$ αντισώματα, 2,3: αντι- $H5$ αντισώματα.

Όπως προκύπτει από το σχήμα 1, οι αντι-οροί που δοκιμάστηκαν αναγνωρίζουν τόσο τον επίτοπο $H5VIN1cor54-69$ όσο και το σύμπλεγμα του με το φορέα SOC_4-I , ενώ η εξειδίκευση της πρόσδεσης επιβεβαιώνεται από την ελάχιστη αναγνώριση του φορέα SOC_4-I (control). Επιπλέον, παρατηρείται ότι αντι- $H6$ οροί αναγνωρίζουν πιο ισχυρά τον επίτοπο $H5VIN1cor54-69$, και μάλιστα όταν αυτός είναι συνδεδεμένος στο φορέα SOC_4-I , από ότι τον αναγνωρίζουν οι αντι- $H5$ οροί.

Διερεύνηση της ανοσογονικότητας του επιτόπου $H5VIN1cor54-69$

Πείραμα ανοσοποίησης

Μια ομάδα 30 κοτόπουλων ηλικίας μιας ημέρας ανοσοποιήθηκαν με 2,5 μg ανοσοσυμπλέγματος $Ac-SOC_4-[Ac_2, (H5VIN1cor54-69)_2]-OH$ γαλακτοματοποιημένου σε ατελές ανοσοενισχυτικό Freund's (IFA), διαμέσου της ενδοδερμικής ή της ενδομυϊκής οδού. Μια άλλη ομάδα 10 κοτόπουλων ηλικίας μιας ημέρας συμπεριλήφθηκε στη μελέτη ως ομάδα ελέγχου, χωρίς να υποστεί οποιαδήποτε ανοσοποίηση (εμβολιασμό). 15 ημέρες μετά, όλα τα ζώα (ανοσοποιημένα και μη) μολύνθηκαν με το μετρίου παθογένειας (OIE standard ICPI index 1.2) στέλεχος X ID50 του $H5N2$ ιού της γρίπης των πτηνών (Avian Influenza Virus,



AIV). Η μόλυνση έγινε διαμέσου της ρινικής οδού και τα ζώα διατηρήθηκαν υπό παρατήρηση για αρκετές ημέρες. Το υικό φορτίο στην ρινοφαρυγγική κοιλότητα των ζώων παρακολουθήθηκε με RT-PCR μετά από νεκροψία σε προκαθορισμένα χρονικά σημεία, ενώ παρακολουθούνταν επίσης και η πορεία της ασθένειας στα κοτόπουλα με την πάροδο του χρόνου.

Αποτελέσματα

Τα κλινικά και ιστολογικά αποτελέσματα έδειξαν ότι όλα τα ανοσοποιημένα κοτόπουλα, από τη δεύτερη κιόλας ημέρα μετά τη μόλυνση με τον ιό της γρίπης H5N2, παρουσιάζουν τα συμπτώματα της νόσου (γρίπη), και μάλιστα πολύ έντονα (Πίνακας 1). Πιο συγκεκριμένα, τα ανοσοποιημένα ζώα εμφάνισαν αυξημένη νοσηρότητα, θνησιμότητα και ιική απέκκριση σε σχέση με τα μη-ανοσοποιημένα, καθώς επίσης ευρεία ιστική κατανομή του ιού και σοβαρή βλάβη σχεδόν όλων των ζωτικών οργάνων τους. Παράλληλα, αμέσως μετά τη μόλυνση – και ενώ έχουν παρέλθει 15 ημέρες από την ανοσοποίηση – σε κανένα από τα πειραματόζωα δεν ανιχνεύονται εξουδετερωτικά αντισώματα έναντι του ιού.

Πίνακας 1. Κλινικές ενδείξεις των πειραματόζωων όπως καταγράφονται σε διάφορες χρονικές στιγμές μετά την πρόκληση μόλυνσης με ιό γρίπης H5N2.

Τρόπος ανοσοποίησης	3 dpi			5 dpi		
	Clinical Score	Νοσηρότητα	Θνησιμότητα	Clinical Score	Νοσηρότητα	Θνησιμότητα
Ενδομυϊκά	1.2	7/15	0/15	2.4	13/15	5/15
Ενδοδερμικά	1.8	8/13	2/13	2.6	8/11	1/11
Μη-ανοσοποιημένα	0.5	3/10	0/10	0.6	2/10	1/10

Με άλλα λόγια, παρατηρείται ότι η ανοσοποίηση με το σύμπλεγμα Ac-SOC₄-[Ac₂, (H5VIN1cor54-69)₂]-OH προκαλεί ταχεία εκδήλωση και επιδείνωση της νόσου της γρίπης στα κοτόπουλα που μολύνθηκαν κατόπιν με τον ιό γρίπης H5N2. Ωστόσο, και παρά την έντονη εκδήλωση της νόσου, κάποια από τα ανοσοποιημένα ζώα κατάφεραν τελικά να ανακάμψουν και να επιζήσουν. Στα ζώα αυτά, 25 ημέρες μετά την ανοσοποίηση και 10 ημέρες μετά τη μόλυνση και ενώ έχουν νοσήσει αλλά τελικά επιζήσει, ανιχνεύονται εξουδετερωτικά αντισώματα έναντι του ιού της γρίπης. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι



τέτοια αντισώματα δεν ανιχνεύονται στα μη ανοσοποιημένα ζώα μετά την μόλυνση με τον ιό της γρίπης (ομάδα ελέγχου).

Από τα παραπάνω, καθίσταται σαφές ότι το σύμπλεγμα Ac-SOC₄-[Ac₂, (H5VIN1cor54-69)₂]-OH, όταν χρησιμοποιείται για την ανοσοποίηση κοτόπουλων, δεν επάγει προστατευτική ανοσολογική απόκριση έναντι του ιού της γρίπης, όπως αναμένετο, αλλά αυξάνει τη θνησιμότητα των πειραματόζωων, καθιστώντας τα πιο ευαίσθητα στη μόλυνση. Παρόλα αυτά, το γεγονός ότι τα πειραματόζωα που επέζησαν ανέπτυξαν αντισώματα κατά του ιού είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον και χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση. Αναμφίβολα, η ανοσοποίηση με το σύμπλεγμα Ac-SOC₄-[Ac₂, (H5VIN1cor54-69)₂]-OH εμπλέκεται στην υψηλή παθογένεια που αναπτύσσει ο ιός στα πειραματόζωα, έστω και αν προς το παρόν δεν καθίσταται δυνατή η ερμηνεία αυτού του φαινομένου.



Διερεύνηση της ανοσογονικότητας (προστατευτική ανοσία) σε ποντίκια, των επιτόπων T1, T3, T5 και T7 της H5 αιμοσυγκολλητίνης (HA) του ιού της γρίπης των πτηνών.

Εισαγωγή

Οι πεπτιδικές αλληλουχίες T1 (VLMENERTL), T3 (ASFFRNVVWL), T5 (FHDSNVKNL) και T7 (NFESNGNFI) της H5 HA προβλέφθηκαν με υπολογιστικές μεθόδους, βάσει της συγγένειάς τους για MHC I ποντικών, ως T-κυτταρικοί επίτοποι αυτής της πρωτεΐνης. Προκειμένου να διερευνηθεί η ανοσογονικότητα αυτών των πεπτιδίων και έτσι οι προτεινόμενες αλληλουχίες να επιβεβαιωθούν ως T-κυτταρικοί επίτοποι της πρωτεΐνης H5 HA, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοποίησης ποντικών με τα ανοσογονικά συμπλέγματα αυτών των πεπτιδίων στον ολιγοπεπτιδικό φορέα SOC₄-I.

Πείραμα ανοσοποίησης με τα SOC-συμπλέγματα των επιτόπων T1, T3, T5 και T7

Τέσσερις ομάδες από 6 θηλυκά BALB/c ποντίκια ανοσοποιήθηκαν, αντίστοιχα, με ένα από τα τέσσερα συμπλέγματα:

Ac-SOC₄[Ac₂, (T1)₂]-NH₂

Ac-SOC₄[Ac₂, (T3)₂]-NH₂

Ac-SOC₄[Ac₂, (T5)₂]-NH₂

Ac-SOC₄[Ac₂, (T7)₂]-NH₂

Την ημέρα 0, σε κάθε ποντίκι έγινε υποδόρια ανοσοποίηση με 50 μg από το αντίστοιχο ανοσοσύμπλεγμα, σε H₂O και Complete Freund's Adjuvant (CFA). Την 15^η και την 30^η ημέρα έγινε επαναληπτική ανοσοποίηση με 25 μg από το αντίστοιχο ανοσοσύμπλεγμα, σε H₂O και Incomplete Freund's Adjuvant (IFA). 15 ημέρες μετά την τρίτη ανοσοποίηση τα ζώα μολύνθηκαν ενδορινικά με 2 x 10³ pfu (10x LD₅₀) ιού γρίπης H5N1 (MB1). Τα ποσοστά επιβίωσης προσδιορίστηκαν μετά από μια περίοδο 14 ημερών. Ταυτόχρονα, πραγματοποιήθηκαν και πειράματα control, ανοσοποιώντας δυο ομάδες 6 ποντικών με φορέα SOC και adjuvant, αντίστοιχα, ενώ μελετήθηκε και μια ομάδα 6 ποντικών που δεν υποβλήθηκαν σε καμία ανοσοποίηση.



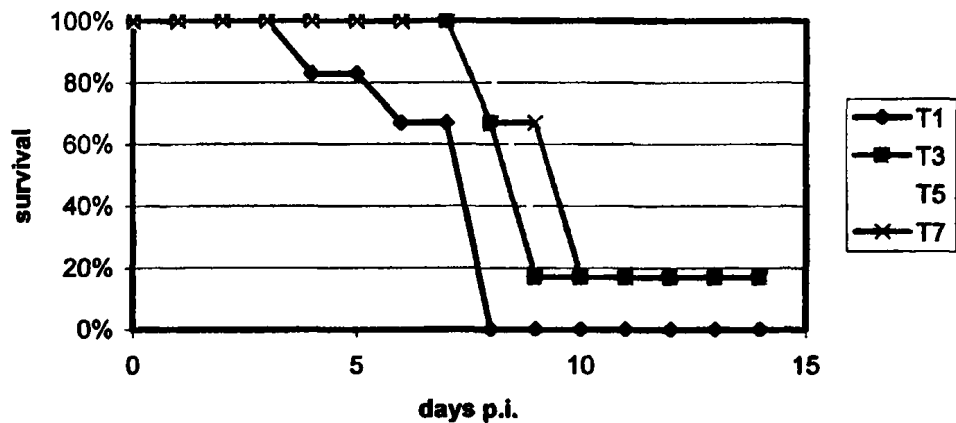
Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον Πίνακα 2 και στο Σχήμα 2 που ακολουθούν.

Πίνακας 2.

Αριθμός ανοσοποιημένων ποντικών που επιβίωσαν ή πέθαναν μετά από μόλυνση με H5N1 ιό γρίπης

Σύμπλεγμα ανοσοποίησης	Ζώα που πέθαναν	Ζώα που επέζησαν
Ac-SOC ₄ [Ac ₂ , (T1) ₂]-NH ₂	6	0
Ac-SOC ₄ [Ac ₂ , (T3) ₂]-NH ₂	5	1
Ac-SOC ₄ [Ac ₂ , (T5) ₂]-NH ₂	4	2
Ac-SOC ₄ [Ac ₂ , (T7) ₂]-NH ₂	5	1
Φορέας SOC ₄	2	4
Adjuvant	5	0
Control (χωρίς ανοσοποίηση)	6	0



Σχήμα 2. Εξέλιξη της μόλυνσης μετά από ανοσοποίηση με τα SOC-σμπλέγματα των επιτόπων T1, T3, T5 και T7

Από τον πίνακα 2 φαίνεται πως η ανοσοποίηση με τα παραπάνω συμπλέγματα δεν επιφέρει σημαντική προστασία των πειραματόζων (ποντίκια) έναντι της μόλυνσης από ιό γρίπης των πτηνών, καθώς τα ποσοστά θνησιμότητας που καταγράφηκαν κυμαίνονται από 67% έως 100%.

Ωστόσο, από το σχήμα 2, όπου καταγράφεται η εξέλιξη της μόλυνσης, παρατηρούνται τα εξής:

- τα ζώα που ανοσοποιήθηκαν με το σύμπλεγμα $\text{Ac-SOC}_4[\text{Ac}_2, (\text{T1})_2]\text{-NH}_2$ υπέκυψαν ταχύτερα στη νόσο και ήδη από την όγδοη ημέρα μετά την μόλυνση η θνησιμότητα έφτασε στο 100%.
- Τα ζώα που ανοσοποιήθηκαν με τα συμπλέγματα $\text{Ac-SOC}_4[\text{Ac}_2, (\text{T3})_2]\text{-NH}_2$ και $\text{Ac-SOC}_4[\text{Ac}_2, (\text{T7})_2]\text{-NH}_2$ κατέστησαν περισσότερα ανθεκτικά έναντι της μόλυνσης με τον ιό H5N1, καθώς θνησιμότητα άρχισε να καταγράφεται όχι νωρίτερα από την όγδοη ημέρα μετά την μόλυνση, ακολουθώντας όμως μια ταχεία επιδείνωση καθώς μέσα σε μια ημέρα το 83% των ζώων είχε υποκύψει.
- Τέλος, τα ζώα που ανοσοποιήθηκαν με το σύμπλεγμα $\text{Ac-SOC}_4[\text{Ac}_2, (\text{T5})_2]\text{-NH}_2$ εκδήλωσαν σε κάποιο βαθμό ανθεκτικότητα έναντι της μόλυνσης καθώς η θνησιμότητα, που άρχισε να καταγράφεται την έβδομη ημέρα μετά την μόλυνση από τον ιό, περιορίστηκε σε ποσοστό 67%. Τα δυο από τα έξι ζώα της ομάδας αυτής που κατόρθωσαν να επιβιώσουν φαίνεται πως ανέπτυξαν προστατευτική ανοσία έναντι του ιού της γρίπης H5N1 ύστερα από την ανοσοποίησή τους με το σύμπλεγμα του επιτόπου T5.

Μελέτη πρόσδεσης των γλυκοπεπτιδικών αναλόγων του σιαλο-υποδοχέα στην πρωτεΐνη αιμοσυγκολλητίνη H5 του ιού της γρίπης

Εισαγωγή

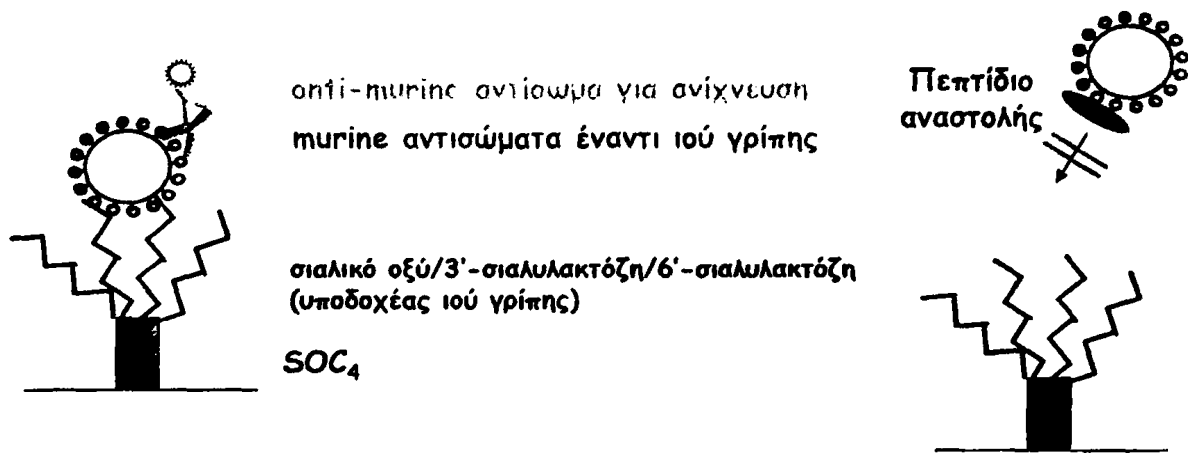
Τα γλυκοπεπτιδικά ανάλογα $\text{H-SOC}_4(\text{SA-Aoa})_4\text{-NH}_2$, $\text{Ac-SOC}_4[\text{Ac}_2, (\text{SA-Aoa})_2]\text{-NH}_2$, $\text{Ac-SOC}_4[\text{Ac}_2, (3'\text{SL-Aoa})_2]\text{-NH}_2$ και $\text{Ac-SOC}_4[\text{Ac}_2, (6'\text{SL-Aoa})_2]\text{-NH}_2$ σχεδιάστηκαν ως μοντέλα του σιαλο-υποδοχέα της HA του ιού της γρίπης και χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα για την ανάπτυξη μιας στερεάς φάσης δοκιμασίας πρόσδεσης (ELISA) που θα επέτρεπε, αφενός, την ταχεία ανίχνευση του ιού της γρίπης και, αφετέρου, την διάκριση μεταξύ ιών γρίπης πτηνών και μεταλλαγμένων ιών γρίπης πτηνών, ικανών να προσδένονται και στον ανθρώπινο υποδοχέα. Επιπλέον, αυτή η τεχνική ELISA σχεδιάστηκε με στόχο να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση πεπτιδικών αναστολέων της πρόσδεσης του ιού της γρίπης στον σιαλο-υποδοχέα του κυττάρου-ξενιστή.

Πειραματική πορεία

Στο σχήμα 3 απεικονίζεται η αρχή μεθόδου του πειράματος ELISA που αναπτύχθηκε. Σύμφωνα με αυτό, το κάθε γλυκοπεπτιδικό ανάλογο επιστρώνεται στο πλακίδιο και επωάζεται με ψευδοϊκά σωματίδια ιού γρίπης, κατασκευασμένα εργαστηριακά να φέρουν



διάφορους συνδυασμούς αιμοσυγκολλητίνης, νευραμινιδάσης και matrix πρωτεϊνών ιού γρίπης των πτηνών ή των ανθρώπων. Στη συνέχεια, γίνεται επώαση με αντισώματα έναντι ιού γρίπης και, κατόπιν, επώαση με επισημασμένο με ένζυμο αντι-αντίσωμα για ανίχνευση. Τέλος, προστίθεται το ενζυμικό υπόστρωμα και μετράται η απορρόφηση του χρωμοφόρου προϊόντος της ενζυμικής αντίδρασης στα 450nm. Η ενζυμική δράση, που εκφράζεται με το μέγεθος της απορρόφησης, είναι ανάλογη της ποσότητας του αντισώματος που συνδέθηκε με το αντιγόνο (ψευδοϊός γρίπης) η οποία κατ' επέκταση εκφράζει την συγγένεια του ιού (για την ακρίβεια την συγγένεια της HA του ιού) για τον σιαλο-υποδοχέα (γλυκοπεπτιδικό ανάλογο).



Σχήμα 3. Αρχή μεθόδου της ELISA τεχνικής που αναπτύχθηκε για τον έλεγχο πρόσδεσης ψευδοϊικών σωματιδίων ιού γρίπης στα γλυκοπεπτιδικά ανάλογα του σιαλο-υποδοχέα.

Αποτελέσματα

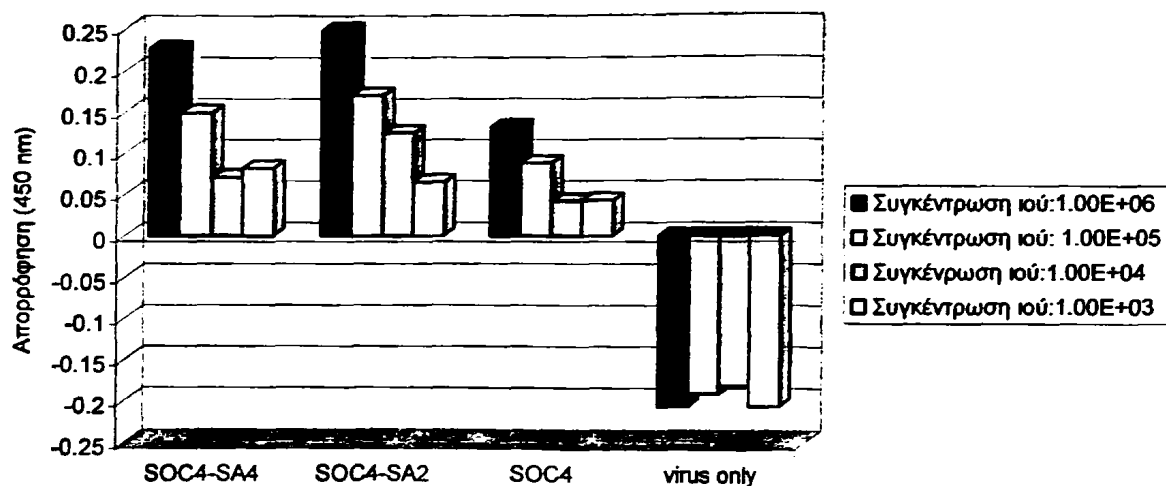
Αρχικά, δοκιμάστηκαν με την παραπάνω τεχνική τα ανάλογα H-SOC₄(SA-Aoa)₄-NH₂ και Ac-SOC₄[Ac₂, (SA-Aoa)₂]-NH₂. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε φορέας SOC₄-I που δε φέρει το σιαλικό οξύ στην ε-αμινομάδα των λυσινών αυτού, ενώ οι τελικές τιμές προκύπτουν ύστερα από αφαίρεση του τυφλού. Τα πρώτα πειραματικά αποτελέσματα παρατίθενται στο σχήμα 4.

Από το σχήμα 4 προκύπτουν τα εξής δεδομένα:

- η πρόσδεση των ψευδοϊικών σωματιδίων στα γλυκοπεπτιδικά ανάλογα εμφανίζεται ως μια εξαρτώμενη-από-τη-συγκέντρωση διαδικασία, που σημαίνει ότι όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του ιού που χρησιμοποιείται για επώαση με το ανάλογο του υποδοχέα, τόσο μεγαλύτερη πρόσδεση παρατηρείται μεταξύ τους



- δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στην πρόσδεση του ιού στο ανάλογο $H-SOC_4(SA-Aoa)_4-NH_2$ σε σχέση με το ανάλογο $Ac-SOC_4[Ac_2, (SA-Aoa)_2]-NH_2$
- ο φορέας SOC_4-I , που δε φέρει το σιαλικό οξύ στην ε-αμινομάδα των λυσινών αυτού και που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας, προσδένεται με τα ψευδοϊκά σωματίδια, αν και σε μικρότερο βαθμό.



Σχήμα 4. Σχηματική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της ELISA δοκιμασίας πρόσδεσης ψευδοϊού γρίπης στα ανάλογα $H-SOC_4(SA-Aoa)_4-NH_2$ και $Ac-SOC_4[Ac_2, (SA-Aoa)_2]-NH_2$ του σιαλο-υποδοχέα, για διάφορες συγκεντρώσεις προστιθέμενου ιού.

Αν και προκαταρκτικά, τα παραπάνω αποτελέσματα κρίνονται ενθαρρυντικά και για το λόγο αυτό αποφασίστηκε να βελτιωθεί η ευαισθησία και η αποτελεσματικότητα της τεχνικής, δοκιμάζοντας τα ανάλογα $Ac-SOC_4[Ac_2, (3'SL-Aoa)_2]-NH_2$ και $Ac-SOC_4[Ac_2, (6'SL-Aoa)_2]-NH_2$. Τα ανάλογα αυτά προσομοιάζουν καλύτερα τον υποδοχέα των πτηνών και των ανθρώπων, αντίστοιχα, καθώς φέρουν τον χαρακτηριστικό α2,3 ή α2,6 γλυκοζιτικό δεσμό μεταξύ σιαλικού οξέος και γαλακτόζης, που διαφοροποιεί τους δυο υποδοχείς μεταξύ τους. Τα πειράματα ELISA με αυτά τα ανάλογα είναι σε εξέλιξη.

Τα πρόσφατα ξεσπάσματα ιού γρίπης των πτηνών υψηλής παθογένειας H5N1 έχουν λάβει παγκόσμιες διαστάσεις. Παράλληλα με την εξάπλωση αυτού του ιού των πτηνών σε οικόσιτα πουλερικά και άγρια υδρόβια πουλιά σε Ασία, Ευρώπη και Αφρική, εκατοντάδες ανθρώπινα κρούσματα έχουν επιβεβαιωθεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, ενώ τα περισσότερα από αυτά ήταν θανατηφόρα. Επιπλέον, ο ιός έχει επίσης εξαπλωθεί και σε άλλα θηλαστικά, όπως οι γάτες, ενώ αν αποκτήσει την ικανότητα να μεταδίδεται εύκολα μεταξύ των ανθρώπων, οι ιατρικές και οικονομικές συνέπειες μιας ενδεχόμενης πανδημίας θα είναι καταστρεπτικές. Κατά συνέπεια, η ανάγκη για αποτελεσματικές διαγνωστικές μεθόδους, εμβόλια και νέα αντι-ϊικά φάρμακα έναντι του υποτύπου H5N1 του ιού της γρίπης καθίσταται επείγουσα και επιβεβλημένη.

-Η παρούσα διατριβή πραγματεύεται τη σύνθεση μακρομοριακών πεπτιδικών συμπλεγμάτων διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής, αφενός μεν για την ανάπτυξη εμβολίου έναντι της μόλυνσης από ιό γρίπης των πτηνών, αφετέρου δε για την ανάπτυξη διαγνωστικής μεθοδολογίας ανίχνευσης του ιού της γρίπης των πτηνών.

Τα συμπλέγματα που σχεδιάστηκαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής βασίστηκαν στις καλά μελετημένες ιδιότητες του επαναλαμβανόμενου ολιγοπεπτιδικού φορέα SOC₄-I. Ο φορέας αυτός αποτελεί ιδανικό υπόστρωμα για την πρόσδεση πεπτιδικών επιτόπων από την ε-αμινομάδα των λυσινών αυτού και, επιπλέον, έχει βρεθεί ότι υιοθετεί κανονική δευτεροταγή δομή (κεκαμένη 3₁₀ έλικα) η οποία επιτρέπει στα προσδεδεμένα σε αυτόν πεπτίδια να μην αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, ούτε με το μόριο του φορέα και να διατηρούν την αρχική, ενεργό τους διαμόρφωση. Έτσι ο ελικοειδής χαρακτήρας των SOC-συμπλεγμάτων είναι προϋπόθεση τόσο για την ανάπτυξη ανοσοδιαγνωστικών τεχνικών, όσο και αποτελεσματικών ανοσοποιήσεων. Δεδομένου, επίσης, ότι μικρά, γραμμικά πεπτίδια δεν είναι ικανά να επάγουν ισχυρές ανοσολογικές αποκρίσεις και για το λόγο αυτό απαιτείται η πρόσδεσή τους σε μόρια-φορείς, καθίσταται σαφές ότι ο φορέας SOC₄-I ικανοποιεί αυτήν την απαίτηση και οδηγεί στη λήψη ιδιαίτερα σταθερών μακρομοριακών συμπλεγμάτων, ενισχύοντας την ανοσογονικότητα των προσδεδεμένων επιτόπων και οδηγώντας στην ανάπτυξη ισχυρών εξειδικευμένων ανοσολογικών αποκρίσεων αυστηρώς έναντι αυτών των επιτόπων.

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, προβλέφθηκαν με υπολογιστικές τεχνικές, βάσει της συγγενείας τους για ΜΗC I ποντικών, συγκεκριμένες πεπτιδικές αλληλουχίες της πρωτεΐνης αιμοσυγκολλητίνης (HA) H5 του ιού της γρίπης των πτηνών, ως πιθανές αντιγονικές/ανοσογονικές περιοχές αυτής της πρωτεΐνης. Οι πεπτιδικές αυτές περιοχές προσδέθηκαν, σε δυο αντίγραφα η κάθε μια, στον επαναλαμβανόμενο oligοπεπτιδικό φορέα SOC₄-I και τα μακρομόρια που προέκυψαν δοκιμάστηκαν σε πειράματα ανοσοποιήσεων πειραματόζωων (ποντίκια) ως προς την ενδεχόμενη προστατευτική τους δράση (εμβόλια) έναντι μόλυνσης από ιό γρίπης των πτηνών.

Παράλληλα, ως προς το δεύτερο σκέλος του θέματος, επιχειρήθηκε η ανάπτυξη μιας διαγνωστικής δοκιμασίας ELISA που θα επέτρεπε, αφενός, τη γρήγορη ανίχνευση και, αφετέρου, τον έλεγχο εξειδίκευσης για υποδοχέα διαφόρων ιών γρίπης των πτηνών. Πιο συγκεκριμένα, η δοκιμασία αυτή, βασισμένη στη χρήση γλυκοπεπτιδικών μοντέλων που μιμούνται τον υποδοχέα του ξενιστή για τον ιό της γρίπης (συγκεκριμένα για την αιμοσυγκολλητίνη αυτού) σχεδιάστηκε ώστε να επιτρέπει τον έλεγχο πρόσδεσης ιών γρίπης σε αυτά τα μοντέλα, με σκοπό να καθίσταται δυνατή η διάκριση μεταξύ ιού γρίπης πτηνών και μεταλλαγμένου ιού γρίπης πτηνών ικανού να μολύνει και τον άνθρωπο. Είναι γνωστό ότι τον υποδοχέα του ιού της γρίπης συνιστούν σιαλικά οξέα oligοσακχαριτικών μονάδων επιφανειακών γλυκοπρωτεϊνών του ξενιστή, όπου αποτελούν το ελεύθερο άκρο του oligοσακχαρίτη και προσδέονται με το αμέσως προηγούμενο σάκχαρο, που είναι πάντα μια γαλακτόζη, μέσω α2,3 (υποδοχέας των πτηνών) ή α2,6 (ανθρώπινος υποδοχέας) γλυκοζιτικού δεσμού. Σε αυτήν την περίπτωση, ο επαναλαμβανόμενος oligοπεπτιδικός φορέας SOC₄-I χρησιμοποιήθηκε ως το «υπόστρωμα» για την πρόσδεση των σακχάρων, οδηγώντας στην ανάπτυξη των γλυκοπεπτιδομιμητικών μοντέλων του υποδοχέα.

Με βάση όλα τα παραπάνω, τα μακρομοριακά συμπλέγματα που συντέθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής είναι τα εξής:



Ανοσοσυμπλέγματα των επιτόπων της HA:

Πεπτιδικά ανάλογα	Μοριακό Βάρος (Da)
1 Ac-SOC ₄ [Ac ₂ , (H5VIN1cor54-69) ₂]-OH	4893,6
2 Ac-SOC ₄ {Ac ₂ , [T1(CH=N-O)] ₂ }-NH ₂	4051,7
3 Ac-SOC ₄ {Ac ₂ , [T3(CH=N-O)] ₂ }-NH ₂	4177,9
4 Ac-SOC ₄ {Ac ₂ , [T5(CH=N-O)] ₂ }-NH ₂	3847,3
5 Ac-SOC ₄ {Ac ₂ , [T7(CH=N-O)] ₂ }-NH ₂	3783,1

Τα παραπάνω μακρομόρια συντέθηκαν με ομοιοπολική πρόσδεση των επιλεγμένων περιοχών της HA στον τετραμερή ολιγοπεπτιδικό φορέα SOC₄-I, είτε με την κλασική βήμα προς βήμα συνθετική μεθοδολογία στερεάς φάσης (μακρομόριο 1), είτε μέσω χημειοεκλεκτικής αντίδρασης πρόσδεσης επιτόπων (σχηματισμός δεσμού οξίμης). Πιο συγκεκριμένα, η σύνθεση των μακρομορίων 2, 3, 4 και 5 πραγματοποιήθηκε σε υγρή φάση, σύμφωνα με τη μεθοδολογία χημειοεκλεκτικών αντιδράσεων σχηματισμού δεσμού οξίμης, μεταξύ του N^ε-αμινοοξυ-ακετυλιωμένου (στις λυσίνες 1 και 7) φορέα SOC₄-I Ac-SOC₄(Ac₂,Aoa₂)-NH₂ και ενός κάθε φορά εκ των αλδεϋδικών παραγώγων των επιτόπων T1 VLMENERTLK(CHOCO), T3 ASFFRNVVWLK(CHOCO), T5 FHDSNVKNLK(CHOCO) και T7 NFESNGNFIK(CHOCO) της αιμοσυγκολλητίνης H5, αντίστοιχα. Η αναλυτική πορεία σύνθεσης περιγράφεται στο Κεφάλαιο 12.

Τα μακρομόρια 1-5, με μοριακά βάρη που κυμαίνονται από 3,8kDa έως 4,9kDa, παρασκευάστηκαν γενικά σε καλές αποδόσεις και υψηλή καθαρότητα, με εξαίρεση το 1, που συντέθηκε βήμα προς βήμα σε στερεή φάση, σε συνολική απόδοση ~12%, καθώς και το 3, που συντέθηκε σε υγρή φάση μέσω σχηματισμού δεσμού οξίμης και το οποίο δεν κατέστη δυνατό να απομονωθεί σε καθαρή μορφή λόγω μεγάλης δυσδιαλυτότητας.

Συσχετίζοντας τις δυο μεθοδολογίες που ακολουθήθηκαν για τη σύνθεση μακρομοριακών συμπλεγμάτων διακλαδισμένης αρχιτεκτονικής, χρησιμοποιώντας τον συνθετικό ολιγοπεπτιδικό φορέα SOC₄-I, η μεθοδολογία χημειοεκλεκτικής πρόσδεσης επιτόπων μέσω δεσμού οξίμης αναδεικνύεται περισσότερο αποτελεσματική και λειτουργική για τη λήψη διακλαδισμένων πεπτιδίων σχετικά μεγάλου μοριακού βάρους, σε σχέση με τη χρονοβόρα και χαμηλής απόδοσης βήμα προς βήμα πεπτιδική σύνθεση.

Γλυκοπεπτιδομιμητικά μοντέλα του σιαλο-υποδοχέα της HA:

Γλυκοπεπτιδικά ανάλογα	Μοριακό Βάρος (Da)
1 H-SOC ₄ (SA-Aoa) ₄ -NH ₂	2555,6
2 Ac-SOC ₄ [Ac ₂ , (SA-Aoa) ₂]-NH ₂	1953,1
3 Ac-SOC ₄ [Ac ₂ , (3'SL-Aoa) ₂]-NH ₂	2601,7
4 Ac-SOC ₄ [Ac ₂ , (6'SL-Aoa) ₂]-NH ₂	2601,7

Τα παραπάνω γλυκοπεπτιδικά ανάλογα συντέθηκαν με ομοιοπολική πρόσδεση διαφόρων σιαλοσακχαριτών στον τετραμερή oligοπεπτιδικό φορέα SOC₄-I μέσω χημειοεκλεκτικής αντίδρασης (σχηματισμός δεσμού οξίμης). Πιο συγκεκριμένα, η σύνθεση του γλυκοπεπτιδίου 1 πραγματοποιήθηκε σε υγρή φάση, σύμφωνα με τη μεθοδολογία χημειοεκλεκτικών αντιδράσεων σχηματισμού δεσμού οξίμης μεταξύ του N^ε-αμινοοξυ-ακετυλιωμένου φορέα SOC₄-I H-SOC₄(Aoa)₄-NH₂ και της καρβονυλικής ομάδας της δομής ανοικτής αλυσίδας του σιαλικού οξέος, ενώ η σύνθεση των γλυκοπεπτιδίων 2, 3 και 4 πραγματοποιήθηκε, μεταξύ του N^ε-αμινοοξυ-ακετυλιωμένου (στις λυσίνες 1 και 7) φορέα SOC₄-I Ac-SOC₄(Ac₂,Aoa₂)-NH₂ και της καρβονυλικής ομάδας της δομής ανοικτής αλυσίδας ενός εκ των σακχάρων: σιαλικό οξύ, 3'-σιαλυλ-λακτόζη και 6'-σιαλυλ-λακτόζη. Η αναλυτική πορεία σύνθεσης περιγράφεται στο Κεφάλαιο 13.

Τα γλυκοπεπτιδικά ανάλογα 1-4 παρασκευάστηκαν σε καλές αποδόσεις και υψηλή καθαρότητα, καθιστώντας τη χημειοεκλεκτική αντίδραση σχηματισμού δεσμού οξίμης μεταξύ υδατανθρακικών μονάδων ποικίλου μεγέθους και του oligοπεπτιδικού φορέα SOC₄ μια ιδιαίτερα αποτελεσματική μεθοδολογία σύνθεσης γλυκοπεπτιδικών αναλόγων.

Η διαμορφωτική μελέτη των γλυκοπεπτιδικών αναλόγων 2 και 4 αλλά και του N^ε-αμινοοξυ-ακετυλιωμένου, στις λυσίνες 1 και 7, φορέα SOC₄ πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού, σε διαλύματα H₂O, H₂O/TFE (50/50, v/v) και TFE. Η συγκέντρωση των πεπτιδίων ήταν 100μM και τα φάσματα που ελήφθησαν απεικονίζονται στα σχήματα 1-3 του Κεφαλαίου 14. Επιπλέον, τα φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού αναλύθηκαν με το υπολογιστικό πρόγραμμα CDNN, ώστε να εκτιμηθεί το ποσοστό των διαφόρων δευτεροταγών δομών που συνεισφέρουν στην τελική διαμόρφωση των πεπτιδίων.

Όσον αφορά στην επίδραση του διαλύτη, όπως προκύπτει από τα φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού των σχήματα 4-6 αλλά και τους Πίνακες 1-3 του Κεφαλαίου 14, σε H₂O όλα τα



πεπτίδια έχουν ποσοστό έλικας ~10% το οποίο αυξάνεται καθώς προστίθεται TFE και προσεγγίζει το μέγιστο (20%) σε 100% TFE. Ωστόσο, το αυξανόμενο ποσοστό TFE επιδρά διαφορετικά σε κάθε πεπτίδιο. Έτσι, από το 50% στο 100% TFE η διαμόρφωση του φορέα δεν επηρεάζεται, το ποσοστό έλικας στο γλυκοπεπτίδιο Ac-SOC₄[Ac₂, (SA-Aoa)₂]-NH₂ αυξάνεται κατά περίπου 5 ποσοστιαίες μονάδες, ενώ αντίθετα το ποσοστό έλικας στο γλυκοπεπτίδιο Ac-SOC₄[Ac₂, (6'SL-Aoa)₂]-NH₂ εμφανίζει ελάχιστη μείωση.

Όσον αφορά στην επίδραση της πρόσδεσης των σακχάρων στο φορέα SOC₄-I, από τα ίδια σχήματα και πίνακες του Κεφαλαίου 14, προκύπτει ότι στο H₂O η πρόσδεση αυτή δεν επιφέρει αξιόλογες μεταβολές στη διαμόρφωση του φορέα, ενώ η εικόνα είναι λίγο διαφορετική στους άλλους δυο διαλύτες που μελετήθηκαν. Σε μίγμα H₂O/TFE 50/50 (v/v) μόνο η πρόσδεση του τρισακχαρίτη φαίνεται πως επηρεάζει λίγο τη σχετική αναλογία των δευτεροταγών δομών, ενισχύοντας το ποσοστό έλικας (18%), ενώ σε TFE φαίνεται πως και τα δυο είδη σακχάρου ενισχύουν την έλικα, αλλά το κάθε ένα σε διαφορετικό ποσοστό (από 14% σε 19% για το SA και 17% για το 6'SL).

Ωστόσο, οι μεταβολές που παρατηρούνται, τόσο με την αλλαγή των διαλυτών όσο και με την πρόσδεση των σακχάρων, είναι ελάχιστες και πιθανά βρίσκονται στα όρια του πειραματικού σφάλματος. Για το λόγο αυτό, θα πρέπει να επισημανθεί ως σημαντική παρατήρηση το ότι η παρουσία σακχάρου, που για πρώτη φορά προσδένεται σε φορέα SOC₄-I, δεν επηρεάζει σημαντικά τη διαμόρφωση του μορίου του φορέα SOC₄-I, γεγονός που βρίσκεται σε απόλυτη συμφωνία και επιβεβαιώνει τον αρχικό σχεδιασμό αυτής της κατηγορίας μορίων-φορέων.

Από τα πειράματα ανοσοποίησης πειραματόζωων (κοτόπουλα ή ποντίκια) με τα ανοσοσυμπλέγματα 1-5 και την εν συνεχεία πρόκληση μόλυνσης (challenge infection) αυτών από ιό γρίπης των πτηνών, που περιγράφονται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 15, προέκυψαν τα ακόλουθα αποτελέσματα:

Όσον αφορά στα πειράματα ανοσοποιήσεων κοτόπουλων με το ανοσοσύμπλεγμα 1, αν και το πεπτίδιο H5VIN1cor54-69, που επιλέχθηκε και χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη, είναι αντιγονικό, ωστόσο, δεν κατέστη δυνατό να επάγει κατάλληλη ανοσολογική απόκριση in vivo και προστασία έναντι μόλυνσης από ιό γρίπης των πτηνών. Επιπλέον, τα εμβολιασμένα με το σύμπλεγμα Ac-SOC₄-[Ac₂, (H5VIN1cor54-69)₂]-OH κοτόπουλα εκδήλωσαν σοβαρά κλινικά σημάδια και υπέκυψαν στη μόλυνση και το θάνατο πολύ ταχύτερα μετά τη μόλυνση με τον ιό (ήδη από την τρίτη ημέρα μετά την πρόκληση της μόλυνσης), σε σχέση με τα μη-εμβολιασμένα ζώα. Η ιική επιθετικότητα συσχετίζεται με την



ανίχνευση υψηλότερων τίτλων ειδικών αντι-NP και αντι-HA αντισωμάτων από τη δέκατη ημέρα μετά την μόλυνση, πιθανότατα λόγω του μεγάλου αντιγονικού φορτίου που παρουσιάζεται στα ζώα αυτά πολύ γρήγορα μετά την μόλυνση με H5N2 ιό γρίπης.

Η εξήγηση που δίνεται, βασισμένη σε αντίστοιχα αποτελέσματα για το HIV-1, είναι ότι το εμβόλιο προκάλεσε γενικευμένη ανοσολογική ενεργοποίηση, η οποία αύξησε την αντιγραφή του H5N2 και τον κίνδυνο μόλυνσης. Αυτή η ενεργοποίηση συνήθως καθορίζεται από CD4+ T λεμφοκύτταρα που κατευθύνονται σε συγκεκριμένους υποδοχείς και αυξάνουν την ευαισθησία στη μόλυνση. Η παρουσία πολύ χαμηλών τίτλων αντισωμάτων κατά την ανοσοποίηση με το σύμπλεγμα Ac-SOC₄-[Ac₂, (H5VIN1cor54-69)₂]-OH πιθανόν συνέβαλε στην ενεργοποίηση της ασθένειας και στην αύξηση της αντιγραφής του ιού H5N2.

Άλλη πιθανή εξήγηση είναι ότι η ανοσοποίηση προκάλεσε την παραγωγή IL-10 που παρεμποδίζει την ανάπτυξη προστατευτικής ανοσίας.

Όσον αφορά στα ανοσοσυμπλέγματα 2-5, αποδεικνύεται ότι οι ανοσοποιήσεις ποντικών με αυτά τα πεπτιδικά ανάλογα της πρωτεΐνης HA του ιού της γρίπης δεν κατόρθωσαν να επάγουν κατάλληλη ανοσολογική απόκριση *in vivo* και προστασία των πειραματόζων από τη μόλυνση από ιό γρίπης των πτηνών. Τα ποσοστά θνησιμότητας των πειραματόζων που καταγράφηκαν κυμαίνονται από 67% έως 100%, με την ομάδα των ζώων που ανοσοποιήθηκαν με το πεπτιδικό σύμπλεγμα 4 να εμφανίζει το μικρότερο ποσοστό (67%) αφού δυο από τα έξι ζώα κατόρθωσαν να επιβιώσουν πιθανόν διότι ανέπτυξαν προστατευτική ανοσία έναντι του ιού γρίπης H5N1 ως αποτέλεσμα της ανοσοποίησής τους με το σύμπλεγμα του επιτόπου T5 της πρωτεΐνης HA.

Από τα αποτελέσματα αυτά μπορούμε να συμπεράνουμε ότι οι πεπτιδικές αλληλουχίες T1, T3, T5 και T7 της αιμοσυγκολλητίνης H5 HA, που προβλέφθηκαν ως επίτοποι της πρωτεΐνης αυτής ικανοί να παρουσιάζονται από μόρια MHC I στα CD8 T-λεμφοκύτταρα, δεν επιβεβαιώνονται ως κύριοι επίτοποι αυτής καθώς απέτυχαν να επιφέρουν την επιθυμητή προστατευτική ανοσολογική απόκριση. Επιπλέον, το γεγονός αυτό ενδεχομένως οφείλεται στο ότι ο ιός της γρίπης H5N1, τουλάχιστον το στέλεχος που δοκιμάστηκε στην παρούσα μελέτη, έχει ήδη υποστεί μεταλλάξεις που του επιτρέπουν να διαφεύγει από τις ανοσολογικές αποκρίσεις του ξενιστή (escape mutants).

Τέλος, τα πειράματα ELISA που πραγματοποιήθηκαν με τα γλυκοπεπτιδικά ανάλογα του υποδοχέα της HA του ιού της γρίπης με σκοπό την ανάπτυξη διαγνωστικής μεθοδολογίας ανίχνευσης και μελέτης της εξειδίκευσης για υποδοχέα ιών γρίπης, αν και βρίσκονται ακόμα σε πρώιμο στάδιο, εντούτοις κρίνονται ενθαρρυντικά και αναμένεται τα αποτελέσματα που



θα προκύψουν μετά την ολοκλήρωσή τους να συμβάλουν αποτελεσματικά και να δώσουν νέες προοπτικές στην ανάπτυξη διαγνωστικών τεχνικών για τον ιό της γρίπης των πτηνών.

Παραμένει η ανάγκη για περαιτέρω έρευνα και ανάπτυξη νέων διαγνωστικών τεχνικών, καθώς και η ανάγκη για την εκπαίδευση του προσωπικού που θα ασχοληθεί με την αντιμετώπιση των ασθενειών που προκαλούνται από τον ιό της γρίπης των πτηνών.

Επιπλέον, είναι σημαντικό να ληφθούν υπόψη οι προκλήσεις που προκύπτουν από την ταχεία μετάδοση του ιού της γρίπης των πτηνών, καθώς και η ανάγκη για την ανάπτυξη αποτελεσματικών μέτρων πρόληψης και αντιμετώπισης της νόσου.

Επιπλέον, είναι σημαντικό να ληφθούν υπόψη οι προκλήσεις που προκύπτουν από την ταχεία μετάδοση του ιού της γρίπης των πτηνών, καθώς και η ανάγκη για την ανάπτυξη αποτελεσματικών μέτρων πρόληψης και αντιμετώπισης της νόσου.

Επιπλέον, είναι σημαντικό να ληφθούν υπόψη οι προκλήσεις που προκύπτουν από την ταχεία μετάδοση του ιού της γρίπης των πτηνών, καθώς και η ανάγκη για την ανάπτυξη αποτελεσματικών μέτρων πρόληψης και αντιμετώπισης της νόσου.

Επιπλέον, είναι σημαντικό να ληφθούν υπόψη οι προκλήσεις που προκύπτουν από την ταχεία μετάδοση του ιού της γρίπης των πτηνών, καθώς και η ανάγκη για την ανάπτυξη αποτελεσματικών μέτρων πρόληψης και αντιμετώπισης της νόσου.

Επιπλέον, είναι σημαντικό να ληφθούν υπόψη οι προκλήσεις που προκύπτουν από την ταχεία μετάδοση του ιού της γρίπης των πτηνών, καθώς και η ανάγκη για την ανάπτυξη αποτελεσματικών μέτρων πρόληψης και αντιμετώπισης της νόσου.

Επιπλέον, είναι σημαντικό να ληφθούν υπόψη οι προκλήσεις που προκύπτουν από την ταχεία μετάδοση του ιού της γρίπης των πτηνών, καθώς και η ανάγκη για την ανάπτυξη αποτελεσματικών μέτρων πρόληψης και αντιμετώπισης της νόσου.



Τα γενικά συμπεράσματα που προκύπτουν από την παρούσα διατριβή είναι τα εξής:

Παρασκευάστηκαν με επιτυχία και σε καλές αποδόσεις αλδεϋδικά παράγωγα πεπτιδικών τμημάτων της πρωτεΐνης αιμοσυγκολλητίνης (HA) του ιού της γρίπης των πτηνών, ύστερα από κατάλληλη τροποποίηση του C-τελικού άκρου αυτών και ήπια οξειδωση σε υγρή φάση.

Παρασκευάστηκαν, επίσης, διακλαδισμένα πεπτιδικά μακρομόρια, με μοριακά βάρη που κυμαίνονται από ~3,8kDa έως ~4,2kDa, μέσω χημειοεκλεκτικής αντίδρασης, σε υγρή φάση, σχηματισμού δεσμού οξίμης μεταξύ του N^ε-αμινοοξυ-ακετυλιωμένου ολιγοπεπτιδικού φορέα SOC₄-I και των κατάλληλα τροποποιημένων (αλδεϋδικά παράγωγα) πεπτιδικών τμημάτων (επιτόπων), σε καλές αποδόσεις και υψηλή καθαρότητα.

Επιπλέον, παρασκευάστηκαν διακλαδισμένα γλυκοπεπτιδικά μακρομόρια, ως μοντέλα του σιαλο-υποδοχέα της HA, με μοριακά βάρη που κυμαίνονται από ~1,9kDa έως ~2,6kDa, μέσω χημειοεκλεκτικής αντίδρασης, σε υγρή φάση, σχηματισμού δεσμού οξίμης μεταξύ του N^ε-αμινοοξυ-ακετυλιωμένου φορέα SOC₄-I και διαφόρων υδατανθρακικών μονάδων, ως μοντέλα γλυκοπρωτεϊνών με μη φυσικό δεσμό μεταξύ πεπτιδικού/πρωτεϊνικού και ολιγοσακχαρικού τμήματος (νεογλυκοπεπίδια). Η μεθοδολογία αυτή αναπτύσσεται για πρώτη φορά χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τον ολιγοπεπτιδικό συνθετικό φορέα SOC₄-I, διευρύνοντας τις εφαρμογές του εν λόγω μορίου-φορέα.

Μελετήθηκαν τα διαμορφωτικά χαρακτηριστικά του N^ε-αμινοοξυ-ακετυλιωμένου φορέα SOC₄-I και των γλυκοπεπτιδικών μακρομορίων με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού, η οποία απέδειξε ότι η συγκεκριμένη τροποποίηση που υφίσταται το μόριο του φορέα για την πρόσδεση σακχάρων σε αυτό αλλά και η πρόσδεση των σακχάρων αυτή καθεαυτή, όπως ισχύει και για την πρόσδεση πεπτιδικών τμημάτων, δεν επηρεάζουν τη διαμόρφωση του μορίου του φορέα και των συμπλεγμάτων του.

Τα συνθετικά SOC₄-παράγωγα υποψήφιων (από μελέτες πρόβλεψης) CD8 T-κυτταρικών επιτόπων της H5 HA του ιού της γρίπης των πτηνών, που παρασκευάστηκαν για τη βελτίωση της ανοσογονικότητας καθενός από αυτούς τους επιτόπους, χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα ανοσοποιήσεων πειραματόζωων. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η ανοσολογική απόκριση που προκάλεσαν δεν ήταν ικανοποιητική ώστε να προκαλέσουν



προστατευτική ανοσία. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα είναι στη σωστή κατεύθυνση και συμβάλλουν εποικοδομητικά στην ανάπτυξη εμβολίων κατά της γρίπης των πτηνών.

Τέλος, τα γλυκοπεπτιδικά ανάλογα του υποδοχέα της HA του ιού της γρίπης χρησιμοποιούνται στην ανάπτυξη μιας μεθοδολογίας ELISA για την ανίχνευση και τη μελέτη εξειδίκευσης για υποδοχέα ιών γρίπης, τεχνική που αναμένεται να συμβάλει ουσιαστικά προς την κατεύθυνση νέων διαγνωστικών εργαλείων του ιού γρίπης των πτηνών.



An influenza pandemic is a global outbreak of a disease that occurs when a new influenza A virus emerges in the human population, causes serious illness and then spreads easily from person to person worldwide. Past influenza pandemics have led to high levels of illness, death, social disruption and economic loss. Birds are the natural hosts of influenza A virus, but most avian influenza viruses are not transmitted to humans. However, the current influenza A/H5N1 viruses are more virulent in birds than in the past and are associated with human infections, with a case fatality rate of more than 50%. Since its appearance in Hong Kong in 1997, the H5N1 outbreaks among animals, affecting both wild birds and domestic poultry, have spread to most countries in South East Asia and also in Africa and Europe. To date there is no vaccine against H5N1 and variants resistant to the current antiviral drugs are emerging. This highlights the urgent need for fast and specific diagnosis, an effective vaccine and new efficient antiviral drugs.

The entry of influenza virus into susceptible cells is mediated by the viral hemagglutinin (HA) glycoprotein, which is present in the lipid membrane surrounding the virus, and constitutes the major surface antigen against which neutralizing antibodies are directed. The receptor binding preference of influenza viruses correlates with the animal species from which the viruses are isolated. Human isolates preferentially bind to the terminal sialic acid of glycoprotein and glycolipid receptors with $\alpha 2,6$ linkages to galactose (SA $\alpha 2,6$ Gal), whereas avian isolates prefer $\alpha 2,3$ linkages (SA $\alpha 2,3$ Gal).

Aiming to contribute in the development of an influenza vaccine, several SOC-T cell epitope conjugates were synthesized and tested for their immunogenicity in mice after challenge infection with influenza virus. The influenza hemagglutinin T cell epitopes were predicted by computational methods and were then coupled on the SOC₄-I carrier in two copies in order to improve their immunogenicity. The desired macromolecules of branched architecture were obtained either by using the step by step Boc/Bzl solid phase peptide synthesis, or by the chemoselective ligation approach, through oxime bond formation, between the appropriately modified for this purpose peptide fragments. Mice immune response to these SOC-T cell epitope conjugates was not adequate to induce protective immunity against influenza infection.



Moreover, this work also aims to contribute in the development of highly specific and sensitive biological assays for the diagnosis and discrimination between avian and human influenza viruses. To this end, we synthesized four glycopeptide analogs, mimicking the hemagglutinin receptor. Their synthesis was achieved via a chemoselective ligation approach, which generates an oxime bond between the N^ε-aminooxyacetylated-SOC₄-I oligopeptide carrier and the carbonyl group at the reducing end of different sialosaccharides. Conformational studies by circular dichroism spectroscopy (CD) revealed no significant influence of the sugar moiety to the well defined secondary structure of the SOC₄-I oligopeptide carrier, though confirming the initial design of the SOC_n molecules and broadening their applications. The resulted glycopeptide conjugates were used for the development of an ELISA binding assay with influenza pseudoviruses. Preliminary results are quite promising, suggesting the usefulness of those glycopeptide conjugates to the diagnosis of influenza infections as well as to receptor specificity studies of different influenza virus isolates.



- [1] De Jong MD, Hien TT. Avian influenza A (H5N1). *Journal of Clinical Virology* 2006;35(1):2-13.
- [2] Alexander DJ. An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine* 2007;25(30 SPEC. ISS.):5637-44.
- [3] WHO. Avian influenza ("bird flu")-Fact sheet. February 2006 [cited; Available from: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/avian_influenza/en/index.html]
- [4] Stephenson I, Nicholson KG, Wood JM, Zambon MC, Katz JM. Confronting the avian influenza threat: Vaccine development for a potential pandemic. *Lancet Infectious Diseases* 2004;4(8):499-509.
- [5] Hampson AW, Mackenzie JS. Preparing for an influenza pandemic: the influenza viruses. *MJA* 2006 20 November 2006;185(10):S39-S43.
- [6] Russell CJ, Webster RG. The genesis of a pandemic influenza virus. *Cell* 2005;123(3):368-71.
- [7] Cinatl Jr J, Michaelis M, Doerr HW. The threat of avian influenza a (H5N1): Part II: Clues to pathogenicity and pathology. *Medical Microbiology and Immunology* 2007;196(4):191-201.
- [8] Gambotto A, Barratt-Boyes SM, de Jong MD, Neumann G, Kawaoka Y. Human infection with highly pathogenic H5N1 influenza virus. *The Lancet* 2008;371(9622):1464-75.
- [9] Huckriede A, Bungener L, Stegmann T, Daemen T, Medema J, Palache AM, et al. The virosome concept for influenza vaccines. *Vaccine* 2005;23(SUPPL. 1).
- [10] Hoelscher MA, Garg S, Bangari DS, Belser JA, Lu X, Stephenson I, et al. Development of adenoviral-vector-based pandemic influenza vaccine against antigenically distinct human H5N1 strains in mice. *Lancet* 2006;367(9509):475-81.
- [11] Ivanovska N, Tchorbanov A, Prechl J, Maximova V, Voynova E, Vassilev TL. Immunization with a DNA chimeric molecule encoding a hemagglutinin peptide and a scFv CD21-specific antibody fragment induces long-lasting IgM and CTL responses to influenza virus. *Vaccine* 2006;24(11):1830-7.
- [12] El Sahly HM, Keitel WA. Pandemic H5N1 influenza vaccine development: An update. *Expert Review of Vaccines* 2008;7(2):241-7.



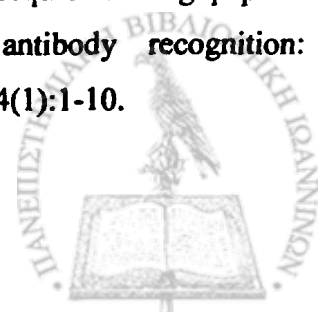
- [13] CDC. Influenza Viruses. 2005 [cited; Available from: http://www.cdc.gov/flu/avian/gen-info/pdf/flu_viruses.pdf]
- [14] Rachakonda PS. STUDIES ON CONFORMATIONAL STABILITY OF THE ECTODOMAIN OF INFLUENZA VIRUS HEMAGGLUTININ. DISSERTATION 2004 [cited; Available from: <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/rachakonda-p-sivaramakrishna-2005-02-15/HTML/chapter1.html>]
- [15] Lai AL, Park H, White JM, Tamm LK. Fusion peptide of influenza hemagglutinin requires a fixed angle boomerang structure for activity. *Journal of Biological Chemistry* 2006;281(9):5760-70.
- [16] Eckert DM, Kim PS. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annual Review of Biochemistry*, 2001: 777-810.
- [17] Skehel JJ, Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: The influenza hemagglutinin. *Annual Review of Biochemistry*, 2000: 531-69.
- [18] Stevens J, Blixt O, Tumpey TM, Taubenberger JK, Paulson JC, Wilson IA. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science* 2006;312(5772):404-10.
- [19] Gamblin SJ, Haire LF, Russell RJ, Stevens DJ, Xiao B, Ha Y, et al. The Structure and Receptor Binding Properties of the 1918 Influenza Hemagglutinin. *Science* 2004;303(5665):1838-42.
- [20] Stevens J, Blixt O, Glaser L, Taubenberger JK, Palese P, Paulson JC, et al. Glycan microarray analysis of the hemagglutinins from modern and pandemic influenza viruses reveals different receptor specificities. *Journal of Molecular Biology* 2006;355(5):1143-55.
- [21] Yamada S, Suzuki Y, Suzuki T, Le MQ, Nidom CA, Sakai-Tagawa Y, et al. Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature* 2006;444(7117):378-82.
- [22] Gambaryan A, Tuzikov A, Pazynina G, Bovin N, Balish A, Klimov A. Evolution of the receptor binding phenotype of influenza A (H5) viruses. *Virology* 2006;344(2):432-8.
- [23] Bewley CA. Illuminating the switch in influenza viruses. *Nature Biotechnology* 2008;26(1):60-2.
- [24] Chandrasekaran A, Srinivasan A, Raman R, Viswanathan K, Raguram S, Tumpey TM, et al. Glycan topology determines human adaptation of avian H5N1 virus hemagglutinin. *Nature Biotechnology* 2008;26(1):107-13.



- [25] Cinatl Jr J, Michaelis M, Doerr HW. The threat of avian influenza A (H5N1). Part IV: Development of vaccines. *Medical Microbiology and Immunology* 2007;196(4):213-25.
- [26] Roti M, Yang J, Berger D, Huston L, James EA, Kwok WW. Healthy human subjects have CD4+ T cells directed against H5N1 influenza virus. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2008;180(3):1758-68.
- [27] Rimmelzwaan GF, Fouchier RA, Osterhaus AD. Influenza virus-specific cytotoxic T lymphocytes: a correlate of protection and a basis for vaccine development. *Current Opinion in Biotechnology* 2007;18(6):529-36.
- [28] Wiley DC, Wilson IA. Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation. *Nature* 1981;289(5796):373-8.
- [29] Daniels RS, Douglas AR, Skehel JJ, Wiley DC. Analyses of the antigenicity of influenza haemagglutinin at the pH optimum for virus-mediated membrane fusion. *Journal of General Virology* 1983;64(8):1657-62.
- [30] Caton AJ, Brownlee GG, Yewdell JW, Gerhard W. The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H1 subtype). *Cell* 1982;31(2 II):417-27.
- [31] Tsuchiya E, Sugawara K, Hongo S, Matsuzaki Y, Muraki Y, Li ZN, et al. Antigenic structure of the haemagglutinin of human influenza A/H2N2 virus. *Journal of General Virology* 2001;82(10):2475-84.
- [32] Kaverin NV, Rudneva IA, Ilyushina NA, Varich NL, Lipatov AS, Smirnov YA, et al. Structure of antigenetic sites on the haemagglutinin molecule of H5 avian influenza virus and phenotypic variation of escape mutants. *Journal of General Virology* 2002;83(10):2497-505.
- [33] Kaverin NV, Rudneva IA, Ilyushina NA, Lipatov AS, Krauss S, Webster RG. Structural Differences among Hemagglutinins of Influenza A Virus Subtypes Are Reflected in Their Antigenic Architecture: Analysis of H9 Escape Mutants. *Journal of Virology* 2004;78(1):240-9.
- [34] Hioe CE, Dybdahl-Sissoko N, Philpott M, Hinshaw VS. Overlapping cytotoxic T-lymphocyte and B-cell antigenic sites on the influenza virus H5 hemagglutinin. *Journal of Virology* 1990;64(12):6246-51.
- [35] Bright RA, Ross TM, Subbarao K, Robinson HL, Katz JM. Impact of glycosylation on the immunogenicity of a DNA-based influenza H5 HA vaccine. *Virology* 2003;308(2):270-8.



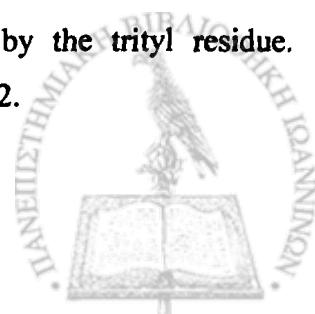
- [36] Matrosovich M, Zhou N, Kawaoka Y, Webster R. The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *Journal of Virology* 1999;73(2):1146-55.
- [37] Su Y, Zhu X, Wang Y, Wu M, Tien P. Evaluation of Glu11 and Gly8 of the H5N1 influenza hemagglutinin fusion peptide in membrane fusion using pseudotype virus and reverse genetics. *Archives of Virology* 2008;153(2):247-57.
- [38] Huang Q, Chen CL, Herrmann A. Bilayer conformation of fusion peptide of influenza virus hemagglutinin: A molecular dynamics simulation study. *Biophysical Journal* 2004;87(1):14-22.
- [39] Steinhauer DA. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology* 1999;258(1):1-20.
- [40] Cross KJ, Wharton SA, Skehel JJ, Wiley DC, Steinhauer DA. Studies on influenza haemagglutinin fusion peptide mutants generated by reverse genetics. *EMBO Journal* 2001;20(16):4432-42.
- [41] Sollner TH. Intracellular and viral membrane fusion: A uniting mechanism. *Current Opinion in Cell Biology* 2004;16(4):429-35.
- [42] 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):1715-35.
- [43] Tam JP. 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):5409-13.
- [44] Mutter M, Tuchscherer GG, Miller C, Altmann KH, Carey RI, Wyss DF, et al. Template-assembled synthetic proteins with four-helix-bundle topology. Total chemical synthesis and conformational studies. *Journal of the American Chemical Society* 1992;114(4):1463-70.
- [45] Tsikaris V, Sakarellos C, Cung MT, 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):291-3.
- [46] Alexopoulos C, Tsikaris V, Rizou C, Sakarellos-Daitsiotis M, Sakarellos C, Cung MT, et al. The position of the LysN(ϵ)H₂-grafted antigens along the sequential oligopeptide carrier, Ac-(Aib-Lys-Aib-Gly)(n) (SOC(n)-II), influences the antibody recognition: Application to the Sm main autoimmune epitope. *Biopolymers* 2000;54(1):1-10.



- [47] Pal D, Chakrabarti P. Cis peptide bonds in proteins: Residues involved, their conformations, interactions and locations. *Journal of Molecular Biology* 1999;294(1):271-88.
- [48] Sager C, Mutter M, Dumy P. Influence of cis-trans isomerisation on pentapeptide cyclisation. *Tetrahedron Letters* 1999;40(45):7987-91.
- [49] Bodanszky M. *Peptide Chemistry: A Practical Textbook*. 2nd Rev Edition. New York: Springer Verlag, 1993.
- [50] Mitchell AR, Kent SBH, Engelhard M, Merrifield RB. A new synthetic route to tert-butylloxycarbonylaminoacyl-4-(oxymethyl)phenylacetamidomethyl-resin, an improved support for solid-phase peptide synthesis. *Journal of Organic Chemistry* 1978;43(14):2845-52.
- [51] Wang SS. p-Alkoxybenzyl alcohol resin and p-alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide resin for solid phase synthesis of protected peptide fragments. *Journal of the American Chemical Society* 1973;95(4):1328-33.
- [52] 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):513-20.
- [53] 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):562-8.
- [54] Barlos K, Gatos D, Kapolos S, Poulos C, Schafer W, Wenqing Y. 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):555-61.
- [55] Matsueda GR, Stewart JM. A p-Methylbenzhydrylamine resin for improved solid-phase synthesis of peptide amides. *Peptides* 1981;2(1):45-50.
- [56] Rink H. Solid phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin *Tetrahedron Letters* 1981;28(33):3787-90.
- [57] Anderson GW, McGregor AC. t-Butylloxycarbonylamino Acids and Their Use in Peptide Synthesis. *J Am Chem Soc* 1957;79(23):6180-3.
- [58] Carpino LA, Han GY. The 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. *Journal of Organic Chemistry* 1972;37(22):3404-9.



- [59] Carpino LA, Shroff H, Triolo SA, 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):7829-32.
- [60] Ramage R, Green J, Blake AJ. An acid labile arginine derivative for peptide synthesis: N(G)-2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulphonyl-L-arginine. *Tetrahedron* 1991;47(32):6353-70.
- [61] Fujino M, Wakimasu M, Kitada C. 4-Methoxy-2,3,6-trimethylbenzenesulphonyl (Mtr): A new amino-protecting group in peptide synthesis. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 1982(8):445-6.
- [62] Mazur RH, Plume G. Improved synthesis of bradykinin. *Experientia* 1968;24(7):661.
- [63] Ramachandran J, Li CH. Preparation of crystalline NG-tosylarginine derivatives. *Journal of Organic Chemistry* 1962;27(11):4006-9.
- [64] Yajima H, Takeyama M, Kanaki J, Mitani K. The mesitylene-2-sulphonyl group, an acidolytically removable N G-protecting group for arginine. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 1978(11):482-3.
- [65] Erickson BW, Merrifield RB. Use of chlorinated benzyloxycarbonyl protecting groups to eliminate N α -branching at lysine during solid-phase peptide synthesis. *Journal of the American Chemical Society* 1973;95(11):3757-63.
- [66] Bycroft BW, Chan WC, Chhabra SR, Hone ND. A novel lysine-protecting procedure for continuous flow solid phase synthesis of branched peptides. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 1993(9):778-9.
- [67] Chhabra SR, Hothi B, Evans DJ, White PD, Bycroft BW, Chan WC. An appraisal of new variants of Dde amine protecting group for solid phase peptide synthesis. *Tetrahedron Letters* 1998;39(12):1603-6.
- [68] Sieber P, Riniker B. Protection of histidine in peptide synthesis: A reassessment of the trityl group. *Tetrahedron Letters* 1987;28(48):6031-4.
- [69] Sakakibara S, Fujii T. Synthesis and use of N-im-tosyl-L-histidine. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 1969;42(5):1466.
- [70] Chillemi F, Merrifield RB. Use of Nim-dinitrophenylhistidine in the solid-phase synthesis of the tricosapeptides 124-146 of human hemoglobin .beta. chain. *Biochemistry* 1969;8(11):4344-6.
- [71] Sieber P, Riniker B. Protection of carboxamide functions by the trityl residue. Application to peptide synthesis. *Tetrahedron Letters* 1991;32(6):739-42.



- [72] Chang CD, Waki M, Ahmad M, Meienhofer J, Lundell EO, Haug JD. Preparation and properties of N α -9-fluorenylmethyloxycarbonylamino acids bearing tert.-butyl side chain protection. *International Journal of Peptide and Protein Research* 1980;15(1):59-66.
- [73] Dangles O, Guibe F, Balavoine G, Lavielle S, Marquet A. Selective cleavage of the allyl and allyloxycarbonyl groups through palladium-catalyzed hydrostannolysis with tributyltin hydride. Application to the selective protection-deprotection of amino acid derivatives and in peptide synthesis. *Journal of Organic Chemistry* 1987;52(22):4984-93.
- [74] Adamson JG, Blaskovich MA, Groenevelt H, Lajoie GA. Simple and convenient synthesis of tert-butyl ethers of Fmoc-serine, Fmoc-threonine, and Fmoc-tyrosine. *Journal of Organic Chemistry* 1991;56(10):3447-9.
- [75] Erickson BW, Merrifield RB. 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):3750-6.
- [76] Mizoguchi T, Levin G, Woolley DW, Stewart JM. O-benzyl-N-t-butyloxycarbonyl-L-threonine. *Journal of Organic Chemistry* 1968;33(2):903-4.
- [77] Sugano H, Miyoshi M. A convenient synthesis of N-tert-butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-serine. *Journal of Organic Chemistry* 1976;41(13):2352-3.
- [78] Barlos K, Gatos D, Koutsogianni S, Schafer W, Stavropoulos G, Wenqing Y. Demonstration and employment of N-Fmoc-O-Trt hydroxyamino acid derivatives in the solid-phase synthesis of peptides. *Tetrahedron Letters* 1991;32(4):471-4.
- [79] McCurdy SN. The investigation of Fmoc-cysteine derivatives in solid phase peptide synthesis. *Peptide research* 1989;2(1):147-52.
- [80] 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):148-53.
- [81] Li D, Elbert DL. The kinetics of the removal of the N-methyltrityl (Mtt) group during the synthesis of branched peptides. *Journal of Peptide Research* 2002;60(5):300-3.
- [82] Matysiak S, Bo?ldicke 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):1733-4.
- [83] König W, Geiger R. Racemization in peptide syntheses. Racemisierung bei Peptidsynthesen 1970;103(7):2024-33.



- [84] Castro B, Dourtoglou B, Dormay JR, Evin G, Selve C, Ziegler JC. Peptide coupling reagents. VI. A novel, cheaper preparation of benzotriazoloxyltris [dimethylamino] phosphonium hexafluorophosphate (BOP reagent). *Synthesis* 1976;18:751-2.
- [85] Coste J, Le-Nguyen D, Castro B. PyBOP®: a new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product. *Tetrahedron Letters* 1990;31(2):205-8.
- [86] Coste J, Dufour MN, Pantaloni A, Castro B. BroP: A new reagent for coupling N-methylated amino acids. *Tetrahedron Letters* 1990;31(5):669-72.
- [87] Dourtoglou V, Gross B. O-benzotriazolyl-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate as coupling reagent for the synthesis of peptides of biological interest. *Synthesis* 1984;NO. 7:572-4.
- [88] Knorr R, Trzeciak A, Bannawarth W, Gillsen D. New coupling reagents in peptide chemistry. *Tetrahedron Letters* 1989;30:1927-30.
- [89] Palasek SA, Cox ZJ, Collins JM. Limiting racemization and aspartimide formation in microwave-enhanced Fmoc solid phase peptide synthesis. *Journal of Peptide Science* 2007;13(3):143-8.
- [90] Mergler M, Dick F, Sax B, Weiler P, Vorherr T. The aspartimide problem in Fmoc-based SPPS. Part I. *Journal of Peptide Science* 2003;9(1):36-46.
- [91] Mergler M, Dick F, Sax B, Staehelin C, Vorherr T. The aspartimide problem in Fmoc-based SPPS. Part II. *Journal of Peptide Science* 2003;9(8):518-26.
- [92] Mergler M, Dick F. The aspartimide problem in Fmoc-based SPPS. Part III. *Journal of Peptide Science* 2005;11(10):650-7.
- [93] Tam JP, Riemen MW, Merrifield RB. Mechanisms of aspartimide formation: the effects of protecting groups, acid, base, temperature and time. *Peptide research* 1988;1(1):6-18.
- [94] Dölling R, Beyermann M, Haenel J, Kernchen F, Krause E, Franke P, et al. Piperidine-mediated side product formation for Asp(OBut)-containing peptides. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 1994(7):853-4.
- [95] Packman LC. N-2-hydroxy-4-methoxybenzyl (Hmb) backbone protection strategy prevents double aspartimide formation in a 'difficult' peptide sequence. *Tetrahedron Letters* 1995;36(41):7523-6.
- [96] Kostidis S, Stathopoulos P, Chondrogiannis NI, Sakarellos C, Tsikaris V. Aspartyl methyl ester formation via aspartimide ring opening: A proposed modification of the



protocols used in Boc- and Fmoc-based solid-phase peptide synthesis. *Tetrahedron Letters* 2003;44(48):8673-6.

[97] Orpiszewski J, Schormann N, Kluge-Beckerman B, Liepnieks JJ, Benson MD. Protein aging hypothesis of Alzheimer disease. *FASEB Journal* 2000;14(9):1255-63.

[98] Gisin BF, Merrifield RB. Carboxyl-catalyzed intramolecular aminolysis. A side reaction in solid-phase peptide synthesis. *Journal of the American Chemical Society* 1972;94(9):3102-6.

[99] Pedrosa E, Grandas A, de las 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):743-6.

[100] Fischer PM. Diketopiperazines in peptide and combinatorial chemistry. *Journal of Peptide Science* 2003;9(1):9-35.

[101] Pearson DA, Blanchette M, Baker ML, Guindon CA. Trialkylsilanes as scavengers for the trifluoroacetic acid deblocking of protecting groups in peptide synthesis. *Tetrahedron Letters* 1989;30(21):2739-42.

[102] Αντωνόπουλος ΧΑ, Καραμάνος ΝΚ. Χημεία Οργανικών Φυσικών Προϊόντων. Εκδόσεις Πανεπιστημίου Πατρών 1989.

[103] Stryer L. Βιοχημεία. 1997; Τόμος Ι, 3η Έκδοση, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.

[104] McMurry J. Οργανική Χημεία. 2002; Τόμος ΙΙ, 3η Έκδοση, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.

[105] Ress DK, Linhardt RJ. Sialic acid donors: chemical synthesis and glycosylation. *Current Organic Synthesis* 2004;1:31-46.

[106] Guo Z, Shao N. Glycopeptide and glycoprotein synthesis involving unprotected carbohydrate building blocks. *Med Res Rev* 2005 Nov;25(6):655-78.

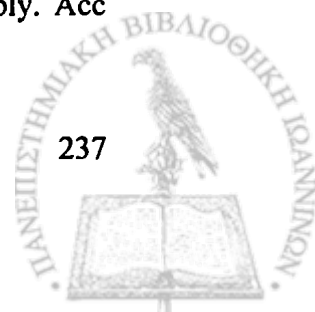
[107] Davis BG. Synthesis of glycoproteins. *Chem Rev* 2002 Feb;102(2):579-602.

[108] Peri F, Nicotra F. Chemoselective ligation in glycochemistry. *Chem Commun (Camb)* 2004 Mar 21;21(6):623-7.

[109] Marcaurelle LA, Bertozzi CR. New directions in the synthesis of glycopeptide mimetics. *Chemistry - A European Journal* 1999;5(5):1384-90.

[110] Buskas T, Ingale S, Boons GJ. Glycopeptides as versatile tools for glycobiology. *Glycobiology* 2006 Aug;16(8):113R-36R.

[111] Hang HC, Bertozzi CR. Chemoselective approaches to glycoprotein assembly. *Acc Chem Res* 2001 Sep;34(9):727-36.



- [112] Langenhan JM, Thorson JS. Recent carbohydrate-based chemoselective ligation applications. *Current Organic Synthesis* 2005;2:59-81.
- [113] Wong SY, Guile GR, Dwek RA, Arsequell G. Synthetic glycosylation of proteins using N-(beta-saccharide) iodoacetamides: applications in site-specific glycosylation and solid-phase enzymic oligosaccharide synthesis. *Biochem J* 1994 Jun 15;300 (Pt 3)(Pt 3):843-50.
- [114] Carrasco MR, Nguyen MJ, Burnell DR, MacLaren MD, Hengel SM. Synthesis of neoglycopeptides by chemoselective reaction of carbohydrates with peptides containing a novel N'-methyl-aminooxy amino acid. *Tetrahedron Letters* 2002;43(33):5727-9.
- [115] Peri F, Dumy P, Mutter M. Chemo- and stereoselective glycosylation of hydroxylamino derivatives: A versatile approach to glycoconjugates. *Tetrahedron* 1998;54(40):12269-78.
- [116] Peri F, Cipolla L, La Ferla B, Dumy P, Nicotra F. A highly convergent approach to O- and N-linked glycopeptide analogues. *Glycoconj J* 1999 Aug;16(8):399-404.
- [117] Peri F, Cipolla L, Rescigno M, La Ferla B, Nicotra F. Synthesis and biological evaluation of an anticancer vaccine containing the C-glycoside analogue of the Tn epitope. *Bioconjug Chem* 2001 May-Jun;12(3):325-8.
- [118] Cipolla L, La Ferla B, Lay L, Peri F, Nicotra F. Stereoselective synthesis of α -C-glycosides of N-acetylgalactosamine. *Tetrahedron Asymmetry* 2000;11(1):295-303.
- [119] Renaudet O, Dumy P. Chemoselectively template-assembled glycopeptide presenting clustered cancer related T-antigen. *Tetrahedron Lett* 2004;45:65-8.
- [120] Renaudet O, Dumy P. Expedient synthesis of aminooxylated-carbohydrates for chemoselective access of glycoconjugates. *Tetrahedron Lett* 2001;42:7575-78.
- [121] Marcaurelle LA, Shin Y, Goon S, Bertozzi CR. Synthesis of oxime-linked mucin mimics containing the tumor-related T(N) and sialyl T(N) antigens. *Org Lett* 2001 Nov 15;3(23):3691-4.
- [122] Kent S. Total chemical synthesis of enzymes. *J Pept Sci* 2003;9(9):574-93.
- [123] Dawson PE, Kent SB. Synthesis of native proteins by chemical ligation. *Annu Rev Biochem* 2000;69:923-60.
- [124] Papas S, Strongylis C, Tsikaris V. Synthetic approaches for total chemical synthesis of proteins and protein-like macromolecules of branched architecture. *Current Organic Chemistry* 2006;10(14):1727-44.

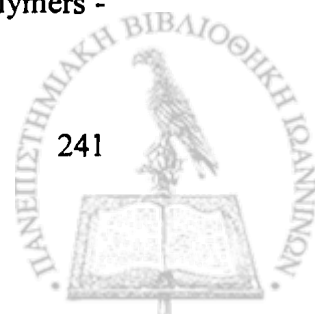


- [125] Borgia JA, Fields GB. Chemical synthesis of proteins. *Trends Biotechnol* 2000 Jun;18(6):243-51.
- [126] Zeng W, Ghosh S, Macris M, Pagnon J, Jackson DC. Assembly of synthetic peptide vaccines by chemoselective ligation of epitopes: Influence of different chemical linkages and epitope orientations on biological activity. *Vaccine* 2001;19(28-29):3843-52.
- [127] Nardin EH, Calvo-Calle JM, Oliveira GA, Clavijo P, Nussenzweig R, Simon R, et al. *Plasmodium falciparum* polyoximes: Highly immunogenic synthetic vaccines constructed by chemoselective ligation of repeat B-cell epitopes and a universal T-cell epitope of CS protein. *Vaccine* 1998;16(6):590-600.
- [128] Beekman NJ, Schaaper WM, Langeveld JP, Boshuizen RS, Meloen RH. The nature of the bond between peptide and carrier molecule determines the immunogenicity of the construct. *J Pept Res* 2001 Sep;58(3):237-45.
- [129] Tam JP, Xu J, Eom KD. Methods and strategies of peptide ligation. *Biopolymers* 2001;60(3):194-205.
- [130] Coltart DM. Peptide segment coupling by prior ligation and proximity-induced intramolecular acyl transfer. *Tetrahedron* 2000;56(22):3449-91.
- [131] Tam JP, Yu Q, Miao Z. Orthogonal ligation strategies for peptide and protein. *Biopolymers* 1999;51(5):311-32.
- [132] Kochendoerfer GG, Tack JM, Cressman S. Total chemical synthesis of a 27 kDa TASP protein derived from the MscL ion channel of *M. tuberculosis* by ketoxime-forming ligation. *Bioconjug Chem* 2002 May-Jun;13(3):474-80.
- [133] Zeng W, Jackson DC, Rose K. Synthesis of a new template with a built-in adjuvant and its use in constructing peptide vaccine candidates through polyoxime chemistry. *J Pept Sci* 1996;2(1):66-72.
- [134] Nyanguile O, Mutter M, Tuchscherer G. Synthesis of antiparallel 4 α -helix bundle TASP by chemoselective ligation. *Letters in Peptide Science* 1994;1(1):9-16.
- [135] Rose K, Zeng W, Brown LE, Jackson DC. A synthetic peptide-based polyoxime vaccine construct of high purity and activity. *Molecular Immunology* 1995 1995/10;32(14-15):1031-7.
- [136] Zeng W, Jackson DC, Murray J, Rose K, Brown LE. Totally synthetic lipid-containing polyoxime peptide constructs are potent immunogens. *Vaccine* 2000 2000/1/6;18(11-12):1031-9.

- [137] Rose K. Facile synthesis of homogeneous artificial proteins. *J Am Chem Soc* 1994;116(1):30-3.
- [138] Wahl F, Mutter M. Analogues of oxytocin with an oxime bridge using chemoselectively addressable building blocks. *Tetrahedron Letters* 1996;37(38):6861-4.
- [139] Spetzler JC, Tam JP. Unprotected peptides as building blocks for branched peptides and peptide dendrimers. *Int J Pept Protein Res* 1995;45(1):78-85.
- [140] Mezo G, Manea M, Jakab A, Kapuvári B, Bosze S, Schlosser G, et al. Synthesis and structural characterization of bioactive peptide conjugates using thioether linkage approaches. *J Pept Sci* 2004;10(12):701-13.
- [141] Azam F, Bladon CM. Synthetic approaches to macromolecular models for ion channel proteins. *Tetrahedron Letters* 1998;39(35):6377-80.
- [142] Mezo G, de Oliveira E, Krikorian D, Feijlbrieff M, Jakab A, Tsikaris V, et al. Synthesis and comparison of antibody recognition of conjugates containing herpes simplex virus type 1 glycoprotein D epitope VII. *Bioconjug Chem* 2003;14(6):1260-9.
- [143] Canne LE, Ferre- D'Amare AR, Burley SK, Kent SBH. Total Chemical Synthesis of a Unique Transcription Factor-Related Protein: cMyc-Max. *J Am Chem Soc* 1995;117(11):2998-3007.
- [144] Zhang L, Tam JP. Thiazolidine formation as a general and site-specific conjugation method for synthetic peptides and proteins. *Anal Biochem* 1996;233(1):87-93.
- [145] Shao J, Tam JP. Unprotected Peptides as Building Blocks for the Synthesis of Peptide Dendrimers with Oxime, Hydrazone, and Thiazolidine Linkages. *J Am Chem Soc* 1995;117(14):3893-9.
- [146] Vanderesse R, Thevenet L, Marraud M, Boggetto N, Reboud M, Corbier C. α -aminoxy acids as building blocks for the oxime and hydroxylamine pseudopeptide links. Application to the synthesis of human elastase inhibitors. *Journal of Peptide Science* 2003;9(5):282-99.
- [147] Rose K, Zeng W, Regamey PO, Chernushevich IV, Standing KG, Gaertner HF. Natural peptides as building blocks for the synthesis of large protein-like molecules with hydrazone and oxime linkages. *Bioconjug Chem* 1996 Sep-Oct;7(5):552-6.
- [148] Poethko T, Schottelius M, Thumshirn G, Hersel U, Herz M, Henriksen G, et al. Two-step methodology for high-yield routine radiohalogenation of peptides: (18 F)-labeled RGD and octreotide analogs. *J Nucl Med* 2004 May;45(5):892-902.



- [149] Bure C, Lelievre D, Delmas A. Identification of by-products from an orthogonal peptide ligation by oxime bonds using mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2000;14(23):2158-64.
- [150] Geoghegan KF, Stroh JG. 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. *Bioconjug Chem* 1992 Mar-Apr;3(2):138-46.
- [151] Gaertner HF, Rose K, Cotton R, Timms D, Camble R, Offord RE. Construction of protein analogues by site-specific condensation of unprotected fragments. *Bioconjug Chem* 1992 May-Jun;3(3):262-8.
- [152] Vilaseca LA, Rose K, Werlen R, Meunier A, Offord RE, Nichols CL, et al. Protein conjugates of defined structure: synthesis and use of a new carrier molecule. *Bioconjug Chem* 1993 Nov-Dec;4(6):515-20.
- [153] Chelius D, Shaler TA. Capture of peptides with N-terminal serine and threonine: a sequence-specific chemical method for Peptide mixture simplification. *Bioconjug Chem* 2003 Jan-Feb;14(1):205-11.
- [154] Zhao Y, Kent SB, Chait BT. Rapid, sensitive structure analysis of oligosaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Mar 4;94(5):1629-33.
- [155] Cervigni SE, Dumy P, Mutter M. Synthesis of Glycopeptides and Lipopeptides by Chemoselective Ligation. *Angewandte Chemie (International Edition in English)* 1996;35(11):1230-2.
- [156] Durieux P, Fernandez-Carneado J, Tuchscherer G. Synthesis of biotinylated glycosulfopeptides by chemoselective ligation. *Tetrahedron Letters* 2001;42(12):2297-9.
- [157] Peluso S, Imperiali B. Asparagine surrogates for the assembly of N-linked glycopeptide mimetics by chemoselective ligation. *Tetrahedron Letters* 2001;42(11):2085-7.
- [158] Nielsen EB, Schellman JA. The absorption spectra of simple amides and peptides. *The Journal of physical chemistry* 1967;71(7):2297-304.
- [159] Woody RW, Tinoco Jr I. Optical rotation of oriented helices. III. Calculation of the rotatory dispersion and circular dichroism of the alpha- and 310-helix. *The Journal of Chemical Physics* 1967;46(12):4927-45.
- [160] Moffitt W. Optical rotatory dispersion of helical polymers. *The Journal of Chemical Physics* 1956;25(3):467-78.
- [161] Madison V, Schellman J. Optical activity of polypeptides and proteins. *Biopolymers - Peptide Science Section* 1972;11(5):1041-76.



- [162] Applequist J. A full polarizability treatment of the π - π^* absorption and circular dichroic spectra of α -helical polypeptides. *The Journal of Chemical Physics* 1979;71(11):4332-8.
- [163] Brahms S, Brahms J, Spach G, Brack A. Identification of β , β -turns and unordered conformations in polypeptide chains by vacuum ultraviolet circular dichroism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1977;74(8):3208-12.
- [164] Woody RW. OPTICAL ROTATORY PROPERTIES OF BIOPOLYMERS. *J Polym Sci Macromol Rev* 1977;12:181-321.
- [165] Toniolo C, Bonora GM, Palumbo M. Linear oligopeptides. XLIII. Study of the relationship between conformation and nature of side chain: Homologous series derived from γ -branched amino acid residues. *Biopolymers* 1978;17(7):1713-27.
- [166] Balcerski JS, Pysh ES, Bonora GM, Toniolo C. Vacuum ultraviolet circular dichroism of β -forming alkyl oligopeptides. *Journal of the American Chemical Society* 1976;98(12):3470-3.
- [167] Toniolo C, Bonora GM, Salardi S. Study of the relationship between conformation and nature of side chains in linear oligopeptides: homologous series derived from β -branched amino acid residues. *International Journal of Biological Macromolecules* 1981;3(6):377-83.
- [168] Kelly MM, Pysh ES, Bonora GM, Toniolo C. Vacuum ultraviolet circular dichroism of protected homooligomers derived from L-leucine. *Journal of the American Chemical Society* 1977;99(10):3264-6.
- [169] Bush CA, Sarkar SK, Kopple KD. Circular dichroism of beta turns in peptides and proteins. *Biochemistry* 1978;17(23):4951-4.
- [170] Gierasch LM, Deber CM, Madison V, Niu CH, Blout ER. Conformations of (X-L-Pro-Y)₂ cyclic hexapeptides. Preferred beta-turn conformers and implications for beta turns in proteins. *Biochemistry* 1981;20(16):4730-8.
- [171] Woody RW. Circular dichroism. *Methods in Enzymology* 1995;246:34-71.



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

- 1. ΑΝΑΦΟΡΑ
- 2. ΑΝΑΦΟΡΑ
- 3. (R) ΑΝΑΦΟΡΑ
- 4. (N) ΑΝΑΦΟΡΑ
- 5. (P) ΑΝΑΦΟΡΑ

Αναφορά στην περίπτωση που ο ενδιαφερόμενος έχει υποβάλει αίτηση για την απόκτηση της ιδιότητας του δημοτικού συμβούλου ή του δημοτικού ελεγκτή.

Αναφορά στην περίπτωση που ο ενδιαφερόμενος έχει υποβάλει αίτηση για την απόκτηση της ιδιότητας του δημοτικού συμβούλου ή του δημοτικού ελεγκτή.

Αναφορά στην περίπτωση που ο ενδιαφερόμενος έχει υποβάλει αίτηση για την απόκτηση της ιδιότητας του δημοτικού συμβούλου ή του δημοτικού ελεγκτή.

Αναφορά στην περίπτωση που ο ενδιαφερόμενος έχει υποβάλει αίτηση για την απόκτηση της ιδιότητας του δημοτικού συμβούλου ή του δημοτικού ελεγκτή.

Αναφορά στην περίπτωση που ο ενδιαφερόμενος έχει υποβάλει αίτηση για την απόκτηση της ιδιότητας του δημοτικού συμβούλου ή του δημοτικού ελεγκτή.

Αναφορά στην περίπτωση που ο ενδιαφερόμενος έχει υποβάλει αίτηση για την απόκτηση της ιδιότητας του δημοτικού συμβούλου ή του δημοτικού ελεγκτή.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

- Actm:** ακεταμιδομεθυλομάδα
- Ala (A):** αλανίνη
- Alloc:** Αλλυλοξυ-καρβονυλομάδα
- Allyl:** Αλλυλομάδα
- Arg (R) :** αργινίνη
- Asn (N):** ασπαραγίνη
- Asp (D):** ασπαρτικό οξύ
- Boc:** t-βουτοξυ-καρβονυλομάδα
- BOP:** βενζοτρίαζολ-1-υλ-οξυ-τρις-(διμεθυλαμινο)-φωσφονικό εξαφθοροφωσφορικό άλας
- BroP:** βρωμο-τρις-(διμεθυλαμινο)-φωσφονικό εξαφθοροφωσφορικό άλας
- Bzl:** βενζυλομάδα
- CD:** (Circular dichroism) κυκλικός διχρωϊσμός
- Cys (C):** κυστεΐνη
- CTL:** κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα
- DCC:** N,N-δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμίδιο
- DIC:** N,N-διϊσοπροπυλοκαρβοδιϊμίδιο
- DCM:** διχλωρομεθάνιο
- Dde:** 1-(4,4-διμεθυλο-2,6-διοξο-κυκλοεξ-1-υλιδεν)αιθυλομάδα
- DMF:** διμεθυλοφορμαμίδιο
- DIEA:** διϊσοπροπυλοαιθυλαμίνη
- DMSO:** διμεθυλοσουλφοξείδιο
- DMS:** διμεθυλοσουλφίδιο
- Dnp:** 2,4-δινιτροφαινυλομάδα
- ELISA:** Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay, Ανοσοπροσροφητική ανάλυση στερεάς φάσεως με σύνδεση ενζύμου
- EG:** αιθυλενογλυκόλη
- ESI-MS:** Electrospray Ionization-Mass Spectrometry, φασματομετρία μάζας ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό
- EMS:** αιθυλομεθυλοσουλφίδιο
- EDT:** αιθανοδιθειόλη
- Fmoc:** 9-Φλουορενυλο-μεθυλοξυ-καρβονυλομάδα

Gln (Q): γλουταμίνη
Glu (E): γλουταμινικό οξύ
Gly (G): γλυκίνη
HA: αιμοσυγγολητίνη
HBTU: ο-βενζοτριαζολυλο-τετραμεθυλο-ισουρονικό εξαφθοροφωσφορικό άλας
HPAIV: υψηλής παθογένειας ιός γρίπης των πτηνών
HF: υγρό υδροφθόριο
HFIP: εξαφθορο-ισοπροπανόλη
His (H): ιστιδίνη
HOBt: 1-υδροξυβενζοτριαζόλιο
HPLC: Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
Ile (I): ισολευκίνη
ivDde: 1-(4,4-διμεθυλο-2,6-διοξο-κυκλοεξ-1-υλιδεν)-3-μεθυλ-βουτυλομάδα
IR : Φασματοσκοπία Υπεριώδους
Leu (L): λευκίνη
Lys (K): λυσίνη
LPAIV: Low Pathogenic Avian Influenza Virus, χαμηλής παθογένειας ιός γρίπης των πτηνών
MeOH: μεθανόλη
Met (M): μεθειονίνη
Mmt: 4-μεθοξυ-τριτυλομάδα
Mtt: 4-μεθυλο-τριτυλομάδα
Mtr: 4-μεθοξυ-2,3,6-τριμεθυλοφαινυλο-σουλφονυλομάδα
Mts: 2,4,6-τριμεθυλοφαινυλο-σουλφονυλομάδα
MHC: Major Histocompatibility Complex, Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας
NA: Νευραμινιδάση
NMR Spectroscopy: Nuclear Magnetic Resonance, Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού
OtBu: t-βουτοξυομάδα
OBzl: βενζυλοξυομάδα
OcHx: κυκλοεξυλοξυομάδα
Pbf: 2,2,4,6,7-πενταμεθυλο-διϋδροβενζοφουρανο-5-σουλφονυλομάδα
PBS: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών



Phe (F): φαινυλαλανίνη
Pmc: 2,2,5,7,8-πενταμεθυλο-χρωμαιο-6-σουλφονυλομάδα
Pro (P): προλίνη
PyBOP: βενζοτρίαζολ-1-υλ-οξυ-τρις-πυρολιδινό-φωσφονικό εξαφθοροφωσφορικό άλας
PyBrop: βρωμο-τρις-πυρολιδινό-φωσφονικό εξαφθοροφωσφορικό άλας
Ser (S): σερίνη
SPPS: Solid Phase Peptide Synthesis, πεπτιδική σύνθεση στερεής φάσης
TBTU: ο-βενζοτρίαζολυλο-τετραμεθυλο-ισοουρονικό τετραφθοροβορικό άλας
TES: τριαιθυλοσιλάνιο
TFA: τριφθοροξικό οξύ
TFE: τριφθοροαιθανόλη
TFMSA: τριφθορομεθανοσουλφονικό οξύ
tBu: t-βουτυλομάδα
Thr (T): θρεονίνη
TIS: τριϊσοπροπυλοσιλάνιο
Tos: π-τολουόλο-σουλφονυλομάδα
Trp (W): τρυπτοφάνη
Trt: τριτυλομάδα (τριφαινυλομεθυλομάδα)
Tyr (Y): τυροσίνη
Val (V): βαλίνη
Xan: Ξανθυλομάδα
Z: βενζυλοξυκαρβονυλομάδα
2-Cl-Z: 2-χλωρο- βενζυλοξυκαρβονυλομάδα

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΣΠΟΥΔΕΣ

- 2005-σήμερα Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής, Εργαστήριο Χημείας Πεπτιδίων, Τομέας Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, με θέμα «Επαναλαμβανόμενοι ολιγοπεπτιδικοί φορείς για διαγνωστικούς ελέγχους και εμβόλια»
- 2002-2005 Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης στην «Κλινική Βιοχημεία και Ανοσοχημεία-Μικροβιακή Βιοτεχνολογία», του Μεταπτυχιακού Προγράμματος «Χημικές και Βιοχημικές Τεχνολογίες», Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Θέμα Διπλωματικής Διατριβής: «Σύνθεση, διαμορφωτική και ανοσοχημική μελέτη πολυπεπτιδίων-μοντέλων κολλαγόνου: εφαρμογές στην ανίχνευση της φθοράς κολλαγόνου έργων τέχνης»
- 1997-2001 Πτυχίο Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. Βαθμός Πτυχίου: Λίαν Καλώς (7,08)

ΓΝΩΣΗ Η/Υ

ECDL
Core Certificate 2007

Ενότητες: Βασικές Έννοιες Πληροφορικής, Χρήση Η/Υ- Διαχείριση Αρχείων, Επεξεργασία Κειμένου, Υπολογιστικά Φύλλα, Βάσεις Δεδομένων, Παρουσιάσεις, Υπηρεσίες Διαδικτύου

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά

Άριστα, Πτυχίο Proficiency of Michigan, 2006

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

01-03-2004 έως
30-06-2004

Υποτροφία Αναμορφωμένου Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (ΕΠΕΑΕΚ II, Γ' ΚΠΣ)

ΕΠΙΚΟΥΡΙΚΟ-ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΕΡΓΟ



Προσφορά επικουρικού εκπαιδευτικού έργου κατά τα ακαδημαϊκά έτη 2003-2004, 2005-2006 και 2008-2009, στο εργαστηριακό μάθημα **Εργαστήριο Βιοχημείας**, που διδάσκεται στο χειμερινό εξάμηνο (7^ο) του Δ' Έτους του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ

- | | |
|---|---|
| 01-05-2007 έως
30-04-2009 | Σύμβαση ανάθεσης έργου με την Επιτροπή Ερευνών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στο έργο: «Μοριακοί Παράγοντες και Μηχανισμοί της Μετάδοσης και Παθογένειας του Υψηλής Παθογένειας Ιού της Γρίπης των Πτηνών» (Κωδικός Έργου 32166, χρηματοδότηση ΕΕ (100%), SIXTH FRAMEWORK PROGRAMME) |
| 01-10-2005 έως
31-12-2006 | Σύμβαση ανάθεσης έργου με την Επιτροπή Ερευνών του ΤΕΙ Αθήνας στο έργο: «ΕΠΕΑΕΚ Αρχιμήδης II-Ενίσχυση Ερευνητικών Ομάδων στο ΤΕΙ Αθήνας κωδικός MIS 99910» (χρηματοδότηση ΥΠΕΠΘ / Γ' ΚΠΣ) |
| 01-07-2004 έως
31-10-2004
και
01-03-2005 έως
30-06-2005 | Συμβάσεις ανάθεσης έργου με την Επιτροπή Ερευνών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στο έργο: « Τεχνολογία Laser για τη συντήρηση γλυπτών» (Κωδικός Έργου 62/1645, χρηματοδότηση ΙΤΕ-ΓΓΕΤ) |
| 12-2001 έως
09-2002 | Ερευνητική απασχόληση στο Εργαστήριο Φυσικοχημικών Τεχνικών του Τμήματος Συντήρησης Αρχαιοτήτων και Έργων Τέχνης (ΣΑΕΤ) του ΤΕΙ Αθήνας, στον τομέα της ανάλυσης και χαρακτηρισμού των οργανικών υλικών κατασκευής μουσειακών αντικειμένων και μνημείων, με χρωματογραφικές τεχνικές.
Παράλληλη ερευνητική απασχόληση και στο Εργαστήριο Φυσικοχημικών Αναλύσεων της Διεύθυνσης Συντήρησης της ΕΘΝΙΚΗΣ ΠΙΝΑΚΟΘΗΚΗΣ - ΜΟΥΣΕΙΟ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥ ΣΟΥΤΖΟΥ , στις φυσικοχημικές αναλύσεις έργων τέχνης |
| 15-01-2002 έως
15-07-2002 | Εργαστήριο Παροχής Υπηρεσιών «ΕΥΡΙΑΔΙΚΗ», Τμήμα ΣΑΕΤ, ΤΕΙ Αθήνας
Αναλύσεις συνδετικών μέσω βυζαντινών και μεταβυζαντινών τοιχογραφιών και επιχρισμάτων αρχαίων ναών με Αέρια Χρωματογραφία (GC) και Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) , στα πλαίσια παροχής υπηρεσιών |



ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. «Φυσικοχημική μελέτη των στρωμάτων αυγοτέμπερας σε έργα τέχνης»
Ε. Ιωακείμογλου, Σ. Ζεβγίτη, Α. Τερλιξή, *Χημικά Χρονικά*, 64(9) 2002, 250-254
2. “Collagen models as a probe in the decay of works of art: Synthesis, Conformation and Immunological studies”
Stella Zevgiti, Constantinos Sakarellos, Maria Sakarellos-Daitsiotis, Eleni Ioakimoglou and Eugenia Panou-Pomonis, *Journal of Peptide Science*, 2007; 13: 121-127
3. “The presence of antibodies recognizing a peptide derived from the second conserved region of HIV-1 gp120 correlates with non-progressive HIV infection”
Ana Djordjevic, Milena Veljkovic, Sascha Antoni, Maria Sakarellos-Daitsiotis, Dimitrios Krikorian, Stella Zevgiti, Ursula Dietrich and Nevena Veljkovic and Donald R. Branch, *Current HIV Research*, 5(5), September 2007, 443-448
4. “A palmitoyl-tailed Sequential Oligopeptide Carrier for engineering immunogenic conjugates”
Michael Kargakis, Stella Zevgiti, Dimitrios Krikorian, Maria Sakarellos-Daitsiotis, Constantinos Sakarellos and Eugenia Panou-Pomonis, *Vaccine*, 25 (2007), 6708-6712
5. “Artificial carriers as a tool for engineering reconstituted protein mimics”
D. Krikorian, S. Zevgiti, T. Skarlas, D. Dimtsoudi, S. Papas, E. Panou-Pomonis, V. Tsikaris, M. Sakarellos-Daitsiotis and C. Sakarellos, Review in book, Peptides, Editor Paul Kordopatis, under publication (2008)

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΠΛΗΡΗ ΠΡΑΚΤΙΚΑ ΔΙΕΘΝΩΝ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ

1. Synthesis, Conformational and Immunological studies of collagen models: applications in works of art. Stella Zevgiti, Eugenia Panou, Maria Sakarellos-Daitsiotis, Eleni Ioakimoglou, Constantinos Sakarellos. 4th Hellenic Forum on Bioactive Peptides, (P.A. Cordopatis, E. Manessi-Zoupa and G.N. Pairas Eds.), TYPORAMA-Tachytypo Ltd, Patras, Greece, 2004, pp.331-335
2. Collagen models: Synthesis, conformational studies and applications in works of art. Stella Zevgiti, Eugenia Panou, Constantinos Sakarellos, Maria Sakarellos-Daitsiotis and Eleni Ioakimoglou. In ‘Peptides 2004’ (Flegel, M., Fridkin, M., Gilon, C., Slaninova, J., Eds.), 2004, pp.936-937
3. Development of an immunoassay for the detection of natural anti-NTM/VIP antibodies of HIV-1. Dimitrios Krikorian, Stella Zevgiti, Veljko Veljkovic, Maria Sakarellos-Daitsiotis and Constantinos Sakarellos. 5th Hellenic Forum on Bioactive Peptides, (P.A. Cordopatis, E. Manessi-Zoupa and G.N. Pairas Eds.), TYPORAMA-Tachytypo Ltd, Patras, Greece, 2006, pp.217-222
4. Development of diagnostics and vaccine candidates for the highly pathogenic H5N1 influenza virus. Stella Zevgiti, Dimitrios Krikorian, Veljko Veljkovic, Maria



Sakarellos-Daitsiotis and Constantinos Sakarellos. In 'Peptides 2006' (Rolka, K., Rekowski, P., Silberring, J., Eds.), 2006, pp.44-45

5. Development of a diagnostic immunoassay for the detection of natural anti-NTM/VIP antibodies of HIV-1. Dimitrios Krikorian, **Stella Zevgiti**, Veljko Veljkovic, Maria Sakarellos-Daitsiotis and Constantinos Sakarellos. In 'Peptides 2006' (Rolka, K., Rekowski, P., Silberring, J., Eds.), 2006, pp.50-51
6. SOC₄-sialyl saccharide conjugates as mimetics of the hemagglutinin-binding receptor and as vaccine candidates against Avian Influenza Virus infection. **Stella Zevgiti**, Dimitrios Krikorian, Eugenia Panou-Pomonis, Thomas Haarmann, Ursula Dietrich and Maria Sakarellos-Daitsiotis. 6th Hellenic Forum on Bioactive Peptides, Patras, Greece, 2008 (in press)

ABSTRACT ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Synthesis, Conformational and Immunological studies of collagen models: applications in works of art
S. Zevgiti, E. Panou, M. Sakarellos-Daitsiotis, E. Ioakimoglou, C. Sakarellos
J. Peptide Sci., 2004, Vol 10, Is S1, p H58
2. Collagen models: Synthesis, conformational studies and applications in works of art
Stella Zevgiti, Eugenia Panou, Constantinos Sakarellos, Maria Sakarellos-Daitsiotis and Eleni Ioakimoglou
J. Peptide Sci., 2004, Vol 10, Is S2, p 260
3. Development of diagnostics and vaccine candidates for the highly pathogenic H5N1 influenza virus
Stella Zevgiti, Dimitrios Krikorian, Veljko Veljkovic, Maria Sakarellos-Daitsiotis and Constantinos Sakarellos
J. Peptide Sci., 2006, Vol 12, Is S1, p 585
4. Development of a diagnostic immunoassay for the detection of natural anti-NTM/VIP antibodies of HIV-1
Dimitrios Krikorian, **Stella Zevgiti**, Veljko Veljkovic, Maria Sakarellos-Daitsiotis and Constantinos Sakarellos
J. Peptide Sci., 2006, Vol 12, Is S1, p 603

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Αναγνώριση της ταυτότητας των συνδετικών μέσων μεταβυζαντινών τοιχογραφιών με χρωματογραφικές τεχνικές
Ε. Ιωακείμογλου, Ε. Καβαλιεράτου, **Σ. Ζευγίτη**, Κ. Στουπάθης, Ε. Κουλουμπή
4^ο Συμπόσιο Ελληνικής Αρχαιομετρικής Εταιρείας, 28-31 Μαΐου 2003, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα
2. Synthesis, Conformational and Immunological studies of collagen models: applications in works of art (poster)
Stella Zevgiti, Eugenia Panou, Maria Sakarellos-Daitsiotis, Eleni Ioakimoglou, Constantinos Sakarellos
4th Hellenic Forum on Bioactive Peptides, April 22-24, 2004, Patra, Greece



3. Collagen models: Synthesis, conformational studies and applications in works of art (poster)
Stella Zevgiti, Eugenia Panou, Constantinos Sakarellos, Maria Sakarellos-Daitsiotis and Eleni Ioakimoglou
3rd International and 28th European Peptide Symposium, September 5-10, 2004, Prague, Czech Republic
4. Ένας νέος φορέας αντιγονικών επιτόπων για την ανάπτυξη διαγνωστικών και εμβολίων: εφαρμογές στο HIV-1 και στον ιό H5N1 της γρίπης των πτηνών
M. Σακαρέλλου-Δαϊτσιώτου, Δ. Κρικориάν, **Στ. Ζευγίτη**, V. Veljkovic, K. Σακαρέλλος
8^ο Πανελλήνιο συνέδριο Ιολογίας, 12-14 Μαΐου, 2006, Θεσσαλονίκη
5. Design of diagnostics and vaccine candidates for the highly pathogenic H5N1 influenza virus (poster)
Stella Zevgiti, Dimitrios Krikorian, Veljko Veljkovic, Maria Sakarellos-Daitsiotis and Constantinos Sakarellos
5th Hellenic Forum on Bioactive Peptides, May 14-16, 2006, Patra, Greece
6. Development of an immunoassay for the detection of natural anti-NTM/VIP antibodies of HIV-1
Dimitrios Krikorian, **Stella Zevgiti**, Veljko Veljkovic, Maria Sakarellos-Daitsiotis and Constantinos Sakarellos
5th Hellenic Forum on Bioactive Peptides, May 14-16, 2006, Patra, Greece
7. Development of diagnostics and vaccine candidates for the highly pathogenic H5N1 influenza virus (poster)
Stella Zevgiti, Dimitrios Krikorian, Veljko Veljkovic, Maria Sakarellos-Daitsiotis and Constantinos Sakarellos
29th European Peptide Symposium, September 3-8, 2006, Gdnask, Poland
8. Development of a diagnostic immunoassay for the detection of natural anti-NTM/VIP antibodies of HIV-1 (poster)
Dimitrios Krikorian, **Stella Zevgiti**, Veljko Veljkovic, Maria Sakarellos-Daitsiotis and Constantinos Sakarellos
29th European Peptide Symposium, September 3-8, 2006, Gdnask, Poland
9. Chromatographic and immunochemical techniques as a probe in evaluating the extent of decay of collagen-based works of art (poster)
Stella Zevgiti, Eugenia Panou-Pomonis, Constantinos Sakarellos, Eleni Ioakimoglou and Maria Sakarellos-Daitsiotis
ICOM CONSERVATION COMMITTEE, International Meeting of the Special Interest Icons Group
Icons: Approaches to Research, Conservation and Ethical Issues, BENAKI MUSEUM-Pireos Street Annexe, Athens, 3-7 December 2006
10. SOC₄-sialyl saccharide conjugates as mimetics of the hemagglutinin-binding receptor and as vaccine candidates against Avian Influenza Virus infection (poster)

Stella Zevgiti, Dimitrios Krikorian, Eugenia Panou-Pomonis, Thomas Haarmann, Ursula Dietrich and Maria Sakarellos-Daitsiotis

6th Hellenic Forum on Bioactive Peptides, May 18-20, 2008, Patra, Greece

11. Ligation of T cell epitopes of hemagglutinin of Avian Influenza Virus H5N1 to an artificial carrier via oxime formation for immunization experiments (poster)

Theodore Skarlas, **Stella Zevgiti**, Eugenia Panou-Pomonis, Karoline Droebner, Oliver Planz and Maria Sakarellos-Daitsiotis

6th Hellenic Forum on Bioactive Peptides, May 18-20, 2008, Patra, Greece

12. SOC₄-sialyl saccharide conjugates as mimetics of the hemagglutinin-binding receptor and as vaccine candidates against Avian Influenza Virus infection (poster)

Stella Zevgiti, Dimitrios Krikorian, Eugenia Panou-Pomonis, Thomas Haarmann, Ursula Dietrich and Maria Sakarellos-Daitsiotis

1st Joint Bird Flu Meeting, February 2-4, 2009, Barcelona, Spain

13. Ligation of T cell epitopes of hemagglutinin of Avian Influenza Virus H5N1 to an artificial carrier via oxime formation for immunization experiments (poster)

Theodore Skarlas, **Stella Zevgiti**, Eugenia Panou-Pomonis, Karoline Droebner, Oliver Planz and Maria Sakarellos-Daitsiotis

1st Joint Bird Flu Meeting, February 2-4, 2009, Barcelona, Spain

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

4^ο Συνέδριο Χημείας «Βασική και Εφαρμοσμένη Χημική Έρευνα»

16-18 Μαΐου 2001

Τμήμα Χημείας

Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

«Μελέτη Οργανικών Υλικών στην Αρχαιολογία και στα Έργα Τέχνης»

Ελληνική Αρχαιομετρική Εταιρεία

15 Ιανουαρίου 2002

Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

4^ο Συμπόσιο Αρχαιομετρίας «Αρχαιομετρικές Μελέτες στο Αιγαίο: ανασκόπηση και πρόσφατες εξελίξεις»

Ελληνική Αρχαιομετρική Εταιρεία

28-31 Μαΐου 2003

Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

4^ο Ελληνικό Forum Βιοδραστικών Πεπτιδίων

22-24 Απριλίου 2004

Πανεπιστήμιο Πατρών

2^ο Συνέδριο Ελληνικής Κρυσταλλογραφικής Εταιρείας

15-16 Οκτωβρίου 2004

ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος



5^ο Ελληνικό Forum Βιοδραστικών Πεπτιδίων
14-16 Μαΐου 2006
Πανεπιστήμιο Πατρών

Εικόνες: Έρευνα, Συντήρηση και θέματα Δεοντολογίας
03-07 Δεκεμβρίου 2006
Μουσείο Μπενάκη-Κτήριο οδού Πειραιώς

6^ο Ελληνικό Forum Βιοδραστικών Πεπτιδίων
18-20 Απριλίου 2008
Πανεπιστήμιο Πατρών

1st Joint Bird Flu Meeting
2-4 Φεβρουαρίου 2009
Βαρκελώνη, Ισπανία

