



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΣΥΝΘΕΤΙΚΟΙ ΠΕΠΤΙΔΙΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ ΓΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗ
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ
ΕΝΑΝΤΙ ΤΩΝ ΙΩΝ H5N1 ΚΑΙ HIV

ΘΕΟΔΩΡΟΣ Κ. ΣΚΑΡΛΑΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

που εκπονήθηκε στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2010

Ημερομηνία **αίτησης** του κ. Σκάρλα Θεόδωρου: 02-04-2007

Ημερομηνία **ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής** Γ.Σ.Ε.Σ.: 666^A/27-04-2007

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα:

Ευγενία Πάνου-Πομώνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Μέλη:

Μαρία Σακαρέλλου-Δαϊτσιώτου, Καθηγήτρια

Κωνσταντίνος Σακαρέλλος, Καθηγητής

Ημερομηνία **ορισμού θέματος:** Γ.Σ. 667^A/11-05-2007

Θέμα: «Συνθετικοί πεπτιδικοί φορείς για ανάπτυξη διαγνωστικών και προστατευτικής ανοσίας έναντι των ιών H5N1 και HIV»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ Γ.Σ.Ε.Σ.: 797^A/10-09-2010

1. Ευγενία Πάνου-Πομώνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Επιβλέπουσα
2. Μαρία Σακαρέλλου-Δαϊτσιώτου, Καθηγήτρια
3. Κωνσταντίνος Σακαρέλλος, Καθηγητής
4. Βασίλειος Τσίκαρης, Καθηγητής
5. Αλέξανδρος Τσελέπης, Καθηγητής
6. Δημόκριτος Τσουκάτος, Καθηγητής
7. Άννα-Ειρήνη Κούκκου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό: «Άριστα» στις 28-09-2010

Ο Θεός "ἔδωκεν ἀνθρώποις ἐπιστήμην ἐνδοξάζεσθαι ἐν τοῖς
θαυμασίοις αὐτοῦ".

*Σοφία Σειράχ ΑΗ,6 Παλαιά Διαθήκη κατά τούς Εβδομήκοντα, έκδοσης Αποστολικής Διακονίας της Εκκλησίας της Ελλάδος, σ.
1137.*

Αφιερώνεται στην ιερή μνήμη της μητέρας μου

Γιαννούλας

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Χημείας Πεπτιδίων του Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων το χρονικό διάστημα Απρίλιος 2007-Σεπτέμβριος 2010. Το κομμάτι της διδακτορικής διατριβής που αφορά τον υψηλής παθογένειας ιό της γρίπης των πτηνών H5N1 αποτελεί μέρος του Ερευνητικού Ευρωπαϊκού Προγράμματος Euroflu.

Το θέμα της εργασίας μου ανατέθηκε από τριμελή συμβουλευτική επιτροπή αποτελούμενη από την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Ευγενία Πάνου-Πομώνη (ως επιβλέπουσα), την Καθηγήτρια κ. Μαρία Σακαρέλλου-Δαϊτσιώτου και τον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Σακαρέλλο, τους οποίους ευχαριστώ θερμά για την άμεση επίβλεψη, το ενδιαφέρον και καθοδήγησή τους καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής.

Ευχαριστώ επίσης τον Καθηγητή κ. Βασίλειο Τσίκαρη για το ενδιαφέρον του και τις πολύτιμες συμβουλές του κατά την εκπόνηση της εργασίας μου.

Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Γερμανούς συναδέλφους για την διεξαγωγή των βιολογικών πειραμάτων καθώς και για την πολύ καλή συνεργασία τους.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συναδέλφους μου στο εργαστήριο για την άριστη συνεργασία μαζί τους καθώς και την βοήθειά τους όποτε και όπου χρειάστηκε.

Σκάρλας Θεόδωρος

Ιωάννινα 2010

Περιεχόμενα

Πρόλογος

Θεωρητικό Μέρος

Κεφάλαιο 1^ο: Ανοσοποιητικό Σύστημα

1.1 Εισαγωγή.....	5
1.2 Εγγενής (Φυσική) και Επίκτητη (Ειδική) ανοσία.....	6
1.3 Τύποι Επίκτητης (ειδικής) ανοσίας.....	7
1.4 Κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.....	7
1.4.1 T- λεμφοκύτταρα	9
1.4.2 B-λεμφοκύτταρα.....	11
1.4.3 Μονοκύτταρα-Μακροφάγα.....	11
1.5 Υποδοχείς αντιγόνων.....	12
1.5.1 Αντισώματα	12
1.5.2 Υποδοχέας των T-λεμφοκυττάρων (TCR- T Cell Receptor)αντιγόνων.....	15
1.6 Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας (MHC: Major Histocompatibility Complex) 15	
1.7 Ανοσολογική Απόκριση.....	18
1.8 Ανοσία εναντίον των ιών	19
1.8.1 Εγγενής (Φυσική) Ανοσοποιητική απόκριση προς τους ιούς	20
1.8.2 Επίκτητη (Ειδική) Ανοσοποιητική απόκριση προς τους ιούς.....	21
1.9 Εμβόλια.....	21
1.10 Επίκτητες (δευτεροπαθείς) ανοσοανεπάρκειες.....	23

Κεφάλαιο 2^ο:

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ: Στοιχεία Ιολογίας

I.2.1 Ορισμός των ιών.....	29
I.2.2 Κύριες γενικές ιδιότητες των ιών	30
I.2.3 Γενική μορφολογία ιών	31
I.2.4 Χημική σύνθεση των ιών	32
I.2.5 Αναπαραγωγή (πολλαπλασιασμός) των ιών	33
I.2.6 Αναπαραγωγικός κύκλος ιών-Στάδια αναπαραγωγής.....	34
I.2.6.1 Αναπαραγωγή RNA-ιών.....	37
I.2.6.2 RNA ιοί με αρνητική μονή έλικα ssRNA (-).....	38
I.2.6.3 Ρετροϊοί – (Ιοί με μονή έλικα ssRNA (+) με ενδιάμεσο DNA)	39

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A) Ιός της Γρίπης – Ιός τη γρίπης των πτηνών (H5N1)

II.2.A.1 Εισαγωγή.....	43
II.2.A.2 Δομή του ιού.....	46
II.2.A.3 Κύκλος αναπαραγωγής του ιού της γρίπης.....	49
II.2.A.4 Υψηλής παθογένειας ιός της γρίπης των πτηνών H5N1	52
II.2.A.5 Ανάπτυξη εμβολίου έναντι του ιού της γρίπης	61

B) Ιός της Ανθρώπινης Ανοσοανεπάρκειας (HIV)

II.2.B.1 Εισαγωγή	67
II.2.B.2 Δομή του ιού HIV.....	68
II.2.B.3 Αναπαραγωγή του ιού HIV.....	71
II.2.B.4 Προκλήσεις για την ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού εμβολίου έναντι του ιού HIV.....	76

Κεφάλαιο 3^ο: Συνθετικοί Φορείς

3.1 Εισαγωγή	83
3.2 Συνθετικοί Φορείς	84
3.3 Είδη συνθετικών φορέων	84
3.3.1 Συστήματα πολλαπλών αντιγονικών πεπτιδίων (Multiple Antigen Peptide System-MAPs).....	85
3.3.2 Διακλαδισμένα πολυπεπτίδια με σκελετό poly(Lys)	87
3.3.3 Σύστημα πρόσδεσης πεπτιδίων TASPs (Template-Assembled Synthetic Proteins)	88
3.4 Επαναλαμβανόμενοι Ολιγοπεπτιδικοί Φορείς (Sequential Oligopeptide Carriers-SOC _n)	88

Κεφάλαιο 4^ο: Αρχές Πεπτιδικής Σύνθεσης

4.1 Αμινοξέα- Πεπτίδια- Πρωτεΐνες	95
4.2 Πεπτιδικός Δεσμός.....	99
4.3 Στερεοχημεία του πεπτιδικού δεσμού.....	100
4.4 Σύντομη ιστορία της Χημείας των πεπτιδίων.....	103
4.5 Πεπτιδική Σύνθεση	110

4.6 Σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση	111
4.7 Πολυμερικά υποστρώματα (ρητίνες) για τη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση	113
4.8 Προστατευτικές ομάδες	120
4.9 Αμινοπροστατευτικές ομάδες	121
4.9.1 Fmoc-ομάδα	122
4.9.2 Boc-ομάδα	124
4.10 Προστασία των παράπλευρων δραστικών ομάδων των αμινοξέων	125
4.11 Ορθογωνική Προστασία	127
4.12 Μέθοδοι σχηματισμού πεπτιδικού δεσμού	128
4.13 Καρβοδιϊμίδια	129
4.13.1 Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού N-αλκοξυκαρβονυλάμινο αμινοξέων με καρβοδιϊμίδια	130
4.13.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την πορεία των αντιδράσεων καρβοδιϊμιδίων των N-αλκοξυκαρβονυλάμινο αμινοξέων	133
4.13.3 1-υδροξυβενζοτρίαζόλιο (HOBt) ως πρόσθετο στις αντιδράσεις καρβοδιϊμιδίων	133
4.14 Φωσφονικά και ουρονικά παράγωγα	135
4.14.1 Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού με O-Βενζοτρίαζολ-τετραμεθυλο-ουρονικό εξαφθοροφωσφορικό (HBTU) και τετραφθοροβορικό άλας (TBTU) των N-αλκοξυκαρβονυλάμινο αμινοξέων	136
4.14.2 Το HOBt ως πρόσθετο στις συζεύξεις φωσφονικού και ουρονικού τύπου αντιδραστηρίων N-αλκοξυκαρβονυλάμινο αμινοξέων	138
4.15 Χειρικότητα στην πεπτιδική σύνθεση	139
4.15.1 Μηχανισμοί ισομερίωσης	141
4.16 Ανεπιθύμητες Αντιδράσεις κατά τη διάρκεια της πεπτιδικής σύνθεσης- Σχηματισμός ασπαρτιμιδίου	143
4.17 Αποκοπή πεπτιδίου από τη ρητίνη (Fmoc-στρατηγική)	145

Κεφάλαιο 5^ο: Χημειοεκλεκτικές Μέθοδοι παρασκευής πρωτεϊνών και πεπτιδικών μακρομορίων με διακλαδισμένη δομή (chemoselective ligation)

5.1 Χημικές μέθοδοι παρασκευής πρωτεϊνών και πεπτιδικών μακρομορίων με διακλαδισμένη δομή	153
5.2 Χημειοεκλεκτική σύνδεση (chemoselective ligation)	153

5.3 Χημειοεκλεκτική σύνδεση με σχηματισμό μη-αμιδικού δεσμού	154
5.3.1 Χημειοεκλεκτική σύνδεση με σχηματισμό δεσμού οξίμης	155
5.4 Σχηματισμός αλδεϋδών σε πεπτίδια	156
5.5 Παράγοντες που επηρεάζουν τις αντιδράσεις χημειοεκλεκτικής σύνδεσης σχηματισμού δεσμού οξίμης	158

Κεφάλαιο 6^ο: Σκοπός της ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

.....	163
-------	-----

Πειραματικό Μέρος

Κεφάλαιο 7^ο: Σύνθεση, καθαρισμός και Ταυτοποίηση

7.1 Εισαγωγή	169
7.2 Γενική πορεία σύνθεσης	171
7.3 Σύνθεση αναλόγων με χημειοεκλεκτική σύνδεση μέσω σχηματισμού δεσμού οξίμης	175
7.4 Σύνθεση του φορέα Ac-SOC ₄ -(Ac ₂ , Aoa ₂)-NH ₂ (1)	177
7.5 Σύνθεση του Ac-SOC ₄ -[Ac ₂ , (VWTYNAELLK(CH=N-O)) ₂]-NH ₂ (2)	179
7.6 Σύνθεση του Ac-SOC ₄ -[Ac ₂ , (YNNTNQEDLK(CH=N-O)) ₂]-NH ₂ (3)	185
7.7 Σύνθεση του Ac-SOC ₄ -[Ac ₂ , (QLRDNAKELK(CH=N-O)) ₂]-NH ₂ (4)	191
7.8 Σύνθεση του Ac-SOC ₄ -[Ac ₂ , (MPFHNIHPLK(CH=N-O)) ₂]-NH ₂ (5)	197
7.9 Σύνθεση του φορέα Palm-SOC ₄ -(Aoa) ₄ -NH ₂ (6)	203
7.10 Σύνθεση του Palm-SOC ₄ -[LLTTNKDGAK(CH=N-O)] ₄ -NH ₂ (7)	205
7.11 Σύνθεση του Palm-SOC ₄ -[HKYPC(Acm)STTNC(Acm)SPK(CH=N-O)] ₄ -NH ₂ (8)	211
7.12 Σύνθεση του Ac-SOC ₄ -(LSLVPPA) ₄ -OH (9)	217
7.13 Σύνθεση του Ac-SOC ₄ -(ASAKWSIGPGRA) ₄ -OH (10)	219

Κεφάλαιο 8^ο: Βιολογικά Πειράματα

8.1 Εισαγωγή	223
8.2 Ανοσοποίηση ποντικών με SOC-συμπλέγματα T-κυτταρικών επιτόπων της HA του ιού της γρίπης των πτηνών H5N1 και αξιολόγηση της προστατευτικής ανοσίας	224

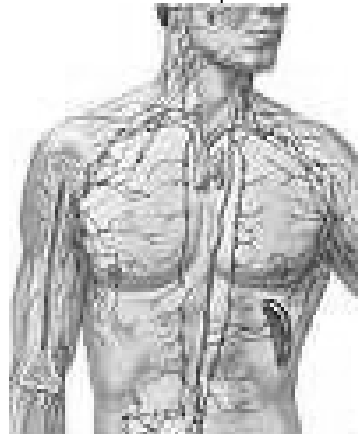
8.3 Πειράματα διασταυρωτής αντίδρασης των SOC ₄ -σύνπλεγμάτων (7)-(10) με ορούς ασθενών LTNP (Long-term non progressors) και ασθενών με εξέλιξη της ασθένειας (HIV-progressors)	225
8.4 Ανοσοποίηση ποντικών με το Ac-SOC ₄ -(ASAKWSIGPGRA) ₄ -OH σύνπλεγμα (10) και αξιολόγηση της δραστηριότητας των αντι-ορών τους in vitro	226
<u>Κεφάλαιο 9^ο: Αποτελέσματα –Συζήτηση</u>	231
<u>Κεφάλαιο 10^ο: Συμπεράσματα</u>	239
<u>Βιβλιογραφία</u>	243
<u>ΠΕΡΙΛΗΨΗ-SUMMARY</u>	263
<u>Παράρτημα</u>	269

Θεωρητικό Μέρος

Κεφάλαιο 1^ο

Ανοσοποιητικό Σύστημα

- Εισαγωγή
- Εγγενής (Φυσική) και Επίκτητη (Ειδική) ανοσία
- Τύποι Επίκτητης (ειδικής) ανοσίας
- Κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος
- T- λεμφοκύτταρα
- B-λεμφοκύτταρα
- Μονοκύτταρα-Μακροφάγα
- Υποδοχείς Αντιγόνων
- Αντισώματα
- Υποδοχέας T-λεμφοκυττάρων
- Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας (MHC)
- Ανοσολογική Απόκριση
- Ανοσία εναντίον των ιών
- Εγγενής (Φυσική) Ανοσοποιητική απόκριση προς τους ιούς
- Επίκτητη (Ειδική) Ανοσοποιητική απόκριση προς τους ιούς
- Εμβόλια
- Επίκτητες (δευτεροπαθείς) ανοσοανεπάρκειες



1.1 Εισαγωγή

Το περιβάλλον μας περιλαμβάνει μεγάλη ποικιλία βλαπτικών παραγόντων που μπορούν να προκαλέσουν νόσους ή ακόμη και θάνατο του ξενιστή τους. Το ανθρώπινο σώμα έχει την ικανότητα να αντιστέκεται σε όλους σχεδόν τους τύπους των μικροβίων (ιούς, βακτήρια, παθογόνοι μύκητες, παράσιτα) και τοξινών που τείνουν να προκαλέσουν βλάβες σε ιστούς και όργανα. Η ικανότητά του αυτή ονομάζεται **ανοσία** και το σύστημα το επιφορτισμένο γι' αυτή τη διεργασία ονομάζεται **ανοσοποιητικό σύστημα**. Ωστόσο, επειδή κάτω από ορισμένες συνθήκες οι μηχανισμοί που προστατεύουν τον οργανισμό είναι δυνατόν να προκαλέσουν ιστική βλάβη, ο σύγχρονος ορισμός της ανοσίας είναι η ικανότητα του οργανισμού να αντιδρά με διάφορες ξένες ουσίες, συμπεριλαμβανομένων μικροβίων και μακρομορίων, όπως π.χ. πρωτεϊνών, πολυσακχαριτών κ.α., χωρίς αυτό να συνιστά υποχρεωτικά μια φυσιολογική ή παθολογική διεργασία.

Επειδή υπάρχουν πολλά, διαφορετικά είδη μικροοργανισμών, απαιτείται μεγάλη ποικιλία ανοσοποιητικών αποκρίσεων για να αντιμετωπίζεται κάθε τύπος μόλυνσης. Η θέση απ' όπου ξεκινά κάποια μόλυνση και ο τύπος του παθογόνου αιτίου καθορίζουν κατά κύριο λόγο, το ποιες ανοσοποιητικές αποκρίσεις θα είναι αποτελεσματικές. Η σημαντικότερη διάκριση γίνεται μεταξύ εκείνων των αιτιών που εισβάλλουν στα κύτταρα του ξενιστή και εκείνων που δεν εισβάλλουν στα κύτταρα. Όλοι οι ιοί, ορισμένα βακτήρια και μερικά παρασιτικά πρωτόζωα πολλαπλασιάζονται μέσα στα κύτταρα του ξενιστή, οπότε, για να μπορέσει το ανοσοποιητικό σύστημα να εξουδετερώσει μια μόλυνση θα πρέπει να αναγνωρίσει και να καταστρέψει τα μολυσμένα αυτά κύτταρα. Ωστόσο, κατά την πορεία μιας

μόλυνσης, ακόμη και τα ενδοκυττάρια παθογόνα φθάνουν στα κύτταρα-στόχους τους μέσω του αίματος και των υγρών των ιστών. Στη φάση αυτή οι παθογόνοι μικροοργανισμοί είναι ευαίσθητοι σε στοιχεία του ανοσοποιητικού συστήματος τα οποία συνήθως αντιμετωπίζουν τα εξωκυττάρια παθογόνα.¹

1.2 Εγγενής (Φυσική) και Επίκτητη (Ειδική) ανοσία

Γενικά οποιαδήποτε ανοσοποιητική απόκριση περιλαμβάνει, **πρώτον**, αναγνώριση του παθογόνου ή άλλου ξένου υλικού, και **δεύτερον**, ανάπτυξη αντίδρασης εναντίον του, με σκοπό την εξάλειψη του. Οι διάφοροι τύποι ανοσοποιητικής απόκρισης διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: **Εγγενής (ή Φυσική)** και **Επίκτητη (ή ειδική)** ανοσοποιητική απόκριση.

Η **Εγγενής (ή Φυσική)** ανοσοποιητική απόκριση περιλαμβάνει γενικές διεργασίες όπως:

α) Φαγοκυττάρωση μικροβίων και άλλων εισβολέων από λευκοκύτταρα και κύτταρα του συστήματος των ιστικών μακροφάγων (χρησιμοποιούν πρωτόγονα, μη εξειδικευμένα συστήματα αναγνώρισης, τα οποία τους επιτρέπουν να συνδέονται με ποικιλία μικροβιακών προϊόντων).

β) Καταστροφή από τις όξινες εκκρίσεις του στομάχου και από πεπτικά ένζυμα, των μικροβίων που φθάνουν από την στοματική οδό στο στομάχι.

γ) Αντίσταση του δέρματος στην εισβολή μικροοργανισμών.

δ) Παρουσία στο αίμα ορισμένων χημικών ουσιών που προσκολλώνται στους ξένους μικροοργανισμούς ή στις τοξίνες και προκαλούν την καταστροφή τους.

Η **Επίκτητη (ή ειδική)** ανοσοποιητική απόκριση δεν αναπτύσσεται παρά μόνο όταν το σώμα υποστεί επίθεση από μικροβιακή νόσο ή τοξίνη και επιτελείται μέσω κυττάρων που λέγονται **λεμφοκύτταρα** και των εκκρινόμενων παραγόντων των κυττάρων αυτών, όπως τα **αντισώματα**. Κατά την ειδική ανοσοποιητική απόκριση αναγνωρίζεται μόριο που ονομάζεται **αντιγόνο** και προκαλεί τους ως άνω μηχανισμούς. Τα δύο κύρια χαρακτηριστικά της ειδικής ανοσοποιητικής απόκρισης είναι η **εξειδίκευση** (υψηλή εξειδίκευση για ένα συγκεκριμένο παθογόνο αίτιο) και η **μνήμη** (το ανοσοποιητικό σύστημα «θυμάται» το μολυσματικό παράγοντα και μπορεί να τον εμποδίσει να προκαλέσει νόσο αργότερα και βελτιώνεται σε κάθε επόμενη επαφή με το ίδιο παθογόνο αίτιο).

Στην πραγματικότητα παρατηρείται σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των λεμφοκυττάρων και των φαγοκυττάρων. Στα πρώτα στάδια της μόλυνσης κυριαρχούν οι

φυσικές αποκρίσεις, αλλά αργότερα τα λεμφοκύτταρα αρχίζουν να δημιουργούν ειδικές, ανοσοποιητικές αποκρίσεις.

1.3 Τύποι Επίκτητης (ειδικής) ανοσίας

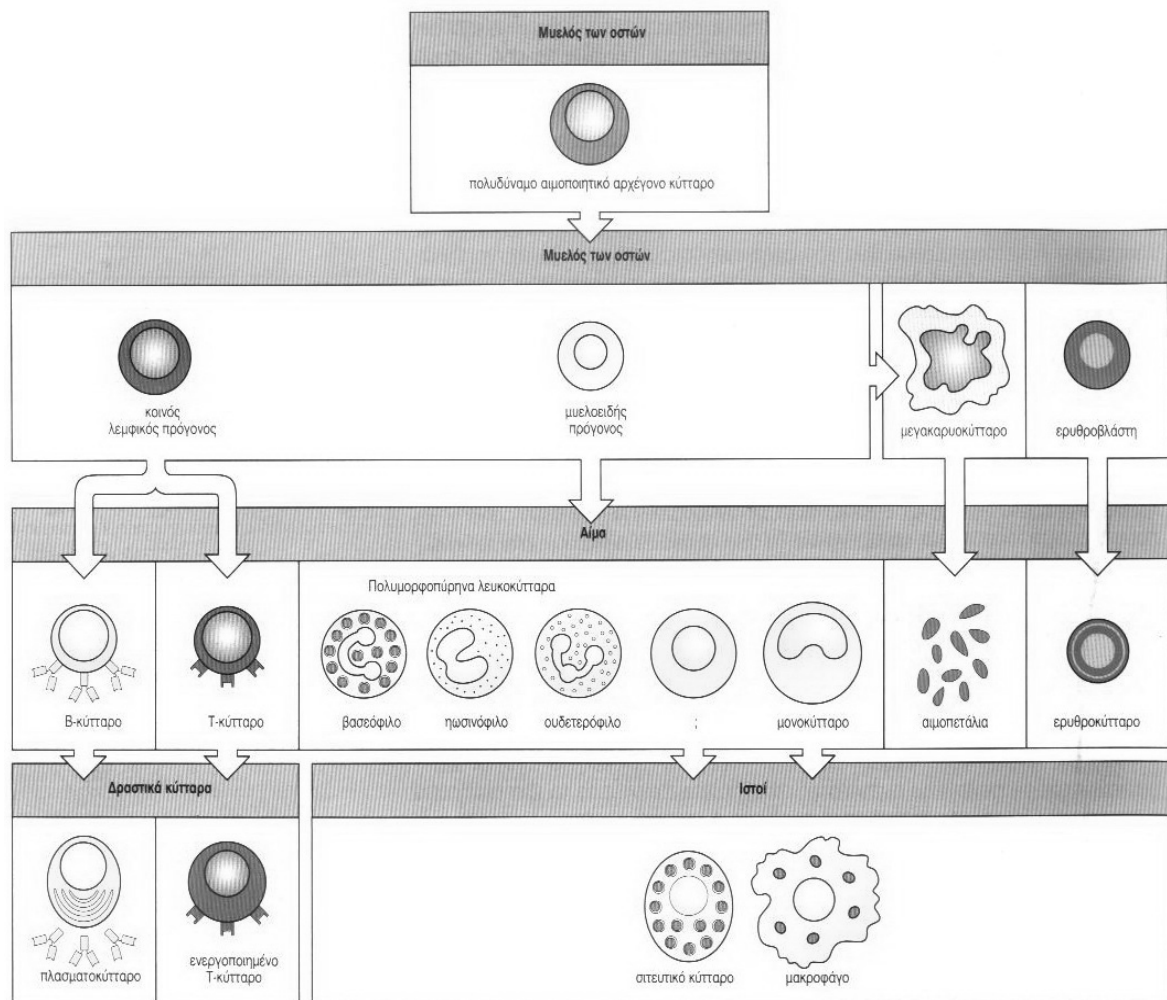
Υπάρχουν δύο βασικοί, αλλά στενά συσχετιζόμενοι μεταξύ τους τύποι επίκτητης ανοσίας. Κατά τον ένα τύπο, το σώμα αναπτύσσει κυκλοφορούντα στο αίμα **αντισώματα**, τα οποία έχουν την ικανότητα να επιτίθενται εναντίον του εισβολέα. Αυτός ο τύπος ανοσίας λέγεται **χυμική ανοσία** ή ανοσία των Β-κυττάρων (γιατί τα αντισώματα παράγονται από Β-λεμφοκύτταρα). Κατά το δεύτερο τύπο της επίκτητης ανοσίας, παράγονται σε πολύ μεγάλο αριθμό ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα, τα οποία είναι ειδικά προγραμματισμένα να καταστρέφουν το ξένο παράγοντα. Αυτός ο τύπος ανοσίας λέγεται **κυτταρική ανοσία** ή ανοσία των Τ-κυττάρων (γιατί τα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα είναι Τ-λεμφοκύτταρα).

1.4 Κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος

Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (λευκά αιμοσφαίρια) συμπεριλαμβανομένων και των υπολοίπων έμορφων συστατικών του αίματος (ερυθρά αιμοσφαίρια, αιμοπετάλια) γεννώνται στο μυελό των οστών και προέρχονται από πρόδρομα ή προγονικά κύτταρα, τα **αιμοποιητικά αρχέγονα ή πολυδύναμα μητρικά κύτταρα**. Από αυτά στη συνέχεια προέρχονται μητρικά κύτταρα περιορισμένης εμβέλειας (Μυελοειδές προγονικό, Λεμφοειδές προγονικό), τα οποία αποτελούν τα άμεσα προγονικά κύτταρα των ερυθρών αιμοσφαιρίων, των αιμοπεταλίων και των δύο βασικών πληθυσμών των λευκών αιμοσφαιρίων (**Σχήμα 1.1**).

Το προγονικό κύτταρο της μυελικής σειράς είναι ο πρόδρομος των **κοκκιοκυττάρων** και **μακροφάγων** του ανοσολογικού συστήματος. Τα μακροφάγα αποτελούν ένα από τα δύο είδη φαγοκυττάρων του ανοσολογικού συστήματος, βρίσκονται δε σε πολλούς από τους ιστούς του σώματος συμμετέχοντας στους μηχανισμούς της φυσικής ανοσίας όπου παίζουν σημαντικότατο ρόλο. Αποτελούν τις ώριμες μορφές των **μονοκυττάρων**, τα οποία βρίσκονται στην κυκλοφορία και μετατρέπονται συνεχώς σε μακροφάγα όταν μεταναστεύουν στους ιστούς. Τα **κοκκιοκύτταρα** ονομάζονται έτσι γιατί στο πρωτόπλασμα τους βρίσκονται ειδικά κοκκία τα οποία προσλαμβάνουν έντονα χρωστικές. Μερικές φορές ονομάζονται επίσης **πολυμορφοπύρρηνα** γιατί έχουν πυρήνες με περίεργα σχήματα. Υπάρχουν 3 είδη κοκκιοκυττάρων. Τα **ουδετερόφιλα** τα οποία περιλαμβάνονται στα φαγοκύτταρα του ανοσολογικού συστήματος, είναι τα πλέον πολυάριθμα και τα πιο σημαντικά κύτταρα της

φυσικής ανοσίας. Τα **ηωσινόφιλα**, πιστεύεται ότι συμμετέχουν κυρίως στους μηχανισμούς άμυνας έναντι των παρασιτικών λοιμώξεων και ενεργοποιούνται από λεμφοκύτταρα ειδικής ανοσίας. Οι λειτουργίες των **βασεοφίλων** πιθανότατα είναι παρόμοιες με αυτές των **σιτευτικών** κυττάρων, τα οποία πιστεύεται ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία των βλεννογόνων, ενώ επίσης είναι τα κύτταρα από τα οποία εκκρίνεται η ισταμίνη κατά τη διάρκεια των αλλεργικών αντιδράσεων.



Σχήμα 1.1 Όλα τα κυτταρικά στοιχεία του αίματος περιλαμβανομένων των λεμφοκυττάρων της ειδικής ανοσίας προέρχονται από τα αρχέγονα μητρικά αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού των οστών³

Από το κοινό προγονικό κύτταρο της λεμφικής σειράς προέρχονται τα **λεμφοκύτταρα**. Υπάρχουν δύο κύριες κατηγορίες λεμφοκυττάρων: (i) τα **B-λεμφοκύτταρα** ή **B-κύτταρα**, τα οποία όταν διεγερθούν μετατρέπονται σε πλασματοκύτταρα από τα οποία παράγονται τα αντισώματα και (ii) τα **T-λεμφοκύτταρα** ή **T-κύτταρα** τα οποία διακρίνονται σε **κυτταροτοξικά T-κύτταρα**, τα οποία εξολοθρεύουν τα κύτταρα που έχουν μολυνθεί από ιούς και σε **βοηθητικά** κύτταρα που ενεργοποιούν άλλα κύτταρα, όπως τα B-κύτταρα και τα μακροφάγα. Τα λεμφοκύτταρα δεν εκφράζουν καμία λειτουργική δραστηριότητα, μέχρις ότου συναντήσουν κάποιο αντιγόνο, γεγονός το οποίο πυροδοτεί τον πολλαπλασιασμό τους και την εκδήλωση των εξειδικευμένων λειτουργιών τους.

Τα B και T-λεμφοκύτταρα φέρουν στην επιφάνειά τους μια μεγάλη ποικιλία υποδοχέων κάθε ένας από τους οποίους έχει ειδικότητα για κάποιο συγκεκριμένο αντιγόνο. Και οι δύο αυτοί πληθυσμοί κυττάρων συνεργικά μπορούν να αναγνωρίζουν μια τεράστια ποικιλία αντιγόνων. Το **αντίσωμα (ανοσοσφαιρίνη)** ως μόριο δεσμευμένο στην κυτταρική επιφάνεια, αποτελεί τον αντιγονικό υποδοχέα των B-λεμφοκυττάρων, από τα οποία εκκρίνεται όταν αυτά ενεργοποιηθούν. Ο αντιγονικός υποδοχέας των T-λεμφοκυττάρων παρουσιάζει ομοιότητες με την ανοσοσφαιρίνη αλλά αποτελεί τελείως διαφορετική οντότητα.²

1.4.1 T- λεμφοκύτταρα

Τα T-λεμφοκύτταρα παράγονται στο μυελό των οστών και μεταναστεύουν στο θύμο αδένα όπου ωριμάζουν και διαφοροποιούνται. Η διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων στο θύμο εκδηλώνεται με την έκφραση μορίων γλυκοπρωτεϊνών (δεικτών) στην επιφάνεια των λεμφοκυττάρων και διάφορες λειτουργίες. Για την ταξινόμηση αυτών των δεικτών χρησιμοποιείται το σύστημα CD (cluster designation) που σημαίνει μόρια της επιφάνειας των λευκοκυττάρων, τα οποία ανιχνεύονται με μονοκλωνικά αντισώματα και χρησιμεύουν για την ταυτοποίηση διαφόρων κυτταρικών πληθυσμών. Στο σύστημα αυτό οι δείκτες αριθμούνται ως CD1, CD2, CD3 κ.λπ.

Τα λεμφοκύτταρα εντός του θύμου υφίστανται διαδοχικές αλλαγές στα αντιγόνα της μεμβράνης τους. Οι φαινοτυπικές αυτές αλλαγές μπορεί να διακριθούν σε τρία στάδια.

Το **α' στάδιο** χαρακτηρίζεται από τις αναδιατάξεις των γονιδίων της β αλυσίδας του υποδοχέα αντιγόνου του T-λεμφοκυττάρου (**TCRβ**, TCR:T-cell receptor), την έκφραση του CD3 στο κυτταρόπλασμα, αλλά όχι στη μεμβράνη και την απουσία CD4 και CD8 (διπλά αρνητικά–DN: Double Negative, CD4⁻CD8⁻). Το **β' στάδιο** χαρακτηρίζεται από τη σύγχρονη

έκφραση του CD4 και CD8 στο ίδιο κύτταρο, την αναδιάταξη των γονιδίων που κωδικοποιούν την α αλυσίδα του υποδοχέα αντιγόνου του T-λεμφοκυττάρου (**TCR α**) και την έκφραση και των δυο αλυσίδων του TCR σε χαμηλή πυκνότητα στην επιφάνεια του κυττάρου σε συνδυασμό με τα πολυπεπτίδια του CD3 (διπλά θετικά–DP: Double Positive, CD4⁺CD8⁺). Το **γ' στάδιο** διακρίνεται από την παρουσία στη μεμβράνη του κυττάρου του CD3 σε συνδυασμό με τον **αβTCR** σε μεγάλη πυκνότητα και την εμφάνιση δυο ειδών κυττάρων που εκφράζουν CD4 ή CD8 (μονά θετικά–SP: Single Positive, CD4⁺ ή CD8⁺).

Δεν είναι γνωστό ποιοί είναι οι παράγοντες οι οποίοι επάγουν ένα κύτταρο CD4⁺CD8⁺ να επιλέξει τελικά την έκφραση του CD4 ή CD8 και συγχρόνως να αποκτήσει τη «βοηθητική» ή «κυτταρολυτική» ιδιότητα αντιστοίχως. Είναι όμως προφανές ότι η ειδικότητα του TCR υποδοχέα έχει καθοριστικό ρόλο, εάν τελικά εκφρασθεί το CD4 ή το CD8. Έτσι θυμοκύτταρα των οποίων οι TCRs είναι ειδικοί για τα μόρια του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας τάξης I (**MHC-I**) θα εκφράσουν μόνο CD8, ενώ θυμοκύτταρα που έχουν TCRs με περιορισμό για μόρια MHC τάξης II (**MHC-II**) θα εκφράσουν μόνο CD4.

Τα T-λεμφοκύτταρα έχουν να αναγνωρίσουν ένα μεγάλο αριθμό αντιγόνων και αυτό το μεγάλο φάσμα ειδικοτήτων επιτυγχάνεται με την τυχαία αναδιάταξη των γονιδίων που κωδικοποιούν τις αλυσίδες του TCR (αβ ή γδ).

Οι δυο πληθυσμοί των ώριμων πλέον T-λεμφοκυττάρων CD4 (65%) και CD8 (35%) εγκαταλείπουν το θύμο και μεταναστεύουν στις θυμοεξαρτώμενες περιοχές των δευτερογενών λεμφικών οργάνων ως βοηθητικά (T_H) και κυτταροτοξικά (T_C) κύτταρα αντιστοίχως. Ο θύμος παρέχει επίσης την εξασφάλιση ότι κανένα από τα λεμφοκύτταρα που τον εγκαταλείπουν δεν θα αντιδρά έναντι πρωτεϊνών, είτε άλλων αντιγόνων που βρίσκονται στους ιστούς του σώματος. Εάν ένα T-λεμφοκύτταρο αντιδρά με τα αντιγόνα του σώματος αυτό καταστρέφεται και φαγοκυτταρώνεται αντί να αποδοθεί στην κυκλοφορία. Έτσι, τα μόνα κύτταρα που τελικά αποδίδονται είναι εκείνα που αντιδρούν μόνο έναντι αντιγόνων που προέρχονται από μικρόβια ή τοξίνες είτε ακόμα και από μεταμοσχευμένο ιστό άλλου ατόμου.

Δείκτες επιφανείας χαρακτηρίζουν όχι μόνο τα στάδια διαφοροποίησης, αλλά και την ενεργοποίηση και τις διάφορες υποομάδες των T-λεμφοκυττάρων. Έτσι οι δείκτες CD45 RO και CD45 RA χαρακτηρίζουν κύτταρα μνήμης ή παρθένα αντιστοίχως, ενώ οι CD25, CD35 και CD70 είναι δείκτες ενεργοποίησης. Μερικοί δείκτες (CD2, CD5) βρίσκονται στα T, αλλά και σ' άλλα κύτταρα.

1.4.2 B-λεμφοκύτταρα

Τα B-λεμφοκύτταρα αντιπροσωπεύουν το 5-15% περίπου του συνόλου των κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων και προσδιορίζονται από την παρουσία ανοσοσφαιρινών στην επιφάνεια τους. Οι ανοσοσφαιρίνες παράγονται κανονικά και ενσωματώνονται στην πλασματική μεμβράνη του κυττάρου, όπου δρουν ως ειδικοί υποδοχείς αντιγόνων.

Η ωρίμανση των B-λεμφοκυττάρων διαφέρει από τα άλλα κύτταρα που παράγονται στο μυελό των οστών κατά το ότι τα B-λεμφοκύτταρα έχουν αντιγονοεξαρτώμενη και μη αντιγονοεξαρτώμενη φάση ωρίμανσης. Τα προ-B κύτταρα προέρχονται από προγονικά κύτταρα του μυελού των οστών και ανιχνεύονται από την παρουσία στο κυτόπλασμα ανοσοσφαιρίνης IgM (cIgM). Τα προ-B κύτταρα ωριμάζουν προς ανώριμα B-κύτταρα που εκφράζουν πλέον την IgM στην επιφάνεια (sIgM). Τα ανώριμα B-κύτταρα μεταναστεύουν προς την περιφέρεια και εξακολουθούν την ανεξάρτητη από αντιγόνα ωρίμανση, ενώ εκφράζουν IgD επιφάνειας, επεκτείνουν το ρεπερτόριο αντιγόνων των B-κυττάρων και μεταβάλλουν τον ισότυπο της ανοσοσφαιρίνης στην επιφάνεια των B-κυττάρων έτσι ώστε να εκφράζεται μόνο επιφανειακή IgM, IgG, IgA ή IgE με την IgD. Από κάθε B κύτταρο μόνο ένα είδος αντιγονικής ειδικότητας Ig εκφράζεται. Όταν έλθουν σε επαφή με αντιγόνο, τα ώριμα B-κύτταρα είτε τελικά διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα που εκκρίνουν αντισώματα, είτε πολλαπλασιάζονται για να σχηματίσουν πληθυσμούς από μακρόβια μνημονικά B-κύτταρα, τα οποία έχουν την ικανότητα αντίδρασης όταν υποστούν καινούρια πρόκληση από το ίδιο αντιγόνο.

1.4.3 Μονοκύτταρα-Μακροφάγα

Τα μονοκύτταρα προέρχονται από πρόδρομα κύτταρα του μυελού των οστών και κυκλοφορούν στο αίμα, με ημιζωή 1 ως 3 μέρες. Ένα ποσοστό των μονοκυττάρων εγκαταλείπουν την κυκλοφορία και μεταναστεύουν στους ιστούς, αποτελώντας τα ιστικά μακροφάγα. Τα μακροφάγα ανευρίσκονται στα λεμφογάγγλια, στο σπλήνα, στο μυελό των οστών, στον περιαγγειακό συνδετικό ιστό, στο περιτόναιο, στον υπεζωκότα και στους αρθρικούς θύλακες, στο συνδετικό ιστό του δέρματος, στους πνεύμονες (μακροφάγα των κυψελίδων), στο ήπαρ (κύτταρα Kupffer), στα οστά (οστεοκλάστες), και στο κεντρικό νευρικό σύστημα (μικρογλοία). Επιπρόσθετα, δυο τύποι κυττάρων που προέρχονται από το μυελό των οστών, που εξειδικεύονται ως κύτταρα που παρουσιάζουν αντιγόνα,

ανευρίσκονται σε πολλούς ιστούς και ονομάζονται δενδριτικά κύτταρα (στα λεμφογάγγλια, σπλήνα και θύμο αδένες) και τα κύτταρα Langerhan (στο δέρμα και το θύμο αδένες).

Τα μονοκύτταρα-μακροφάγα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην έκφραση της ανοσοποιητικής αντίδρασης μέσω παρουσίας του αντιγόνου προς τα λεμφοκύτταρα και την έκκριση παραγόντων όπως είναι η ιντερλευκίνη 1, που παίζουν ουσιαστικό ρόλο στην ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων. Υπό ορισμένες συνθήκες, τα μονοκύτταρα μπορούν επίσης να επιτελούν ανοσορυθμιστικές λειτουργίες όπως είναι η δραστηριότητα των κατασταλτικών κυττάρων. Επιπρόσθετα, τα μονοκύτταρα-μακροφάγα επιτελούν εκτελεστικές λειτουργίες όπως είναι η καταστροφή μικροβίων που είναι επικαλυμμένα με αντισώματα. Ενεργοποιημένα μακροφάγα μπορούν επίσης να επιτελούν δραστηριότητα που μοιάζει με εκείνη των NK (Natural Killer cells: φυσικά φονικά κύτταρα) και να καταστρέφουν τύπους κυττάρων όπως κύτταρα όγκων, χωρίς να υπάρχει αντίσωμα. Τα μονοκύτταρα-μακροφάγα εκφράζουν υποδοχείς επιφανείας για πολλά μόρια, περιλαμβανομένης και της περιοχής Fc των IgG. Επιπρόσθετα, τα μονοκύτταρα-μακροφάγα εκφράζουν HLA τάξης II αντιγόνα.

1.5 Υποδοχείς αντιγόνων

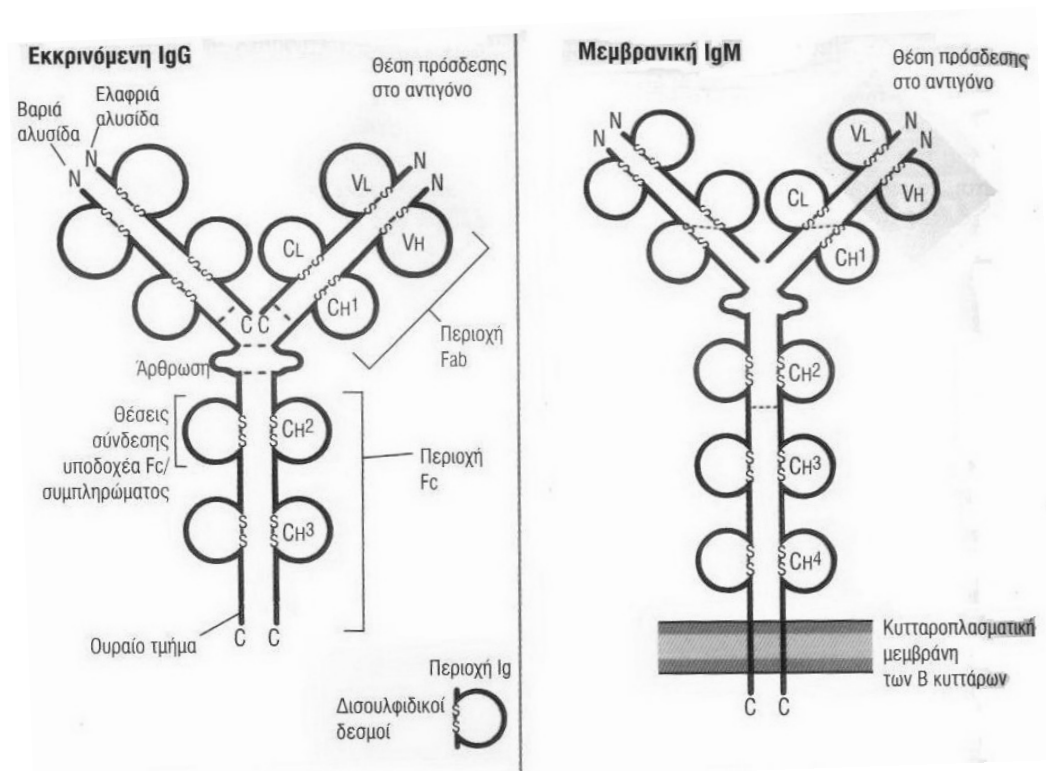
Το κύριο χαρακτηριστικό της ειδικής ανοσοποιητικής απόκρισης είναι η αναγνώριση ξένων αντιγόνων. Σε αυτή τη διαδικασία συμμετέχουν δύο ξεχωριστοί τύποι μορίων, οι **ανοσοσφαιρίνες** και οι **υποδοχείς αντιγόνων**, οι οποίοι ευρίσκονται επί των **T-λεμφοκυττάρων (TCRs)**. Χαρακτηριστικά γνωρίσματα αυτών των μορίων είναι η ποικιλότητα και η ετερογένεια που τους δίνει τη δυνατότητα να αναγνωρίζουν πολλά, διαφορετικά αντιγόνα.⁴

1.5.1 Αντισώματα

Τα αντισώματα αποτελούν προϊόντα διαφοροποιημένων B-λεμφοκυττάρων και πραγματοποιούν το χυμικό σκέλος της ανοσοποιητικής αντίδρασης. Οι κύριες λειτουργίες τους συνίστανται στην ειδική τους σύνδεση με το αντιγόνο και την αδρανοποίηση είτε την απομάκρυνση της τοξίνης ή του υπεύθυνου μικροοργανισμού, παράσιτου είτε άλλης ξένης ουσίας από το σώμα.

Ένα μόριο αντισώματος αποτελείται από δύο πανομοιότυπες βαριές αλυσίδες (H) και δύο πανομοιότυπες ελαφριές αλυσίδες (L), με κάθε αλυσίδα να περιέχει μια μεταβλητή και μια ή περισσότερες σταθερές περιοχές (**Σχήμα 1.2**). Οι τέσσερις αλυσίδες συνδέονται έτσι

ώστε να σχηματίζουν ένα μόριο με μορφή Y. Κάθε ελαφριά αλυσίδα συνδέεται με μια βαριά αλυσίδα και οι δύο βαριές αλυσίδες συνδέονται μεταξύ τους, όλες με δισουλφιδικούς δεσμούς. Η κάθε ελαφριά αλυσίδα αποτελείται από μία μεταβλητή και μία σταθερή περιοχή, ενώ η κάθε βαριά αλυσίδα έχει μία μεταβλητή και τρεις ή τέσσερις σταθερές περιοχές. Η κάθε περιοχή αναδιπλώνεται παίρνοντας μια χαρακτηριστική τρισδιάστατη μορφή που ονομάζεται περιοχή ανοσοσφαιρίνης (immunoglobulin domain).



Σχήμα 1.2 Η δομή των αντισωμάτων. Απεικονίζονται σχηματικά μια εκκρινόμενη IgG και μια μεμβρανική μορφή της IgM⁴

Κάθε μεταβλητή περιοχή της βαριάς αλυσίδας (V_H) ή της ελαφριάς αλυσίδας (V_L) περιέχει τρεις υπερμεταβλητές περιοχές ή CDRs (Complementarity Determining Regions: περιοχές καθορισμού συμπληρωματικότητας). Από αυτές τις τρεις περιοχές, η μεγαλύτερη μεταβλητότητα συγκεντρώνεται στην CDR3, η οποία βρίσκεται στο σημείο σύνδεσης των περιοχών C και V. Τα τμήματα των μορίων των αντισωμάτων συχνά ονομάζονται με βάση τις ιδιότητες των πρωτεολυτικών κλασμάτων των ανοσοσφαιρινών. Το κλάσμα ενός αντισώματος που περιέχει μια ολόκληρη ελαφριά αλυσίδα (με μονήρεις περιοχές C και V) συνδεδεμένη με την περιοχή V και την πρώτη περιοχή C της βαριάς αλυσίδας είναι αυτό που περιέχει το τμήμα του αντισώματος που απαιτείται για την αναγνώριση του αντιγόνου και

ονομάζεται Fab (Fragment antigen binding, κλάσμα πρόσδεσης αντιγόνου). Οι υπόλοιπες περιοχές C αποτελούν την περιοχή Fc ή κρυσταλλικό κλάσμα (Fragment crystalline) που ονομάζεται έτσι επειδή τείνει να σχηματίζει κρυστάλλους όταν βρίσκεται σε διάλυμα. Σε κάθε μόριο ανοσοσφαιρίνης υπάρχουν δύο πανομοιότυπα τμήματα Fab που προσδένονται με το αντιγόνο και ένα τμήμα Fc που είναι υπεύθυνο για τις περισσότερες δραστικές λειτουργίες των αντισωμάτων. Μεταξύ των περιοχών Fab και Fc των περισσότερων μορίων αντισωμάτων υπάρχει ένα ευλύγιστο τμήμα που ονομάζεται περιοχή άρθρωσης (hinge region). Η περιοχή άρθρωσης επιτρέπει στα δύο τμήματα Fab να μετακινούνται ώστε να προσδένονται ταυτόχρονα με αντιγονικούς επιτόπους που απέχουν μεταξύ τους διαφορετικές αποστάσεις. Το καρβοξυτελικό άκρο της βαριάς αλυσίδας μπορεί να «αγκυροβολεί» στην κυτταροπλασματική μεμβράνη ή να έχει ένα τελικό τμήμα που στερείται αυτής της «άγκυρας» με αποτέλεσμα το αντίσωμα να παράγεται σε μορφή εκκρινόμενης πρωτεΐνης. Οι ελαφριές αλυσίδες δεν συνδέονται με τις μεμβράνες του κυττάρου.

Υπάρχουν δύο τύποι ελαφριών αλυσίδων, οι κ και οι λ, οι οποίες διαφέρουν στις σταθερές τους περιοχές αλλά δεν διαφέρουν στις λειτουργίες τους. Υπάρχουν πέντε τύποι βαριών αλυσίδων που ονομάζονται μ, γ, δ, ε, και α, που διαφέρουν επίσης στις σταθερές τους περιοχές. Κάθε τύπος ελαφριάς αλυσίδας μπορεί να ενώνεται με οποιοδήποτε τύπο βαριάς αλυσίδας για να σχηματισθεί ένα μόριο αντισώματος. Τα αντισώματα που περιέχουν διαφορετικές βαριές αλυσίδες ανήκουν σε διαφορετικούς ισοτύπους ή τάξεις και ονομάζονται ανάλογα με τη βαριά αλυσίδα τους, δηλαδή IgM, IgG, IgD, IgE και IgA ανεξάρτητα από το είδος της ελαφριάς αλυσίδας. Οι αντιγονικοί υποδοχείς των ώριμων Β-λεμφοκυττάρων που δεν έχουν συναντήσει αντιγόνο και τα οποία λέγονται παρθένα λεμφοκύτταρα, είναι μεμβρανικές IgM ή IgD. Μετά τη διέγερση από το αντιγόνο και τα βοηθητικά Τ-λεμφοκύτταρα, ο ειδικός για το αντιγόνο κλώνος των Β λεμφοκυττάρων πολλαπλασιάζεται και διαφοροποιείται σε κύτταρα που εκκρίνουν αντίσωμα. Ορισμένοι από τους απογόνους των Β κυττάρων που εκφράζουν IgM ή IgD μπορεί να εκκρίνουν IgM, ενώ άλλοι απόγονοι των ίδιων Β κυττάρων μπορεί να παράγουν αντισώματα άλλων τάξεων βαριών αλυσίδων.

Τα αντισώματα μπορούν να προσδέσουν μεγάλη ποικιλία αντιγόνων, συμπεριλαμβανομένων μακρομορίων και μικρών χημικών ενώσεων. Τα αντισώματα προσδένονται στα αντιγόνα μέσω αναστρέψιμων, μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων, που συμπεριλαμβάνουν δεσμούς υδρογόνου αλλά και αλληλεπιδράσεις ηλεκτρικών φορτίων. Τα τμήματα του αντιγόνου που αναγνωρίζονται από τα αντισώματα ονομάζονται επίτοποι ή καθοριστές (determinants). Η αναγνώριση των διαφόρων αντιγονικών καθοριστών μπορεί να

εξαρτάται από την αλληλουχία των αμινοξέων τους (γραμμικοί καθοριστές) ή από το σχήμα τους (καθοριστές διαμόρφωσης). Ορισμένοι από τους καθοριστές αυτούς είναι κρυμμένοι μέσα στα μόρια του αντιγόνου και αποκαλύπτονται μετά από κάποια φυσικοχημική αλλαγή (νεοκαθοριστές).²

1.5.2 Υποδοχέας των T-λεμφοκυττάρων (TCR – T Cell Receptor)

Η ειδικότητα των T-λεμφοκυττάρων για τα διάφορα αντιγόνα καθορίζεται από τον υποδοχέα του αντιγόνου (TCR) της μεμβράνης των κυττάρων, ο οποίος αναγνωρίζει το αντιγόνο και είναι χαρακτηριστικός κάθε κλώνου κυττάρων.

Ο TCR είναι ένα ετεροδιμερές μόριο αποτελούμενο από τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες αβ ή γδ. Οι πολυπεπτιδικές αυτές αλυσίδες συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς και επιπλέον οι γδ αλυσίδες μπορούν να παραμένουν και ως μονομερή. Οι αλυσίδες αυτές εμφανίζουν μεγάλη πολυμορφία, χαρακτηρίζονται από μια μεταβλητή και μια σταθερή περιοχή στο εξωκυττάριο τμήμα του μορίου τους, οι μεταβλητές περιοχές αποτελούν το τμήμα του υποδοχέα που αναγνωρίζει το ξένο πεπτίδιο και αυτές χαρακτηρίζουν το T-λεμφοκύτταρο ως TCRαβ ή TCRγδ. Η σταθερή περιοχή του TCR αποτελείται από μια εξωκυττάρια, μια διαμεμβρανική και μια κυτταροπλασματική (C-τελικό άκρο) περιοχή.

Οι αβ και γδ αλυσίδες είναι ενωμένες με μια σειρά πολυπεπτιδίων, τα οποία γενικώς ονομάζονται CD3. Αυτή η συνένωση είναι απαραίτητη για την έκφραση του συμπλέγματος TCR στην κυτταρική επιφάνεια και τη μεταφορά μηνυμάτων στο εσωτερικό του κυττάρου ύστερα από την αναγνώριση του αντιγόνου.

Κάθε ένα T-λεμφοκύτταρο διαθέτει είτε έναν αβ είτε έναν γδ υποδοχέα, ενώ η συντριπτική πλειονότητα των T-λεμφοκυττάρων δημιουργεί τον αβ υποδοχέα. Τα T-λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν το αντιγόνο μόνο σε συνδυασμό με μόρια του MHC τάξης I (CD8) ή II (CD4) και για τη σύνδεση αυτή βασικό ρόλο παίζει ο TCR.

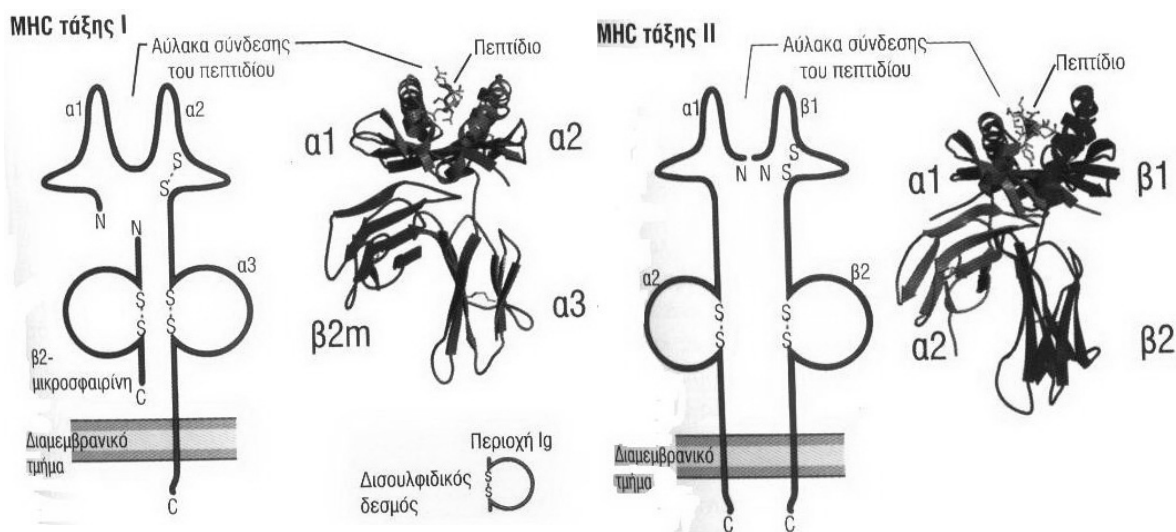
1.6 Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας (MHC: Major Histocompatibility Complex)

Τα μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) είναι πρωτεΐνες της μεμβράνης των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (APCs) που παρουσιάζουν πεπτίδια από πρωτεϊνικά αντιγόνα ώστε να αναγνωρισθούν από τα T-λεμφοκύτταρα. Το MHC ανακαλύφθηκε σαν ο γενετικός τόπος που καθορίζει κατά κύριο λόγο την αποδοχή ή την απόρριψη ιστικών μοσχευμάτων από ένα άτομο σε άλλο.

Οι πρωτεΐνες MHC στον άνθρωπο ονομάζονται ανθρώπινα λευκοκυτταρικά αντιγόνα (human leukocyte antigens, HLA). Τα μόρια MHC ανήκουν σε δυο διαφορετικές τάξεις την I και II, που διαφέρουν μεταξύ τους δομικά και λειτουργικά. Στον άνθρωπο υπάρχουν τρεις τύποι γονιδίων α-αλυσίδας τάξεως I, που ονομάζονται HLA-A, -B και -C, ενώ για την τάξη II υπάρχουν τρεις τύποι γονιδίων που ονομάζονται HLA-DR, -DP και DQ.

Κάθε μόριο τάξης I αποτελείται από μια α αλυσίδα, μη ομοιοπολικά συνδεδεμένη σε μια πρωτεΐνη, τη β2-μικροσφαιρίνη, η οποία κωδικοποιείται εκτός του MHC (**Σχήμα 1.3**). Τα αμινοτελικά τμήματα των περιοχών α1 και α2 του μορίου MHC τάξης I σχηματίζουν μια αύλακα σύνδεσης του πεπτιδίου, η οποία είναι αρκετά μεγάλη ώστε να εφαρμόζουν πεπτίδια 8 ως 11 αμινοξέων. Τα πεπτίδια που θα παρουσιαστούν στα T-λεμφοκύτταρα συνδέονται στη βάση της αύλακας σύνδεσης του πεπτιδίου, ενώ ο υποδοχέας των T-κυττάρων έρχεται σε επαφή με τις πλευρές της αύλακας (ο υποδοχέας βέβαια, έρχεται σε επαφή και με τμήματα του πεπτιδίου που παρουσιάζεται). Τα πολυμορφικά αμινοξέα των μορίων τάξης I, δηλαδή τα αμινοξέα που διαφέρουν μεταξύ των μορίων MHC διαφορετικών ατόμων, εντοπίζονται στις περιοχές α1 και α2 της α αλυσίδας. Ορισμένα από αυτά τα πολυμορφικά αμινοξέα συνεισφέρουν στη δημιουργία μορφολογικών παραλλαγών στη βάση της αύλακας σύνδεσης του πεπτιδίου και επομένως στην ικανότητα διαφορετικών μορίων MHC να παρουσιάζουν πεπτίδια. Άλλα πολυμορφικά αμινοξέα συνεισφέρουν σε διαφοροποιήσεις στα πλάγια των αυλακών και επομένως επηρεάζουν την αναγνώριση από T-κύτταρα. Η περιοχή α3 είναι σταθερή και περιέχει τη θέση σύνδεσης για το συνυποδοχέα CD8 των T-κυττάρων. Η ενεργοποίηση των T-κυττάρων απαιτεί αναγνώριση από τον υποδοχέα των T κυττάρων (T-cell receptor, TCR) του συνδεδεμένου με το MHC πεπτιδικού αντιγόνου και ταυτόχρονη αναγνώριση του μορίου MHC από το συνυποδοχέα. Επομένως, τα CD8⁺ T-κύτταρα μπορούν να απαντήσουν μόνο σε πεπτίδια που παρουσιάζονται από μόρια MHC τάξης I. Τα μόρια τάξης I εκφράζονται σε όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα.

Κάθε μόριο MHC τάξης II αποτελείται από δύο αλυσίδες, τις α και β (**Σχήμα 1.3**). Τα αμινοτελικά τμήματα και των δύο αλυσίδων, οι περιοχές α1 και β1, περιέχουν πολυμορφικά αμινοξέα και σχηματίζουν μία αύλακα αρκετά μεγάλη ώστε να εφαρμόζουν πεπτίδια μήκους 10 ως 30 αμινοξέων. Η μη πολυμορφική περιοχή β2 περιέχει τη θέση σύνδεσης του συνυποδοχέα CD4 των T-κυττάρων. Επειδή το CD4 συνδέεται με τα μόρια MHC τάξης II, τα CD4⁺ T-κύτταρα απαντούν μόνο σε πεπτίδια επιτόπους που παρουσιάζονται από μόρια MHC τάξης II. Τα μόρια MHC τάξης II εκφράζονται κυρίως στα επαγγελματικά APCs, όπως τα δένδριτικά κύτταρα καθώς και στα μακροφάγα και στα B λεμφοκύτταρα.



Σχήμα 1.3 Δομή των μορίων ΜΗC τάξης Ι, -ΙΙ⁴

Κάθε μόριο ΜΗC μπορεί να παρουσιάσει μόνο ένα πεπτίδιο κάθε φορά, επειδή υπάρχει μόνο μία αύλακα, αλλά κάθε μόριο ΜΗC είναι ικανό να παρουσιάσει πολλά διαφορετικά πεπτίδια, διότι μόνο ένα ή δύο αμινοξέα από το πεπτίδιο πρέπει να εφαρμόζουν στην αύλακα του μορίου ΜΗC. Έτσι, τα μόρια ΜΗC έχουν μια «ευρεία» ειδικότητα όσον αφορά τη σύνδεση πεπτιδίου, ενώ κάθε μόριο ΜΗC μπορεί να συνδέσει πολλά αλλά όχι όλα τα πιθανά πεπτίδια. Αυτό βέβαια είναι ένα βασικό χαρακτηριστικό, μια και κάθε άτομο έχει ένα περιορισμένο αριθμό διαφορετικών μορίων ΜΗC, τα οποία πρέπει να είναι ικανά να παρουσιάσουν ένα τεράστιο αριθμό και ποικιλία αντιγόνων. Τα μόρια ΜΗC συνδέουν μόνο πεπτίδια και όχι άλλους τύπους αντιγόνων. Για το λόγο αυτό τα ΜΗC-περιορισμένα $CD4^+$ και $CD8^+$ T-κύτταρα αναγνωρίζουν και αποκρίνονται μόνο σε πρωτεϊνικά αντιγόνα, δηλαδή τη φυσική πηγή των πεπτιδίων. Η σύνδεση των πεπτιδίων στα μόρια ΜΗC είναι μια αλληλεπίδραση χαμηλής συγγένειας με πολύ βραδύ ρυθμό διάστασης. Η χαμηλή συγγένεια που απαιτείται για τη σύνδεση εξασφαλίζει ότι οι δομικοί περιορισμοί για τη σύνδεση είναι λίγοι, έτσι ώστε στο ίδιο μόριο ΜΗC να μπορούν να συνδεθούν πολλά διαφορετικά πεπτίδια. Ο βραδύς ρυθμός διάστασης εξασφαλίζει ότι από τη στιγμή που ένα μόριο ΜΗC έχει συνδεθεί με ένα πεπτίδιο, θα το παρουσιάζει για μεγάλο χρονικό διάστημα, μεγιστοποιώντας την πιθανότητα αναγνώρισης από ένα T κύτταρο και έναρξης της ανοσοαπάντησης.

Τα μόρια ΜΗC αποκτούν το πεπτιδικό τους φορτίο κατά τη διάρκεια της βιοσύνθεσης τους και της συναρμολόγησης τους μέσα στα κύτταρα. Επομένως, τα μόρια ΜΗC παρουσιάζουν πεπτίδια που προέρχονται από μικροοργανισμούς που βρίσκονται μέσα στα

κύτταρα του ξενιστή και γι αυτό τα MHC-περιορισμένα T-κύτταρα αναγνωρίζουν μικροοργανισμούς που βρίσκονται μέσα στα κύτταρα και είναι οι μεσολαβητές της ανοσίας κατά των ενδοκυττάρων μικροοργανισμών. Επιπλέον, τα μόρια MHC τάξης I αποκτούν τα πεπτίδια τους από πρωτεΐνες του κυτοσολίου, ενώ τα μόρια τάξης II από πρωτεΐνες των ενδοκυττάρων κυστιδίων. Μόνο τα μόρια MHC που φέρουν πεπτίδιο εκφράζονται σταθερά στις κυτταρικές επιφάνειες.⁴

1.7 Ανοσολογική Απόκριση

Τα χαρακτηριστικά της ανοσιακής απάντησης του ξενιστού έναντι των λοιμογόνων παραγόντων συνοψίζονται ως εξής: Η αρχική αντιμετώπιση του εισβολέα επιτελείται με τη **φυσική μη ειδική άμυνα**. Σε περίπτωση που η φυσική άμυνα αποδειχθεί ανεπαρκής ο οργανισμός αναπτύσσει νέα μέσα άμυνας, που αποτελούν την **ειδική επίκτητη ανοσία**. Σε απλές γραμμές και συνοπτικά η διαδικασία αυτή έχει ως εξής:

Μόλις κάποιο παθογόνο βακτήριο μπει στο σώμα, προσλαμβάνεται από τα μακροφάγα με φαγοκύτωση και καταστρέφεται ενώ παράλληλα τα αντιγόνα του εκθέτονται στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης των μακροφάγων μέσω των μορίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC I, II). Τα T-λεμφοκύτταρα διαμέσου του TCR υποδοχέα αναγνωρίζουν το σύμπλεγμα ξένου αντιγόνου-αντιγόνου ιστοσυμβατότητας ($CD8^+$ T-κύτταρα/MHC-I, $CD4^+$ T-κύτταρα/MHC-II). Κατά τη σύνδεση ενός $CD4^+$ T-κυττάρου με το MHC-II αυτό ενεργοποιείται. Από τη σύνδεση αυτή ενεργοποιείται και το μακροφάγο το οποίο εκκρίνει μία πρωτεΐνη-διαβιβαστή την ιντερλευκίνη-1 (IL-1), η οποία διεγείρει τον πολλαπλασιασμό του ενεργοποιούμενου $CD4^+$ T-κυττάρου προς δύο διαφορετικούς κλώνους, τα διεγερτικά T και βοηθητικά T κύτταρα. Στη συνέχεια τα διεγερτικά T-λεμφοκύτταρα εκκρίνουν μια άλλη πρωτεΐνη-διαβιβαστή την ιντερλευκίνη-2 (IL-2). Η IL -2 διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των $CD8^+$ T-λεμφοκυττάρων που έχουν ήδη συνδεθεί με σύμπλεγμα ξένου αντιγόνου-αντιγόνου ιστοσυμβατότητας κατηγορία I προς ένα κλώνο αρχικά κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων και στη συνέχεια σε ένα κλώνο κατασταλτικών T-λεμφοκυττάρων. Τα βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα εκκρίνουν λεμφοκίνες που ρυθμίζουν τη δράση των κυτταροτοξικών και των κατασταλτικών T-λεμφοκυττάρων καθώς και των $CD8^+$ T και B-λεμφοκυττάρων. Τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα εκκρίνουν ουσίες που καταστρέφουν τα μολυσμένα από το παθογόνο βακτήριο κύτταρα, τα οποία έχουν στην κυτταρική τους μεμβράνη το αντιγόνο αυτού του βακτηρίου. Τα κατασταλτικά T-

λεμφοκύτταρα δημιουργούνται αργότερα από τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα και με τη βοήθεια των βοηθητικών T-λεμφοκυττάρων αναστέλλουν τη δράση των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων όταν το παθογόνο βακτήριο έχει πια καταστραφεί σταματώντας έτσι την ανοσολογική απόκριση. Τέλος, μετά το σταμάτημα της ανοσολογικής απόκρισης, μερικά από τα βοηθητικά και τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα παραμένουν και δρουν σαν κύτταρα μνήμης (T-κύτταρα μνήμης), έτοιμα να πυροδοτήσουν το ξεκίνημα μιας νέας κυτταρικής ανοσολογικής απόκρισης σε περίπτωση προσβολής από το ίδιο παθογόνο βακτήριο. Κατά τη **χυμική ανοσία** κεντρικό ρόλο παίζουν τα B-λεμφοκύτταρα και οι ανοσοσφαιρίνες που εκκρίνουν. Αυτά, αναγνωρίζουν το αντιγόνο στη μεμβράνη του παθογόνου βακτηρίου συνδέονται μ' αυτό και το εκθέτουν στην κυτταρική τους μεμβράνη μαζί με το αντιγόνο ιστοσυμβατότητας, κατηγορία II. Στο σύμπλεγμα ξένου αντιγόνου-αντιγόνου ιστοσυμβατότητας συνδέεται ένα βοηθητικό T-λεμφοκύτταρο όπως ακριβώς συμβαίνει στην κυτταρική ανοσία μεταξύ μακροφάγου-T-λεμφοκυττάρου. Στη συνέχεια, το βοηθητικό T-λεμφοκύτταρο εκκρίνει ιντερλευκίνες που ενεργοποιούν τον πολλαπλασιασμό του ενεργοποιημένου B-λεμφοκυττάρου προς δύο διαφορετικούς κλώνους, τα πλασματοκύτταρα και τα B-κύτταρα μνήμης. Τα B-κύτταρα μνήμης δρουν όπως τα T-κύτταρα μνήμης αφού μπορούν οποιαδήποτε στιγμή να πυροδοτήσουν το ξεκίνημα της ανοσολογικής απόκρισης σε περίπτωση προσβολής από το ίδιο βακτήριο. Παράλληλα τα κύτταρα αυτά, μετά την πρώτη προσβολή, συνεχίζουν να εκκρίνουν για μερικά χρόνια αντισώματα κατά του συγκεκριμένου αντιγόνου τα οποία κυκλοφορούν στο πλάσμα σαν μέρος των IgG ανοσοσφαιρινών, έτοιμα να αντιμετωπίσουν μια πιθανή νέα εισβολή του παθογόνου βακτηρίου.

Τα διάφορα είδη μικροοργανισμών προκαλούν διαφορετική ανοσιακή αντίδραση. Αναλόγως του λοιμογόνου παράγοντα διακρίνουμε ανοσιακή αντίδραση έναντι: 1.α) **εξωκυττάρων βακτηρίων**, 1.β) **ενδοκυττάρων βακτηρίων**, 2) **ιών**, 3) **παρασίτων**.⁵

1.8 Ανοσία εναντίον των ιών

Οι ιοί είναι ενδοκυττάρια παράσιτα και χρησιμοποιούν τους μηχανισμούς των κυττάρων-ξενιστών για να πολλαπλασιαστούν. Τα αντιγόνα των ιών διακρίνονται σε δομικά και μη δομικά. Τα πρώτα είναι πρωτεΐνες του καψιδίου του ιού, ενώ τα δεύτερα εμφανίζονται στο κύτταρο μετά τον ενδοκυττάριο πολλαπλασιασμό του ιού. Η σύνδεση του ιού με το κύτταρο γίνεται διαμέσου των ιικών πρωτεϊνών ή των γλυκοπρωτεϊνών του ελύτρου. Τον πολλαπλασιασμό του γονιδιώματος ακολουθεί η σύνθεση των πρωτεϊνών για το σχηματισμό

του καψιδίου και η απελευθέρωση του σωματιδίου μετά λύση του κυττάρου (ιοί χωρίς έλυτρο) ή με εκβλάστηση από την κυτταρική επιφάνεια (ιοί με έλυτρο). Έτσι η ανοσιακή απάντηση κατευθύνεται έναντι ιικών σωματιδίων ή έναντι του μολυσμένου κυττάρου.

Η είσοδος γίνεται συνήθως μέσα από βλεννογόνες επιφάνειες. Το τρυπημένο δέρμα είναι μια άλλη οδός άμεσης εισόδου των ιών στην κυκλοφορία του αίματος. Ο πολλαπλασιασμός συνήθως συμβαίνει σε επιθηλιακές επιφάνειες, ακολουθούμενος συνήθως από ιοαιμία (αιμομεταφερόμενη εξάπλωση) για τη μόλυνση και άλλων ιστών. Η ανάρρωση από τη μόλυνση μπορεί να συμπεριλαμβάνει την εξαφάνιση του ιού από τον ξενιστή. Ωστόσο, ορισμένοι ιοί παραμένουν σε μια λανθάνουσα (μη μολυσματική) μορφή μετά το τέλος της οξείας μόλυνσης, και μπορούν να επανενεργοποιηθούν προς παραγωγή νέων μολυσματικών ιοσωματίων. Άλλοι ιοί μπορούν να παραμείνουν σε μολυσματική μορφή παρά την εκδήλωση της ανοσολογικής απόκρισης ή να παραμείνουν ως βραδεία μόλυνση και προκαλούν την ασθένεια ύστερα από πολλά χρόνια.⁶

1.8.1 Εγγενής (Φυσική) Ανοσοποιητική απόκριση προς τους ιούς

Η πρωταρχική άμυνα εναντίον της ιικής εισβολής είναι η ακεραιότητα των σωματικών επιφανειών. Εάν θιγεί η ακεραιότητα, τότε ενεργοποιούνται πρώιμες, "μη ειδικές" ανοσοποιητικές άμυνες, όπως είναι οι ιντερφερόνες (IFN), τα φυσικά φονικά κύτταρα (NK) και τα μακροφάγα.

Η μόλυνση ενός κυττάρου από ιούς οδηγεί στην παραγωγή IFN-α και IFN-β, οι οποίες εκδηλώνουν την αντι-ιική τους δράση, σε γειτονικά κύτταρα, μέσω της σύνδεσής τους με τον υποδοχέα IFNα/β. Ειδικότερα με την πρόσδεση τους στον υποδοχέα ενεργοποιούν οδό μεταγωγής μηνυμάτων, η οποία με τη σειρά της, επάγει τη μεταγραφή διαφόρων γονιδίων. Ένα από αυτά τα γονίδια κωδικοποιεί ένζυμο το οποίο ενεργοποιεί μια ριβονουκλεάση, που αποικοδομεί το ιικό RNA. Επίσης, άλλα γονίδια, που ενεργοποιούνται συμβάλλουν στην αναστολή του ιικού πολλαπλασιασμού. Η σύνδεση της IFN-α και της IFN-β στα NK κύτταρα διεγείρει τη λυτική τους δράση, καθιστώντας τα αποτελεσματικά στη θανάτωση των προσβεβλημένων από ιούς κυττάρων. Η φαγοκύτωση του ιού από τα επαγγελματικά φαγοκύτταρα, μακροφάγα ή ουδετερόφιλα επιτυγχάνεται μετά τη σύντηξη του περιβλήματος του με την κυτταρική μεμβράνη. Τα μακροφάγα πλην του ρόλου τους στην επαγωγή και ρύθμιση της ειδικής ανοσιακής απάντησης συμμετέχουν και στους μη ειδικούς μηχανισμούς άμυνας έναντι των ιών και των άλλων ενδοκυττάρων μικροοργανισμών. Η αντιακή δράση

του φαγοκυττάρου εκδηλώνεται είτε με κατευθείαν δράση επί του ιού είτε με απελευθέρωση αντικών μεσολαβητών.

1.8.2 Επίκτητη (Ειδική) Ανοσοποιητική απόκριση προς τους ιούς

Τα αντισώματα χρησιμεύουν κυρίως για την πρόληψη της προσήλωσης του ιού στο κύτταρο παρά για τον περιορισμό της λοίμωξης, που έχει ήδη εγκατασταθεί. Τα αντικά αντισώματα αναστέλλουν τη λοίμωξη με εξουδετέρωση που είναι η πιο σπουδαία αντίδραση ιού-αντισώματος. Αντισώματα των τάξεων IgG, IgA, IgM εξουδετερώνουν τη λοιμογόνο δράση του ιού παρεμποδίζοντας την προσήλωση και είσοδο του ιού στο κύτταρο. Αν το παραγόμενο αντίσωμα ανήκει σε ισότυπο (IgM) που ενεργοποιεί το συμπλήρωμα, μπορεί να προκληθεί λύση των ικών σωματιδίων που φέρουν περίβλημα. Τα αντισώματα και το συμπλήρωμα, μπορούν επίσης, να προκαλέσουν συγκόλληση των ικών σωματιδίων και να δράσουν ως οψωνίνες διευκολύνοντας, τη μεσολαβούμενη από τους υποδοχείς Fc και C3 των μακροφάγων, την φαγοκυττάρωση των ικών σωματιδίων. Τα αντισώματα δεν έχουν συνήθως την ικανότητα εξάλειψης του ιού από τη στιγμή της εγκατάστασης της λοίμωξης. Από τη στιγμή της εγκατάστασης της λοίμωξης οι σημαντικότεροι αμυντικοί μηχανισμοί του ξενιστή είναι εκείνοι της κυτταρικής ανοσίας. Γενικά, οι κύριοι πρωταγωνιστές της κυτταρικής ανοσολογικής απόκρισης έναντι των ιών είναι τα $CD8^+$ Tc-λεμφοκύτταρα (κυτταροτοξικά) και τα $CD4^+$ T_H1 (βοηθητικά) λεμφοκύτταρα. Τα ενεργοποιημένα T_H1 λεμφοκύτταρα παράγουν έναν αριθμό κυτταροκινών, οι οποίες έχουν είτε άμεση, είτε έμμεση αντι-ική δράση. Τα ειδικά για τον ιό κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα θανατώνουν τα κύτταρα που έχουν προσβληθεί από τον ιό, εξαλείφοντας, έτσι, τις πιθανές πηγές νέων ικών σωματιδίων.

1.9 Εμβόλια

Χάρη στις αρχικές επιτυχίες των Jenner (ευλογία) και Pauster (λύσσα) η έννοια του εμβολιασμού καθιερώθηκε και αναπτύχθηκε. Σκοπός του εμβολιασμού είναι η πρόκληση ανοσίας με παραγωγή αντισωμάτων και ευαισθητοποιημένων λεμφοκυττάρων, τα οποία αντιδρούν γρήγορα σε νέα επαφή με το αντιγόνο.

Ένα εμβόλιο για να είναι ικανοποιητικό πρέπει να πληροί τους εξής όρους;

1. Να προκαλεί γρήγορη, αποτελεσματική και όσο το δυνατόν μακροχρόνια ανοσοποίηση.
2. Να είναι ασφαλές με όσον το δυνατόν λιγότερες και ηπιότερες παρενέργειες.
3. Να είναι σταθερό ακόμη και σε μη ιδανικές συνθήκες αποθήκευσης και μεταφοράς.

4. Να είναι φθινό ώστε να μπορεί να εφαρμοστεί ευρέως.

Στη συνέχεια αναφέρονται μερικές από τις κυριότερες κατηγορίες εμβολίων.

(1) Εξασθενημένοι ζώντες μικροοργανισμοί όπου έχει ελαχιστοποιηθεί η μολυσματικότητά τους, αλλά διατηρούν τη δυνατότητα να αναπτύσσονται για μικρό χρονικό διάστημα μέσα στον οργανισμό στον οποίο ενοφθαλμίστηκαν. Με τα εμβόλια αυτά επιτυγχάνεται η παραγωγή κυττάρων μνήμης και η διέγερση της κυτταρομεσολαβητικής απόκρισης. Η πιθανότητα μεταστροφής προς τον άγριο τύπο του λοιμογόνου στελέχους είναι ένα σημαντικό μειονέκτημα.

(2) Νεκροί μικροοργανισμοί, τα εμβόλια αυτά επάγουν κυρίως τη χυμική απόκριση. Η ανοσία που προκαλείται συνήθως υπολείπεται εκείνης, που επιτυγχάνεται με ζωντανούς οργανισμούς.

(3) Εμβόλια με απομονωμένα μακρομόρια, τρία είδη αυτού του τύπου εμβολίων χρησιμοποιούνται σήμερα: **πολυσακχαρίτες του ελύτρου**, **αδρανοποιημένες εξωτοξίνες** και **ανασυνδυσμασμένα μικροβιακά αντιγόνα**. Τα πολυσακχαριτικά εμβόλια δεν έχουν την ικανότητα να διεγείρουν τα T_H κύτταρα. Διεγείρουν τα B κύτταρα και προκαλούν ελάχιστη ή και καθόλου παραγωγή κυττάρων μνήμης. Ένας τρόπος άμεσης διέγερσης των T_H κυττάρων με ένα πολυσακχαριτικό αντιγόνο είναι η σύζευξη του αντιγόνου αυτού με μία πρωτεΐνη-φορέα. Τα εμβόλια τοξινών χρησιμοποιούνται για ανοσοποίηση απέναντι σε εξωτοξίνες, που παράγονται από ορισμένα παθογόνα βακτήρια. Ο εμβολιασμός προκαλεί την παραγωγή ειδικών αντισωμάτων έναντι της τοξίνης, τα οποία έχουν την ικανότητα να προσδένονται στην τοξίνη και να εξουδετερώνουν τη δράση της. Οι πρόοδοι στη βιοτεχνολογία έχουν ανοίξει καινούριους ορίζοντες στην ανοσοπροφύλαξη. Θεωρητικά, το γονίδιο που κωδικοποιεί μία συγκεκριμένη ανοσογόνο πρωτεΐνη μπορεί να κλωνοποιηθεί και να εκφραστεί σε κύτταρα, με τη βοήθεια της τεχνολογίας του ανασυνδυσμασμένου DNA.

(4) Εμβόλια από συνθετικά πεπτίδια, τα πεπτίδια δεν είναι τόσο ανοσογόνα όσο οι πρωτεΐνες και είναι δύσκολο να επάγουν και χυμική και κυτταρομεσολαβητική ανοσοαπόκριση. Η σύζευξή τους με άλλα μόρια φορείς και η χρήση ανοσοενισχυτικών μπορεί να ενισχύσει την ανάπτυξη προστατευτικής ανοσίας στα πεπτίδια. Η παρασκευή συνθετικών πεπτιδίων για τη χρήση τους ως εμβολίων που θα επάγουν είτε χυμική είτε κυτταρομεσολαβητική ανοσοαπόκριση, απαιτεί την κατανόηση της φύσης των T και B κυτταρικών επιτόπων τους. Το ιδανικό εμβόλιο για την πρόκληση χυμικής ανοσοαπόκρισης θα πρέπει να περιέχει πεπτίδια από τους ανοσοεπικρατείς B κυτταρικούς επιτόπους. Επίσης, ένα αποτελεσματικό εμβόλιο θα πρέπει να προκαλεί την παραγωγή ενός πληθυσμού T_H

κυττάρων μνήμης. Επομένως το πεπτιδίο αυτό θα πρέπει να περιέχει και ανοσοεπικρατείς T-κυτταρικούς επιτόπους.

(5) Εμβόλια με γενετικά τροποποιημένους φορείς, τα γονίδια που κωδικοποιούν τα κυριότερα αντιγόνα ορισμένων ιδιαίτερα παθογόνων μικροοργανισμών είναι δυνατόν να εισαχθούν μέσα σε εξασθενημένους ιούς ή βακτήρια. Οι εξασθενημένοι μικροοργανισμοί έχουν ρόλο φορέα, ο οποίος θα πολλαπλασιαστεί μέσα στον ξενιστή και θα εκφράσει το γονιδιακό προϊόν του παθογόνου, μεταφέροντας μεγάλες ποσότητες του αντιγόνου επί τόπου.

(6) Εμβόλια DNA, μία πρόσφατα ανεπτυγμένη μέθοδος εμβολιασμού, συνίσταται στην άμεση ενδομυϊκή χορήγηση πλασμιδιακού DNA. Τα μυϊκά κύτταρα προσλαμβάνουν το DNA και εκφράζουν το πρωτεϊνικό αντιγόνο που κωδικοποιείται από αυτό. Το υικό αντιγόνο εκφράζεται και στα δενδριτικά κύτταρα της περιοχής που προσλαμβάνουν το πλασμιδιακό DNA και εκφράζουν το υικό αντιγόνο. Τα εμβόλια DNA επάγουν τόσο χυμική όσο και κυτταρομεσολαβητική ανοσία και προκαλούν παρατεταμένη έκφραση του αντιγόνου, γεγονός που οδηγεί στη δημιουργία σημαντικής ανοσολογικής μνήμης.

(7) Εμβόλια πολυσθενών υπομονάδων, χρησιμοποιούνται ως καλύτερα συστήματα αύξησης της ανοσογονικότητας των πεπτιδικών αντιγόνων καθώς και για τη διευκόλυνση εισαγωγής τους στο κύτταρο για περιπτώσεις που είναι επιθυμητή η πρόκληση ανοσοαπόκρισης μέσω των CTL. Συμπλέγματα αντιγόνου-αντισώματος στερεάς φάσης με την τοποθέτηση μονοκλωνικών αντισωμάτων σε συγκεκριμένα στερεά σωματίδια και, στη συνέχεια, με τον κορεσμό τους με το επιθυμητό αντιγόνο χρησιμοποιούνται ως εμβόλια. Έχειδειχθεί ότι επάγουν έντονη χυμική και κύτταρο μεσολαβητική ανοσοαπόκριση. Άλλοι τύποι περιλαμβάνουν πρωτεϊνικά μικύλλια, λιπιδικά σφαιρίδια (λιποσώματα) ή ανοσοδιεγερτικά συμπλέγματα όπου είναι ενσωματωμένα τα πρωτεϊνικά αντιγόνα. Εκτός από την αυξημένη αντιγονικότητά τους, τα λιποσώματα και τα ανοσοδιεγερτικά συμπλέγματα φαίνεται ότι έχουν την ικανότητα να συντήκονται με την κυτταρική μεμβράνη, με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η είσοδος του αντιγόνου στον ενδοκυττάριο χώρο, όπου θα συμβεί η επεξεργασία του μέσω της ενδογενούς οδού. Με τον τρόπο αυτό επάγεται η κυτταρομεσολαβητική ανοσοαπόκριση.⁷

1.10 Επίκτητες (δευτεροπαθείς) ανοσοανεπάρκειες

Συχνά αναπτύσσονται ανεπάρκειες του ανοσοποιητικού συστήματος εξαιτίας ανωμαλιών οι οποίες δεν είναι γενετικές αλλά επίκτητες. Η σημαντικότερη από αυτές είναι η λοίμωξη HIV.

Ο HIV εγκαθιστά λανθάνουσα λοίμωξη στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος αλλά μπορεί να επανενεργοποιηθεί ώστε να παράγει λοιμώδη ιό. Η παραγωγή του ιού οδηγεί στο θάνατο των μολυσμένων κυττάρων, σε ανοσοανεπάρκεια και στις κλινικές εκδηλώσεις του AIDS. Η λοίμωξη από τον HIV μεταδίδεται με σεξουαλική επαφή, βελόνες μολυσμένες από χρήστες ενδοφλεβίων ναρκωτικών, διαπλακουντιακή μεταφορά, ή μετάγγιση μολυσμένου αίματος ή παραγώγων του αίματος. Μετά τη λοίμωξη μπορεί να υπάρχει μια σύντομη, οξεία, ιαιμία, οπότε ο ιός ανιχνεύεται στο αίμα και ο ξενιστής απαντά όπως σε οποιαδήποτε ήπια ιογενή λοίμωξη. Ο ιός μολύνει $CD4^+$ T-κύτταρα, δένδριτικά κύτταρα και μακροφάγα στο αίμα, στις θέσεις εισόδου στα επιθήλια και περισσότερο από όλα στα λεμφικά όργανα όπως είναι οι λεμφαδένες. Τα δένδριτικά κύτταρα μπορούν να προσλάβουν τον ιό καθώς εισέρχεται διαμέσου των επιθηλίων και τον μεταφέρουν στα περιφερικά λεμφικά όργανα, όπου μολύνει τα T-κύτταρα. Ο ενσωματωμένος προϊός μπορεί να ενεργοποιηθεί στα μολυσμένα κύτταρα, όπως ήδη αναφέρθηκε, οδηγώντας στην παραγωγή σωματίων του ιού και στην εξάπλωση της λοίμωξης. Στην πορεία της λοίμωξης από τον HIV η κύρια πηγή των λοιμωδών ιικών σωματίων είναι τα ενεργοποιημένα $CD4^+$ T-κύτταρα, ενώ τα δένδριτικά κύτταρα και τα μακροφάγα είναι οι δεξαμενές της λοίμωξης.

Η εξάλειψη των $CD4^+$ T-κυττάρων στην πορεία της λοίμωξης HIV οφείλεται στην κυτταροπαθογόνο δράση του ιού, η οποία προκύπτει από την παραγωγή των ιικών σωματίων. Η ενεργός έκφραση των γονιδίων του ιού και η πρωτεϊνοσύνθεση μπορεί να παρεμβαίνουν στους συνθετικούς μηχανισμούς των T-κυττάρων. Επομένως, τα μολυσμένα T-κύτταρα, μέσα στα οποία παράγεται ο ιός, φονεύονται στη διάρκεια της διαδικασίας αυτής. Μπορεί επίσης να καταστραφούν και άλλα μολυσμένα κύτταρα, όπως τα δένδριτικά, με αποτέλεσμα τη διαταραχή της αρχιτεκτονικής των λεμφικών οργάνων. Ο συνδυασμός της εξάλειψης των $CD4^+$ T-κυττάρων και των δομικών ανωμαλιών των λεμφικών οργάνων, οδηγεί στην ανοσοανεπάρκεια που χαρακτηρίζει το AIDS.⁷

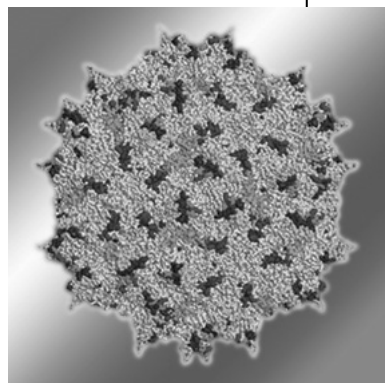
Κεφάλαιο 2^ο

- **Στοιχεία Ιολογίας**
- **Ιός της Γρίπης – Ιός τη γρίπης
των πτηνών (H5N1)**
- **Ιός της Ανθρώπινης
Ανοσοανεπάρκειας (HIV)**

Ι. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Στοιχεία Ιολογίας

- Ορισμός των ιών
- Κύριες γενικές ιδιότητες των ιών
- Γενική μορφολογία ιών
- Χημική σύνθεση των ιών
- Αναπαραγωγή (πολλαπλασιασμός) των ιών
- Αναπαραγωγικός κύκλος ιών-Στάδια αναπαραγωγής
- Αναπαραγωγή RNA-ιών
- RNA ιοί με αρνητική μονή έλικα ssRNA (-)
- Ρετροϊοί – (Ιοί με μονή έλικα ssRNA (+) με ενδιάμεσο DNA)



I.2.1 Ορισμός των ιών

Η απόδοση ενός ορισμού για τους ιούς είναι δυσχερής λόγω της ποικιλίας των φυσικοχημικών και βιολογικών χαρακτήρων των διαφόρων ομάδων ιών και ιδιαίτερα λόγω των πολλών διαφορετικών σχέσεων ιού-ξενιστή κυττάρου. Έχουν προταθεί πολλοί ορισμοί, κανείς όμως απ' αυτούς δεν είναι πλήρης και ιδανικός.

Οι Luria και Darnell (1967) δίνουν τον εξής ορισμό για τους ιούς: Οι ιοί είναι οντότητες των οποίων το γενετικό υλικό αποτελείται από τμήμα νουκλεϊνικού οξέος (DNA ή RNA), που αναπαράγεται μέσα σε ζώντα κύτταρα και χρησιμοποιεί το συνθετικό μηχανισμό των ξενιστών κυττάρων προκειμένου να κατευθύνει τη σύνθεση νέων απογόνων ιικών σωματιδίων (βιρίων), τα οποία περιέχουν το ιικό γενετικό υλικό και το μεταφέρουν σε άλλα κύτταρα. Οι ιοί μπορούν επίσης να ορισθούν ως οι μικρότεροι σε μέγεθος (10-300 nm) και από πλευράς χημικής σύνθεσης, μεταβολικού εξοπλισμού και λειτουργίας ως οι απλούστεροι και λιτότεροι, αυστηρά παρασιτικοί γνωστοί λοιμογόνους παράγοντες. Οι ιοί αναφέρονται ως «λοιμογόνους παράγοντες» και όχι ως μικροοργανισμοί, καθόσον οι αληθινοί μικροοργανισμοί, ανεξάρτητα από το μέγεθος τους, είναι κύτταρα που περιέχουν νουκλεϊνικό οξύ, αλλά και διαθέτουν δικό τους μεταβολικό εξοπλισμό με τον οποίο μπορούν να αναπαράγουν τα δομικά συστατικά τους και να πολλαπλασιάζονται με διαίρεση του μητρικού τους κυττάρου. Οι ιοί μπορούν επίσης να ορισθούν ως μολυσματικό, ή δυνάμενο να μεταδοθεί, γενετικό υλικό ορισμένης σύνθεσης που περιβάλλεται από κέλυφος κυρίως πρωτεϊνικής φύσης, το οποίο και τους προσδίδει την μορφή τους. Υπό την έννοια αυτή, η λοίμωξη ενός κυττάρου από ένα ιό αποτελεί εισβολή ενός γενετικού συστήματος στη σφαίρα δράσης ενός άλλου.¹

1.2.2 Κύριες γενικές ιδιότητες των ιών

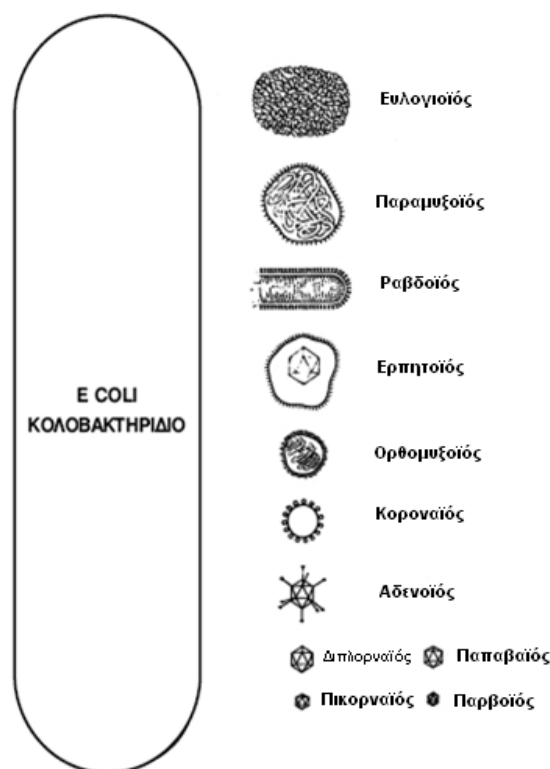
Μεταξύ των διαφόρων ιδιοτήτων που έχουν οι ιοί, οι παρακάτω τρεις ξεχωρίζουν τους ιούς σε σχέση με τους άλλους μικροοργανισμούς:

1. **Μικρό μέγεθος.** Οι ιοί είναι μικρότεροι από τους άλλους μικροοργανισμούς. Το μέγεθος τους ποικίλλει από 10 έως 300 nm (**Σχήμα 1.2.1**).
2. **Γενετικό υλικό από DNA ή RNA.** Οι ιοί περιέχουν ένα μόνο τύπο γενετικού υλικού, δηλαδή είτε δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ (DNA) οπότε ονομάζονται DNA-ιοί ή δεοξυριβοϊοί, είτε ριβονουκλεϊνικό οξύ (RNA) οπότε ονομάζονται RNA-ιοί ή ριβοϊοί, αλλά όχι και τα δύο μαζί.
3. **Μεταβολική αδράνεια.** Οι ιοί που βρίσκονται έξω από ευαίσθητα κύτταρα εμφανίζουν μεταβολική αδράνεια. Στερούνται αυτοδύναμης μεταβολικής δραστηριότητας και δεν έχουν ριβοσωμάτια, δεν πολλαπλασιάζονται, ούτε παρουσιάζουν οποιαδήποτε άλλη εμφανή ή ανιχνεύσιμη μεταβολική δραστηριότητα πάνω στην άβιο ύλη. Όταν όμως εισέλθουν μέσα σε ευπαθή κύτταρα είναι πια ικανοί να αναπαράγονται με δαπάνη της μεταβολικής ύλης και ενέργειας και με κατάλληλο αναπροσανατολισμό και κινητοποίηση της μεταβολικής μηχανής του ξενιστού κυττάρου. Έτσι οι ιοί αποτελούν την ύψιστη γνωστή μορφή παρασιτισμού.

Η αναπαραγωγή των ιών περιλαμβάνει (1) ενδοκυτταρική διάσπαση των βιρίων στα μακρομοριακά συστατικά τους και ακολούθως (2) σύνθεση ιικών νουκλεϊνικών οξέων και πρωτεϊνών, των οποίων η δομή καθορίζεται από το γένωμα του ιού. Τελικά (3) τα ιικά μακρομόρια συναθροίζονται σε απογόνους-βίρια, που ανέρχονται αριθμητικά σε χιλιάδες ιικά σωματίδια ανά μολυνθέν κύτταρο. Προφανώς αυτός ο τρόπος αναπαραγωγικού κύκλου διαφέρει ριζικά του τρόπου πολλαπλασιασμού των μικροβίων (βακτηρίων) που είναι κατά κανόνα η διχοτόμηση του μητρικού μικροβιακού κυττάρου.

Παρά την παρασιτική εξάρτηση των ιών από τα κύτταρα-ξενιστές, ορισμένοι ιοί διαθέτουν ένα ή περισσότερα ένζυμα, που χρησιμοποιούν για την είσοδο τους μέσα σε ευπαθή κύτταρα, την απέκδυση του πυρηνικού τους οξέος από τα περιβλήματα του ή/και για την πυροδότηση ή εκκίνηση ή εκτροπή προς όφελος τους του μεταβολικού δυναμικού του ξενιστού κυττάρου.

Από τους βασικούς διαφοροποιητικούς χαρακτήρες των ιών προκύπτουν, σαν συνέπεια, ορισμένα πρακτικής σημασίας επακόλουθα. Έτσι π.χ. οι ιοί δεν είναι ευαίσθητοι στις αντιβιοτικές ουσίες που δρουν βλαπτικά σε ορισμένες μεταβολικές δραστηριότητες (π.χ. σύνθεση κυτταρικού τοιχώματος, σύνθεση πρωτεϊνών) των άλλων μικροοργανισμών.¹



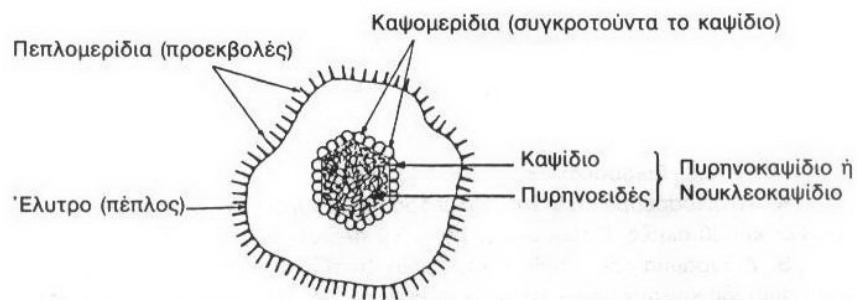
Σχήμα 1.2.1 Σύγκριση μεγέθους και μορφής των συνηθέστερων ιών με το κολοβακτηρίδιο¹

1.2.3 Γενική μορφολογία ιών

Οι ιοί συνίστανται βασικά από ένα κεντρικό τμήμα που περιέχει ένα τύπο νουκλεϊνικού οξέος (DNA ή RNA) που περιβάλλεται από ένα πρωτεϊνικό περίβλημα. Ορισμένοι μόνο ιοί, που ονομάζονται ελутροφόροι ιοί, περιβάλλονται επιπλέον από λιποπρωτεϊνικό ή και λιποσακχαριδικό έλυτρο (Σχήμα 1.2.2). Ιοί οι οποίοι δεν φέρουν έλυτρο ονομάζονται γυμνοί ιοί.

Το πλήρες, ανέπαφο και λοιμογόνο ικό σωματίδιο ονομάζεται **βίριο**. Το πρωτεϊνικό περίβλημα ονομάζεται **κάψα ή καψίδιο** και οι μορφολογικές υπομονάδες που συγκροτούν την κάψα καλούνται **καψομερίδια**. Κάθε καψομερίδιο συγκροτείται περαιτέρω από χημικές υπομονάδες. Το κεντρικό τμήμα του ιού που περιλαμβάνει το νουκλεϊνικό οξύ συχνά φέρεται με την ονομασία **πυρηνοειδές**. Το πυρηνοειδές μαζί με το στενά περιβάλλον αυτό καψίδιο φέρονται συχνά με την ονομασία **πυρηνοκαψίδιο** (ή νουκλεοκαψίδιο). Η πρωτεϊνική κάψα αφ' ενός προφυλάσσει την εύθραυστη ταινία του πυρηνικού οξέος από μηχανικές και άλλες φυσικοχημικές βλαπτικές επιδράσεις (όπως π.χ. από την επίδραση νουκλεασών που κυκλοφορούν στο αίμα) και αφ' ετέρου προσδίδει στον ιό αντιγονικότητα. Ορισμένοι ιοί φέρουν διπλό πρωτεϊνικό κέλυφος.

Το έλυτρο περιβάλλει εξωτερικά το ικό σωματίδιο άλλοτε χαλαρά και άλλοτε σταθερά, ανάλογα με το είδος του ελυτροφόρου ιού. Προέρχεται μερικώς από μεμβράνες του ξενιστού κυττάρου όπου έλαβε χώρα η αναπαραγωγή του ιού. Η βασική δομή των ελύτρων περιλαμβάνει διπλή στιβάδα φωσφολιπιδίων, στην οποία εντοιχίζονται πρωτεΐνες και γλυκοπρωτεΐνες των ιών. Η απώλεια του ελύτρου σημαίνει και απώλεια της μολυσματικότητας των ιών, κυρίως επειδή δεν μπορούν εισέλθουν μέσα στα ευπαθή κύτταρα. Το έλυτρο περιέχει ικά αντιγόνα, αλλά επίσης και αντιγόνα της μεμβράνης του ξενιστού κυττάρου, από την οποία προκύπτει εν μέρει.



Σχήμα 1.2.2 Τα μορφολογικά συστατικά που συνθέτουν ένα πλήρες ελυτροφόρο ικό σωματίδιο¹

Τα ικά σωματίδια εμφανίζουν τρεις τύπους αρχιτεκτονικής διάταξης των δομικών στοιχείων τους, και ειδικότερα του νουκλεοκαψιδίου τους:

1. Κυβοειδής και μάλιστα εικοσαεδρική συμμετρία.
2. Ελικοειδής συμμετρία.
3. Σύμπλοκος συμμετρία.

Μεταξύ των παραπάνω τριών βασικών τύπων αρχιτεκτονικής διάταξης υπάγονται ειδικότερα μορφολογικά πρότυπα, όπως των μυξοϊών (σφαιροειδή σωματίδια με πυρηννοκαψίδιο ελικοειδούς συμμετρίας), των ραβδοϊών (σωματίδια σχήματος σφαίρας πυροβόλου όπλου, με πυρηννοκαψίδιο ελικοειδούς συμμετρίας) κ.λπ.¹

1.2.4 Χημική σύνθεση των ιών

Εκτός από το νουκλεϊνικό οξύ, όπου βρίσκονται οι εντολές για την αναπαραγωγή του ιού, οι πρωτεΐνες αποτελούν το κυριότερο συστατικό κάθε ιικού σωματιδίου.

Οι ποικίλες ικές πρωτεΐνες ασκούν διάφορες λειτουργικές αποστολές. Οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στην επιφάνεια των ικών σωματιδίων έχουν συχνά ειδικές διατάξεις και σχηματίζουν μέρος ειδικών μορφωμάτων, που εκδηλώνουν ορισμένες βιολογικές δραστηριότητες (π.χ. οι αιμοσυγκολλητίνες και οι νευραμινιδάσες των ορθο-, παρα-μυξοϊών, ραβδοϊών κ.λπ.). Τα βίρια των μικρότερων και απλούστερων ιών περιέχουν μία ή λίγες μόνο πρωτεΐνες ή πολυπεπτιδικές αλυσίδες, ενώ τα βίρια των μεγαλύτερων και πολυπλοκοτέρων ιών μπορεί να περιέχουν πολύ περισσότερες.

Το νουκλεϊνικό οξύ των ιών περιέχει τον κώδικα για το σχηματισμό διαφόρων ενζύμων, απαραίτητων για τη βιοσύνθεση των ικών σωματιδίων. Σπανιότερα οι πρωτεΐνες που υπάρχουν στο βίριο συνιστούν ένζυμα έτοιμα να αναλάβουν κάποια λειτουργία, αυτές αποτελούν τις καλούμενες αρχικές ή πρώϊμες πρωτεΐνες οι οποίες κινητοποιούν το μηχανισμό της ικής αναπαραγωγής.

Επιπλέον οι ελυτροφόροι ιοί φέρουν λιπίδια που αποτελούν συστατικό των περιβλημάτων τους. Ορισμένοι ιοί (π.χ. μυξοϊοί) φέρουν ελάχιστες ποσότητες υδατανθράκων συνήθως με τη μορφή γλυκοπρωτεϊνικών ακανθών πάνω στο έλυτρο τους.

Οι ικές πρωτεΐνες διακρίνονται σε δύο κατηγορίες:

1. Δομικές πρωτεΐνες που αποτελούν δομικό υλικό των ιών και είναι οι πρωτεΐνες του καψιδίου, του ελύτρου ή οι πρωτεΐνες του πυρήνα. Οι γλυκοπρωτεΐνες βρίσκονται στις άκανθες και τις προεκβολές των ελύτρων. Κυρίως πρόκειται για ολιγομερή π.χ οι άκανθες της αιμοσυγκολλητίνης του ιού της γρίπης είναι τριμερή, ενώ οι άκανθες της νευραμινιδάσης του ιδίου του ιού είναι τετραμερή.
2. Μη δομικές πρωτεΐνες που δεν ενσωματώνονται στα ικά σωματίδια, αλλά κατά κανόνα αποτελούν ένζυμα απαραίτητα για τη διεργασία αναπαραγωγής των ιών, όπως για τη σύνθεση νέων μορίων ικού πυρηνικού οξέος.

Ο αριθμός των πρωτεϊνών για τις οποίες μπορεί να φέρει τον κώδικα παραγωγής κάποιος ιός εξαρτάται από το μέγεθος του ικού γενετικού υλικού. Εξ αιτίας αυτού του γεγονότος κάποιοι ιοί μπορεί να έχουν ανάγκη και να χρησιμοποιούν μερικά από τα ένζυμα του ξενιστού κυττάρου, για την αναπαραγωγή τους.¹

1.2.5 Αναπαραγωγή (πολλαπλασιασμός) των ιών

Τα στάδια αναπαραγωγής των ιών περιλαμβάνουν: την προσκόλληση, είσοδο, έκδυση, μεταγραφή, μετάφραση πρώιμων πρωτεϊνών, τον αναδιπλασιασμό του νουκλεϊνικού

οξέος του ιού, τη μετάφραση όψιμων πρωτεϊνών, τη συνάθροιση-συναρμολόγηση δομικών στοιχείων, τη συγκρότηση νέων βιρίων και απελευθέρωση (έξοδος).

Το νουκλεϊνικό οξύ των ιών έχει κατατεθειμένες τις γενετικές πληροφορίες ώστε να κωδικοποιεί για τα ειδικά για τον κάθε ιό μακρομόρια, για τη σύνθεση όμως των μακρομορίων αυτών απαιτείται και χρησιμοποιείται η μεταβολική μηχανή των ξενιστών κυττάρων. Η παραγωγή ιικού m-RNA αποτελεί βασικό και αποφασιστικό βήμα που καθιστά ικανό τον ιό να αναλάβει επ' ωφελεία του τη διεύθυνση των μεταβολικών λειτουργιών του ξενιστού κυττάρου. Το ιικό m-RNA σχηματίζεται κατόπιν μεταγραφής του ιικού γενετικού υλικού. Στα ριβοσωμάτια των μολυνθέντων κυττάρων συντίθενται ιικές πρωτεΐνες, δομικές και μη δομικές. Οι πρωτεΐνες του καψιδίου των ιών συντίθενται στα ελεύθερα ριβοσώματα, ενώ οι πρωτεΐνες του ελύτρου συντίθενται στα ριβοσώματα του ενδοπλασματικού δικτύου, οι πρωτεΐνες αυτές αφού γλυκοζυλιωθούν, μέσω κυστιδίων, μεταφέρονται στη μεμβράνη των κυττάρων. Εκτός από τις δομικές πρωτεΐνες των ιών, σχηματίζονται και οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες, οι οποίες επηρεάζουν τη μεταγραφή του γενώματος και τη μετάφραση των m-RNAs.

Το παραπάνω σύστημα ροής των πληροφοριών από τα ιικά γονίδια προς τα κυτταρικά ριβοσωμάτια ακολουθεί την ορθόδοξη οδό για τους DNA ιούς. Αντίθετα, οι RNA ιοί ξεκινούν την αναπαραγωγή τους από γενετικές πληροφορίες κατατεθειμένες στο RNA. Το μητρικό RNA των ριβοϊών μπορεί να εκτελεί μία ή αμφότερες από δύο βασικές λειτουργίες, ανάλογα με τους ριβοϊούς, δηλαδή αφ' ενός να επιτελεί απ' ευθείας μετάφραση πρωτεϊνών στα ριβοσωμάτια των κυττάρων (θετική πολικότητα, το RNA χρησιμεύει ως mRNA) όπου ολισθαίνει σαν μία ταινία m-RNA και αφ' ετέρου να χρησιμεύει σαν μήτρα για την παραγωγή ενδιάμεσων, συμπληρωματικών ταινιών RNA (αρνητική πολικότητα, το RNA δεν χρησιμεύει άμεσα ως mRNA), από τις οποίες στην συνέχεια παράγονται νέες θετικές ταινίες RNA.¹

1.2.6 Αναπαραγωγικός κύκλος ιών-Στάδια αναπαραγωγής

Ο κύκλος αναπαραγωγής των ιών μπορεί να διακριθεί σε ορισμένα διαδοχικά στάδια, αν και σε ένα μολυσμένο από ιό κύτταρο, όπου λαμβάνει χώρα αναπαραγωγή απογόνων ιών, είναι δυνατό, λίγες ώρες μετά την έναρξη του αναπαραγωγικού κύκλου, να παρατηρηθεί ότι ορισμένες από τις διαχωριζόμενες σε στάδια διεργασίες λαμβάνουν χώρα και ταυτόχρονα, με τελική απόληξη τη συγκρότηση και απελευθέρωση νέων βιρίων.

Τα τρία πρώτα στάδια της αναπαραγωγής αποτελούν τις αρχικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ιού και του προσβαλλόμενου κυττάρου.

1. Η προσκόλληση του ιού στην επιφάνεια του προσβαλλόμενου κυττάρου αποτελεί το πρωταρχικό βήμα για την εισβολή του ιού στο κύτταρο. Η αρχική επαφή κυττάρου-ιού είναι ασθενής (αναστρέψιμη προσκόλληση), ενώ στη συνέχεια γίνεται πιο δυνατή (μη αναστρέψιμη προσκόλληση). Αυτή η πιο σταθερή ένωση είναι προσκόλληση σε πολλαπλά σημεία πιθανόν και σε σημεία μέσα στη μεμβράνη. Όσο περισσότερα σημεία προσκολληθούν στην επιφάνεια των ιών τόσο μεγαλύτερη η πιθανότητα λοίμωξης. Τα σημεία της επιφάνειας του ιού μπορεί να είναι προεκβολές ειδικών πρωτεϊνών του ιού, όπως οι άκανθες ή δομικές πρωτεΐνες στην επιφάνεια των ιών, ή ένα μωσαϊκό διαφόρων πρωτεϊνών του καψιδίου. Τα σημεία υποδοχής στα κύτταρα του ξενιστή είναι πιθανόν πρωτεΐνες της επιφάνειας συχνά γλυκοπρωτεΐνες. Για πολλούς ιούς έχει αποδειχθεί ότι προσκολλούνται σε ειδικούς υποδοχείς. Οι δυνάμεις που συγκρατούν τους ιούς επάνω στην επιφάνεια του κυττάρου είναι ηλεκτροστατικές. Επίσης, κατιόντα Mg^{++} και Ca^{++} λαμβάνουν μέρος στην ένωση. Η ταχύτητα δράσης του κυττάρου-ιού ποικίλει, είναι ανεξάρτητη από τη θερμοκρασία αλλά είναι απευθείας ανάλογη με τη συγκέντρωση των κυττάρων, δηλαδή τη διαθέσιμη επιφάνεια στην οποία ο ιός μπορεί να προσκολληθεί. Η σταθερότητα σύνδεσης των ιών στα κύτταρα, εξαρτάται από τη θερμοκρασία και απαιτεί πολυσθενή προσκόλληση των ιών στα κύτταρα δηλαδή προσκόλληση σε πολλούς υποδοχείς. Αμέσως μετά την προσκόλληση, οι ιοί περιβάλλονται μερικώς από πλασματική μεμβράνη ως αποτέλεσμα προσκόλλησης των ιών σε πολλαπλά σημεία της πλασματικής μεμβράνης, κάνοντας έτσι τη μεμβράνη να διπλώνεται γύρω από τους ιούς. Πολλές φορές δεν αρκεί ένα μόριο για την προσκόλληση των ιών, αλλά χρειάζεται και ένας επιπλέον υποδοχέας (συνυποδοχέας). Η ύπαρξη των υποδοχέων αυτών κάνει τα κύτταρα ευαίσθητα στους ιούς. Οι ειδικοί υποδοχείς επάνω στους οποίους μπορούν να προσροφηθούν οι ιοί, παίζουν σημαντικό ρόλο στον τροπισμό και στην παθογένεια των ιών. Οι υποδοχείς της επιφάνειας των κυττάρων επιτελούν λειτουργίες των κυττάρων, και οι ιοί τους χρησιμοποιούν για να εισέρχονται στα κύτταρα. Κάθε ευαίσθητο κύτταρο έχει τουλάχιστον 100.000 υποδοχείς για ένα δεδομένο ιό. Απουσία, καταστροφή ή δέσμευση των ειδικών αυτών υποδοχέων καθιστά τα κύτταρα ανθεκτικά στην προσβολή από τον ιό, εκτός αν το γενετικό υλικό του ιού εισαχθεί απ' ευθείας στο εσωτερικό του κυττάρου.

2. Η είσοδος του ιού στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου και ειδικότερα ο μοριακός μηχανισμός εισόδου ποικίλει για τους διαφόρους ιούς. Οι ιοί οι οποίοι έχουν έλυτρο και οι γυμνοί ιοί έχουν διαφορετικό τρόπο εισόδου στο κύτταρο. Οι περισσότεροι γυμνοί ιοί εισέρχονται μέσω ενδοκύττωσης. Αφού προσκολληθούν στους υποδοχείς βυθίζονται σε εγκολπώματα. Τα εγκολπώματα τελικά κλείνουν και σχηματίζουν κυστίδια μέσω των οποίων

οι ιοί έρχονται στο κυττόπλασμα. Τα κυστίδια μεταφέρουν τους ιούς στα πρώιμα ενδοσώματα. Οι υποδοχείς ανακυκλώνονται ερχόμενοι στην επιφάνεια των κυττάρων μέσω μεταφορικών κυστιδίων. Το περιεχόμενο από τα πρώιμα ενδοσώματα έρχεται στα όψιμα ενδοσώματα. Τα όψιμα ενδοσώματα συντήκονται με τα λυσοσώματα και οι ιοί εξέρχονται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου μέσω λύσης των ενδοσωμάτων οπότε συμβαίνει και το ξεσκεπάσμα των ιών και η απελευθέρωση του πυρηνικού τους οξέος. Ένας άλλος τρόπος εισόδου των γυμνών ιών στα κύτταρα είναι μέσω σχηματισμού πόρου. Οι ιοί αυτοί προσκολλώνται στην επιφάνεια των κυττάρων του ξενιστή και απελευθερώνουν το γένωμά τους, το οποίο διαπερνά την κυττοπλασματική μεμβράνη μέσω πόρου, ο οποίος έχει σχηματιστεί από αυτούς. Οι ιοί οι οποίοι έχουν έλυτρο εισέρχονται στο κύτταρο είτε με ενδοκύττωση είτε με σύντηξη με τα στοιχεία της μεμβράνης. Ελυτροφόροι ιοί όπως ο ιός της γρίπης εισέρχονται στα κύτταρα με ενδοκύττωση, η οποία ρυθμίζεται από τους υποδοχείς. Αφού οι ιοί εγκλεισθούν μέσα στα κυτταρικά ενδοσώματα σε χαμηλό pH, συντήκονται με τη μεμβράνη των ενδοσωμάτων μέσω της πρωτεΐνης σύντηξης που διαθέτουν και το νουκλεϊνικό τους οξύ εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα. Κατά τη σύντηξη υπάρχουν φυσικές αντιδράσεις μεταξύ των πλασματικών μεμβρανών και της επιφάνειας των κυττάρων που επιφέρουν φυσικές αλλαγές στους ιούς και στη μεμβράνη με αποτέλεσμα την είσοδο των ιών στα κύτταρα. Η σύντηξη γίνεται μέσω μιας βραχείας πρωτεϊνικής αλυσίδας σύντηξης, η οποία διαθέτει υδρόφοβα αμινοξέα, τα οποία προκαλούν τη σύντηξη των λιπιδίων των ιών με τα λιπίδια της μεμβράνης του κυττάρου του ξενιστή. Ο ιός HIV εισέρχεται με σύντηξη.

3. Έκδυση. Το ιικό σωματίδιο ακολούθως απεκδύεται από την πρωτεϊνική του κάψα και απελευθερώνει τα νουκλεϊκά του οξέα. Τούτο επιτυγχάνεται πιθανότατα από ένζυμα του ξενιστού κυττάρου που υπάρχουν στα λυσοσώματα του κυττάρου. Έτσι απελευθερώνεται ή καθίσταται προσπελάσιμο το ιικό πυρηνικό οξύ, ώστε να καταστεί δυνατή η παραγωγή ιικού m-RNA. Η διάλυση αυτή των στοιχείων των ιών είναι απαραίτητο βήμα πριν από την αναπαραγωγή τους. Η φάση αυτή του κύκλου ανάπτυξης των ιών ονομάζεται περίοδος έκλειψης και διαρκεί μέχρι το σχηματισμό των πρώτων απογόνων ιών. Κατά τη διάρκεια της έκλειψης δεν μπορούν να παρατηρηθούν πλήρη ιικά σωματίδια μέσα στα κύτταρα. Μερικοί ιοί απελευθερώνουν το γενετικό τους υλικό σχεδόν αμέσως μετά την είσοδο, ενώ άλλοι το μεταφέρουν στον πυρήνα των κυττάρων μέσω μιας πρωτεΐνης.

Στα επόμενα, μετά τα τρία πρώτα, στάδια η αναπαραγωγή των ιών διαφέρει ανάλογα αν πρόκειται για DNA ή RNA-ιούς. Πάντοτε όμως ουσιώδης σκοπός της αναπαραγωγικής διαδικασίας παραμένει (α) η αναστολή των κυτταρικών λειτουργιών, (β) η μεταγραφή σε

mRNA, (γ) ο αναδιπλασιασμός του γενώματος των ιών δ) η μορφογένεση και η απελευθέρωση των ιών από τα κύτταρα.

Τα γενώματα των ιών και οι πρωτεΐνες των καψιδίων συνθέτουν τους προιούς. Η ωρίμανση των ιών γίνεται κυρίως στην περιοχή του αναδιπλασιασμού του πυρηνικού οξέος των ιών. Η απελευθέρωση των ιών από τα κύτταρα γίνεται μέσω λύσης των κυττάρων ή μέσω δημιουργίας εκβλαστωμάτων των κυττάρων. Ο τρόπος απελευθέρωσης των γυμνών ιών εξαρτάται από τον τύπο των ιών και από τον τύπο των κυττάρων. Οι RNA γυμνοί ιοί αφού ωριμάσουν απελευθερώνονται ταχέως από το κύτταρο προκαλώντας λύση και θάνατο των κυττάρων. Η λύση και ο θάνατος των κυττάρων προκαλείται από τις βλαβερές επιδράσεις της αναπαραγωγής των ιών και τις κυττοπαθολογικές αλλοιώσεις που αναπτύσσονται. Οι ιοί που φέρουν έλυτρο, έχουν ένα αντιγονικό μωσαϊκό στο έλυτρο τους χαρακτηριστικό των ιών και των κυττάρων του ξενιστή και εξέρχονται μέσω εκβλαστωμάτων από τα κύτταρα από τροποποιημένα μέρη της μεμβράνης, στα οποία έχουν ενσωματωθεί πρωτεΐνες του ελύτρου των ιών. Τα εκβλαστώματα δεν γίνονται μόνο από την πλασματική μεμβράνη αλλά και από άλλες μεμβράνες των κυττάρων. Τα εκβλαστώματα αποκόπτονται από το κύτταρο και δημιουργούνται οι νέοι ιοί χωρίς να έχουμε λύση του κυττάρου. Ο ιός HIV μπορεί να εξαπλώνεται από κύτταρο σε κύτταρο μέσω πόρων των κυττάρων ή μέσω σύντηξης των μεμβρανών των κυττάρων.^{1,2}

1.2.6.1 Αναπαραγωγή RNA-ιών

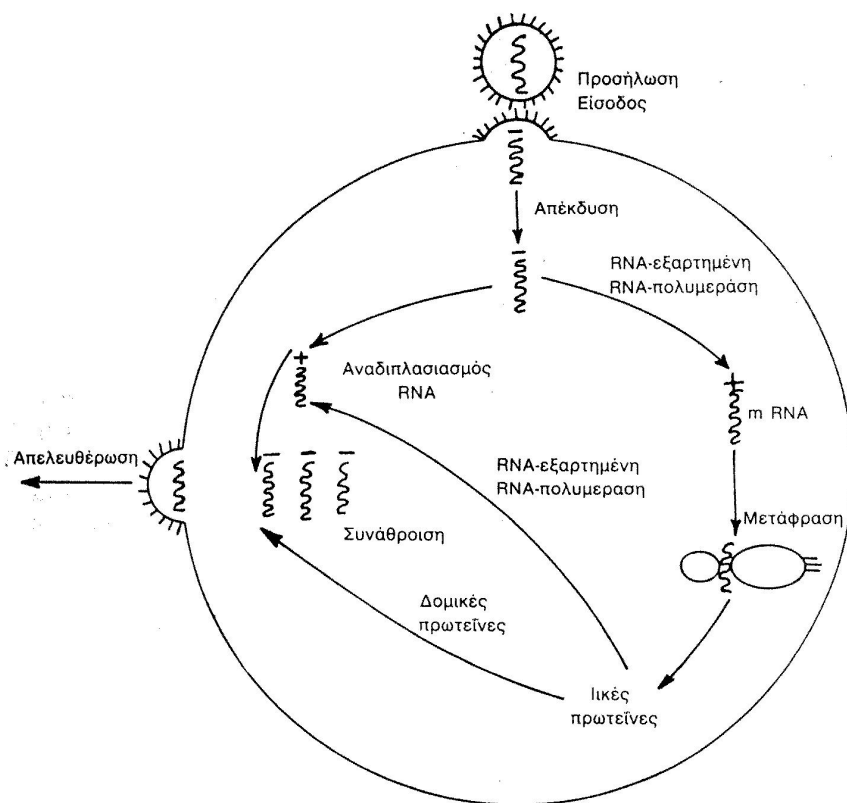
Οι RNA-ιοί παρουσιάζουν την, μεταξύ όλων των μικροοργανισμών, μοναδικότητα να έχουν το γενετικό τους υλικό ως RNA, και όχι ως DNA. Οι RNA-ιοί διακρίνονται στις εξής ομάδες ανάλογα με τον τρόπο σχηματισμού του mRNA:

1. **RNA ιοί με διπλή έλικα dsRNA**, το γένωμα των ιών χρησιμεύει σαν καλούπι για τη σύνθεση των m-RNAs.
2. **RNA ιοί με θετική μονή έλικα ssRNA(+)**, το RNA των ιών αυτών δρα ως mRNA και μεταφράζεται κατευθείαν μέσα στο κύτταρο.
3. **RNA ιοί με αρνητική μονή έλικα ssRNA(-)**, το mRNA προκύπτει μετά από μεταγραφή και συνεπώς είναι συμπληρωματικό της εισαγόμενης στο κύτταρο ταινίας RNA. Στην τάξη αυτή ανήκουν και οι ορθομυξιοί.
4. **Ρετροιοί**, πρόκειται για RNA ιούς, οι οποίοι μετατρέπονται σε DNA και κατευθύνουν την παραγωγή των m-RNAs.¹

1.2.6.2 RNA ιοί με αρνητική μονή έλικα ssRNA (-)

Οι ιοί αυτοί διακρίνονται σε δύο υποκατηγορίες, ιοί με κατάτμητη αρνητική έλικα RNA(-) (ορθομυξιοί) και ιοί με μη κατάτμητη αρνητική έλικα.

Οι αρνητικές έλικες RNAs (-) δεν είναι μόνες τους λοιμογόνοι αλλά πρέπει να μετατραπούν σε θετικές (m-RNAs) για να αρχίσει η λοίμωξη και αυτό γίνεται μέσω μιας RNA πολυμεράσης την οποία έχουν οι ιοί. Αυτά τα m-RNAs στην συνέχεια μεταφράζονται στις πρωτεΐνες των ιών (Σχήμα 1.2.3). Η διαδικασία αντιγραφής και αναπαραγωγής γίνεται στο κυτταρόπλασμα. Προκειμένου για τον ιό της γρίπης ο οποίος έχει κατάτμητο γένωμα και αναπαράγεται στον πυρήνα των κυττάρων, η σύνθεση των πρωτεϊνών λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου. Ορισμένες από τις νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες μεταφέρονται στον πυρήνα του κυττάρου προς συγκρότηση των νουκλεοκαψιδίων, τα οποία στη συνέχεια επιστρέφουν στο κυτταρόπλασμα. Η απόκτηση του ελύτρου των ιικών σωματιδίων γίνεται καθώς τα νουκλεοκαψίδια διέρχονται δια μέσου των κυτταροπλασματικών μεμβρανών.



Σχήμα 1.2.3 Διαγραμματική παράσταση αναπαραγωγικού κύκλου RNA-ιού με αρνητική μονή έλικα ssRNA (-)¹

I.2.6.3 Ρετροϊοί – (Ιοί με μονή έλικά ssRNA (+) με ενδιάμεσο DNA)

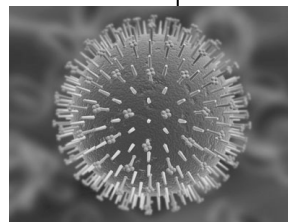
Οι ρετροϊοί έχουν δύο αντίγραφα RNA γενώματος. Δύο είναι τα κύρια χαρακτηριστικά του τρόπου πολλαπλασιασμού των ρετροϊών. Καταρχήν, όταν τα RNAs των ρετροϊών εισέλθουν στο κύτταρο του ξενιστή, μέσω μιας RNA-εξαρτώμενης DNA πολυμεράσης μετατρέπονται σε DNAs. Σχηματίζεται υβρίδιο DNA-RNA. Η έλικά RNA πέπτει και αντικαθίσταται από έλικά cDNA. Με τον τρόπο αυτό σχηματίζεται διπλή έλικά DNA. Το dsDNA στην συνέχεια ενσωματώνεται στο χρωμόσωμα του κυττάρου του ξενιστή. Από εδώ παράγονται τα m-RNAs των ιών όπως ακριβώς παράγονται και τα m-RNAs του κυττάρου, τα οποία μεταφράζονται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου του ξενιστή.

Η ενσωμάτωση του DNA των ρετροϊών στο χρωμόσωμα των κυττάρων του ξενιστή είναι αναγκαία για να εγκατασταθεί η λανθάνουσα φάση, άλλωστε ο ιός μπορεί να αναπαράγεται χωρίς να ενσωματωθεί στο κυτταρικό DNA. Στην αρχή της μόλυνσης παράγονται πολλαπλώς συνδεδεμένα m-RNAs για την παραγωγή ρυθμιστικών πρωτεϊνών και αργότερα μη συνδεδεμένα m-RNAs για την παραγωγή των δομικών πρωτεϊνών και των υπολοίπων ρυθμιστικών πρωτεϊνών. Η σύνθεση των ιών γίνεται στο κυτταρόπλασμα και οι ιοί δημιουργούν το έλυτρο τους όπως εξέρχονται μέσω προεκβολών από την κυτταροπλασματική μεμβράνη στην οποία έχουν τοποθετηθεί οι πρωτεΐνες των ιών.¹

ΙΙ. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A) Ιός της Γρίπης – Ιός τη γρίπης των πτηνών (H5N1)

- Εισαγωγή
- Δομή του ιού
- Κύκλος αναπαραγωγής του ιού της γρίπης
- Υψηλής παθογένειας ιός της γρίπης των πτηνών H5N1
- Ανάπτυξη εμβολίου έναντι του ιού της γρίπης



II.2.A.1 Εισαγωγή

Ο όρος «μυξοϊός» χρησιμοποιήθηκε για να δηλώσει μια ομάδα ελυτροφόρων, σφαιροειδών, RNA-ιών που σχετίζονται με τις «βλεννίνες». Οι μυξοϊοί χωρίζονται σε δύο οικογένειες, τους ορθομυξοϊούς (orthomyxoviridae) και τους παραμυξοϊούς (paramyxoviridae). Ο **ιός της γρίπης** ανήκει στην οικογένεια των **ορθομυξοϊών**. Η ονομασία των ορθομυξοϊών προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις ορθός (ortho) και μύξα (myxo) που είναι η βλέννη.^{1Α,2Α}

Ο ιός της γρίπης περιλαμβάνει τρεις τύπους: Α, Β και C. Η ταξινόμηση των ιών στους τρεις αυτούς τύπους γίνεται βάση των αντιγονικών διαφορών των εσωτερικών πρωτεϊνών **M** (matrix protein: θεμέλια πρωτεΐνη) και **NP** (nucleoprotein: νουκλεοπρωτεΐνη). Ο τύπος Α, διακρίνεται περαιτέρω σε υποτύπους που καθορίζονται βάσει των γλυκοπρωτεϊνών επιφανείας, της **αιμοσυγκολλητίνης (HA, Hemagglutinin)** και της **νευραμινιδάσης (NA, Neuraminidase)**. Μέχρι σήμερα, 16 υπότυποι HA (H1-H16) και 9 υπότυποι NA (N1-N9) έχουν απομονωθεί από πτηνά, ζώα και ανθρώπους σε διάφορους συνδυασμούς.¹ Όλοι οι ιοί της γρίπης των πτηνών ανήκουν στον τύπο Α. Οι τύποι Β και C, δεν διακρίνονται σε υποτύπους.

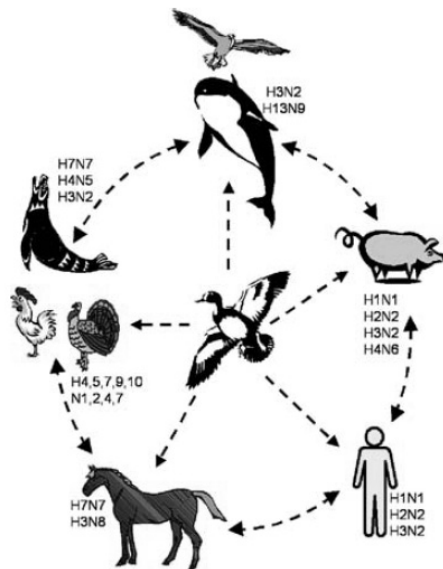
Ο ιός της γρίπης προκαλεί την ασθένεια της γρίπης. Η γρίπη είναι ιστορικά μια αρχαία νόσος που προκαλεί ετήσιες **επιδημίες** και περιοδικά **πανδημίες**. Ο Ιπποκράτης το 412 π.Χ. έχει περιγράψει επιδημία γρίπης. Οι πανδημίες που εμφανίζονται σε περιοδικά διαστήματα, ποικίλλουν σε σοβαρότητα και μπορεί να είναι από ήπιας μορφής έως καταστροφικής. Τον περασμένο αιώνα καταγράφηκαν τρεις πανδημίες, η καταστροφική Ισπανική γρίπη του 1918 (H1N1, περισσότεροι από 50 εκατομμύρια θάνατοι παγκοσμίως), η Ασιατική γρίπη του 1957 (H2N2, περισσότεροι από 1 εκατομμύριο θάνατοι παγκοσμίως), και η γρίπη του Χονγκ Κονγκ του 1968 (H3N2, μισό εκατομμύριο θάνατοι παγκοσμίως).² Οι πανδημίες γρίπης στους ανθρώπους συνδέονται μόνο με τον **τύπο Α** και οφείλονται στην ανάδυση αντιγονικά

νέων στελεχών του ιού της γρίπης, έναντι των οποίων δεν προϋπάρχει ανοσία στο γενικό πληθυσμό. Οι αντιγονικές αυτές αλλαγές (antigenic shift: αντιγονική μετατόπιση, μεγάλες αντιγονικές αλλαγές) οφείλονται σε γενετική αναδιάταξη κατόπιν ταυτόχρονης λοίμωξης ενός κυττάρου με δυο στελέχη τύπου A, ενός ανθρώπινης προέλευσης και ενός ζωικής προέλευσης ή δύο στελεχών τύπου A ανθρώπινης προέλευσης. Θεωρητικά, οποιοσδήποτε συνδυασμός αντιγονικών υποτύπων HA και NA είναι δυνατός.

Οι εποχιακές **επιδημίες** γρίπης στους ανθρώπους οφείλονται σε σημειακές αλλαγές αμινοξέων (antigenic drift: αντιγονική απόκλιση, μικρές αντιγονικές αλλαγές) στις αντιγονικές περιοχές της HA και NA ιών της γρίπης του ανθρώπου **τύπου A ή B**. Οι μικρές αυτές αντιγονικές αλλαγές οφείλονται στη χαμηλή πιστότητα της RNA πολυμεράσης των ιών της γρίπης, καθώς η RNA πολυμεράση παράγει σφάλματα αντιγραφής με ρυθμό $1/10^4$ βάσεις ανά κύκλο αναπαραγωγής.³ Μετά από κάθε νέα αντιγονική απόκλιση ιού της γρίπης A, εμφανίζονται τουλάχιστον τέσσερις υποκαταστάσεις αμινοξέων σε δύο ή περισσότερα αντιγονικά σημεία της πρωτεΐνης HA.⁴ Ο **τύπος C** προκαλεί σποραδικά κρούσματα **ήπιας** μορφής στους ανθρώπους.

Η φυσική δεξαμενή των ιών της γρίπης A είναι τα υδρόβια πτηνά, στα οποία εμφανίζονται οι ιοί να έχουν πετύχει ένα βέλτιστο επίπεδο προσαρμογής στον ξενιστή.⁵ Μέχρι σήμερα, 105 υπότυποι του ιού της γρίπης A έχουν ανακαλυφθεί, όλοι τους σε πτηνά. Από τα υδρόβια πτηνά, οι ιοί μεταδίδονται κατά καιρούς σε άλλα ζώα, συμπεριλαμβανομένων των θηλαστικών (χοίροι, άλογα, άνθρωποι) και των οικόσιτων πουλερικών⁶ (**Σχήμα II.2.A.1**) και μέσω προσαρμογής με μετάλλαξη ή γενετική αναδιάταξη, ορισμένοι από αυτούς τους ιούς μπορούν να καθιερώσουν ειδικές για τα είδη, μόνιμες σειρές ιών της γρίπης A, προκαλώντας παροδικές λοιμώξεις και επιδημίες στο νέο ξενιστή. Ο αριθμός των υποτύπων που διαπέρασαν το φράγμα των ειδών και εδραίωσαν σταθερές σειρές στα θηλαστικά είναι περιορισμένος. Οι υπότυποι H1-3 και N1-2 έχουν απομονωθεί από ανθρώπους. Η μετάδοση των ιών και των παροδικών λοιμώξεων μπορεί επίσης να συμβεί μεταξύ των νέων ξενιστών, π.χ. μεταξύ ανθρώπων και χοίρων ή κοτόπουλων και ανθρώπων.

Οι ιοί της γρίπης των πτηνών ταξινομούνται ως **υψηλής ή χαμηλής** παθογένειας. Οι χαμηλής παθογένειας ιοί προκαλούν ήπια νόσο του αναπνευστικού, ενώ οι υψηλής παθογένειας ιοί προκαλούν εκτεταμένη θνησιμότητα. Οι περισσότεροι ιοί της γρίπης των πτηνών που απομονώθηκαν είναι μη παθογόνοι, δηλαδή οδηγούν σε ασυμπτωματική λοίμωξη ή σε ήπια νόσο.



Σχήμα Π.2.Α.1 Διάδοση στελεχών του ιού της γρίπης μεταξύ διαφορετικών ειδών⁶

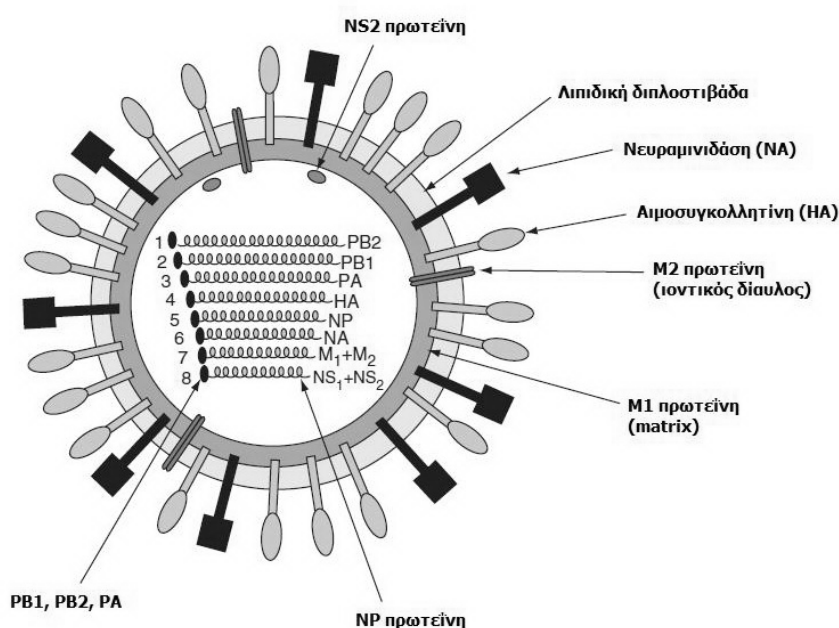
Οι **υψηλής παθογένειας** ιοί της γρίπης των πτηνών περιορίζονται στους **H5** και **H7** υποτύπους και προκαλούν σοβαρά κρούσματα νόσου σε κοτόπουλα ή γαλοπούλες. Γενικά, οι υψηλής παθογένειας ιοί της γρίπης των πτηνών δεν υπάρχουν στα άγρια πτηνά, αλλά όταν ένα χαμηλής παθογένειας H5 ή H7 στέλεχος μολύνει τα πουλερικά μπορεί να εξελιχθεί σε υψηλής παθογένειας στέλεχος μέσω απόκτησης μιας πολυβασικής περιοχής αποκοπής στην HA. Η HA συντίθεται ως πρόδρομο μόριο (HA0), και απαιτείται πρωτεολυτική ενεργοποίησή της στις HA1 και HA2 υπομονάδες προκειμένου να εκτεθεί το πεπτιδίο σύντηξης που είναι υπεύθυνο για την είσοδο του ιού στο κύτταρο ξενιστή. Ένας από τους λόγους για τους οποίους, οι ιοί της γρίπης των ανθρώπων και οι χαμηλής παθογένειας ιοί της γρίπης των πτηνών μολύνουν τους ιστούς της αναπνευστικής και εντερικής οδού αντίστοιχα, είναι η ανάγκη για μια συγκεκριμένη κυτταρική πρωτεάση που υπάρχει μόνο στο αναπνευστικό και εντερικό βλεννογόνο, ικανή να επεξεργαστεί την πρόδρομη HA0. Με την απόκτηση μιας πολυβασικής περιοχής αποκοπής, οι H5 και H7 επεξεργάζονται από περισσότερες κυτταρικές πρωτεάσες και αυτοί οι ιοί μετατρέπονται σε συστηματικούς προκαλώντας μολύνσεις που διασπείρονται σε κοτόπουλα και άλλα πουλερικά, με αποτέλεσμα την υψηλή παθογένεια.

Οι ιοί της γρίπης των πτηνών τύπου A είναι το κλειδί για την εμφάνιση πανδημιών γρίπης στον άνθρωπο. Τα στελέχη του ιού που ενεπλάκησαν στις πανδημίες γρίπης του 20ού αιώνα προέρχονταν άμεσα από ιούς της γρίπης των πτηνών, είτε μέσω γενετικής αναδιάταξης

μεταξύ στελεχών ιού της γρίπης των ανθρώπων και πτηνών (1957 και 1968) ή ενδεχομένως, μέσω προσαρμογής καθαρών στελεχών των πτηνών στους ανθρώπους (1918).⁷

II.2.A.2 Δομή του ιού

Οι ιοί της γρίπης είναι ελυτροφόροι, πλειομορφικοί ιοί. Συνήθως είναι σφαιροειδή σωματίδια, μέσης διαμέτρου 100 nm (**Σχήμα II.2.A.2**). Απαντούν επίσης επιμήκεις ή νηματοειδείς μορφές. Το λιπιδικό έλυτρο των ιών της γρίπης προέρχεται από την πλασματική μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή στο οποίο ο ιός αναπαράχθηκε. Το 71% του ιού είναι πρωτεΐνες, το 22% λιπίδια το 6% υδατάνθρακες και το 1% το γονιδιώμά του.

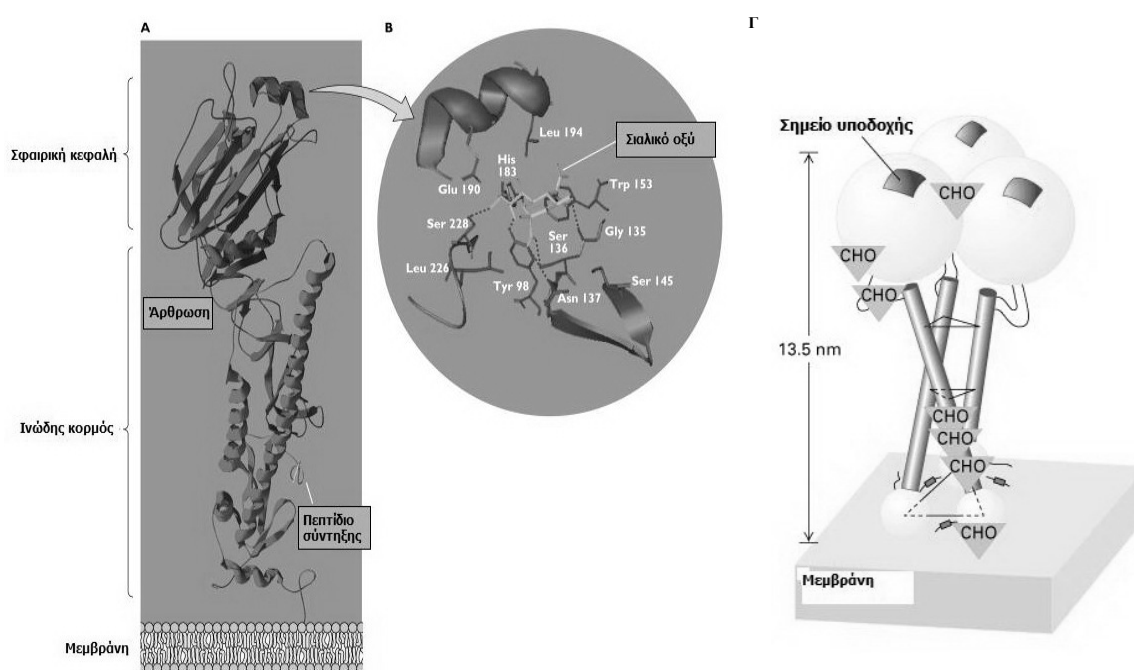


Σχήμα II.2.A.2 Δομή του ιού της γρίπης^{3A}

Στην επιφάνεια του ιού υπάρχουν 500 γλυκοπρωτεϊνικές προεκβολές (άκανθες), αιμοσυγκολλητίνης (HA) και νευραμινιδάσης (NA). Οι προεκβολές είναι πρωτεϊνικής φύσεως και έχουν ένα υδρόφιλο και ένα υδρόφοβο άκρο, εμπεδωμένο μέσα στο λιποπολυσακχαριδικό και λιποπρωτεϊνικό έλυτρο. Ο λόγος HA/NA είναι 4-5/1. Οι άκανθες έχουν μήκος 10-14 nm και διάμετρο 4-6 nm.

Οι αιμοσυγκολλητίνες (566 αμινοξέα) αποτελούν το 80% των ακανθών και το 25% των ιικών πρωτεϊνών, έχουν σχήμα ραβδίου και ενώνονται με υποδοχείς του κυττάρου ξενιστή που φέρουν σιαλικό οξύ, με τη βοήθεια μιας συντηρημένης ακολουθίας αμινοξέων

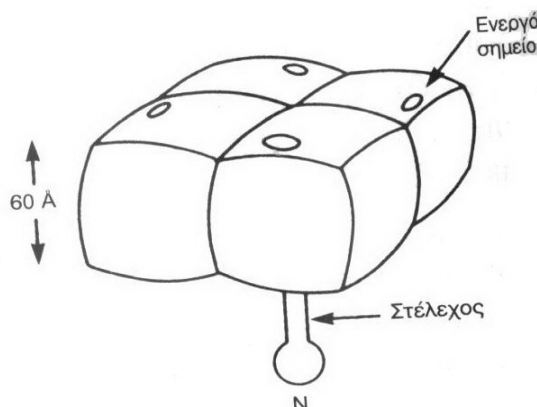
που σχηματίζει μια θήκη στο μόριο της αιμοσυγκολλητίνης (**Σχήμα Π.2.Α.3**). Η HA είναι ένα τριμερές μόριο και κάθε μονάδα της αποτελείται από τις HA1 και HA2, συνδεόμενες μεταξύ τους με δισουλφιδικό δεσμό, γεγονός που της προσδίδει μεγαλύτερη σταθερότητα (**Σχήμα Π.2.Α.3**). Η αιμοσυγκολλητίνη συντίθεται αρχικά ως μια πρόδρομη πολυπεπτιδική αλυσίδα (HA0) και για να μπορέσει να είναι δραστική στη διαμεσολάβηση σύντηξης του ιού με τα κύτταρα ξενιστές, το πρόδρομο μόριο HA0 πρέπει να διασπαστεί σε ένα συγκεκριμένο σημείο σε δύο αλυσίδες HA1 και HA2. Η ατομική δομή του HA δείχνει ότι η HA1 αλυσίδα περιέχει την περιοχή πρόσδεσης του υποδοχέα και τις αντιγονικές περιοχές επιτόπων και η HA2 μεσολαβεί τη σύντηξη με τη μεμβράνη. Η HA έχει σχέση με την εξουδετέρωση του ιού, εφ' όσον προς αυτήν κατευθύνονται τα εξουδετερωτικά αντισώματα, τα οποία παράγονται από τον ξενιστή. Ονομάζεται αιμοσυγκολλητίνη διότι έχει την ικανότητα να συγκολλά ερυθρά αιμοσφαίρια.



Σχήμα Π.2.Α.3 Α) Δομή μονομερούς HA του ιού της γρίπης Β) λεπτομέρειες της περιοχής σύνδεσης στον υποδοχέα και Γ) Δομή HA τριμερούς^{5Α}

Η νευραμινιδάση (NA) είναι ένα τετραμερές αποτελούμενο από τέσσερα μονομερή σχήματος μανιταριού. Κάθε άκανθα NA έχει κεφαλή με 4 ενεργά σημεία (**Σχήμα Π.2.Α.4**). Η NA έχει δράση ενζυμική και μπορεί να διασπά το σιαλικό οξύ διευκολύνοντας την

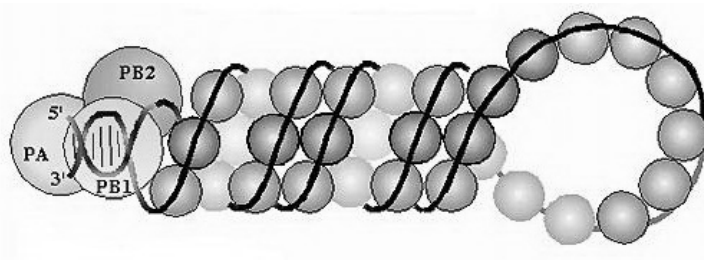
απελευθέρωση των ικών σωματιδίων από τα μολυσμένα κύτταρα, όταν αυτά εξέρχονται μέσω προεκβολών. Οι NA αποτελούν το 5% των ικών πρωτεϊνών.



Σχήμα Π.2.Α.4 Δομή του NA τετραμερούς του ιού της γρίπης^{1Α}

Το νουκλεοκαψίδιο του ιού είναι σωληνοειδές και εμφανίζει ελικοειδή συμμετρία. Οι ιοί της γρίπης Α, Β περιέχουν τεμαχισμένο γενετικό υλικό, αποτελούμενο από 8 χωριστά τμήματα μονόκλωνου RNA-αρνητικής πολικότητας, ενώ οι ιοί της γρίπης C από 7 χωριστά τμήματα ίδιας πολικότητας. Κάθε έλικα RNA κωδικοποιεί από μία πρωτεΐνη εκτός από τις 7 και 8 που κωδικοποιούν από δύο πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα η 1η έλικα κωδικοποιεί την PB2 πρωτεΐνη (PB, polymerase basic protein: πολυμεράση βασική πρωτεΐνη), η 2η την PB1, η 3η την PA (PA, polymerase acidic protein: πολυμεράση όξινη πρωτεΐνη), η 4η την HA, η 5η την NP, η 6η την NA, η 7η την M, η οποία διασπάται στη M1 και M2 και η 8η τις πρωτεΐνες NS1 και NS2 (NS, non-structural protein: μη-δομική πρωτεΐνη).

Οι PB1, PB2 και PA πρωτεΐνες συνδέονται με το RNA του ιού, σχηματίζοντας μια ριβονουκλεοπρωτεϊνική δομή (RNP) (**Σχήμα Π.2.Α.5**), στην οποία λαμβάνει μέρος και η πρωτεΐνη NP, η οποία συνδέεται επίσης με το ιικό RNA σχηματίζοντας μαζί με τις PB1, PB2 και PA μία δομή ελικοειδούς συμμετρίας. Οι πρωτεΐνες PB1 και PB2 έχουν δράση τρανσκριπτάσης. Η PA πρωτεΐνη έχει δράση τρανσκριπτάσης πιθανώς και δράση πρωτεάσης.



(Σχήμα Π.2.Α.5) Ριβονουκλεοπρωτεϊνική δομή (RNP)

Οι πρωτεΐνες M1 και M2 βρίσκονται κάτω από το λιπιδιακό έλυτρο του ιού. Η πρωτεΐνη M1 είναι αντιγονική και χημικά συνδέεται με το RNP, αποτελεί το 40% των ιικών πρωτεϊνών και είναι σημαντική για τη μορφογένεση των σωματιδίων του ιού. Η πρωτεΐνη M2 σχηματίζει κανάλι στη λιπιδική διπλοστιβάδα του ιού, μεταφέροντας πρωτόνια από το οξινισμένο ενδόσωμα στο εσωτερικό του ιικού σωματιδίου κατά τη διάρκεια έκδυσής του. Απαντά μόνο σε λίγα αντίγραφα ανά σωματίδιο ιού.

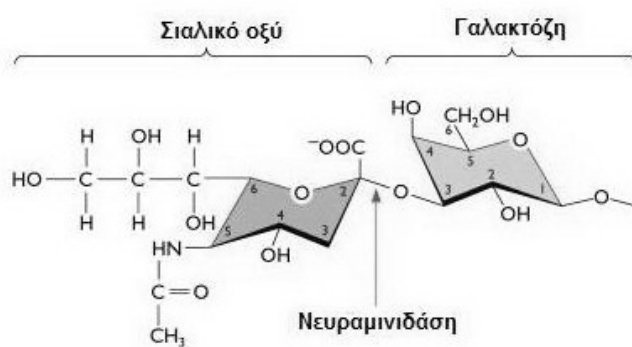
Η μη δομική πρωτεΐνη NS1 είναι μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη. Μια από τις λειτουργίες της είναι η παρεμπόδιση της μεταφοράς από τον πυρήνα των mRNAs των κυττάρων ξενιστών. Επίσης η NS1 μάχεται την έμφυτη (φυσική) άμυνα του οργανισμού και ελαχιστοποιεί την παραγωγή ιντερφερονών. Τέλος η μη δομική πρωτεΐνη NS2, αλληλεπιδρά με την M1 πρωτεΐνη. Αυτή η αλληλεπίδραση θεωρείται ότι είναι απαραίτητη στον κύκλο ζωής του ιού για την εξαγωγή του RNP συμπλέγματος από τον πυρήνα.^{4A}

II.2.A.3 Κύκλος αναπαραγωγής του ιού της γρίπης

α) Προσκόλληση

Ο ιός προσκολλάται με την αιμοσυγκολλητίνη (HA) στους υποδοχείς των κυττάρων ξενιστών που περιέχουν σιαλικό οξύ. Στελέχη του **ιού της γρίπης του ανθρώπου** κατά προτίμηση συνδέονται με κατάλοιπα σιαλικού οξέος τα οποία συνδέονται με γαλακτόζη μέσω **α2,6** γλυκοζιτικού δεσμού, ενώ στελέχη του **ιού της γρίπης των πτηνών** συνδέονται με κατάλοιπα σιαλικού οξέος τα οποία συνδέονται με γαλακτόζη μέσω **α2,3** γλυκοζιτικού δεσμού⁸ (**Σχήμα II.2.A.6**). Αντιστοίχως, τα ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού συστήματος περιλαμβάνουν κυρίως σιαλικό οξύ με α2,6 γλυκοζιτικό δεσμό, ενώ τα κύτταρα ξενιστές στα πτηνά περιέχουν κυρίως σιαλικό οξύ με α2,3 γλυκοζιτικό δεσμό.⁹⁻¹¹ Τα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού συστήματος των χοίρων περιέχουν τόσο α2,3 όσο και α2,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς, πράγμα που εξηγεί γιατί αυτό το ζώο είναι εύαλωτο τόσο σε ιούς της γρίπης ανθρώπων όσο και πτηνών.¹¹ Εξαιτίας αυτού του χαρακτηριστικού, οι χοίροι θεωρούνται ευρέως ως μια πιθανή πηγή νέων πανδημικών στελεχών, δεδομένου ότι θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως μη επιλεκτικοί ξενιστές, όπου μπορεί να γίνει μικτή μόλυνση με στελέχη του ιού της γρίπης των πτηνών και ανθρώπου, με πιθανό αποτέλεσμα την ανάδυση νέων γενετικά ετεροσυνδυασμένων ιών, ή την προσαρμογή καθαρών στελεχών του ιού της γρίπης των πτηνών που να μπορούν να αναγνωρίζουν ανθρώπινους υποδοχείς.

Επίσης συγκεκριμένες αλλαγές αμινοξέων στις θέσεις 226 και 228 στην HA έχουν προσδιοριστεί ως σημαντικές ως προς την ειδικότητα έναντι του υποδοχέα σιαλικού οξέος και γενικότερα την παθογένεια του ιού. Η HA του **ιού της γρίπης των πτηνών** περιέχει Gln226 και Gly228.¹² Από την άλλη πλευρά, **ιοί της γρίπης του ανθρώπου** συνήθως περιέχουν Leu226 και Ser228, για τους υποτύπους H2¹³ και H3,¹⁴⁻¹⁶ και όχι για τον H1.¹⁷ Για τον υπότυπο H1, η ειδικότητά του ως προς τον υποδοχέα σιαλικού οξέος καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τη φύση των καταλοίπων στη θέση 190. Μετάλλαξη του Glu στη θέση 190 σε Asp και της Gly225 σε Glu συνδέεται με την απόκτηση ειδικότητας ιών της γρίπης των πτηνών έναντι σιαλικού οξέος με γλυκοζιτικό δεσμό α2,6 κατά τη διάρκεια προσαρμογής σε αυτούς τους ξενιστές.¹⁶



Σχήμα Π.2.Α.6 Σιαλικό οξύ συνδεόμενο με γαλακτόζη μέσω α2,3 γλυκοζιτικού δεσμού και το σημείο αποκοπής από τη νευραμινιδάση.

β) Είσοδος

Η είσοδος των ιών στο κύτταρο ξενιστή γίνεται κατόπιν ενδοκύττωσης, η οποία προκαλείται από την ένωση της HA στους υποδοχείς σιαλικού οξέος και σχηματισμού ενδοσώματος, στο οποίο εγκλείεται ο ιός.

Στη συνέχεια λόγω της οξίνισης των ενδοσωμάτων (pH 5) μέσω της αντλίας πρωτονίων, γίνεται διάσπαση των HA μονομερών με ένζυμα πρωτεάσες, στις HA1 (ανώτερο NH₂ τμήμα) και HA2 (διαμεμβρανικό COOH τμήμα) υπομονάδες, οι οποίες ενώνονται με δισουλφιδικούς δεσμούς. Η διάσπαση αυτή προκαλεί μη αναστρέψιμες διαμορφωτικές αλλαγές στις HA άκανθες, οι οποίες ενεργοποιούν τη σύντηξη των μεμβρανών του ελύτρου των ιών με τη μεμβράνη του ενδοσώματος από το άμινο-τελικό άκρο της HA2.¹⁸ Η πρωτεολυτική ενεργοποίηση άρα είναι ουσιαστική για τη διασπορά του ιού και τη μολυσματικότητά του.¹⁹ Οι HA των **χαμηλής παθογένειας ιών της γρίπης των πτηνών** και

των **εποχιακών ιών της γρίπης του ανθρώπου** περιέχουν μια Arg στο σημείο αποκοπής και γι' αυτό το λόγο οι χαμηλής παθογένειας ιοί της γρίπης των πτηνών πρωτεολύονται σε περιορισμένο αριθμό οργάνων οδηγώντας σε ήπια ή ασυμπτωματική λοίμωξη, σε αντίθεση με τους υψηλής παθογένειας ιούς της γρίπης των πτηνών που φέρουν πολλαπλά βασικά αμινοξέα στο σημείο αποκοπής που αναγνωρίζονται από διάφορες πρωτεάσες.

Επίσης, πρωτόνια περνούν μέσα από την πρωτεΐνη M2, η οποία σχηματίζει κανάλια στη λιπιδιακή μεμβράνη του ιού και κάνουν την πρωτεΐνη M1 να απελευθερωθεί από το σύμπλεγμα της ριβονουκλεοπρωτεΐνης (RNP).

Το σύμπλεγμα RNP εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου, μέσω της σύντηξης του ιικού ελύτρου με τη μεμβράνη του ενδοσώματος. Το απελευθερωμένο σύμπλεγμα RNP μεταφέρεται ακολούθως στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή.

γ) Αναπαραγωγή του γονιδιώματος

Ο ιός αντιγράφεται στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή, ενώ οι πρωτεΐνες του ιού συντίθενται στο κυτταρόπλασμα. Αρχικά, οι αρνητικής (-) πολικότητας RNA έλικες του ιού αντιγράφονται από την ιική RNA πολυμεράση σε mRNAs. Ακολούθως, τα mRNAs μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή όπου μεταφράζονται σε πρωτεΐνες.

Ειδικότερα, τα mRNAs που κωδικοποιούν τις ικές μεμβρανικές πρωτεΐνες (HA, NA, M2) μεταφράζονται από ριβοσώματα του ενδοπλασματικού δικτύου και υφίστανται περαιτέρω γλυκοζυλίωση. Όλα τα άλλα mRNAs μεταφράζονται στα ελεύθερα ριβοσώματα (NS1, NS2, PB1, PB2, PA, NP, M1).

Οι HA και NA γλυκοπρωτεΐνες σχηματίζονται στα ριβοσώματα του ενδοπλασματικού δικτύου και ενσωματώνονται στο εξωτερικό μέρος της μεμβράνης του κυττάρου. Οι πρωτεΐνες PB1, PB2, PA και NP, εισέρχονται στον πυρήνα του κυττάρου όπου καταλύουν τη σύνθεση πλήρους μήκους θετικής (+) πολικότητας RNAs. Αυτά χρησιμεύουν σαν πρότυπα προς αντιγραφή, για την παραγωγή αρνητικής (-) πολικότητας ιικών RNAs, τα οποία στη συνέχεια σχηματίζουν νουκλεοκαψίδια αφού συμπεριλάβουν οκτώ διαφορετικά τμήματα γονιδιώματος. Κάποια από τα νέα συντεθειμένα αρνητικής (-) πολικότητας RNAs, παράγουν mRNAs για σύνθεση πρωτεϊνών ξανά.

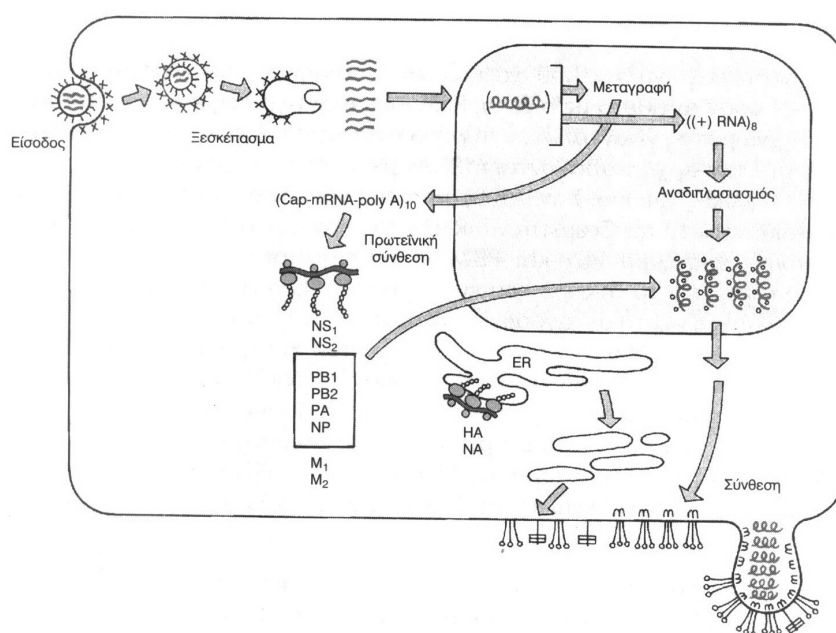
Επίσης, οι πρωτεΐνες M1 και NS1 μεταφέρονται στον πυρήνα. Ακολούθως, η M1 πρωτεΐνη δεσμεύεται στα νέα συντεθειμένα αρνητικής (-) πολικότητας RNAs τερματίζοντας τη σύνθεση mRNAs και σε συνδυασμό με την NS2 επάγει την έξοδο των νουκλεοκαψιδίων στο κυτταρόπλασμα. Τα ιικά νουκλεοκαψίδια που συνδέονται με τις πρωτεΐνες M1 και NS2,

μεταφέρονται στην κυτταρική επιφάνεια και συνδέονται με περιοχές της κυτταροπλασματικής μεμβράνης που περιέχουν τις γλυκοπρωτεΐνες HA και NA.

δ) Έξοδος

Η M1 πρωτεΐνη ενώνεται με το κυτταροπλασματικό μέρος των HA και NA. Οι πρωτεΐνες του νουκλεοκαψιδίου αντιδρούν με την πρωτεΐνη M1 και οι ιοί προβάλλουν από το κύτταρο μέσω εκβλαστωμάτων.

Οι ιοί είναι προσκολλημένοι στην επιφάνεια του κυττάρου μέσω της ένωσης HA-σιαλικού οξέος. Η νευραμιδάση (NA) των ιών στη συνέχεια διασπά το σιαλικό οξύ και οι ιοί απελευθερώνονται. Ο τρόπος αναπαραγωγής του ιού της γρίπης φαίνεται στο (Σχήμα Π.2.A.7). Ο όλος κύκλος αναπαραγωγής διαρκεί 8 - 10 ώρες. Αρκετά κύτταρα επιτρέπουν πολλούς κύκλους αναπαραγωγής των ιών πριν πεθάνουν. Τελικά τα κύτταρα πεθαίνουν λόγω διαταραχής της φυσιολογικής σύνθεσης των μακρομορίων τους.



Σχήμα Π.2.A.7 Αναπαραγωγή του ιού της γρίπης^{1A}

Π.2.A.4 Υψηλής παθογένειας ιός της γρίπης των πτηνών H5N1

α) Εμφάνιση και εξάπλωση του ιού H5N1

Πριν το 1996 χαμηλής παθογένειας ιοί της γρίπης των πτηνών H5 είχαν απομονωθεί από οικοσίτες πάπιες και χήνες στην Νοτιοανατολική Κίνα αλλά όχι από κοτόπουλα²⁰ και

εξουδετερωτικά αντισώματα έναντι του ιού H5 είχαν ανιχνευθεί σε ορούς χοίρων από την Νοτιοανατολική Κίνα που συλλέχθηκαν την περίοδο 1977-1982 και το 1998.²¹

Γενετικά στοιχεία έδειξαν ότι ο πρόδρομος του τωρινού κυκλοφορούντος υψηλής παθογένειας ιού H5N1, εντοπίστηκε για πρώτη φορά σε οικόσιτες χήνες στο Guangdong της Κίνας το 1996.²¹ Μέχρι σήμερα, ο πρόδρομος αυτού του ιού είναι άγνωστος, αν και τα οκτώ τμήματα γονιδίων είναι στενά συνδεδεμένα με εκείνα των χαμηλής παθογένειας ιών H5, που απομονώθηκαν από αποδημητικά πτηνά και αγριόπαπιες στο Hokkaido της Ιαπωνίας.^{22,23}

Ανθρώπινο κρούσμα με τον ιό H5N1, συνέβη το Μάιο του 1997 στο Χονγκ Κονγκ, και ο ιός που το προκάλεσε εντοπίστηκε τον Αύγουστο του 1997²⁴ ως ο πρώτος υψηλής παθογένειας ιός της γρίπης των πτηνών γνωστός να προκαλεί θανατηφόρα μόλυνση στους ανθρώπους. Κατά το υπόλοιπο διάστημα του 1997, 17 επιπλέον ανθρώπινα κρούσματα εντοπίστηκαν, και έξι ασθενείς υπέκυψαν από τη μόλυνση του H5N1. Επιτήρηση και επιδημιολογικές μελέτες απέδειξαν ότι οι αγορές πουλερικών ήταν η πηγή της μόλυνσης των ανθρώπων με τον ιό H5N1.²⁰ Μεταγενέστερες γενετικές αναλύσεις του ιού από ανθρώπους έδειξαν ότι έξι εσωτερικά γονίδια ήταν στενά συνδεδεμένα με αυτά του ιού H9N2 που εντοπίστηκε στο Quail του Χονγκ Κονγκ το 1997 και ότι το γονίδιο της νευραμινιδάσης ήταν γενετικά όμοιο με αυτό του ιού H6N1 που εντοπίστηκε στο Teal του Χονγκ Κονγκ το 1997, αυξάνοντας την πιθανότητα η ανακατάταξη μεταξύ αυτών των ιών να εμπλέκεται στη γένεση του υψηλής παθογένειας ιού της γρίπης των πτηνών H5N1.²¹

Η θανάτωση όλων των πουλερικών στο Χονγκ-Κονγκ ουσιαστικά εξάλειψε αυτόν το συγκεκριμένο γονότυπο του υψηλής παθογένειας ιού της γρίπης H5N1. Δεν υπήρχαν άλλα ανθρώπινα κρούσματα στο Χονγκ Κονγκ, αλλά οι ιοί H5N1 συνέχισαν να κυκλοφορούν μεταξύ φαινομενικά υγιών οικόσιτων παπιών στις παράκτιες επαρχίες της Κίνας κατά το διάστημα 1999-2002.²⁵ Υψηλής παθογένειας ιοί της γρίπης H5N1 εντοπίστηκαν επίσης σε χήνες σε αγορές ζωντανών πουλερικών στο Βιετνάμ το 2001, καθώς και σε κρέας πάπιας που είχε εξαχθεί από την Κίνα στην Κορέα και την Ιαπωνία το 2001 και το 2003.²¹ Κατά τη διάρκεια του 2001 και 2002, πολλαπλοί γονότυποι του H5N1 εντοπίστηκαν σε πουλερικά στη Νότια Κίνα.²⁶ Αυτοί οι ιοί είχαν αιμοσυγκολλητίνη τυπική με το γένος των ιών H5N1, που εντοπίστηκαν στο Guangdong της Κίνας το 1996, αλλά με μια πληθώρα διαφορετικών εσωτερικών γονιδίων. Επιπλέον, τα γονίδια της NA αυτών των διάφορων ιών H5N1 ήταν παρόμοια με αυτά των ιών που εντοπίστηκαν στο Guangdong της Κίνας το 1996, αλλά συχνά είχαν απαλείψεις αμινοξέων στην περιοχή του μίσχους.²⁶ Το 2002, ξέσπασμα θανατηφόρου

νόσου του ιού H5N1 σε υδρόβια πτηνά εμφανίστηκε στα πάρκα Penfold και Kowloon στο Χονγκ Κονγκ και πολλά υδρόβια είδη, καθώς σπουργίτια και περιστέρια πέθαναν.²⁷

Το επόμενο σημαντικό γεγονός για την ανάπτυξη των ιών H5N1 ήταν η επανεμφάνισή τους στους ανθρώπους το 2003. Κόρη οικογένειας από το Χονγκ Κονγκ πέθανε καθώς επισκέπτονταν την επαρχία Fujian της Κίνας τον Φεβρουάριο του 2003. Κατά την επιστροφή τους στο Χονγκ Κονγκ, μόλυνση με τον ιό H5N1 διαγνώστηκε στον πατέρα και τον αδελφό της,²⁸ ο πατέρας στη συνέχεια πέθανε, αλλά ο αδελφός ανάρρωσε.

Στα τέλη του 2003 έως τις αρχές του 2004, ξεσπάσματα του υψηλής παθογένειας ιού της γρίπης των πτηνών H5N1, σε οικόσιτα πουλερικά αναφέρθηκαν στη Νότια Κορέα, την Ιαπωνία, το Βιετνάμ, το Λάος, την Καμπότζη και την Ινδονησία. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, μετάδοση του ιού H5N1 από πτηνό σε άνθρωπο οδήγησε σε θανατηφόρο μόλυνση στο Βιετνάμ και την Ταϊλάνδη. Ορολογικά στοιχεία δείχνουν ότι περιορισμένες ανθρώπινες μολύνσεις συνέβησαν στην Ιαπωνία και τη Νότια Κορέα κατά τη διάρκεια του 2003-2004. Γενετική ανάλυση έδειξε ότι οι ιοί που εξαπλώνονται προς την Ιαπωνία και τη Νότια Κορέα διέφεραν στο γονίδιο της PA, από τους ιούς που ήταν κυρίαρχοι στο Βιετνάμ, την Ταϊλάνδη, την Καμπότζη, την Ινδονησία και τη Νότια Κίνα.²⁶

Το Μάιο του 2005, συνέβη ένα θανατηφόρο κρούσμα του ιού H5N1 στη λίμνη Qinghai στη δυτική Κίνα σκοτώνοντας περισσότερα από 6.000 υδρόβια αποδημητικά πτηνά.^{21,29} Το γεγονός αυτό ήταν το πρώτο μεγάλο ξέσπασμα του H5N1 σε άγρια αποδημητικά πτηνά. Οι πρόδρομοι του επικρατέστερου ιού H5N1 στη λίμνη Qinghai μπορεί να προέρχονται από οικόσιτα πουλερικά. Κατά τη διάρκεια του ξεσπάσματος στη λίμνη Qinghai εντοπίστηκαν τέσσερις τουλάχιστον γονότυποι του ιού H5N1 στα υδρόβια πτηνά, αλλά ένας γονότυπος έγινε κυρίαρχος και γρήγορα εξαπλώθηκε σε άγρια και οικόσιτα πτηνά στη Σιβηρία (Ιούλιος 2005), τη Μογγολία και το Καζακστάν (Αύγουστος 2005), την Κροατία, Ρουμανία και την Τουρκία (Οκτώβριος 2005), τη Μέση Ανατολή και Ευρώπη (2006), τη Νιγηρία και την Ινδία (Φεβρουάριος 2006).^{21,29} Αν και οι ιοί H5N1 από τη λίμνη Qinghai, μπορεί παροδικά να μόλυναν υδρόβια αποδημητικά πτηνά, τα διαθέσιμα στοιχεία επιτήρησης δεν αναφέρουν τη διαιώνιση αυτού του ιού σε αυτές της φυσικές δεξαμενές.

Το 2005, προσδιορίστηκαν δύο μεγάλοι κλάδοι του ιού χωρίς επικαλυπτόμενη γεωγραφική κατανομή με βάση την ανάλυση ακολουθίας της HA.³⁰ Οι ιοί που απομονώθηκαν από την Ταϊλάνδη, την Καμπότζη και το Βιετνάμ κατά τη διάρκεια 2004-2005 ήταν συγκεντρωμένοι στον κλάδο 1, ενώ οι ιοί που απομονώθηκαν από την Κίνα, την Ινδονησία, την Κορέα και την Ιαπωνία το διάστημα 2003-2004 ήταν συγκεντρωμένοι στον

κλάδο 2. Το 2005, ανθρώπινη μόλυνση με ιούς H5N1 συνέχισε να αναφέρεται στο Βιετνάμ και την Ταϊλάνδη, καθώς και νέα κρούσματα αναφέρθηκαν στην Καμπότζη, την Κίνα και την Ινδονησία. Τα αποτελεσματικά μέτρα ελέγχου που λήφθηκαν από το Βιετνάμ (εμβολιασμός των πουλερικών) και την Ταϊλάνδη (απάλειψη) μείωσαν σημαντικά από το 2006 τον αριθμό των κρουσμάτων σε αυτές τις δύο χώρες, καθώς και την κυκλοφορία του κλάδου 1. Από την άλλη πλευρά, ιοί του κλάδου 2 εξακολούθησαν να εξελίσσονται σε τρεις μεγάλους υποκλάδους που διαφέρουν ως προς τη γεωγραφική κατανομή. Ιοί H5N1, από την Ινδονησία που απομονώθηκαν από το 2003, εξακολουθούν να συγκεντρώνονται σε μια υπογενιά (2.1), γεγονός που υποδηλώνει την πιθανότητα μιας μόνο εισόδου του ιού στην Ινδονησία και της συνεχιζόμενης εξέλιξής τους εντός της περιοχής από το 2003.^{21,30,31} Ο υποκλάδος 2.2 περιέχει τον ιό H5N1 που προκάλεσε το μεγάλης κλίμακας θανατηφόρο κρούσμα στα άγρια πτηνά στη λίμνη Qinghai και τους ιούς H5N1 που στη συνέχεια διαδόθηκαν στη Μέση Ανατολή, την Ευρώπη και την Αφρική, προτείνοντας ένα πιθανό ρόλο των αποδημητικών πτηνών στη διάδοση του ιού.^{30,32} Επιτήρηση στη Νότια Κίνα από τον Ιούλιο του 2005 έως τον Ιούνιο του 2006, προσδιόρισε μια επικρατούσα υπογενιά που είχε αντικαταστήσει τις περισσότερες από τις προηγούμενες καθιερωμένες υπογενιές. Αυτοί οι ιοί που μοιάζουν με αυτούς που απομονώθηκαν από την επαρχία Fujian αποτελούν ένα ξεχωριστό υποκλάδο 2.3 και περαιτέρω εξαπλώθηκαν στο Χονγκ Κονγκ, τη Μαλαισία, το Λάος, το Βιετνάμ και την Ταϊλάνδη, προκαλώντας κρούσματα σε άγρια πτηνά και σε οικόσιτα πουλερικά από το 2006 έως το 2008.^{30,33}

β) Μοναδικά Χαρακτηριστικά του ιού H5N1: Αλλάζοντας μοτίβα

Δεδομένου ότι οι ιοί H5N1, συνέχισαν να εξαπλώνονται και να εξελίσσονται κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας, έχουν γίνει γνωστά πολλά μοναδικά χαρακτηριστικά του ιού.

Το πρώτο χαρακτηριστικό που παρατηρήθηκε ήταν η ικανότητα του ιού H5N1 να προκαλεί θανατηφόρα μόλυνση σε άγρια πτηνά, συμπεριλαμβανομένων των υδρόβιων πτηνών, μετά το ξέσπασμα στο Χονγκ Κονγκ το χειμώνα του 2002.²⁷ Παρόλο που οι υψηλής παθογένειας ιοί H5 είναι υψηλά θανατηφόροι σε κοτόπουλα και σε άλλα ορνιθοειδή πτηνά, σπάνια είχαν αναφερθεί να είναι παθογόνοι σε άγρια πτηνά.

Έχουμε μάθει επίσης ότι, αν και ορισμένοι από τους ιούς H5N1 που απομονώθηκαν από το 2002 και αρχικά ήταν πολύ θανατηφόροι σε πάπιες, αντιγονικές παραλλαγές με μειωμένη παθογένεια μπορεί να επιλέγησαν γρήγορα σε αυτή τη φυσική δεξαμενή της

γρίπης.³⁴ Επιπλέον, υδρόβια πτηνά (συμπεριλαμβανομένων και οικόσιτων παπιών) παρουσίασαν μεγαλύτερη αντίσταση απ' ότι κοτόπουλα και άλλα ορνιθοειδή πτηνά στη μόλυνση από τον ιό H5N1 και κατά συνέπεια μπορούν να χρησιμεύσουν ως κρυφές πηγές ("Δούρειοι ίπποι") για τη διατήρηση και την εξάπλωση του ιού.³⁴

Μοναδικά χαρακτηριστικά παρατηρήθηκαν επίσης μεταξύ του κλάδου 2.2 των ιών H5N1, ο οποίος διαδόθηκε ευρέως στη Μέση Ανατολή, την Ευρώπη και την Αφρική. Η διάδοση αυτής της γενιάς του ιού H5N1 θεωρείται ότι συνέβη εν μέρει λόγω της μετανάστευσης των πτηνών. Πειραματική μόλυνση έξι ειδών άγριων παπιών αποκάλυψε διαφορές στην ευαισθησία έναντι του ιού H5N1.³⁵ Επιπλέον, παρατηρήθηκε μεταξύ αυτών των ειδών άγριας πάπιας ότι ο ιός που διασκορπιζόταν από το λαιμό ήταν περισσότερος και μεγαλύτερης διάρκειας. Αυτή η ιδιότητα της αναπνευστικής διασποράς πρέπει να ληφθεί υπόψη κατά τη μελέτη της οικολογίας του ιού H5N1 στα αποδημητικά πτηνά. Ένα άλλο αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό του επικρατέστερου ιού H5N1 στη λίμνη Qinghai, είναι ότι είχε μια μετάλλαξη στο γονιδίου PB2 (E→K στη θέση 627), είναι ένας από τους διατηρημένους δείκτες των ξενιστών (E627 για τους ιούς των πτηνών και K627 για τους ανθρώπινους ιούς της γρίπης), και σχετίζεται με αυξημένη ιική μολυσματικότητα σε ποντίκια.^{29,36}

Η επανεμφάνιση ανθρώπινων μολύνσεων από τον ιό H5N1 το 2004, συνοδεύτηκε από πολλά μοναδικά χαρακτηριστικά του ιού συμπεριλαμβανομένου του αυξημένου εύρους ξενιστών και της αυξημένης παθογένειας σε θηλαστικά είδη. Παρά το γεγονός ότι οι γάτες μπορούν να μολυνθούν με τον ιό της γρίπης πειραματικά, η πρώτη αναφορά φυσικής μόλυνσης από τον ιό της γρίπης των πτηνών σε αιλουροειδή προκλήθηκε από τον υψηλής παθογένειας ιό H5N1, σε ζωολογικό κήπο στην Ταϊλάνδη: τίγρεις και λεοπαρδάλεις που είχαν τραφεί με μολυσμένα σφάγια πουλερικών με τον H5N1, εμφάνισαν σοβαρή πνευμονία και υπέκυψαν στην λοίμωξη.³⁷ Περαιτέρω εργαστηριακή μελέτη επιβεβαίωσε την ευαισθησία των οικόσιτων γατών στη μόλυνση με τον υψηλής παθογένειας ιό της γρίπης H5N1, καθώς και την πειραματική μετάδοση μεταξύ γατών.^{38,39} Εκτός από τις γάτες, αναφέρθηκε θανατηφόρα μόλυνση σκύλου που τράφηκε με σφάγιο πάπιας μολυσμένο με τον ιό H5N1 στην Ταϊλάνδη.⁴⁰ Οι περιπτώσεις αυτές τονίζουν την πιθανή απειλή του ιού H5N1 στα άγρια είδη θηλαστικών.

Επιπλέον, αυξημένη ιική παθογένεια στα θηλαστικά είδη συνδέεται με τους ιούς H5N1 που έχουν απομονωθεί από μολυσμένους ανθρώπους.⁴¹ Χαρακτηρισμός ενός υψηλής παθογένειας ιού H5N1, που απομονώθηκε από ένα θανατηφόρο ανθρώπινο κρούσμα στο

Βιετνάμ έδειξε ότι η δραστηριότητα της ιικής πολυμεράσης αποτελεί βασικό παράγοντα για την αυξημένη παθογένεια στα θηλαστικά.⁴² Άλλοι παράγοντες που μπορούν να καθορίσουν το εύρος των ξενιστών και την παθογένεια των ιών H5N1, περιλαμβάνουν τις ικές γλυκοπρωτεΐνες επιφανείας, την παρουσία καταλοίπων Lys στη θέση 627 στην PB2 πρωτεΐνη, καθώς και τη δυνατότητα να αποφύγει την έμφυτη ανοσολογική απόκριση μέσω της πρωτεΐνης NS1.⁴³

Συνολικά, η ευρεία διάδοση των υψηλής παθογένειας ιών H5N1 έχει πολλά μοναδικά χαρακτηριστικά που θα πρέπει να ληφθούν υπόψη σε κάθε προσπάθεια για την καταπολέμηση του ιού. Πρώτον, η ικανότητα του ιού να αναπαράγεται τόσο στην αναπνευστική όσο και στη γαστρεντερική οδό και να προκαλεί θανατηφόρα μόλυνση στα υδρόβια πτηνά. Δεύτερον είναι ότι, σε δεξαμενές οικόσιτων παπιών και υδρόβιων πτηνών, η επιλογή αντιγονικών παραλλαγών με μειωμένη παθογένεια για αυτά τα είδη μπορεί να συμβεί. Οικόσιτες πάπιες και υδρόβια πτηνά που περιέχουν τις επιλεγμένες παραλλαγές χωρίς εμφανή συμπτώματα μπορεί να μεταδώσουν τον ιό σε κοτόπουλα και άλλα άγρια πτηνά (όπως χήνες και κύκνοι), που είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι στη μόλυνση, προκαλώντας έτσι ξεσπάσματα. Τρίτον, ο υψηλής παθογένειας ιός H5N1, με αυξημένο εύρος ξενιστών στα είδη των αιλουροειδών ή κουναβιών παρέχει στον ιό ευκαιρίες για περαιτέρω προσαρμογή στα θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένων και των ανθρώπων.⁴⁴

γ) Μόλυνση ανθρώπων από τον ιό H5N1

Παρά το γεγονός ότι η μετάδοση των ιών της γρίπης H5N1 μεταξύ των πτηνών είναι εξαιρετικά αποτελεσματική, η μετάδοση μεταξύ των ειδών από πτηνά σε θηλαστικά παραμένει σπάνια. Μετά από μια δεκαετία συνεχούς κυκλοφορίας, οι ιοί H5N1 οδήγησαν σε περισσότερες από 380 ανθρώπινες μολύνσεις με περίπου 60% ποσοστό θνησιμότητας. Η υψηλότερη θνησιμότητα παρατηρείται μεταξύ των ασθενών 10-19 ετών και το χαμηλότερο ποσοστό μεταξύ ασθενών 50 ετών ή μεγαλύτερων.⁴⁵ Η τυπική κλινική εκδήλωση της ανθρώπινης μόλυνσης με τον ιό H5N1 είναι σοβαρή πνευμονία που μπορεί να εξελιχθεί σε σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας, ωστόσο έχει αναφερθεί και ήπια νόσος του άνω αναπνευστικού χωρίς πνευμονία.^{45,46} Ανάλογα με τον κλάδο που ανήκει ο ιός H5N1, γαστρεντερικά συμπτώματα αναφέρθηκαν μεταξύ του 5-52% των ασθενών.⁴⁵ Εγκεφαλοπάθεια έχει αναφερθεί σε ένα ανθρώπινο κρούσμα.⁴⁷ Υψηλό ιικό φορτίο, λεμφοπενία, αυξημένα επίπεδα γαλακτικής δευδρογονάσης και συγκεκριμένα επίπεδα χημειοκινών και κυτοκινών σχετίζονται με μοιραία έκβαση μετά τη μόλυνση.^{45,48}

Οροεπιδημιολογικά αποτελέσματα από τις ομάδες υψηλού κινδύνου με στενή επαφή με μολυσμένα πουλερικά ή με ασθενείς δείχνουν ότι ασυμπτωματική μόλυνση είναι σπάνια.^{45,46}

Απευθείας μετάδοση από πτηνό σε άνθρωπο ως αποτέλεσμα στενής επαφής με μολυσμένα πουλερικά με τον ιό H5N1, επαφή με μολυσμένο περιβάλλον, ή κατανάλωση άβραστων προϊόντων πουλερικών είναι οι κύριες αιτίες μόλυνσης για τον άνθρωπο.^{45,46} Κάθετη μετάδοση του ιού από μολυσμένη μητέρα στο έμβρυο έχει αναφερθεί.⁴⁹ Περιορισμένη και μη διατηρημένη μόλυνση από άνθρωπο σε άνθρωπο έχει αναφερθεί από μέλη οικογένειας που παρακολουθούν ασθενείς μολυσμένους με τον ιό H5N1.^{50,51} Η παρατήρηση ότι το 90% των περιπτώσεων συμβαίνει μεταξύ εξ αίματος μελών οικογένειας προτείνει επίσης την πιθανότητα της γενετικής προδιάθεσης.⁴⁵

δ) Συμπεράσματα

Έχουν περάσει περισσότερα από 40 χρόνια από την ανθρώπινη πανδημία του ιού της γρίπης του 1968 (H3N2), και περισσότερα από 30 χρόνια από τότε που ο ιός H1N1 επανεμφανίστηκε. Έχει, επομένως, γίνει ένα σημαντικό μεγάλο χρονικό διάλειμμα από τότε που ένα πανδημικό στέλεχος της γρίπης έχει προκύψει και υπάρχει μια αυξημένη ανησυχία που βασίζεται σε ιστορικές καταγραφές⁵² ότι μια πανδημία επίκειται. Κατά την τελευταία δεκαετία, έχουμε εντοπίσει αρκετούς υποτύπους του ιού της γρίπης Α με αυξημένες πιθανότητες πανδημίας, περιλαμβάνοντας την άμεση μετάδοση του ιού της γρίπης των πτηνών του υποτύπου H5, που οδήγησε σε ήπια έως σοβαρή ανθρώπινη μόλυνση.

Το ερώτημα που συχνά τίθεται είναι κατά πόσο ο ιός της γρίπης H5N1, που έχει μολύνει 409 ανθρώπους από 15 χώρες του κόσμου και σκότωσε 256 (Μάρτιος 2009) θα πετύχει σταθερή μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο για να κηρυχθεί ως πανδημικό στέλεχος. Από τη μεριά της κτηνοτροφίας στην Ευρασία, ο ιός H5N1 έχει επιτύχει ήδη μια καταστροφική κατάσταση στη βιομηχανία των πουλερικών στις πληγείσες χώρες.⁵³ Από τη σκοπιά της πιθανότητας για εμφάνιση ανθρώπινης πανδημίας, όσο ο H5N1 συνεχίζει να κυκλοφορεί και να προκαλεί περιστατικά μετάδοσης μεταξύ των ειδών, η δυνατότητα του ιού να προσαρμοστεί περαιτέρω στον ανθρώπινο πληθυσμό θα πρέπει να ληφθεί υπόψη κατά την αξιολόγηση απειλής πανδημίας. Μέχρι σήμερα, ο H5N1 δεν έχει ακόμη αποκτήσει πολλές αλλαγές σε ειδικούς δείκτες των ξενιστών που διαφοροποιούν τους ανθρώπινους από τους ιούς της γρίπης των πτηνών και έχουν παρατηρηθεί από τους πανδημικούς ιούς του 1918 (Ισπανική γρίπη), του 1957 (Ασιατική γρίπη) και του 1968 (γρίπη του Χονγκ Κονγκ).⁵⁴ Ωστόσο, η πιθανότητα ότι η προσαρμογή του ιού H5N1 στο ανθρώπινο είδος δεν μπορεί να

ακολουθήσει το ίδιο μοτίβο που παρατηρήθηκε με προηγούμενους πανδημικούς ιούς δεν θα πρέπει να αποκλειστεί.

Θα ήταν πρόωρο να εφησυχάσουμε ως προς τον H5N1 και της πιθανότητάς του να προκαλέσει πανδημία, επειδή συνεχίζει να εξελίσσεται με ταχείς ρυθμούς, τόσο με συσσώρευση μεταλλάξεων όσο και με ανακατάταξη. Μια πρόσφατη ανακατάταξη στη φύση μεταξύ του υψηλής παθογένειας ιού H5N1 και ενός μη παθογόνου ιού H3N8 πάπιας στη Λαϊκή Δημοκρατία του Λάος παρήγαγε ιό με επτά γονίδια από τον H5N1 και ένα γονίδιο (PB2) από τον H3N8. Αυτή η ανακατάταξη σκότωσε όλες τις αγριόπαπιες σε τέσσερις ημέρες και μεταδόθηκε αποτελεσματικά σε άλλες αγριόπαπιες που ήταν σε επαφή. Αυτός είναι ο πρώτος H5N1 γονότυπος που σκότωσε όλες τις μολυσμένες πάπιες, απεικονίζοντας τη συνεχιζόμενη εξέλιξη αυτών των υψηλής παθογένειας ιών H5N1. Ενώ η πειραματική παραγωγή ετεροσυνδυασμένων ιών μεταξύ εποχιακών ιών της γρίπης του ανθρώπου H3N2 και ιού της γρίπης των πτηνών H5N1 Ασίας δεν έχει μέχρι στιγμής δημιουργήσει ένα μεταδοτικό ιό σε κουνάβια,⁵⁵ αυτό δεν αντικατοπτρίζει κατ' ανάγκη το πιθανό πρότυπο των διαφορετικών ετεροσυνδυασμών που θα μπορούσαν να παραχθούν στη φύση. Με αυξημένο εύρος ξενιστών σε αιλουροειδή, σκυλιά, και άγρια είδη θηλαστικών^{21,40,56} υπάρχει η δυνατότητα για τους ιούς H5N1 να προσαρμοστούν περαιτέρω στα θηλαστικά.

Ωστόσο, κάποιοι υποστηρίζουν την άποψη ότι μόνο ιοί της γρίπης H1, H2, H3 έχουν την ικανότητα για μετάδοση μεταξύ των ανθρώπων.⁵⁷ Στοιχεία από ανθρώπους υποστηρίζουν την παρουσία ιών H1, H2, H3 στον άνθρωπο, σε παλαιότερες εποχές,⁵² και ορολογικά στοιχεία από τους υπόλοιπους 13 υποτύπους HA (H4-7, H10-11), είναι αποσπασματικά, στην καλύτερη περίπτωση.^{21,58} Έτσι, μπορεί να υποστηριχθεί με βάση ορολογικά δεδομένα και από τις πανδημίες του εικοστού αιώνα πως η ισχυρότερη πιθανότητα για μια πανδημία είναι από ένα υπότυπο H2 και όχι από τους H5, H6, H7 και H9 υποτύπους. Ωστόσο, δεν έχουμε επαρκείς γνώσεις για να αποκλείσουμε τους τελευταίους υποτύπους.

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας έχει καθορίσει φάσεις απειλής πανδημίας για τους ιούς της γρίπης με έξι επίπεδα ετοιμότητας και το επίπεδο έχει παραμείνει στη φάση 3 από το 2005: ένας νέος υπότυπος του ιού της γρίπης προκαλεί ασθένεια στους ανθρώπους αλλά δεν εξαπλώνεται ακόμη αποτελεσματικά και σταθερά μεταξύ των ανθρώπων. Η συνεχιζόμενη κυκλοφορία του υψηλής παθογένειας ιού H5N1 στην Ευρασία με κορύφωση κρουσμάτων τους ψυχρούς μήνες και με συνεχιζόμενη υψηλή δραστηριότητα στα οικόσιτα πουλερικά στην Ινδονησία, την Ινδία, το Μπαγκλαντές είναι σε συνεχή ανησυχία. Η συνεχιζόμενη ύπαρξη του υψηλής παθογένειας ιού H5N1 στην Ταϊλάνδη και το Βιετνάμ με κορύφωση κρουσμάτων

τους κρύους μήνες κατά τη διάρκεια των τεσσάρων τελευταίων ετών έχει συσχετιστεί με πάπιες βοσκής, με ανθρώπινο πληθυσμό και την εντατική καλλιέργεια ρυζιού και όχι με αριθμούς πληθυσμού κοτόπουλων.⁵⁹ Οι διαφορετικές στρατηγικές που χρησιμοποιήθηκαν στην Ταϊλάνδη και το Βιετνάμ στην προσπάθεια για τον έλεγχο και εξάλειψη του H5N1 έχουν μειώσει τη συχνότητα εμφάνισης του ιού H5N1 σε ανθρώπους και πουλερικά, αλλά δεν έχουν ακόμη γίνει πλήρως επιτυχημένες. Στο Βιετνάμ, ένα μαζικό πρόγραμμα εμβολιασμού των πουλερικών μείωσε με επιτυχία τον αριθμό των κρουσμάτων στους ανθρώπους και στα κοτόπουλα σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα το 2006, αλλά ο ιός εκ νέου εμφανίστηκε το 2007, τόσο στα πουλερικά όσο και στους ανθρώπους. Στην Ταϊλάνδη, η μαζική επιτήρηση και εξολόθρευση χωρίς τη χρήση εμβολίου μείωσε σημαντικά τη συχνότητα εμφάνισης κρουσμάτων του H5N1, αλλά μεμονωμένα ξεσπάσματα σημειώθηκαν το 2007 και το 2008. Ενώ ορισμένα από αυτά τα ξεσπάσματα μπορούν να προκύψουν από την εισαγωγή λαθραίων πουλερικών από τα σύνορα, φυλογενετική ανάλυση του ιών H5N1 επίσης υποστηρίζει την ιδέα της τοπικής εμμόνης. Η ταυτοποίηση των εξελικτικών δεξαμενών των υψηλής παθογένειας ιών H5N1 είναι απαραίτητη για την εξάλειψη του ιού με επιτυχία.

Αν τα αποδημητικά υδρόβια πτηνά διαιωνίζουν τον H5N1, τότε η εκρίζωση μπορεί να μην είναι εφικτή μακροπρόθεσμα. Ο ρόλος των αποδημητικών υδρόβιων πτηνών στη διαιώνιση του υψηλής παθογένειας ιού της γρίπης H5N1 είναι άλυτος. Αποδημητικά υδρόβια πτηνά, ιδίως πάπιες, μπορούν να εξαπλώσουν τον ιό, αλλά δεν υπάρχουν πειστικές αποδείξεις για τη διαιώνιση του H5N1 σε βοσκότοπους και μετάδοση στην επόμενη γενιά.

Αν δεχθούμε την υπόθεση ότι τα αποδημητικά υδρόβια πτηνά δεν είναι οι δεξαμενές διαιώνισης του υψηλής παθογένειας ιού της γρίπης H5N1, τότε μπορεί να προταθεί ότι ο υψηλής παθογένειας ιός της γρίπης H5N1 εξακολουθεί να αποτελεί μια νόσο που μπορεί να ξεριζωθεί. Υπάρχει προηγούμενο για την εξάλειψη του H5N1 από την εντατική επιτήρηση και εξολόθρευση, χωρίς τη χρήση εμβολίου. Ωστόσο, εάν ένα εμβόλιο χρησιμοποιείται σε γειτονικές χώρες, τα συμπτώματα της νόσου μπορούν να καλυφθούν και η συνεχιζόμενη εντατική επίβλεψη είναι απαραίτητη. Η γνώση που απαιτείται για την επίτευξη του στόχου της εξάλειψης είναι διαθέσιμη. Πιθανή επιτήρηση είναι απολύτως απαραίτητη, για να γίνεται όλο και πιο προφανές ότι ο H5N1 δεν προκαλεί συμπτώματα νόσου σε όλα τα είδη και ότι ο «Δούρειος ίππος» στις πάπιες δεν έχει ακόμη πλήρως εκτιμηθεί.⁶⁰

Π.2.Α.5 Ανάπτυξη εμβολίου έναντι του ιού της γρίπης

Η εμφάνιση των υψηλής παθογένειας ιών της γρίπης των πτηνών στα οικόσιτα πουλερικά και ο αυξανόμενος αριθμός περιπτώσεων απευθείας μετάδοσης ιών της γρίπης των πτηνών διαφορετικών υποτύπων στους ανθρώπους είναι μια σημαντική απειλή για τη δημόσια υγεία λόγω της πιθανότητας αυτών των ιών να εμφανίσουν πανδημία. Το συνεχιζόμενο ξέσπασμα του υψηλής παθογένειας ιού της γρίπης των πτηνών H5N1 στον πληθυσμό των πτηνών και ο σχεδόν 50% ρυθμός θνησιμότητας μεταξύ των ανθρώπων που μολύνθηκαν με ιούς H5N1 υπογραμμίζουν την ανάγκη για στρατηγικές ελέγχου με σκοπό να προληφθεί μια πιθανή πανδημία γρίπης.

Οι ερευνητικές προσπάθειες για τον έλεγχο αναδυόμενων ιογενών ασθενειών επικεντρώνονται και στην ανάπτυξη αποτελεσματικών εμβολίων. Ο εμβολιασμός είναι ο ακρογωνιαίος λίθος της πρόληψης. Το ενδιαφέρον για την ανάπτυξη πανδημικών εμβολίων εντείνεται με το ξέσπασμα ανθρώπινων μολύνσεων από τον ιό της γρίπης των πτηνών H5N1, στο Χονγκ Κονγκ το 1997 και έχει αυξηθεί περαιτέρω, καθώς οι ιοί H5N1 έχουν εξαπλωθεί στα πτηνά και τους ανθρώπους από το 2003. Παρά την εκτεταμένη εμπειρία με εμβόλια κατά των ιών της γρίπης του ανθρώπου, οι ερευνητές αντιμετωπίζουν διάφορα πρόσθετα εμπόδια στην επιτυχή ανάπτυξη εμβολίων έναντι ιών της γρίπης των πτηνών με πιθανότητα εμφάνισης πανδημίας.⁶¹

α) Στόχος ενός πανδημικού εμβολίου

Ο αυξανόμενος αριθμός αναφορών άμεσης μετάδοσης ιών της γρίπης των πτηνών σε ανθρώπους τα τελευταία χρόνια και οι αυξανόμενες μολύνσεις ανθρώπων και διάφορων πτηνών από τον ιό της γρίπης των πτηνών H5N1 σε πολλές χώρες τονίζουν τη σημαντική απειλή των υψηλής και χαμηλής παθογένειας ιών της γρίπης των πτηνών για την ανθρώπινη υγεία. Επειδή δεν είναι πιθανό να προβλεφθεί ποιος υπότυπος του ιού της γρίπης των πτηνών θα προκαλέσει την επόμενη πανδημία στον άνθρωπο, ένα ιδανικό εμβόλιο θα πρέπει να προκαλεί μια ανοσολογική απόκριση που θα προστατεύει τον ξενιστή από μόλυνση από ένα μεγάλο φάσμα ιών της γρίπης, από τον ίδιο ή διαφορετικούς υποτύπους.

Οι γλυκοπρωτεΐνες HA και NA των ιών της γρίπης υπόκεινται σε γενετική και αντιγονική μεταβλητότητα με σκοπό να ξεφύγουν από την ανοσολογική απόκριση. Η παρουσία εξουδετερωτικών αντισωμάτων ειδικά για την HA προσφέρει άμεση προστασία από μόλυνση με ιούς της γρίπης, ενώ η κάθαρση των ιών της γρίπης του ανθρώπου εξαρτάται κυρίως από την κυτταρική ανοσία. Ωστόσο αντισώματα ειδικά για την NA δεν

εξουδετερώνουν τη μολυσματικότητα, περιορίζουν όμως την αναπαραγωγή του ιού εμποδίζοντας την απελευθέρωση νέων ιικών σωματιδίων, μια διαδικασία που απαιτεί ικές ΝΑ πρωτεΐνες. Γι' αυτό, αντισώματα ειδικά για τη ΝΑ μπορούν να μειώσουν τη σοβαρότητα της νόσου.^{62,63} Επίτοποι που αναγνωρίζονται από τα κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα (CTLs) είναι παρόντες στις πρωτεΐνες NP, PB2 και PA των ανθρώπινων ιών της γρίπης. Επομένως, εάν ένας ιός με νέα HA και/ή NA αναδύεται στον ανθρώπινο πληθυσμό, η κυτταρική ανοσία κατευθύνεται έναντι των υψηλά διατηρημένων εσωτερικών πρωτεϊνών και θα μπορούσε να έχει ρόλο στην προστασία σε μια πανδημία. Η αρχή που διέπει σήμερα τα κυκλοφορούντα εμβόλια έναντι των ιών της γρίπης του ανθρώπου είναι η επαγωγή προστατευτικών αντισωμάτων ειδικών για την HA του προβλεπόμενου επιδημικού στελέχους. Η συγκέντρωση της HA σε κυκλοφορούντα εμβόλια αδρανοποιημένων ιών για την εποχιακή γρίπη είναι τυποποιημένη, αλλά όχι η συγκέντρωση της NA.

Ο ρόλος της κυτταρικής ανοσίας στον έλεγχο των μολύνσεων από τον ιό της γρίπης των πτηνών δεν είναι γνωστός. Ένα πιθανό πλεονέκτημα ενός εμβολίου που επάγει την κυτταρική ανοσία, πέρα από το γεγονός ότι επάγει την προστατευτική απόκριση των αντισωμάτων, είναι ότι οι εσωτερικές πρωτεΐνες του ιού οι οποίες είναι στόχοι της κυτταρικής ανοσίας τείνουν να είναι διατηρημένες και να είναι λιγότερο επιρρεπείς σε γενετική μετατόπιση από ότι είναι οι περιοχές δέσμευσης των αντισωμάτων στις HA και NA.

Υπάρχουν τουλάχιστον δύο σενάρια στα οποία ένα εμβόλιο που επάγει την κυτταρική ανοσία μπορεί να είναι χρήσιμο σε περίπτωση πανδημίας. Πρώτον, αν και η κυτταρική απόκριση μπορεί να μην εμποδίζει τη μόλυνση από τον ιό, μπορεί να αποτρέψει την εκδήλωση σοβαρών ασθενειών και το θάνατο. Αν και αυτό μπορεί να μην είναι αποδεκτό αποτέλεσμα για ένα εποχιακό εμβόλιο κατά της γρίπης, μπορεί όμως να είναι για ένα πανδημικό εμβόλιο κατά της γρίπης. Δεύτερον, εάν η περίοδος επώασης και η πορεία μόλυνσης από τον ιό της γρίπης των πτηνών είναι μεγαλύτερη από εκείνη με ιούς της γρίπης των ανθρώπων, όπως έχει αναφερθεί,⁴⁶ τα εμβόλια που προκαλούν την προστασία μέσω κυτταρικής ανοσίας μπορεί να είναι αποτελεσματικά.

β) Ποικιλομορφία των ιών της γρίπης και σχεδιασμός εμβολίου

Αν και τα περισσότερα εμβόλια κατά της γρίπης, σχεδιάζονται να επάγουν αντισώματα έναντι της HA για προστασία από τη μόλυνση, η βιολογία των ιών της γρίπης των πτηνών παρουσιάζει πολλές μοναδικές προκλήσεις, σε σύγκριση με τους ιούς της γρίπης των ανθρώπων. Οι προκλήσεις αυτές περιλαμβάνουν την παρουσία διαφόρων υποτύπων HA

και ΝΑ και τη γενετική και αντιγονική μεταβλητότητα σε κάθε υπότυπο. Η αντιγονική μεταβλητότητα έχει συνέπειες για τα πανδημικά εμβόλια οι οποίες θα πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά το σχεδιασμό ενός προστατευτικού εμβολίου.

Ένα από τα πρώτα ζητήματα που πρέπει να εξεταστεί είναι αν τα εμβόλια θα πρέπει να αναπτυχθούν κατά όλων των υποτύπων των γλυκοπρωτεϊνών ΗΑ και ΝΑ. Οι 16 ΗΑ και 9 ΝΑ υπότυποι των ιών της γρίπης των πτηνών μπορεί να μην έχουν παρόμοια πιθανότητα εμφάνισης πανδημίας. Αν και οι υψηλής παθογένειας ιοί της γρίπης των πτηνών H5N1 προκαλούν νοσηρότητα και θνησιμότητα στα πουλερικά, ενδέχεται όμως να μην προκαλέσουν ανθρώπινη πανδημία. Είναι ενδιαφέρον ότι δεν υπάρχουν γνωστά παραδείγματα πανδημίας που προκλήθηκαν από ένα υψηλής παθογένειας ιό της γρίπης H5 ή H7. Λόγω της αβεβαιότητας αυτής, θα ήταν φρόνιμο να αναπτυχθούν εμβόλια έναντι κάθε υποτύπου του ιού της γρίπης των πτηνών, ωστόσο η σειρά προτεραιότητας ανάπτυξης μπορεί να γίνει με βάση τα επιδημιολογικά δεδομένα. Είναι πιθανό οι υπότυποι των ιών της γρίπης των πτηνών που είναι ευρέως διαδεδομένοι στη φύση και εκείνοι που έχουν αποδειχθεί να μολύνουν ανθρώπους να προκαλούν μεγαλύτερη ανησυχία απ' ότι οι υπότυποι που δεν κυκλοφορούν ευρέως στην φύση. Μια σύγκριση των προβλεπόμενων πρωτεϊνικών δομών των υποτύπων ΗΑ (1–15) οδήγησε στην ταξινόμηση αυτών των υποτύπων σε τέσσερις διαφορετικούς κλάδους: 1 (H1, H2, H5, H6, H11 και H13), κλάδος 2 (H8, H9 και H12), κλάδος 3 (H3, H4 και H14) και κλάδος 4 (H7, H10 και H15) 34. Ένα ερώτημα που προκύπτει είναι αν οι γλυκοπρωτεΐνες ΗΑ που ανήκουν στον ίδιο κλάδο μπορούν να επάγουν διασταυρωτή ανοσία έναντι άλλων υποτύπων στον ίδιο κλάδο.

Οι κυκλοφορούντες ιοί της γρίπης του ανθρώπου υφίστανται ταχεία μετάλλαξη (αντιγονική απόκλιση), οδηγώντας σε μεταβλητούς ιούς με αλλαγές αμινοξέων σε ένα ή περισσότερα σημεία σύνδεσης των αντισωμάτων της ΗΑ και /ή ΝΑ που επιτρέπουν στους ιούς να αποφύγουν την εξουδετέρωση από τα αντισώματα που παράγονται ως αποτέλεσμα προηγούμενης φυσικής μόλυνση ή εμβολιασμού.

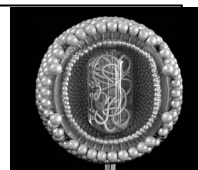
Τα γονίδια εσωτερικών πρωτεϊνών των ιών της γρίπης των πτηνών δεν υπόκεινται σε θετική άνοση επιλογή στα υδρόβια και ελόβια πτηνά. Ωστόσο, η χρήση κτηνιατρικών εμβολίων για την προστασία των πουλερικών από τη μόλυνση με τους ιούς της γρίπης των πτηνών ενδέχεται να οδήγησε την εξέλιξη των γλυκοπρωτεϊνών ΗΑ, αν αυτά τα εμβόλια δεν επάγουν στειρωτική ανοσία. Αρκετές χώρες της Ασίας χρησιμοποιούν κτηνιατρικά εμβόλια για τον έλεγχο των μολύνσεων από τον ιό H5N1 στα πουλερικά. Αν οι ιοί της γρίπης των πτηνών υπόκεινται αντιγονική απόκλιση στα πουλερικά ως συνέπεια της χρήσης του

εμβολίου, τότε τα πανδημικά εμβόλια γρίπης που βρίσκονται αποθηκευμένα για ανθρώπινη χρήση θα πρέπει να εκσυγχρονιστούν. Ωστόσο, ένα αποτελεσματικό πρόγραμμα εμβολιασμού των ζώων θα μειώσει το βάρος της νόσου στα πουλερικά σημαντικά, μειώνοντας έτσι τον κίνδυνο μιας ανθρώπινης πανδημίας. Επίσης, αλλαγές στον ιό που οδηγούνται από θετική άνοση επιλογή στα πουλερικά δεν μπορεί να είναι σημαντικές στον άνθρωπο. Θα είναι σημαντικό να εκτιμηθούν τα πιθανά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα του εμβολιασμού των ζώων και να καθοριστεί η σημασία της αντιγονικής απόκλισης στους ιούς της γρίπης των πτηνών για τους ανθρώπους.

Οι παράγοντες παθογένειας των ιών της γρίπης των πτηνών σε ανθρώπους είναι πολυγονιδιακοί. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για να κατανοήσουμε πώς η παθογένεια των ιών της γρίπης των πτηνών επηρεάζει τη μολυσματικότητα και τη μεταδοτικότητα αυτών των ιών στους ανθρώπους και να διαπιστωθεί εάν αυτοί οι παράγοντες έχουν επιπτώσεις στο σχεδιασμό εμβολίων.

**B) Ιός της Ανθρώπινης
Ανοσοανεπάρκειας (HIV)**

- Εισαγωγή
- Δομή του ιού HIV
- Αναπαραγωγή του ιού HIV
- Προκλήσεις για την ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού εμβολίου έναντι του ιού HIV



II.2.B.1 Εισαγωγή

Το «Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσολογικής Ανεπάρκειας» (Acquired Immune Deficiency Syndrome - AIDS) αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά το 1981 σε ομοφυλόφιλους στις Η.Π.Α που εμφάνιζαν μία διακριτή ανεπάρκεια στις κυτταρικές ανοσολογικές αποκρίσεις καθώς και αξιοσημείωτη μείωση του υποπληθυσμού των $CD4^+$ T κυττάρων (T_H κύτταρα) μαζί με ασυνήθιστες λοιμώξεις, όπως σάρκωμα Kaposi και πνευμονία PCP που προκαλείται από τον ευκαιριακό μυκητιακό παθογόνο *Pneumocystis carinii* (PCP: *Pneumocystis carinii pneumonia*), όπως επίσης και άλλες σπάνια εμφανιζόμενες ευκαιριακές λοιμώξεις. Η νόσος του AIDS προκαλείται από τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας HIV (Human Immunodeficiency virus). Φυλογενετική ανάλυση αλληλουχιών του HIV δείχνει ότι ο ιός μπορεί να έχει μεταδοθεί αρχικά στους ανθρώπους γύρω στο 1930.

Ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας, είναι ρετροϊός και ανήκει στο γένος των Λεντιών (Lentiviridae). Οι Λεντιοί χαρακτηρίζονται από μεγάλη περίοδο επώασης (από το λατινικό *Lentus* που σημαίνει αργός) και αντιγραφής πριν από την εκδήλωση της ασθένειας. Ο ιός απομονώθηκε πρώτη φορά από τους Γάλλους ερευνητές Chermann και Montagnier (1983) από ασθενή με επιμένουσα γενικευμένη λεμφαδενοπάθεια και ονομάστηκε ιός LAV-1 (Lymphadenopathy Associated Virus-1: Ιός Λεμφαδενοπάθειας-1). Το 1984 ο ίδιος ιός απομονώθηκε από τον Αμερικανό ερευνητή Gallo, από ασθενείς με AIDS και με επιμένουσα γενικευμένη λεμφαδενοπάθεια και ονομάστηκε HTLV-III (Human T-cell leukemia virus: ανθρώπινος T-λεμφοκυτταροτρόπος ιός-III) επειδή πίστευαν ότι αποτελεί μέρος της οικογένειας των HTLV ογκογόνων ιών. Τα διάφορα ονόματα που εδόθησαν στους ιούς που βρέθηκαν και τελικά αποδείχθηκαν ότι πρόκειται για τον ίδιο ιό, είναι LAV, ARV (AIDS-Associated Retrovirus: Ιός σχετιζόμενος με το σύνδρομο AIDS) και HTLV-III. Οι ονομασίες αυτές αντικαταστάθηκαν το 1986 από την Διεθνή Επιτροπή Ταξινόμησης Ιών με την ονομασία HIV.^{9B}

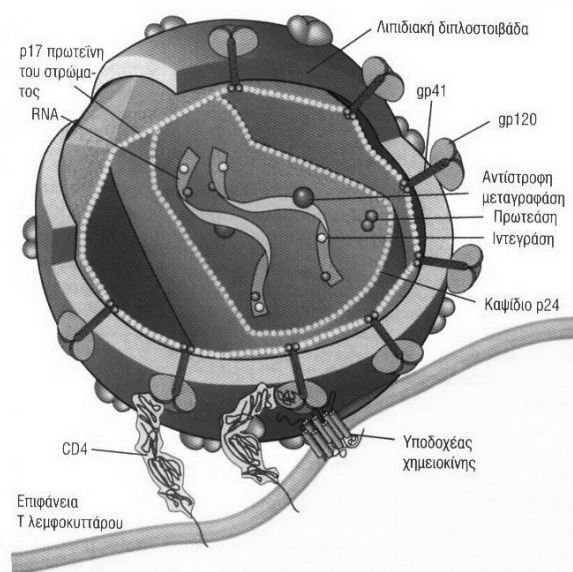
Έχουν βρεθεί δύο στελέχη του ιού, ο HIV-1 και ο HIV-2 (λιγότερο παθογόνος στον άνθρωπο, κυρίως περιορισμένος στη Δυτική Αφρική), αλλά είναι γενικά αποδεκτό ότι το πρώτο στέλεχος προκαλεί το AIDS στη συντριπτική πλειονότητα των περιπτώσεων σε ολόκληρο τον κόσμο. Και τα δύο στελέχη εξελίχθηκαν από διαφορετικούς ιούς ανοσοανεπάρκειας πιθήκων (SIV: Simian immunodeficiency viruses: Ιοί ανοσοανεπάρκειας πιθήκων). Ο ιός HIV-1 των ανθρώπων προήλθε από ιούς SIVcpz (SIVcpz: Simian immunodeficiency viruses chimpanzee: Ιοί ανοσοανεπάρκειας χιμπατζήδων) των χιμπατζήδων. Ο ιός SIV του πιθήκου Sooty mangabey είναι πιθανότατα ο πρόγονος του ιού HIV-2.

Οι κυριότεροι τρόποι μετάδοσης του HIV είναι: α) Η σεξουαλική επαφή (ομο- και ετεροφυλοφιλική) β) Η παρεντερική χορήγηση φαρμάκων, ναρκωτικών (με μολυσμένες από τον HIV βελόνες ή σύριγγες) γ) Η μετάγχιση μολυσμένου αίματος ή παραγώγων αυτού δ) Μεταμοσχεύσεις οργάνων από μολυσμένα άτομα ε) Μετάδοση κάθετη από μολυσμένη μητέρα, ενδομητρίως στο έμβρυο και περιγεννητικά στο νεογνό κατά τη δίοδο του μέσω του γεννητικού καναλιού της μολυσμένης μητέρας. Η μετάδοση κατά τον θηλασμό, με το γάλα είναι ενδεχόμενη στ) Κατόπιν τυχαίου ενοφθαλμισμού με μολυσμένο αίμα ή άλλα βιολογικά υγρά φέροντα τον ιό.

Μέχρι σήμερα περισσότερα από 42 εκατομμύρια άνθρωποι έχουν προσβληθεί από AIDS σε ολόκληρο τον κόσμο και υπολογίζεται ότι περίπου 17 εκατομμύρια έχουν πεθάνει ως αποτέλεσμα των επιπλοκών της μόλυνσης.

II.2.B.2 Δομή του ιού HIV

Ο ιός HIV, είναι σφαιρικός ιός διαμέτρου 80-120 nm (**Σχήμα II.2.B.1**). Εξωτερικά φέρει έλυτρο, αποτελούμενο από διπλή στιβάδα φωσφολιπιδίων με γλυκοπρωτεϊνικές προεκβολές, το οποίο προέρχεται από τη μεμβράνη των κυττάρων του ξενιστή. Κάθε σωματίδιο του ιού εκφράζει 72 γλυκοπρωτεϊνικές προεκβολές που αποτελούνται από τις πρωτεΐνες gp120 (gp: glycoprotein: γλυκοπρωτεΐνη, M.B. 120 kDa) και gp41 (M.B. 41 kDa). Κάθε δομή των προεκβολών αποτελείται από ένα καπελοειδή σχηματισμό, που περιέχει τρία με τέσσερα μόρια gp120 και από ένα διαμεμβρανικό μίσχο με τρία έως τέσσερα μόρια gp41. Η gp120 συνδέεται με μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις με κάθε υπομονάδα του τριμερούς συμπλέγματος της gp41.¹

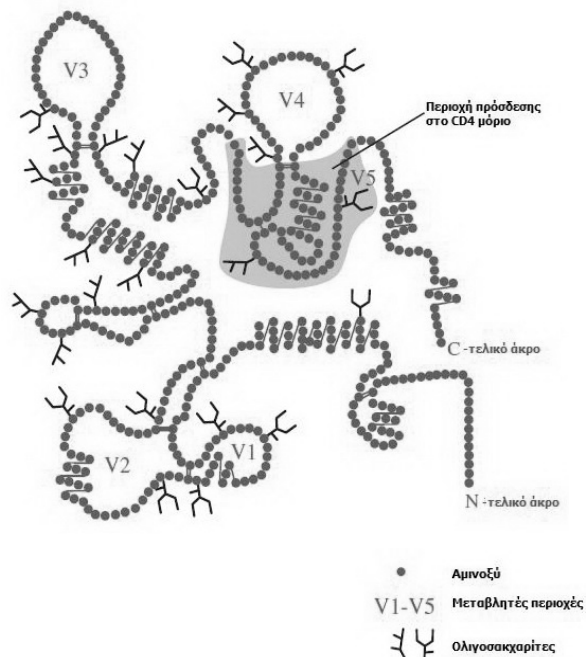


Σχήμα Π.2.Β.1 Δομή του ιού HIV^{3B}

Η gp120 (480 αμινοξέα και 25 ολιγο-σακχαρικές αλυσίδες) περιέχει τέσσερις σταθερές C1-C4 (C: Constant: σταθερή) και πέντε μεταβλητές περιοχές V1-V5 (V: Variable: μεταβλητή) των οποίων οι αλληλουχίες των αμινοξέων μπορούν να διαφέρουν μεταξύ των HIV-1 (**Σχήμα Π.2.Β.2**). Οι τέσσερις πρώτες μεταβλητές περιοχές σχηματίζουν εκτεθειμένες θηλίες οι οποίες περιέχουν δισουλφιδικούς δεσμούς στις βάσεις τους. Η τρίτη μεταβλητή περιοχή (V3) δεν εμπλέκεται άμεσα στη σύνδεση με το CD4 μόριο, αλλά αλληλεπιδρά με τους συνυποδοχείς χημειοκίνης CXCR4 και CCR5. Οι σταθερές περιοχές της gp120 σχηματίζουν ασυνεχείς δομές σημαντικές για την αλληλεπίδραση τόσο με την εξωτερική περιοχή της gp41 όσο και με τους ικούς υποδοχείς στο κύτταρο-στόχο. Τόσο οι σταθερές όσο και οι μεταβλητές περιοχές της gp120 είναι εκτεταμένα γλυκοζυλιωμένες.² Η gp41 (350 αμινοξέα και μόνο 5 ολιγοσακχαρικές αλυσίδες) είναι ένα διαμεμβρανικό μόριο που διαπερνά τη λιπιδική διπλοστιβάδα του ιικού ελύτρου και μεσολαβεί στη σύντηξη των μεμβρανών του ιού και του κυττάρου ξενιστή. Οι gp120 και gp41 παράγονται πρωτεολυτικά από μια πρόδρομη γλυκοπρωτεΐνη την gp160, η οποία συντίθεται στο κοκκιώδες ενδοπλασματικό δίκτυο και στη συνέχεια γλυκοζυλιώνεται στο σύμπλεγμα Golgi σε κατάλοιπα ασπαραγίνης όπου και κόβεται πρωτεολυτικά στις πρωτεΐνες gp120 και gp41.

Εσωτερικά της μεμβράνης υπάρχουν δυο διαδοχικά πρωτεϊνικά καλύμματα. Το εξωτερικό κάλυμμα αποτελείται από την πρωτεΐνη p17. Το εσωτερικό έχει σχήμα κώνου με πεπλατυσμένα άκρα, περιβάλλει τον πυρήνα (νουκλεοκαψίδιο) και αποτελείται από 2000

μόρια της πρωτεΐνης p24. Στο κέντρο του εσωτερικού πρωτεϊνικού καλύμματος βρίσκονται δύο πανομοιότυπα μόρια μονόκλωνου RNA (ssRNA: single strand RNA) που το καθένα αποτελεί πλήρες αντίγραφο του γονιδιώματος του ιού. Επίσης στον πυρήνα του νουκλεοκαψιδίου περικλείονται δυο κυτταρικά tRNAs, αντίγραφα αντίστροφης μεταγραφάσης για τη μεταγραφή του RNA σε DNA, ιντεγκράσης και πρωτεάσης.



Σχήμα II.2.B.2 Δομή της γλυκοπρωτεΐνης gp120^{13B}

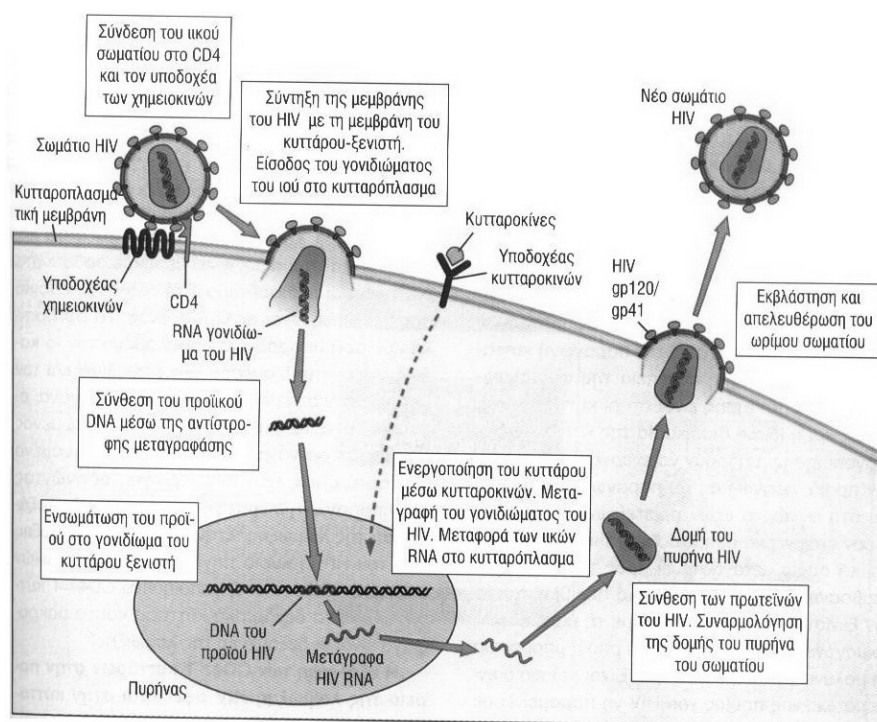
Το κάθε μόριο RNA περιέχει εννέα γονίδια (9.749 νουκλεοτίδια) και κωδικοποιεί πρωτεΐνες των περιβλημάτων, τις γλυκοπρωτεϊνικές προεκβολές, την αντίστροφη μεταγραφάση καθώς και ρυθμιστικά μόρια. Ο HIV μοιράζεται μαζί με όλους τους άλλους ρετροϊούς τρία μεγάλα γονίδια, το **gag** (group specific antigen: αντιγόνο ειδικό για ομάδα), το **pol** (polymerase: γονίδιο πολυμεράση) και το **env** (envelope: γονίδιο φάκελος). Το γονίδιο gag έχει μήκος 1.500 νουκλεοτίδια και κωδικοποιεί τις δομικές πρωτεΐνες του ιικού πυρήνα, αρχικά κωδικοποιεί μια πολυπρωτεΐνη gag (p55, 55KDa) που κόβεται στη συνέχεια πρωτεολυτικά για να δώσει: την πρωτεΐνη μήτρας MA/p17 (matrix), την πρωτεΐνη καψιδίου CA/p24 (Capsid), την πρωτεΐνη του πυρηνοκαψιδίου p7, καθώς και τις ρυθμιστικές και βοηθητικές πρωτεΐνες p15 και p6. Το γονίδιο pol κωδικοποιεί τις ενζυμικές πρωτεΐνες: πρωτεάση PR/p10 (PR: protease), ιντεγκράση IN/p32 (IN: Integrase) για την ενσωμάτωση του ιικού DNA στο DNA του λεμφοκυττάρου, αντίστροφη μεταγραφάση RT/p66,p51 (RT: reverse transcriptase). Το γονίδιο env κωδικοποιεί μια μεγάλη πρόδρομη πρωτεΐνη (gp160), η

οποία κόβεται πρωτεολυτικά στη συσκευή Golgi και δίνει τις πρωτεΐνες gp120 και gp41. Επιπλέον, έχουν ταυτοποιηθεί κάποια γονίδια που παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο, όπως το **tat** (transactivator protein: πρωτεΐνη ενεργοποιητής μεταγραφής), που παράγει έναν παράγοντα (p14) που ασκεί ρυθμιστικό έλεγχο αυξάνοντας τη μεταγραφική ταχύτητα του προιού και το **rev** (regulator of viral protein synthesis: ρυθμιστής ιικής πρωτεϊνικής σύνθεσης) που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη (p19) ρυθμιστή της ιικής έκφρασης, που επιτρέπει την έξοδο των αμάτιστων (ανώριμων) μεταγραφών από τον πυρήνα.

Οι γλυκοπρωτεΐνες του ελύτρου του HIV υπόκεινται σε συχνές αντιγονικές μεταβολές (antigenic drift). Το γονίδιο ενν του γενώματος διαφόρων στελεχών HIV εμφανίζει σημαντική ετερογένεια. Έτσι 20% των νουκλεοτιδίων του γονιδίου ενν των αφρικανικών στελεχών του HIV διαφέρουν από τα αντίστοιχα αμερικανικά στελέχη.^{7B,8B,10B-12B}

II.2.B.3 Αναπαραγωγή του ιού HIV

Ο κύκλος αναπαραγωγής (Σχήμα II.2.B.3) του HIV περιλαμβάνει τα εξής στάδια: α) Προσκόλληση στη μεμβράνη των κυττάρων β) Είσοδος του ιού στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων γ) Ενσωμάτωση του DNA των προϊόν στο χρωμόσωμα του κυττάρου δ) Αντιγραφή προιού ε) Έκφραση των ιών στ) Αυτοσυγκρότηση των ιών και έξοδος από το κύτταρο^{1B,4B-6B}

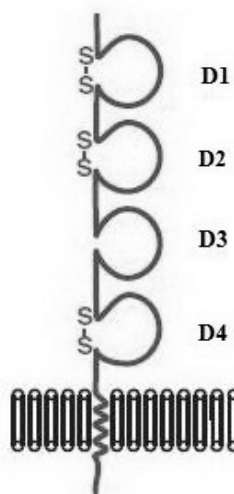


Σχήμα II.2.B.3 Κύκλος αναπαραγωγής του HIV^{2B}

α) Προσκόλληση στη μεμβράνη των κυττάρων

Το πρώτο βήμα της μόλυνσης είναι η αλληλεπίδραση της εξωτερικής γλυκοπρωτεΐνης gp120 του ιού με τον υποδοχέα CD4 των T-λεμφοκυττάρων, που αποτελούν αντίστοιχα τον κύριο υποδοχέα και τα κύρια κύτταρα στόχους για τον HIV. Ο HIV επίσης, μπορεί να μολύνει και άλλα κύτταρα που φέρουν CD4 υποδοχέα (λιγότερους σε αριθμό) όπως τα μακροφάγα, τα δενδριτικά, τα μικρογλοιακά και τα B-λεμφοκύτταρα.

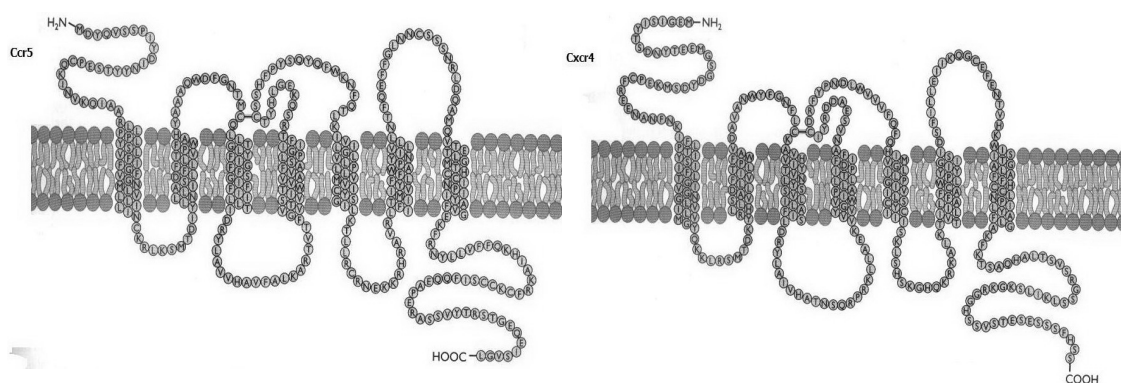
Ο υποδοχέας CD4 ανήκει, υπό ευρεία έννοια, στην ομάδα των ανοσοσφαιρινών και περιλαμβάνει ένα εξωκυττάριο τμήμα που φέρει τέσσερις σφαιρικές περιοχές (D1-D4), ένα διαμεμβρανικό και ένα κυτταροπλασματικό τμήμα (**Σχήμα II.2.B.4**). Υπό φυσιολογικές συνθήκες το μόριο CD4 συνδέεται με μόρια MHC-II. Η περιοχή του CD4 μορίου που εμπλέκεται στη σύνδεση με το μόριο gp120 βρίσκεται μεταξύ των αμινοξέων 25-64 της D1 περιοχής. Για την gp120 η σταθερή περιοχή C4 κοντά στο κάρβοξυ-τελικό άκρο της αποτελεί την σημαντικότερη περιοχή πρόσδεσης στο CD4 μόριο καθώς και υδρόφοβες και υδρόφιλες περιοχές των τμημάτων C2, C3. Η γλυκοζυλίωση της gp120 είναι ένας άλλος πιθανός παράγοντας που επηρεάζει την αλληλεπίδραση CD4-gp120.



Σχήμα II.2.B.4 Δομή του μορίου CD4^{13B}

Για την αποτελεσματική πρόσδεση του ιού στο κύτταρο και την είσοδό του στο κυτταρόπλασμα απαιτείται και η πρόσδεση σε συνυποδοχείς, κυρίως τους υποδοχείς χημειοκινών CCR5 και CXCR4. Τα μόρια αυτά δρουν ως συνυποδοχείς και έχουν επτά διαμεμβρανικές περιοχές (**Σχήμα II.2.B.5**). Κατά τη διάρκεια των ανοσολογικών αποκρίσεων δεσμεύουν χημειοκίνες και μέσω αυτών των αλληλεπιδράσεων ελέγχουν την κυκλοφορία των λευκοκυττάρων και τη διαφοροποίηση των T-κυττάρων. Ανάλογα με τη διάταξη των

καταλοίπων κυστεΐνης που βρίσκονται κοντά στο N-τελικό άκρο, χωρίζονται σε δύο υποοικογένειες, τις C-C και C-X-C (όπου C= Cys και X= οποιοδήποτε αμινοξύ) και ονομάζονται CCR και CXCR. Τα διάφορα λευκοκύτταρα διαθέτουν υποδοχείς διαφορετικών χημειοκινών. Τα περισσότερα HIV-1 στελέχη χρησιμοποιούν τον CCR5 συνυποδοχέα, που βρίσκεται στα μακροφάγα και είναι γνωστό ως R5 στελέχη. Τα HIV-1 στελέχη που χρησιμοποιούν τον CXCR4 συνυποδοχέα είναι γνωστά ως X4 στελέχη, ωστόσο υπάρχουν και κάποια στελέχη (R5X4) που χρησιμοποιούν και τους δύο συνυποδοχείς. Τα R5 στελέχη δεν μολύνουν τα πρώιμα T-κύτταρα, αλλά όλα τα στελέχη μολύνουν τα μνημονικά T-κύτταρα. Από μελέτες έχει βρεθεί ότι το άμινο-τελικό άκρο ή η πρώτη εξωκυττάρια περιοχή του CCR5 λαμβάνει μέρος στην αλληλεπίδραση με το σταθερό τμήμα της gp120, το οποίο βρίσκεται μεταξύ των V1, V2, V3 θηλειών. Για τον CXCR4 συνυποδοχέα, η δεύτερη εξωκυττάρια θηλιά της άμινο-τελικής περιοχής εμπλέκεται στη δέσμευση με τον HIV.



Σχήμα Π.2.Β.5 Δομές των συνυποδοχέων χημειοκίνης α)CCR5 και β)CXCR4

Συνολικά, η προσκόλληση του ιού στη μεμβράνη των κυττάρων περιλαμβάνει τη δέσμευση της gp120 στον CD4 υποδοχέα η οποία επάγει διαμορφωτικές αλλαγές στο μόριο της, κάποιες από τις οποίες περιλαμβάνουν την έκθεση και/ή σχηματισμό ενός σημείου δέσμευσης για συγκεκριμένους υποδοχείς χημειοκίνης. Ακολουθεί σύνδεση της gp120 (του συμπλέγματος gp120-CD4) με τον υποδοχέα χημειοκίνης (CCR5, CXCR4) προκαλώντας διαμορφωτικές αλλαγές στη διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη gp41, η οποία επάγει την συγχώνευση των μεμβρανών ιού-κυττάρου ξενιστή.

β) Είσοδος του ιού στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων

Ο ιός εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή μέσω σύντηξης του ελύτρου του με τη μεμβράνη του ξενιστή με τη βοήθεια της γλυκοπρωτεΐνης gp41. Μετά τη σύντηξη ο πυρήνας του ιού με το ιικό RNA (νουκλεοκαψίδιο) εισχωρούν στο κυτταρόπλασμα. Ακολουθεί μερική αποδιοργάνωση των πρωτεϊνών του καψιδίου και το γονιδίωμα του ιού απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα. Ο ιός σε αυτή τη φάση χρησιμοποιεί το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (RT) για να συνθέσει γραμμικό δίκλωνο ιικό DNA.

Το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση είναι ουσιαστικά μια DNA πολυμεράση η οποία εμφανίζει τρεις ενζυμικές δράσεις: (1) σύνθεσης DNA με τη χρήση RNA ως εκμαγείου (αντίστροφη μεταγραφή) (2) σύνθεσης DNA με τη χρήση DNA ως εκμαγείου και (3) ριβονουκλεάσης (αποικοδόμηση του κλώνου του RNA). Όπως όλες οι DNA πολυμεράσες, η αντίστροφη μεταγραφάση χρειάζεται έναν εκκινητή για τη σύνθεση του DNA. Ο εκκινητής για την αντίστροφη μεταγραφή είναι ένα ειδικό μεταφορικό RNA (tRNA: transfer tRNA) του κυττάρου. Ο τύπος του tRNA που χρησιμοποιείται ως εκκινητής εξαρτάται από τον ιό και μεταφέρεται στο ιόσωμα από το προηγούμενο ξενιστικό κύτταρο.

Η αντίστροφη μεταγραφάση χρησιμοποιεί ως εκμαγείο το ιικό RNA για τη σύνθεση συμπληρωματικής αλυσίδας DNA. Στο υβρίδιο RNA-DNA που δημιουργείται το ιικό RNA διασπάται από την ριβονουκλεάση (τμήμα της αντίστροφης μεταγραφάσης). Από τη συμπληρωματική αλυσίδα του DNA, αμέσως σχηματίζεται το διπλής έλικας ιικό DNA (προϊός).

γ) Ενσωμάτωση του DNA των προϊόν στο χρωμόσωμα του κυττάρου

Μετά την αντίστροφη μεταγραφή, το δίκλωνο ιικό DNA και οι συνδεόμενες με αυτό ιικές πρωτεΐνες IN, MA και Vpr (Vpr: viral protein R: ιική πρωτεΐνη), που ονομάζεται σύμπλεγμα προενσωμάτωσης, μετακινείται προς τον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή. Ακολούθως, το σύμπλεγμα προενσωμάτωσης εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή μέσω πόρων.

Μετά την είσοδο στον πυρήνα, το διπλής έλικας ιικό DNA κόβεται με ειδικό τρόπο στο 5' και 3' άκρο και ενσωματώνεται στο χρωμοσωμικό DNA με τη βοήθεια του ιικού ενζύμου ενσωμάτωσης (IN). Κατά τη διάρκεια της ενσωμάτωσης τα δύο άκρα του ιικού DNA ενσωματώνονται στο DNA του κυττάρου ξενιστή ταυτόχρονα. Ως αποτέλεσμα της ενσωμάτωσης, δύο νουκλεοτίδια χάνονται από το κάθε άκρο το ιικού DNA. Η ενσωμάτωση του DNA του ιού στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή συμβαίνει τυχαία σε διάφορα σημεία.

Μετά την ενσωμάτωση το ιικό DNA μπορεί να υπάρχει είτε σε λανθάνουσα είτε σε παραγωγική κατάσταση, που εξαρτάται από γενετικούς παράγοντες του ιικού στελέχους, από τον τύπο του κυττάρου που έχει προσβληθεί και από την παραγωγή ειδικών πρωτεϊνών του ξενιστού κυττάρου. Η ενσωμάτωση του προϊκού DNA συμβαίνει κυρίως στα χρωμοσώματα των ενεργοποιημένων CD4⁺ T λεμφοκυττάρων, που αποτελούν το 93-95% των μολυσμένων κυττάρων. Η μόλυνση των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων είναι παραγωγική, εκτός από ένα μικρό ποσοστό HIV μολυσμένων μνημονικών CD4⁺ T λεμφοκυττάρων, όπου ο ιός παραμένει σε λανθάνουσα κατάσταση. Αυτά τα κύτταρα, μαζί με τα μολυσμένα μονοκύτταρα, μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα εξασφαλίζουν σταθερές δεξαμενές του HIV, που του επιτρέπουν να ξεφεύγει από το αμυντικό σύστημα και από την αντιρετροϊκή θεραπεία.

δ) Αντιγραφή προιού

Τώρα πλέον ο προιός είναι σαν ένα φυσιολογικό κυτταρικό γονίδιο, το οποίο αντιγράφεται κάθε φορά που το κυτταρικό DNA αντιγράφεται. Το ενσωματωμένο ιικό DNA αρχίζει να μεταγράφεται από την RNA πολυμεράση II του ξενιστή, δίνοντας αντίγραφα του γονιδιώματος του ιικού RNA. Το ιικό αυτό RNA πλήρους μήκους χρησιμοποιείται για τη σύνθεση των gag-pol, ενν πολυπρωτεϊνών, για τη σύνθεση ρυθμιστικών πρωτεϊνών, αλλά και ως γενετικό υλικό για το σχηματισμό των νέων ιών.

ε) Έκφραση των ιών

Ο ιός HIV χρησιμοποιεί το μεταγραφικό μηχανισμό των κυττάρων ξενιστών σε συνδυασμό με επιπρόσθετους μεταγραφικούς και μετα-μεταγραφικούς παράγοντες για την έκφρασή του. Το γονιδιωματικό ιικό RNA και τα ιικά mRNAs μεταφέρονται έξω από τον πυρήνα, όπου αρχίζει η μετάφραση των mRNAs για τη σύνθεση τριών πολυπρωτεϊνών α) την ενν (gp 160), που περιέχει τις gp120 και gp41, β) την gag (p55), που περιέχει τις πρωτεΐνες της μήτρας (MA/p17), του καψιδίου (CA/p24) και του πυρηνοκαψιδίου (NC/p27), και γ) την gag-pol (p160), που περιέχει πρωτεΐνες της μήτρας και του καψιδίου, την πρωτεάση (p10), την αντίστροφη μεταγραφάση (p66,p51) και την ιντεκράση (p32). Οι πρωτεΐνες p55 και p160 παράγονται από το ίδιο mRNA με μια διαδικασία τροποποίησης του «πλαισίου ανάγνωσης» του mRNA από τα ριβοσώματα. Οι πρωτεΐνες ενν (gp160) προωθούνται μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου προς τη συσκευή Golgi, για να σχηματιστούν οι γλυκοπρωτεΐνες gp120 και gp41 στην τελική γλυκοζυλιωμένη μορφή τους, πριν ενσωματωθούν στην πλασματική μεμβράνη του μολυσμένου κυττάρου.

στ) Αυτοσυγκρότηση των ιών και έξοδος από το κύτταρο

Η αυτοσυγκρότηση του ιού είναι μια διαδικασία κατά την οποία μορφοποιείται το ιοσωμάτιο. Οι gag και gag-pol πολυπρωτεΐνες σχετίζονται με την εσωτερική επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης και αλληλεπιδρούν με την gp41, που είναι παρούσα στη μεμβράνη. Το ιικό γονιδιωματικό RNA αλληλεπιδρά με το νουκλεοκαψιδιακό τμήμα της p55. Όταν οι p55 και p160 συγκεντρώνονται στην εσωτερική επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης, συσσωματώνονται και αρχίζουν να συγκροτούνται για το σχηματισμό του ιού.

Με τη συγκρότηση του πρωτεϊνικού πυρήνα με το συνδυασμό δύο μορίων ιικού RNA, δυο κυτταρικών tRNAs και μορίων αντίστροφης τρανσκριπτάσης τα οποία εγκλείονται σε πρωτεϊνικά καψίδια, αρχίζει η διαδικασία εξωκύτωσης του ιού μέσω εκβλαστωμάτων, κατά την οποία ο ιός αποκτά το μεμβρανικό περίβλημα, που περιέχει τις πρωτεΐνες gp120 και gp41 και απελευθερώνεται στον εξωκυττάριο χώρο. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας εξωκύτωσης ή λίγο μετά, γίνεται πρωτεολυτικό κόψιμο των πρόδρομων πρωτεϊνών p160 και p55 στις διάφορες υπομονάδες, με τη δράση μιας πρωτεϊνάσης και παράγεται η ώριμη μορφή του HIV. Τα απελευθερωμένα ιικά σωματίδια ολοκληρώνουν τον κύκλο αντιγραφής τους με ακόλουθη μόλυνση νέου κυττάρου ξενιστή. Η εξωκύτωση του ιού από τα CD4+ T λεμφοκύτταρα έχει ως συνέπεια τη λύση της μεμβράνης και τον κυτταρικό θάνατο. Αντίθετα, τα μολυσμένα μονοκύτταρα, μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα δεν καταστρέφονται κατά τη διάρκεια της απελευθέρωσης των ιών. Ο HIV μπορεί επίσης να προκαλέσει σύντηξη μεταξύ των κυττάρων. Αυτό συμβαίνει όταν η γλυκοπρωτεΐνη gp120, που προεξέχει από την πλασματική μεμβράνη ενός μολυσμένου κυττάρου, έρθει σε επαφή αναγνώρισης με τους υποδοχείς CD4 και χημειοκίνης ενός μη μολυσμένου κυττάρου. Έτσι δημιουργούνται πολυπύρηνα συγκύτια που σιγά-σιγά εκφυλίζονται. Στην καταστροφή των μολυσμένων κυττάρων πιστεύεται ότι συμμετέχουν ενεργά οι γλυκοπρωτεΐνες του ιού, αφού π.χ. αφαίρεση του ενός άκρου της gp41 έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της μολυσματικότητας.

II.2.B.4 Προκλήσεις για την ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού εμβολίου έναντι του ιού HIV

Η καλύτερη επιλογή για να σταματήσει η εξάπλωση της νόσου AIDS, είναι η ανάπτυξη ενός ασφαλούς, αποτελεσματικού, εύκολου να χορηγηθεί και οικονομικού εμβολίου, το οποίο θα εμποδίζει τη μόλυνση και την εξέλιξή της σε ασθένεια. Ωστόσο, είμαστε αρκετά μακριά από ένα αποτελεσματικό εμβόλιο έναντι του ιού HIV, εξαιτίας πολλαπλών εμποδίων και προκλήσεων.

Τα πιο αποτελεσματικά εμβόλια, μιμούνται τη φυσιολογική κατάσταση της μόλυνσης. Τα άτομα που αναρρώνουν από τις περισσότερες ασθένειες έχουν αποκτήσει ανοσία από επόμενες προσβολές. Η μόλυνση από HIV-1 και η εξέλιξη σε σύνδρομο ανοσοανεπάρκειας ακμάζει ακόμα και παρουσία αντισωμάτων στην κυκλοφορία, που κατευθύνονται ενάντια στις πρωτεΐνες του ιού. Η ανοσία μπορεί να συγκρατεί τον ιό υπό έλεγχο για κάποιο χρονικό διάστημα, αλλά σπανίως ξεπερνά τα 12 χρόνια.

Τα περισσότερα εμβόλια αποτρέπουν την ασθένεια, όχι τη μόλυνση. Τα εμβόλια της πολιομυελίτιδας και της γρίπης συγκρατούν τον ιό που παράγεται από τα μολυσμένα κύτταρα υπό έλεγχο, έτσι ώστε να αποφεύγονται βλάβες στον ξενιστή και στη συνέχεια ο ιός απομακρύνεται. Ο HIV-1 δεν υπακούει σε αυτό το μοντέλο, επειδή ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του ξενιστή και μπορεί να παραμένει σε λανθάνουσα κατάσταση για μεγάλες περιόδους. Η κάθαρση ενός ρετροϊού συνιστά ένα δύσκολο στόχο για ένα εμβόλιο. Κάθε αντίγραφο του ιού και κάθε μολυσμένο κύτταρο, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που βρίσκονται σε λανθάνουσα κατάσταση μόλυνσης, πρέπει να εξαλειφθούν από τον ξενιστή. Ωστόσο, ακόμα και χωρίς την πλήρη κάθαρση, ένα εμβόλιο για τον HIV μπορεί να ωφελήσει ένα μολυσμένο άτομο. Επιπλέον, ένα εμβόλιο που προκαλεί μείωση του ιικού φορτίου θα βοηθούσε στον έλεγχο της εξάπλωσης της μόλυνσης.

Τα περισσότερα εμβόλια εμποδίζουν τη μόλυνση από ιούς που εμφανίζουν μικρή μεταβλητότητα. Η αστάθεια του γονιδιώματός του διαφοροποιεί τον HIV-1 από τους περισσότερους ιούς για τους οποίους έχουν παρασκευαστεί επιτυχημένα εμβόλια. Με εξαίρεση τη γρίπη, για την οποία τα εμβόλια θα πρέπει να εναλλάσσονται περιοδικά, οι περισσότεροι ιοί που μπορούν να ελεγχθούν με ανοσοποίηση εμφανίζουν ελάχιστη μόνο μεταβλητότητα στη δομή. Ο HIV-1 εμφανίζει παραλλαγές στα περισσότερα ιικά αντιγόνα και ο ρυθμός αντιγραφής μπορεί να φτάνει τους 10^9 ιούς την ημέρα. Αυτή η ποικιλομορφία, μαζί με τον υψηλό ρυθμό αντιγραφής, επιτρέπουν την παραγωγή ιών με πολλαπλές μεταλλάξεις, κάποιες από τις οποίες επιτρέπουν τη διαφυγή από την ανοσία. Το γεγονός ότι έχουν βρεθεί σημαντικές διαφορές στις ακολουθίες των πρωτεϊνών του φακέλου σε ιούς που έχουν απομονωθεί από τον ίδιο ασθενή, σε διαφορετικές χρονικές στιγμές, υποδεικνύει ότι συμβαίνει παραλλαγή και ότι κάποια από τα έκδοχα του ιού αντιγράφονται, πιθανόν επειδή έχουν μάθει να διαφεύγουν της ανοσολογικής άμυνας του ξενιστή. Υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι αντίσωμα από ασθενείς σε προχωρημένο στάδιο AIDS δε μπορεί να εξουδετερώσει ιό που έχει απομονωθεί από αυτόν τον ασθενή, αλλά μπορεί να θανατώσει

άλλα στελέχη του HIV-1. Τα παραπάνω αποδεικνύουν ότι ο HIV-1 πράγματι ξεφεύγει από το ανοσοποιητικό σύστημα μεταλλάσσοντας τις πρωτεΐνες που στοχεύονται από το αντίσωμα.

Η πλειοψηφία των επιτυχημένων εμβολίων είναι εξασθενημένοι ή θανατωμένοι οργανισμοί. Η παρασκευή ενός εμβολίου εξασθενημένου ρετροϊού από ζωικούς ιούς μετασχηματισμένους ώστε να εμπεριέχουν HIV αντιγόνα είναι μία πιθανή πορεία. Ωστόσο, η χρήση ζωντανών εμβολίων στηρίζεται στην υπόθεση ότι η ανοσία που θα επαχθεί θα απομακρύνει τον ιό του εμβολίου από τον ξενιστή. Αυτό δεν συμβαίνει εύκολα για έναν ρετροϊό, ο οποίος ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του ξενιστή. Μία μαζική προσπάθεια εξέτασης θα απαιτείτο για να εξασφαλιστεί ότι ένα ζωντανό ρετροϊκό εμβόλιο θα είναι ασφαλές και δεν θα προκαλεί χρόνια μόλυνση στον ξενιστή.

Για τους περισσότερους ιούς, η συχνότητα έκθεσης στη μόλυνση είναι σπάνια ή εποχιακή. Σε πολλά άτομα υψηλού κινδύνου, ο ιός απαντάται συχνά και, δυνητικά, σε μεγάλες ποσότητες. Ένα εμβόλιο για το AIDS αναζητείται λοιπόν για να εμποδίσει τη μόλυνση ενάντια σε μία συνεχή επίθεση από τον ιό και/ή μαζικές δόσεις του ιού. Αυτό δεν συμβαίνει κανονικά με άλλους ιούς για τους οποίους η ανοσοποίηση έχει αποδειχθεί επιτυχής.

Τα περισσότερα εμβόλια προστατεύουν έναντι του μολυσμένου αναπνευστικού ή γαστρεντερικού συστήματος. Μαζί με τη συχνότητα έκθεσης στον HIV, η οποία μπορεί να είναι ασυνήθιστα υψηλή για ορισμένα άτομα υψηλού κινδύνου, υπάρχει επίσης το ζήτημα της πορείας του ιού. Η πλειοψηφία των επιτυχημένων εμβολίων προστατεύουν από ιούς που διέρχονται από το αναπνευστικό και γαστρεντερικό σύστημα. Αντίθετα, η πιο κοινή πορεία της μόλυνσης από τον HIV-1 είναι μέσω του γεννητικού συστήματος. Δεν είναι γνωστό κατά πόσο η ανοσία που εδραιώνεται από συμβατικές διαδικασίες εμβολιασμού θα προστατεύσει από τη μόλυνση μέσω αυτής της οδού. Παρόλο που η έλλειψη ενός απόλυτα συγγενικού ζωικού μοντέλου αποκλείει τη σε βάθος εξέταση για προστασία, προκαταρκτικές μελέτες εμβολίου με πρωκτική ή κολπική πρόκληση ανοσοποιημένων πρωτευόντων με HIV-SIV χμιαϊρικούς ιούς (SHIV) έδειξαν προστασία από την πορεία της μόλυνσης.

Η παρασκευή των περισσότερων εμβολίων μέσω κλινικών δοκιμών βασίζεται στα πειράματα σε ζώα. Η εξέταση ενός εμβολίου για ασφάλεια και αποτελεσματικότητα περιλαμβάνει κανονικά πρόκληση μόλυνσης ενός ζώου με τον ιό κάτω από συνθήκες παρόμοιες με αυτές που αφορούν τους ανθρώπους. Με αυτό τον τρόπο, καθορίζονται οι συσχετίσεις με την προστατευτική ανοσία. Για παράδειγμα, αν απαιτούνται υψηλοί τίτλοι CD8+ T κυττάρων και αντισώματος εξουδετέρωσης για την προστασία σε ένα ζώο, τότε η

CD8+ T κυτταρική ανοσία και το αντίσωμα πρέπει να μετρηθούν σε ανθρώπινες δοκιμές του εμβολίου. Μέχρι τώρα, οι μελέτες της HIV μόλυνσης και ασθένειας σε ζώα έχουν διαφωτίσει μόνο λίγα αδρά γεγονότα για τις ανοσολογικές αποκρίσεις που προστατεύουν από τη μόλυνση ή που εμποδίζουν την εξέλιξη της σε ασθένεια. Πολλά αποτελέσματα περιλαμβάνουν ένα συγκεκριμένο ιό σε ένα συγκεκριμένο ξενιστή και δεν είναι εύκολο να επεκταθούν σε καθολικά συμπεράσματα, επειδή βασίζονται σε παράγοντες του ξενιστή, όπως επίσης και σε σχέσεις μεταξύ των ανοσοποιητικών και μολυσματικών στελεχών του ιού. Ωστόσο, πειράματα έχουν δείξει ότι η παθητική ανοσοποίηση με αντισώματα που λαμβάνονται από μολυσμένους με HIV χιμπανζήδες προστατεύουν τους μακάκους από την πρόκληση μόλυνσης από SHIV στελέχη που φέρουν τη γλυκοπρωτεΐνη του φακέλου του HIV. Περαιτέρω ενδείξεις ότι τα αντισώματα μπορούν να εμποδίσουν τη μόλυνση προέρχονται από μελέτες στις οποίες μονοκλωνικά αντισώματα προστάτευσαν μακάκους από κοιλική πρόκληση μόλυνσης με SHIV. Σε όλες τις περιπτώσεις τα αντισώματα χρειάζεται να είναι παρόντα τη στιγμή της πρόκλησης. Χορήγηση αντισωμάτων μετά την πρόκληση της μόλυνσης δεν ήταν αποτελεσματική ως προς την παρεμπόδιση της.

Παρόλο που δεν υπάρχουν αναφορές μεγάλης επιτυχίας σε δοκιμές για ανθρώπινο εμβόλιο έναντι του HIV, η έρευνα σε αυτό το δύσκολο πεδίο παραμένει ενεργή. Αυτή τη στιγμή βρίσκονται σε εξέλιξη διάφορες δοκιμές εμβολίων, που περιλαμβάνουν δοκιμές με ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, πεπτίδια, DNA εμβόλια και ζωντανούς ιούς φορείς ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Παρά τις μαζικές προσπάθειες, η πρόοδος παραμένει αργή. Υπάρχει τώρα ελπίδα ότι ένα εμβόλιο μπορεί να προκύψει από τη συσσωρευμένη γνώση στις ανθρώπινες αποκρίσεις στα υποψήφια εμβόλια.

Είναι προφανές ότι η παρασκευή ενός εμβολίου για το AIDS δεν είναι μία απλή άσκηση στην κλασική έρευνα για τα εμβόλια. Απαιτείται περισσότερη έρευνα για να κατανοηθεί το πώς μπορεί να αντιμετωπιστεί αυτή η ιική επίθεση στο ανοσοποιητικό σύστημα. Ενώ πολλά έχουν γραφεί για το θέμα και έχει προταθεί μία μεγάλη κλίμακα σχεδίων, ο δρόμος προς ένα αποτελεσματικό εμβόλιο δεν είναι γνωστός. Το μόνο σίγουρο είναι ότι πρέπει όλα τα στοιχεία να αναλυθούν προσεκτικά και να εξεταστούν όλοι οι πιθανοί μηχανισμοί παραγωγής ανοσίας. Αυτή είναι μία από τις μεγαλύτερες προκλήσεις της δημόσιας υγείας της εποχής μας. Θα πρέπει να ξεκινήσει μία έντονη προσπάθεια συνεργασίας για να ανακαλυφθεί, να δοκιμαστεί και να παραδοθεί ένα ασφαλές και αποτελεσματικό εμβόλιο για το AIDS.

Κεφάλαιο 3^ο

Συνθετικοί Φορείς

Εισαγωγή

- Συνθετικοί Φορείς
- Είδη συνθετικών φορέων
- Συστήματα πολλαπλών αντιγονικών πεπτιδίων (Multiple Antigen Peptide System-MAPs)
- Διακλαδισμένα πολυπεπτίδια με σκελετό poly (Lys)
- Σύστημα πρόσδεσης πεπτιδίων TASPs (Template-Assembled Synthetic Proteins)
- Επαναλαμβανόμενοι Ολιγοπεπτιδικοί Φορείς (Sequential Oligopeptide Carriers- SOC_n)



3.1 Εισαγωγή

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, η χρήση συνθετικών πεπτιδίων, με διάφορες λειτουργίες, έχει γίνει όλο και περισσότερο δημοφιλής λόγω των ποικίλων πλεονεκτημάτων που προσφέρουν: (α) μπορούν να συντεθούν και να καθαριστούν εύκολα σε επαρκείς ποσότητες (β) μπορούν να μιμηθούν γραμμικούς και, μέχρι ένα σημείο, διαμορφωτικούς επιτόπους αντιγονικών πρωτεϊνών (γ) μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε δοκιμές στερεής φάσης αντί σύνθετων πρωτεϊνών (δ) η σχέση δομής/δραστηριότητας μπορεί να μελετηθεί λεπτομερώς, έτσι ώστε να μπορούν να σχεδιασθούν και να παρασκευαστούν νέα τροποποιημένα πεπτιδικά ανάλογα με βελτιωμένες ιδιότητες και (ε) μοιάζουν περισσότερο με μικρές επιφανειακές περιοχές μακρομοριακών συγκροτημάτων που είναι εκτεθειμένες και εμπλέκονται σε μοριακές αναγνώσεις.¹

Η διαθεσιμότητα συνθετικών πεπτιδικών επιτόπων που προέρχονται από ειδικά αντιγόνα, έχει ωθήσει ένα αριθμό ερευνών για την ανίχνευση και, σε ορισμένες περιπτώσεις, τη διάκριση και την αποσαφήνιση των ιδιοτήτων μιας απόκρισης αντισωμάτων.²⁻⁴ Μελέτες με μικρά αντιγονικά τμήματα μπορεί να βοηθήσουν ώστε να προταθούν νέες θεραπευτικές στρατηγικές για το σχεδιασμό, για παράδειγμα, τροποποιημένων πεπτιδικών επιτόπων ικανών να επηρεάσουν το ανοσοποιητικό σύστημα παρεμβαίνοντας σε διαφορετικά επίπεδα ή χρησιμοποιώντας μια στοχευμένη προσέγγιση φαρμάκων βασισμένη σε αντισώματα έναντι πεπτιδίων.⁵⁻⁷ Συνθετικοί πεπτιδικοί επίτοποι εμφανίζουν μεγάλες πιθανότητες παραγωγής αντισωμάτων και τελικά ανάπτυξης εμβολίων.⁸⁻¹⁰

Λόγω όμως του μικρού μεγέθους οι επίτοποι δεν μπορούν να είναι ανοσογονικοί από μόνοι τους. Για να προκαλέσουν την άμεση παραγωγή αντισωμάτων, πρέπει να συνδεθούν με πρωτεΐνες φορείς όπως την BSA (Bovine Serum Albumin: Αλβουμίνη Βοός), την OVA (ovalbumin: αλβουμίνη) και την KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin: αιμοκυανίνη).^{11,12} Αν και τέτοια συμπλέγματα είναι αποτελεσματικά στο να εγείρουν αντισώματα κατά τη διάρκεια

ανοσοποίησης, έχουν αρκετά μειονεκτήματα (i) παρατηρείται ανοσολογική απόκριση έναντι του πρωτεϊνικού φορέα και της σύνδεσης μεταξύ φορέα-πεπτιδίου,^{13,14} (ii) αλλαγή των βιολογικών ιδιοτήτων του επιτόπου και της ενεργής του διαμόρφωσης και (iii) ο επίτοπος, που αντιπροσωπεύει μόνο ένα μικρό τμήμα του συνολικού συμπλέγματος πρωτεΐνης φορέα-επιτόπου, μπορεί να οδηγήσει σε ένα μικρό κλάσμα ειδικών αντισωμάτων.^{8,12,15-17} Για να αποφευχθούν τα μειονεκτήματα που προέρχονται από τους πρωτεϊνικούς φορείς, τις τελευταίες δεκαετίες εμφανίστηκαν στη βιβλιογραφία συνθετικοί φορείς, όπως για παράδειγμα δενδριμερή που φέρουν διακλαδισμένα τμήματα, πολυμερικά υποστρώματα (multimeric core matrices) και υποστρώματα με ενσωματωμένες αναδιπλωμένες διατάξεις (templates with built-in folding devices), οι οποίοι περιλαμβάνουν πολλαπλές λειτουργίες για την πρόκληση ανοσολογικής απόκρισης έναντι ειδικής θέσης κατά το σχεδιασμό εμβολίου.^{18,19}

3.2 Συνθετικοί Φορείς

Ο σχηματισμός ενός αποτελεσματικού ανοσογόνου που θα μπορούσε να επάγει μια ισχυρή ανοσολογική απόκριση, θα πρέπει να ενσωματώνει στον ίδιο φορέα Β κυτταρικούς επιτόπους, οι οποίοι μιμούνται την τρισδιάστατη διαμόρφωση του αντιγόνου και Τ κυτταρικούς επιτόπους που προκύπτουν από την επεξεργασμένη πρωτεΐνη.^{20,21} Για να επιτύχουμε επίσης ενισχυμένη και παρατεταμένη χυμική και κυτταρική ανοσολογική απόκριση τα ανοσογόνα πρέπει να χορηγηθούν σε συνδυασμό με ανοσοενισχυτικά (adjuvants) που έχουν ανοσοδιεγερτική δραστηριότητα χωρίς παρενέργειες.²² Ανάμικτοι Τ-κυτταρικοί επίτοποι, που δεσμεύονται σε ένα ευρύ φάσμα ισοτυπικών και αλλοτυπικών μορφών ανθρώπινων MHC, θα πρέπει επίσης να ενσωματωθούν.²³ Επομένως, ο λογικός σχεδιασμός ενός ιδανικού πολυσθενούς ανοσογονικού συμπλέγματος και συνεπώς ενός αποτελεσματικού ανθρώπινου εμβολίου θα πρέπει να συνδυάζει στον ίδιο συνθετικό φορέα διαφορετικά πεπτίδια με διάφορες λειτουργίες, που είναι Β και Τ κυτταρικοί επίτοποι, ανοσοενισχυτικά και ανάμικτοι Τ-κυτταρικοί επίτοποι.

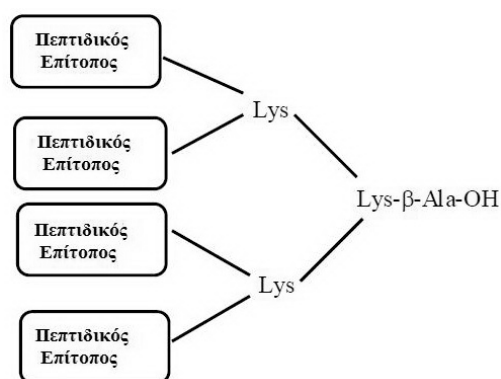
3.3 Είδη συνθετικών φορέων

Το σύστημα πολλαπλών αντιγονικών πεπτιδίων (Multiple Antigen Peptide System-MAPs), τα διακλαδισμένα πολυπεπτίδια με σκελετό poly (Lys) (XAK, AXK, SAK και ASK) και το σύστημα πρόσδεσης πεπτιδίων (Template-Assembled Synthetic Proteins-TASPs) είναι λίγα παραδείγματα συνθετικών φορέων.

3.3.1 Συστήματα πολλαπλών αντιγονικών πεπτιδίων (Multiple Antigen Peptide System-MAPs)

Το σύστημα πολλαπλών αντιγονικών πεπτιδίων (MAPs), που προτάθηκε από τον Tam et al,²⁴⁻²⁶ αποτελείται από ένα πυρήνα ολιγολυσίνης που σχηματίζεται από ένα έως τέσσερα διαδοχικά επίπεδα καταλοίπων λυσίνης πάνω στα οποία μπορούν να δεσμευτούν πολλαπλά αντίγραφα του αντιγόνου (Σχήμα 3.1).

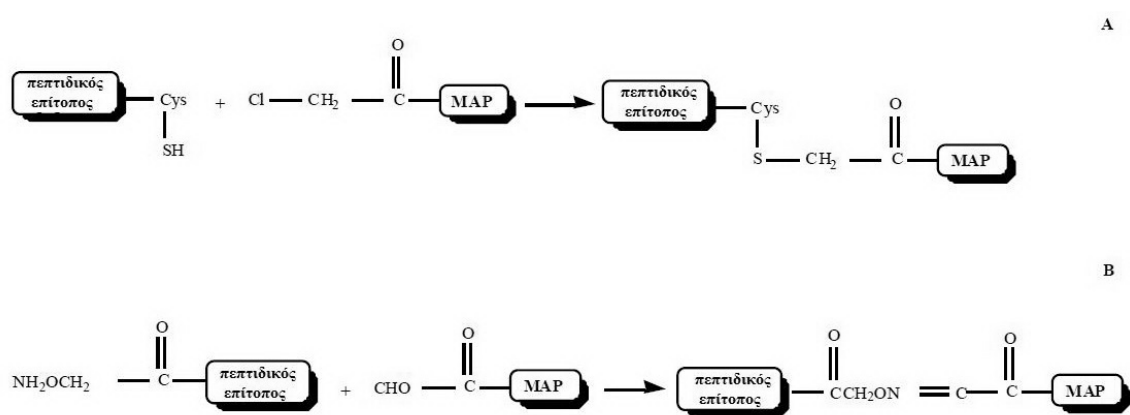
Τα συστήματα MAP μπορούν να συντεθούν είτε με άμεση ή έμμεση μέθοδο.²⁷ Σύμφωνα με την άμεση μέθοδο το όλο μόριο συντίθεται με τη μέθοδο της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση (SPPS: Solid Phase Peptide Synthesis),²⁸⁻³⁰ όμως εμφανίζονται δυσκολίες κατά τον καθαρισμό και χαρακτηρισμό του μορίου γι' αυτό και η μέθοδος είναι λιγότερο προτεινόμενη αν το τελικό μακρομόριο έχει M.B μεγαλύτερο από 4KDa, εξαιτίας των πολυάριθμων παραπροϊόντων.^{31,32}



Σχήμα 3.1 Σχηματική αναπαράσταση ενός τετρασθενούς Συστήματος Πολλαπλών Αντιγονικών Πεπτιδίων (MAPs)¹

Κατά την έμμεση μέθοδο τα MAPs συντίθενται με συμπύκνωση των επιμέρους τμημάτων που έχουν συντεθεί και καθαριστεί ξεχωριστά πριν την τελική τους σύνδεση. Αυτό έχει μεγάλη επίδραση στον καθαρισμό, διότι η δομή που προκύπτει διαφέρει σημαντικά στις φυσικοχημικές ιδιότητές της από τις επιμέρους μονάδες και επομένως όλα τα παραπροϊόντα διαχωρίζονται εύκολα.³³ Κατά τη συμπύκνωση τμημάτων δύο γενικές στρατηγικές μπορούν να εφαρμοστούν. Η πρώτη στρατηγική είναι η κλασική συμπύκνωση πλήρως προστατευμένων πεπτιδίων σε οργανικό διάλυμα. Η χαμηλή απόδοση, οι αργές αντιδράσεις σύζευξης, η χαμηλή διαλυτότητα των πλήρως προστατευμένων τμημάτων και ο κίνδυνος ρακεμοποίησης είναι μερικά από τα κυριότερα προβλήματα της εν λόγω στρατηγικής.³⁴ Η δεύτερη στρατηγική περιλαμβάνει συμπύκνωση απροστάτευτων τμημάτων, συνήθως

συντεθειμένα με SPPS, σε υδατικό διάλυμα υπό ήπιες συνθήκες, με βάση τη χημεία του θείου ή την αντίδραση μεταξύ ασθενούς βάσης-αλδεϋδης. Η θειοαλκυλίωση είναι μια πολύ δημοφιλής στρατηγική στη χημεία των πρωτεϊνών, απαιτείται η προσθήκη της χλωροακέτυλο ομάδας στο σύστημα MAP και ακολουθεί σύζευξη με τον καθαρισμένο επιτόπο, μέσω της σουλφιδρυλομάδας της παράπλευρης αλυσίδας μιας επιπλέον κυστεΐνης που προστέθηκε στο N-τελικό άκρο του επιτόπου^{35,36} (Σχήμα 3.2). Σύμφωνα με την αντίδραση ασθενούς βάσης-αλδεϋδης ένα σύστημα MAP που φέρει αλδεϋδική ομάδα χρησιμοποιείται για να συνδεθεί με απροστάτευτα αντίγραφα του επιτόπου που περιέχουν μια ασθενή πυρηνόφιλη βάση όπως αμινοξύ, στο N-τελικό άκρο τους, για να σχηματίσουν τα MAP δένδριμερή (Σχήμα 3.2).^{37,38}



Σχήμα 3.2 Γενικό σχήμα για τη σύνδεση απροστάτευτων πεπτιδικών τμημάτων στο σύστημα πολλαπλών αντιγονικών πεπτιδίων (MAPs). Σχηματισμός δεσμών A) Θειοαλκυλο B) Οξίμης¹

Συστήματα MAP, που περιέχουν τον ανοσοεπικρατή B κυτταρικό επίτοπο και ένα Th επίτοπο του παράσιτου της ανθρώπινης ελονοσίας, καθώς και συστήματα που αποτελούνται από τέσσερα αντίγραφα του κύριου εξουδετερωτικού επιτόπου του ιού HIV-1 εμφάνισαν ενισχυμένη ανοσογονικότητα σε κάποιες περιπτώσεις και αποτελούν παραδείγματα εφαρμογών των MAP συστημάτων άξια αναφοράς.³⁹⁻⁴²

Σε σύγκριση με τη συμβατική μέθοδο, όπου ένα ανοσογόνο πεπτίδιο προσδένεται σε μια πρωτεΐνη φορέα, τα MAP συστήματα είναι χημικά σαφή και ανοσολογικά εστιασμένα, αλλά συχνά προκαλούν κατώτερες ανοσολογικές αποκρίσεις. Αυτό το αποτέλεσμα αποδόθηκε στη μη-κανονική δευτεροταγή δομή του πυρήνα της ολιγολυσίνης. Ως αποτέλεσμα αυτής της τυχαίας διαμορφωτικής ποικιλίας των MAP συστημάτων, ένας μεγάλος αριθμός διαμορφωτικών B- κυτταρικών επιτόπων μπορούν να παραχθούν και ως εκ τούτου η ανοσολογική απόκριση θα μπορεί να στερείται ειδικότητας. Για παράδειγμα,

διαπιστώθηκε ότι το σύστημα MAP ήταν αποτελεσματικό αντιγόνο στην ELISA, εκτός όταν το πεπτίδιο αντιστοιχούσε σε ένα καρβοξυ-τελικό επίτοπο, ενώ στην περίπτωση ενός αμινο-τελικού πεπτιδίου το MAP σύστημα δεν ήταν ανοσογόνο συγκρινόμενο με το αντίστοιχο σύμπλεγμα με πρωτεΐνη.⁴³⁻⁴⁶ Για το σκοπό αυτό οι έμμεσες τεχνικές σύνδεσης, εισάγουν συνδέσεις οι οποίες πιστεύεται ότι είναι πιθανοί υποψήφιοι για την παραγωγή άσχετων αντισωμάτων έναντι του επιτόπου.¹⁹

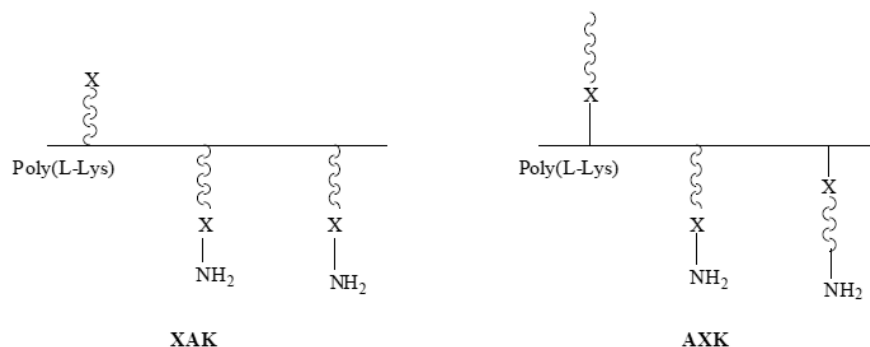
3.3.2 Διακλαδισμένα πολυπεπτίδια με σκελετό poly(Lys)

Τα διακλαδισμένα πολυπεπτίδια του τύπου poly(An-Km), είναι μια άλλη τάξη συνθετικών φορέων που αναπτύχθηκαν από τον Sela et al.,^{47,48} με σκοπό να αντικαταστήσουν τις πρωτεΐνες φορείς. Αυτά τα πολυμερή, που έχουν M.B.~100KDa περίπου, χαρακτηρίζονται από μια αναλογία Lys/Ala ~ 1/20. Τα αντιγονικά/ανοσογονικά πεπτίδια συντέθηκαν με SPPS και προσδέθηκαν ομοιοπολικά στις N^εH₂-ομάδες του συνθετικού πολυμερούς με χρήση γλουταραλδεϋδης. Ωστόσο αυτός ο τύπος των μακρομορίων οδήγησε στην παραγωγή υψηλών τίτλων αντισωμάτων.^{49,50}

Στο εργαστήριο του Hudecz et al.,^{51,52} συντέθηκαν διαφορετικοί τύποι διακλαδισμένων πολυπεπτιδίων αντί των συνθετικών πολυμερών του Sela, για να μελετήσουν συστηματικά τη συσχέτιση μεταξύ δομικών και λειτουργικών ιδιοτήτων. Τα πολυπεπτίδια είχαν γενικό τύπο poly[Lys-(X_i-DL-Ala_m)] (XAK) και poly[Lys-(DL-Ala_m-X_i)] (AXK) όπου $i < 1$, $m \sim 3$, και X = His, D-His, Lys, D-Lys, Glu, D-Glu, Ile, Leu, D-Leu, Phe, D-Phe, Tyr, Pro ή Ser. Αυτά τα πολυπεπτίδια βασίζονται σε ένα poly(L-Lys) σκελετό και περιλαμβάνουν κοντές παράπλευρες αλυσίδες που αποτελούνται από τρία κατάλοιπα DL-Ala και ένα άλλο κατάλοιπο αμινοξέος (X), είτε στο τέλος της διακλάδωσης (XAK), είτε στη θέση δίπλα στο σκελετό polyLys (AXK) (Σχήμα 3.3).⁵³⁻⁵⁵ Αν και τα αποτελέσματα ήταν ελπιδοφόρα, η διαλυτότητα ορισμένων υδρόφοβων συμπλεγμάτων περιορίσε τη δυνατότητά τους για θεραπευτικούς σκοπούς. Λαμβάνοντας υπόψη αυτές τις παρατηρήσεις, σχεδίασαν και σύνθεσαν μια νέα κατηγορία διακλαδισμένων πολυπεπτιδίων που ενσωμάτωναν κατάλοιπα σερίνης/θρεονίνης στις διακλαδώσεις.⁵⁶ Για να βελτιώσουν τη διαλυτότητα στο νερό η Ser προσδέθηκε στο τέλος του ολιγο (DL-Ala) ή απευθείας στο σκελετό polyLys (SAK και ASK). Ένα τροποποιημένο πεπτίδιο ([NLe¹¹]-9-22) που αντιπροσωπεύει ένα ανοσοεπικρατή B κυτταρικό επίτοπο της πρωτεΐνης HSV-1GD (HSV: Herpes Simplex Virus, γλυκοπρωτεΐνη D του απλού ιού έρπη) προσδέθηκε σε SAK μέσω θειοεστερικού δεσμού, είναι ένα

αντιπροσωπευτικό παράδειγμα των διακλαδισμένων πολυπεπτιδίων με poly(Lys) σκελετό.^{57,58}

Η πολυμερική φύση αυτών των ενώσεων, η ασαφής σύνθεση (ειδικά στην περίπτωση μη ελεγχόμενου πολυμερισμού), η αλλαγή της δομής του μορίου που προσδένεται και η απώλεια της επαναληψιμότητάς τους κατά την προετοιμασία τους περιορίζουν τη χρήση τους.



Σχήμα 3.3 Διακλαδισμένα πολυπεπτιδία XAK και AXK με σκελετό poly(L-Lys) (-), τα οποία περιέχουν κοντές πλευρικές αλυσίδες τριών καταλοίπων DL-Ala (---). Όπου X: Glu, Lys, Leu, Ile, Phe, Pro, His, Tyr, Ser¹

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

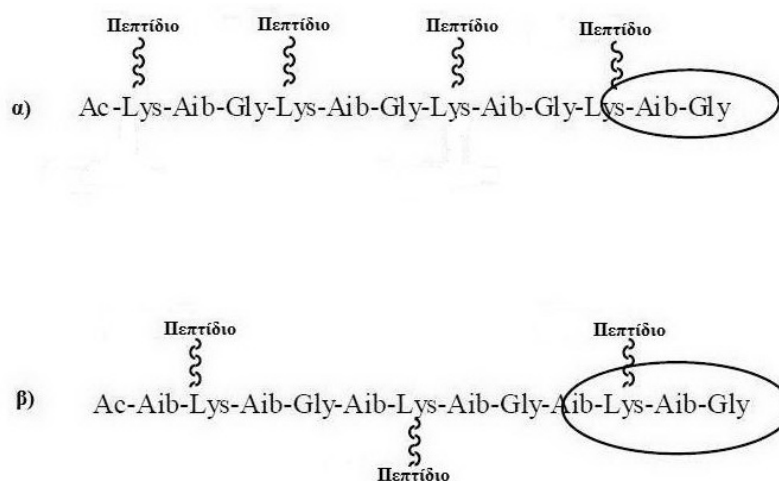
Με σκοπό να ξεπεραστεί το πρόβλημα της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών, ο Mutter et al,⁵⁹ ανέπτυξε το σύστημα πρόσδεσης πεπτιδίων (TASPs: Template-Assembled Synthetic Proteins), το οποίο βασίζεται στην πρόσδεση πεπτιδίων με προκαθορισμένη δομή σε μια δομική μονάδα. Το σύστημα TASP χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς ως μιμητικό επιφανείας. Αναπτύχθηκε κυρίως για το σχεδιασμό de novo πρωτεϊνών και δεν είχε ευρείες εφαρμογές σε ανοσοποιήσεις.

3.4 Επαναλαμβανόμενοι Ολιγοπεπτιδικοί Φορείς (Sequential Oligopeptide Carriers-SOC_n)

Μια νέα κατηγορία συνθετικών φορέων με προκαθορισμένη δευτεροταγή δομή που ονομάζονται Επαναλαμβανόμενοι Ολιγοπεπτιδικοί Φορείς (Sequential Oligopeptide Carriers-SOC_n), εισήχθη με στόχο τη βελτίωση της παρουσίας του επιτόπου καθώς και την ανασύσταση αντιγονικών και ανοσογονικών πρωτεϊνικών μιμητικών.⁶⁰

Οι φορείς SOC_n, είναι στερικά συγκεκριμένοι και χαρακτηρίζονται από λίγες διαμορφώσεις σε διάλυμα και περιλαμβάνουν ένα αμινοξύ το οποίο είναι ανάλογο της

αλανίνης, το α-άμινο ισοβουτυρικό οξύ (C^{α} -τετραυποκατεστημένος) που είναι γνωστό ότι ευνοεί τις ελικοειδείς διαμορφώσεις λόγω των στερικών παρεμποδίσεων που επάγονται από τη δεύτερη μεθυλομάδα στο C^{α} -άτομο.⁶¹ Επιπλέον, δεδομένου ότι το Aib, δεν ανήκει στα φυσικά κωδικοποιούμενα αμινοξέα, πεπτίδια που περιέχουν Aib, μπορεί να είναι πιο ανθεκτικά στην ενζυματική διάσπαση. Ο φορέας SOC_n -I, σχηματίζεται από το επαναλαμβανόμενο μοτίβο (-Lys-Aib-Gly-), ενσωματώνοντας επίσης τα αμινοξέα: λυσίνη (Lys) για την πρόσδεση των αντιγονικών/ ανοσογονικών επιτόπων στην παράπλευρη $N^{\epsilon}H_2$ -ομάδα της και τη γλυκίνη (Gly) για το μικρό στερεοχημικό όγκο της.⁶² Εναλλακτικά, ο φορέας SOC_n -II, ο οποίος σχηματίζεται από το επαναλαμβανόμενο τετραπεπτίδιο (-Aib-Lys-Aib-Gly-), συντέθηκε με σκοπό να μελετηθεί (α) η σημασία της συμβολής του δεύτερου καταλοίπου Aib, στη συνολική διαμόρφωση του φορέα (β) η επίδραση της θέσης του επιτόπου που είναι προσδεδεμένος στην παράπλευρη $N^{\epsilon}H_2$ -ομάδα της Lys, κατά μήκος του σκελετού του φορέα κατά την αναγνώριση από το αντίσωμα (**Σχήμα 3.4**).⁶³



Σχήμα 3.4 Σχηματική παρουσίαση Επαναλαμβανόμενων Ολιγοπεπτιδικών Φορέων (SOC_n), όπου $n = 2-7$. α) SOC_n -I: (Lys-Aib-Gly) $_n$, β) SOC_n -II: (Aib-Lys-Aib-Gly) $_n$ ¹

Μια σημαντική κατευθυντήρια γραμμή στο σχεδιασμό SOC_n φορέων ήταν να δημιουργηθούν φορείς με προκαθορισμένη τρισδιάστατη δομή, έτσι ώστε το προσδεδεμένο αντιγονικό πεπτίδιο να πετύχει ένα καθορισμένο προσανατολισμό στο χώρο. Η κανονικότητα της δευτεροταγούς δομής του φορέα SOC_n , έχει στόχο να επάγει στους αντιγονικούς/ανοσογονικούς επιτόπους τη διατήρηση της φυσικής "ενεργής" τους διαμόρφωσης, χωρίς να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους ή με τον φορέα. Επιπλέον, η απουσία διαμορφωτικών περιορισμών και στερικών παρεμποδίσεων των σχηματισμένων

συμπλεγμάτων ευνοεί μια βέλτιστη αναγνώριση αντισώματος και προκαλεί ισχυρές ανοσολογικές αποκρίσεις για ειδικές περιοχές.

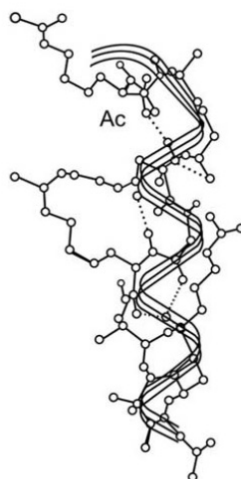
Η σύνθεση των SOC_n-συμπλεγμάτων πραγματοποιείται σύμφωνα με τις αρχές της βήμα προς βήμα πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση. Αξιοποιώντας την πληθώρα των αμινο-προστατευτικών ομάδων και με την εφαρμογή μιας ορθογωνικής στρατηγικής προστασίας, είναι εφικτό να σχηματίσουμε SOC_n-συμπλέγματα με πανομοιότυπα ή ενναλλασσόμενα μοτίβα ABAB, όπου A και B αντιπροσωπεύουν διαφορετικούς επιτόπους, όπως για παράδειγμα δύο τύπους B κυτταρικών επιτόπων, B και T-κυτταρικοί επίτοποι ή CD4⁺ και CD8⁺ T-κυτταρικοί επίτοποι. Δύο N-προστατευτικές ομάδες, οι Boc- και Fmoc-, απαιτούνται για την πρόσδεση πανομοιότυπων αντιγράφων επιτόπων στις N^εH₂-ομάδες της Lys του φορέα σε Pam ρητίνη, ενώ ένα ορθογωνικό σύστημα με τρεις N-προστατευτικές ομάδες όπως Boc-, Fmoc- και Alloc-(σε ρητίνη Pam) ή Fmoc-, Alloc- και Mtt- (σε ρητίνη Wang) είναι απαραίτητο για την πρόσδεση δύο διαφορετικών επιτόπων στον φορέα.

Μετά την ολοκλήρωση της βήμα προς βήμα σύνθεσης του φορέα SOC_n, πάνω στη ρητίνη, κάθε ένας από τους επιτόπους ενώνεται βήμα προς βήμα στην κατάλληλη παράπλευρη αλυσίδα της Lys. Τα SOC_n-συμπλέγματα αποκόπτονται από τη ρητίνη με ισχυρό οξύ (HF, TFA, AcOH), ανάλογα με τη χημική φύση της ρητίνης, παρουσία μορίων-παγίδων (scavengers). Στη συνέχεια, τα συμπλέγματα κατεργάζονται με υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 2M, λυοφιλοποιούνται και καθαρίζονται με διαπίδυση χρησιμοποιώντας μεμβράνες με κατάλληλους πόρους. Η μέγιστη καθαρότητα πετυχαίνεται χρησιμοποιώντας ημι-παρασκευαστική χρωματογραφία ανάστροφης φάσης HPLC εφαρμόζοντας βαθμωτή ή ισοκρατική έκλυση με διαλύτες A, H₂O/0.1% TFA και B, CH₃CN/0.1% TFA. Ο χαρακτηρισμός των SOC_n-συμπλεγμάτων πραγματοποιείται με ανάλυση αμινοξέων, με φασματομετρία μάζας ESI-MS (Liquid Chromatography/Electron Spray Ιονισμού) και ¹H-NMR φασμασκοπία.

Η συγκλίνουσα στρατηγική εφαρμόζεται επίσης για την προετοιμασία των SOC_n-συμπλεγμάτων. Σύμφωνα με την έμμεση μέθοδο κάθε δομική μονάδα του συμπλέγματος συντίθεται και καθαρίζεται χωριστά πριν την τελική τους σύνδεση. Όταν η σύνθεση και ο καθαρισμός του SOC_n και των επιτόπων ολοκληρώνεται, τα καθαρισμένα συστατικά συνδέονται μεταξύ τους μέσω χημειοεκλεκτικής αντίδρασης (chemoselective ligation). Με την ενσωμάτωση μίας α-αλογονοακετυλο ομάδας στις N^εH₂-ομάδες της Lys του SOC_n-I φορέα, είναι εφικτό να συνδέσουμε επιτόπους που φέρουν ένα κατάλοιπο Cys στο C-τελικό άκρο μέσω θειοαιθερικού δεσμού. Σύμφωνα με μια άλλη έμμεση μέθοδο το Boc-αμινόξυ

οξικό οξύ ενώνεται στις παράπλευρες ομάδες της Lys-N^εH₂ του φορέα, ενώ μια αλδεϋδική ομάδα δημιουργείται στο C-τελικό άκρο του κάθε επιτόπου με την προσθήκη μιας Lys και μιας Ser στην Lys-N^εH₂ ακολουθούμενη από οξείδωση με NaIO₄. Μετά την αποκοπή της Boc προστατευτικής ομάδας του αμινοξικού οξέος του φορέα, οι επίτοποι ενώνονται στο φορέα με δεσμό οξίμης.^{53,55,64,65}

Διαμορφωτική ανάλυση του SOCn-I φορέα με ¹H-NMR πειράματα και μοριακή δυναμική αποκάλυψε ότι ο φορέας υιοθετεί μια παραμορφωμένη 3₁₀ έλικα με ελαφρώς κυρτό άξονα και η rms απόκλιση μεταξύ κάθε ζεύγους ατόμων μιας κανονικής 3₁₀-έλικας και του SOCn-I φορέα είναι μικρότερη από 1.4Å (Σχήμα 3.5). Ο δομικός χαρακτηρισμός του SOCn-II φορέα με ¹H-NMR, CD και FTIR πειράματα έδειξε ότι ο φορέας εμφανίζει μια σαφή 3₁₀ έλικα, συγκρινόμενη με την έλικα του SOCn-I φορέα περίπου ίδιου μήκους.



Σχήμα 3.5 Δομή του SOCn φορέα¹

Τα SOCn-συμπλέγματα υποβλήθηκαν σε ¹H-NMR φασματοσκοπία με τη βοήθεια COSY, HOHAHA και NOESY πειραμάτων. Διαπιστώθηκε ότι οι φορείς SOCn διατηρούν την ελικοειδή δομή τους, ακόμη και μετά την πρόσδεση των πεπτιδικών επιτόπων στις παράπλευρες N^εH₂-ομάδες της Lys. Το σημαντικότερο είναι ότι οι προσδεδεμένοι επίτοποι δεν αλληλεπιδρούν μεταξύ τους ή με το φορέα διατηρώντας έτσι τα τοπολογικά χαρακτηριστικά τους. Στην πραγματικότητα, οι πεπτιδικοί επίτοποι είναι διαθέσιμοι είτε για μια καλύτερη αναγνώριση από αντισώματα σε ανοσοχημικές τεχνικές ή για μια σωστή "επεξεργασία" από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα για την έναρξη μιας ισχυρής και ειδικής ανοσολογικής απόκρισης.⁶⁶⁻⁶⁹

Αρκετές βιολογικές μελέτες με SOC_n-σύμπλοκα έχουν γίνει είτε ως αντιγονικά υποστρώματα σε ανοσοχημικές μελέτες είτε ως ανοσογόνα με καλά αποτελέσματα.

Αντιγονικοί επίτοποι προερχόμενοι από τον υποδοχέα ακετυλοχολίνης (AChR) της νευρομυϊκής σύναψης και το αντιγόνο Sm, συνδέθηκαν σε τέσσερα και πέντε αντίγραφα στον φορέα SOC_n και χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση αυτοαντισωμάτων σε ασθενείς με βαριά μυασθένεια και Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο (ΣΕΛ), αντίστοιχα. Αξιόπιστες και επαναλήψιμες διαγνωστικές δοκιμασίες αναπτύχθηκαν με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα [44-48].

Υψηλοί τίτλοι αντισωμάτων παράχθηκαν σε ανοσοποιημένα ζώα με SOC_n-συμπλέγματα, τα οποία περιελάμβαναν επιτόπους από τα αυτοαντιγόνα La/SSB και Sm (κύριους στόχους του συνδρόμου Sjogren και ασθενών με ΣΕΛ αντίστοιχα). Τα παραχθέντα αντισώματα αναγνωρίζουν όχι μόνο τα συμπλέγματα, αλλά και όμοιες πρωτεΐνες. Τα ανοσοπαθολογικά ευρήματα στα νεφρά των ανοσοποιημένων ζώων με τα συμπλέγματα SOC_n-Sm, δείχνουν τραυματισμό ιστού που μεσολαβείται από ανοσολογική απόκριση επάγοντας νεφρική νόσο που συνήθως εμφανίζεται σε ασθενείς με Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο. Στην πραγματικότητα, το σύμπλεγμα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τη διαμόρφωση ενός ζωικού μοντέλου ασθένειας.⁷⁰⁻⁷⁵

Κεφάλαιο 4^ο

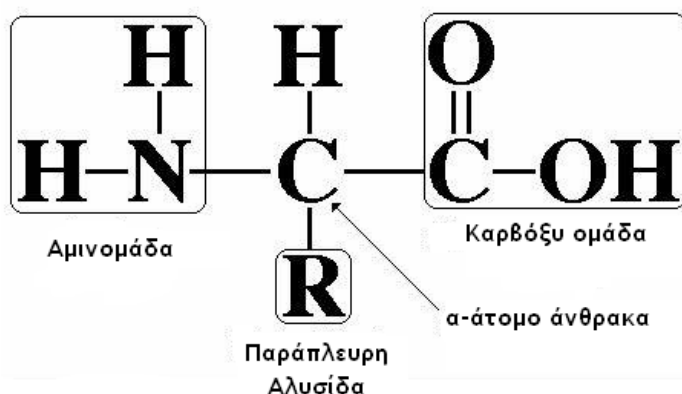
Αρχές Πεπτιδικής Σύνθεσης

- Αμινοξέα- Πεπτίδια- Πρωτεΐνες
- Πεπτιδικός Δεσμός
- Στερεοχημεία του πεπτιδικού δεσμού
- Σύντομη ιστορία της Χημείας των πεπτιδίων
- Πεπτιδική Σύνθεση
- Σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση
- Πολυμερικά υποστρώματα (ρητίνες) στη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση
- Προστατευτικές ομάδες
- Αμινοπροστατευτικές ομάδες
- Προστασία των παράπλευρων δραστικών ομάδων των αμινοξέων
- Ορθογωνική Προστασία
- Μέθοδοι σχηματισμού πεπτιδικού δεσμού
- Καρβοδιϊμίδια
- Φωσφονικά και ουρονικά παράγωγα
- Χειρικότητα στην πεπτιδική σύνθεση
- Ανεπιθύμητες Αντιδράσεις κατά τη διάρκεια της πεπτιδικής σύνθεσης
- Αποκοπή πεπτιδίου από τη ρητίνη (Fmoc-στρατηγική)

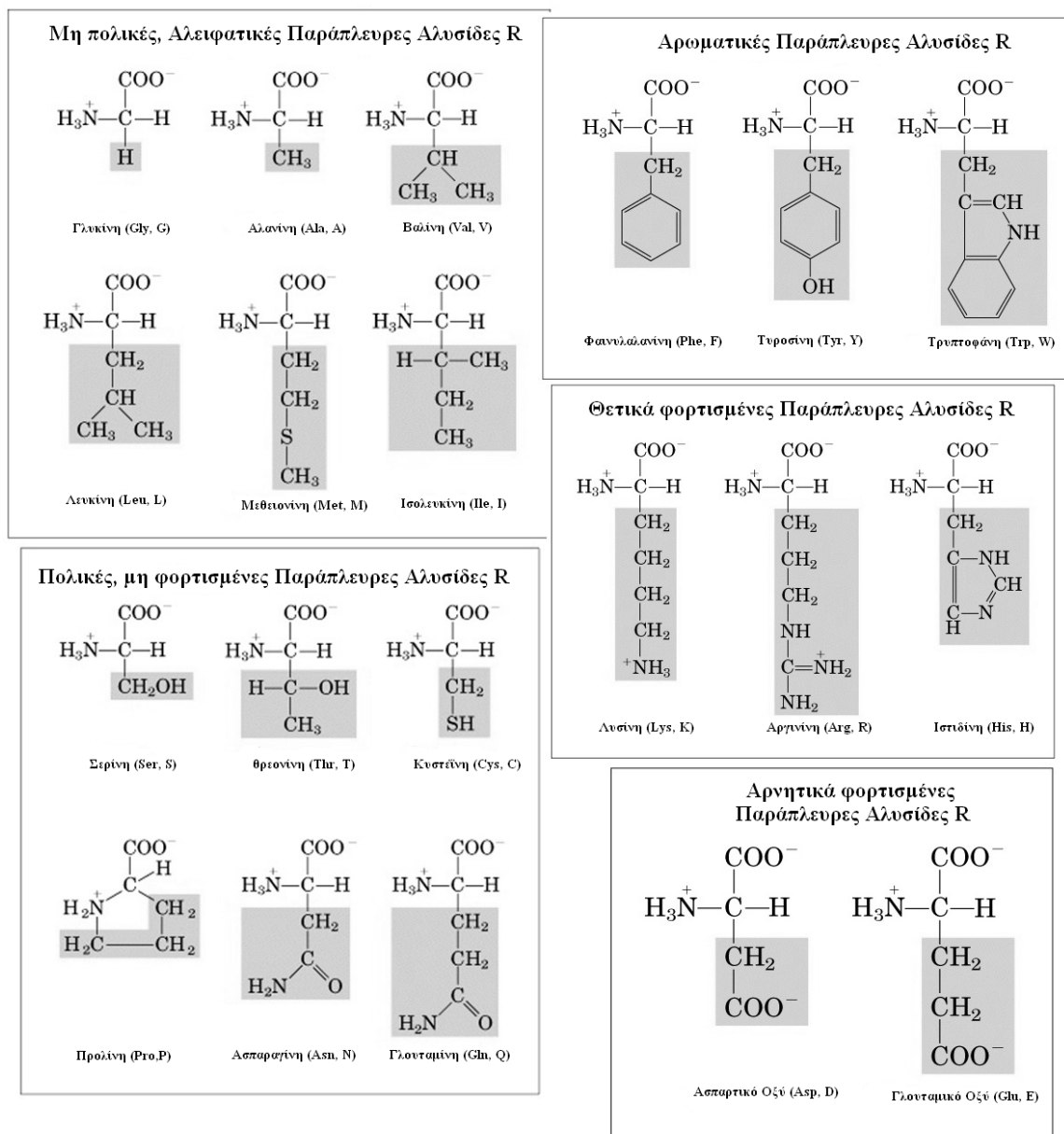


4.1 Αμινοξέα- Πεπτίδια- Πρωτεΐνες

Τα **αμινοξέα** αποτελούν τις δομικές μονάδες των πρωτεϊνών και των πεπτιδίων. Αποτελούνται από ένα άτομο άνθρακα στο οποίο συνδέονται μια καρβοξυλομάδα ($-\text{COOH}$), μια αμινομάδα ($-\text{NH}_2$), ένα άτομο υδρογόνου και μια αποκαλούμενη παράπλευρη αλυσίδα R, η οποία είναι διαφορετική για κάθε αμινοξύ (Σχήμα 4.1). Τα φυσικά αμινοξέα που συναντώνται στις πρωτεΐνες είναι είκοσι (Σχήμα 4.2).



Σχήμα 4.1 Δομή ενός α-αμινοξέος



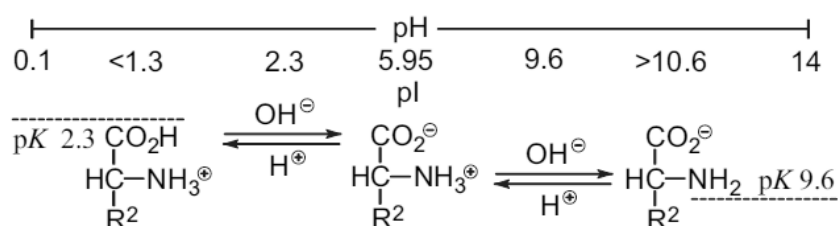
Σχήμα 4.2 Τα 20 φυσικά αμινοξέα

Τα αμινοξέα περιέχουν μια όξινη (-COOH) και μια βασική (-NH₂) λειτουργική ομάδα και μπορούν να βρίσκονται σε πρωτονιωμένη ή μη μορφή. Ο βαθμός ιοντισμού της λειτουργικής ομάδας εξαρτάται από δύο παραμέτρους: τη χημική της φύση και το pH του περιβάλλοντος. Καθώς το pH μεταβάλλεται, η ομάδα προσλαμβάνει ή χάνει ένα πρωτόνιο. Η χημική σύσταση της ομάδας καθορίζει σε ποιά σχετικά μικρή περιοχή (εύρος) του pH θα συμβεί αυτό. Για πρακτικούς σκοπούς αυτή η περιοχή ορίζεται καλύτερα από το λογάριθμο της σταθεράς διάστασης της ομάδας pK_a και η τιμή της αντιστοιχεί σε pH όπου τα μισά μόρια είναι πρωτονιωμένα και τα άλλα μισά μη-πρωτονιωμένα (**Πίνακας 4.1**).

Πίνακας 4.1 Τιμές pKa και pI των αμινοξέων

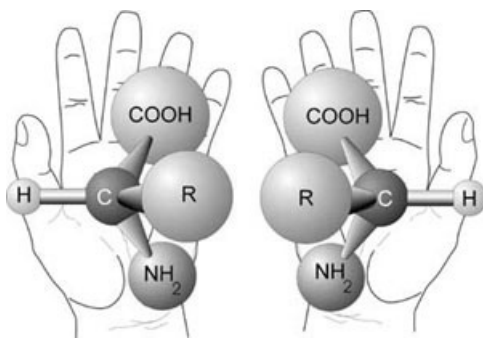
Αμινοξύ	pKa α-COOH	pKa α-NH ₃ ⁺	pKa Παράπλευρης Αλυσίδας	M.B	pI Ισοηλεκτρικό σημείο
Γλυκίνη, Gly	2.34	9.6	-	75.06	5.97
Αλανίνη, Ala	2.35	9.69	-	89.09	6.02
Βαλίνη, Val	2.32	9.62	-	117.14	5.97
Λευκίνη, Leu	2.36	9.60	-	131.17	5.98
Ισολευκίνη, Ile	2.36	9.68	-	131.17	6.02
Φαινυλαλανίνη, Phe	1.83	9.13	-	165.19	5.48
Τρυπτοφάνη, Trp	2.38	9.39	-	204.23	5.88
Τυροσίνη, Tyr	2.20	9.11	10.07	181.19	5.65
Ιστιδίνη, His	1.82	9.17	6.0	155.15	7.58
Σερίνη, Ser	2.21	9.15	-	105.09	5.68
Θρεονίνη, Thr	2.63	10.43	-	119.12	6.53
Μεθειονίνη, Met	2.28	9.21	-	149.21	5.75
Κυστεΐνη, Cys	1.71	8.33	10.78	121.15	5.02
Ασπαρτικό οξύ, Asp	2.09	9.82	3.86	133.10	2.87
Γλουταμινικό οξύ, Glu	2.19	9.67	4.25	147.13	3.22
Ασπαραγίνη, Asn	2.02	8.08	-	132.12	5.41
Γλουταμίνη, Gln	2.17	9.13	-	146.14	5.65
Λυσίνη, Lys	2.18	8.95	10.53	146.19	9.74
Αργινίνη, Arg	2.17	9.04	12.48	174.20	10.76
Προλίνη, Pro	1.99	10.60	-	115.13	6.10

Σε όξινο διάλυμα, η αμινομάδα είναι ιοντισμένη (πρωτονιωμένη) ενώ η καρβοξυλομάδα όχι και αντίστοιχα σε βασικό διάλυμα και οι δυο είναι αποπρωτονιωμένες (**Σχήμα 4.3**). Σε ουδέτερο pH φέρουν δυο φορτία, την πρωτονιωμένη αμινομάδα (-NH₃⁺) και αποπρωτονιωμένη καρβοξυλομάδα (-COO⁻), η τιμή του pH όπου το αμινοξύ φέρει συνολικό φορτίο μηδέν και δεν μετακινείται σε ηλεκτρικό πεδίο, αναφέρεται ως ισοηλεκτρικό σημείο ή pI (Isoelectric point, **Πίνακας 4.1**). Τα αμινοξέα ονομάζονται επίσης αμφοτερικά ιόντα (Zwitter-ions) ή διπολικά ιόντα, φέροντας ένα θετικό και ένα αρνητικό φορτίο και συμπεριφέρονται ως οξέα δίνοντας ένα πρωτόνιο σε μια ισχυρότερη βάση ή ως βάσεις δεχόμενα ένα πρωτόνιο από ένα ισχυρό οξύ.



Σχήμα 4.3 Οι καταστάσεις ιοντισμού αμινοξέος^{2A}

Η ύπαρξη τεσσάρων διαφορετικών υποκαταστατών γύρω από το α-άτομο άνθρακα δημιουργεί ένα στερεογονικό κέντρο με αποτέλεσμα τα αμινοξέα να είναι χειρόμορφα μόρια και απαντούν σε δυο εναντιομερείς μορφές. Οι δύο μορφές με σχέση αντικειμένου-ειδώλου ονομάζονται L και D ισομερή (**Σχήμα 4.4**). Στις πρωτεΐνες τα αμινοξέα απαντώνται με L διαμόρφωση. Τα φυσικά αμινοξέα (L) ορίζονται έτσι, επειδή έχουν την ίδια διαμόρφωση με αυτή της φυσικής γλυκεραλδεύδης, που αυθαίρετα είχε οριστεί ως L-μορφή. Τα εναντιομερή είναι πανομοιότυπα από κάθε άποψη, εκτός απ' ό,τι τα διαλύματά τους στρέφουν το επίπεδο του πολωμένου φωτός σε αντίθετες κατευθύνσεις. Το εναντιομερές που στρέφει το πολωμένο φως προς τα δεξιά λέγεται δεξιόστροφο (+, dextrorotatory), ενώ το εναντιομερές που στρέφει το πολωμένο φως προς τα αριστερά αριστερόστροφο (-, levorotatory). Η γλυκίνη είναι το μοναδικό αμινοξύ που δεν εμφανίζει χειρομορφία.



Σχήμα 4.4 Εναντιομερείς μορφές αμινοξέος

Ανάλογα με τη δομή της παράπλευρης αλυσίδας R που φέρουν τα αμινοξέα, διακρίνονται σε αλειφατικά, θειούχα, αρωματικά, βασικά κλπ. Δεκαπέντε από τα 20 αμινοξέα έχουν ουδέτερες πλευρικές αλυσίδες (ουδέτερα αμινοξέα), δύο διαθέτουν μια επιπλέον καρβοξυλομάδα (ασπαρτικό οξύ και γλουταμικό οξύ: όξινα αμινοξέα), ενώ τρία φέρουν στις πλευρικές αλυσίδες βασικές αμινομάδες (λυσίνη, αργινίνη και ιστιδίνη: βασικά αμινοξέα).

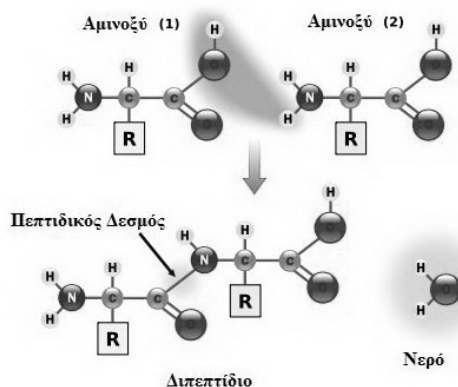
Τα **πεπτίδια** είναι πολυμερή αμινοξέων και προκύπτουν από μερική υδρόλυση των πρωτεϊνών. Οι περισσότερες βιολογικές λειτουργίες του κυττάρου όπως η πρωτεϊνόςύνθεση, η αναπαραγωγή, ο μεταβολισμός της γλυκόζης κ.α. ρυθμίζονται από πεπτίδια πιστοποιώντας έτσι τη σημασία της Χημείας των Πεπτιδίων π.χ. στην ανάπτυξη στοχευμένων φαρμάκων και διαγνωστικών, καθώς και στη μελέτη της μοριακής βάσης πολλών ασθενειών. Τα πεπτίδια ταξινομούνται με τα ελληνικά προθέματα δι-, τρι-, τετρα-, πεντα-, ... οκτα-, εννεα, δεκαπεπτίδια κλπ., ανάλογα με τον αριθμό των αμινοξέων που έχουν. Σε μεγαλύτερα πεπτίδια, το ελληνικό πρόθεμα μπορεί να αντικατασταθεί με αραβικούς αριθμούς, για

παράδειγμα, ένα δεκαπεπτίδιο μπορεί να ονομαστεί 10-πεπτίδιο. Παλαιότερα, πεπτίδια που περιείχαν λιγότερα από 10 αμινοξέα ταξινομούνταν ως **ολιγοπεπτίδια** (oligopeptides, από το ελληνικό oligos = λίγα) ενώ πεπτίδια με 10-100 αμινοξέα ονομάζονταν **πολυπεπτίδια**.

Το όνομα **πρωτεΐνη** προέκυψε από την Ελληνική λέξη **πρώτος**. Οι πρωτεΐνες είναι τα κύρια υλικά του δέρματος, των μυών, των τενόντων και του αίματος. Πρωτεϊνικής φύσεως είναι τα ένζυμα, τα αντισώματα και πολλές ορμόνες. Χημικώς οι πρωτεΐνες είναι πολυμερή αμινοξέων όπως και τα πεπτίδια, με μόνη διαφορά τον αριθμό αμινοξέων που φέρουν. Από χημική άποψη η διαφοροποίηση μεταξύ πολυπεπτιδίων και πρωτεϊνών είναι διφορούμενη. Σύμφωνα με τους σημερινά αποδεκτούς κανόνες ονοματολογίας, τα **ολιγοπεπτίδια** αποτελούνται από λιγότερα από 15 αμινοξέα, τα **πολυπεπτίδια** περιέχουν περίπου 15-50 αμινοξέα και η έκφραση **πρωτεΐνη** χρησιμοποιείται για παράγωγα που περιέχουν περισσότερο από 50 αμινοξέα.^{1Α,2Α}

4.2 Πεπτιδικός Δεσμός

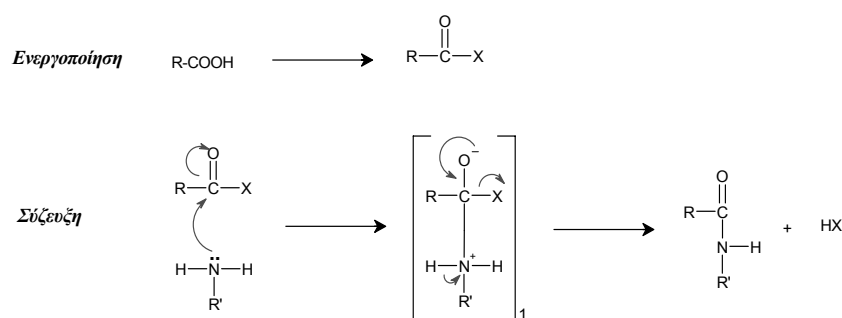
Ο πεπτιδικός δεσμός, χημικώς είναι ένας αμιδικός δεσμός, είναι ο ομοιοπολικός δεσμός μεταξύ μιας καρβοξυλομάδας ενός αμινοξέος και της αμινομάδας ενός άλλου. Σχηματίζεται μέσω πυρηνόφιλης προσβολής από την αμινομάδα του ενός αμινοξέος στο ηλεκτρονιόφιλο άτομο άνθρακα του καρβονυλίου της καρβοξυλομάδας του άλλου αμινοξέος, με ταυτόχρονη απομάκρυνση ενός μορίου H_2O (Σχήμα 4.5).



Σχήμα 4.5 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, περίπου 4Kcal/mol). Σε διάλυμα αν αναμίξουμε δύο αμινοξέα, σε θερμοκρασία δωματίου, ο

σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού δεν ευνοείται θερμοδυναμικά, εφόσον απαιτούνται πολύ δραστικές συνθήκες (υψηλές θερμοκρασίες). Τα αμινοξέα όμως είναι πολύ ευαίσθητες ενώσεις και σε τέτοιες συνθήκες καταστρέφονται. Γι' αυτό γίνεται ενεργοποίηση του καρβοξυλίου του αμινο-τελικού αμινοξέος (**Σχήμα 4.6**). Κατά την ενεργοποίηση το υδροξύλιο αντικαθίσταται από μία ομάδα (-X) δέκτη ηλεκτρονίων. Ομάδες που ασκούν είτε επαγωγικό (-I) φαινόμενο ή μεσομέρια (-M) μειώνουν την ηλεκτρονιακή πυκνότητα στην καρβονυλομάδα αυξάνοντας τον ηλεκτρονιόφιλο χαρακτήρα του άνθρακα του καρβονυλίου διευκολύνοντας την πυρηνόφιλη αντίδραση. Κατά την προσβολή της αμινομάδας στον άνθρακα του καρβονυλίου σχηματίζεται ένα τετραεδρικό διπολικό ενδιάμεσο (**Σχήμα 4.6**). Ο σχηματισμός του πεπτιδικού δεσμού ολοκληρώνεται έπειτα από αποσύνδεση της αποχωρούσας ομάδας (HX) από το τετραεδρικό ενδιάμεσο. Η ικανότητα της αποχωρούσας ομάδας είναι ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει το ρυθμό της αντίδρασης. Η ποικιλία των αποχωρουσών ομάδων παρέχει ένα ευρύ φάσμα μεθόδων για το σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού.



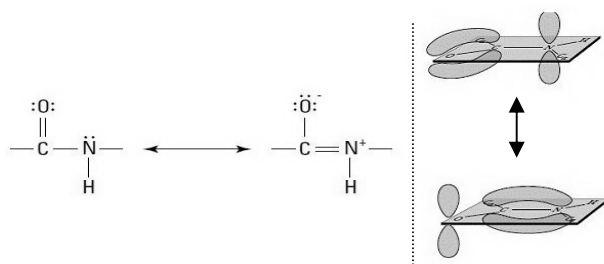
Σχήμα 4.6 Ενεργοποίηση της καρβοξυλομάδας και πυρηνόφιλη προσβολή της

Η ενεργοποίηση του καρβοξυλίου δεν επαρκεί, αφού θα μπορούσαν να συμμετέχουν διάφορες ομάδες όπως η αμινομάδα και η καρβοξυλομάδα των αμινοξέων καθώς επίσης και οι δραστικές ομάδες των παράπλευρων αλυσίδων με αποτέλεσμα τη λήψη ανεπιθύμητων παραπροϊόντων. Για την επίτευξη της επιθυμητής αντίδρασης οι λειτουργικές ομάδες που δεν εμπλέκονται προστατεύονται κατάλληλα με προσωρινές προστατευτικές ομάδες ώστε να μην αντιδράσουν και απομακρύνονται αργότερα.^{3A}

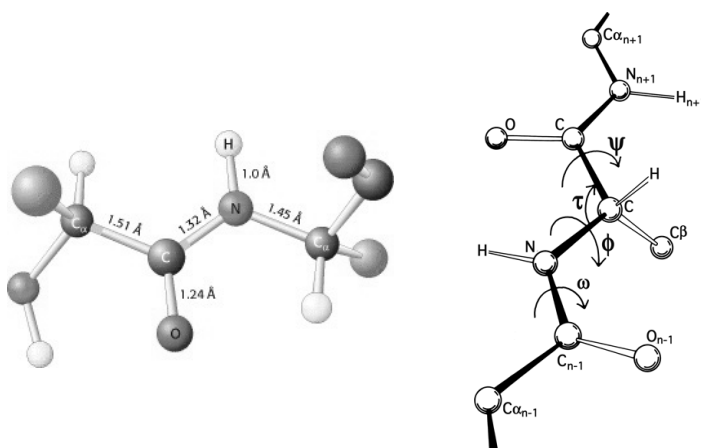
4.3 Στερεοχημεία του πεπτιδικού δεσμού

Το 1951, οι Linus Pauling και Robert Corey απέδειξαν με κρυσταλλογραφία ακτίνων X, ότι το μήκος του δεσμού C-N, στον πεπτιδικό δεσμό, είναι αισθητά μικρότερο (1.32Å),

από ότι σε έναν απλό δεσμό C-N (1.47Å). Ο απεντοπισμός του ασύζευκτου ζεύγους ηλεκτρονίων του N, προσδίδει μερικό χαρακτήρα διπλού δεσμού στον δεσμό C-N (**Σχήμα 4.7**) επάγοντας επιπεδότητα στον πεπτιδικό δεσμό. Η διαμόρφωση του πεπτιδικού σκελετού χαρακτηρίζεται από τις τρεις γωνίες στρέψης, ϕ [C(=O)-N-C ^{α} -C(=O)] (δίεδρη γωνία ϕ), ψ [N-C ^{α} -C(=O)-N] (δίεδρη γωνία ψ) και ω [C ^{α} -C(=O)-N-C-] (δίεδρη γωνία ω) (**Σχήμα 4.8**).

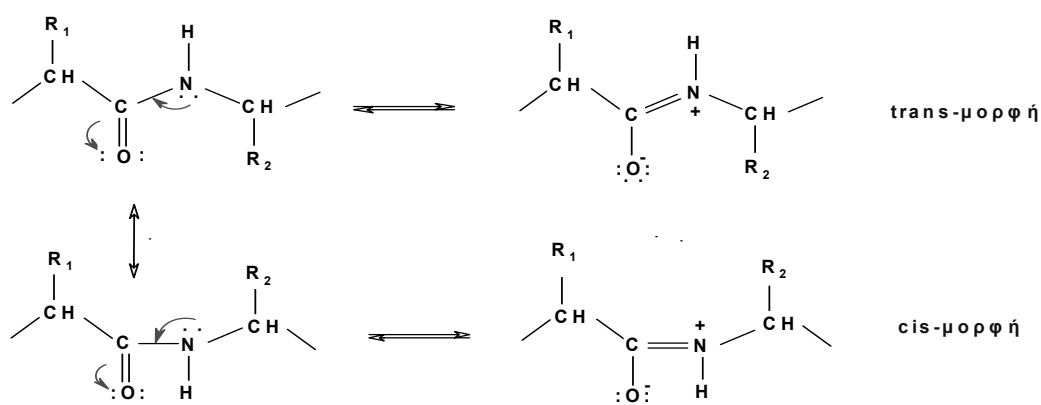


Σχήμα 4.7 Πεπτιδικός δεσμός (C-N) με χαρακτήρα μερικού διπλού δεσμού.



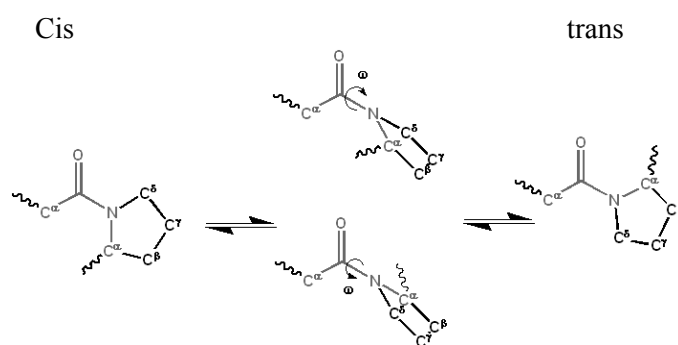
Σχήμα 4.8 Μήκη δεσμών και γωνίες στρέψης (ϕ , ψ , ω) αμινοξέος σε πεπτίδιο

Η ελεύθερη περιστροφή γύρω από τον αμιδικό δεσμό C-N (ω), περιορίζεται δραστηρικά λόγω του χαρακτήρα μερικού διπλού δεσμού, με ενεργειακό φράγμα περιστροφής 105 kJ mol⁻¹. Κατά συνέπεια υπάρχουν δύο στροφομερή του πεπτιδικού δεσμού: η trans-διαμόρφωση ($\omega=180^\circ$) και η cis-διαμόρφωση ($\omega=0^\circ$) (**Σχήμα 4.9**). Η trans- διαμόρφωση ευνοείται ενεργειακά, 2 kcal mol⁻¹, λόγω των στερεοχημικών παρεμποδίσεων που παρατηρούνται στην cis διάταξη από τις παράπλευρες αλυσίδες (R) των δύο ατόμων C ^{α} και προτιμάται στις πρωτεΐνες και στα φυσικά πεπτίδια.



Σχήμα 4.9 Trans- και cis- διαμορφώσεις του πεπτιδικού δεσμού

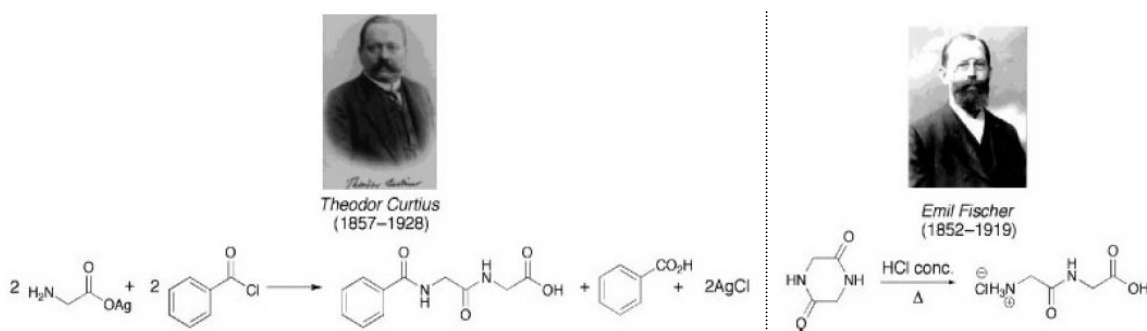
Στις περιπτώσεις όπου η ιμινομάδα της προλίνης συμμετέχει στον πεπτιδικό δεσμό, η ενέργεια του trans- δεσμού Xaa-Pro αυξάνεται. Κατά συνέπεια, η ενεργειακή διαφορά μεταξύ των cis και trans ισομερών μειώνεται (**Σχήμα 4.10**). Το ποσοστό των cis- Xaa-Pro δεσμών (6,5%) είναι περίπου δύο τάξεις μεγέθους υψηλότερο σε σύγκριση με τους cis- πεπτιδικούς δεσμούς μεταξύ όλων των άλλων αμινοξέων (cis 0,05%). Η cis/trans ισομερίωση του πεπτιδικού δεσμού που περιλαμβάνει την ιμινο ομάδα της προλίνης συνήθως λαμβάνει χώρα σε πολλές πρωτεΐνες, και έχει χρόνο ημιζωής μεταξύ 10 και 1000 s. Επίσης οι cis- πεπτιδικοί δεσμοί είναι παρόντες στις δικετοπιπεραζίνες.



Σχήμα 4.10 Cis/trans ισομερισμός ενός πεπτιδικού δεσμού Xaa-Pro, μέσω μεταβατικών καταστάσεων.

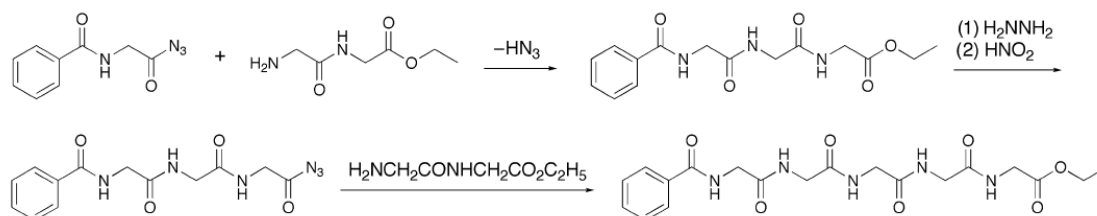
4.4 Σύντομη ιστορία της Χημείας των πεπτιδίων¹

Η δημοσίευση το 1901, από τον E. Fischer και E. Fourneau της παρασκευής του διπεπτιδίου γλυκυλογλυκίνης (glycylglycine) με υδρόλυση της δικετοπιπεραζίνης της γλυκίνης, θεωρείται ως η αρχή της Χημείας των πεπτιδίων. Ωστόσο, ο T. Curtius είχε συνθέσει και χαρακτηρίσει ένα σχετικό πεπτίδιο 20 χρόνια νωρίτερα, κατά τη διάρκεια της διδακτορικής του διατριβής μαζί με τον H. Kolbe, παρασκευάζοντας το πρώτο N-προστατευμένο διπεπτίδιο, βενζοϋλογλυκυλογλυκίνη (benzoylglycylglycine) από την επεξεργασία του άλατος αργύρου της γλυκίνης με βενζυλοχλωρίδιο (**Σχήμα 4.11**).



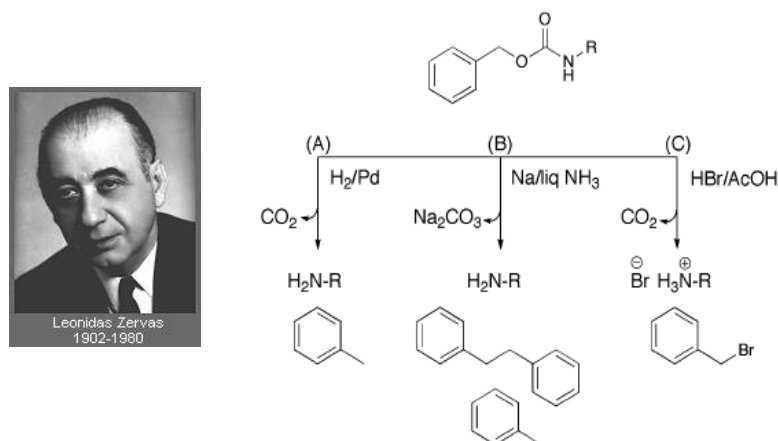
Σχήμα 4.11 Η πρώτη σύνθεση διπεπτιδίου από τον T. Curtius και αργότερα από τον E. Fischer¹

Η εντατική δουλειά του T. Curtius με διαζωενώσεις οδήγησε στην ανάπτυξη της πρώτης πρακτικής μεθόδου για τη σύνθεση πεπτιδίων: μέθοδος σύζευξης αζιδίων, η οποία εφαρμόστηκε επιτυχώς στη σύνθεση πεπτιδίων βενζοϋλογλυκίνης καθορισμένου μήκους (**Σχήμα 4.12**). Ο E. Fischer, αντιθέτως, ανέπτυξε μια μέθοδο σύζευξης πεπτιδίων με χρήση ακυλοχλωριδίων, που παρασκευάστηκαν από τα αντίστοιχα ελεύθερα αμινοξέα χρησιμοποιώντας PCl_5 και ακετυλοχλωρίδιο ως διαλύτη.

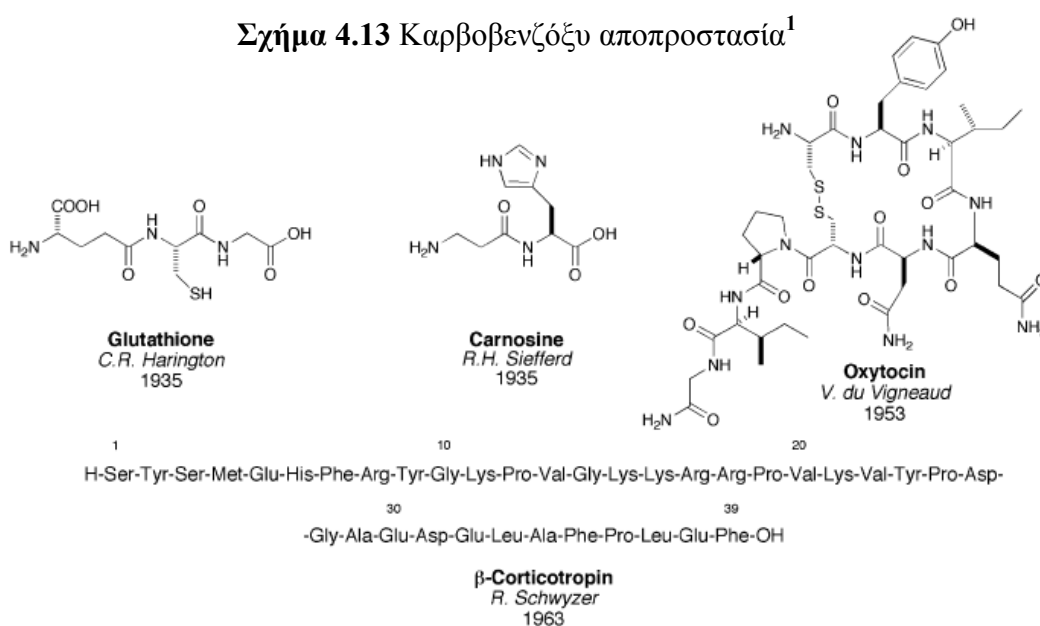


Σχήμα 4.12 Σύνθεση βενζοϋλοπενταγλυκίνης με τη μέθοδο σύζευξης των αζιδίων¹

Τα κυριώτερα προβλήματα, και ως εκ τούτου περιορισμοί, και των δύο μεθόδων προέρχονταν από δυσκολίες την εποχή εκείνη για απόκτηση εναντιομερώς καθαρών L-αμινοξέων και την απουσία αμινο-προστατευτικών ομάδων που απομακρύνονται εύκολα. Η εισαγωγή το 1931, από τον M. Bergmann (πρώην μαθητή του E. Fischer) και το Λεωνίδα Ζέρβα, της καρβοβενζόξυ (carbobenzoxy, Cbz) ομάδας (**Σχήμα 4.13**), για την προσωρινή προστασία της αμινομάδας έλυσε μέρος του προβλήματος και οδήγησε σε μια νέα εποχή στη σύνθεση πεπτιδίων. Από το σημείο αυτό, πολυάριθμα μικρά πεπτίδια, όπως η γλουταθειόνη (glutathione) και καρνοσίνη (carnosine) συντέθηκαν με αποκορύφωμα περίπου 20 χρόνια αργότερα τη σύνθεση της δραστικής ορμόνης οξυτοκίνης (οκταπεπτίδιο), από τον V. du Vigneaud et al. (**Σχήμα 4.14**).



Σχήμα 4.13 Καρβοβενζόξυ αποπροστασία¹

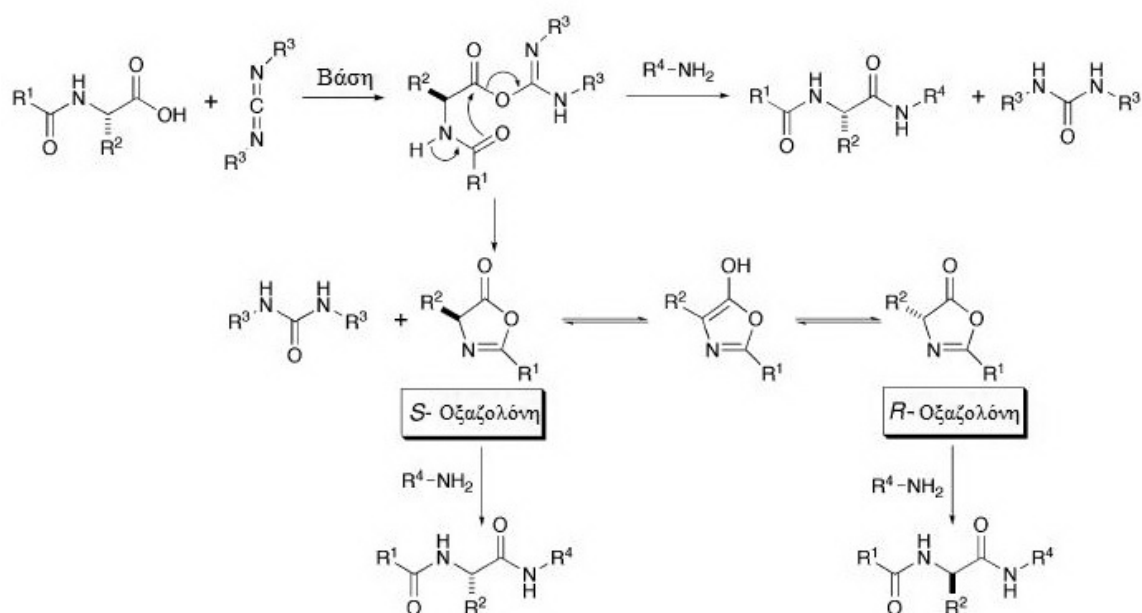


Σχήμα 4.14 Μοριακοί τύποι μερικών από τα πρώτα συνθετικά βιολογικά δραστικά πεπτίδια¹

Στον V. Du Vigneaud απονεμήθηκε το βραβείο Νόμπελ 2 χρόνια αργότερα. Θα πρέπει να αναφερθεί εδώ, ότι οι M. Bergmann και Λ. Ζέρβας έδειξαν κατά τη διάρκεια σύνθεσης της γλουταθειόνης, ότι η χρήση της Cbz-προστατευτικής ομάδας εμπόδιζε τη ρακεμοποίηση κατά τη διάρκεια σχηματισμού του ακυλογλωριδίου, ενώ με N-ακυλο-ή N-βενζοϋλο-προστατευμένα αμινοξέα, η αντίδραση οδήγησε σε σχεδόν πλήρη ρακεμοποίηση. Αποδείχθηκε αργότερα ότι αυτή η διαμορφωτική σταθερότητα είναι μια γενική ιδιότητα των ουρεθάνο-προστατευτικών ομάδων.

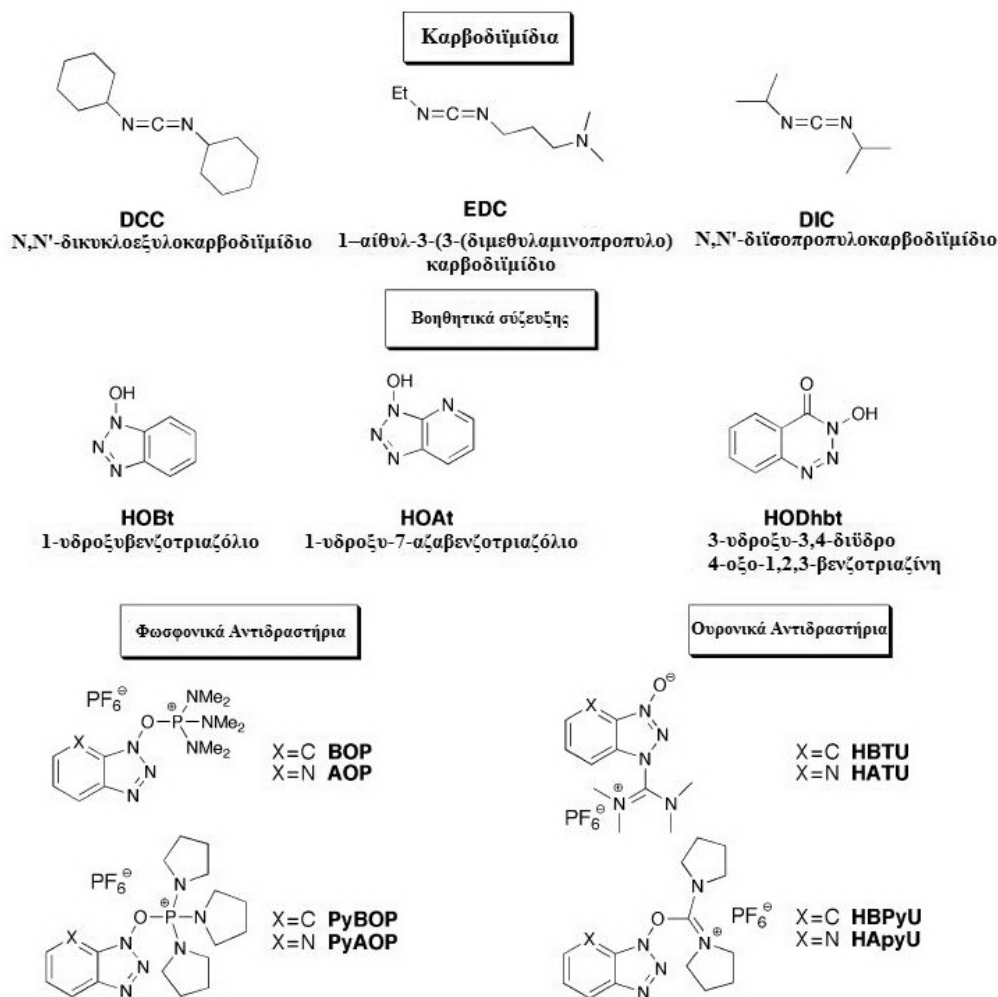
Η εισαγωγή (1957) από τους L.A. Carpino και F.C. McKay, N.F. Albertson μιας νέας, ασταθούς σε οξέα, προστατευτικής ομάδας, της tert-βουτυλοξυκαρβονυλομάδας (tert-butyloxycarbonyl, Boc), που είναι σταθερή στην υδρογόνωση, στα ισχυρά αλκάλια και ως εκ τούτου εντελώς ορθογωνική με την Cbz (ή τροποποιημένη Cbz) ομάδα και επίσης με τους βενζυλεστέρες και αιθέρες, ενίσχυσε κατά πολύ το οπλοστάσιο των προστατευτικών ομάδων που ήταν διαθέσιμες στους πεπτιδοχημικούς της εποχής εκείνης. Ο συνδυασμός των Boc- και Cbz- προστατευτικών ομάδων χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για τη σύνθεση πολλών πεπτιδίων, το πιο εντυπωσιακό παράδειγμα, για αυτήν την περίοδο, είναι η σύνθεση της β-κορτικοτροπίνης (Adrenocorticotrophic hormone, ACTH), μιας ορμόνης 39-καταλοίπων το 1963, από τους R. Schwyzler και P. Sieber (**Σχήμα 4.14**).

Η ανάπτυξη νέων προστατευτικών ομάδων συνοδεύτηκε από εντατική έρευνα για την ανακάλυψη νέων μεθόδων σύζευξης. Η πιο σημαντική καινοτομία στο θέμα αυτό, ήταν ίσως η εισαγωγή των καρβοδιιμίδων (carbodiimides, 1955) από τους J.C. Sheehan, G.P. Hess και H.G. Khorana (**Σχήμα 4.15**). Η μέθοδος ενεργοποίησης με καρβοδιιμίδια έχει, ωστόσο, μια υψηλή τάση για ρακεμοποίηση λόγω της υψηλής δραστηριότητας της O-ακυλο-ισοουρίας, η οποία μπορεί να οδηγήσει, μέσω ενδομοριακής κυκλοποίησης, στο σχηματισμό οξαζολόνης: αυτό το κυκλικό ενδιάμεσο μπορεί εύκολα να ρακεμοποιηθεί μέσω ενός αρωματικού ενδιαμέσου (**Σχήμα 4.15**). Ο μηχανισμός ρακεμοποίησης μέσω σχηματισμού οξαζολόνης έχει ερευνηθεί εκτεταμένα. Στην πρωτοποριακή εργασία τους, οι Goodman και McGahren απέδειξαν όλους τους παράγοντες που επηρεάζουν την οπτική καθαρότητα των ενδιαμέσων οξαζολόνης κατά τη διάρκεια σχηματισμού του πεπτιδικού δεσμού, όπως ο λόγος πυρηνοφιλία/βασικότητα της εισερχόμενης αμινομάδας και η επίδραση του διαλύτη.



Σχήμα 4.15 Αντίδραση σύζευξης μέσω ενεργοποίησης με καρβοδιϊμίδια - μηχανισμός ρακεμοποίησης μέσω σχηματισμού του 5 (4H)-οξαζολόνης^{1A}

Η ενεργοποίηση της καρβοξυλικής ομάδας μπορεί πάντα να οδηγήσει σε ρακεμοποίηση μέσω του ενδιάμεσου οξαζολόνης, ωστόσο, η εισαγωγή "πρόσθετων", όπως 1-υδροξυβενζοτρίαζόλιο (1-hydroxybenzotriazole, HOBt) στο μείγμα αντίδρασης έδειξε στη συνέχεια να ελαχιστοποιεί αυτή την πιθανότητα, με το σχηματισμό ενός λιγότερο δραστικού εστέρα του HOBt. Με τα χρόνια, πολλά άλλα αντιδραστήρια σύζευξης έχουν αναπτυχθεί και τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα απεικονίζεται στο **Σχήμα 4.16**.

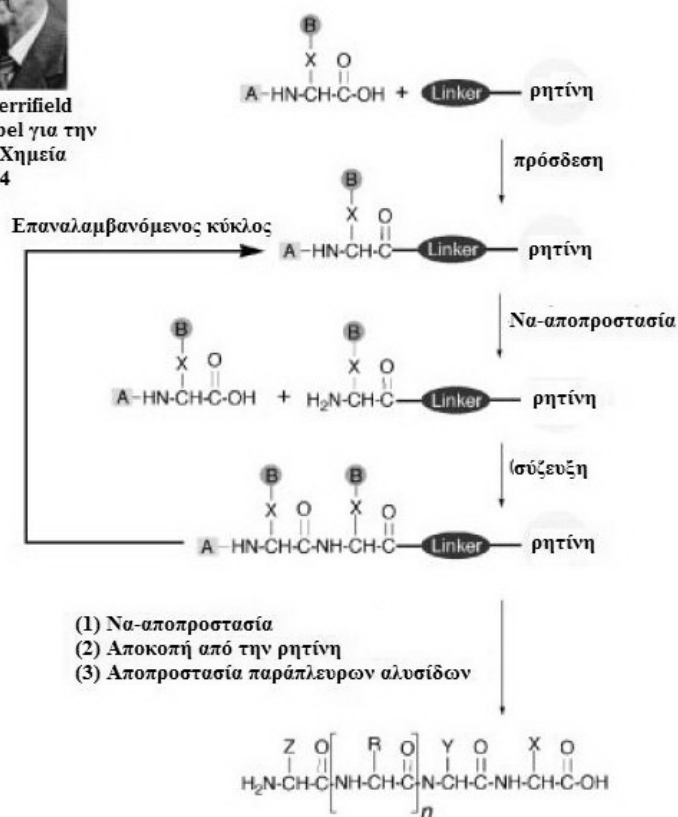


Σχήμα 4.16 Μοριακοί τύποι αντιδραστηρίων σύζευξης¹

Η επόμενη μεγάλη επανάσταση στην χημεία των πεπτιδίων ήρθε το 1963 όταν B. Merrifield δημοσίευσε ένα ιστορικό άρθρο περιγράφοντας τις αρχές και τις εφαρμογές της εφεύρεσής του: σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση (solid-phase peptide synthesis, SPPS). Σε αντίθεση με τη μεθοδολογία σύνθεσης πεπτιδίων σε υγρή φάση, όπου μετά από κάθε αντίδραση το προϊόν πρέπει να απομονώνεται και να καθαρίζεται πριν από το επόμενο βήμα, στη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση το πεπτίδιο συνδέεται σε ένα αδιάλυτο υπόστρωμα και ως εκ τούτου, μετά από κάθε βήμα αντίδρασης, τα παραπροϊόντα απομακρύνονται απλώς με διήθηση και έκπλυση (**Σχήμα 4.17**). Επιπλέον, λόγω του επαναλαμβανόμενου χαρακτήρα της πεπτιδικής σύνθεσης η χρήση ενός αδιάλυτου υποστρώματος σε ένα δοχείο αντίδρασης (vessel) επιτρέπει την αυτοματοποίηση τις διαδικασίας.



Bruce Merrifield
Βραβείο Nobel για την
οργανική Χημεία
1984

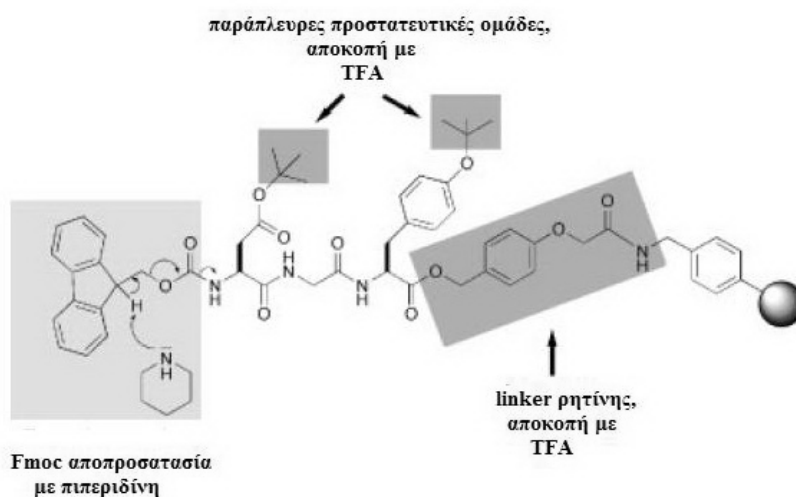


Σχήμα 4.17 Σχηματική παρουσίαση των αρχών σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση¹

Στην αρχή, το στερεό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν ένα χλωρομεθυλιωμένο συμπολυμερές στυρολίου-διβινυλοβενζολίου (ρητίνη Merrifield). Το πεπτίδιο συντέθηκε χρησιμοποιώντας ως αντιδραστήριο σύζευξης καρβοδιϊμίδια, με ένα συνδυασμό Boc ως προστατευτικής ομάδας για το N-τελικό άκρο και βενζυλο- για τις παράπλευρες ομάδες. Μετά την ολοκλήρωση της τελευταίας σύζευξης, το πεπτίδιο αποκόπηκε από τη ρητίνη, με ταυτόχρονη αποπροστασία των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων, χρησιμοποιώντας υγρό υδροφθόριο (HF). Ωστόσο η χρήση υγρού HF κατά την αποκοπή μπορεί να οδηγήσει σε πολλές παράπλευρες αντιδράσεις. Αυτές οι παράπλευρες αντιδράσεις ελαχιστοποιήθηκαν με την εισαγωγή από τον Tam et al ενός πρωτοκόλλου αποκοπής δυο σταδίων χαμηλής-υψηλής συγκέντρωσης HF.

Το 1970, οι L.A. Carpino και G.Y. Han εισήγαγαν μια εντελώς διαφορετική στρατηγική για την προστασία των ομάδων. Αυτή βασίστηκε στη χρήση της ασταθούς σε

βάσεις 9-φλουορενυλομεθυλοξυκαρβονυλομάδας (9-fluorenylmethyloxycarbonyl, Fmoc) για την προστασία των α-αμινομάδων, επιτρέποντας έτσι την ορθογωνική προστασία των παράπλευρων ομάδων μέσω χρήσης προστατευτικών ομάδων που είναι ασταθείς σε οξέα (Σχήμα 4.18).



Σχήμα 4.18 Fmoc στρατηγική στη σύνθεση πεπτιδίων σε στερή φάση. Η ομάδα Fmoc, απομακρύνεται σε βασικές συνθήκες με πιπεριδίνη, ενώ οι παράπλευρες προστατευτικές ομάδες και ο linker απομακρύνονται κάτω από όξινες συνθήκες χρησιμοποιώντας TFA¹

Η αυτοματοποίηση της διαδικασίας SPPS επιτρέπει την ενσωμάτωση περισσότερων από 10 αμινοξέων ανά ημέρα και αμέσως μετά από την εισαγωγή της μεθοδολογίας αυτής υπολογίζεται η σύνθεση χιλιάδων πεπτιδίων. Το 1984 ο Merrifield τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ Χημείας για την εφεύρεσή του. Τα τελευταία χρόνια, πολλά νέα είδη ρητινών έχουν αναπτυχθεί, επιτρέποντας την προετοιμασία πεπτιδίων που φέρουν διαφορετικές λειτουργικές ομάδες στο C-τελικό άκρο όπως ελεύθερο καρβοξύλιο, αμίδιο, θειοεστέρες ή αλκοόλες.

Υπάρχει μια σημαντική πτυχή της χημείας των πεπτιδίων που δεν έχει αναφερθεί μέχρι στιγμής, αλλά η οποία αποτελεί ουσιαστικό παράγοντα: ο καθαρισμός και η ανάλυση των πεπτιδίων. Παράλληλα με την εντατική ανάπτυξη της συνθετικής μεθοδολογίας για την παραγωγή πεπτιδίων, σημαντική πρόοδος έχει σημειωθεί για την αντιμετώπιση αυτών των παραγόντων. Σήμερα, η υψηλής πίεσης (υψηλής απόδοσης) υγρή χρωματογραφία (HPLC) είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος και μάλιστα πολύ αποτελεσματική για τον καθαρισμό, μετατρέποντας σε ρουτίνα το διαχωρισμό πολύπλοκων μειγμάτων προϊόντων. Η φασματομετρία μάζας, αντιθέτως, είναι το πιο ισχυρό εργαλείο για την ανάλυση του

προϊόντος: προσδιορίζοντας την ακριβή μάζα ενός αναλυτικού δείγματος, είναι η καλύτερη απόδειξη ότι η σύνθεση ήταν επιτυχής ή μη. Η ανάπτυξη νέων τεχνολογιών στη φασματομετρία μάζας επιτρέπει την εύρεση της αλληλουχίας των πεπτιδίων και πρωτεϊνών και επομένως, αποτελεί άμεση ανάλυση των πρωτοταγών δομών τους.

4.5 Πεπτιδική Σύνθεση

Γενικά η σύνθεση πεπτιδίων πραγματοποιείται είτε σε **διάλυμα** είτε σε **στερεή** φάση και αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία. Τα πιο σημαντικά σημεία στην πεπτιδική σύνθεση είναι η επιλογή των κατάλληλων συνθηκών καθώς και η χρησιμοποίηση κατάλληλων αντιδραστηρίων. Η σύνθεση σε διάλυμα προηγήθηκε, αλλά παρουσιάζει αρκετά μειονεκτήματα και δυσκολίες. Σε κάθε βήμα της καθίσταται αναγκαία η απομόνωση, ο καθαρισμός και η ταυτοποίηση των ενδιάμεσων προϊόντων σύνθεσης καθιστώντας την όλη διαδικασία επίπονη και χρονοβόρα.

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

(α) Παροδική προστασία με κατάλληλη ομάδα X της αμινομάδας του N-τελικού αμινοξέος. Αυτή η ομάδα θα πρέπει να μειώνει την πυρηνοφιλία της αμινομάδας, να την αδρανοποιεί κατά τη διάρκεια της σύζευξης και να είναι σταθερή στις πειραματικές συνθήκες που εφαρμόζονται. Επίσης, πρέπει να απομακρύνεται εκλεκτικά και εύκολα μετά το σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού, σε κατάλληλες συνθήκες που να μην τον επηρεάζουν. Επιπλέον οι ομάδες αυτές θα πρέπει να μην ευνοούν την ρακεμίσωση του αμινοξέος. Οι κυριότερες ομάδες που χρησιμοποιούνται συνήθως για την προστασία των α-αμινομάδων είναι οι εξής: Boc, Fmoc, Z ομάδα κ.λ.π.

(β) Παροδική προστασία του καρβοξυλίου του C-τελικού αμινοξέος με κατάλληλη ομάδα Y. Η προστασία αυτή γίνεται συνήθως με εστεροποίηση της καρβοξυλομάδας (μεθυλ-, αιθυλ-, t-βουτυλ-, ή βενζυλ-εστέρας). Η προστασία αυτή είναι απαραίτητη στη σύνθεση πεπτιδίων σε διάλυμα, ενώ στην περίπτωση σύνθεσης σε στερεή φάση, το καρβοξύλιο είναι συζευγμένο με το στερεό πολυμερές ή το επόμενο αμινοξύ στην αλληλουχία του πεπτιδίου.

(γ) Παροδική προστασία των δραστικών ομάδων, που πιθανόν να υπάρχουν στις παράπλευρες αλυσίδες των αμινοξέων. Τέτοιες δραστικές ομάδες είναι η ε-NH₂ της Lys, το β-COOH του Asp, η γουανιδομάδα της Arg, η -SH της Cys, η -OH της Ser, Tyr και Thr κ.λ.π.

(δ) Σχηματισμός του πεπτιδικού δεσμού, που επιτυγχάνεται με την ενεργοποίηση του

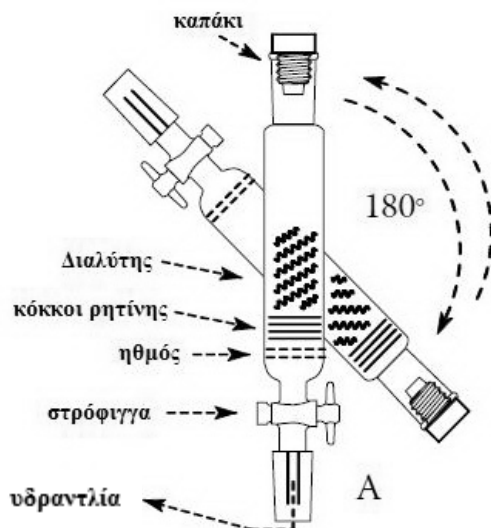
καρβοξυλίου του N-τελικού αμινοξέος και σύζευξη με την αμινομάδα του άλλου αμινοξέος. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται συνήθως για την ενεργοποίηση του καρβοξυλίου είναι: των χλωριδίων, των αζιδίων, των μικτών ανυδριτών, των ενεργών εστέρων, καθώς επίσης και η μέθοδος μέσω διαφόρων αντιδραστηρίων σύζευξης.

(ε) Απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων, μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης, με κατάλληλο τρόπο ώστε να μην καταστρέφονται οι πεπτιδικοί δεσμοί και να λαμβάνεται το πεπτίδιο στην ελεύθερη μορφή του.

4.6 Σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση

Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω η μέθοδος σύνθεσης σε στερεή φάση κατά Merrifield αποτέλεσε σταθμό στη σύνθεση των πεπτιδίων. Σύμφωνα με τη νέα μέθοδο, η σύνθεση γίνεται πάνω σε ένα αδιάλυτο πολυμερές (ρητίνη). Το N-προστατευμένο C-τελικό αμινοξύ του πεπτιδίου προσδένεται ομοιοπολικά πάνω στη ρητίνη, ενώ η N^α-αμινομάδα του και η παράπλευρη αλυσίδα του είναι κατάλληλα προστατευμένες. Στη συνέχεια με μία σειρά επαναλαμβανόμενων βημάτων, αποπροστασίας της N^α-αμινομάδας και σύζευξης του επόμενου κατάλληλα προστατευμένου αμινοξέος λαμβάνουμε το επιθυμητό πεπτίδιο. Η περίσσεια των αντιδραστηρίων σύζευξης και τα παραπροϊόντα απομακρύνονται με εκπλύσεις της ρητίνης με κατάλληλους διαλύτες και διήθηση αυτών. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης επιτυγχάνεται η ταυτόχρονη αποκοπή του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές και η αποπροστασία των παράπλευρων αλυσίδων με τη χρήση κατάλληλων αντιδραστηρίων.

Το κύριο χαρακτηριστικό της σύνθεσης σε στερεή φάση είναι η απομάκρυνση των μη αντιδρώντων συστατικών και των δευτερευόντων προϊόντων με διήθηση. Η τελευταία είναι δυνατή επειδή η σύνθεση γίνεται σε ένα αδιάλυτο υπόστρωμα που είναι με τη μορφή μικρών σφαιριδίων (κόκκοι) και πραγματοποιείται σε ένα δοχείο αντίδρασης (vessel) εφοδιασμένο στο κάτω μέρος με ένα ηθμό και μια έξοδο, η οποία συνδέεται με υδραντλία για την απομάκρυνση του διαλύτη που περιέχει τα ανεπιθύμητα συστατικά (Σχήμα 4.19).



Σχήμα 4.19 Δοχείο αντίδρασης (vessel) για τη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση^{2Α}

Η ροή του υγρού ελέγχεται από στροφήγγα. Τα αντιδρώντα και ο διαλύτης εισάγονται μέσω μιας άνω θύρας-εισόδου που κλείνει με πώμα ή βιδωτό καπάκι. Η ανάδευση επιτυγχάνεται με τη στερέωση του vessel σε περιστρεφόμενο αναδευτήρα. Απλή κίνηση του υποστρώματος και όχι έντονη ανακίνηση είναι επιθυμητή, έτσι ώστε οι κόκκοι της ρητίνης να μην καταστραφούν. Η σύνθεση με αυτό το σύστημα αναφέρεται ως "χειροκίνητη" (manual). Όργανα που ελέγχονται από έναν προγραμματιστή ή υπολογιστή παράγουν πεπτίδια με "αυτόματη" (automated) σύνθεση.

Οι δύο στρατηγικές που ακολουθούνται ευρέως στη σύνθεση σε στερεή φάση είναι η **Boc/Bzl** με Boc προστασία για την N^α-αμινομάδα των αμινοξέων και βένζυλο ή διάφορες άλλες για τις παράπλευρες ομάδες και η **Fmoc/t-butyl** με **Fmoc** προστασία για την N^α-αμινομάδα των αμινοξέων και t-butyl για τις παράπλευρες ομάδες.

Η μέθοδος εμφανίζει αρκετά πλεονεκτήματα, καθώς δεν υπάρχει απώλεια υλικού που συνοδεύει τα συνθετικά βήματα, επειδή το πεπτίδιο δεν βγαίνει έξω από το vessel. Δευτερεύοντα προϊόντα που προέρχονται από τα αντιδραστήρια και τις προστασίες δεν επηρεάζουν την καθαρότητα του πεπτιδίου επειδή απομακρύνονται ποσοτικά μετά από κάθε αντίδραση, συμβάλλοντας έτσι σε ένα ικανοποιητικό βαθμό καθαρότητας. Οι αντιδράσεις μπορούν να οδηγηθούν προς ολοκλήρωση με τη χρήση περίσσειας των αντιδραστηρίων. Το ζήτημα της διαλυτότητας του πεπτιδίου δεν τίθεται όπως συμβαίνει για τις συνθέσεις που πραγματοποιούνται σε διάλυμα. Δεν πραγματοποιείται καθαρισμός των ενδιάμεσων

προϊόντων κατά τη διάρκεια της σύνθεσης και οι ενέργειες είναι επαναλαμβανόμενες και έχουν αυτοματοποιηθεί, μειώνοντας έτσι το χρόνος σύνθεσης των πεπτιδίων.

Οι αντιδράσεις κατά τη σύνθεση σε στερεή φάση θα πρέπει να είναι πλήρεις για να αποφευχθεί ο σχηματισμός μειγμάτων με ελλειπίες ακολουθίες, οι οποίες δημιουργούν τεράστιο πρόβλημα κατά τον καθαρισμό. Ως παράδειγμα, 99% απόδοση σε κάθε ένα από τα 30-βήματα ενός 15-πεπτιδίου δίνει ως προϊόν το πεπτίδιο-στόχο με απόδοση 74% και ένα πεπτίδιο με απόδοση 25% που του λείπει ένα αμινοξύ. Αυτό προϋποθέτει ότι όλες οι μη-αντιδρούσες ομάδες συμμετέχουν στο επόμενο βήμα. Όταν μια αμινομάδα δεν αντιδρά πλήρως κατά την ανάπτυξη της αλυσίδας, η ουσία που παράγεται αναφέρεται ως ελλειπές πεπτίδιο. Τα πεπτίδια αυτά συνεχίζουν να μεγαλώνουν σε μήκος και οδηγούν σε πεπτίδια που περιέχουν ελλειπίες αλληλουχίες. Η παραγωγή ελλειμματικών αλληλουχιών που προκύπτουν από ατελείς συζεύξεις μπορεί να αποφευχθεί με την πραγματοποίηση μιας ακετυλίωσης. Ωστόσο, δεν υπάρχει καμία εγγύηση ότι αυτή η ενέργεια θα επιτύχει το στόχο. Η απομάκρυνση των αντιδραστηρίων θα πρέπει να είναι πλήρης και επιτυγχάνεται με επαναλαμβανόμενες εκπλύσεις με κατάλληλους διαλύτες. Επιτυχής σύνθεση σε στερεή φάση απαιτεί να μην υπάρχουν αντιδράσεις στις παράπλευρες αλυσίδες και την κύρια αλυσίδα, συμπεριλαμβανομένης πρόωρης απομάκρυνσης προστατευτικών ομάδων. Η χρήση άφθονων ποσών διαλυτών και παράγωγων αμινοξέων σε μεγάλη περίσσεια προϋποθέτει ότι όλα τα υλικά θα πρέπει να είναι καθαρά και η χειρική ακεραιότητα των αμινοξέων θα πρέπει να διατηρείται καθ' όλη τη σύνθεση. Ένα άλλο μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι ο έλεγχος, ο καθαρισμός και η ταυτοποίηση του πεπτιδίου γίνονται όταν ολοκληρωθεί η σύνθεση.

4.7 Πολυμερικά υποστρώματα (ρητίνες) για τη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση

Το νέο χαρακτηριστικό της σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση είναι το στερεό υπόστρωμα. Στην αρχική και την απλούστερη μορφή, η σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση περιλαμβάνει ένα ετερογενές μείγμα αντίδρασης, που αποτελείται από μια αδιάλυτη πεπτιδική αλυσίδα δεσμευμένη σε ρητίνη, ένα διαλυτό ενεργοποιημένο παράγωγο αμινοξέος και το διαλύτη. Το πολυμερικό υπόστρωμα θα πρέπει να πληρεί κάποιες προϋποθέσεις για να χρησιμοποιηθεί στη σύνθεση των πεπτιδίων:

- α) Να είναι αδιάλυτο στους χρησιμοποιούμενους διαλύτες.
- β) Να είναι με μορφή σφαιριδίων επαρκούς μεγέθους για να επιτρέπεται η ταχεία απομάκρυνση του διαλύτη με διήθηση.

γ) Να είναι μηχανικά σταθερό ως προς την ανάδευση αλλά και να επιτρέπει τον εύκολο χειρισμό.

δ) Να είναι χημικά αδρανές σε όλα τα αντιδραστήρια και τους διαλύτες που χρησιμοποιούνται, αλλά ταυτόχρονα να είναι αρκετά δραστικό ώστε να επιτρέπει την ομοιοπολική πρόσδεση του πρώτου αμινοξέος της αλληλουχίας που πρόκειται να συντεθεί.

ε) Οι αντιδράσεις στα σημεία πρόσδεσης του υποστρώματος πρέπει να περιλαμβάνουν αντίδρασεις τόσο στο εσωτερικό του όσο και στην επιφάνειά του. Κατά συνέπεια, είναι αναγκαίο να υπάρχει εύκολη διάχυση των αντιδραστηρίων στο εσωτερικό των διογκωμένων κόκκων και τα σημεία πρόσδεσης να είναι προσβάσιμα. Η προσβασιμότητα διευκολύνεται όταν η υποκατάσταση (NH_2/gr ρητίνης) δεν είναι ιδιαίτερα υψηλή. Η έκταση της επιδιαλύτωσης και της διόγκωσης της ρητίνης είναι πολύ σημαντικός παράγοντας. Γενικά, η διατήρηση υψηλά διογκωμένης κατάστασης της ρητίνης σε όλη τη σύνθεση απαιτείται για ταχείες και πλήρεις χημικές αντιδράσεις. Η καλή διόγκωση της ρητίνης δεν καθορίζει μόνο τις ιδιότητες διάχυσής της και ως εκ τούτου την κινητική των αντιδράσεων, αλλά επίσης αποτελεί προϋπόθεση για την εξασφάλιση της ομοιόμορφης κατανομής των αυξανόμενων πεπτιδικών αλυσίδων σε κάθε σημείο του πολυμερικού υποστρώματος.

Οι ιδιότητες διόγκωσης της ρητίνης επηρεάζονται από καθένα από τα στοιχεία του συστήματος: το πεπτίδιο, τη ρητίνη και το διαλύτη. Ως εκ τούτου, κατά τη διάρκεια της πεπτιδικής σύνθεσης, η επιδιαλύτωση αλλάζει από το να είναι απλώς μια ιδιότητα του πολυμερούς της ρητίνης και επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από το προστατευμένο πεπτίδιο. Το διχλωρομεθάνιο (DCM, dichloromethane), για παράδειγμα, είναι καλύτερος διαλύτης για το πολυστυρόλιο απ' ό,τι το διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF, dimethylformamide), αλλά το DMF είναι συνήθως καλύτερο από το DCM για μεσαίες και υψηλά υποκατεστημένες ρητίνες. Μερικές φορές διμερή μίγματα διαλυτών παρέχουν βέλτιστες ιδιότητες διόγκωσης.

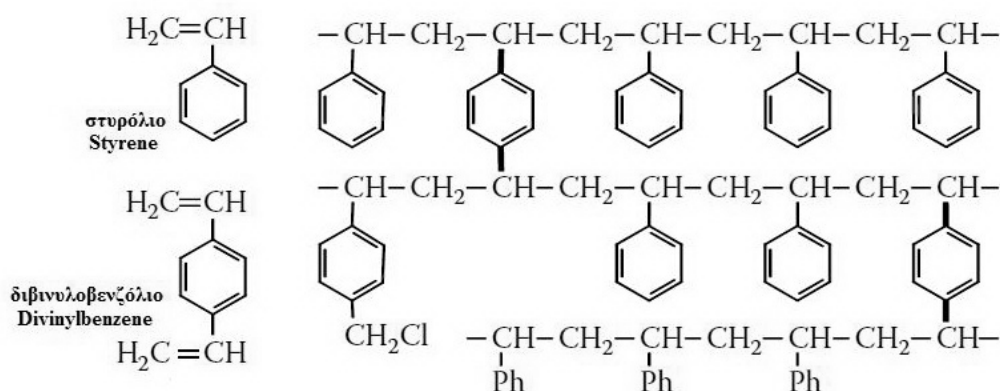
στ) Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των προσδεσμένων πεπτιδικών αλυσίδων στη ρητίνη θα πρέπει να είναι ελάχιστες.

η) Οι αντιδράσεις διευκολύνονται από ένα τμήμα που διαχωρίζει (spacer) το υπόστρωμα από τα σημεία πρόσδεσης.

θ) Η αποκοπή θα πρέπει να είναι δυνατή υπό ήπιες συνθήκες.

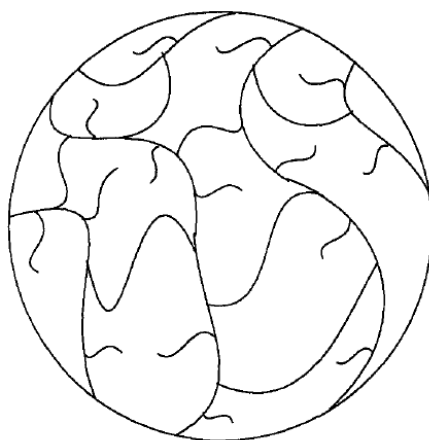
Οι ρητίνες είναι είτε πηκτές (gel) με μικροπόρους είτε μίγμα ενώσεων (composites). Η πρώτη και η πιο δημοφιλής ρητίνη που χρησιμοποιήθηκε στην SPPS, είναι ένα χλωρομεθυλιωμένο συμπολυμερές στυρολίου-διβινυλοβενζολίου με 1-2% διασταυρωτή σύνδεση (**Σχήμα 4.20**) και αναφέρεται ως ρητίνη Merrifield. Αποτελείται από μια αλυσίδα

μεθυλενίου με φαίνυλο προσαρτήματα σε κάθε δεύτερο άτομο άνθρακα, με διασταυρωτές συνδέσεις που σχηματίζονται από την ένωση των φαίνυλο δακτυλίων με δύο αλυσίδες.



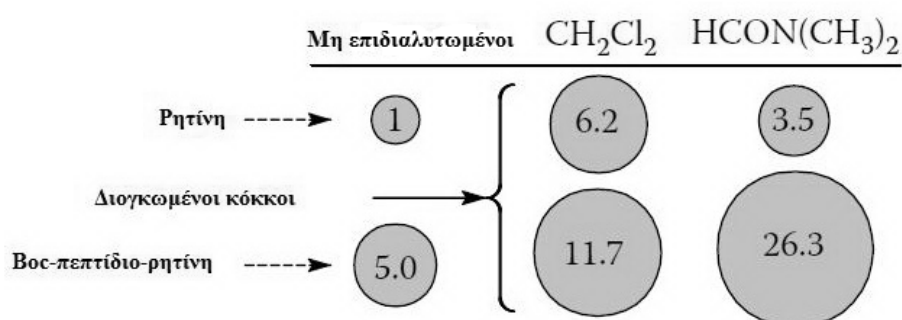
Σχήμα 4.20 Ρητίνη Merrifield που λαμβάνεται με πολυμερισμό του στυρολίου παρουσία διβινυλοβενζολίου ακολουθούμενη από αντίδραση με $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{Cl}$ ^{2Α}

Η ρητίνη, μια πορώδης πηκτή (gel), είναι σε μορφή σφαιριδίων (**Σχήμα 4.21**) συνήθως διαμέτρου 38-75 μm (200-400 mesh: σωματίδια που διέρχονται από φράγμα 200-mesh και συγκρατούνται από φράγμα 400-mesh) και μερικές φορές 70-150 μm (100-200 mesh). Οι λειτουργικές ομάδες βρίσκονται κυρίως στο εσωτερικό των κόκκων της ρητίνης. Το περιβάλλον είναι ετερογενές έτσι κάποια σημεία αντίδρασης είναι λιγότερο προσβάσιμα από κάποια άλλα ή είναι λιγότερο πιθανό να αντιδράσουν με εισερχόμενα παρεμποδιζόμενα παράγωγα αμινοξέων. Η εμπειρία έχει δείξει ότι υλικό με 1% διασταυρωτή σύνδεση δίνει καλύτερα αποτελέσματα από ένα υλικό με 2%.



Σχήμα 4.21 Κύρια δομή του τρισδιάστατου πολυμερικού δικτύου χαρακτηριστικό για ρητίνες τύπου πηκτής (gel)

Σε μια διογκωμένη ρητίνη, δεν υπάρχει πλέον όριο φάσης μεταξύ του διαλύτη και της ρητίνης. Η μέγιστη επιδιαλύτωση συμβαίνει σε διαλύτη με παρόμοια πολικότητα με εκείνη του πολυμερούς. Η έκταση διόγκωσης της ρητίνης πολυστυρενίου απεικονίζεται στο **Σχήμα 4.22**. Η ρητίνη διογκώνεται τρεις φορές το μέγεθός της σε DMF και έξι φορές το μέγεθός της σε λιγότερο πολικό διαλύτη. Η έκταση της επιδιαλύτωσης σε DCM μειώνεται κατά τη σύνθεση του πεπτιδίου καθώς το πολυμερές αλλάζει από υδρόφοβο πολυστυρόλιο σε ένα σύμπλοκο πεπτιδίου-ρητίνης που γίνεται όλο και περισσότερο πολικό. Η μειωμένη επιδιαλύτωση έχει την τάση να κλείνει τα σημεία πρόσδεσης και μια σταδιακή αλλαγή της πολικότητας του διαλύτη κατά τη διάρκεια της σύνθεσης χρησιμεύει για να κρατήσει τα σημεία αντίδρασης προσβάσιμα κατά το δυνατόν. Εναλλασσόμενοι κύκλοι διόγκωσης-συρρίκνωσης βοηθούν στην έκθεση των κρυμμένων σημείων. Ωστόσο, σημεία που εκτίθενται από αλλαγές στην επιδιαλύτωση μπορούν να οδηγήσουν σε ελλειπίες αλληλουχίες. Μέχρι το τέλος της σύνθεσης (**Σχήμα 4.22**), όταν το 80% του πολυμερούς είναι πεπτιδικής φύσης, ο όγκος του είναι πολύ μεγαλύτερος σε DMF απ' ό,τι σε DCM. Ένα βήμα έκπλυσης με αλκοόλη που συρρικνώνει τους κόκκους απομακρύνει τα τελευταία ίχνη των αντιδραστηρίων.



Σχήμα 4.22 Σχετικοί όγκοι ρητίνης πολυστυρολίου και συμπλόκου πεπτιδίου-ρητίνης παρουσία ή απουσία διαλύτη. Οι τιμές είναι για πεπτίδιο 40 αμινοξέων (M.B = 5957 daltons), το πρώτο αμινοξύ προσδένεται σε ρητίνη με υποκατάσταση 0.95 mequiv/g, δίνοντας ένα λόγο πεπτιδίου προς ρητίνη 4:1 κατά βάρος μετά τη σύνθεση^{2A}

Περίπου 10^{12} πολυπεπτιδικές αλυσίδες εντοπίζονται σε ένα κόκκο πολυστυρολίου-διβινυλοβενζολίου διαμέτρου 50 μm και με υποκατάσταση ρητίνης 0,3 mmol πεπτιδίου ανά γραμμάριο ρητίνης. Ένας βέλτιστος βαθμός υποκατάστασης ρητίνης με το πρώτο αμινοξύ κυμαίνεται από 0.2 έως 0.5 mmol ανά γραμμάριο ρητίνης. Με βάση αυτή την παραδοχή, μπορεί να υπολογιστεί ότι το πεπτίδιο, μετά την σύζευξη 15 αμινοξέων, αντιστοιχεί σε

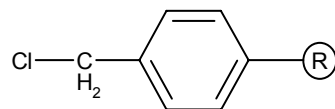
περισσότερο από το 50% της συνολικής μάζας. Η κλασσική ρητίνη Merrifield συμφωνεί με τις απαιτήσεις για κατάλληλα πολυμερικά υποστρώματα, αλλά εμφανίζει προβλήματα σε σχέση με τη μηχανική σταθερότητα, τη χωρητικότητα υποκατάστασης, τη διάχυση και διαφορές στην επιδιαιλύτωση μεταξύ του πολυμερούς και του πεπτιδίου.

Το διασταυρωτά συνδεδεμένο **πολυδιμεθυλακρυλαμίδιο** εισήχθη ως περισσότερο υδρόφιλο υπόστρωμα από τους Atherton και Sheppard. Σχηματίζει πηκτή και επιδιαιλύνεται ιδιαίτερα με διαλύτες κατάλληλους για πεπτιδική σύνθεση (π.χ. DMF). Οι ιδιότητες διάγκωσης αυτού του πολυμερούς είναι καλύτερες από αυτές των ρητινών πολυστυρενίου και αυτό επιτρέπει τη βελτίωση της προσβασιμότητας των λειτουργικών ομάδων του πολυμερούς.

Η εισαγωγή προσδετικών ομάδων (linkers, "συνδέτες") στο πολυμερικό υπόστρωμα αποτελούν τα σημεία πρόσδεσης των αμινοξέων στη ρητίνη. Πρόσθετες "λαβές" (handles) με τη μορφή διλειτουργικών τμημάτων μπορούν να συνδεθούν στο πολυμερικό υπόστρωμα. Η μια από τις δυο λειτουργικές ομάδες πληρεί τις απαιτήσεις για προστασία επιτρέποντας την αποκοπή υπό ήπιες συνθήκες, ενώ η άλλη χρησιμοποιείται για την πρόσδεση στην ρητίνη. Επειδή οι linkers θεωρούνται ως οι προστατευτικές ομάδες για τη C-τελική καρβοξυλομάδα του πεπτιδίου, κατά το σχεδιασμό και την εφαρμογή τους πρέπει ιδιαίτερα να εξεταστούν οι χημικές ιδιότητες τους. Ανάλογα με το C-τελικό άκρο του επιθυμητού πεπτιδίου θα πρέπει να επιλεγεί κατάλληλα ο linker. Η σωστή επιλογή της "λαβής" επιτρέπει τη βελτιστοποίηση της απόδοσης σε σχέση με τα βήματα πρόσδεσης και αποκοπής, καθώς και μείωση της ρακεμοποίησης κατά τη διάρκεια πρόσδεσης του πρώτου αμινοξέος και το σχηματισμό δικετοπιπεραζίνης στο στάδιο του διπεπτιδίου.

Με την πάροδο των ετών χρησιμοποιήθηκε ένας μεγάλος αριθμός νέων ρητινών με διαφορετικές ιδιότητες. Ακολουθούν μερικά παραδείγματα ρητινών που χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην πεπτιδική σύνθεση.^{4A-6A}

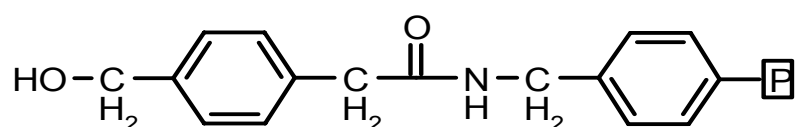
α) Ρητίνη Merrifield



Χλωρομεθυλωμένο πολυμερές^{2,3} με ομάδες βενζυλο-χλωριδίου πάνω στις οποίες προσδένεται το C-τελικό αμινοξύ με εστερικό δεσμό. Χρησιμοποιείται για τη σύνθεση μικρού ή μεσαίου μεγέθους πεπτιδίων ακολουθώντας την Boc-στρατηγική. Ως κύριο

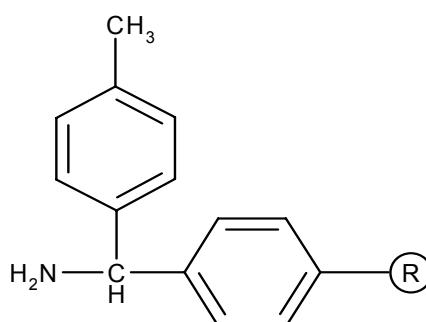
μειονέκτημα της ρητίνης του Merrifield είναι η σχετικά μικρή σταθερότητα του εστερικού δεσμού μεταξύ πεπτιδίου-πολυμερικού υποστρώματος κατά την επαναλαμβανόμενη επεξεργασία της πεπτιδορητίνης με τριφθοροξικό οξύ για την αποκοπή της Boc-ομάδας. Το πεπτίδιο παραλαμβάνεται με ελεύθερο το C-τελικό καρβοξύλιο μετά την αποκοπή του από τη ρητίνη, η οποία γίνεται με χρήση ισχυρών οξέων (HF).

β) Ρητίνη PAM (4-υδροξυμεθυλφαινυλακεταμιδομεθυλο-ρητίνη)



Η PAM ρητίνη^{4,5} χρησιμοποιείται ευρύτατα για τη σύνθεση πεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους. Αυτό συμβαίνει γιατί ο εστερικός δεσμός αμινοξέος-ρητίνης σταθεροποιείται από την παρουσία μιας ηλεκτρονιοελκτικής ακετάμιδο ομάδας που βρίσκεται σε πάρα θέση στο βενζολικό δακτύλιο στον οποίο προσδένεται το πεπτίδιο. Η σταθεροποίηση αυτή του εστερικού δεσμού είναι 100 φορές μεγαλύτερη σε σύγκριση με τη ρητίνη του Merrifield. Με αυτό τον τρόπο ελαχιστοποιούνται οι απώλειες κατά την επαναλαμβανόμενη κατεργασία για την αποκοπή της Boc-ομάδας. Η ρητίνη αυτή είναι συμβατή με την Boc-στρατηγική. Το πεπτίδιο μετά την αποκοπή του από τη ρητίνη, η οποία γίνεται με χρήση ισχυρών οξέων (συνήθως HF και TFMSA), παραλαμβάνεται με ελεύθερο το C-τελικό καρβοξύλιο.

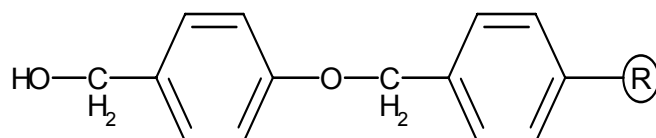
γ) MBHA ρητίνη (4-μεθυλοβενζυδρυλαμίνη)



Η MBHA⁶ ρητίνη χρησιμοποιείται στην Boc-στρατηγική και το πεπτίδιο παραλαμβάνεται στην αμιδική του μορφή. Τα αμινοξέα μπορούν να προσκολληθούν στην

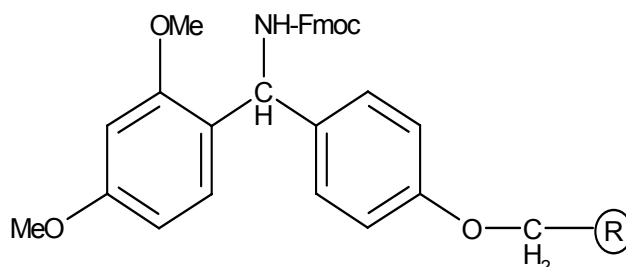
MBHA ρητίνη χρησιμοποιώντας μεθόδους σχηματισμού αμιδικού δεσμού. Η αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη γίνεται με τη χρήση ισχυρών οξέων.

δ) Wang ρητίνη (p-αλκοξυβενζυλοξυβενζυλ-ρητίνη)



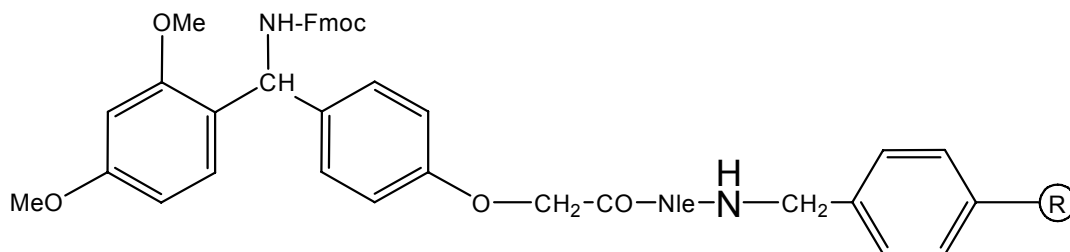
Η Wang ρητίνη⁷ χρησιμοποιείται στην Fmoc-στρατηγική για τη σύνθεση πεπτιδίων με ελεύθερο το C- τελικό καρβοξύλιο. Η πρόσδεση του πεπτιδίου στη ρητίνη γίνεται μέσω ενός εστερικού δεσμού που έχει ένα αλκόξυ ηλεκτρονιοδότη υποκαταστάτη στην πάρα θέση της βενζυλικής αλκοόλης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ευαισθησία του εστερικού δεσμού στα οξέα και έτσι η απομάκρυνση του πεπτιδίου επιτυγχάνεται ύστερα από κατεργασία της πεπτιδορητίνης με τριφθοροξικό οξύ (95% TFA).

ε) Rink Amide ρητίνη 4-[2,4'-διμεθοξυ-φαινυλ-(9-φλουορενυλμεθοξυκαρβονυλ) αμινομεθυλ]-φαινοξύ



Η Rink Amide⁸ χρησιμοποιείται στην Fmoc-στρατηγική για τη σύνθεση πεπτιδίων σε αμιδική μορφή. Η ρητίνη φέρει μια πρόσθετη ομάδα (linker), η οποία είναι ευαίσθητη στα οξέα οπότε η απομάκρυνση του πεπτιδίου από τη ρητίνη μπορεί να γίνει με TFA (αποφυγή χρήσης HF). Κατεργασία με πυκνά διαλύματα TFA μπορεί να οδηγήσει σε αποικοδόμηση του linker, με ταυτόχρονο σχηματισμό παραπροϊόντων, τα οποία δεν μπορούν να απομακρυνθούν εύκολα. Τα προβλήματα αυτά μπορούν να μειωθούν με τη χρήση μικρών συγκεντρώσεων TFA.

στ) Rink Amide AM ρητίνη 4-(2,4'-διμεθοξυφαινυλο-Fmoc-αμινομεθυλο)-φαινοξυακεταμιδο-νορλευκυλαμινομεθυλο-ρητίνη



Η Rink Amide AM ρητίνη⁹ αποτελεί την καλύτερη επιλογή για την σύνθεση αμιδικών πεπτιδίων. Είναι συμβατή με την Fmoc-στρατηγική και η σχάση των αμιδίων από το πολυμερικό υπόστρωμα επιτυγχάνεται κατά την κατεργασία με διάλυμα 95% TFA σε ένα στάδιο. Η μόνη διαφορά με την προηγούμενη (Rink Amide) ρητίνη είναι ότι αποτελείται από τροποποιημένο Rink αμίδιο που έχει προσδεθεί μέσω νορλευκίνης στο 4-μεθυλοβενζυδρυλάμινο-πολυstyrένιο.

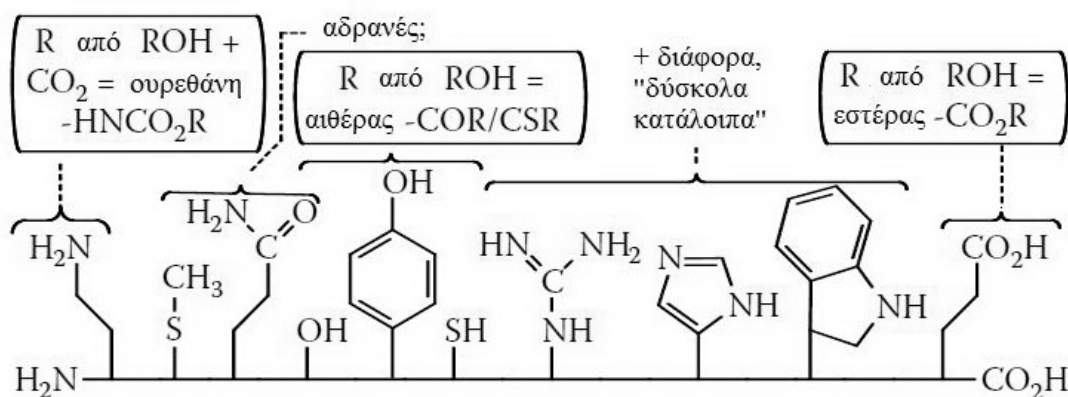
4.8 Προστατευτικές ομάδες

Η ένωση δύο αμινοξέων για να σχηματίσουν ένα πεπτίδιο (διπεπτίδιο) απαιτεί την αναστολή της δραστηριότητας των λειτουργικών ομάδων που δεν ενσωματώνονται στον πεπτιδικό δεσμό. Αυτό επιτυγχάνεται προστατεύοντας κάθε λειτουργική ομάδα με μια ένωση με τρόπο που να επιτρέπει την απομάκρυνση της, κατά βούληση. Αυτές οι ενώσεις αναφέρονται ως προστατευτικές ομάδες.

Αρκετά χαρακτηριστικά είναι απαραίτητα ή επιθυμητά για μια καλή προστατευτική ομάδα. Θα πρέπει να μπορεί να αφαιρείται κατά προτίμηση με ευκολία και με ένα μηχανισμό που δεν οδηγεί σε παράπλευρες αντιδράσεις. Η αναστολή της δραστηριότητας θα πρέπει να είναι πλήρης και καθ' όλη τη σύνθεση και τα προϊόντα που παράγονται από την προστατευτική ομάδα θα πρέπει να διαχωρίζονται από το πεπτίδιο-στόχο. Τόσο η παρασκευή του παραγώγου αμινοξέος όσο και η απομάκρυνση της προστατευτικής ομάδας πρέπει να πραγματοποιείται με διατήρηση της ακεραιότητας της χειρικότητας του αμινοξέος.

Οι λειτουργικές ομάδες που βρίσκονται στα πεπτίδια καθώς και η φύση των προστατευτικών ομάδων που χρησιμοποιούνται για την προστασία τους παρουσιάζονται στο **Σχήμα 4.23**. Οι αμινο- και καρβοξυλομάδες είναι οι πιο διαδεδομένες, ακολουθούμενες από ομάδες υδροξυλίου. Οι καρβοξυλομάδες προστατεύονται ως εστέρες, οι υδροξυλομάδες και

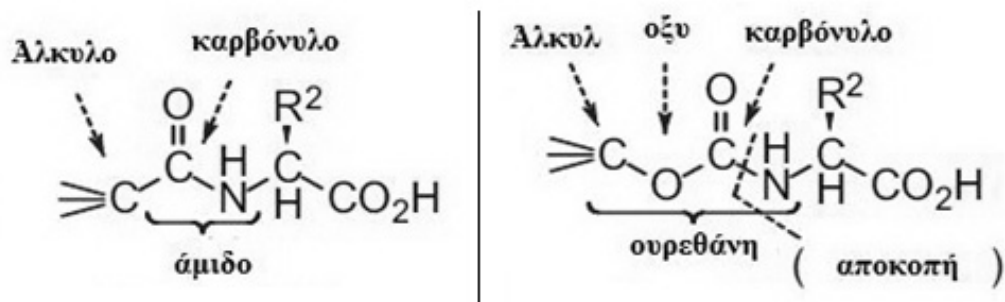
οι σουλφιδρυλομάδες προστατεύονται ως αιθέρες και οι αμινομάδες προστατεύονται ως ουρεθάνες. Η μεθυλθειο- και καρβοξαμιδομάδες είναι αδρανείς κατά τη διάρκεια σχηματισμού του πεπτιδικού δεσμού και οι γουανιδίνο-, ιμιδαζόλο-, και ινδολο- ομάδες είναι ποικίλης φύσεως και δεν προστατεύονται συνήθως με τις ίδιες προσεγγίσεις.



Σχήμα 4.23 Λειτουργικές ομάδες και η φύση των προστατευτικών ομάδων που χρησιμοποιούνται για την προστασία τους^{2A}

4.9 Αμινοπροστατευτικές ομάδες

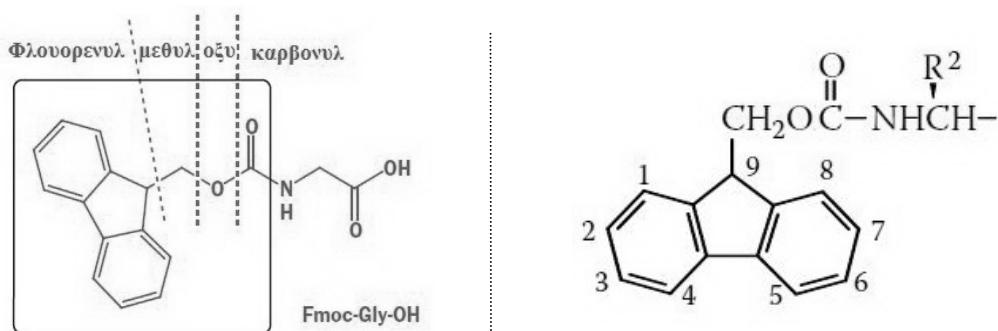
Η φύση του υποκαταστάτη στην αμινομάδα του αμινοξέος με την ελεύθερη καρβοξυλομάδα έχει σημαντική επίπτωση για την πορεία της αντίδρασης. Κυρίως, δύο είδη υποκαταστατών είναι υπό συζήτηση. Ο πρώτος είναι ένας ακυλο υποκαταστάτης στον οποίο το άτομο του αζώτου ενώνεται με ένα αμιδικό δεσμό (**Σχήμα 4.24**). Με σπάνιες εξαιρέσεις, ένας ακυλο υποκαταστάτης δεν μπορεί να αφαιρεθεί χωρίς να επηρεάσει το γειτονικό πεπτιδικό δεσμό, διότι η ακολουθία των ατόμων καρβονυλικός άνθρακας-άζωτο είναι η ίδια με εκείνη σε ένα πεπτίδιο διασπώντας έτσι και τους πεπτιδικούς δεσμούς. Γι' αυτό το λόγο οι ακυλο υποκαταστάτες δεν χρησιμοποιούνται ως προστατευτικές ομάδες. Για να εισάγουν αναστρεψιμότητα, οι πεπτιδοχημικοί εισήγαγαν ένα άτομο οξυγόνου μεταξύ της αλκυλο και της καρβονυλομάδας του ακυλο υποκαταστάτη για την παραγωγή ουρεθάνης, όπου ο N-υποκαταστάτης είναι μια αλκοξυκαρβονυλομάδα (**Σχήμα 4.24**). Οι ουρεθάνες που περιέχουν κατάλληλες αλκυλομάδες, όπως βένζυλο και tert-βουτυλο απομακρύνονται εύκολα απελευθερώνοντας την αμινομάδα. Οι κοινές αλκοξυκαρβονυλομάδες είναι: η Cbz ή Z, η Boc και η Fmoc.



Σχήμα 4.24 N-ακυλο και ουρεθάνο-υποκαταστάτες^{2A}

4.9.1 Fmoc-ομάδα

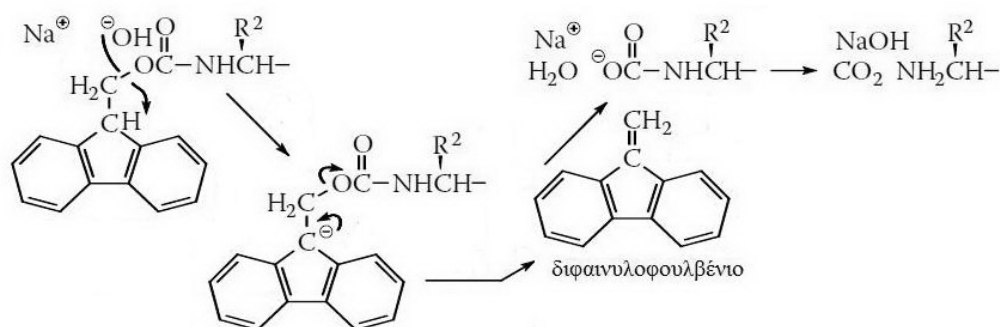
Η Fmoc-ομάδα (Σχήμα 4.25) εισήχθη τη δεκαετία του 1970 στη χημεία πεπτιδίων, αλλά η εφαρμογή της αναφέρθηκε πολύ αργότερα. Είναι μια αρκετά διαδεδομένη αμινοπροστατευτική ομάδα τύπου ουρεθάνης, σταθερή σε οξέα αλλά ευαίσθητη σε ήπιες βάσεις και δευτεροταγείς αμίνες. Η ευαισθησία των Fmoc-προστατευμένων αμινοξέων, ειδικά προς τις δευτεροταγείς αμίνες, επιτρέπει την αποπροστασία των αμινομάδων με αραιά διαλύματα πιπεριδίνης ή διαιθυλαμίνης σε DMF υπό ήπιες συνθήκες. Συνήθως χρησιμοποιείται 20% πιπεριδίνη σε DMF και η αποκοπή της Fmoc-ομάδας γίνεται μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου. Άλλα αντιδραστήρια, όπως το 1,8-διαζαδικυκλο [5,4,0] ενδεκα-7-ένιο (DBU) ή φθοριούχα ιόντα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εναλλακτική λύση.



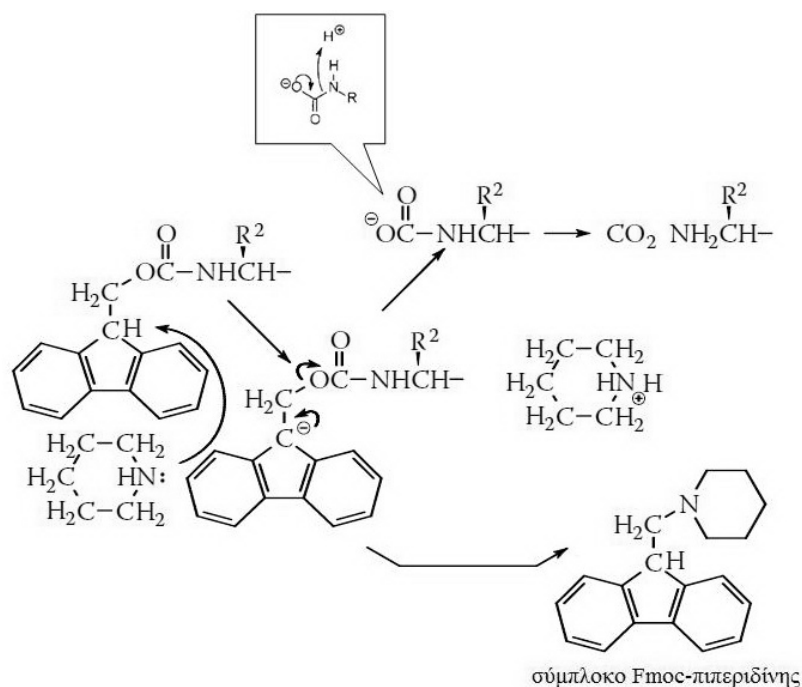
Σχήμα 4.25 Fmoc-προστατευτική ομάδα^{2A}

Η αντίδραση απομάκρυνσης της Fmoc-ομάδας προχωρεί με βάση έναν μηχανισμό β-απόσπασης (E2). Αρχικά αφαιρείται ένα πρωτόνιο από το C-9 άτομο από ένα ιόν υδροξειδίου επειδή αυτό το άτομο υδρογόνου είναι ενεργοποιημένο λόγω της αρωματικότητας των δακτυλίων (Σχήμα 4.26). Ακολουθεί μετατόπιση ηλεκτρονίων που οδηγεί στη διάσπαση του

μορίου, με τη δημιουργία ενός εξωκυκλικού διπλού δεσμού στην ομάδα των τριών δακτυλίων. Το προϊόν διφαινυλοφουλβένιο έχει την τάση να πολυμερίζεται. Στην πράξη, χρησιμοποιείται μια δευτεροταγής αμίνη για την απομάκρυνση του πρωτονίου, η οποία είναι πυρηνόφιλη έτσι ώστε να παγιδεύει την αποπρωτονιωμένη ομάδα που ελευθερώνεται (Σχήμα 4.27). Η πιπεριδίνη, είναι η αμίνη που χρησιμοποιείται για το σκοπό αυτό: αποπρωτονιώνει και επιπλέον ενώνεται με την προστατευτική ομάδα στο τελικό άτομο άνθρακα πριν ο διπλός δεσμός μπορέσει να δημιουργηθεί. Δεν εκλύεται αέριο κατά τη διάρκεια της αποπροστασίας, έτσι το διοξείδιο του άνθρακα ενώνεται με την πιπεριδίνη ως άλας. Η Fmoc-ομάδα είναι ανθεκτική σε οξέα και σε συνδυασμό με τις ήπιες συνθήκες αποκοπής της είναι ορθογωνική με τις ασταθείς σε οξέα προστατευτικές βένζυλο- και tert-βουτυλομάδες.



Σχήμα 4.26 Αποπρωτονίωση με ανιόν υδροξειδίου και δημιουργία διφαινυλοφουλβένιου^{2A}

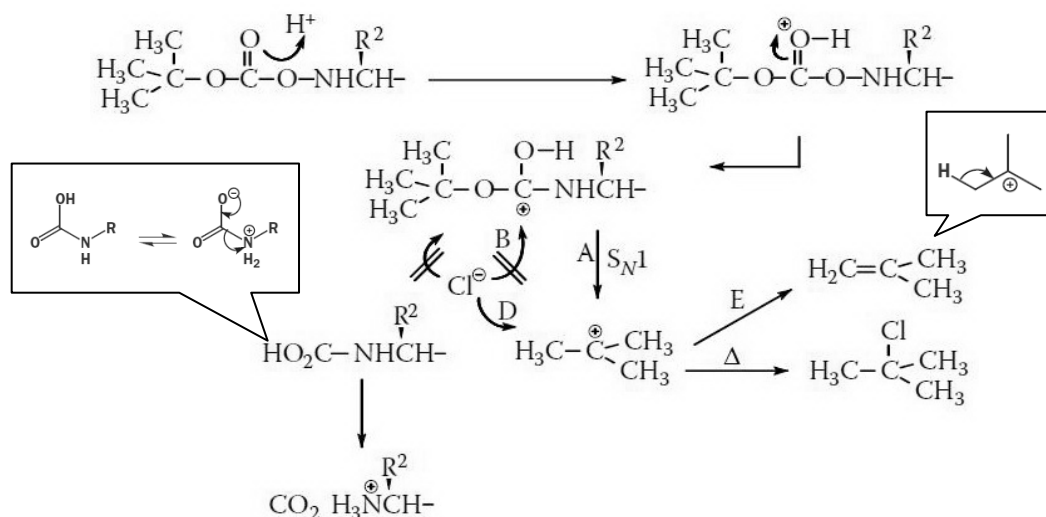


Σχήμα 4.27 Αποπρωτονίωση με πιπεριδίνη και δημιουργία συμπλόκου Fmoc-πιπεριδίνης^{2A}

4.9.2 Boc-ομάδα

Η Boc-ομάδα, διαθέσιμη από τα τέλη της δεκαετίας του 1950, είναι μια άλλη σημαντική αμινοπροστατευτική ομάδα τύπου ουρεθάνης. Είναι ευαίσθητη σε οξέα όπως σε ασθενές υδροχλώριο σε αδρανή διαλύτη.

Η αντίδραση (Σχήμα 4.28) περιλαμβάνει πρωτονίωση του ατόμου οξυγόνου του καρβονυλίου, ακολουθούμενη από μετατόπιση ηλεκτρονίων για να δώσει το ενδιάμεσο καρβοκατιόν που διασπάται επειδή είναι ασταθές, ελευθερώνοντας το σταθερό κατιόν *tert*-βουτυλο. Η διάσπαση του καρβοκατιόντος λαμβάνει χώρα με S_N1 αντίδραση (πορεία Α, αυθόρμητη αναδιάταξη των ηλεκτρονίων με απελευθέρωση του καρβοκατιόντος). Το αντισταθμιστικό ιόν χλωρίου (πορεία Β) εμπλέκεται μόνο μετά το σχηματισμό του τρις-υποκατεστημένου καρβοκατιόντος, που παγιδεύεται ως *tert*-βουτυλοχλωρίδιο (πορεία Δ). Μερικά από τα κατιόντα αναδιατάσσονται σε ισοβουτένιο (πορεία Ε) προτού δεσμευτούν από το χλώριο. Η χρήση υδροχλωρίου για την απομάκρυνση της Boc-ομάδας εφαρμόστηκε αρχικά όπως και όταν αναπτύχθηκε η μέθοδος σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση. Το αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται τώρα συνήθως για την απομάκρυνση της Boc-ομάδας είναι το τριφθοροξικό οξύ σε διχλωρομεθάνιο DCM. Ο μηχανισμός είναι ο ίδιος εκτός από το ότι το καρβοκατιόν δεν αναδιατάσσεται σε ισοβουτένιο, αλλά παγιδεύεται όλο ως *tert*-βουτυλο τριφθοροξικό.



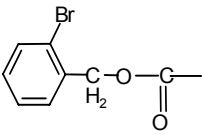
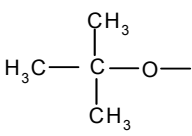
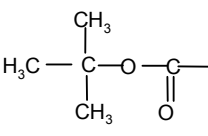
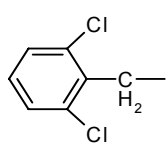
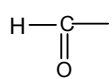
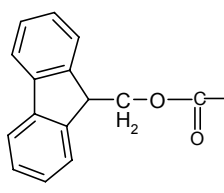
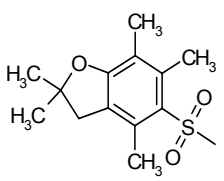
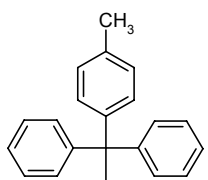
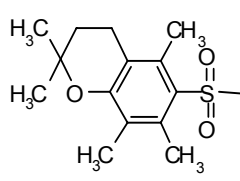
Σχήμα 4.28 Αποπροστασία της Boc-ομάδας^{2A}

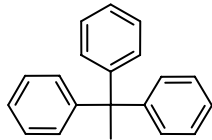
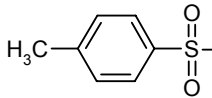
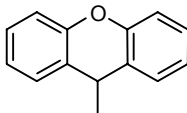
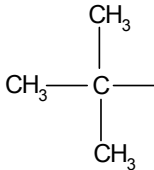
4.10 Προστασία των παράπλευρων δραστικών ομάδων των αμινοξέων

Η επιλογή της κατάλληλης προστατευτικής ομάδας για τις παράπλευρες αλυσίδες των αμινοξέων εξαρτάται από τη φύση των ομάδων αυτών και από τη στρατηγική σύνθεσης που ακολουθείται. Οι ομάδες αυτές πρέπει να είναι σταθερές τόσο στις συνθήκες αποπροστασίας της α-αμινομάδας όσο και στις συνθήκες σχηματισμού του πεπτιδικού δεσμού, καθώς επίσης να απομακρύνονται εύκολα ή/και εκλεκτικά. Μερικά αμινοξέα μπορούν να ενσωματωθούν στην πεπτιδική αλυσίδα χωρίς προστασία της παράπλευρης αλυσίδας τους (Met, Asn και Gln). Οι συνηθέστερες προστατευτικές ομάδες που χρησιμοποιούνται στη σύνθεση των πεπτιδίων φαίνονται στον **Πίνακα 4.2**.

Πίνακας 4.2 Συνηθέστερες προστατευτικές ομάδες που χρησιμοποιούνται για την παράπλευρη προστασία των αμινοξέων

Προστατευτική ομάδα	Συντομογραφία	Τύπος	Αμινοξέα στα οποία χρησιμοποιείται
Acetamidomethyl Ακεταμιδομεθυλομάδα	Acm		Cys
Allyloxycarbonyl Αλλυλοξυκαρβονυλο	Alloc		Lys
Benzyl Βενζυλο	Bzl		Tyr, Thr, Ser
Benzyloxy Βενζυλοξυομάδα	BzlO		Glu, Asp
Benzyloxycarbonyl Βενζυλοξυκαρβονυλο	Z		Lys
Benzyloxymethyl Βενζυλοξυμεθυλο	Bom		His

2-Bromobenzyloxycarbonyl 2-Βρωμοβενζυλοξυκαρβονυλο	2-Br-Z		Tyr
t-Butoxy t-Βουτοξυ	t-BuO		Glu, Asp
t-Butoxycarbonyl t-Βουτοξυκαρβονυλο	Boc		Trp, Lys
2,6-Dichlorobenzyl 2,6-Διχλωροβενζυλομάδα	2,6-Di-Cl-Bzl		Tyr
Formyl Φορμυλο	For		Trp
Fluorenylmethoxycarbonyl Φλουορενυλμεθοξυκαρβόνυλο	Fmoc		Lys
2,2,4,6,7-Pentamethyl- dihydrobenzofuran-5-sulfonyl 2,2,4,6,7-Πενταμεθυλο- διϋδροφουράνο-5-σουλφόνυλο	Pbf		Arg
4-Methyltrityl 4-Μεθυλοτριτυλο	Mtt		Lys
2,2,5,7,8-Pentamethyl- chromane-6-sulfonyl 2,2,5,7,8 Πενταμεθυλο- χρωμανο-6-σουλφόνυλο	Pmc		Arg

Trityl Τριτυλο	Trt		Ser, His, Gln, Cys, Asn,
Tosyl Τοζυλ	Tos		His, Arg
Xan Ξανθένυλο	Xan		Asn, Gln
t-Butyl t-Βουτυλο	tBu		Cys, Ser, Thr, Tyr

4.11 Ορθογωνική Προστασία

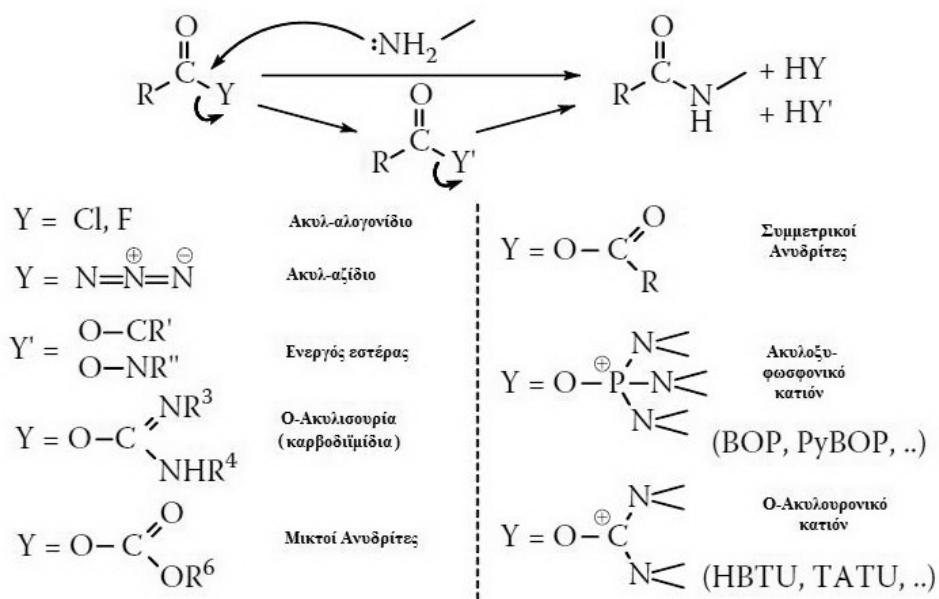
Η επιτυχία στην πεπτιδική σύνθεση εξαρτάται από την απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των α-NH₂ καθώς η πεπτιδική αλυσίδα επιμηκύνεται χωρίς να επηρεάζονται οι προστατευτικές ομάδες των άλλων λειτουργικών ομάδων. Διάφοροι συνδυασμοί προστασίας των ομάδων εφαρμόζονται στην πεπτιδική σύνθεση και χαρακτηρίζονται ως **ορθογωνικά συστήματα**, όταν η προστατευτική ομάδα της α-NH₂ απομακρύνεται με ένα μηχανισμό διαφορετικό από εκείνο που χρησιμοποιείται για την αποπροστασία των άλλων λειτουργικών ομάδων. Επίσης εφαρμόζονται συστήματα που δεν είναι ορθογωνικά, στα οποία οι προστατευτικές ομάδες είναι ευαίσθητες σε οξέα που είναι ισχυρότερα από εκείνα που χρησιμοποιούνται για την απομάκρυνση των α-προστατευτικών ομάδων. Ένα τρίτο επίπεδο ορθογωνικότητας μπορεί να εισαχθεί με την ενσωμάτωση μιας λειτουργικής ομάδας στην παράπλευρη αλυσίδα που δεν είναι ευαίσθητη στα αντιδραστήρια αποκοπής. Ένα παράδειγμα είναι η αλλυλο/ αλλυλοξυκαρβονυλο ομάδα (allyloxycarbonyl). Οι ορθογωνικές προστασίες των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων που χρησιμοποιούνται στην πεπτιδική σύνθεση στερεής φάσης φαίνονται στον **Πίνακα 4.3**.

Πίνακας 4.3 Ορθογωνικές προστασίες παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων που χρησιμοποιούνται στην πεπτιδική σύνθεση στερεής φάσης.

Αμινοξύ	Boc-στρατηγική	Fmoc-στρατηγική
Arg	Mts, Tos	Mtr, Pbf, Pmc
Asn, Gln	Trt, Xan	Trt
Asp, Glu	Obzl, Alloc, OcHx	OtBu, OAllyl
Cys	Acm, Trt, pMeBzl	Acm, tBu, Trt
His	Bom, Tos, Dnp, Trt	Boc, Trt
Lys	Fmoc, Z, 2-Cl-Z	Boc, Tfa, Alloc, ivDde
Ser, Thr	Bzl	tBu
Trp	For, Mts	Boc
Tyr	Bzl, 2,6-di-Cl-Bzl, 2-Br-Z	tBu

4.12 Μέθοδοι σχηματισμού πεπτιδικού δεσμού

Οι διαδικασίες που χρησιμοποιούνται για την ένωση δύο αμινοξέων για το σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού αναφέρονται ως μέθοδοι σύζευξης. Η σύζευξη περιλαμβάνει πυρηνόφιλη προσβολή από την αμινομάδα του ενός αμινοξέος στο ηλεκτρονιόφιλο καρβονυλικό άτομο άνθρακα του άλλου αμινοξέος που έχει ενεργοποιηθεί από την εισαγωγή μιας ηλεκτρονιοελκτικής ομάδας Y. Η ενεργοποίηση μπορεί να γίνει παρουσία ή απουσία του N-πυρηνόφιλου. Ενεργοποίηση απουσία του N-πυρηνόφιλου αναφέρεται ως προενεργοποίηση. Όταν η σύζευξη πραγματοποιείται με την προσθήκη μιας ένωσης σε ένα μείγμα δύο αντιδρώντων, η ένωση αυτή αναφέρεται ως αντιδραστήριο σύζευξης. Οι κοινές ενεργοποιημένες μορφές του αμινοξέος φαίνονται στο **Σχήμα 4.29** με σειρά αυξανόμενης πολυπλοκότητας, η οποία αντιστοιχεί επίσης, με εξαίρεση τους μικτούς ανυδρίτες, με τη σειρά με την οποία οι μέθοδοι παρουσιάστηκαν στη διεθνή βιβλιογραφία.



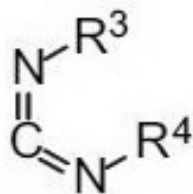
Σχήμα 4.29 Μέθοδοι σύζευξης και ενεργοποιημένες μορφές^{2A}

Η ομάδα ενεργοποίησης Y μπορεί να αποτελείται από ένα άτομο αλογόνου, μια αζιδομάδα, ένα άτομο οξυγόνου που συνδέεται με ένα άτομο άνθρακα με διπλό δεσμό (O=C=), ένα κατιονικό άτομο άνθρακα (O-C⁺) ή άτομο φωσφόρου (O-P⁺) ή ένα άτομο αζώτου που βρίσκεται δίπλα σε ένα άτομο με διπλό δεσμό (O-N-X=). Ορισμένες ενεργοποιημένες μορφές είναι περισσότερο σταθερές από άλλες. Τρεις διαφορετικοί τύποι μπορούν να διακριθούν: (α) Η ενεργοποιημένη μορφή μπορεί να είναι μια σταθερή ένωση μακράς διάρκειας, όπως ένας ενεργοποιημένος εστέρας. (β) Μια ένωση ενδιάμεσης σταθερότητας, όπως ένα άκυλο αλογονίδιο, αζίδιο ή ένας μικτός ή συμμετρικός ανυδρίτης που μπορεί ή δεν μπορεί να απομονωθεί. (γ) Ένα μεταβατικό ενδιάμεσο που δεν είναι απομονώσιμο ούτε ανιχνεύσιμο. Το ενεργοποιημένο παράγωγο υπόκειται αμέσως σε αμινόλυση για να δώσει το πεπτίδιο ή μπορεί να αντιδράσει με ένα δεύτερο πυρηνόφιλο που προέρχεται από τα αντιδρώντα για να δώσει τον πιο σταθερό ενεργό εστέρα ή συμμετρικό ανυδρίτη, που η αμινόλυσή τους παράγει το πεπτίδιο.

4.13 Καρβοδιϊμίδια

Τα καρβοδιϊμίδια είναι από τα πιο συνηθισμένα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια σύζευξης. Η χρήση τους συχνά δημιουργεί συμμετρικούς ανυδρίτες. Χρησιμοποιήθηκαν κατά το παρελθόν στη σύνθεση νουκλεοτιδίων και εισήχθησαν στο χώρο των πεπτιδίων από τους

Sheehan και Hess το 1955. Τα διακυκλοκαρβοδιϊμίδια αποτελούνται από δύο αλκυλαμινομάδες που συνδέονται με διπλούς δεσμούς με το ίδιο άτομο άνθρακα (**Σχήμα 4.30**). Είναι στην πραγματικότητα αφυδατικοί παράγοντες αποσπώντας ένα μόριο νερού από τις καρβοξυλο- και αμινομάδες των δύο αντιδρώντων, με το άτομο οξυγόνου να συνδέεται στο άτομο άνθρακα του καρβοδιϊμιδίου και τα άτομα υδρογόνου στα άτομα του αζώτου, δίνοντας μια *N,N*-δισ-υποκατεστημένη ουρία. Κατά τη διαδικασία σχηματισμού του πεπτιδικού δεσμού το καρβοδιϊμίδιο χρησιμεύει ως φορέας της ακυλομάδας που μπορεί να συνδεθεί στο άτομο του αζώτου της ουρίας, δίνοντας *N*-ακυλοουρία ή στο άτομο οξυγόνου της ουρίας δίνοντας *O*-ακυλοισοουρία. Το πιο γνωστό καρβοδιϊμίδιο είναι το δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμίδιο (DCC, dicyclohexylcarbodiimide) που δημιουργεί την πολύ αδιάλυτη *N,N'*-δικυκλοεξυλοουρία.

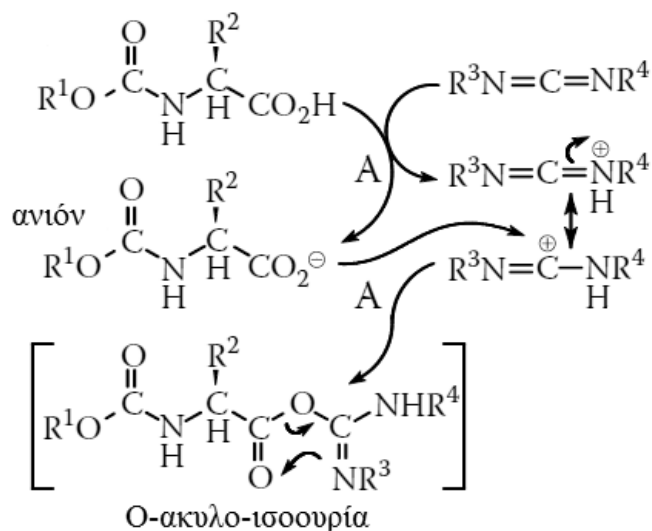


Σχήμα 4.30 Δομή διακυκλοκαρβοδιϊμιδίου^{2A}

4.13.1 Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού *N*-αλκοξυκαρβονυλάμινο αμινοξέων με καρβοδιϊμίδια

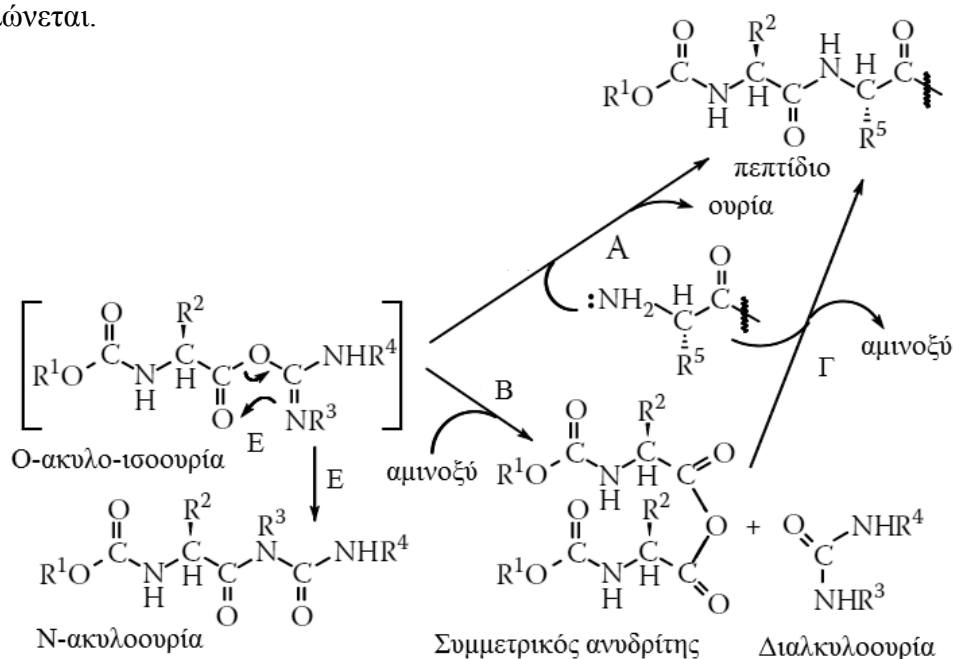
Η πιο γνωστή μέθοδος σχηματισμού πεπτιδικού δεσμού είναι η μέθοδος των καρβοδιϊμιδίων, χρησιμοποιώντας DCC.

Τα καρβοδιϊμίδια περιέχουν δύο άτομα αζώτου που είναι ελαφρώς βασικά, αυτό αρκεί για να προκαλέσει αντίδραση μεταξύ του καρβοδιϊμιδίου και του παραγώγου του αμινοξέος. Σύμφωνα με το μηχανισμό της αντίδρασης η βάση αφαιρεί ένα πρωτόνιο από το παράγωγο αμινοξέος, παράγοντας ένα καρβοξυλικό ανιόν και ένα άτομο αζώτου που φέρει θετικό φορτίο (**Σχήμα 4.31**). Ο απεντοπισμός της πρωτονιωμένης μορφής στο άτομο άνθρακα επάγει την προσβολή του από το καρβοξυλικό ανιόν παράγοντας *O*-ακυλο-ισοουρία. Η *O*-ακυλο-ισοουρία από *N*-αλκοξυκαρβονυλάμινο αμινοξέα ή πεπτίδια δεν έχει ανιχνευθεί γι' αυτό και οι παρενθέσεις. Η ύπαρξή της προκύπτει με βάση την αναλογία των αντιδράσεων καρβοδιϊμιδίων με φαινόλες που δίνουν *O*-ακυλο-ισοουρία.



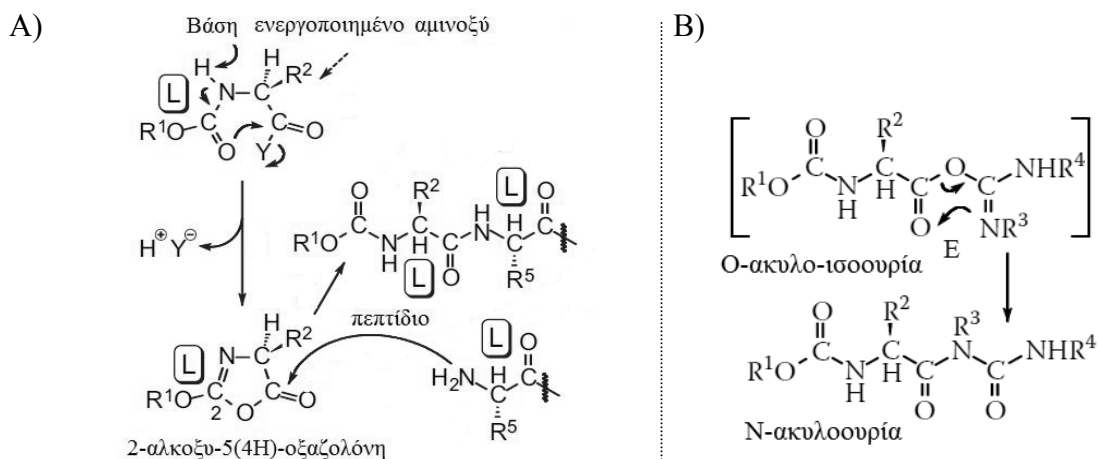
Σχήμα 4.31 Μηχανισμός αντίδρασης σχηματισμού πεπτιδικού δεσμού N-αλκοξυκαρβονυλάμινο αμινοξέων με καρβοδιϊμίδια-Σχηματισμός Ο-ακυλο-ισοουρίας^{2Α}

Η κανονική πορεία των αντιδράσεων για την Ο-ακυλο-ισοουρία είναι να υποστεί αμινόλυση για να δώσει το πεπτίδιο (**Σχήμα 4.32, πορεία Α**). Ωστόσο, υπό ορισμένες προϋποθέσεις, μέρος της Ο-ακυλο-ισοουρίας υφίσταται προσβολή από ένα δεύτερο μόριο του αμινοξέος για να δώσει συμμετρικό ανυδρίτη (**Σχήμα 4.32, πορεία Β**) που αμινολύεται στη συνέχεια για να δώσει το πεπτίδιο και ένα ισοδύναμο του αμινοξέος (**Σχήμα 4.32, πορεία Γ**) που ανακυκλώνεται.



Σχήμα 4.32 Ο-ακυλο-ισοουρία και αντιδράσεις που υφίσταται^{2Α}

Μια τρίτη επιλογή είναι ότι μέρος της Ο-ακυλο-ισοουρίας κυκλοποιείται σε οξαζολόνη (**Σχήμα 4.33 A**) που επίσης δίνει πεπτίδιο με αμινόλυση. Ανεξάρτητα από την πορεία με την οποία η Ο-ακυλο-ισοουρία δημιουργεί πεπτίδιο, η θεωρητική απόδοση είναι ένα ισοδύναμο πεπτιδίου και ένα ισοδύναμο N,N'-διαλκυλοουρίας που ελευθερώνεται. Ωστόσο, μια τέταρτη και ανεπιθύμητη πορεία είναι δυνατή λόγω της φύσης της Ο-ακυλο-ισοουρίας. Η τελευταία περιλαμβάνει ένα βασικό άτομο αζώτου ($C=NR^3$) σε εγγύτητα με το ενεργοποιημένο καρβονύλιο. Αυτό το άτομο μπορεί να δράσει ως πυρηνόφιλο, δημιουργώντας μία αναδιάταξη (**Σχήμα 4.33 B**) που παράγει N-ακυλοουρία που είναι μια σταθερή αδρανής μορφή του αμινοξέος. Η αντίδραση αυτή είναι μη-αναστρέψιμη και καταναλώνει το αρχικό αμινοξύ χωρίς να παράγει πεπτίδιο. Η ακριβής κατάληξη της Ο-ακυλο-ισοουρίας σε οποιαδήποτε σύνθεση εξαρτάται από πολλούς παράγοντες.



Σχήμα 4.33 A) Σχηματισμός οξαζολόνης από N-αλκοξυκαρβονυλάμινο αμινοξέα B) Σχηματισμός N-ακυλοουρίας από O-ακυλο-ισοουρία^{2A}

Άφθονο ίζημα N,N'-δικυκλοεξυλοουρίας καταβυθίζεται μέσα σε λίγα λεπτά σε κάθε αντίδραση που χρησιμοποιείται DCC. Αυτό επιτρέπει την απομάκρυνσή της, ωστόσο είναι μερικώς διαλυτή στους οργανικούς διαλύτες που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση και αδιάλυτη σε υδατικά διαλύματα, οπότε δεν είναι εύκολο να απομακρυνθεί εντελώς από τα προϊόντα της αντίδρασης. Γι' αυτό το λόγο εισήχθησαν τα διαλυτά καρβοδιϊμίδια. Επιπλέον η N,N'-δικυκλοεξυλοουρία παρουσιάζει πρόβλημα στη SPPS διότι δεν μπορεί να απομακρυνθεί με διήθηση. Αυτό οδήγησε στην αντικατάστασή της από το διίσοπροπυλοκαρβοδιϊμίδιο (DIC) που δίνει ουρία που είναι διαλυτή σε οργανικούς διαλύτες.

4.13.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την πορεία των αντιδράσεων καρβοδιϊμιδίων των N-αλκοξυκαρβονυλάμινο αμινοξέων

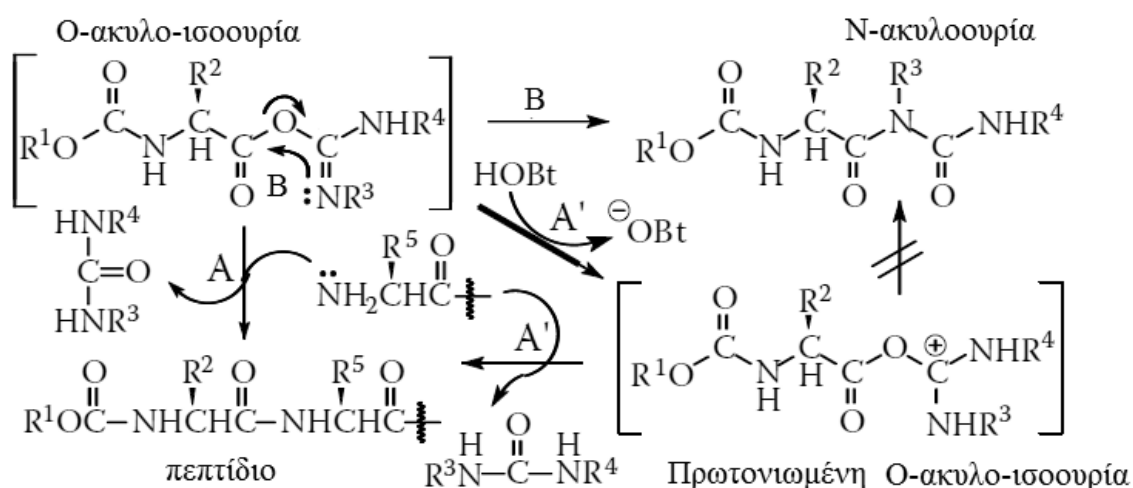
Η πορεία των αντιδράσεων των καρβοδιϊμιδίων εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως: α) τη φύση και τη στοιχειομετρία των αντιδρώντων β) τη φύση του διαλύτη γ) τη θερμοκρασία δ) την παρουσία τριτοταγούς αμίνης και ε) την παρουσία πρόσθετων ή βοηθητικών πυρηνόφιλων.

Το πρώτο ενδιαμέσο στην αντίδραση είναι η O-ακυλο-ισοουρία η τύχη της οποίας εξαρτάται κυρίως από τη διαθεσιμότητα του N-πυρηνόφιλου. Για αντιδράσεις σε διαλύματα, η O-ακυλο-ισοουρία αμέσως δεσμεύεται από το N-πυρηνόφιλο δίνοντας το πεπτίδιο-στόχο, αλλά αν η αντίδραση καθυστερήσει με το N-πυρηνόφιλο για οποιονδήποτε λόγο η O-ακυλο-ισοουρία αντιδρά με ένα άλλο αμινοξύ για να δώσει συμμετρικό ανυδρίτη. Αυτό συμβαίνει όταν δεν υπάρχει N-πυρηνόφιλο, όπως όταν πραγματοποιείται προενεργοποίηση ή όταν η πρόθεση είναι να σχηματιστεί συμμετρικός ανυδρίτης. Επίσης καθυστέρηση στην κατανάλωση της O-ακυλο-ισοουρίας μπορεί να είναι αποτέλεσμα της πιο αργής προσέγγισης ενός N-πυρηνόφιλου που είναι αδιάλυτο στο μέσο αντίδρασης. Στην περίπτωση της SPSPS, ένα τμήμα του πεπτιδίου προέρχεται από το συμμετρικό ανυδρίτη. Υπάρχει και μια δεύτερη συνέπεια αν η αντίδραση με το N-πυρηνόφιλο καθυστερεί: η O-ακυλο-ισοουρία έχει την τάση να κυκλοποιείται σε 2-αλκοξυ-5(4H)-οξαζολόνη ή να αναδιατάσσεται προς N-ακυλοουρία. Ο σχηματισμός οξαζολόνης είναι ασήμαντος. Ωστόσο ο σχηματισμός N-ακυλοουρίας καταναλώνει O-ακυλο-ισοουρία χωρίς να παράγει πεπτίδιο.

4.13.3 1-υδροξυβενζοτρίαζόλιο (HOBt) ως πρόσθετο στις αντιδράσεις καρβοδιϊμιδίων

Στις αντιδράσεις των καρβοδιϊμιδίων, όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, μια ανταγωνιστική ενδομοριακή αντίδραση μπορεί να συμβεί με την οποία το βασικό ίμινο άζωτο της O-ακυλο-ισοουρίας προσβάλλει το καρβονύλιο παράγοντας N-ακυλοουρία χωρίς να σχηματίζει πεπτίδιο (Σχήμα 4.34, πορεία B). Αν αυτό το βασικό άτομο αζώτου πρωτονιωθεί (Σχήμα 4.34, πορεία A') η πυρηνοφιλία του εξαλείφεται και η μετατόπιση O→N της ακυλομάδας δεν μπορεί να συμβεί. Το HOBt αυξάνει την αποδοτικότητα των αντιδράσεων καρβοδιϊμιδίων. Ένας από τους τρόπους με τους οποίους επιτυγχάνεται αυτό είναι η εξάλειψη σχηματισμού της N-ακυλοουρίας. Το HOBt είναι ασθενώς όξινο και πρωτονιώνει την O-ακυλο-ισοουρία, εμποδίζοντας έτσι την ενδομοριακή αντίδραση. Επιπλέον, η πρωτονιωμένη O-ακυλο-ισοουρία είναι καλύτερο ηλεκτρονιόφιλο από την μη-πρωτονιωμένη μορφή ευνοώντας την κατανάλωσή της. Την ίδια στιγμή, η πρωτονίωση από το HOBt δημιουργεί το ανιόν

βενζοτρίαζολυλόξυ (Σχήμα 4.34, πορεία Α'), που είναι πολύ καλός αποδέκτης ηλεκτρονιόφιλων προσφέροντας ταυτόχρονα ένα πρόσθετο και ισχυρότερο πυρηνόφιλο για την κατανάλωση της Ο-ακυλο-ισοουρίας. Η συνέπεια των ανωτέρω είναι ότι η αποπρωτονίωση της Ο-ακυλο-ισοουρίας ευνοεί την ενδομοριακή αντίδραση. Γι' αυτό η παρουσία τριτοταγών αμινών είναι επιβλαβής για τις αντιδράσεις καρβοδιιμιδίων επειδή προωθούν το σχηματισμό Ν-ακυλοουρίας. Ένας πιο πολικός διαλύτης καθώς και υψηλότερη θερμοκρασία επίσης προωθεί το σχηματισμό Ν-ακυλοουρίας. Αυτός είναι και ο λόγος που οι αντιδράσεις καρβοδιιμιδίων πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία χαμηλότερη από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος (0 ° ή 5°). Η O→N μετατόπιση της ακυλομάδας διευκολύνεται επίσης από οποιαδήποτε καθυστέρηση στην κατανάλωση της Ο-ακυλο-ισοουρίας. Ο σχηματισμός της Ν-ακυλοουρίας είναι συνεπώς πιο διαδεδομένος όταν η παράπλευρη αλυσίδα παρεμβαίνει στην προσέγγιση της πυρηνόφιλης αμίνης όπως στην περίπτωση των β-μεθυλαμινο αμινοξέων (Val, Ile, Thr).

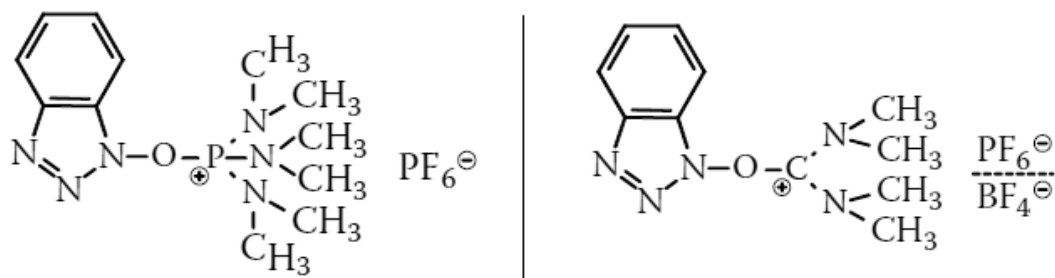


Σχήμα 4.34 Ο ρόλος του HOBt ως πρόσθετο στις αντιδράσεις καρβοδιιμιδίων^{2A}

Επίσης το HOBt αναστέλει την ισομερίωση κατά τη διάρκεια της σύζευξης. Ο εναντιομερισμός προκαλείται από το σχηματισμό και την ενολοποίηση της οξαζολόνης. Το HOBt επιδρά και στις δυο αυτές διαδικασίες. Αναστέλει το σχηματισμό της οξαζολόνης με πρωτονίωση της Ο-ακυλο-ισοουρίας ενισχύοντας την ηλεκτρονιοφιλικότητά της και επιταχύνοντας έτσι την κατανάλωσή της, ενώ την ίδια στιγμή παράγει το οξυβενζοτρίαζολο ανιόν που είναι ένας πρόσθετος δέκτης του ηλεκτρονιόφιλου. Παρόμοια το HOBt αναστέλει την ενολοποίηση της οξαζολόνης πρωτονιώνοντάς την.

4.14 Φωσφονικά και ουρονικά παράγωγα

Στα τέλη της δεκαετίας του 1970 ξεκίνησε μια νέα εποχή στον τομέα της πεπτιδοχημείας, με την εισαγωγή αντιδραστηρίων που ενσωματώνουν το 1-υδροξυβενζοτρίαζόλιο (HOBt) στο μόριο τους. Τα αντιδραστήρια αυτά επιδρούν στις συζεύξεις αποτελεσματικά και με υψηλές ταχύτητες. Περιέχουν στο μόριό τους οξυβενζοτρίαζόλιο που συνδέεται μέσω του ατόμου οξυγόνου σε ένα άτομο φωσφόρου ή άνθρακα που φέρει διαλκυλάμινο υποκαταστάτες ελλειπείς σε αριθμό, έτσι ώστε να είναι θετικά φορτισμένο. Οι υποκαταστάτες είναι είτε διμεθυλάμινο ή πενταμελείς δακτύλιοι πυρολιδίνης που σχηματίζονται από μια τετραμεθυλο αλυσίδα ενωμένη στα δύο άκρα σε άτομο αζώτου. Το θετικό φορτίο εξουδετερώνεται από ένα μη-πυρηνόφιλο αντισταθμιστικό ιόν εξαφθοροφωσφορικό (PF_6^-) ή τετραφθοροβορικό (BF_4^-) (Σχήμα 4.35).



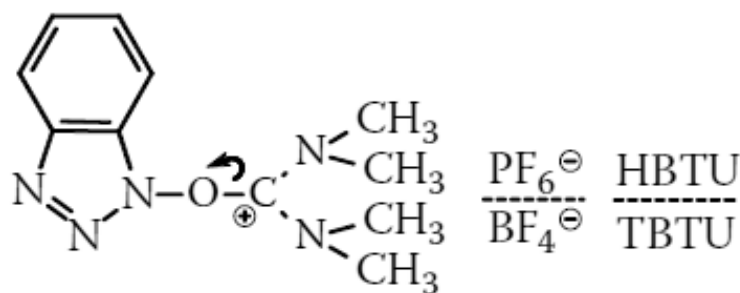
Σχήμα 4.35 Δομή φωσφονικών και ουρονικών αντιδραστηρίων σύζευξης^{2A}

Τα τρις-άζωτο υποκατεστημένα αντιδραστήρια που περιέχουν φώσφορο είναι φωσφορικά άλατα και έτσι ονομάζονται. Τα δις-άζωτο υποκατεστημένα αντιδραστήρια που περιέχουν άνθρακα είναι άλατα καρβενίου, αλλά ονομάζονται διαφορετικά, ως ουρονικά άλατα με βάση το κοινό όνομα της πλήρως υποκατεστημένης μητρικής ένωσης της ουρίας. Όσον αφορά τη δραστηρότητα τους, τα αντιδραστήρια είναι μοναδικά στο ότι δεν αντιδρούν με καρβοξυλομάδες αλλά μόνο με καρβοξυλικά ανιόντα και δεν αντιδρούν με αμινομάδες παρουσία του ανιόντος. Οι αντιδράσεις σύζευξης, ως εκ τούτου, ξεκινούν με μετατροπή των καρβοξυλομάδων σε καρβοξυλικά ανιόντα με την προσθήκη τριτογούς αμίνης. Τα ανιόντα αντιδρούν αμέσως με τα φορτισμένα άτομα των αντιδραστηρίων διότι το βενζοτρίαζολυλοξυ ανιόν είναι μια καλή αποχωρούσα ομάδα. Το ενδιάμεσο που σχηματίζεται έχει ένα υψηλά ενεργοποιημένο καρβονύλιο που ταχύτατα προσβάλεται από το πυρηνόφιλο άζωτο για να δώσει πεπτίδιο ή από το βενζοτρίαζολυλοξυ ανιόν για να δώσει τον βενζοτρίαζολυλο εστέρα

που μπορεί επίσης να είναι ο πρόδρομος του πεπτιδίου. Η ενεργοποίηση και η αμινόλυση λαμβάνουν μέρος στον ίδιο διαλύτη, και δεν υπάρχει καμία γνωστή γενική παράπλευρη αντίδραση σχετιζόμενη με αυτά τα αντιδραστήρια που να μειώνει την απόδοση του πεπτιδίου με κατανάλωση των ενεργοποιημένων ειδών. Όταν προκύψουν αρνητικές εξελίξεις, όπως περιστασιακά συμβαίνει, είναι συνήθως αποτέλεσμα της τριτοταγούς αμίνης που είναι αναγκαία για την προώθηση της αντίδρασης. Νεότερα αντιδραστήρια που περιέχουν άλλα πρόσθετα, όπως N-υδροξυσουξινιμίδιο (N-hydroxysuccinimide) και 1-υδροξυ-7-αζαβενζοτρίαζόλιο έχουν επίσης αναπτυχθεί.

4.14.1 Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού με O-Βενζοτρίαζολ-τετραμεθυλο-ουρονικό εξαφθοροφωσφορικό (HBTU) και τετραφθοροβορικό άλας (TBTU) των N-αλκοξυκαρβονυλάμινο αμινοξέων

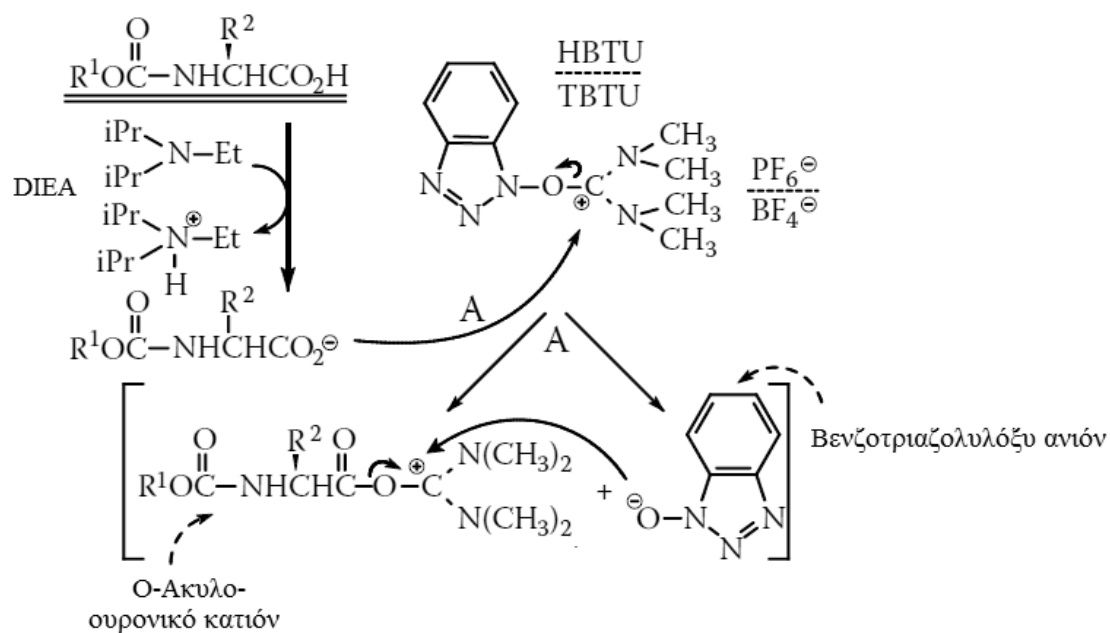
Τα αντιδραστήρια αυτού του τύπου αρχικά προκάλεσαν λίγη προσοχή, ώσπου μια δεκαετία αργότερα αναφέρθηκε η επιτυχής χρήση τους. Σε αυτά τα αντιδραστήρια, οι διμεθυλαμινομάδες συνδέονται σε ένα άτομο άνθρακα. Το αντισταθμιστικό ιόν της αρχικής ένωσης γνωστή ως HBTU είναι το εξαφθοροφωσφορικό. Μια δεύτερη μορφή είναι διαθέσιμη και είναι γνωστή ως TBTU με αντισταθμιστικό ιόν το τετραφθοροβορικό (Σχήμα 4.36).



Σχήμα 4.36 Δομή των HBTU και TBTU^{2A}

Σύμφωνα με το μηχανισμό της αντίδρασης το αμινοξύ μετατρέπεται πρώτα στο ανιόν του με προσθήκη μιας τριτοταγούς αμίνης. Οι αρχικές αναφορές δεν ανέφεραν κάτι για τη φύση της τριτοταγούς αμίνης. Αργότερα η διίσοπροπυλαιθυλαμίνη (DIEA: Diisopropylamine) αναδείχθηκε ως η πιο ιδανική βάση. Η βάση προστίθεται στο μίγμα του αμινοξέος, του άμινο πυρηνόφιλου και του HBTU/TBTU. Στη συνέχεια το καρβοξύ ανιόν προσβάλλει το θετικά φορτισμένο άτομο άνθρακα διώχνοντας την

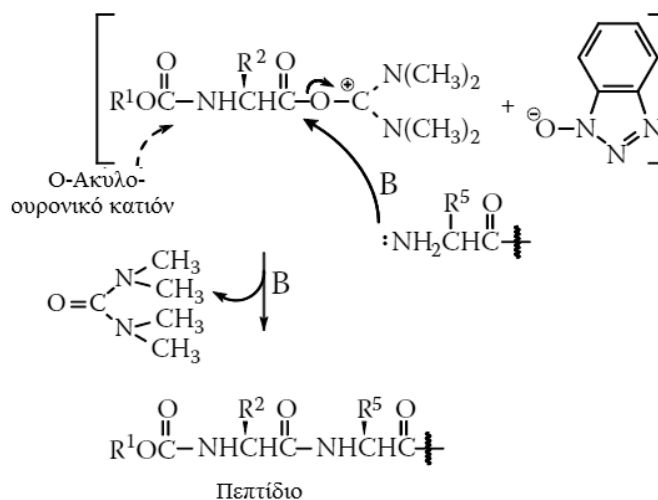
οξυβενζοτρίαζολυλομάδα ως ανιόν και παράγοντας το ακυλοξυκαρβονικό ενδιάμεσο που φέρει ακόμη το θετικό φορτίο (Σχήμα 4.37, πορεία Α).



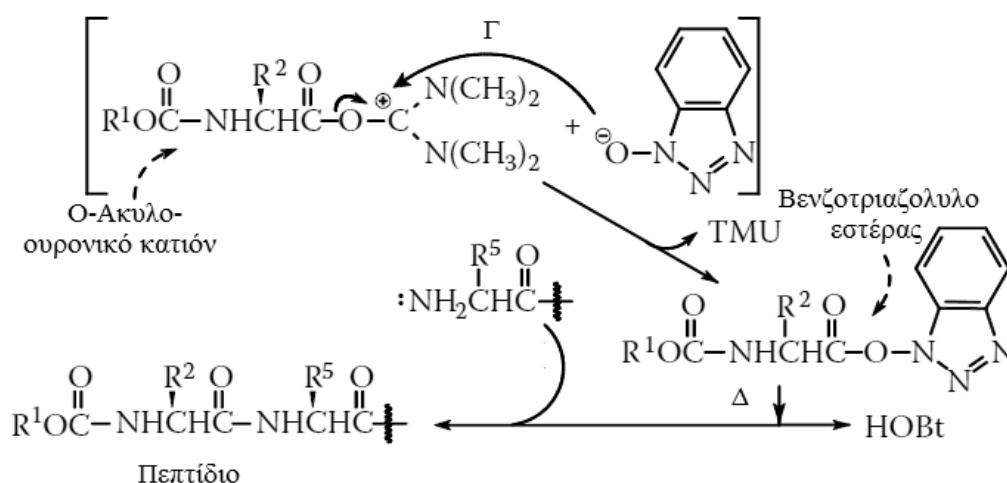
Σχήμα 4.37 Μηχανισμός σχηματισμού πεπτιδικού δεσμού με HBTU και TBTU-Σχηματισμός ενδιάμεσου^{2Α}

Το πεπτίδιο τότε παράγεται από μία από τις δύο πιθανές πορείες, αμινόλυση στο ακυλο καρβονύλιο του ενδιαμέσου (Σχήμα 4.38, πορεία Β) ή προσβολή από το οξυβενζοτρίαζολυλο ανιόν στο ακυλο καρβονύλιο για να δώσει τον βενζοτρίαζόλυλο εστέρα (Σχήμα 4.38, πορεία Γ) που υφίσταται στη συνέχεια αμινόλυση (Σχήμα 4.38, πορεία Δ).

A)



B)



Σχήμα 4.38 A) αμινόλυση του ενδιαμέσου O-Ακυλο-ουρονικού κατιόντος B) σχηματισμός βενζοτριαζόλυλο εστέρας και αμινόλυσή του^{2A}

4.14.2 Το HOBt ως πρόσθετο στις συζεύξεις φωσφονικού και ουρονικού τύπου αντιδραστηρίων N-αλκοξυκαρβονυλάμινο αμινοξέων

Τα φωσφονικού και ουρονικού τύπου αντιδραστήρια δρουν στις συζεύξεις αντιδρώντας αρχικά με το ανιόν του παραγώγου του αμινοξέος. Ο βενζοτριαζόλυλο εστέρας είναι μια από τις δύο πιθανές πρόδρομες ουσίες του πεπτιδίου (**Σχήμα 4.38 B**). Ο Hudson πρότεινε ότι αν ο εστέρας είναι ο πρόδρομος του πεπτιδίου, επιπλέον HOBt με μορφή των ανιόντων θα είναι επωφελής, διότι θα προωθήσει το σχηματισμό εστέρας λόγω επίδρασης της περίσσειας. Έτσι μια παραλλαγή της χρήσης των φωσφονικού και ουρονικού τύπου

αντιδραστηρίων είναι η πραγματοποίηση της αντίδρασης παρουσία HOBt και τριτοταγούς αμίνης που απαιτείται για τη μετατροπή του αμινοξέος σε ανιόν. Η πρακτική αυτή έγινε αρκετά κοινή. Ωστόσο εντοπίστηκαν περιπτώσεις κατά τις οποίες η προσθήκη HOBt σε συζεύξεις παραγώγων βαλίνης και ισολευκίνης ήταν επιβλαβής. Η βλαβερή επίδραση του HOBt μπορεί να εξηγηθεί στη βάση του ότι οι εστέρες που παράγονται από παρεμποδιζόμενα κατάλοιπα αμινολύνονται λιγότερο εύκολα. Οι τελευταίες εξελίξεις φαίνεται να δείχνουν ότι η προσθήκη HOBt σε αντιδράσεις με φωσφονικού και ουρονικού τύπου αντιδραστήρια N-αλκοξυκαρβονυλάμινο αμινοξέων είναι ένα ανοιχτό ερώτημα.

4.15 Χειρικήτητα στην πεπτιδική σύνθεση

Με εξαίρεση τη γλυκίνη, όλα τα άλλα αμινοξέα είναι χειρόμορφα μόρια διότι φέρουν ένα α-άτομο άνθρακα με τέσσερις διαφορετικούς υποκαταστάτες. Τέτοιου είδους άνθρακες καλούνται **ασύμμετρα κέντρα** ή **στερεογονικά κέντρα**. Στη θρεονίνη και ισολευκίνη υπάρχει επίσης ένα στερεογονικό κέντρο στην παράπλευρη αλυσίδα. Συνέπεια αυτών τα αμινοξέα απαντούν σε δυο εναντιομερείς μορφές (L, D) με σχέση αντικειμένου-ειδώλου (κατοπτρικά είδωλα). Οι εναντιομερείς ενώσεις είναι επίσης οπτικά ενεργές ενώσεις διότι τα διαλύματά τους στρέφουν το επίπεδο του πολωμένου φωτός σε αντίθετες κατευθύνσεις.

Η βιολογική δραστηριότητα ενός πεπτιδίου ή μιας πρωτεΐνης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη διαμόρφωση των χειρικών κέντρων των αμινοξέων, έτσι η διατήρηση της ακεραιότητας αυτών των κέντρων είναι πολύ σημαντική στην πεπτιδική σύνθεση. Άρα μια επιτυχημένη πεπτιδική σύνθεση περιλαμβάνει ένα πεπτίδιο που διατηρεί την στερεοϊσομερία του σε όλα τα βήματα της σύνθεσης. Διαφορετικά αντί ενός απλού προϊόντος θα ληφθεί ένα μίγμα στερεοϊσομερών. Ο αριθμός τους σ' ένα πεπτίδιο με n στερεογονικά κέντρα είναι 2^n . Κατά συνέπεια κατά τη σύνθεση ενός όχι πολύ μεγάλου πεπτιδίου θα παραχθεί ένα περίπλοκο μίγμα και ο διαχωρισμός του επιθυμητού προϊόντος από ένα πλήθος παρόμοιων ενώσεων πιθανόν να αποδειχθεί ότι είναι μια παρα πολύ δύσκολη προσπάθεια. Ωστόσο, τα αμινοξέα που χρησιμοποιούνται στη σύνθεση δεν διατηρούν πάντα την στερεοϊσομερία τους κατά τη διάρκεια χειρισμού τους. Η απώλεια της στερεοϊσομερίας τους μπορεί να συμβεί σε οποιοδήποτε στάδιο της σύνθεσης, κατά την προετοιμασία των παραγώγων αμινοξέων, κατά τη σύζευξη ή την αποπροστασία.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφέρουμε πως η ορολογία για την περιγραφή της απώλειας της χειρικήτητας δεν χρησιμοποιείται με μεγάλη ακρίβεια από τους πεπτιδοχημικούς. Οι λόγοι είναι δυο. **Πρώτον**, οι όροι που χρησιμοποιούνται, **ρακεμοποίηση**

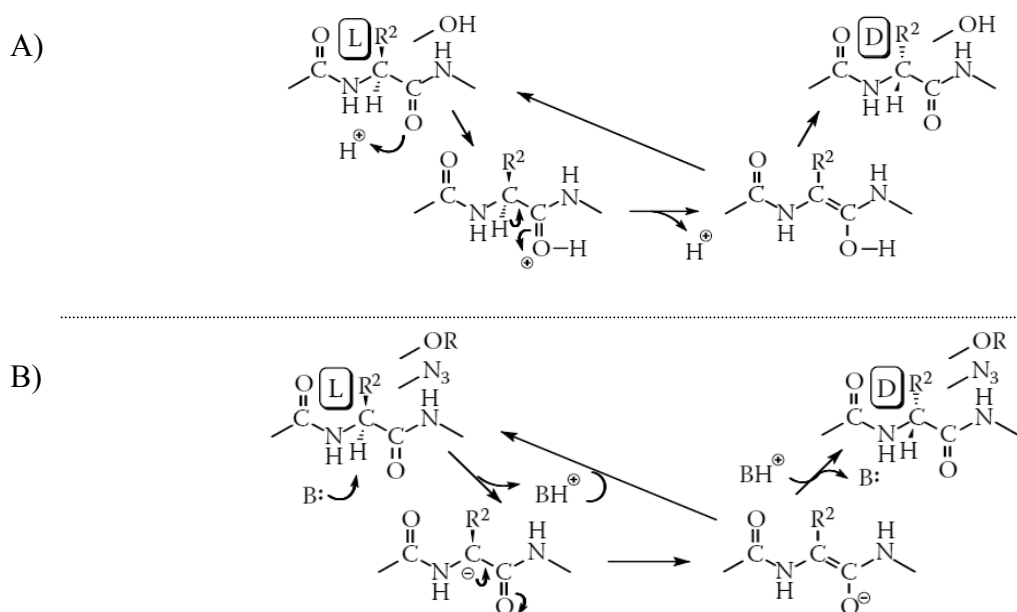
και **επιμερισμός**, περιγράφουν τα γεγονότα από μια διαφορετική άποψη. Ο όρος ρακεμοποίηση στην Οργανική Χημεία σημαίνει τη μετατροπή ενός ισομερούς σε ένα ισόποσο μίγμα δύο ισομερών, ενώ ο επιμερισμός τη μετατροπή ενός ισομερούς σε ένα άλλο ισομερές. **Δεύτερον**, η ρακεμοποίηση ισχύει για ενώσεις με ένα στερεογονικό κέντρο, ενώ ο επιμερισμός ισχύει για ενώσεις με δύο ή περισσότερα στερεογονικά κέντρα, ορισμένα αμινοξέα ανήκουν στην πρώτη ομάδα και άλλα ανήκουν στη δεύτερη ομάδα. Συνέπεια του τελευταίου είναι ότι συχνά κανείς δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει τον ίδιο όρο για να περιγράψει τη διαδικασία ισομερισμού μερικών αμινοξέων, αλλά δυστυχώς ο όρος ρακεμοποίηση χρησιμοποιείται από πολλούς για να δηλώσει όλες τις αλλαγές στη διαμόρφωση και είναι πολύ διαφορετικός από τον πραγματικό του ορισμό. Ο Benoiton¹⁰ πρότεινε τον όρο- **"εναντιομερίωση"**. Ο όρος "εναντιομερίωση" έχει πρόσφατα αναθεωρηθεί από τις επιτροπές ονοματολογίας για να σημαίνει την αλληλομετατροπή των εναντιομερών, υπονοώντας τα κατοπτρικά είδωλα που περιέχουν ένα στερεογονικό κέντρο. Η εναντιομερίωση είναι σύμφωνη με τον όρο επιμερισμό – και οι δυο σημαίνουν τη μετατροπή ενός ισομερούς σε ένα άλλο, εξαλείφοντας έτσι το πρόβλημα της ποσοτικοποίησης. Και οι δύο μπορούν να εφαρμοστούν (η ρακεμοποίηση όχι) στην περίπτωση κατά την οποία η μετατροπή συμβαίνει σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50%. Τέλος, η εναντιομερίωση είναι προτιμότερη από τον όρο ρακεμοποίηση για τον ορισμό της ελλιπούς ισομερίωσης διότι είναι πιο ακριβής, μερική ρακεμοποίηση σημαίνει μερική παραγωγή ενός οπτικά ανενεργού προϊόντος. Γι' αυτό από εδώ και κάτω θα χρησιμοποιείται ο όρος "εναντιομερίωση" για να δηλώσουμε την απώλεια της χειρικότητας.

Η οπτική καθαρότητα και η στερεοχημική ακεραιότητα ενός συνθετικού πεπτιδίου, κατά συνέπεια, εξαρτάται κατά πολύ από το βαθμό της ισομερίωσης κατά τη διάρκεια της σύζευξης ή άλλων τύπων αντιδράσεων ευαίσθητων στην ισομερίωση. Εάν μόνο το 1% ισομεριώνεται σε κάθε ένα αμινοξύ κατά τη διάρκεια της πεπτιδικής σύνθεσης ενός 10-πεπτιδίου, το μείγμα των ισομερών περιέχει μόνο 90,4% του πεπτιδίου με τη σωστή στερεοχημεία. Στην περίπτωση ενός 50-πεπτιδίου, μόνο το 60,5% του επιθυμητού ισομερούς παραλαμβάνεται θεωρητικά. Στην πραγματικότητα, οι "στρατηγικές" της πεπτιδικής σύνθεσης, που αποτελούν το γενικό σχεδιασμό στον προγραμματισμό των συνθέσεων υπαγορεύονται καταρχήν από τις προϋποθέσεις που αφορούν τη διατήρηση της στερεοϊσομέρειας.

4.15.1 Μηχανισμοί ισομερίωσης

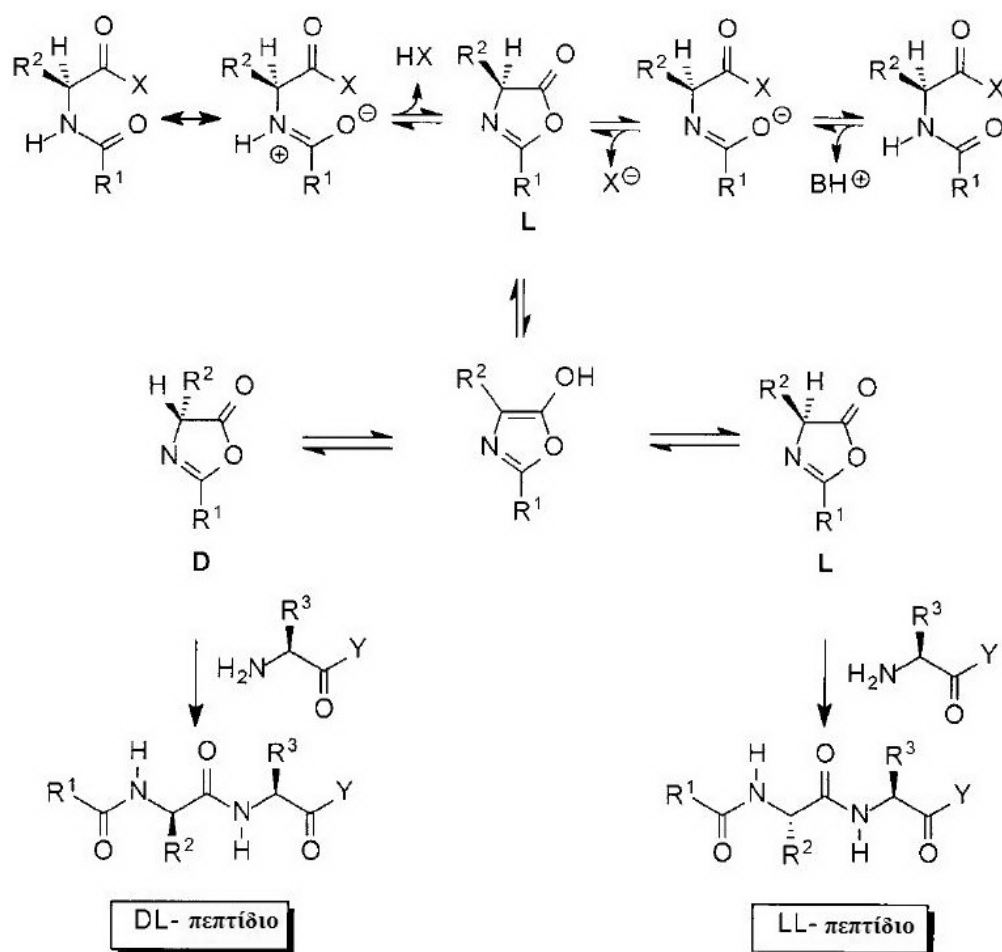
Αν και τα ελεύθερα αμινοξέα είναι συνήθως διαμορφωτικά σταθερά, η κατάσταση γίνεται διαφορετική όταν έχουμε καρβοξυ-ενεργοποιημένα παράγωγα αμινοξέος. Η ισχυρή ενεργοποίηση που προκαλεί η ομάδα Υ στο άτομο άνθρακα του καρβονυλίου λόγω της ισχυρής ηλεκτρονιακής της έλξης επεκτείνεται στο α-άτομο άνθρακα, που είναι ένα χειρικό κέντρο, διευκολύνοντας την απόσπαση του ατόμου του υδρογόνου υπό τη μορφή πρωτονίου. Η απομάκρυνση και η ακόλουθη επαναπρόσδεση αυτού του πρωτονίου αποτελεί ένα πιθανό μηχανισμό εναντιομερισμού. Η εναντιομερίωση μπορεί να συμβεί με **απευθείας ενολοποίηση** του ενεργοποιημένου αμινοξέος, με **ενολοποίηση της σχηματιζόμενης οξαζολόνης** κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων σύζευξης των ενεργοποιημένων αμινοξέων ή και με τους δυο μηχανισμούς. Ο σχηματισμός ενόλης περιλαμβάνει απομάκρυνση του πρωτονίου από το α-άτομο άνθρακα του καταλοίπου, ακολουθούμενη από μετατόπιση του διπλού δεσμού του γειτονικού καρβονυλίου στον α-άνθρακα μειώνοντας έτσι τη χειρικότητα. Επαναπρωτονίωση στο α-άτομο άνθρακα παράγει τις δύο πιθανές διαμορφώσεις.

Η απευθείας ενολοποίηση μπορεί να ξεκινήσει με οξύ ή βάση (**Σχήμα 4.39**) με την καταλυόμενη από βάση ενολοποίηση να συμβαίνει πιο συχνά. Συνήθως, ωστόσο όχι πάντα, συμβαίνει σε ένα κατάλοιπο που είναι υποκατεστημένο τόσο στην αμινομάδα όσο και στην καρβοξυλομάδα. Η τάση για να συμβεί ενολοποίηση εξαρτάται από τη φύση των τριών υποκαταστατών στο α-άτομο άνθρακα, ηλεκτρονιοελκτικές ομάδες ευνοούν τον ιοντισμό.



Σχήμα 4.39 Εναντιομερίωση καταλοίπου με απευθείας ενολοποίηση A) καταλυόμενη από οξύ B) καταλυόμενη από βάση^{2A}

Η πιο σημαντική αιτία εναντιομερισμού κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων σύζευξης προέρχεται από την κυκλοποίηση των καρβοξυ-ενεργοποιημένων παραγώγων αμινοξέων για να σχηματίσουν τη στεreoχημικά ασταθή 5(4H)-οξαζολόνη (Σχήμα 4.40).



Σχήμα 4.40 Εναντιομερίωση μέσω σχηματισμού 5(4H)-οξαζολόνης. R¹: αλκυλο, αρυλο ή αλκοξύ^{5A}

Η τάση για σχηματισμό της 5(4H)-οξαζολόνης συσχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την ομάδα ενεργοποίησης, καθώς και από τις ηλεκτρονικές ιδιότητες της N-ακυλο-ομάδας (R¹-CO-). Ακυλο-κατάλοιπα όπως ακετυλο-, βενζοϋλο- ή τριφθοροακετυλο- ευνοούν το σχηματισμό οξαζολόνης λόγω της πυρηνοφιλίας του οξυγόνου του καρβονυλίου. Η ηλεκτρονιοδοτικότητα του αζώτου της αμινομάδας ενισχύει την πυρηνόφιλη προσβολή του οξυγόνου στην ενεργοποιημένη καρβοξυλομάδα. Η οξαζολόνη (L-) που σχηματίζεται από αυτή τη διαδικασία είναι επιρρεπής στον εναντιομερισμό. Μια οξαζολόνη μπορεί εύκολα να

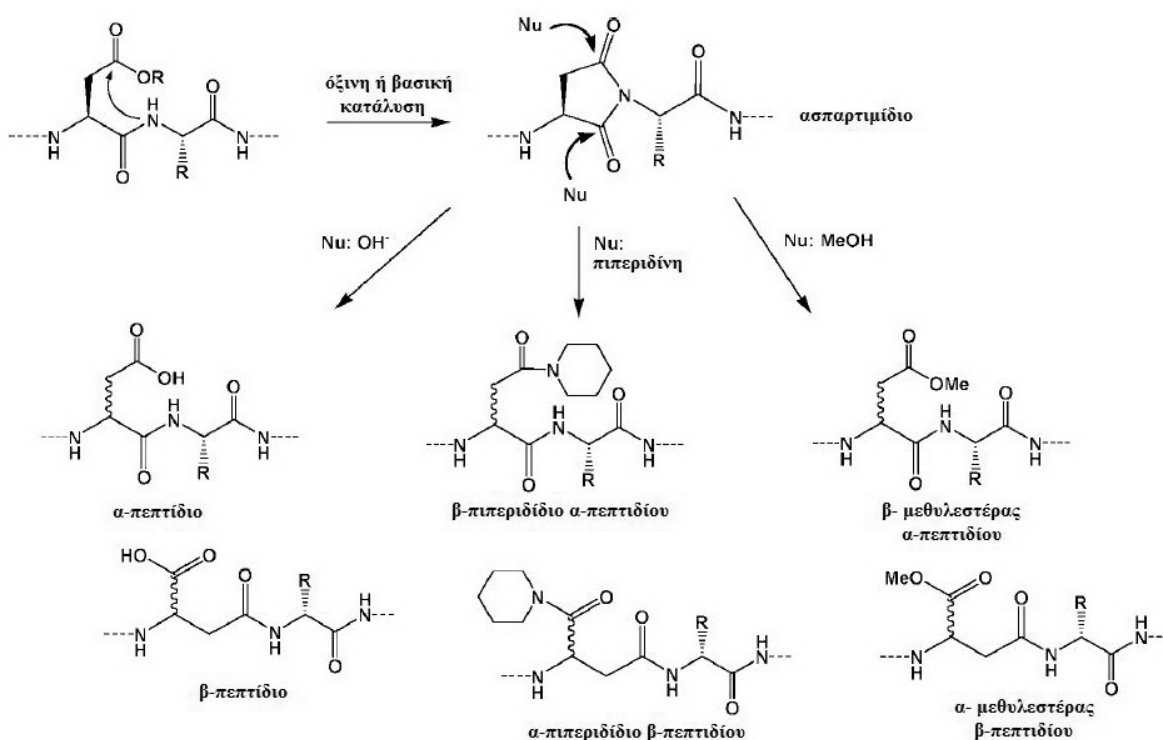
εναντιομεριωθεί υπό τις συνθήκες σύζευξης από μια βασικά-καταλυόμενη αντίδραση μέσω ενός αρωματικού ενδιαμέσου, παράγοντας ένα μίγμα και των δύο εναντιομερών L- και D-. Στο παρελθόν, υπήρχε η άποψη ότι ο σχηματισμός οξαζολόνης δεν συμβαίνει σε N-αλκοξυκαρβονυλο-αμινοξέα. Ωστόσο, αποδείχθηκε το 1977 ότι 2-αλκοξυ-5(4H)-οξαζολόνη μπορεί στην πραγματικότητα να σχηματιστεί κατά την ενεργοποίηση της καρβοξυλομάδας. Αυτά τα παράγωγα φαίνεται να είναι πολύ λιγότερο επιρρεπή στην εναντιομερίωση απ' ό,τι τα 2-αλκυλο ή 2-αρυλο παράγωγα και επίσης υπόκεινται σε αμινόλυση πολύ πιο γρήγορα.

Οι παράγοντες που καθορίζουν την έκταση του εναντιομερισμού περιλαμβάνουν (α) τη δομή της ομάδας που συνδέεται με την α-αμινομάδα του καταλοίπου που πρόκειται να συζευχθεί (β) τη δομή του καταλοίπου που πρόκειται να συζευχθεί (γ) τη διαδικασία σύζευξης (δ) το διαλύτη και (ε) τη θερμοκρασία. Προφανώς, μια ισχυρή ηλεκτρονιο-ελκτική ομάδα που είναι συνδεδεμένη στην α-αμινομάδα αποσταθεροποιεί το πρωτόνιο στο α-άτομο άνθρακα. Όπως προαναφέρθηκε, η πιο σημαντική οδός για εναντιομερίωση περιλαμβάνει το σχηματισμό 5(4H)-οξαζολόνης. Η διαδικασία αυτή ευνοείται από (α) μια ισχυρή ηλεκτρονιοελκτική ομάδα για την ενεργοποίηση της καρβοξυλομάδας προκειμένου να σχηματιστεί ο επόμενος πεπτιδικός δεσμός και (β) μια πλούσια ηλεκτρονιακή πυκνότητα στο άτομο του οξυγόνου της καρβονυλομάδας που χρησιμοποιείται για την προστασία της αμινομάδας. Αυτοί οι δύο παράγοντες ευνοούν την κυκλοποίηση. Η χρήση ουρεθανών για την προστασία των α-αμινομάδων διασκορπίζει την ηλεκτρονιακή πυκνότητα μεταξύ δύο ατόμων οξυγόνου.

4.16 Ανεπιθύμητες Αντιδράσεις κατά τη διάρκεια της πεπτιδικής σύνθεσης-Σχηματισμός ασπαρτιμιδίου

Η σύνθεση των πεπτιδίων σε εργαστηριακή κλίμακα έχει μετατραπεί πλέον σε ρουτίνα εξαιτίας της επανάστασης που έφερε στο χώρο ο Merrifield με τη SPPS καθώς και λόγω της συστηματικής έρευνας που πραγματοποιείται από πολλά ερευνητικά εργαστήρια στο χώρο της χημείας των πεπτιδίων. Παρόλη την μεγάλη ανάπτυξη που έχει επιτευχθεί, η επιτυχής σύνθεση ενός πεπτιδίου προϋποθέτει την παραλαβή του σε αρκετά μεγάλες ποσότητες. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την αποφυγή ή ελαχιστοποίηση των ανεπιθύμητων παράπλευρων αντιδράσεων κατά τη διάρκεια της σύνθεσης, καθώς δημιουργούν διάφορα παραπροϊόντα που μερικές φορές μπορούν να κάνουν ακόμα και δύσκολο τον καθαρισμό του τελικού προϊόντος.

Η κύρια παράπλευρη αντίδραση κατά τη διάρκεια σύνθεσης πεπτιδίων που περιέχουν Asp, είναι ο σχηματισμός ασπαρτιμιδίου (Asi: Aspartimide).¹¹ Ο σχηματισμός ασπαρτιμιδίου συμβαίνει είτε υπο όξινες είτε υπο βασικές συνθήκες (**Σχήμα 4.41**). Στην Boc-στρατηγική ο όξινα καταλυόμενος σχηματισμός ασπαρτιμιδίου έχει αναφερθεί ότι συμβαίνει κάτω από ισχυρά όξινες συνθήκες, όπως με HF ή τριφθορομεθυλοσουλφονικό οξύ- τριφθοροξικό οξύ (TFMSA-TFA) αλλά και σε πιο ήπιες όπως με TFA. Στην Fmoc-στρατηγική ο σχηματισμός ασπαρτιμιδίου συμβαίνει μέσω κατάλυσης από βάση, ιδιαιτέρως με την παρατεταμένη χρήση πιπεριδίνης ή ισχυρότερων βάσεων για την απομάκρυνση της Fmoc-ομάδας. Έχει αποδειχθεί ότι αυτή η ενδομοριακή κυκλοποίηση συμβαίνει σε υψηλότερο ποσοστό κάτω από βασικές συνθήκες.



Σχήμα 4.41 Μηχανισμός σχηματισμού Ασπαρτιμιδίου (Asi) και προϊόντων από την αντίδρασή του με πυρηνόφιλα (Nu: nucleophiles)¹¹

Αρκετές λεπτομερείς μελέτες έχουν συσχετίσει την έκταση σχηματισμού Asi σε πεπτίδια που περιέχουν Asp- με: (i) τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται στην πεπτιδική σύνθεση δηλαδή την επιλογή της αποπροστασίας της Fmoc-ομάδας ή τα αντιδραστήρια σύζευξης (ii) τον τύπο της προστατευτικής ομάδας της παράπλευρης αλυσίδας του Asp (iii) το αμινοξύ που ακολουθεί το Asp στην αλληλουχία -Asp-Xaa- (ο σχηματισμός ιμιδίου έχει

αναφερθεί να συμβαίνει όταν στη θέση Xaa βρίσκεται Gly, Asn, Asp, Ser, Ala, Arg, Cys, His και Gln, ενώ η έκταση της αντίδρασης εξαρτάται από τη στρατηγική σύνθεσης που ακολουθείται, Boc/Bzl ή Fmoc /tBu, και (iv) τη διαμόρφωση του πεπτιδίου.

Διάφορες μέθοδοι έχουν προταθεί με στόχο την ελαχιστοποίηση σχηματισμού Asi. Η χρήση HOBt ή 2,4-δινιτροφαινόλης (DNP: dinitrophenol) μαζί με τη βάση κατά τη διάρκεια απομάκρυνσης της Fmoc-ομάδας μπορεί μερικώς, αλλά όχι πλήρως, να αναστείλει αυτή την παράπλευρη αντίδραση. Επιπλέον, τα δύο αυτά αντιδραστήρια δεν είναι κατάλληλα όταν το πεπτίδιο προσδένεται σε ρητίνη μέσω linker ασταθούς σε βάση. Μια άλλη προσέγγιση περιλαμβάνει την προστασία της αμιδομάδας του Xaa καταλοίπου στην αλληλουχία -Asp-Xaa- με την Hmb (2-υδροξυ-4-μεθοξυβενζυλο) ομάδα. Ωστόσο αυτή η μέθοδος δεν είναι συμβατή με τη Boc-στρατηγική. Επιπλέον δυσκολίες έχουν αναφερθεί στην Fmoc-στρατηγική, συμπεριλαμβανομένων ελλειπών συζεύξεων λόγω του ογκώδους της Hmb-ομάδας καθώς και ατελής αποπροστασία αλυσίδας σε περιπτώσεις αμινοξέων εκτός από γλυκίνη. Γενικά ηλεκτρονιοδοτικές και/ή στερικώς παρεμποδιζόμενες προστατευτικές ομάδες του β-καρβοξυλίου όπως κυκλοεξυλο εστέρας στη Boc-στρατηγική και tert-βουτυλεστέρας στην Fmoc-στρατηγική μπορούν επίσης να ελαχιστοποιήσουν το σχηματισμό Asi. Σε ορισμένες περιπτώσεις και ιδιαίτερα στη σύνθεση μεγάλων πεπτιδίων, έχουν ληφθεί σημαντικά ποσά πεπτιδίων που περιέχουν Asi και σχετιζόμενων υποπροϊόντων.

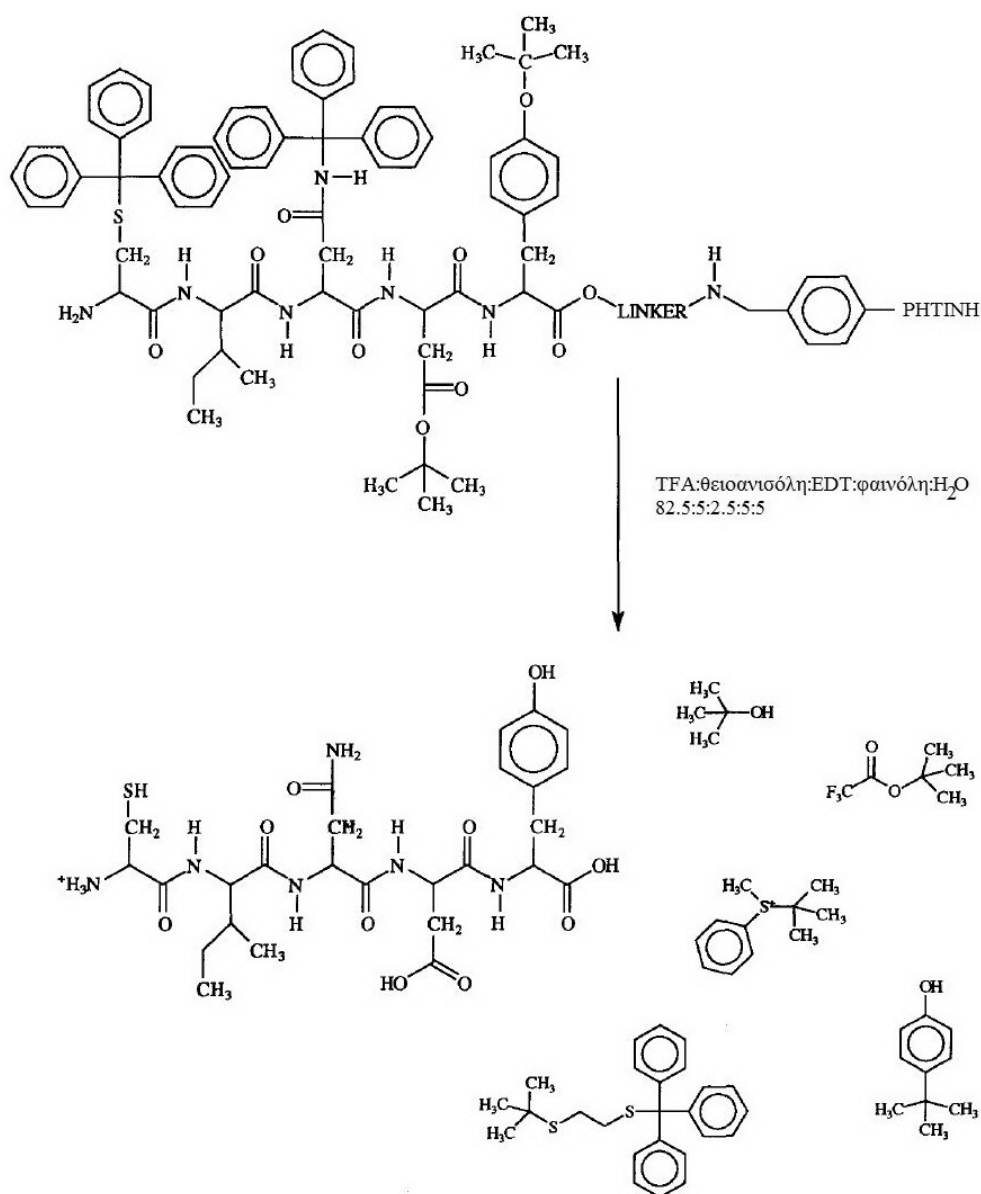
Μόλις σχηματιστεί ο ιμιδο-δακτύλιος η ευαισθησία των δύο καρβονυλικών ατόμων άνθρακα σε πυρηνόφιλα όπως H_2O , πιπεριδίνη, κλπ., οδηγεί στο άνοιγμα του δακτυλίου (Σχήμα 4.41). Η υδρόλυση του ηλεκτριμιδίου παράγει ένα μείγμα α- και β- ασπαρτυλο πεπτιδίων με το τελευταίο να είναι το βασικό προϊόν. Εναντιομερίωση του Asp μπορεί επίσης να συμβεί από την επεξεργασία των Asi πεπτιδίων με ισχυρές βάσεις. Το κύριο πρόβλημα που προκαλείται από την αντίδραση αυτή, εκτός από τη μειωμένη απόδοση του α-πεπτιδίου στόχου είναι ο δύσκολος διαχωρισμός και καθαρισμός των δύο προϊόντων (α- και β-ασπαρτυλο πεπτίδια).

4.17 Αποκοπή πεπτιδίου από τη ρητίνη (Fmoc-στρατηγική)

Η επιτυχής σύνθεση μιας πεπτιδικής αλληλουχίας αντιπροσωπεύει το ήμισυ της πρόκλησης της σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση (SPPS). Μετά τη σύνθεση του πεπτιδίου πάνω στη ρητίνη γίνεται αποπροστασία των παράπλευρων αλυσίδων και αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη. Συνήθως στην Fmoc στρατηγική οι παράπλευρες προστατευτικές ομάδες και οι συνδέτες (linkers) είναι ασταθείς στο τριφθοροξικό οξύ (TFA) (Σχήμα 4.42).

Αν και η Fmoc στρατηγική είναι μια πιο ήπια εναλλακτική λύση από την Boc στρατηγική, το τελικό στάδιο που περιλαμβάνει την ταυτόχρονη απομάκρυνση των παράπλευρων προστατευτικών ομάδων και του πεπτιδίου από τη ρητίνη με χρήση TFA έχει ως αποτέλεσμα την έκθεση των ευαίσθητων αμινοξέων σε μια δεξαμενή δραστικών καρβοκατιόντων. Για την προστασία του πεπτιδίου από τα καρβοκατιόντα που παράγονται προστίθενται στο TFA ορισμένες χημικές ουσίες, γνωστές ως παγίδες αντιδραστήρια (scavengers) που αντιδρούν με τα κατιόντα καθώς αυτά απελευθερώνονται.

Υπο ορισμένες συνθήκες το TFA μπορεί να διασπάσει τόσο το δεσμό μεταξύ linker-πεπτιδίου όσο και το σημείο πρόσδεσης του linker με τη ρητίνη. Κατά συνέπεια, δύο γεγονότα μπορεί να συμβούν. Το ελεύθερο καρβοκατιόν του linker μπορεί αλκυλιώσει την Trp. Επιπλέον, η απόδοση αποκοπής μπορεί να μειωθεί αισθητά λόγω της αντίδρασης μεταξύ ενός καταλοίπου Cys ή Trp και του ιόντος του linker, ενώ εξακολουθούν να συνδέονται με τη ρητίνη. Εναλλακτικά, ορισμένοι linkers έχει διαπιστωθεί ότι δεν είναι τόσο ασταθείς όπως έχει αναφερθεί και γι' αυτό απαιτούν μεγαλύτερους χρόνους αποκοπής ή ισχυρότερα οξέα. Ο Riniker et al απέδωσαν αυτή τη μειωμένη αστάθεια σε εξουδετέρωση του TFA από τους αμιδικούς δεσμούς και πρότειναν έναν κύκλο επεξεργασίας του πεπτιδίου-ρητίνης αρκετές φορές με διάλυμα TFA, διήθηση και προσθήκη νέου TFA για να επιτευχθεί μια ιοντική ισχύ αρκετά υψηλή για πλήρη αποκοπή από την ρητίνη. Εναλλακτικά, ο Kiso et al περιέγραψαν μια διαδικασία χρησιμοποιώντας τετραφθοροβορικό οξύ (HBF_4) για να αυξηθεί η απόδοση αποκοπής χωρίς να θυσιάζεται η ακεραιότητα του πεπτιδίου. Για ένα συγκεκριμένο σύμπλοκο linker-ρητίνη που χρησιμοποιείται για πρώτη φορά προτείνεται η εκτέλεση μιας σειράς πιλοτικών ή μίνι-αποκοπών για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών αποπροστασίας. Ωστόσο, η χρήση linkers που είναι σταθεροί έναντι του TFA επιτρέπει την απομάκρυνση των παράπλευρων προστατευτικών ομάδων πριν την αποκοπή του πεπτιδίου-ρητίνης. Το πλεονέκτημα χρήσης αυτής της μεθόδου για την προστασία τροποποίησης της Trp από tert-βουτυλο ομάδες αποδείχθηκε από τον Sheppard et al.



Σχήμα 4.42 Αντίδραση πλήρους προστατευμένου πεπτιδίου-ρητίνης με TFA παρουσία παγίδων αντιδραστηρίων (scavengers)

Αν και υπάρχει μόνο ένας linker ανά πεπτίδιο, υπάρχει συχνά μια πληθώρα παράπλευρων προστατευτικών ομάδων με τις οποίες ανταγωνίζεται. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες παράπλευρες προστατευτικές ομάδες ασταθείς σε οξέα για την Fmoc στρατηγική είναι η *tert*-βούτυλο (tBu) για το Asp, Glu, Ser, Thr, Tyr, η τριφαινυλομεθυλομαδα (Trt) για Cys, His, Asn και Gln ή 2,4,6-τριμεθοξυβενζυλο (Tmob) για Asn και Gln, η Boc για Lys και Trp και η Pmc (2,2,5,7,8-πενταμεθυλο-chroman-6-

σουλφόνυλο) ή Pbf (2,2,4,6,7-πενταμεθυλοδιϋδροβενζοφουράνιο-5-σουλφόνυλο) για την Arg. Κατά τη διάρκεια αποπροστασίας των παράπλευρων αλυσίδων με TFA, πολύ δραστικά καρβοκατιόντα και σουλφονυλομάδες παράγονται από αυτές τις προστατευτικές ομάδες που μπορούν να αλκυλιώσουν ή να σουλφονιώσουν διάφορα ευαίσθητα αμινοξέα στην αλληλουχία. Το TFA μπορεί να αντιδράσει με tBu κατιόντα και να σχηματίσει tBu-τριφθοροξικό ή να σχηματίσει ένα προϊόν προσθήκης με το scavenger αιθανεδιθειόλη (EDT).

Τα αμινοξέα που είναι πιο ευαίσθητα κατά την αποκοπή του πεπτιδίου με TFA είναι: Met, Tyr και Trp. Η Met είναι ευαίσθητη στην οξείδωση ή στην tert-βουτυλίωση. Η Tyr μπορεί επίσης να tert-βουτυλιωθεί ή να σουλφονιωθεί από μια Pmc ομάδα. Η Trp χωρίς την Boc ως παράπλευρη προστατευτική είναι ευαίσθητη στην οξονόλυση ή στην τροποποίησή της από τον linker από παράπλευρες προστατευτικές ομάδες, ή από τους ίδιους τους scavengers. Σε μελέτη συσχέτισης μεταξύ της εγγύτητας της Trp και της Arg σε μια αλληλουχία και της έκτασης της τροποποίησης της Trp από την Pmc (Arg), ο Lebl et al διαπίστωσαν ότι η τροποποίηση είναι μεγαλύτερη όταν η Trp και η Arg χωρίζονταν από ένα αμινοξύ. Όταν η ευαίσθητη ακολουθία Trp-Xxx-Arg βρισκόταν στο C-τελικό άκρο παρα από όταν βρίσκονταν στο N-τελικό άκρο, η έκταση της τροποποίησης αυξανόταν. Αρκετές έρευνες έχουν αποδείξει το πλεονέκτημα της προστασίας του αζώτου του ινδολίου της Trp με Boc-ομάδα για να ανασταλλεί η ηλεκτρονιόφιλη αλκυλίωση του ινδολίου.

Όταν χρησιμοποιούνται linkers που έχουν σχεδιαστεί να διασπώνται σε χαμηλή συγκέντρωση TFA, είναι πιθανό η ταυτόχρονη αποπροστασία του πεπτιδίου να μην είναι πλήρης. Επεξεργασία δύο σταδίων με TFA έχει προταθεί από τον Barany et al και από τον Rink et al σύμφωνα με την οποία το πεπτίδιο απελευθερώνεται από τη ρητίνη με ένα αραιό διάλυμα TFA (2-5% σε DCM), διηθείται και στη συνέχεια αφήνεται να αναδευτεί σε υψηλή συγκέντρωση TFA (50-95%) για την πλήρη αποπροστασία των παράπλευρων αλυσίδων. Ένα επιπλέον πρόβλημα κατά την απομάκρυνση των παράπλευρων προστατευτικών ομάδων είναι η περιστασιακή απώλεια της αστάθειάς τους. Ανάλογα με τη θέση και τον αριθμό τους σε μια ακολουθία, οι tBu, Trt και κυρίως οι Pmc ομάδες μπορεί να χρειάζονται βοήθεια για την πλήρη απομάκρυνσή τους. Οι Friede et al διαπίστωσαν ότι η Trt ομάδα σε μια N-τελική Asn είναι αρκετά σταθερή έναντι του TFA, ανεξάρτητα από τη σύνθεση του scavenger, απαιτώντας 12 ώρες επεξεργασίας για την πλήρη απομάκρυνσή της. Μερικές φορές δεν είναι δυνατόν να βρεθούν κατάλληλες συνθήκες αποκοπής και στην προκειμένη περίπτωση το πεπτίδιο πρέπει να ξανασυντεθεί χρησιμοποιώντας μια εναλλακτική προστατευτική ομάδα.

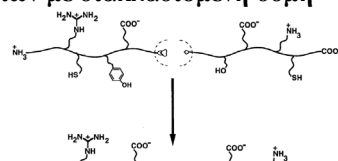
Πολλά από τα προβλήματα που αναφέρθηκαν παραπάνω, συμπεριλαμβανομένων των μη αντιστρεπτών τροποποιήσεων, οξειδώσεων και απομάκρυνση επίμονων προστατευτικών ομάδων μπορούν να παρακαμφθούν με την προσθήκη πυρηνόφιλων scavengers στο TFA. Υπάρχει μια ποικιλία από μίγματα αποκοπής που περιγράφονται στη βιβλιογραφία που έχουν αναπτυχθεί για συγκεκριμένες αλληλουχίες και μπορούν επίσης να είναι εφαρμόσιμα για ένα ευρύ φάσμα πεπτιδίων. Όπως για παράδειγμα το αντιδραστήριο K (82,5% TFA, 5% φαινόλη, 5% H₂O, 5% θειοανισόλη, 2,5% EDT), το αντιδραστήριο R (90% TFA, 5% θειοανισόλη, 3% EDT, 2% ανισόλη) και το αντιδραστήριο B (88% TFA, 5% φαινόλη, 5% H₂O, 2% TIS). Στην περίπτωση που η αμινοξική αλληλουχία δεν εμπεριέχει ευαίσθητα αμινοξέα, η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη γίνεται με διάλυμα 95% TFA, 2,5% H₂O και 2,5% τριϊσοπροπυλοσιλάνιο (TIS).

Έχουν υπάρξει πολλά διαφορετικά είδη πυρηνόφιλων ως scavengers στη βιβλιογραφία. Για παράδειγμα η 1,2-αιθανοδιθειόλη (EDT) ανταγωνίζεται ευνοϊκά το Pmc, τα κατιόντα από linkers, tBu και tBu-τριφθοροξικό, εμποδίζοντας την πρόσδεσή τους στην Trp, Tyr, ή Met. Το EDT επίσης αποτρέπει την επαναπρόσδεση της Trt-ομάδας στην Cys. Η προσθήκη EDT αναστέλλει την προαναφερθείσα αντίδραση της Trp ή Cys με τον linker όταν εξακολουθούν να είναι δεσμευμένα στη ρητίνη και αναστέλλει την οξείδωση της Trp από την όξινα καταλύόμενη οζονόλυση. Όπως προαναφέρθηκε, το EDT μπορεί να σχηματίζει σύμπλοκο με το TFA και να τροποποιήσει την Trp. Το νερό ως scavenger προστίθεται στο μίγμα που περιέχει EDT και αναστέλλει το σχηματισμό αυτού του συμπλόκου. Προστίθεται ως 5% του συνολικού μείγματος TFA, το νερό επίσης μειώνει τη δραστηριότητα των ιόντων tBu και Pmc και εξαλείφει την παράπλευρη αντίδραση απομάκρυνσης της Pmc δηλαδή τη σουλφονίωση της Ser ή Thr. Η θειοανισόλη αποτρέπει την οξείδωση και την tert-βουτυλίωση της Met και επιταχύνει την απομάκρυνση των άρυλο σουλφονίων. Τελευταία προστέθηκε φαινόλη για να βοηθήσει στην περαιτέρω δέσμευση των Pmc κατιόντων.

Κεφάλαιο 5°

**Χημειοεκλεκτικές Μέθοδοι
παρασκευής πρωτεϊνών και
πεπτιδικών μακρομορίων με
διακλαδισμένη δομή
(chemoselective ligation)**

- Χημικές μέθοδοι παρασκευής πρωτεϊνών και πεπτιδικών μακρομορίων με διακλαδισμένη δομή
- Χημειοεκλεκτική σύνδεση (chemoselective ligation)
- Χημειοεκλεκτική σύνδεση με σχηματισμό μη-αμιδικού δεσμού
- Χημειοεκλεκτική σύνδεση με σχηματισμό δεσμού οξίμης
- Σχηματισμός αλδεϋδών σε πεπτίδια
- Παράγοντες που επηρεάζουν τις αντιδράσεις χημειοεκλεκτικής σύνδεσης σχηματισμού δεσμού οξίμης



5.1 Χημικές μέθοδοι παρασκευής πρωτεϊνών και πεπτιδικών μακρομορίων με διακλαδισμένη δομή

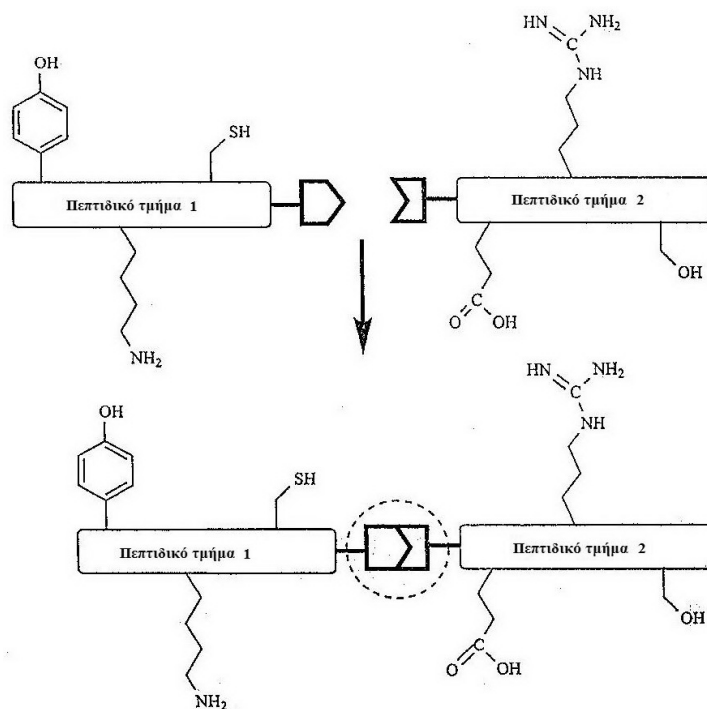
Οι χημικές μέθοδοι παρασκευής πρωτεϊνών και πεπτιδικών μακρομορίων με διακλαδισμένη δομή μπορούν να διακριθούν σε τρεις γενικές κατηγορίες¹: α) τη βήμα-προς-βήμα σύνθεση σε στερεή φάση, όπου το μόριο-στόχος συντίθεται με διαδοχική προσθήκη των αμινοξέων β) τη συγκρότηση πρωτεϊνών μέσω σύνδεσης πλήρως προστατευμένων πεπτιδικών τμημάτων (συγκλίνουσα σύνθεση, convergent synthesis) και γ) τη συγκρότηση πρωτεϊνών μέσω χημειοεκλεκτικής σύνδεσης (chemoselective ligation) απροστάτευτων πεπτιδικών τμημάτων. Η τελευταία μπορεί να υποδιαιρεθεί στις ακόλουθες μεθόδους: i) Χημική σύνδεση (Chemical Ligation) όπου μια μη φυσική δομή (μη-αμιδικός δεσμός) σχηματίζεται π.χ θειοαιθέρας, θειοεστέρα, οξίμη, θειαζολιδίνη και άλλοι δεσμοί, και ii) Φυσική χημική σύνδεση (native chemical ligation) όπου ένας αμιδικός δεσμός δημιουργείται μεταξύ δυο τμημάτων στο σημείο σύνδεσης.

5.2 Χημειοεκλεκτική σύνδεση (chemoselective ligation)

Η πιο σημαντική πρόσφατη εξέλιξη στην ολική σύνθεση μακρομορίων είναι η μέθοδος της χημειοεκλεκτικής σύνδεσης (chemoselective ligation). Η γενική αρχή αυτής της μεθόδου φαίνεται στο **Σχήμα 5.1**. Δυο απροστάτευτα πεπτιδικά τμήματα διαλύονται σε νερό, αντιδρούν μεταξύ τους για να παράγουν το πολυπεπίδιο-στόχο. Μοναδικές δραστικές ομάδες ενσωματώνονται σε κάθε πεπτίδιο κατά τη διάρκεια της σύνθεσής τους σε στερεή φάση, έτσι ώστε μόνο τα σημεία που πρόκειται να ενωθούν να αντιδρούν μεταξύ τους παρουσία πολυάριθμων παράπλευρων ομάδων και χωρίς να χρειάζεται να προστατευτούν.

Άρα δύο είναι τα χαρακτηριστικά της χημειοεκλεκτικής σύνδεσης: (α) η χρήση απροστάτευτων πεπτιδικών τμημάτων και (β) η αντίδραση εκτελείται σε υδατικό περιβάλλον.

Για την επίτευξη της χημειοεκλεκτικής σύνδεσης ένα δραστικό ζεύγος αποτελούμενο από ένα **πυρηνόφιλο** και ένα **ηλεκτρονιόφιλο** προστίθεται στα πεπτίδια κατά τη διάρκεια της σύνθεσής τους σε στερεή φάση. Συνήθως, το πυρηνόφιλο είναι μια ασθενής βάση που είτε έχει pKa σημαντικά χαμηλότερο από τις α- και ε-αμινομάδες ή πυρηνοφιλία πολύ ισχυρότερη από ό,τι η α-αμινομάδα έτσι ώστε η σύνδεση να είναι εκλεκτική σε ρυθμιστικό υδατικό διάλυμα με pH≈7.



Σχήμα 5.1 Σχηματική παρουσίαση χημειοεκλεκτικής σύνδεσης απροστάτευτων πεπτιδικών τμημάτων¹

5.3 Χημειοεκλεκτική σύνδεση με σχηματισμό μη-αμιδικού δεσμού

Για την παρασκευή ενός μεγάλου εύρους πρωτεϊνών και μακρομορίων πεπτιδικής φύσεως με μοριακά βάρη που κυμαίνονται μέχρι και 25 kD σε μέγεθος μέσω εκλεκτικής σύνδεσης, όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, χρησιμοποιείται μια ποικιλία μεθόδων.

Μια γενική προσέγγιση είναι μέσω της χημείας του καρβονυλίου όπου μια ασθενής βάση ενώνεται με μια αλδεΰδη υπό όξινες συνθήκες. Οι αλδεΰδες αντιπροσωπεύουν μια ομάδα ηλεκτρονιόφιλων που δεν βρίσκονται σε πεπτίδια αλλά είναι εξαιρετικά δραστικά ηλεκτρονιόφιλα για να αξιοποιηθούν για χημειοεκλεκτική σύνδεση. Σε υδατικές συνθήκες, ιδίως σε όξινο pH, τα καρβονύλια αντιδρούν με αμίνες για να σχηματίσουν ασταθείς ιμίνες. Για να αποκτήσουμε σταθερά προϊόντα για εκλεκτική σύνδεση, χρησιμοποιούνται ασθενείς βάσεις, ιδίως εκείνες που εμφανίζουν ισχυρή τάση για αντίδραση συμπύκνωσης με αλδεΰδες.

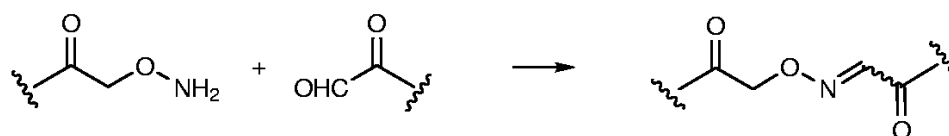
Σε γενικές γραμμές επιθυμητές ασθενείς βάσεις, εκτός από κυστεΐνη, δεν υπάρχουν στις φυσικές αλληλουχίες αμινοξέων και για το σκοπό αυτό διάφοροι τύποι ασθενών βάσεων για σύνδεση με αλδεϋδες έχουν αναπτυχθεί. Ο πρώτος τύπος αποτελείται από συζευγμένες αμίνες που η βασικότητά τους μειώνεται από γειτονικές ηλεκτρονιοελκτικές ομάδες που σταθεροποιούν επίσης τα ίμινο προϊόντα. Αυτός ο τύπος περιλαμβάνει την υδροξυλαμίνη που σχηματίζει οξίμη και υποκατεστημένες υδραζίνες, όπως ακυλδραζίνες που σχηματίζουν υδραζόνη. Ο δεύτερος τύπος περιλαμβάνει 1,2-δισ-υποκατεστημένες χαρακτηριστικές δομές που σχηματίζουν μια κυκλική ένωση σε μια αντίδραση προσθήκης στα ιμινο ενδιάμεσα. Σ' αυτόν τον τύπο περιλαμβάνονται παράγωγα 1,2-αμινοαιθανοθειόλης και 1,2-αμινοαιθανόλης σαν αυτά που βρίσκονται σε N-τελική κυστεΐνη και θρεονίνη. Αυτές οι 1,2-δισ-υποκατεστημένες ασθενείς βάσεις αντιδρούν με αλδεϋδες για να σχηματίσουν ένα δακτύλιο σαν της προλίνης, όπως θειαζολιδινικό από κυστεΐνη και οξαζολιδίνη από θρεονίνη.

Η χρήση απροστάτευτων πεπτιδικών τμημάτων στη χημειοεκλεκτική σύνδεση έχει ένα αριθμό πλεονεκτημάτων. Απροστάτευτα συνθετικά πεπτίδια μέχρι και 60 αμινοξέα μπορούν εύκολα να προετοιμαστούν από την πολύ βελτιστοποιημένη μέθοδο της βήμα-προς-βήμα πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση. Μπορούν να καθαριστούν σε υψηλό βαθμό με διάφορες τεχνικές, όπως την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης (RP-HPLC: Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography) και μπορούν να χαρακτηριστούν αποτελεσματικά με τεχνικές όπως φασματομετρία μαζών με ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό (electrospray mass spectrometry, ESI-MS). Τα απροστάτευτα πεπτίδια συχνά έχουν καλή διαλυτότητα σε υδατικά διαλύματα και αν είναι απαραίτητο η διαλυτότητά τους μπορεί δραματικά να ενισχυθεί με τη χρήση χαοτροπικών μέσων όπως γουανιδίνη-HCl 6M. Προστασία και ενεργοποίηση δεν απαιτείται. Τέλος, η μέθοδος αυτή προσφέρει τη δυνατότητα επιτυχούς σύνθεσης διαφορετικών ομάδων μακρομορίων, όπως κυκλικές πρωτεΐνες, διακλαδισμένα πεπτίδια και σύμπλοκα πρωτεϊνών που είναι δύσκολο να επιτευχθούν μέσα από συμβατικές προσεγγίσεις.^{1A-2A}

5.3.1 Χημειοεκλεκτική σύνδεση με σχηματισμό δεσμού οξίμης

Παρόλο που η χημεία υδροξυλαμίνης-αλδεϋδης χρησιμοποιήθηκε από τον Erlanger et al.² για το σχηματισμό οξίμης και αργότερα από τον Pochon et al.³ για σύζευξη σε συγκεκριμένο σημείο σε πρωτεΐνη, η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στην πεπτιδική σύνθεση από τον Rose⁴ και αργότερα από τους Tuchscherer⁵, Shao και Tam.⁶ Η υδροξυλαμίνη συνήθως εισάγεται χρησιμοποιώντας το εμπορικά διαθέσιμο αμινοξικό οξύ

(NH₂OCH₂COOH) για σχηματισμό οξίμης, το οποίο μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί με προστασία για να ενσωματωθεί σε οποιαδήποτε θέση στην αλληλουχία πεπτιδίου που συντίθεται σε στερεή φάση. Τα πεπτίδια που περιέχουν αμινοξυ-ακέτυλο ομάδες είναι σταθερά ως προς τις συνθήκες αποκοπής με HF και TFA και μπορούν να ενωθούν με αλδεϋδες για να δώσουν δεσμό οξίμης (**Σχήμα 5.2**). Δεσμοί οξίμης έχουν χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή κυκλικών πεπτιδίων με ένωση τελικού άκρου-παράπλευρης αλυσίδας και δενδριμερών πεπτιδίων.^{6,7}



Σχήμα 5.2 Χημειοεκλεκτική σύνδεση που οδηγεί στο σχηματισμό μη-πεπτιδικού δεσμού οξίμης^{2A}

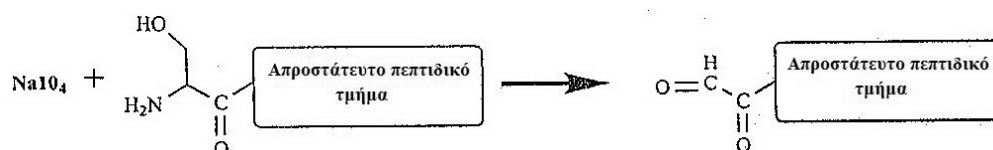
Σε όξινες συνθήκες, οι βασικές παράπλευρες αλυσίδες είναι πρωτονιωμένες και έτσι δεν συμμετέχουν στην αντίδραση. Από την άλλη πλευρά, ασθενείς βάσεις όπως αμινόξυ ομάδες, εξακολουθούν να είναι καλά πυρηνόφιλα, υπό αυτές τις συνθήκες, και είναι άκρως δραστικά προς τις αλδεϋδες. Συνήθως, ένα κατάλοιπο σερίνης (πρόδρομος αλδεϋδης) ενώνεται σε μια παράπλευρη αλυσίδα Lys- και η αμινοξυακετυλομάδα χρησιμοποιείται ως η ασθενής βάση στο N-τελικό άκρο. Υπό ήπιες όξινες συνθήκες αυτή η ασθενής βάση είναι το μόνο δραστικό πυρηνόφιλο παρόν. Οι αμινόξυ ομάδες εύκολα σχηματίζουν σταθερούς δεσμούς οξίμης με αλδεϋδες σε τιμές pH μεταξύ 3 και 5.5.

5.4 Σχηματισμός αλδεϋδών σε πεπτίδια

Το περιοριστικό βήμα στη σύνθεση μέσω χημικής σύνδεσης (Chemical Ligation) γενικά δεν είναι το ίδιο το βήμα της σύνδεσης, που είναι σχετικά απλό για την εκτέλεση, αλλά μάλλον η προετοιμασία των πεπτιδικών τμημάτων ώστε να διαθέτουν τις κατάλληλες ακραίες δραστικές ομάδες.

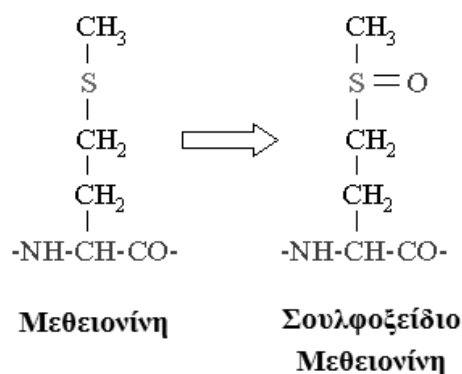
Αν και οι αλδεϋδες μπορούν να παραχθούν από πολλές οργανικές μετατροπές, δύο μέθοδοι για την προετοιμασία N-τελικών πεπτιδικών αλδεϋδών και πέντε μέθοδοι για την προετοιμασία C-τελικών πεπτιδικών αλδεϋδών έχουν αναπτυχθεί ειδικά για τη σύνδεση των πεπτιδίων. Μια μέθοδος για την προετοιμασία της N-τελικής πεπτιδικής αλδεϋδης αξιοποιεί την ευαισθησία των 1-αμινο-2-υδροξυ ενώσεων στην οξείδωση με NaIO₄.⁸ Ελεϋθερα πεπτίδια

που περιέχουν N-τελικά αμινοξέα όπως Ser ή Thr μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρόδρομες ουσίες αλδεΐδης πριν από τη σύνδεση (**Σχήμα 5.3**). Η ευαισθησία της Ser ή Thr στο υπεριοδικό είναι μερικές χιλιάδες φορές μεγαλύτερη από την πιο γνωστή οξείδωση με υπεριοδικό των 1,2-cis-διολών για παράδειγμα στα σάκχαρα των γλυκοπρωτεϊνών.⁹ Αυτό σημαίνει ότι η οξείδωση των 2-αμινο-αλκοολών σε ουδέτερο pH μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσα σε λίγα λεπτά και οδηγεί σε εκλεκτική οξείδωσή τους ακόμη και αν άλλες παράπλευρες αλυσίδες είναι πιθανά ευαίσθητες στην οξείδωση.



Σχήμα 5.3 Οξείδωση με υπεριοδικό της Ser παρουσία ιμιδαζολίου ως ρυθμιστικό (50mM, αντισταθμιστικό ιόν χλωρίου), pH = 6.95, 5 min. Η διακοπή της οξείδωσης έγινε με αιθυλενογλυκόλη¹

Η συγκέντρωση του αντιδραστηρίου πρέπει να είναι πολύ χαμηλή, μόνο σε μικρή περίσσεια πάνω από την 1-αμινο-2-αλκοόλη καθώς και ο χρόνος αντίδρασης διατηρείται μικρός (3 έως 10 min). Είναι επομένως πιθανό να αποφευχθεί η οξειδωτική προσβολή των παράπλευρων αλυσίδων της Met και Trp, αλλά ο κίνδυνος μερικής μετατροπής της Met σε σουλφοξείδιο (**Σχήμα 5.4**) παραμένει και θα πρέπει να διασφαλιστεί με την προσθήκη μεγάλης περίσσειας μεθειονίνης ως συμπλεκτικό αντιδραστήριο (scavenger). Στην πράξη, η μετατροπή της τελικής 1,2-αμινοαλκοόλης (Ser, Thr) σε αλδεΐδη είναι εύκολη και πάρα πολύ συμβατή με το γενικό σχήμα πεπτιδικής σύνθεσης, καθώς τόσο η Boc όσο και η Fmoc στρατηγική μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή πεπτιδίου πρόδρομου αλδεΐδης.



Σχήμα 5.4 Οξείδωση Μεθειονίνης σε σουλφοξείδιο

Η αντίδραση οξείδωσης για το σχηματισμό αλδεϋδης μπορεί να γίνει σε ένα N-τελικό κατάλοιπο αμινοξέος όπως Ser ή Thr είτε σε ένα κατάλοιπο 1-αμινο-αλκοόλης που έχει συνδεθεί μέσω μιας επιλεγμένης παράπλευρης αλυσίδας, όπως με τη μορφή N^ε-Seryl-Lys. Η τελευταία προσέγγιση έχει εφαρμοστεί ευρέως στη σύνθεση μακρομορίων πρωτεϊνικής σύνθεσης διακλαδισμένης δομής αν και ορισμένες από τις συνδέσεις που προκύπτουν δεν είναι πολύ σταθερές σε όξινο ή βασικό pH.

5.5 Παράγοντες που επηρεάζουν τις αντιδράσεις χημειοεκλεκτικής σύνδεσης σχηματισμού δεσμού οξίμης

Δεδομένου ότι αυτές οι αντιδράσεις απαιτούν 1-3 ημέρες για να ολοκληρωθούν, είναι επιθυμητό να αυξήσουμε την ταχύτητα της αντίδρασης και συνεπώς να συντομεύσουμε το χρόνο αντίδρασης. Από τους Tao & Sam⁶ έγιναν διάφορες μελέτες, ως προς την επίδραση του pH του μέσου αντίδρασης, την επίδραση της στοιχειομετρίας της αντίδρασης, τη χρήση οργανικών συν-διαλυτών, την εκτέλεση των αντιδράσεων σε υψηλότερη θερμοκρασία και τη σταθερότητα του δεσμού οξίμης.

α) Επίδραση του pH και της στοιχειομετρίας

Γενικά, ο ρυθμός αντίδρασης αυξάνεται καθώς το pH αυξάνεται. Στην αντίδραση σχηματισμού οξίμης αν και ο ρυθμός αντίδρασης αυξάνεται με την αύξηση του pH ωστόσο η απόδοση του προϊόντος μειώθηκε λόγω παράπλευρων αντιδράσεων. Έτσι το βέλτιστο pH φαίνεται να είναι περίπου στο 5.0. Σε αντίθεση με την επίδραση του pH η επίδραση της στοιχειομετρίας ήταν μη σημαντική.

β) Επίδραση των οργανικών συν-διαλυτών

Ο μηχανισμός κατά το σχηματισμό οξίμης περιλαμβάνει την απόσπαση μορίου νερού μετά την πυρηνόφιλη προσθήκη. Μείωση της περιεκτικότητας του νερού στο μέσο αντίδρασης ευνοεί την ολοκλήρωση της αντίδρασης. Αρκετοί οργανικοί διαλύτες αναμίξιμοι με νερό ελέγχθηκαν. Για την αντίδραση σχηματισμού οξίμης χρησιμοποιήθηκαν ως οργανικοί συν-διαλύτες το ακετονιτρίλιο, το διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) και το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO). Αν και ο συν-διαλύτης ακετονιτρίλιο δεν βελτίωσε το ρυθμό σχηματισμού οξίμης, προσθήκη DMF και DMSO επιτάχυνε σημαντικά την αντίδραση. Σε 50% DMF σε pH 5.7 ο ρυθμός αντίδρασης ήταν 3 φορές μεγαλύτερος απ' ό,τι σε κανονικές

συνθήκες, ενώ σε DMSO ο ρυθμός αυξήθηκε 6.5 φορές. Οι παράπλευρες αντιδράσεις που συνέβησαν σε pH 5.7 δεν παρατηρήθηκαν σε μέσο που περιείχε DMF ή DMSO.

Συνοπτικά πολικοί απρωτικοί διαλύτες όπως DMSO στις αντιδράσεις σχηματισμού οξίμης οδήγησαν στην πιο σημαντική βελτίωση της ταχύτητας. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η προσθήκη αναμίξιμων με νερό πολικών απρωτικών οργανικών συν-διαλυτών είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος να αυξηθεί ο ρυθμός αντίδρασης. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι η χρήση οργανικών συν-διαλυτών έχει δύο επιπλέον πλεονεκτήματα, την πρόληψη συσσώρευσης διαφόρων πεπτιδικών δενδριμερών και στην σύνδεση αδιάλυτων οργανικών μορίων στο νερό με πεπτίδια και πρωτεΐνες.

γ) Επίδραση της θερμοκρασίας

Επειδή φυσιολογική θερμοκρασία χρησιμοποιείται συχνά σε βιοχημικές μελέτες, οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν επίσης στους 37 °C, για να επιταχυνθεί ο ρυθμός αντίδρασης. Για το σχηματισμό δεσμού οξίμης επιτεύχθηκε επιτάχυνση ρυθμού 2-3-φορές. Οι συνδυασμένη επίδραση αυξημένης θερμοκρασίας και οργανικών συν-διαλυτών μελετήθηκε επίσης. Ο διαλύτης DMSO χρησιμοποιήθηκε για το σχηματισμό δεσμού οξίμης. Η πρόσθετη επίδραση στο ρυθμό σχηματισμού οξίμης σε pH 4.7 ήταν πάνω από 3 φορές. Σε pH 5.7 ο ρυθμός αντίδρασης αυξήθηκε 12 φορές και το 90% του προϊόντος διαμορφώθηκε σε λιγότερο από 5 ώρες. Συνοπτικά η αντίδραση ολοκληρώθηκε μέσα σε 6 ώρες υπό τέτοιες συνθήκες.

δ) Σταθερότητα δεσμού οξίμης

Η σταθερότητα του δεσμού οξίμης μελετήθηκε για 24 ώρες σε τέσσερις τιμές pH (3, 5, 7 και 9) σε υδατικό μέσο. Ο δεσμός οξίμης ήταν σταθερός σε όξινο και ουδέτερο μέσο, αλλά το 21% του προϊόντος αποσυντίθεται σε pH 9.

ε) Συμπεράσματα

Η σύνδεση απροστάτευτων πεπτιδικών τμημάτων με βάση τη χημεία ασθενούς βάσης-αλδεϋδης για το σχηματισμό δεσμού οξίμης παρέχει μια γενική χρήσιμη προσέγγιση για τη σύνθεση πεπτιδικών δενδριμερών μεγάλου μοριακού βάρους. Ο ρυθμός των αντιδράσεων μπορεί να αυξηθεί με το χειρισμό των συνθηκών αντίδρασης, όπως με αλλαγή του pH και της θερμοκρασίας και με την προσθήκη οργανικών συν-διαλυτών. Το βέλτιστο εύρος pH αντίδρασης σχηματισμού δεσμού οξίμης είναι 4.7-5.2. Στους 37 °C, ο ρυθμός αντίδρασης

αυξήθηκε 2-3 φορές. Η προσθήκη οργανικών συν-διαλυτών περαιτέρω επιτάχυνε το ρυθμό αντίδρασης. Ο διαλύτης DMSO είναι η πιο χρήσιμος συν-διαλύτης για σχηματισμό δεσμού οξίμης. Όταν οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται στους 37 °C σε μέσο που περιέχει τους κατάλληλους οργανικούς διαλύτες, ο ρυθμός αυξάνεται περισσότερο από 12 φορές. Η σύνδεση μπορεί να ολοκληρωθεί μέσα σε 6 ώρες, σε σύγκριση με τις 1-3 ημέρες που χρειάζονται υπό μη βελτιστοποιημένες συνθήκες. Η προσθήκη οργανικών συν-διαλυτών έχει επίσης ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση συσσώρευσης του πεπτιδίου και τη διαλυτοποίηση οργανικών μορίων.

**ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ
ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ**

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Οι μολυσματικές ασθένειες αποτελούν σοβαρή απειλή για τη δημόσια υγεία. Ειδικότερα, τα συνεχιζόμενα κρούσματα μολυσματικότητας που προκαλούνται από τον υψηλής παθογένειας ιό της γρίπης των πτηνών H5N1 (High Pathogenic Avian Influenza Viruses H5N1: HPAIV H5N1) και τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας HIV (Human Immunodeficiency virus) έχουν αυξήσει κατά πολύ τη θνησιμότητα στον ανθρώπινο πληθυσμό εξαιτίας της έλλειψης αποτελεσματικών θεραπευτικών μέσων.

Από το 1997 και μετά παρατηρήθηκε ευρεία εξάπλωση του HPAIV H5N1. Κρούσματα μόλυνσης παρατηρήθηκαν τόσο μεταξύ των πτηνών όσο και απευθείας μετάδοση του ιού από τα πτηνά στους ανθρώπους. Το τελευταίο φαινόμενο ήταν που αύξησε κατά πολύ την ανησυχία για μια επερχόμενη πανδημία γρίπης εξαιτίας και του υψηλού ρυθμού θνησιμότητας των ανθρώπων που είχαν μολυνθεί. Παράλληλα, ο ιός HIV που προκαλεί την ασθένεια της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας και που αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά τον περασμένο αιώνα (1981) αποτελεί την αιτία μόλυνσης περισσότερων από 42 εκατομμυρίων ανθρώπων σε ολόκληρο τον κόσμο με περισσότερους από 17 εκατομμύρια θανάτους ως αποτέλεσμα των επιπλοκών της μόλυνσης.

Για την επιστημονική κοινότητα η αποτελεσματική αντιμετώπιση της μολυσματικότητας αυτών των ιών αποτελεί μια πρόκληση μιας και ακόμη δεν έχουν βρεθεί αποτελεσματικές θεραπευτικές μέθοδοι. Η καλύτερη επιλογή για να σταματήσει η εξάπλωση των ιών HPAIV H5N1 και HIV είναι η ανάπτυξη ασφαλών και αποτελεσματικών εμβολίων.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι ο σχεδιασμός, η σύνθεση και η ανοσογονική μελέτη υποψήφιων πεπτιδικών επιτόπων των ιών HPAIV H5N1 και HIV με απώτερο σκοπό την ανάπτυξη προστατευτικής ανοσίας και διαγνωστικών.

Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν και μελετήθηκαν:

- πεπτιδικά ανάλογα T-κυτταρικών επιτόπων της αιμοσυγκολλητίνης (HA) H5 του ιού της γρίπης των πτηνών που προσδιορίστηκαν με υπολογιστικές μεθόδους βάσει της συγγενείας τους με μόρια MHC ποντικών. Τα ανάλογα αυτά προσδέθηκαν στον Επαναλαμβανόμενο Ολιγοπεπτιδικό Φορέα (Lys-Aib-Gly)₄ (Sequential Oligopeptide Carrier: SOC_n) **Ac-SOC₄-[2Ac, (NH₂OCH₂C(O))₂]-NH₂** σε δυο αντίγραφα με χημειοεκλεκτική σύνδεση μέσω σχηματισμού δεσμού οξίμης. Τα SOC-συμπλέγματα που συντέθηκαν είναι τα εξής:

- **Ac-SOC₄-[2Ac, (VWTYNAELLK(CH=N-O))₂]-NH₂**
- **Ac-SOC₄-[2Ac, (YNNTNQEDLK(CH=N-O))₂]-NH₂**
- **Ac-SOC₄-[2Ac, (QLRDNAKELK(CH=N-O))₂]-NH₂**

➤ **Ac-SOC₄-[2Ac, (MPFHNIHPLK(CH=N-O))₂]-NH₂**

- τα παραπάνω SOC-συμπλέγματα χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή ανοσοποιήσεων σε ποντίκια με σκοπό την αξιολόγηση της ανοσογονικότητάς τους και την πιθανή ανάπτυξη προστατευτικής ανοσίας.
- επίσης παρασκευάστηκαν και μελετήθηκαν πεπτιδικά ανάλογα που αποτελούν πιθανούς HIV-1 επιτόπους αντισωμάτων που προέρχονται από ασθενείς οι οποίοι είναι φορείς του ιού αλλά δεν έχουν ασθενήσει εδώ και πολλά χρόνια (Long-term non progressors, LTNP). Οι επιτόποι αυτοί προσδιορίστηκαν με την τεχνική έκθεσης σε φάγους (Phage display technique). Τα παραπάνω ανάλογα προσδέθηκαν στον Επαναλαμβανόμενο Ολιγοπεπτιδικό Φορέα (Lys-Aib-Gly)₄ σε τέσσερα αντίγραφα είτε με την βήμα-προς-βήμα πεπτιδική σύνθεση είτε με χημειοεκλεκτική σύνδεση μέσω σχηματισμού δεσμού οξίμης στον φορέα. Τα SOC-συμπλέγματα που συντέθηκαν είναι τα εξής:

➤ **Ac-SOC₄-I-(LSLVPPA)₄-OH**

➤ **Ac-SOC₄-I-(ASAKWSIGPGRA)₄-OH**

➤ **Palm-SOC₄-I-[LLTTNKDGAK(CH=N-O)]₄-NH₂**

➤ **Palm-SOC₄-I-[HKYPC(Acm)STTNC(Acm)SPK(CH=N-O)]₄-NH₂**

- μελετήθηκε η διασταυρωτή αντίδραση των SOC-συμπλεγμάτων με ορούς ασθενών που είναι θετικοί στον ιό HIV-1 (LTNP, HIV-1 progressors) με ELISA. Επίσης έγιναν ανοσοποιήσεις ποντικών με τα SOC-συμπλέγματα και μέσω ELISA έγινε η αξιολόγηση της δραστηριότητας των SOC-συμπλεγμάτων με τους αντι-ορούς των ανοσοποιημένων ποντικών.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 7^ο

Σύνθεση, καθαρισμός και Ταυτοποίηση

- Εισαγωγή
- Γενική πορεία σύνθεσης
- Σύνθεση αναλόγων με χημειοεκλεκτική σύνδεση μέσω σχηματισμού δεσμού οξίμης
- Σύνθεση του φορέα Ac-SOC₄-(Ac₂, Aoa₂)-NH₂ (1)
- Σύνθεση του Ac-SOC₄-[Ac₂, (VWTYNAELLK(CH=N-O))₂]-NH₂ (2)
- Σύνθεση του Ac-SOC₄-[Ac₂, (YNNTNQEDLK(CH=N-O))₂]-NH₂ (3)
- Σύνθεση του Ac-SOC₄-[Ac₂, (QLRDNAKELK(CH=N-O))₂]-NH₂ (4)
- Σύνθεση του Ac-SOC₄-[Ac₂, (MPFHNIHPLK(CH=N-O))₂]-NH₂ (5)
- Σύνθεση του φορέα Palm-SOC₄-(Aoa)₄-NH₂ (6)
- Σύνθεση του Palm-SOC₄-[LLTTNKDGAK(CH=N-O)]₄-NH₂ (7)
- Σύνθεση του Palm-SOC₄-[HKYPC(Acm)STTNC(Acm)SPK(CH=N-O)]₄-NH₂ (8)
- Σύνθεση του Ac-SOC₄-(LSLVPPA)₄-OH (9)
- Σύνθεση του Ac-SOC₄-(ASAKWSIGPGRA)₄-OH (10)

7.1 Εισαγωγή

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή τα πεπτιδικά ανάλογα που παρασκευάστηκαν και μελετήθηκαν είναι τα εξής:

1. Ac-SOC₄-(Ac₂, Aoa₂)-NH₂ (Φορέας)
2. Ac-SOC₄-[Ac₂, (VWTYNAELLK(CH=N-O))₂]-NH₂ (SOC₄-T₂ επίτοπος της HA H5N1)
3. Ac-SOC₄-[Ac₂, (YNNTNQEDLK(CH=N-O))₂]-NH₂ (SOC₄-T₄ επίτοπος της HA H5N1)
4. Ac-SOC₄-[Ac₂, (QLRDNAKELK(CH=N-O))₂]-NH₂ (SOC₄-T₆ επίτοπος της HA H5N1)
5. Ac-SOC₄-[Ac₂, (MPFHNIHPLK(CH=N-O))₂]-NH₂ (SOC₄-T₈ επίτοπος της HA H5N1)
6. Palm-SOC₄-(Aoa)₄-NH₂ (Φορέας)
7. Palm-SOC₄-[LLTTNKDGAK(CH=N-O)]₄-NH₂ (SOC₄-επίτοπος της gp120 HIV)
8. Palm-SOC₄-[HKYPC(Acm)STTNC(Acm)SPK(CH=N-O)]₄-NH₂ (SOC₄-επίτοπος της gp120 HIV)
9. Ac-SOC₄-(LSLVPPA)₄-OH (SOC₄-επίτοπος της gp120 HIV)
10. Ac-SOC₄-(ASAKWSIGPGRA)₄-OH (SOC₄-επίτοπος της gp120 HIV)

Η σύνθεση των πεπτιδικών αναλόγων (1), (6), (9), (10) πραγματοποιήθηκε εξ' ολοκλήρου με τη βήμα-προς-βήμα πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση κατά Merrifield. Ειδικότερα, τα ανάλογα (1), (6) συντέθηκαν με βάση την Fmoc/tBu στρατηγική σε Rink

Amide AM ρητίνη, ενώ τα ανάλογα (9), (10) συντέθηκαν με βάση την Boc/Bzl στρατηγική χρησιμοποιώντας ως πολυμερικό υπόστρωμα την Boc-Gly-PAM ρητίνη.

Η σύνθεση των αναλόγων (2)-(5) και (7), (8) πραγματοποιήθηκε σε τρία στάδια. Στο **πρώτο στάδιο** πραγματοποιήθηκε η σύνθεση των επιμέρους τμημάτων (φορέων, επιτόπων) με τη βήμα-προς-βήμα πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση κατά Merrifield ακολουθώντας την Fmoc/tBu στρατηγική και χρησιμοποιώντας ως πολυμερικό υπόστρωμα την Rink Amide AM ρητίνη. Στο **δεύτερο στάδιο** πραγματοποιήθηκε η δημιουργία αλδεϋδομάδας στους πεπτιδικούς επιτόπους μέσω οξείδωσης και στο **τρίτο στάδιο** έγινε η σύνδεση των αλδεϋδικών επιτόπων με τους φορείς με χημειοεκλεκτική σύνδεση μέσω σχηματισμού δεσμού οξίμης.

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της σύνθεσης των πεπτιδικών αναλόγων είναι οι εξής:

- 1) Μεθανόλη (MeOH)
- 2) Διχλωρομεθάνιο (DCM)
- 3) Διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) σε molecular sieves για τη δέσμευση δευτεροταγών αμινών που προκύπτουν ως παραπροϊόντα της διάσπασής του.
- 4) Τριφθοροξικό οξύ (TFA) για την αποπροστασία της Boc-ομάδας.
- 5) Διϊσοπροπυλαιθυλαμίνη (DIEA)
- 6) Πιπεριδίνη για την αποπροστασία της Fmoc-ομάδας

Ως αντιδραστήρια σύζευξης χρησιμοποιήθηκαν το TBTU (βενζοτρίαζολ-τετραμεθυλο-ουρονικό τετραφθοροβορικό), το HBTU (βενζοτρίαζολ-τετραμεθυλο-ουρονικό εξαφθοροφωσφορικό) και το DIC (διϊσοπροπυλοκαρβοδιϊμίδιο). Ως βοηθητικό πυρηνόφιλο κατά τη διάρκεια των συζεύξεων χρησιμοποιήθηκε το HOBt (1- υδρόξυβενζοτρίαζόλιο).

Τα αμινοξέα που χρησιμοποιήθηκαν στην Fmoc-στρατηγική έφεραν τις εξής προστασίες: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Asp(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Lys(Ac)-OH, Fmoc-Lys(Mtt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Aib-OH, Fmoc-Cys(Acm)-OH.

Στην Boc στρατηγική τα αμινοξέα χρησιμοποιήθηκαν με τις εξής προστασίες: Boc-Gly-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Trp-OH, Boc-Arg(Tos)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Aib-OH, Boc-Val-OH, Boc-Ala-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Pro-OH, Boc-Lys(Fmoc)-OH.

7.2 Γενική πορεία σύνθεσης

Η σύζευξη των αμινοξέων έγινε χρησιμοποιώντας αμινοξύ/HOBt/HBTU/DIEA σε αναλογία 3/3/3/6 σε μίγμα διαλυτών DCM:DMF σε αναλογία 2:1. Ο έλεγχος ολοκλήρωσης της σύζευξης καθώς και της απομάκρυνσης της Fmoc ή Boc ομάδας έγινε με το test Kaiser. Είναι ημιποσοτικό test με το οποίο πιστοποιείται η παρουσία ελεύθερων αμινομάδων στην πεπτιδορρητίνη και γίνεται σε δοκιμαστικό σωλήνα με την προσθήκη μερικών κόκκων πεπτιδορρητίνης και πέντε σταγόνων από καθένα από τα παρακάτω διαλύματα:

- α) 2 ml KCN 0.001M σε 100 ml πυριδίνη
- β) 5 g νυνιδρίνης σε 100 ml αιθανόλη
- γ) 80 g φαινόλης σε 20 ml αιθανόλη

Ο δοκιμαστικός σωλήνας τοποθετείται σε υδρόλουτρο των 100° C για τουλάχιστον 30 sec. Εμφάνιση μπλε κόκκων (ή καφέ σε ορισμένες περιπτώσεις αμινοξέων) πιστοποιεί την ύπαρξη ελεύθερων αμινομάδων [θετικό (+) test Kaiser], ενώ στην περίπτωση που οι κόκκοι παραμένουν λευκοί [αρνητικό (-) test Kaiser] πιστοποιείται ότι η σύζευξη του αμινοξέος έχει ολοκληρωθεί και δεν υπάρχουν ελεύθερες αμινομάδες στην πεπτιδορρητίνη.

Για τα ανάλογα (9), (10) πραγματοποιήθηκε μείωση της αρχικής υποκατάστασης της ρητίνης, με σκοπό τη μείωση των στερεοχημικών παρεμποδίσεων. Η διαδικασία περιελάμβανε αρχικά απομάκρυνση της Boc-ομάδας (Boc-Gly-PAM ρητίνη) και πρόσδεση του επόμενου αμινοξέος (Fmoc-προστατευμένο), χρησιμοποιώντας ποσότητα ίση με την υποκατάσταση που θέλουμε να επιτύχουμε. Ακολούθησε ακετυλίωση των ελεύθερων αμινομάδων της πεπτιδορρητίνης που απέμειναν, χρησιμοποιώντας οξικό ανυδρίτη σε πυριδίνη. Ο προσδιορισμός της νέας υποκατάστασης έγινε σε δύο δείγματα πεπτιδορρητίνης (9,65 mg και 10,38 mg αντίστοιχα). Πρώτα απομακρύναμε την Fmoc-προστατευτική ομάδα με διάλυμα 40% πιπεριδίνη/DMF. Η απομάκρυνση έγινε τοποθετώντας τα δυο δείγματα πεπτιδορρητίνης σε δυο δοκιμαστικούς σωλήνες και προσθέτοντας από 5ml διαλύματος 40% πιπεριδίνη/DMF τα αφήσαμε να αναδεύονται για 30 min. Ακολούθως λάβαμε 300 μl από τα δυο υπερκείμενα και τα αραιώσαμε με 2,7 ml διαλύματος 40% πιπεριδίνη/DMF. Τέλος ακολούθησε φωτομέτρηση στα 300,6 nm. Η υποκατάσταση υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\text{mmoles NH}_2 = (\alpha \times V) / (\epsilon \times g \times l)$$

- | | |
|-------------------------------------|-------------------------------------|
| α: μέγιστη απορρόφηση στα 300,6 nm | g: βάρος δείγματος σε γραμμάρια (g) |
| V: ο όγκος μετά την αραιώση | l: μήκος κυψελίδας σε εκατοστά (cm) |
| ε: συντελεστής μοριακής απορρόφησης | |

Στην περίπτωση της Fmoc στρατηγικής η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη καθώς και η ταυτόχρονη αποπροστασία των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων επιτυγχάνεται με κατεργασία με TFA παρουσία νερού και τριίσοπροπυλσιλανίου (TIS) ως μόριο παγίδα των καρβοκατιόντων. Ακολούθως το TFA εξατμίζεται και στο υπόλειμμα προστίθεται DCM /εξάνιο (1/1) και εξατμίζεται εκ νέου. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται 2-3 φορές προκειμένου να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή απομάκρυνση του TFA. Στην συνέχεια το πεπτίδιο καταβυθίζεται με την βοήθεια διαιθυλαιθέρα. Ακολουθεί διήθηση και κατεργασία με αιθέρα για την απομάκρυνση των μορίων παγίδων που χρησιμοποιήθηκαν. Το πεπτίδιο παραλαμβάνεται (εκχυλίζεται) σε υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 2N και λυοφιλοποιείται.

Στην Boc στρατηγική η αποκοπή των πεπτιδίων από τη ρητίνη καθώς και η ταυτόχρονη αποπροστασία των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων επιτυγχάνεται με κατεργασία με 10 ml δισαπεσταγμένου υδροφθορίου (HF) για κάθε g πεπτιδορητίνης, παρουσία 1 ml ανισόλης-0,5 g φαινόλης (παγίδες), για 30 min στους -8°C και για 1 ώρα στους 0°C. Έτσι, κατά την κατεργασία της πεπτιδορητίνης με HF στους -8°C τα δραστικά καρβοκατιόντα που σχηματίζονται, λόγω της χαμηλής θερμοκρασίας, δεν χαρακτηρίζονται από μεγάλη κινητικότητα (μικρή κινητική ενέργεια) και μπορούν να παγιδευτούν, πριν αλκυλιώσουν κάποιες παράπλευρες αλυσίδες αμινοξέων. Η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί στην ποσοτική αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη. Στη συνέχεια το HF απομακρύνεται υπό κενό και το υπόλειμμα κατεργάζεται με αιθέρα. Τα πεπτίδια που φέρουν πολικές ομάδες, συνήθως καταβυθίζονται, ενώ απομακρύνονται τα μόρια παγίδες με διαδοχικές εκπλύσεις με αιθέρα. Το πεπτίδιο παραλαμβάνεται (εκχυλίζεται) σε υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 2N και λυοφιλοποιείται.

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

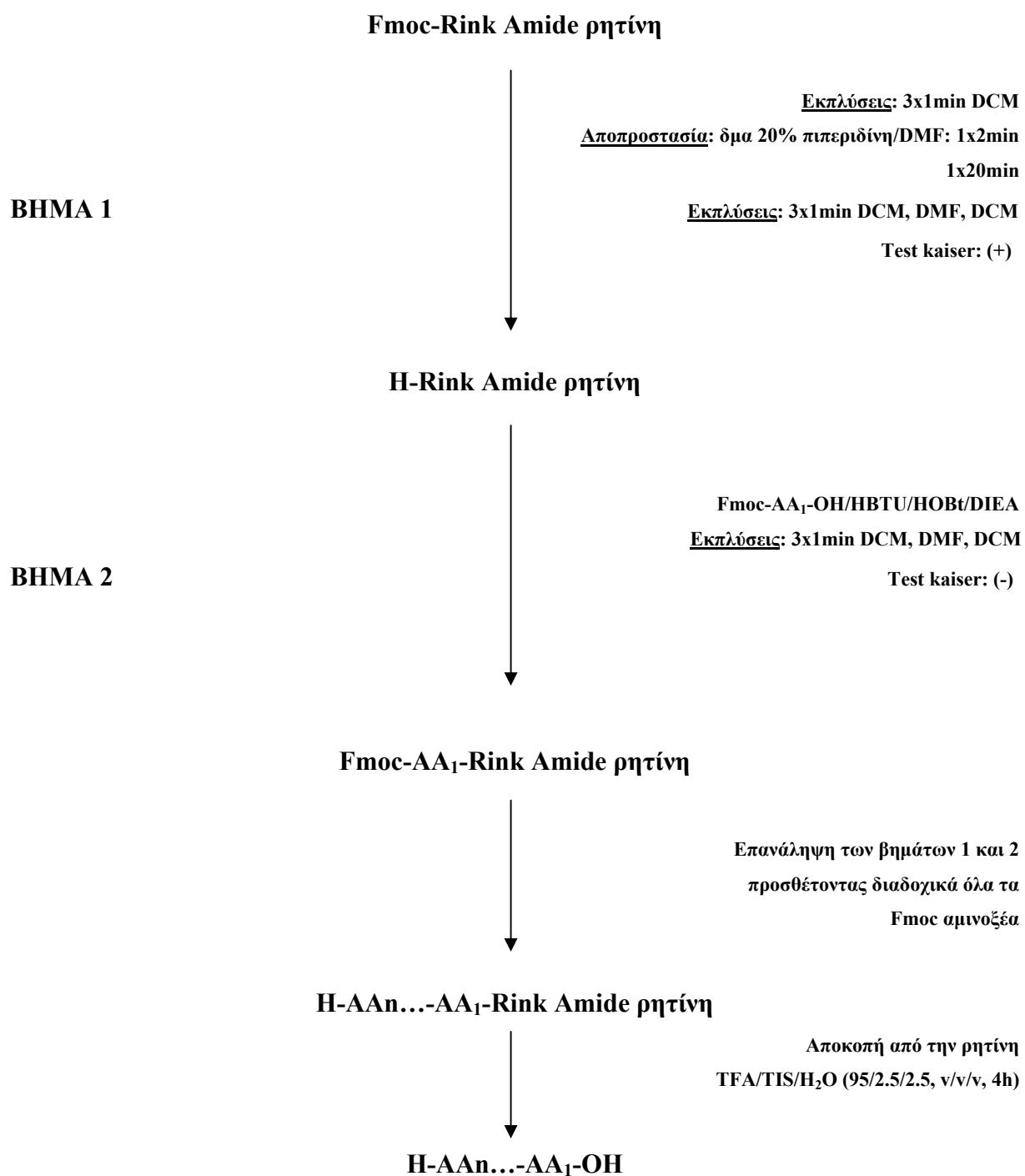
1. Υγρή χρωματογραφία ανάστροφης φάσης και υψηλής διαχωριστικής ικανότητας RP-HPLC (Reverse Phase – High Performance Liquid Chromatography).

(α) Αναλυτική RP-HPLC

(β) Ημιπαρασκευαστική RP-HPLC

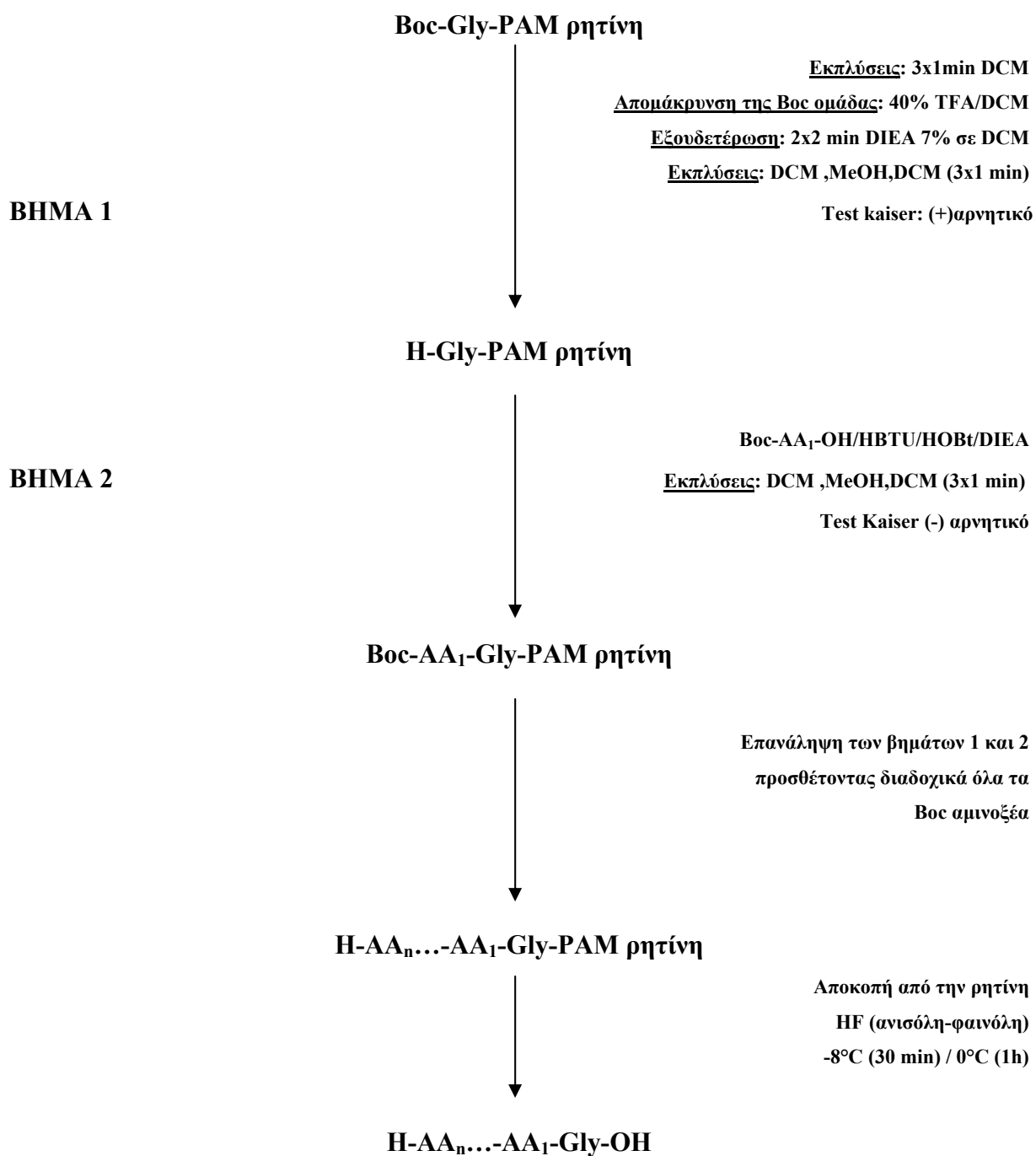
2. Φασματομετρία μάζας ESI (Electrospray Ionization)

Στο **Σχήμα 7.1** φαίνεται η γενική μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση των πεπτιδίων με την Fmoc-στρατηγική.



Σχήμα 7.1 Γενικό διάγραμμα σύνθεσης πεπτιδίων με Fmoc-στρατηγική.

Στο **Σχήμα 7.2** φαίνεται η γενική μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε για την σύνθεση των πεπτιδίων με την Boc-στρατηγική.



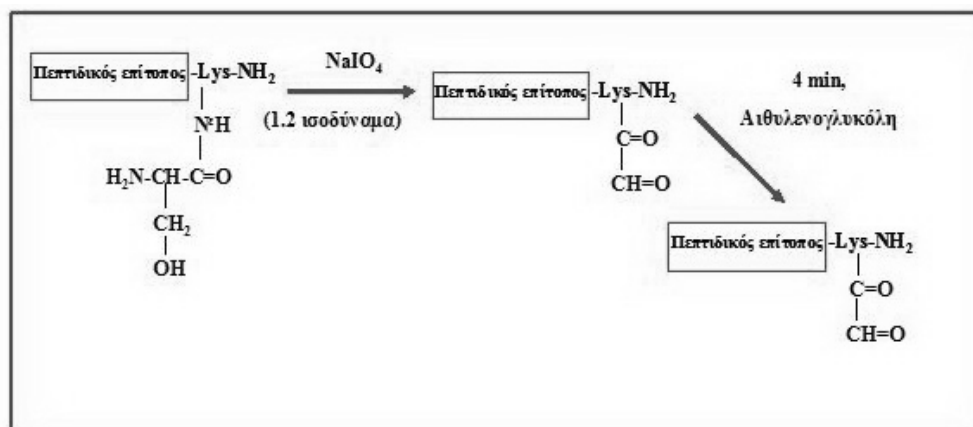
Σχήμα 7.2 Διάγραμμα σύνθεσης πεπτιδίων με Boc-στρατηγική

7.3 Σύνθεση αναλόγων με χημειοεκλεκτική σύνδεση μέσω σχηματισμού δεσμού οξίμης

Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω η σύνθεση των αναλόγων (2)-(5) και (7), (8) έγινε με χημειοεκλεκτική σύνδεση μέσω σχηματισμού δεσμού οξίμης και πραγματοποιήθηκε σε τρία στάδια. Τα ανάλογα (2)-(5) προέκυψαν από την πρόσδεση των αλδεϋδικών επιτόπων VWTYNAELLK(CHOCO)-NH₂, YNNTNQEDLK(CHOCO)-NH₂, QLRDNAKELK(CHOCO)-NH₂, MPFHNHPLK(CHOCO)-NH₂ στο φορέα Ac-SOC₄-(Ac₂, Aoa₂)-NH₂, αντίστοιχα. Τα ανάλογα (7), (8) προέκυψαν από την πρόσδεση των αλδεϋδικών επιτόπων LLTTNKDGAK(CHOCO)-NH₂, HKYPC(Acm)STTNC(Acm)SPK(CHOCO)-NH₂ στο φορέα Palm-SOC₄-(Aoa)₄-NH₂, αντίστοιχα.

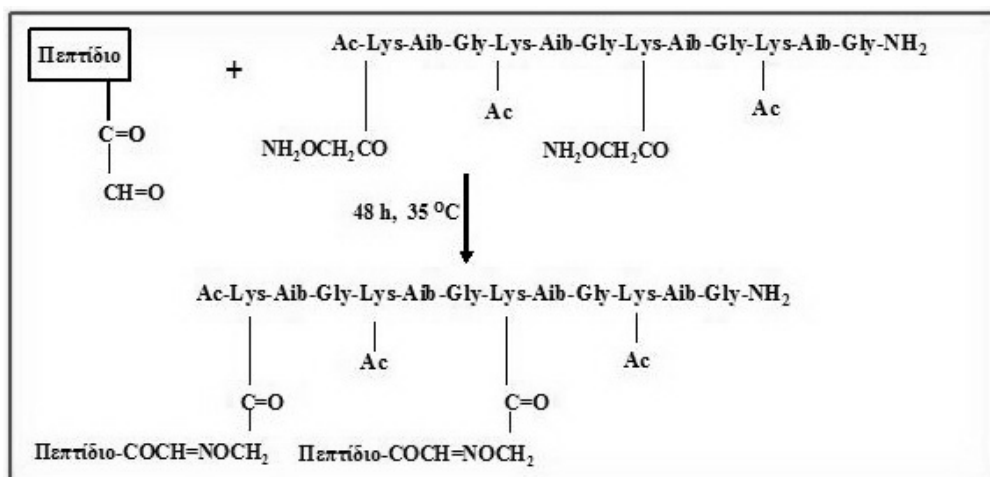
Το **πρώτο στάδιο** περιελάμβανε τη σύνθεση των επιτόπων και των φορέων ξεχωριστά με τη βήμα-προς-βήμα πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση κατά Merrifield ακολουθώντας την Fmoc/tBu στρατηγική (**Σχήμα 7.1**).

Στο **δεύτερο στάδιο** πραγματοποιήθηκε η δημιουργία αλδεϋδομάδας στους επιτόπους μέσω οξείδωσης με NaIO₄ μιας 1-αμινο-2-αλκοόλης και γι' αυτό το σκοπό σχεδιάστηκε ώστε στο C-τελικό άκρο των επιτόπων να περιλαμβάνει το μοτίβο -Lys(Ser) (**Σχήμα 7.3**). Αρχικά η Lys προστέθηκε ως Fmoc-Lys(Mtt)-OH. Μετά την προσθήκη του N-τελικού αμινοξέος του επιτόπου και χωρίς να απομακρύνουμε την Fmoc-ομάδα έγινε απομάκρυνση της Mtt-ομάδας της Lys με διάλυμα 1.8% TFA/DCM και προστέθηκε στην παράπλευρη αμινομάδα η Ser ως Fmoc-Ser(tBu)-OH. Ακολούθησε ταυτόχρονη απομάκρυνση των Fmoc-ομάδων της σερίνης και του N-τελικού αμινοξέος με διάλυμα 20% πιπεριδίνη/DMF και το πεπτίδιο αποκόπηκε από τη ρητίνη. Η αντίδραση της οξείδωσης λαμβάνει χώρα σε διάλυμα παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος ιμιδαζολίου/HCl pH=7. Το NaIO₄ χρησιμοποιείται σε περίσσεια. Η διακοπή της αντίδρασης γίνεται με προσθήκη διαλύματος αιθυλενογλυκόλης.



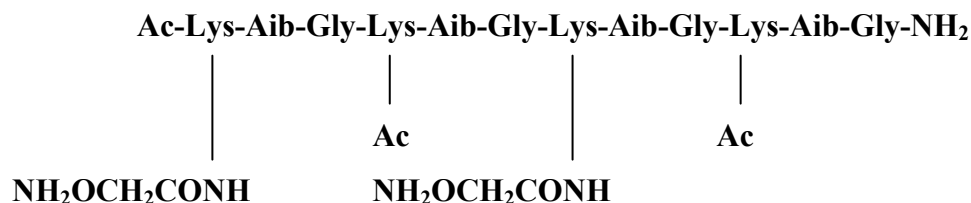
Σχήμα 7.3 Αντίδραση οξείδωσης με NaIO₄

Στο **τρίτο στάδιο** έγινε η σύνδεση των φορέων με τους αλδεϋδικούς επιτόπους με χημειοεκλεκτική σύνδεση μέσω σχηματισμού δεσμού οξίμης (**Σχήμα 7.4**). Η αντίδραση γίνεται σε διάλυμα παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος-οξικού νατρίου pH= 4.6 και σε θερμοκρασία ~ 35° C. Η εξέλιξη της αντίδρασης ελέγχεται με φασματομετρία ESI-MS. Η αντίδραση αφήνεται για 2-4 ημέρες υπό ανάδευση. Ο επίτοπος βρίσκεται σε περίσσεια ως προς τις θέσεις πρόσδεσης του φορέα.



Σχήμα 7.4 Αντίδραση σύνδεσης αλδεϋδικού επιτόπου με φορέα μέσω σχηματισμού δεσμού οξίμης

7.4 Σύνθεση του φορέα Ac-SOC₄-(Ac₂, Aoa₂)-NH₂ (1)

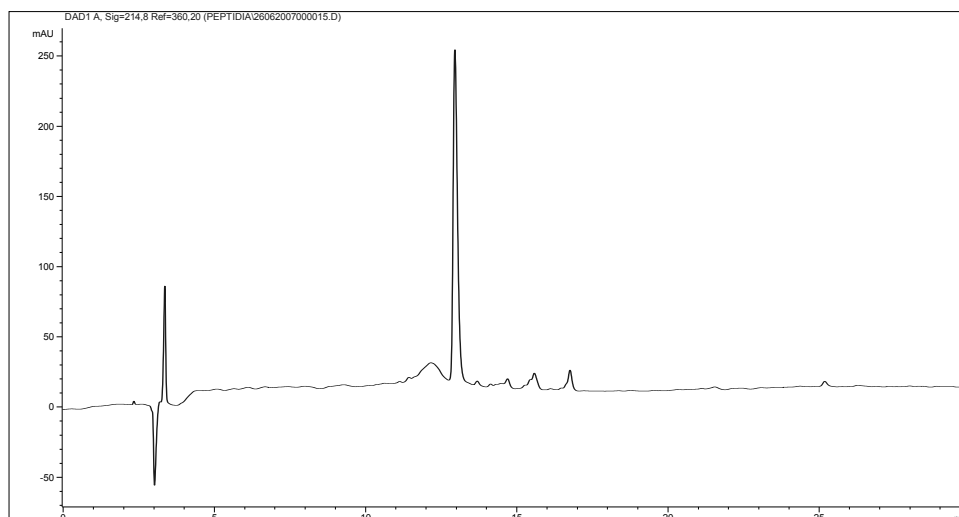


M.B = 1370,57

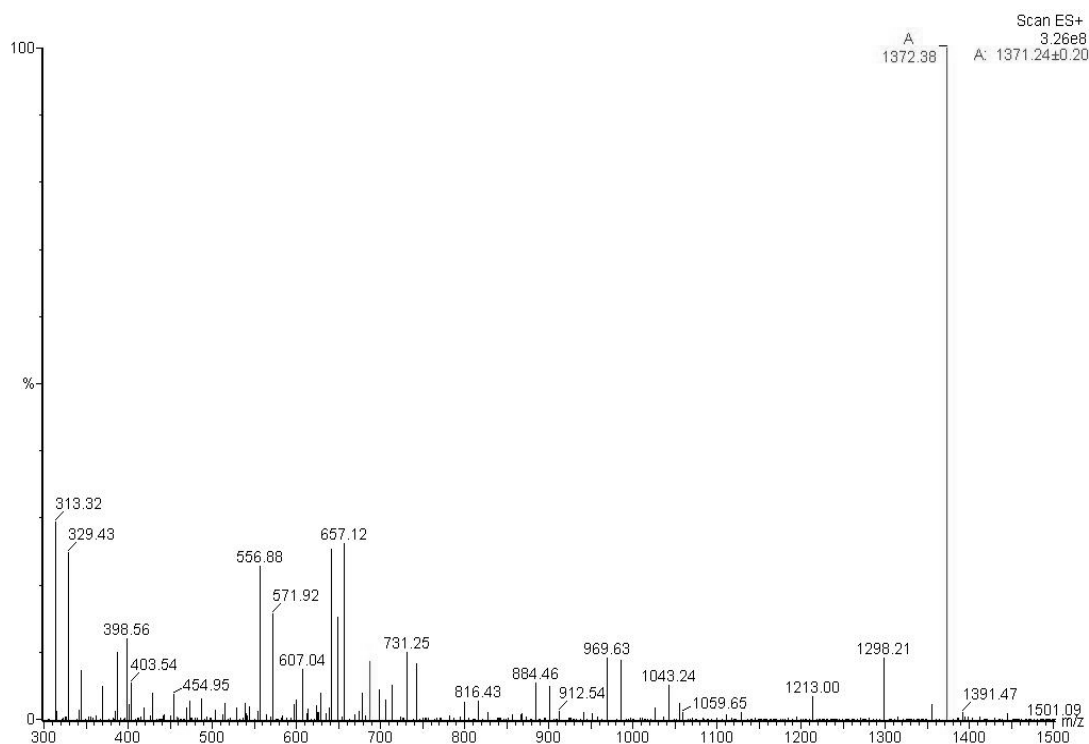
M.T: C₅₈H₁₀₃N₁₉O₁₉

Η σύνθεση του φορέα έγινε σε **Rink Amide AM** ρητίνη ακολουθώντας τη γενική πορεία σύνθεσης με Fmoc στρατηγική (**Σχήμα 7.1**). Χρησιμοποιήθηκαν **1,01 g** ρητίνης με υποκατάσταση **0,67 mmole/g**. Τα αμινοξέα εισήχθηκαν ως Fmoc-παράγωγα με τις αντίστοιχες προστασίες όπως αναφέρθηκαν πιο πάνω. Μετά την προσθήκη του N-τελικού αμινοξέος έγινε απομάκρυνση της Fmoc-ομάδας με δμα 20% πιπεριδίνης/DMF και ακολούθησε ακετυλίωση με οξικό ανυδρίτη σε πυριδίνη. Στη συνέχεια έγινε απομάκρυνση των παράπλευρων Mtt-ομάδων με διάλυμα 1,8% TFA/DCM και προστέθηκε Boc-αμινοξικό οξύ. Όταν ολοκληρώθηκε η σύνθεση, η πεπτιδορητίνη μεταφέρθηκε σε ξηραντήρα κενού για ξήρανση υπεράνω P₂O₅. Η απόδοση σύνθεσης του πεπτιδίου πριν την αποκοπή του από την ρητίνη ήταν **48%**. Η αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη καθώς και η επεξεργασία και η παραλαβή του έγινε σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε πιο πάνω. Η απόδοση αποκοπής από τη ρητίνη ήταν **97%**.

Ο καθαρισμός του πεπτιδίου έγινε σε ημιπαρασκευαστική RP-HPLC. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από **A/B: 90/10** σε **A/B: 50/50** σε **30 min**. Η απόδοση καθαρισμού ήταν **27%**. Η καθαρότητα του πεπτιδίου ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC (**Σχήμα 7.5**) η δε ταυτοποίησή του έγινε με φασματομετρία μάζας Electronspray Ionization (ESI-MS) (**Σχήμα 7.6**).



Σχήμα 7.5 Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του φορέα **Ac-SOC₄-(Ac₂, Aoa₂)-NH₂**. Σύστημα έκλουσης: (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA σε αναλογία **A/B: 90/10** ως **A/B: 50/50** για **30 min**.



Σχήμα 7.6 Φάσμα μάζας ESI (Electrospray Ionization) του φορέα **Ac-SOC₄-(Ac₂, Aoa₂)-NH₂**. Υπολογισθέν μοριακό βάρος, M.B= **1370,57**. Ευρεθέν μοριακό βάρος, M.B= **1371,24**

7.5 Σύνθεση του Ac-SOC₄-[Ac₂, (VWTYNAELLK(CH=N-O))₂]-NH₂ (2)

Το **πρώτο στάδιο**, όπως έχει αναφερθεί, περιλαμβάνει τη σύνθεση του επιτόπου και του φορέα ξεχωριστά με τη βήμα-προς-βήμα πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση κατά Merrifield. Η σύνθεση του φορέα περιγράφηκε στην ενότητα 7.4 και γι' αυτό παραλείπεται. Το ίδιο ισχύει και για τα ανάλογα (4), (5).

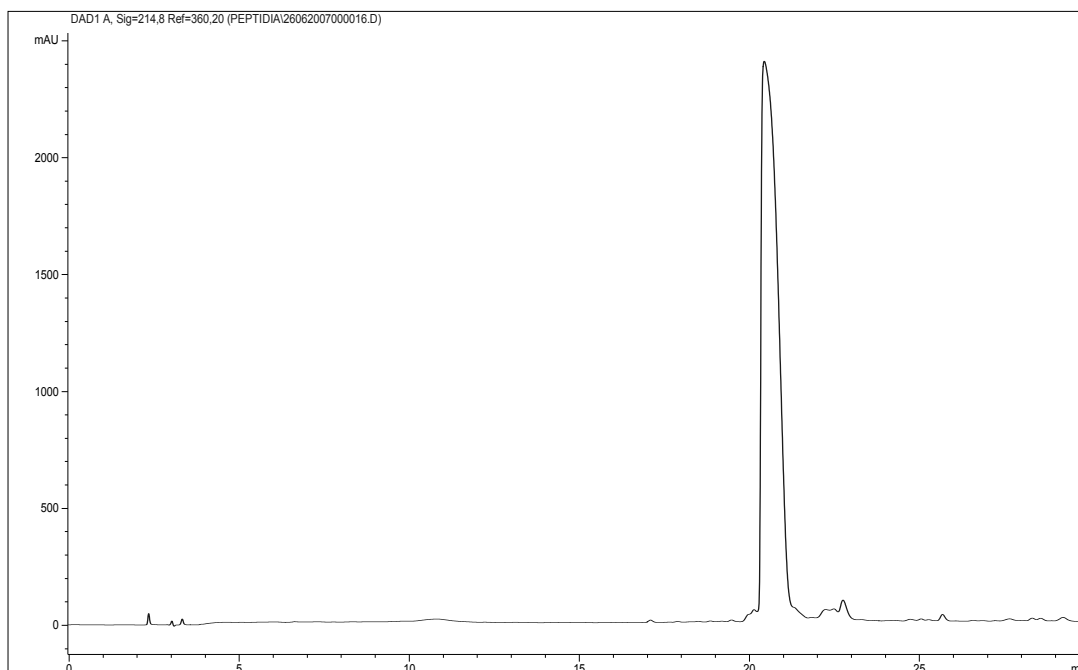
1^ο Στάδιο: Σύνθεση του επιτόπου Val-Trp-Thr-Tyr-Asn-Ala-Glu-Leu-Leu-Lys(Ser)-NH₂ (T₂)

MB = 1322,52

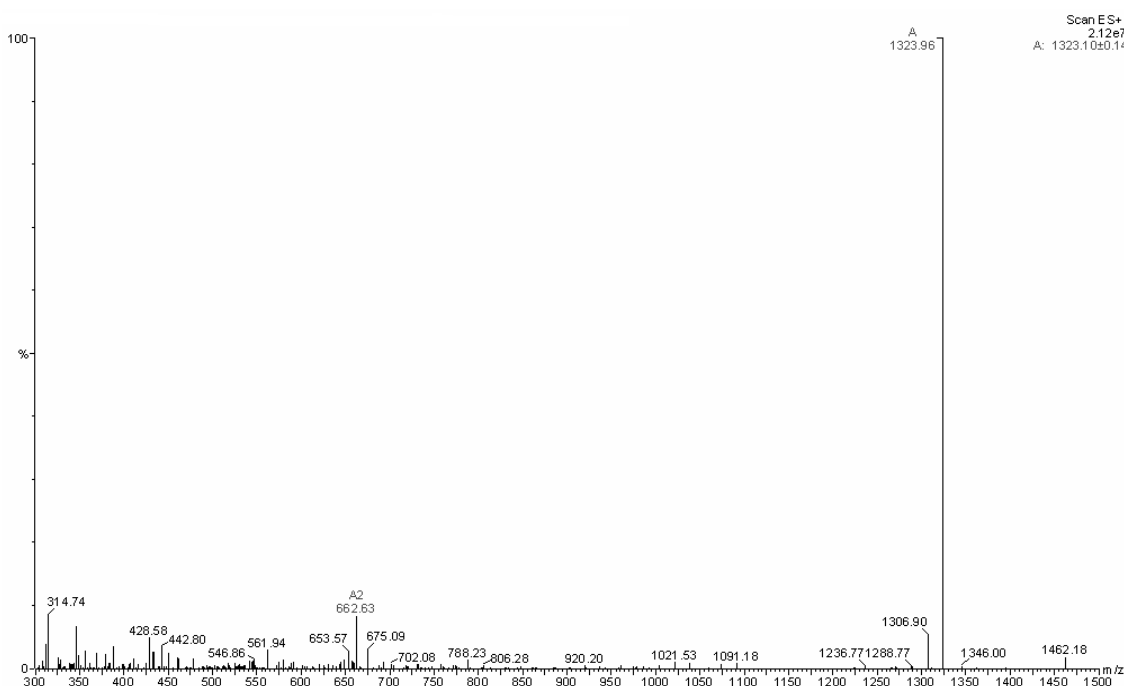
M.T: C₆₂H₉₅N₁₅O₁₇

Η σύνθεση του επιτόπου έγινε σε **Rink Amide AM** ρητίνη ακολουθώντας τη γενική πορεία σύνθεσης με Fmoc στρατηγική (**Σχήμα 7.1**). Χρησιμοποιήθηκαν **1,00 g** ρητίνης με υποκατάσταση **0,67 mmole/g**. Τα αμινοξέα εισήχθηκαν ως Fmoc-παράγωγα με τις αντίστοιχες προστασίες όπως αναφέρθηκαν πιο πάνω. Όταν ολοκληρώθηκε η σύνθεση, η πεπτιδορητίνη μεταφέρθηκε σε ξηραντήρα κενού για ξήρανση υπεράνω P₂O₅. Η απόδοση σύνθεσης του πεπτιδίου πριν την αποκοπή του από την ρητίνη ήταν **62%**. Η αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη καθώς και η επεξεργασία και η παραλαβή του έγινε σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε πιο πάνω. Η απόδοση αποκοπής από τη ρητίνη ήταν **98%**.

Ο καθαρισμός του πεπτιδίου έγινε σε ημιπαρασκευαστική RP-HPLC. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από **A/B: 90/10** σε **A/B: 50/50** σε **30 min**. Η απόδοση καθαρισμού ήταν **46%**. Η καθαρότητα του πεπτιδίου ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC (**Σχήμα 7.7**) η δε ταυτοποίησή του έγινε με φασματομετρία μάζας Electrospray Ionization (ESI-MS) (**Σχήμα 7.8**).



Σχήμα 7.7 Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του πεπτιδίου **VWTYNAELLK(S)-NH₂**. Σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA σε αναλογία **A/B: 90/10** ως **A/B: 50/50** για **30 min**.



Σχήμα 7.8 Φάσμα μάζας ESI (Electrospray Ionization) του πεπτιδίου **VWTYNAELLK(S)-NH₂**. Υπολογισθέν μοριακό βάρος, M.B= **1322,52**. Ευρεθέν μοριακό βάρος, M.B= **1323,10**

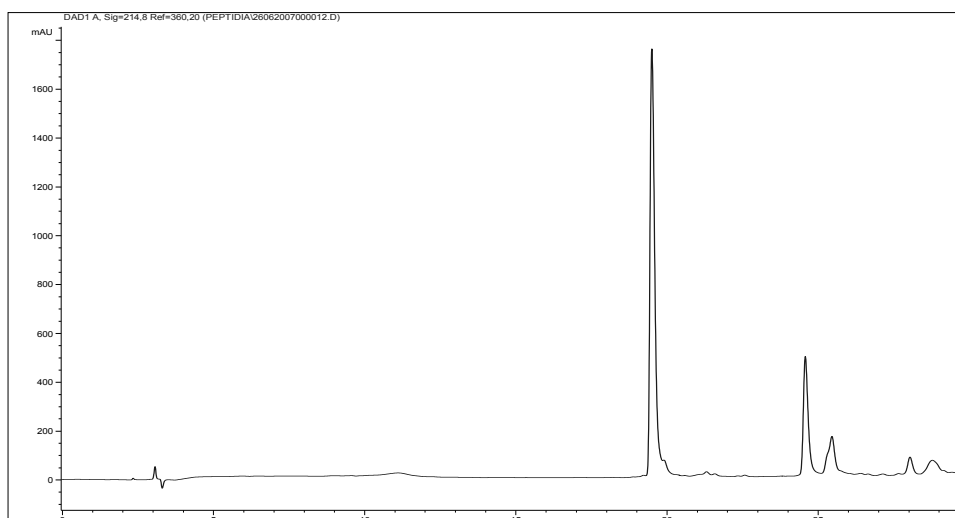
2^ο Στάδιο: Σύνθεση του αλδεϋδικού επιτόπου VWTYNAELLK(CHO)-NH₂ (T₂)

MB = 1291,46

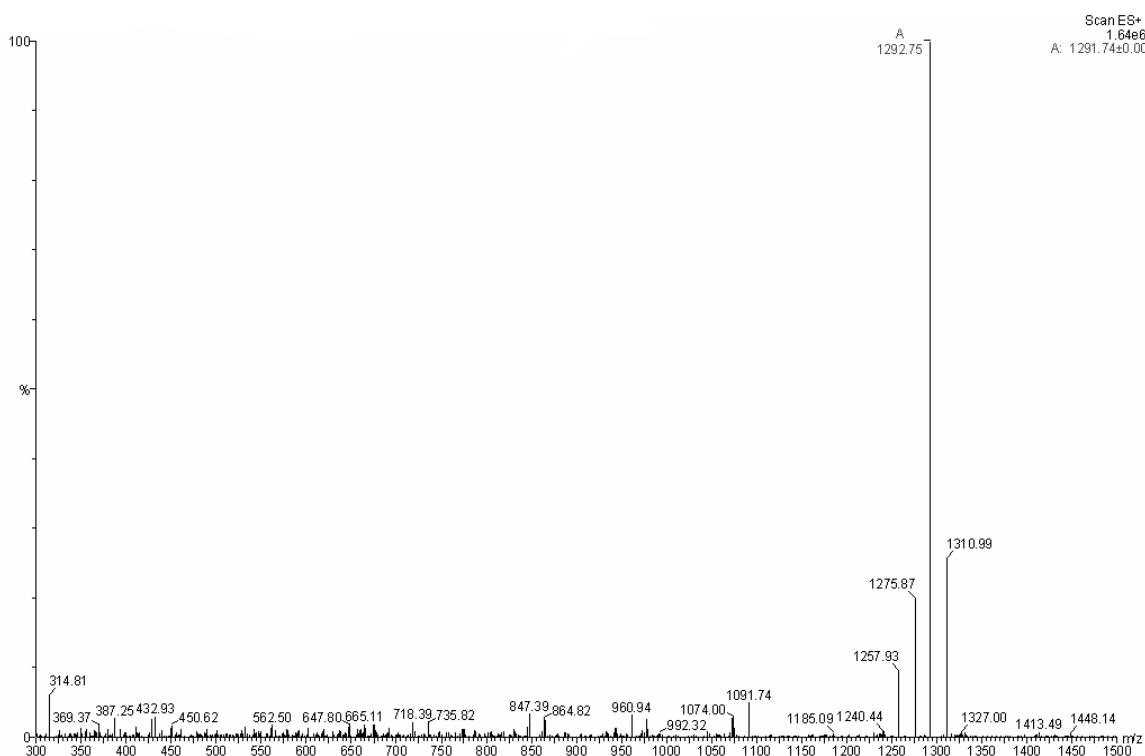
M.T: C₆₁H₉₀N₁₄O₁₇

Η οξείδωση του VWTYNAELLK(S)-NH₂ πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα. Σε σφαιρική φιάλη (50ml) προστέθηκαν **23,87 mg** του πεπτιδίου και διαλύθηκαν σε **1,8 ml H₂O** υπό ανάδευση. Στη συνέχεια προστέθηκαν **14,40 ml** ρυθμιστικού διαλύματος **ιμιδαζολίου/HCl** pH= 7,0. Στο υπό ανάδευση διάλυμα προστέθηκε το διάλυμα **NaIO₄** (**4,62 mg** σε **1,8 ml H₂O**). Η αντίδραση οξείδωσης αφέθηκε για **4 min**. Η διακοπή της αντίδρασης έγινε με την προσθήκη διαλύματος **αιθυλενογλυκόλης 0,43 ml** (100 mM).

Το επιθυμητό πεπτιδικό ανάλογο απομονώθηκε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από **A/B: 90/10** σε **A/B: 50/50** σε **30 min**. Η απόδοση οξείδωσης ήταν **71%**. Η καθαρότητα του πεπτιδίου ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC (**Σχήμα 7.9**) η δε ταυτοποίησή του έγινε με φασματομετρία μάζας Electrospray Ionization (ESI-MS) (**Σχήμα 7.10**).

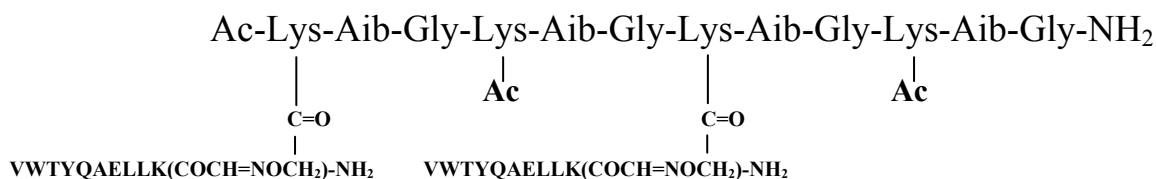


Σχήμα 7.9 Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του πεπτιδικού αναλόγου **VWTYNAELLK(CHOCO)-NH₂**. Σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA σε αναλογία **A/B: 90/10** ως **A/B: 50/50** για **30 min**.



Σχήμα 7.10 Φάσμα μάζας ESI (Electrospray Ionization) του πεπτιδικού αναλόγου **VWTYNAELLK(CHOCO)-NH₂**. Υπολογισθέν μοριακό βάρος, M.B= **1291,46** Ευρεθέν μοριακό βάρος, M.B= **1291,74**

3^ο Στάδιο: Σύνθεση του Ac-SOC₄-(Ac₂, [VWTYNAELLK(CH=N-O)₂]]-NH₂ (2)

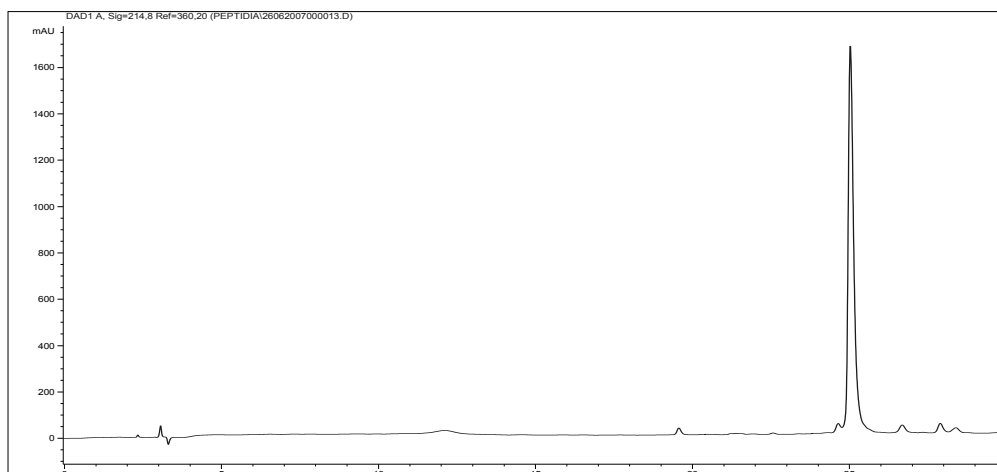


M.B: 3917,44

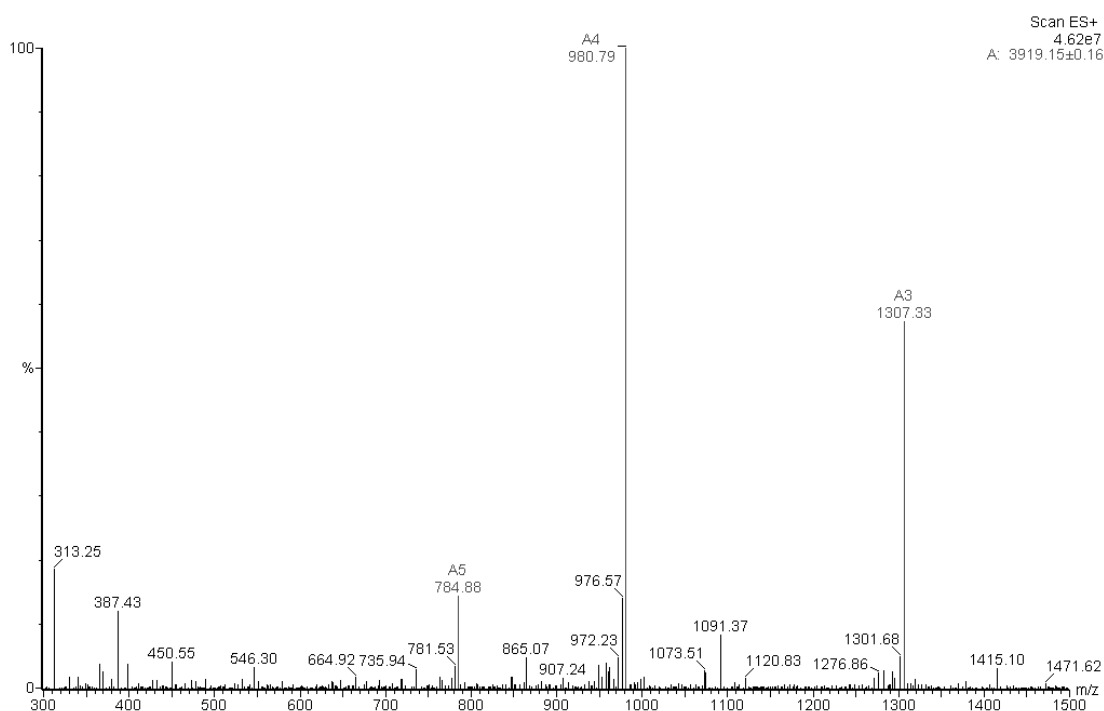
M.T: C₁₈₀H₂₇₉N₄₇O₅₁

Σε σφαιρική φιάλη που βρίσκεται σε υδρόλουτρο σε θερμοκρασία 35°C προστέθηκαν **14,20 mg** αλδεϋδικού παραγώγου και διαλύθηκαν υπό ανάδευση σε **2,1 ml H₂O/0,1% TFA** και **0,4ml CH₃CN/0,1% TFA**. Στο υπό ανάδευση διάλυμα προστέθηκε το διάλυμα του φορέα **Ac-SOC₄-(Ac₂, Aoa₂)-NH₂ (5,11mg, 0,37ml H₂O/0,1% TFA)**. Η αντίδραση αφέθηκε για **2 ημέρες (48h)** κατά τη διάρκεια των οποίων παρακολουθούνταν με φασματομετρία μάζας Electronspray Ionization (ESI-MS).

Το μίγμα της αντίδρασης οδηγήθηκε στην ημιπαρασκευαστική RP-HPLC για καθαρισμό. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από **A/B: 90/10** σε **A/B: 50/50** σε **30 min**. Η απόδοση της αντίδρασης ήταν **52%**. Η καθαρότητα του πεπτιδίου ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC (**Σχήμα 7.11**) η δε ταυτοποίησή του έγινε με φασματομετρία μάζας Electronspray Ionization (ESI-MS) (**Σχήμα 7.12**).



Σχήμα 7.11 Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του πεπτιδικού αναλόγου **Ac-SOC₄-[Ac₂, [VWTYNAELLK(CH=N-O)₂]-NH₂]**. Σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA σε αναλογία **A/B: 90/10** ως **A/B: 50/50** για **30 min**.



Σχήμα 7.12 Φάσμα μάζας ESI (Electrospray Ionization) του πεπτιδικού αναλόγου **Ac-SOC₄-[Ac₂, (VWTYNAELLK(CH=N-O)₂)-NH₂]**. Υπολογισθέν μοριακό βάρος, M.B= **3917,44**. Ευρεθέν μοριακό βάρος, M.B= **3919,15**

7.6 Σύνθεση του Ac-SOC₄-[Ac₂, (YNNTNQEDLK(CH=N-O))₂]-NH₂ (3)

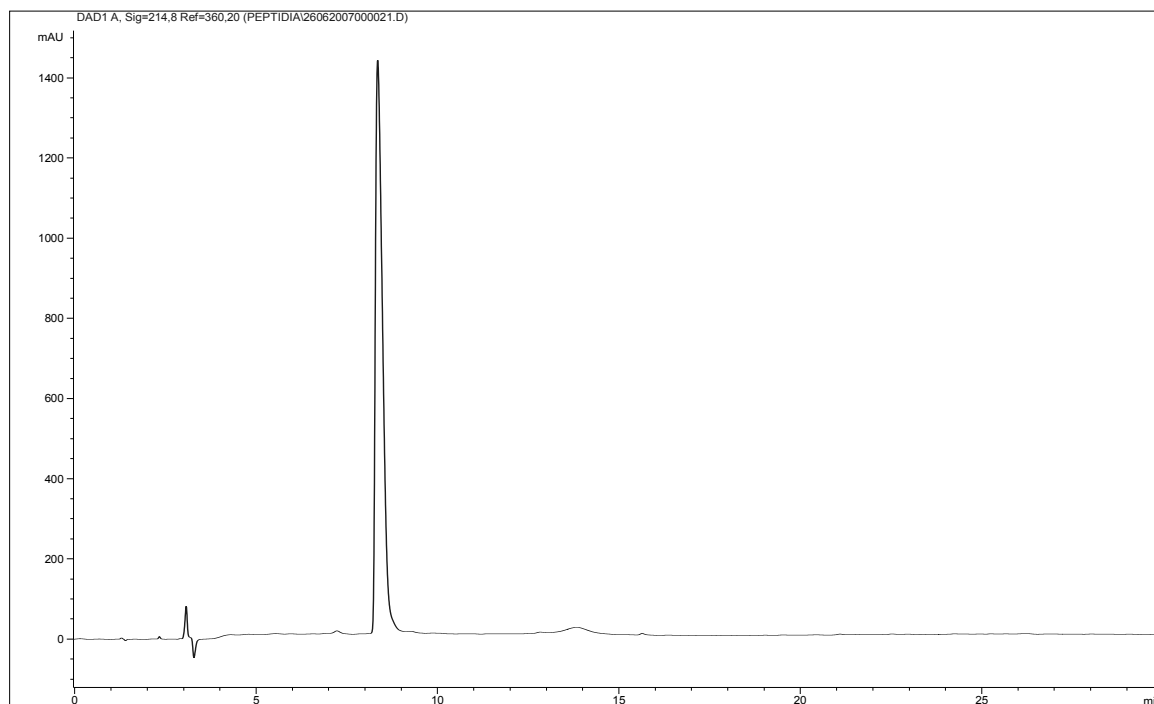
1^ο Στάδιο: Σύνθεση του επιτόπου Tyr-Asn-Asn-Thr-Asn-Gln-Glu-Asp-Leu-Lys(Ser)-NH₂ (T₄)

$$MB = 1324,32$$

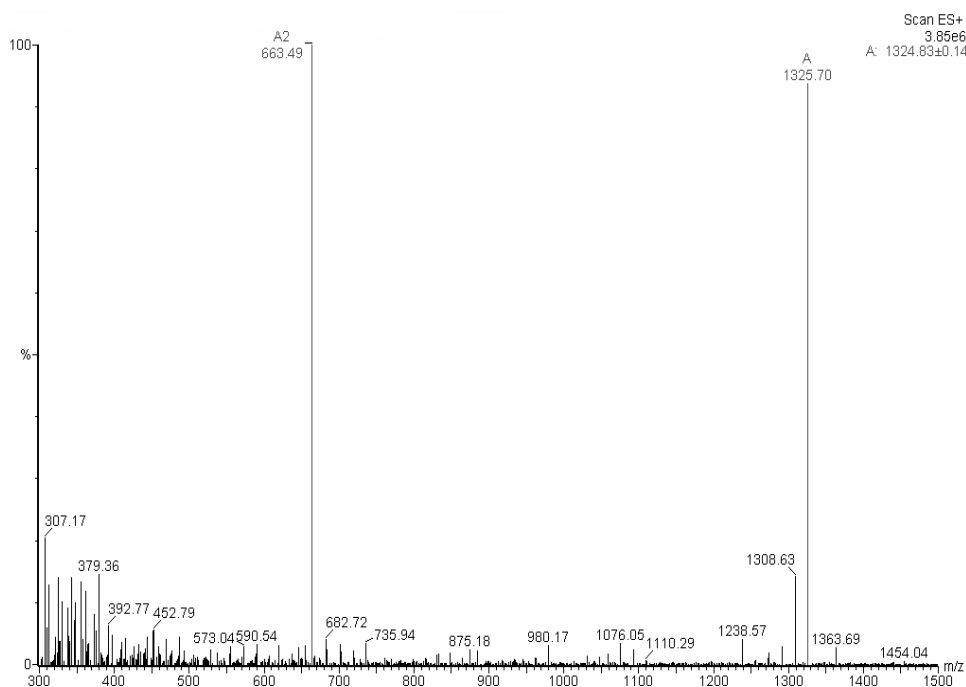
$$M.T: C_{54}H_{85}N_{17}O_{22}$$

Η σύνθεση του πεπτιδίου έγινε σε **Rink Amide AM** ρητίνη ακολουθώντας τη γενική πορεία σύνθεσης με Fmoc στρατηγική (**Σχήμα 7.1**). Χρησιμοποιήθηκαν **0,76 g** ρητίνης με υποκατάσταση **0,67 mmole/g**. Τα αμινοξέα εισήχθησαν ως Fmoc-παράγωγα με τις αντίστοιχες προστασίες όπως αναφέρθηκαν πιο πάνω. Όταν ολοκληρώθηκε η σύνθεση, η πεπτιδορητίνη μεταφέρθηκε σε ξηραντήρα κενού για ξήρανση υπεράνω P₂O₅. Η απόδοση σύνθεσης του πεπτιδίου πριν την αποκοπή του από την ρητίνη ήταν **67%**. Η αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη καθώς και η επεξεργασία και η παραλαβή του έγινε σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε πιο πάνω. Η απόδοση αποκοπής από τη ρητίνη ήταν **95%**.

Ο καθαρισμός του πεπτιδίου έγινε σε ημιπαρασκευαστική RP-HPLC. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από **A/B: 90/10** σε **A/B: 50/50** σε **30 min**. Η απόδοση καθαρισμού ήταν **62%**. Η καθαρότητα του πεπτιδίου ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC (**Σχήμα 7.13**) η δε ταυτοποίησή του έγινε με φασματομετρία μάζας Electronspray Ionization (ESI-MS) (**Σχήμα 7.14**).



Σχήμα 7.13 Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του πεπτιδίου **YNNTNQEDLK(S)-NH₂**. Σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA σε αναλογία **A/B: 90/10** ως **A/B: 50/50** για **30 min**.



Σχήμα 7.14 Φάσμα μάζας ESI (Electrospray Ionization) του πεπτιδίου **YNNTNQEDLK(S)-NH₂**. Υπολογισθέν μοριακό βάρος, M.B= **1324,32** Ευρεθέν μοριακό βάρος, M.B= **1324,83**

2^ο Στάδιο: Σύνθεση του αλδεϋδικού επιτόπου YNNTNQEDLK(CHOCO)-NH₂ (T₄)

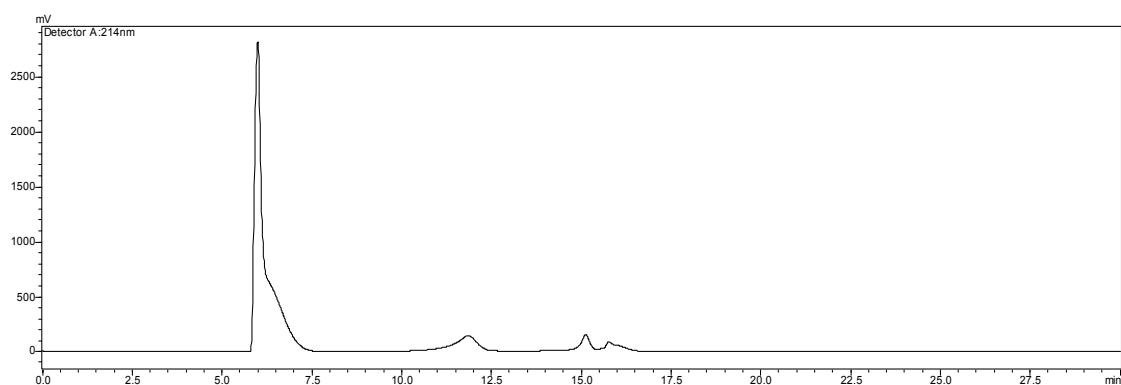
MB = 1293,26

M.T: C₅₃H₈₀N₁₆O₂₂

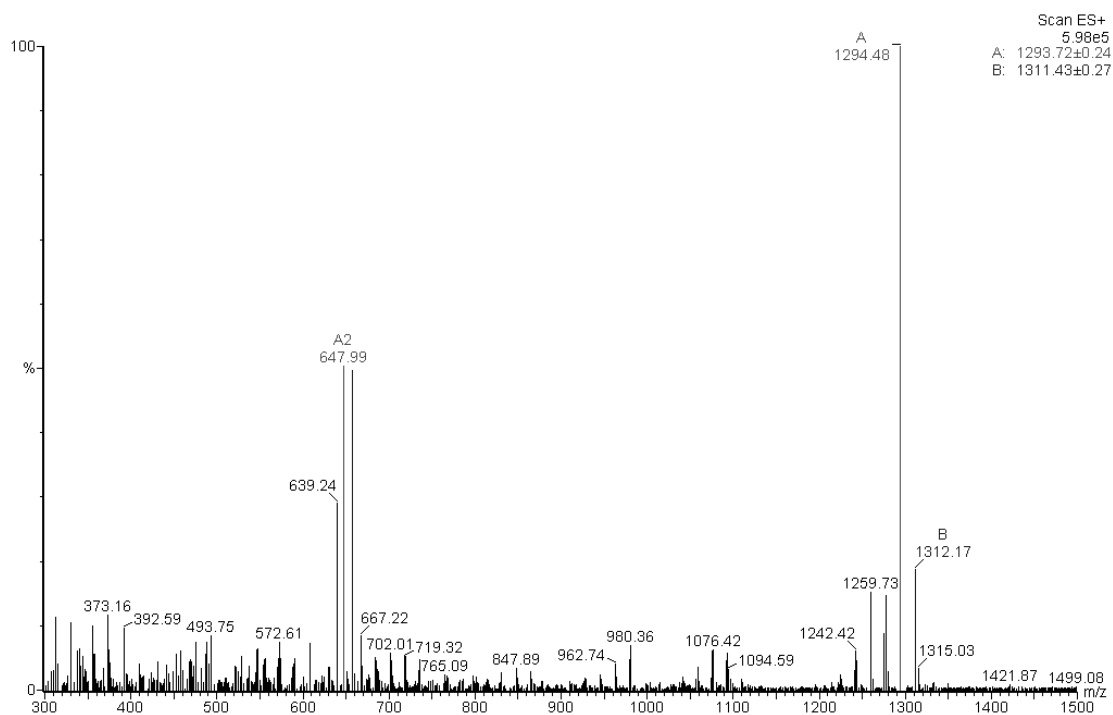
Η οξείδωση του YNNTNQEDLK(S)-NH₂ πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα. Σε σφαιρική φιάλη (50ml) προστέθηκαν **23,20 mg** του πεπτιδίου και διαλύθηκαν σε **1,75 ml H₂O** υπό ανάδευση. Στη συνέχεια προστέθηκαν **14 ml** ρυθμιστικού διαλύματος **ιμιδαζολίου/HCl** pH= 7.0. Στο υπό ανάδευση διάλυμα προστέθηκε το διάλυμα **NaIO₄ (4,49 mg σε 1,75 ml H₂O)**. Η αντίδραση οξείδωσης αφέθηκε για **4 min**. Η διακοπή της αντίδρασης έγινε με την προσθήκη διαλύματος αιθυλενογλυκόλης **0,42 ml** (100 mM).

Το επιθυμητό πεπτιδικό ανάλογο απομονώθηκε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από **A/B: 90/10** σε **A/B: 50/50** σε **30 min**. Η απόδοση οξείδωσης ήταν **65%**. Η καθαρότητα του πεπτιδίου ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC (**Σχήμα 7.15**) η δε ταυτοποίησή του έγινε με φασματομετρία μάζας Electrospray Ionization (ESI-MS) (**Σχήμα 7.16**).

Στο φάσμα μάζας προσδιορίστηκαν δυο κύριες κορυφές που αντιστοιχούν σε M.B **1293,72** και **1311,43**. Το 1293,72 αντιστοιχεί στο M.B του αλδεϋδικού επιτόπου ενώ το 1311,43 αντιστοιχεί στο M.B της ένυδρης μορφής του αλδεϋδικού επιτόπου.

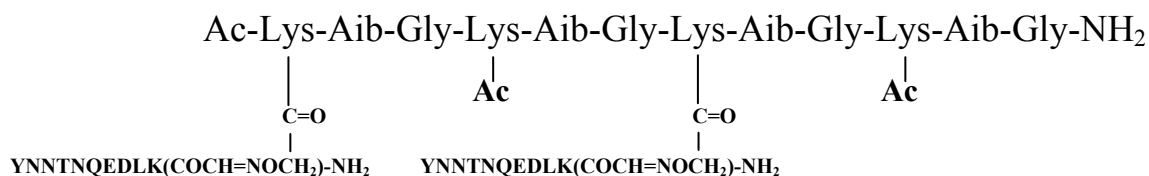


Σχήμα 7.15 Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του πεπτιδικού αναλόγου **YNNTNQEDLK(CHOCO)-NH₂**. Σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA σε αναλογία A/B: 90/10 ως A/B: 50/50 για 30 min.



Σχήμα 7.16 Φάσμα μάζας ESI (Electrospray Ionization) του πεπτιδικού αναλόγου **YNNTNQEDLK(CHOCO)-NH₂**. Υπολογισθέν μοριακό βάρος, M.B= **1293,26** Ευρεθέν μοριακό βάρος, M.B= **1293,72**

3^ο Στάδιο: Σύνθεση του Ac-SOC₄-(Ac₂, (YNNTNQEDLK(CH=N-O))₂)-NH₂ (3)

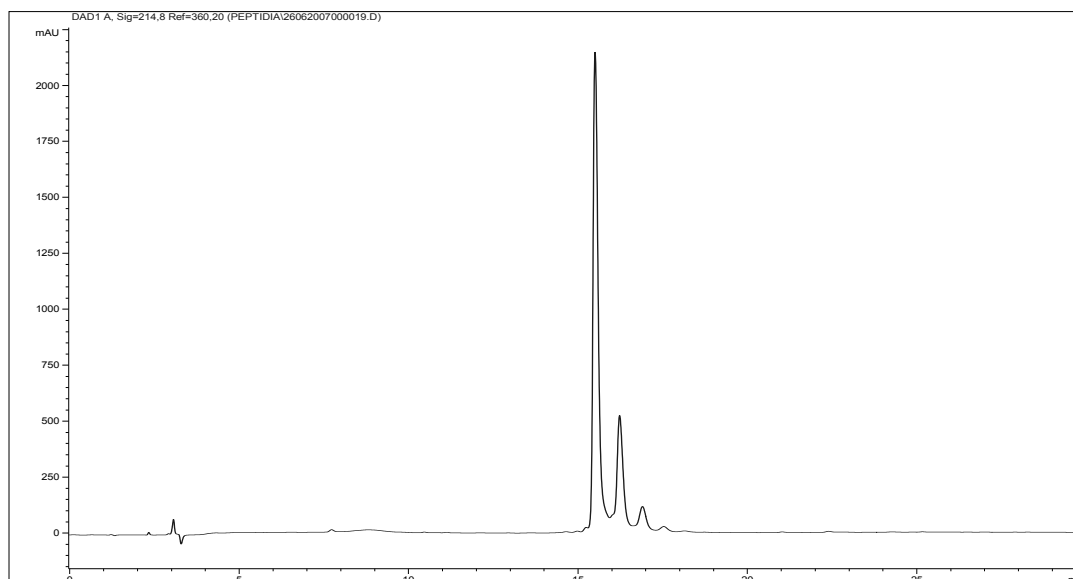


MB = 3921,16

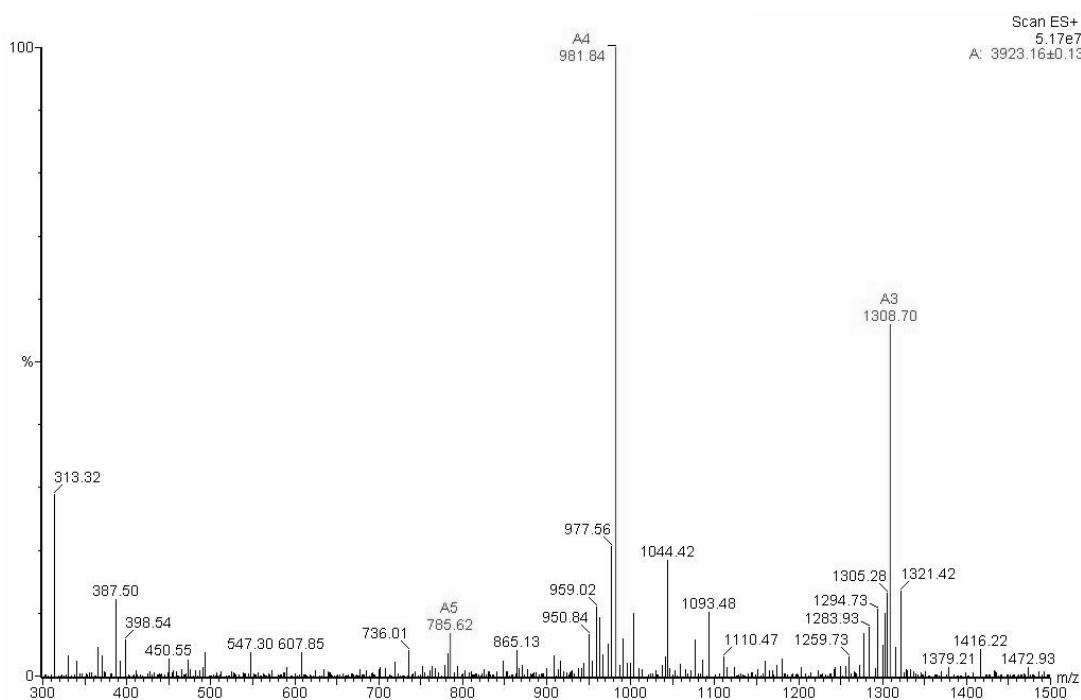
M.T: C₁₆₄H₂₅₉N₅₁O₆₁

Σε σφαιρική φιάλη που βρίσκεται σε υδρόλουτρο σε θερμοκρασία 35°C προστέθηκαν **14,16 mg** αλδεϋδικού παραγώγου και διαλύθηκαν υπό ανάδευση σε **0,95 ml H₂O** και **0,15 ml CH₃CN**. Στο υπό ανάδευση διάλυμα προστέθηκε το διάλυμα του φορέα **Ac-SOC₄-(Ac₂, Aoa₂)-NH₂ (5,11 mg, 0,37 ml H₂O)** και **6,57 ml** ρυθμιστικό διάλυμα **οξικού οξέος-οξικού νατρίου** pH= 4,6. Η αντίδραση αφέθηκε για 2 ημέρες (48h) κατά τη διάρκεια των οποίων παρακολουθούνταν με φασματομετρία μάζας Electronspray Ionization (ESI-MS).

Το μίγμα της αντίδρασης οδηγήθηκε στην ημιπαρασκευαστική RP-HPLC για καθαρισμό. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από **A/B: 90/10** σε **A/B: 50/50** σε **30 min**. Η απόδοση της αντίδρασης ήταν **67%**. Η καθαρότητα του πεπτιδίου ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC (**Σχήμα 7.17**) η δε ταυτοποίησή του έγινε με φασματομετρία μάζας Electronspray Ionization (ESI-MS) (**Σχήμα 7.18**).



Σχήμα 7.17 Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του πεπτιδικού αναλόγου **Ac-SOC₄-[2Ac, (YNNTNQEDLK(CH=N-O))₂]-NH₂**. Σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA σε αναλογία **A/B: 90/10** ως **A/B: 50/50** για **30 min**.



Σχήμα 7.18 Φάσμα μάζας ESI (Electrospray Ionization) του πεπτιδικού αναλόγου **Ac-SOC₄-[2Ac, (YNNTNQEDLK(CH=N-O))₂]-NH₂**. Υπολογισθέν μοριακό βάρος, M.B= 3921,16. Ευρεθέν μοριακό βάρος, M.B= 3923,16

7.7 Σύνθεση του Ac-SOC₄-[Ac₂, (QLRDNAKELK(CH=N-O))₂]-NH₂ (4)

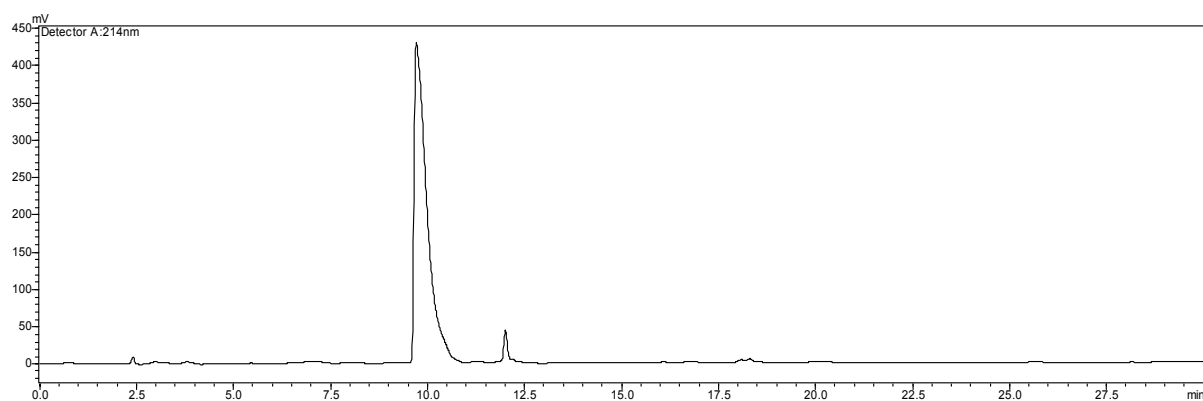
1^ο Στάδιο: Σύνθεση του επιτόπου Gln-Leu-Arg-Asp-Asn-Ala-Lys-Glu-Leu-Lys(Ser)-NH₂ (T₆)

MB = 1300,43

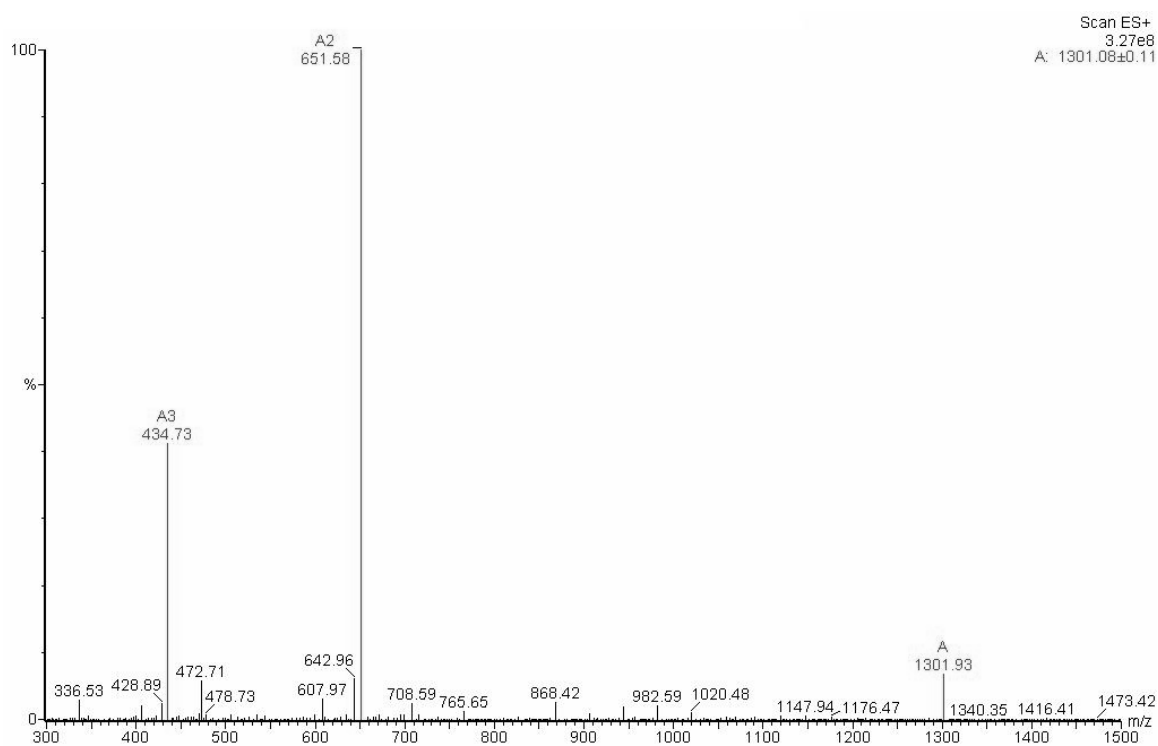
M.T: C₅₄H₉₇N₁₉O₁₈

Η σύνθεση του πεπτιδίου έγινε σε **Rink Amide AM** ρητίνη ακολουθώντας τη γενική πορεία σύνθεσης με Fmoc στρατηγική (**Σχήμα 7.1**). Χρησιμοποιήθηκαν **0,60 g** ρητίνης με υποκατάσταση **0,67 mmole/g**. Τα αμινοξέα εισήχθηκαν ως Fmoc-παράγωγα με τις αντίστοιχες προστασίες όπως αναφέρθηκαν πιο πάνω. Όταν ολοκληρώθηκε η σύνθεση, η πεπτιδορητίνη μεταφέρθηκε σε ξηραντήρα κενού για ξήρανση υπεράνω P₂O₅. Η απόδοση σύνθεσης του πεπτιδίου πριν την αποκοπή του από την ρητίνη ήταν **91%**. Η αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη καθώς και η επεξεργασία και η παραλαβή του έγινε σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε πιο πάνω. Η απόδοση αποκοπής από τη ρητίνη ήταν **98%**.

Ο καθαρισμός του πεπτιδίου έγινε σε ημιπαρασκευαστική RP-HPLC. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από **A/B: 90/10** σε **A/B: 50/50** σε **30 min**. Η απόδοση καθαρισμού ήταν **48%**. Η καθαρότητα του πεπτιδίου ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC (**Σχήμα 7.19**) η δε ταυτοποίησή του έγινε με φασματομετρία μάζας Electrospray Ionization (ESI-MS) (**Σχήμα 7.20**).



Σχήμα 7.19 Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του πεπτιδίου **QLRDNAKELK(S)-NH₂**. Σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA σε αναλογία **A/B: 90/10** ως **A/B: 50/50** για **30 min**.



Σχήμα 7.20 Φάσμα μάζας ESI (Electrospray Ionization) του πεπτιδίου **QLRDNAKELK(S)-NH₂**. Υπολογισθέν μοριακό βάρος, **M.B= 1300,43**. Ευρεθέν μοριακό βάρος, **M.B= 1301,08**

2^ο Στάδιο: Σύνθεση του αλδεϋδικού επιτόπου QLRDNAKELK(CHOCO)-NH₂ (T₆)

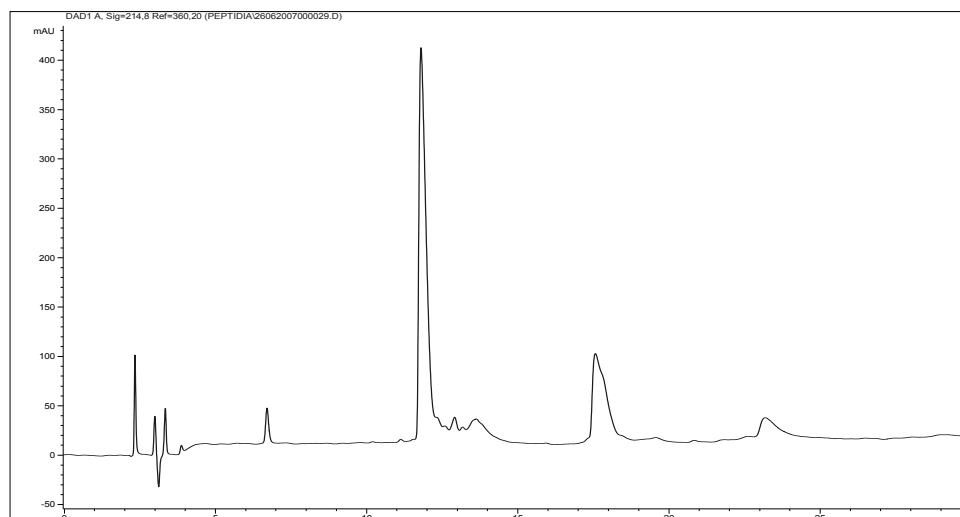
MB = 1269,37

M.T: C₅₃H₉₂N₁₈O₁₈

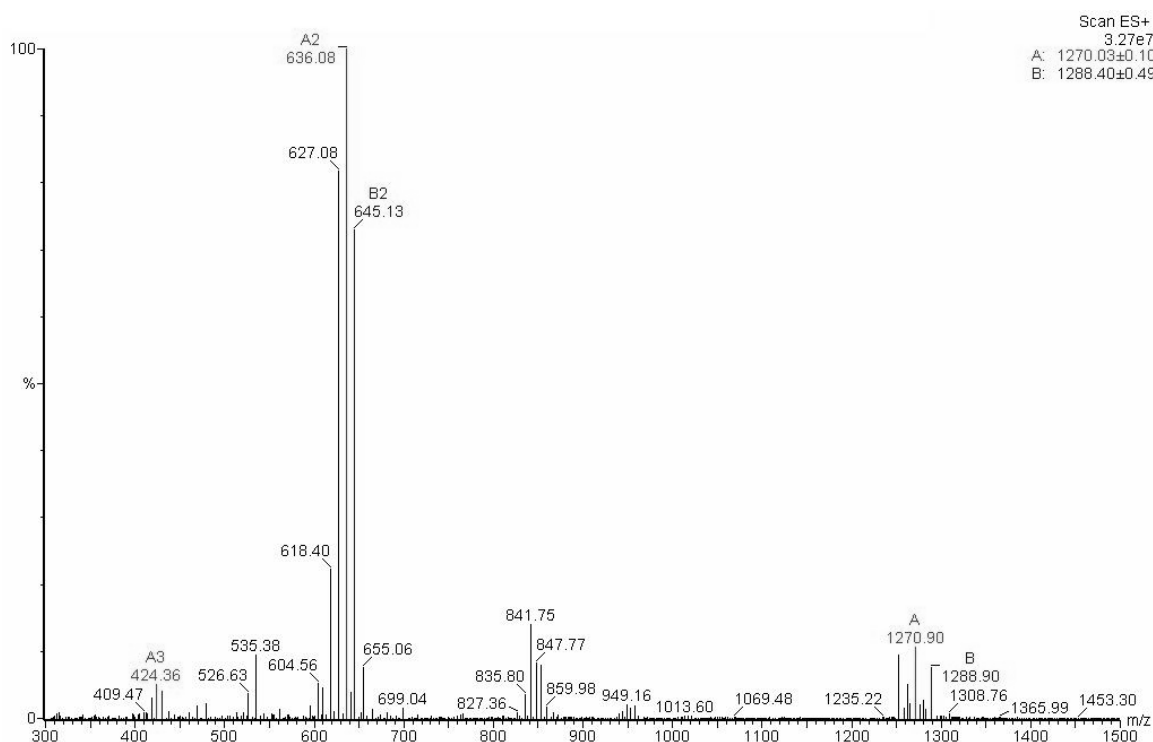
Η οξείδωση του **QLRDNAKELK(S)-NH₂** πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα. Σε σφαιρική φιάλη (50ml) προστέθηκαν **20,34 mg** του πεπτιδίου και διαλύθηκαν σε **1,56 ml H₂O** υπό ανάδευση. Στη συνέχεια προστέθηκαν **12,5 ml** ρυθμιστικού διαλύματος **ιμιδαζολίου/HCl** pH= 7,0. Στο υπό ανάδευση διάλυμα προστέθηκε το διάλυμα **NaIO₄ (4,00 mg σε 1,56 ml H₂O)**. Η αντίδραση οξείδωσης αφέθηκε για **4 min**. Η διακοπή της αντίδρασης έγινε με την προσθήκη διαλύματος αιθυλενογλυκόλης **0,37 ml** (100 mM).

Το επιθυμητό πεπτιδικό ανάλογο απομονώθηκε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από **A/B: 90/10** σε **A/B: 50/50** σε **30 min**. Η απόδοση οξείδωσης ήταν **67%**. Η καθαρότητα του πεπτιδίου ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC (**Σχήμα 7.21**) η δε ταυτοποίησή του έγινε με φασματομετρία μάζας Electronspray Ionization (ESI-MS) (**Σχήμα 7.22**).

Στο φάσμα μάζας εμφανίζονται οι δυο κύριες κορυφές που αντιστοιχούν σε M.B **1270,03** και **1288,40**. Το 1270,03 αντιστοιχεί στο M.B του αλδεϋδικού αναλόγου ενώ το 1288,40 αντιστοιχεί στο M.B της ένυδρης μορφής του αλδεϋδικού επιτόπου.

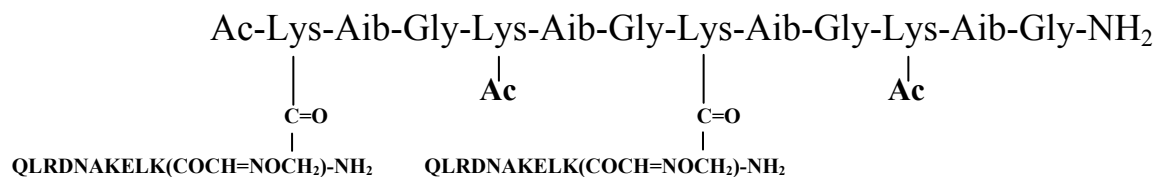


Σχήμα 7.21 Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του πεπτιδικού αναλόγου **QLRDNALAKELK(CHOCO)-NH₂**. Σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA σε αναλογία A/B: 90/10 ως A/B: 50/50 για 30 min.



Σχήμα 7.22 Φάσμα μάζας ESI (Electrospray Ionization) του πεπτιδικού αναλόγου **QLRDNALAKELK(CHOCO)-NH₂**. Υπολογισθέν μοριακό βάρος, M.B= 1269,37. Ευρεθέν μοριακό βάρος, M.B= 1270,03

3^ο Στάδιο: Σύνθεση του Ac-SOC₄-[Ac₂, (QLRDNAKELK(CH=N-O))₂]-NH₂ (4)

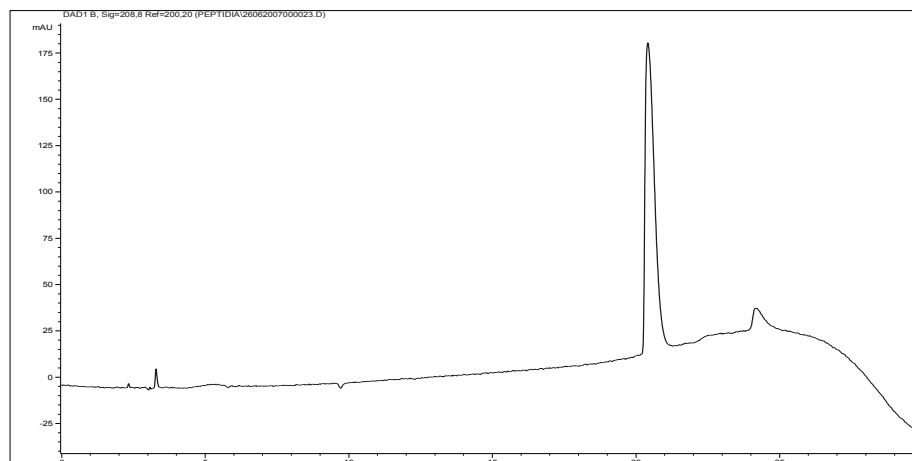


MB = 3873,38

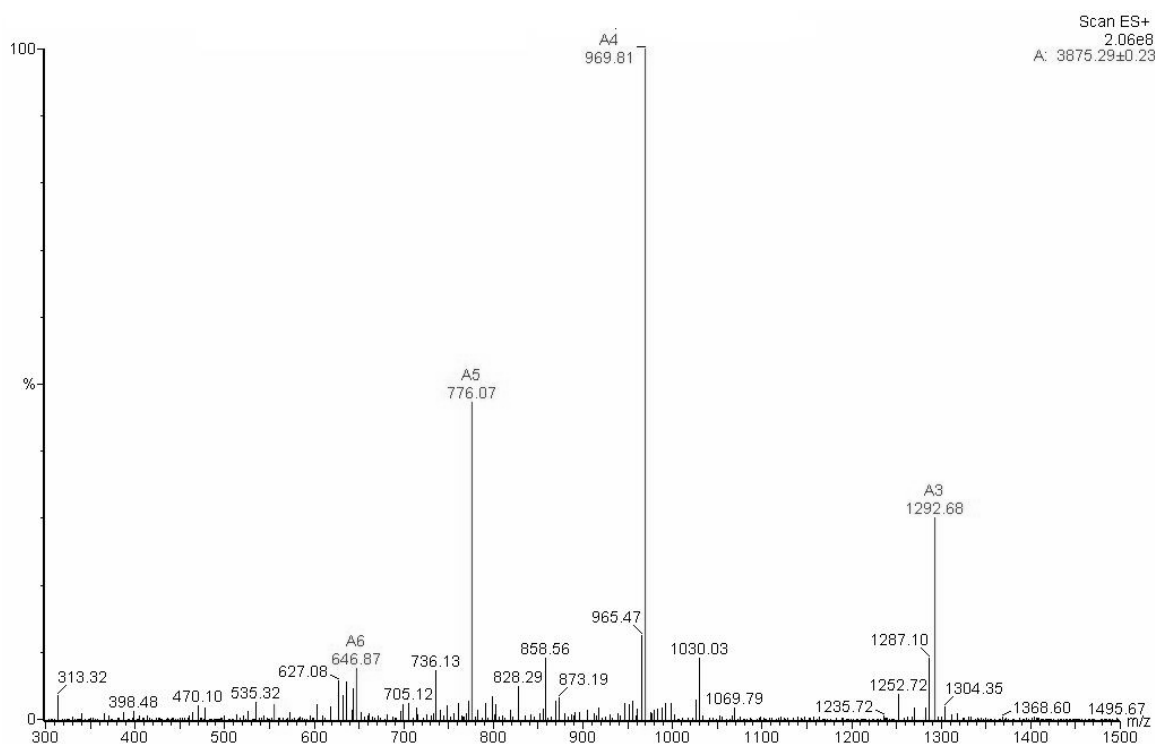
M.T: C₁₆₄H₂₈₃N₅₅O₅₃

Σε σφαιρική φιάλη που βρίσκεται σε υδρόλουτρο σε θερμοκρασία 35°C προστέθηκαν **12,98 mg** αλδεϋδικού παραγώγου και διαλύθηκαν υπό ανάδευση σε **1,02 ml H₂O**. Στο υπό ανάδευση διάλυμα προστέθηκε το διάλυμα του φορέα **Ac-SOC₄-I-(Ac₂, Aoa₂)-NH₂ (5,00 mg, 0,37 ml H₂O)** και **6,13 ml** ρυθμιστικό διάλυμα **οξικού οξέος-οξικού νατρίου** pH= 4,6. Η αντίδραση αφέθηκε για 4 ημέρες κατά τη διάρκεια των οποίων παρακολουθούνταν με φασματομετρία μάζας Electrospray Ionization (ESI-MS).

Το μίγμα της αντίδρασης οδηγήθηκε στην ημιπαρασκευαστική RP-HPLC για καθαρισμό. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από **A/B: 90/10** σε **A/B: 50/50** σε **30 min**. Η απόδοση της αντίδρασης ήταν **33%**. Η καθαρότητα του πεπτιδίου ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC (**Σχήμα 7.23**) η δε ταυτοποίησή του έγινε με φασματομετρία μάζας Electrospray Ionization (ESI-MS) (**Σχήμα 7.24**).



Σχήμα 7.23 Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του πεπτιδικού αναλόγου **Ac-SOC₄-[Ac₂, (QLRDNAKELK(CH=N-O))₂]-NH₂**. Σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA σε αναλογία **A/B: 90/10** ως **A/B: 50/50** για **30 min**.



Σχήμα 7.24 Φάσμα μάζας ESI (Electrospray Ionization) του πεπτιδικού αναλόγου **Ac-SOC₄-[Ac₂, (QLRDNAKELK(CH=N-O))₂]-NH₂**. Υπολογισθέν μοριακό βάρος, M.B=3873,38. Ευρεθέν μοριακό βάρος, M.B= 3875,29

7.8 Σύνθεση του Ac-SOC₄-[Ac₂, (MPFHNIHPLK(CH=N-O))₂]-NH₂ (5)

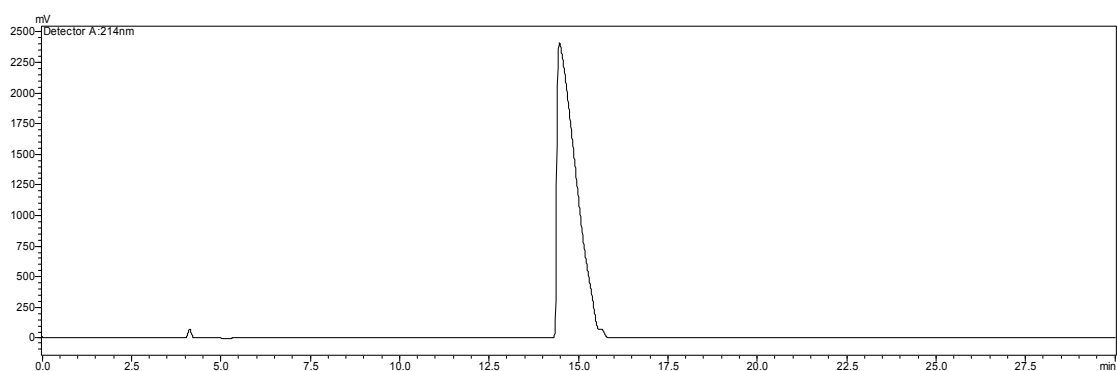
1^ο Στάδιο: Σύνθεση του επιτόπου Met-Pro-Phe-His-Asn-Ile-His-Pro-Leu-Lys(Ser)-NH₂ (T₈)

MB = 1319,55

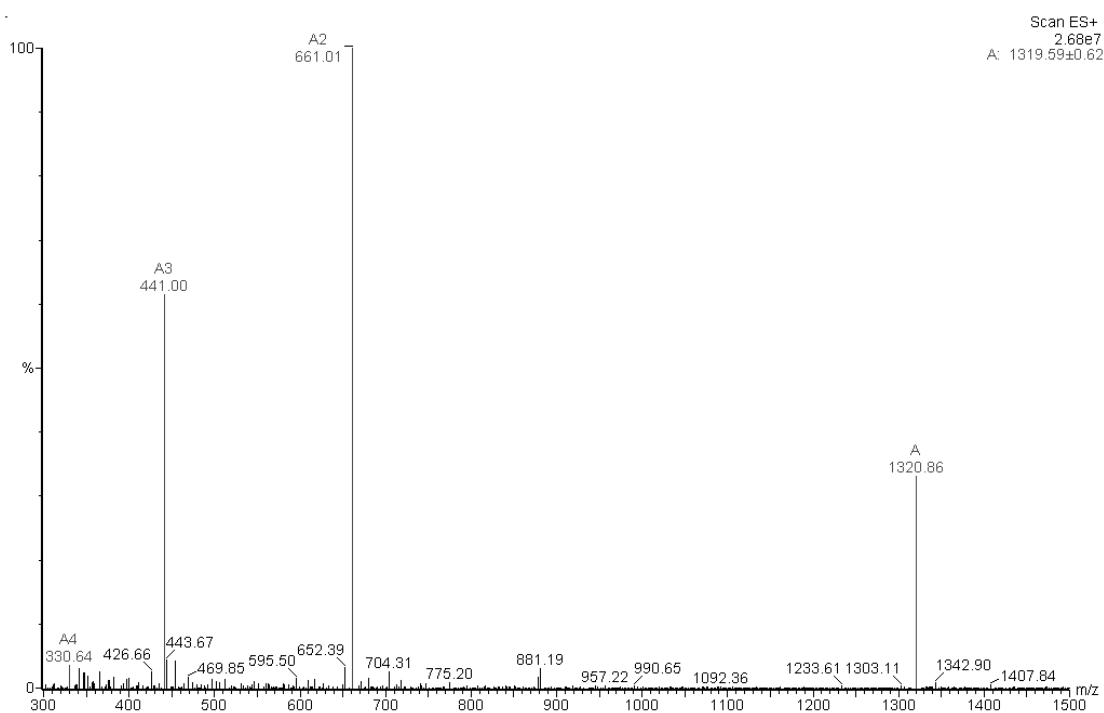
M.T: C₆₁H₉₄N₁₈O₁₃S

Η σύνθεση του πεπτιδίου έγινε σε **Rink Amide AM** ρητίνη ακολουθώντας τη γενική πορεία σύνθεσης με Fmoc στρατηγική (**Σχήμα 7.1**). Χρησιμοποιήθηκαν **0,60 g** ρητίνης με υποκατάσταση **0,67 mmole/g**. Τα αμινοξέα εισήχθηκαν ως Fmoc-παράγωγα με τις αντίστοιχες προστασίες όπως αναφέρθηκαν πιο πάνω. Όταν ολοκληρώθηκε η σύνθεση, η πεπτιδορητίνη μεταφέρθηκε σε ξηραντήρα κενού για ξήρανση υπεράνω P₂O₅. Η απόδοση σύνθεσης του πεπτιδίου πριν την αποκοπή του από την ρητίνη ήταν **88%**. Η αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη καθώς και η επεξεργασία και η παραλαβή του έγινε σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε πιο πάνω. Η απόδοση αποκοπής από τη ρητίνη ήταν **94%**.

Ο καθαρισμός του πεπτιδίου έγινε σε ημιπαρασκευαστική RP-HPLC. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από **A/B: 90/10** σε **A/B: 50/50** σε **30 min**. Η απόδοση καθαρισμού ήταν **75%**. Η καθαρότητα του πεπτιδίου ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC (**Σχήμα 7.25**) η δε ταυτοποίησή του έγινε με φασματομετρία μάζας Electrospray Ionization (ESI-MS) (**Σχήμα 7.26**).



Σχήμα 7.25 Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του πεπτιδίου **MPFHNIHPLK(S)-NH₂**. Σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA, με κλιμακούμενη βαθμίδωση σε αναλογία A/B: 90/10 ως A/B: 50/50 για 30 min.



Σχήμα 7.26 Φάσμα μάζας ESI (Electrospray Ionization) του πεπτιδίου **MPFHNIHPLK(S)-NH₂**. Υπολογισθέν μοριακό βάρος, M.B= 1319,55 Ευρεθέν μοριακό βάρος, M.B= 1319,59

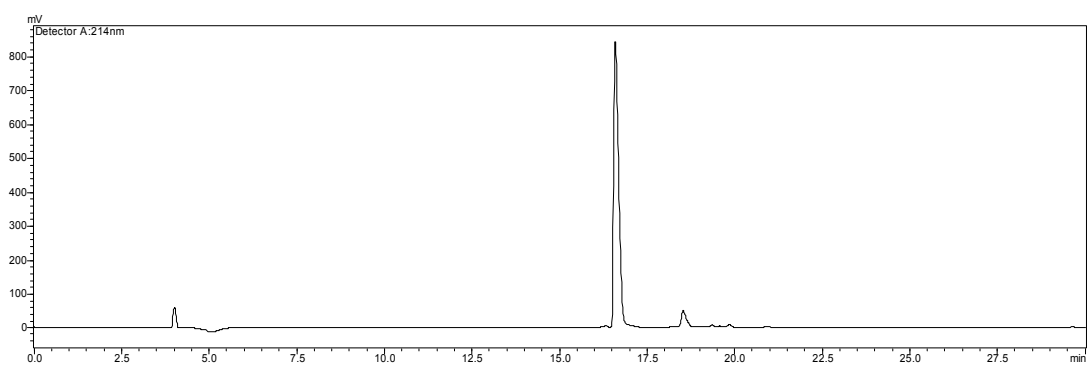
2^ο Στάδιο: Σύνθεση του αλδεϋδικού επιτόπου MPFHNIHPLK(CHOCHO)-NH₂ (T₈)

MB = 1288,49

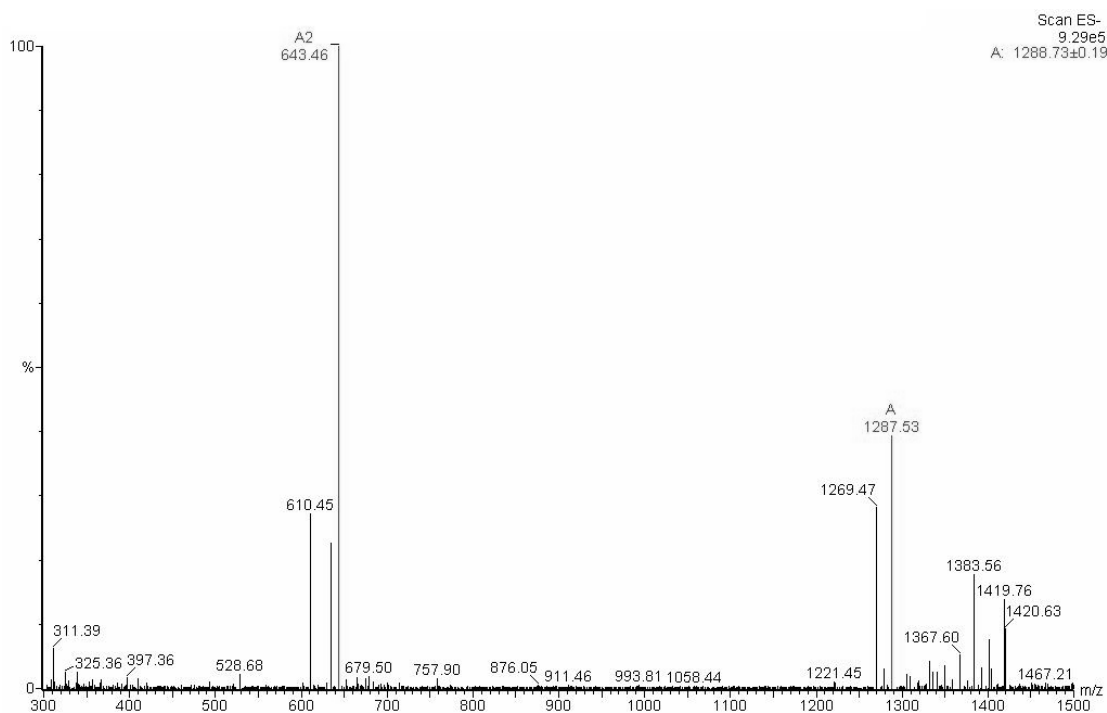
M.T: C₆₀H₈₉N₁₇O₁₃S

Η οξείδωση του **MPFHNIHPLK(S)-NH₂** πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα. Σε σφαιρική φιάλη (50ml) προστέθηκαν **25,00 mg** του πεπτιδίου και διαλύθηκαν σε **1,89 ml H₂O** υπό ανάδευση. Στη συνέχεια προστέθηκαν **15,12 ml** ρυθμιστικού διαλύματος **ιμιδαζολίου/HCl** pH= 7,0. Στο υπό ανάδευση διάλυμα προστέθηκε το διάλυμα **NaIO₄ (4,85 mg σε 1,89 ml H₂O)**. Η αντίδραση οξείδωσης αφέθηκε για **1:30 min**. Η διακοπή της αντίδρασης έγινε με την προσθήκη διαλύματος αιθυλενογλυκόλης **0,45 ml** (100 mM).

Το επιθυμητό πεπτιδικό ανάλογο απομονώθηκε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από **A/B: 90/10** σε **A/B: 50/50** σε **30 min**. Η απόδοση οξείδωσης ήταν **63%**. Η καθαρότητα του πεπτιδίου ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC (**Σχήμα 7.27**) η δε ταυτοποίησή του έγινε με φασματομετρία μάζας Electrospray Ionization (ESI-MS) (**Σχήμα 7.28**).

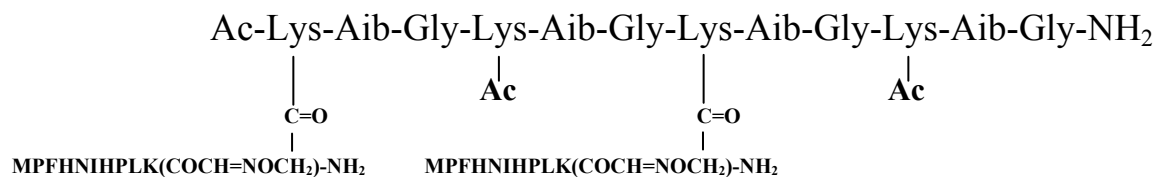


Σχήμα 7.27 Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του πεπτιδικού αναλόγου **MPFHNIHPLK(CHOCO)-NH₂**. Σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA σε αναλογία A/B: 90/10 ως A/B: 50/50 για 30 min.



Σχήμα 7.28 Φάσμα μάζας ESI (Electrospray Ionization) του πεπτιδικού αναλόγου **MPFHNIHPLK(CHOCO)-NH₂**. Υπολογισθέν μοριακό βάρος, M.B=1288,49. Ευρεθέν μοριακό βάρος, M.B=1288,73

3^ο Στάδιο: Σύνθεση του Ac-SOC₄-(Ac₂, (MPFHNIHPLK(CH=N-O))₂)-NH₂ (5)

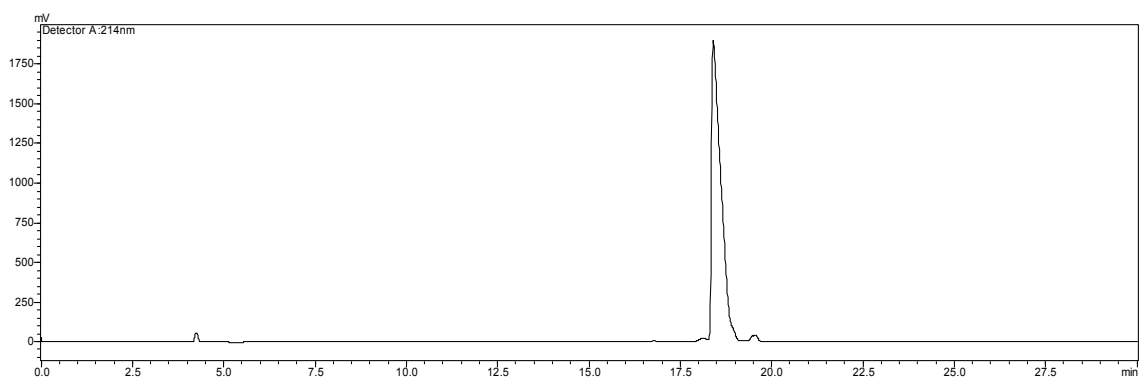


MB = 3911,62

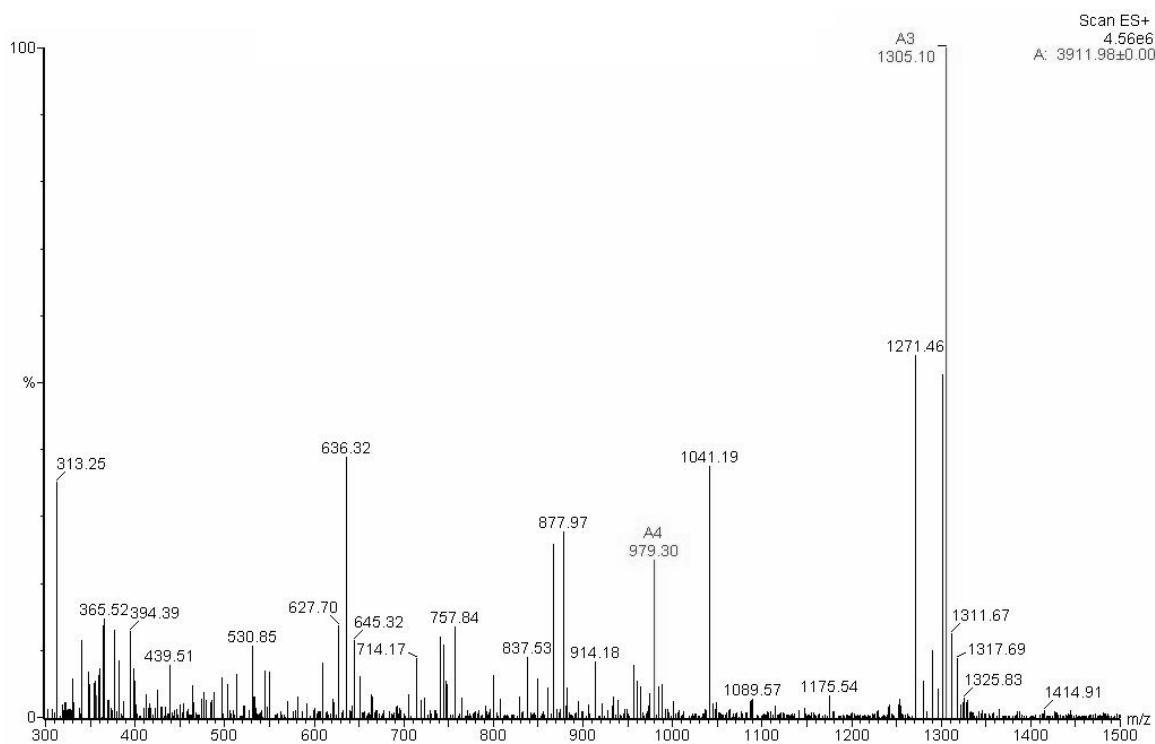
M.T: C₁₇₈H₂₇₇N₅₃O₄₃S₂

Σε σφαιρική φιάλη που βρίσκεται σε υδρόλουτρο σε θερμοκρασία 35°C προστέθηκαν **12,00 mg** αλδεϋδικού παραγώγου και διαλύθηκαν υπό ανάδευση σε **0,93 ml H₂O**. Στο υπό ανάδευση διάλυμα προστέθηκε το διάλυμα του φορέα **Ac-SOC₄-(Ac₂, Aoa₂)-NH₂ (5,30 mg, 0,39 ml H₂O)** και **5,59 ml** ρυθμιστικό διάλυμα **οξικού οξέος-οξικού νατρίου** pH= 4,6. Η αντίδραση αφέθηκε για 4 ημέρες κατά τη διάρκεια των οποίων παρακολουθούνταν με φασματομετρία μάζας Electrospray Ionization (ESI-MS).

Το μίγμα της αντίδρασης οδηγήθηκε στην ημιπαρασκευαστική RP-HPLC για καθαρισμό. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από **A/B: 90/10** σε **A/B: 50/50** σε **30 min**. Η απόδοση της αντίδρασης ήταν **60%**. Η καθαρότητα του πεπτιδίου ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC (**Σχήμα 7.29**) η δε ταυτοποίησή του έγινε με φασματομετρία μάζας Electrospray Ionization (ESI-MS) (**Σχήμα 7.30**).

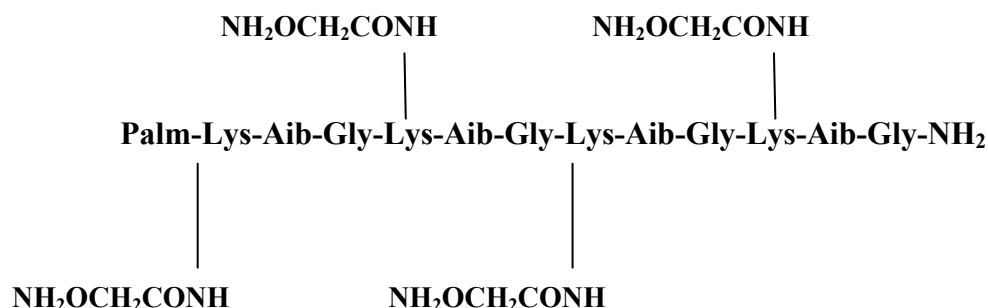


Σχήμα 7.29 Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του πεπτιδικού αναλόγου **Ac-SOC₄-[Ac₂, (MPFHNIHPLK(CH=N-O))₂]-NH₂**. Σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA σε αναλογία A/B: 90/10 ως A/B: 50/50 για 30 min.



Σχήμα 7.30 Φάσμα μάζας ESI (Electrospray Ionization) του πεπτιδικού αναλόγου **Ac-SOC₄-[2Ac, (MPFHNIHPLK(CH=N-O))₂]-NH₂**. Υπολογισθέν μοριακό βάρος, M.B=3911,62. Ευρεθέν μοριακό βάρος, M.B= 3911,98

7.9 Σύνθεση του φορέα Palm-SOC₄-(Aoa)₄-NH₂ (6)

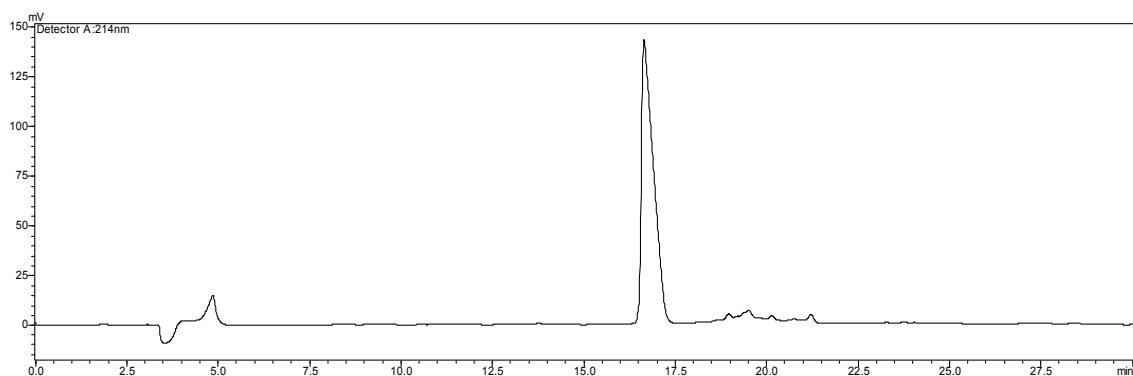


M.B = 1628,96

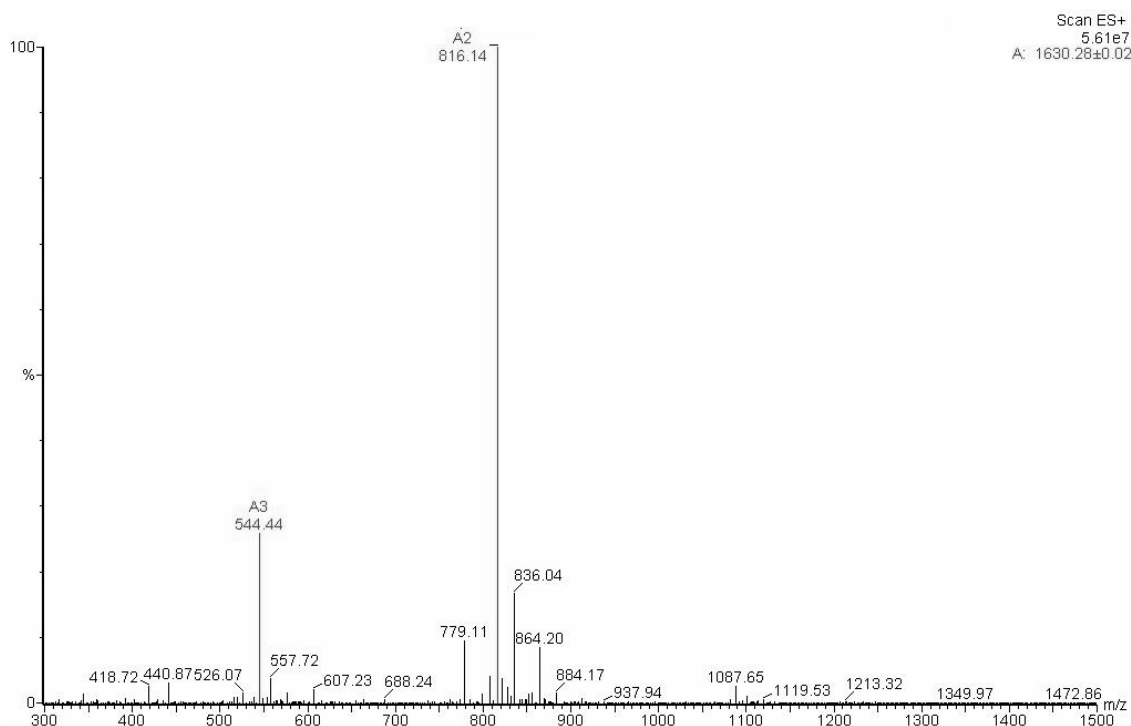
M.T: C₇₂H₁₃₃N₂₁O₂₁

Η σύνθεση του πεπτιδίου έγινε σε **Rink Amide AM** ρητίνη ακολουθώντας τη γενική πορεία σύνθεσης με Fmoc στρατηγική (**Σχήμα 7.1**). Χρησιμοποιήθηκαν **0,91 g** ρητίνης με υποκατάσταση **0,67 mmole/g**. Τα αμινοξέα εισήχθηκαν ως Fmoc-παράγωγα με τις αντίστοιχες προστασίες όπως αναφέρθηκαν πιο πάνω. Μετά την προσθήκη του N-τελικού αμινοξέος έγινε απομάκρυνση της Fmoc-ομάδας με δμα 20% πιπεριδίνης/DMF και ακολούθησε παλμυτιλίωση με παλμιτικό ανυδρίτη σε DCM και πυριδίνη. Στη συνέχεια έγινε απομάκρυνση των παράπλευρων Mtt-ομάδων με διάλυμα 1,8% TFA/DCM και προστέθηκε Boc-αμινοξικό οξύ. Όταν ολοκληρώθηκε η σύνθεση, η πεπτιδορητίνη μεταφέρθηκε σε ξηραντήρα κενού για ξήρανση υπεράνω P₂O₅. Η απόδοση σύνθεσης του πεπτιδίου πριν την αποκοπή του από την ρητίνη ήταν **86%**. Η αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη καθώς και η επεξεργασία και η παραλαβή του έγινε σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε πιο πάνω. Η απόδοση αποκοπής από τη ρητίνη ήταν **94%**.

Ο καθαρισμός του πεπτιδίου έγινε σε ημιπαρασκευαστική RP-HPLC. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από **A/B: 70/30** σε **A/B: 20/80** σε **30 min**. Η απόδοση καθαρισμού ήταν **33%**. Η καθαρότητα του πεπτιδίου ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC (**Σχήμα 7.31**) η δε ταυτοποίησή του έγινε με φασματομετρία μάζας Electrospray Ionization (ESI-MS) (**Σχήμα 7.32**).



Σχήμα 7.31 Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του φορέα **Ac-SOC₄-(Aoa)₄-NH₂**. Σύστημα έκλουσης: (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA σε αναλογία **A/B: 70/30** ως **A/B: 20/80** για **30 min**.



Σχήμα 7.32 Φάσμα μάζας ESI (Electrospray Ionization) του φορέα **Ac-SOC₄-(Aoa)₄-NH₂**. Υπολογισθέν μοριακό βάρος, M.B= **1628,96**. Ευρεθέν μοριακό βάρος, M.B= **1630,28**

7.10 Σύνθεση του Palm-SOC4-[LLTTNKDGAK(CH=N-O)]₄-NH₂ (7)

Το **πρώτο στάδιο**, όπως έχει αναφερθεί, περιλαμβάνει τη σύνθεση του επιτόπου και του φορέα ξεχωριστά με τη βήμα-προς-βήμα πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση κατά Merrifield. Η σύνθεση του φορέα περιγράφηκε στην ενότητα 7.9 και γι' αυτό παραλείπεται. Το ίδιο ισχύει και για το ανάλογο (8).

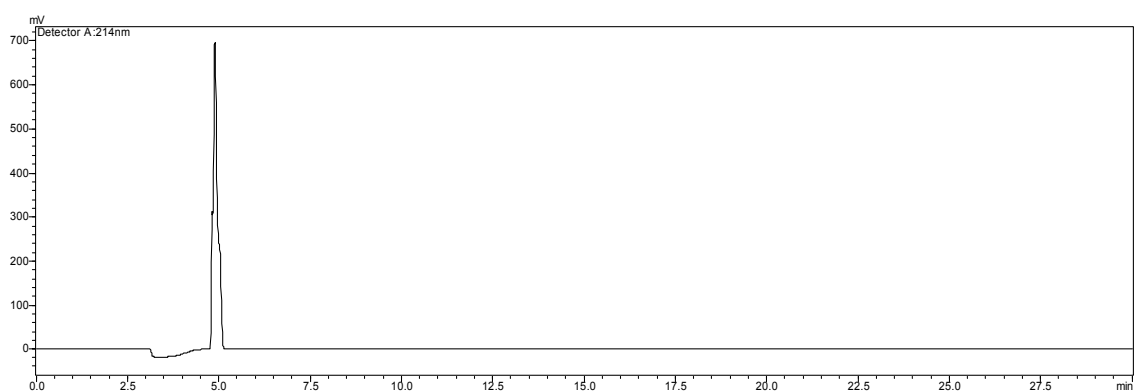
1^ο Στάδιο: Σύνθεση του επιτόπου Leu-Leu-Thr-Thr-Asn-Lys-Asp-Gly-Ala-Lys(Ser)-NH₂ (HIV)

MB = 1146,26

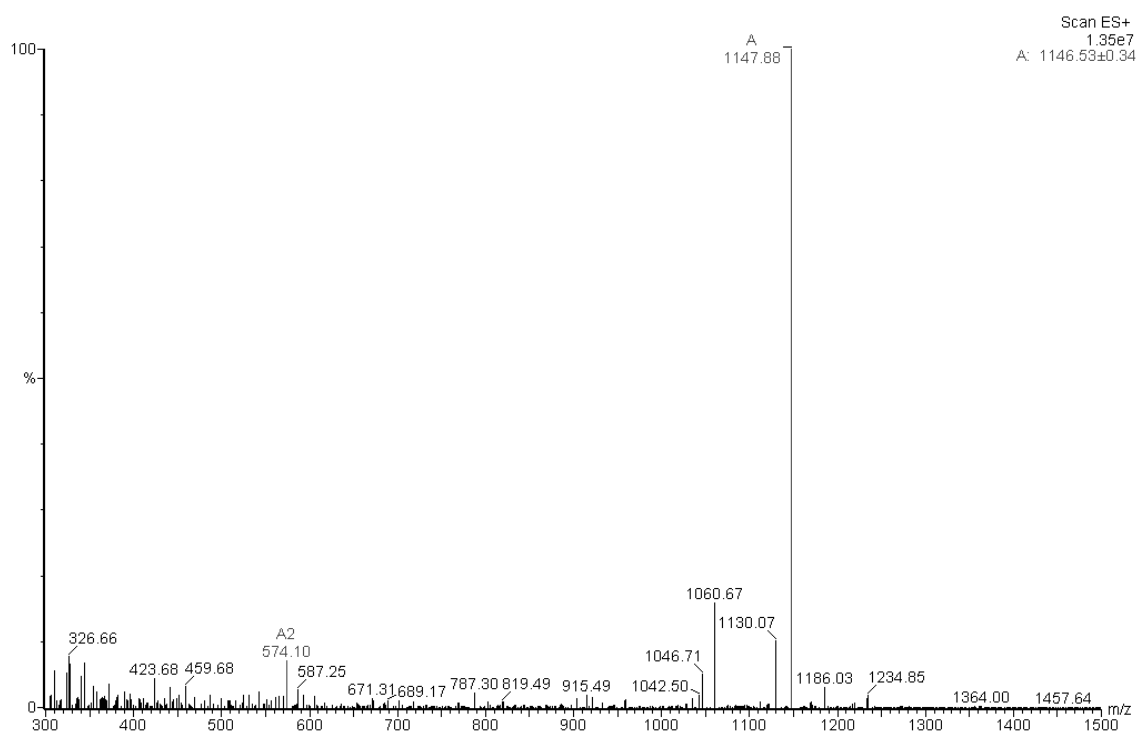
M.T: C₄₈H₈₇N₁₅O₁₇

Η σύνθεση του πεπτιδίου έγινε σε **Rink Amide AM** ρητίνη ακολουθώντας τη γενική πορεία σύνθεσης με Fmoc στρατηγική (**Σχήμα 7.1**). Χρησιμοποιήθηκαν **0,90 g** ρητίνης με υποκατάσταση **0,67 mmole/g**. Τα αμινοξέα εισήχθησαν ως Fmoc-παράγωγα με τις αντίστοιχες προστασίες όπως αναφέρθηκαν πιο πάνω. Όταν ολοκληρώθηκε η σύνθεση, η πεπτιδορητίνη μεταφέρθηκε σε ξηραντήρα κενού για ξήρανση υπεράνω P₂O₅. Η απόδοση σύνθεσης του πεπτιδίου πριν την αποκοπή του από την ρητίνη ήταν **78%**. Η αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη καθώς και η επεξεργασία και η παραλαβή του έγινε σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε πιο πάνω. Η απόδοση αποκοπής από τη ρητίνη ήταν **92%**.

Ο καθαρισμός του πεπτιδίου έγινε σε ημιπαρασκευαστική RP-HPLC. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από **A/B: 70/30** σε **A/B: 50/50** σε **30 min**. Η απόδοση καθαρισμού ήταν **40%**. Η καθαρότητα του πεπτιδίου ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC (**Σχήμα 7.33**) η δε ταυτοποίησή του έγινε με φασματομετρία μάζας Electrospray Ionization (ESI-MS) (**Σχήμα 7.34**).



Σχήμα 7.33 Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του πεπτιδίου **LLTTNKDGAK(S)-NH₂**. Σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA, με κλιμακούμενη βαθμίδωση σε αναλογία **A/B: 70/30** ως **A/B: 50/50** για **30 min**.



Σχήμα 7.34 Φάσμα μάζας ESI (Electrospray Ionization) του πεπτιδίου **LLTTNKDGAK(S)-NH₂**. Υπολογισθέν μοριακό βάρος, M.B= **1146,26** Ευρεθέν μοριακό βάρος, M.B= **1146,53**

2^ο Στάδιο: Σύνθεση του αλδεϋδικού επιτόπου LLTTNKDGAK(CHO)-NH₂ (HIV)

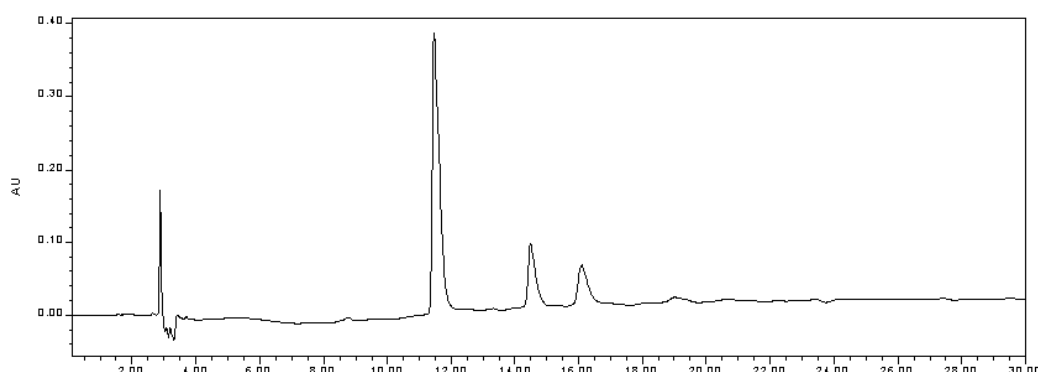
MB = 1115,2

M.T: C₄₇H₈₂N₁₄O₁₇

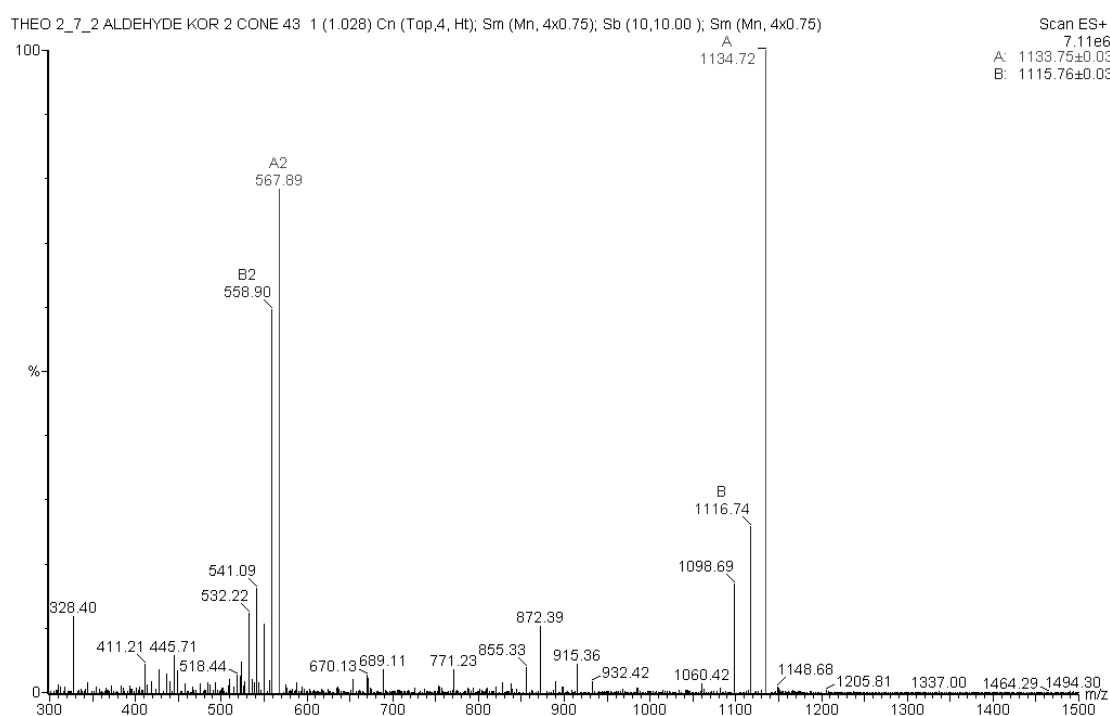
Η οξείδωση του LLTTNKDGAK(S)-NH₂ πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα. Σε σφαιρική φιάλη (50ml) υπό ανάδευση προστέθηκαν **48,10 mg** του πεπτιδίου και διαλύθηκαν σε **4,20 ml H₂O**. Στη συνέχεια προστέθηκαν **33,60 ml** ρυθμιστικού διαλύματος **ιμιδαζολίου/HCl** pH= 7,0. Στο υπό ανάδευση διάλυμα προστέθηκε το διάλυμα **NaIO₄ (10,78 mg σε 4,20 ml H₂O)**. Η αντίδραση οξείδωσης αφέθηκε για 4 min. Η διακοπή της αντίδρασης έγινε με την προσθήκη διαλύματος **αιθυλενογλυκόλης 1 ml (100 mM)**.

Το επιθυμητό πεπτιδικό ανάλογο απομονώθηκε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από **A/B: 90/10 σε A/B: 50/50 σε 30 min**. Η απόδοση οξείδωσης ήταν **49%**. Η καθαρότητα του πεπτιδίου ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC (**Σχήμα 7.35**) η δε ταυτοποίησή του έγινε με φασματομετρία μάζας Electrospray Ionization (ESI-MS) (**Σχήμα 7.36**).

Στο φάσμα μάζας προσδιορίστηκαν δυο κύριες κορυφές που αντιστοιχούν σε M.B 1115,76 και 1133,75. Το 1115,76 αντιστοιχεί στο M.B του αλδεϋδικού αναλόγου ενώ το 1133,75 αντιστοιχεί στο M.B της ένυδρης μορφής του αλδεϋδικού επιτόπου.

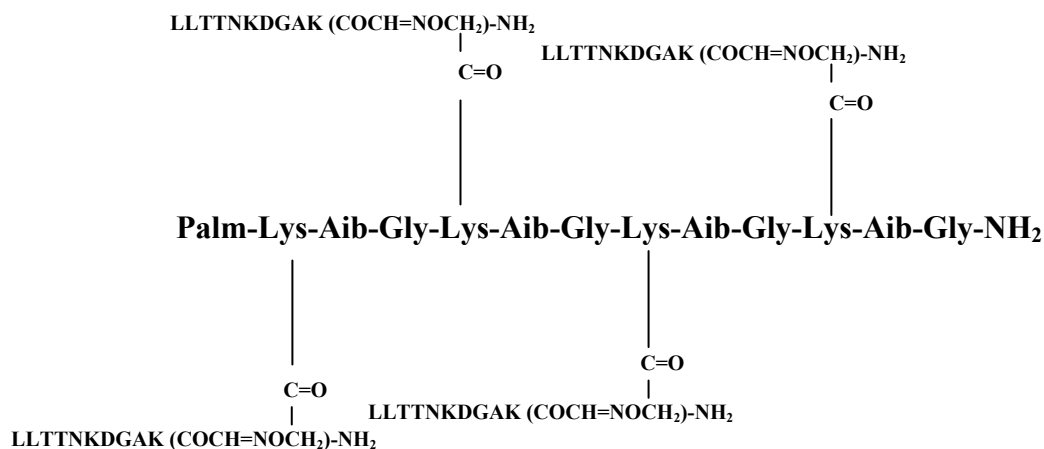


Σχήμα 7.35 Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του πεπτιδικού αναλόγου **LLTTNKDGA(CHO)2-NH₂**. Σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA σε αναλογία A/B: 90/10 ως A/B: 50/50 για 30 min.



Σχήμα 7.36 Φάσμα μάζας ESI (Electrospray Ionization) του πεπτιδικού αναλόγου **LLTTNKDGA(CHO)2-NH₂**. Υπολογισθέν μοριακό βάρος, M.B=1115,2. Ευρεθέν μοριακό βάρος, M.B=1115,76

3^ο Στάδιο: Σύνθεση του Palm-SOC4-[LLTTNKDGAK(CH=N-O)]₄-NH₂ (7)

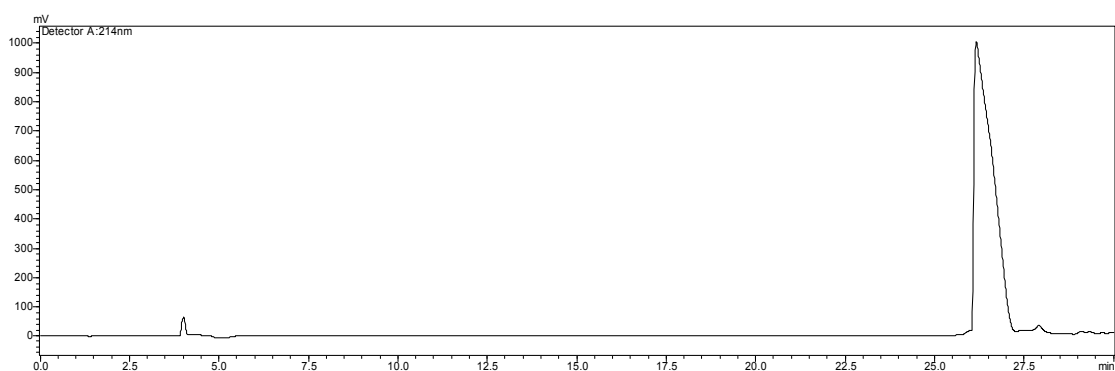


MB = 6017,9

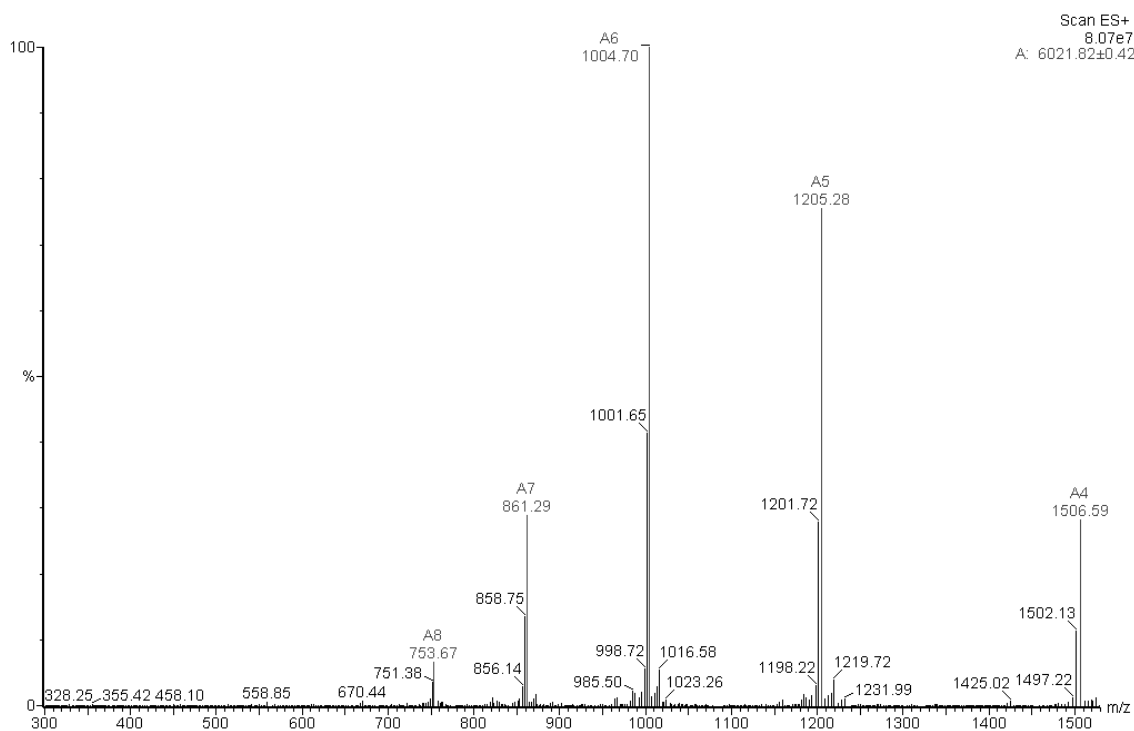
M.T: C₂₆₀H₄₅₃N₇₇O₈₅

Σε σφαιρική φιάλη που βρίσκεται σε υδρόλουτρο σε θερμοκρασία 35°C προστέθηκαν **23,05 mg** αλδεϋδικού παραγώγου και διαλύθηκαν υπό ανάδευση σε **2,07 ml H₂O**. Στο υπό ανάδευση διάλυμα προστέθηκε το διάλυμα του φορέα (**6,01 mg, 0,37ml H₂O**) και **12,40ml** ρυθμιστικό διάλυμα **οξικού οξέος-οξικού νατρίου** pH= 4,6. Η αντίδραση αφέθηκε για 4 ημέρες κατά τη διάρκεια των οποίων παρακολουθούνταν με φασματομετρία μάζας Electronspray Ionization (ESI-MS).

Το μίγμα της αντίδρασης οδηγήθηκε στην ημιπαρασκευαστική RP-HPLC για καθαρισμό. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από **A/B: 90/10** σε **A/B: 50/50** σε **30 min**. Η απόδοση της αντίδρασης ήταν **24,4%**. Η καθαρότητα του πεπτιδίου ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC (**Σχήμα 7.37**) η δε ταυτοποίησή του έγινε με φασματομετρία μάζας Electronspray Ionization (ESI-MS) (**Σχήμα 7.38**).



Σχήμα 7.37 Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του πεπτιδικού αναλόγου **Ac-SOC₄-[LLTTNKDGAK(CH=N-O)]₄-NH₂**. Σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA σε αναλογία A/B: 90/10 ως A/B: 50/50 για 30 min.



Σχήμα 7.38 Φάσμα μάζας ESI (Electrospray Ionization) του πεπτιδικού αναλόγου **Ac-SOC₄-[LLTTNKDGAK(CH=N-O)]₄-NH₂**. Υπολογισθέν μοριακό βάρος, M.B= 6017,9. Ευρεθέν μοριακό βάρος, M.B= 6021,82

7.11 Σύνθεση του Palm-SOC₄-[HKYPC(Acm)STTNC(Acm)SPK(CH=N-O)]₄-NH₂ (8)

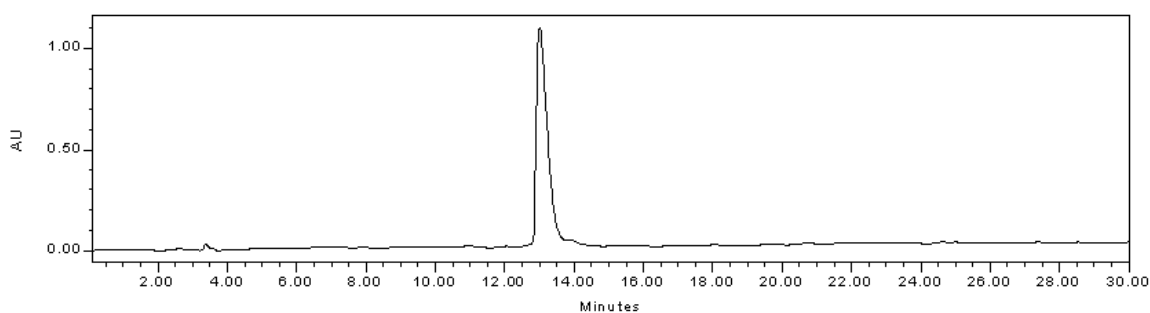
1^ο Στάδιο: Σύνθεση του επιτόπου His-Lys-Tyr-Pro-Cys(Acm)-Ser-Thr-Thr-Asn-Cys(Acm)-Lys(Ser)-NH₂ (HIV)

$$MB = 1693,91$$

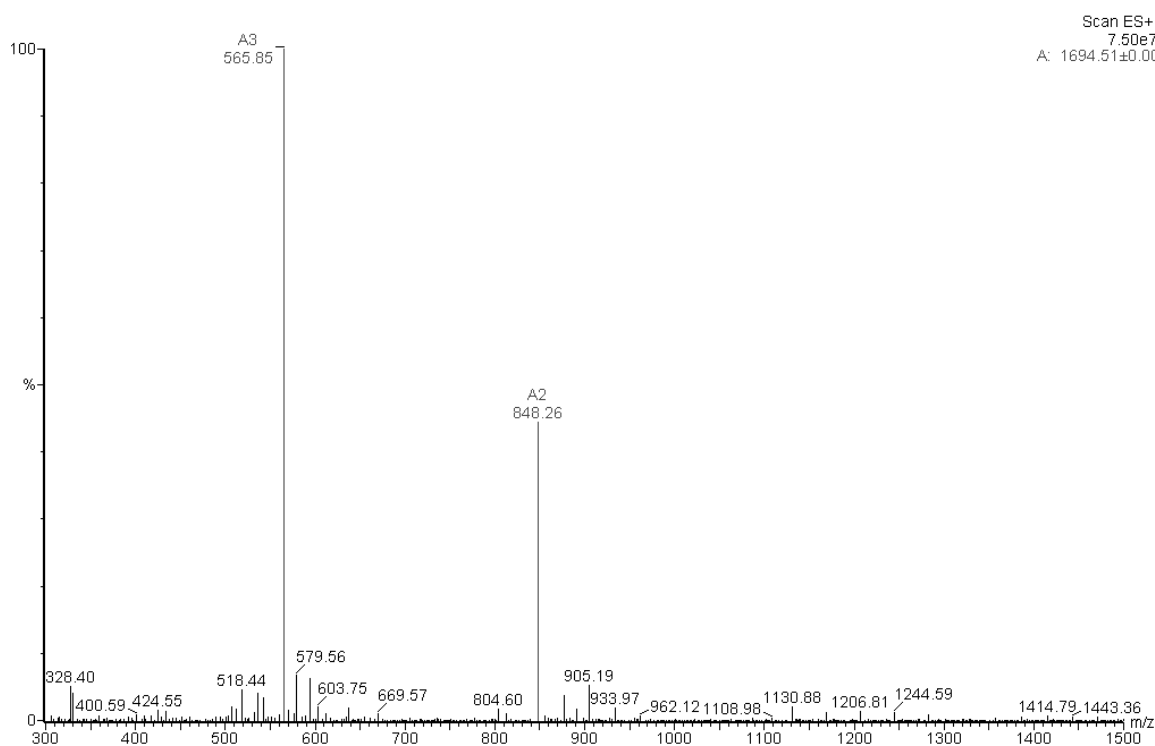
$$M.T: C_{70}H_{112}N_{22}O_{23}S_2$$

Η σύνθεση του πεπτιδίου έγινε σε **Rink Amide AM** ρητίνη ακολουθώντας τη γενική πορεία σύνθεσης με Fmoc στρατηγική (**Σχήμα 7.1**). Χρησιμοποιήθηκαν **0,91 g** ρητίνης με υποκατάσταση **0,67 mmole/g**. Τα αμινοξέα εισήχθησαν ως Fmoc-παράγωγα με τις αντίστοιχες προστασίες όπως αναφέρθηκαν πιο πάνω. Όταν ολοκληρώθηκε η σύνθεση, η πεπτιδορητίνη μεταφέρθηκε σε ξηραντήρα κενού για ξήρανση υπεράνω P₂O₅. Η απόδοση σύνθεσης του πεπτιδίου πριν την αποκοπή του από την ρητίνη ήταν **86%**. Η αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη καθώς και η επεξεργασία και η παραλαβή του έγινε σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε πιο πάνω. Η απόδοση αποκοπής από τη ρητίνη ήταν **92%**.

Ο καθαρισμός του πεπτιδίου έγινε σε ημιπαρασκευαστική RP-HPLC. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από **A/B: 70/30** σε **A/B: 50/50** σε **30 min**. Η απόδοση καθαρισμού ήταν **67%**. Η καθαρότητα του πεπτιδίου ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC (**Σχήμα 7.39**) η δε ταυτοποίησή του έγινε με φασματομετρία μάζας Electronspray Ionization (ESI-MS) (**Σχήμα 7.40**).



Σχήμα 7.39 Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του πεπτιδίου **HKYPC(Acm)STTNC(Acm)SPK(S)-NH₂**. Σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA, με κλιμακούμενη βαθμίδωση σε αναλογία **A/B: 90/10** ως **A/B: 50/50** για **30 min**.



Σχήμα 7.40 Φάσμα μάζας ESI (Electrospray Ionization) του πεπτιδίου **HKYPC(Acm)STTNC(Acm)SPK(S)-NH₂**. Υπολογισθέν μοριακό βάρος, M.B= 1693,91
Ευρεθέν μοριακό βάρος, M.B= 1694,51

2^ο Στάδιο: Σύνθεση του αλδεϋδικού επιτόπου HKYPC(Acm)STTNC(Acm)SPK(CHOCHO)-NH₂ (HIV)

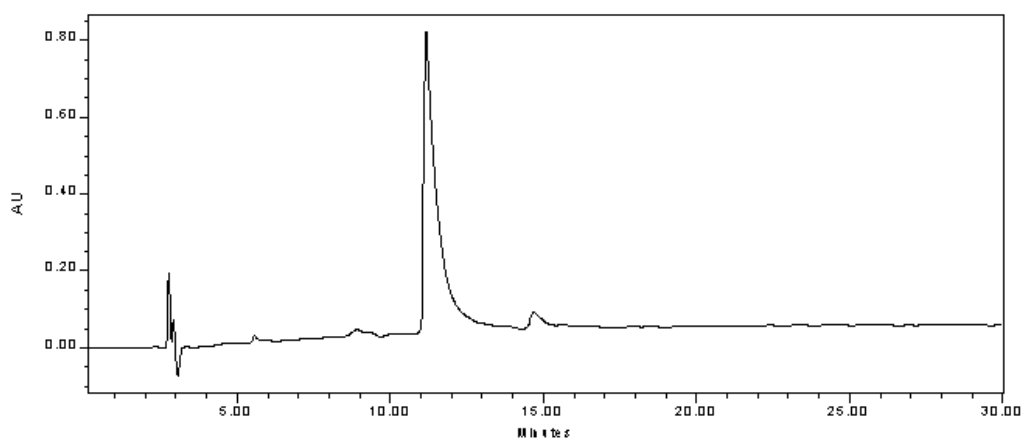
MB = 1662,86

M.T: C₆₉H₁₀₇N₂₁O₂₃S₂

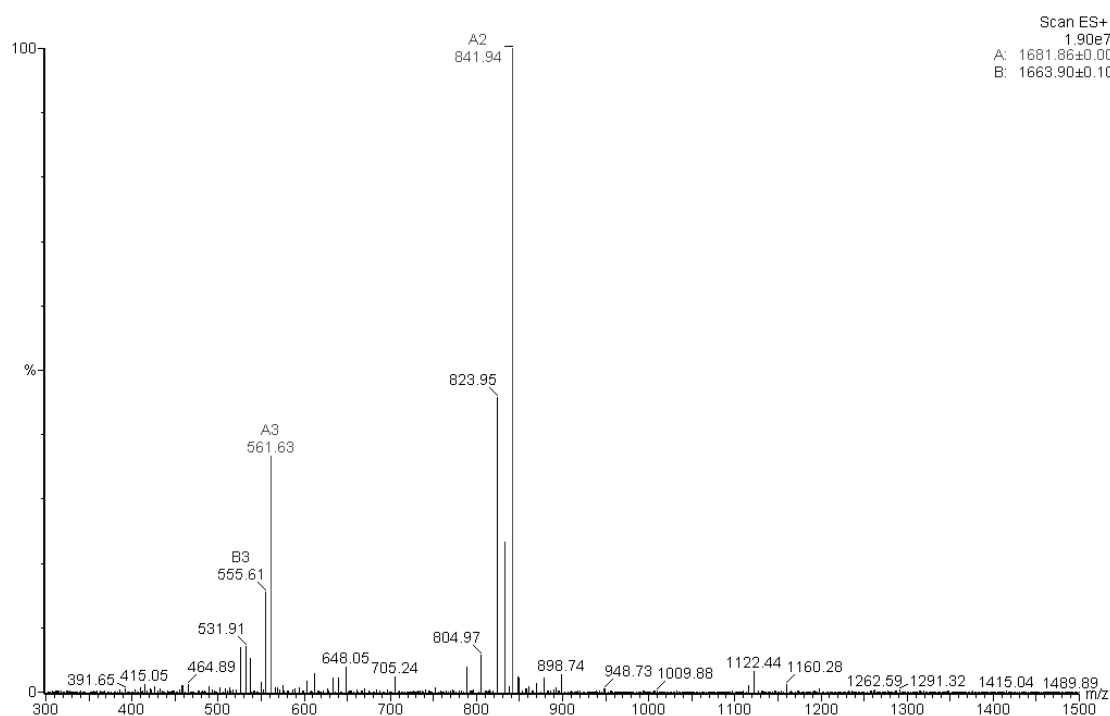
Η οξείδωση του HKYPC(Acm)STTNC(Acm)SPK(S)-NH₂ πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα. Σε σφαιρική φιάλη (50ml) προστέθηκαν **30 mg** του πεπτιδίου και διαλύθηκαν σε **1,77 ml H₂O** υπό ανάδευση. Στη συνέχεια προστέθηκαν **14,24 ml** ρυθμιστικού διαλύματος ιμιδαζολίου/HCl pH= 7,0. Στο υπό ανάδευση διάλυμα προστέθηκε το διάλυμα **NaIO₄ (4,57 mg σε 1,78 ml H₂O)**. Η αντίδραση οξείδωσης αφέθηκε για **4 min**. Η διακοπή της αντίδρασης έγινε με την προσθήκη διαλύματος **αιθυλενογλυκόλης 0,43 ml** (100 mM).

Το επιθυμητό πεπτιδικό ανάλογο απομονώθηκε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από **A/B: 90/10** σε **A/B: 50/50** σε **30 min**. Η απόδοση οξείδωσης ήταν **60%**. Η καθαρότητα του πεπτιδίου ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC (**Σχήμα 7.41**) η δε ταυτοποίησή του έγινε με φασματομετρία μάζας Electrospray Ionization (ESI-MS) (**Σχήμα 7.42**).

Στο φάσμα μάζας προσδιορίστηκαν δυο κύριες κορυφές που αντιστοιχούν σε M.B 1663,90 και 1681,86. Το 1663,90 αντιστοιχεί στο M.B του αλδεϋδικού αναλόγου ενώ το 1681,86 αντιστοιχεί στο M.B της ένυδρης μορφής του αλδεϋδικού επιτόπου.

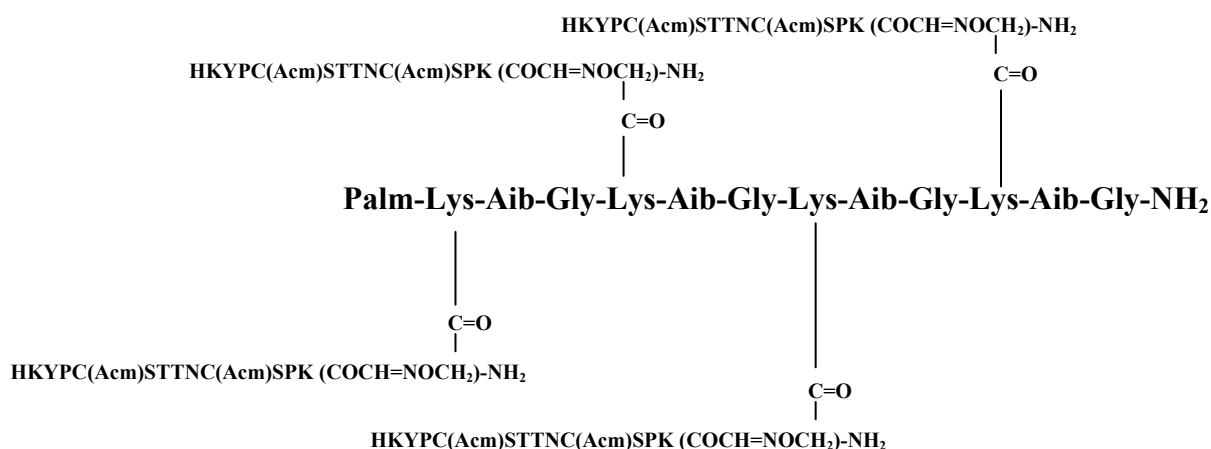


Σχήμα 7.41 Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του πεπτιδικού αναλόγου **HKYPC(Acm)STTNC(Acm)SPK(CHOCHO)-NH₂**. Σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA σε αναλογία A/B: 90/10 ως A/B: 50/50 για 30 min.



Σχήμα 7.42 Φάσμα μάζας ESI (Electrospray Ionization) του πεπτιδικού αναλόγου **HKYPC(Acm)STTNC(Acm)SPK(CHOCHO)-NH₂**. Υπολογισθέν μοριακό βάρος, M.B=1662,86. Ευρεθέν μοριακό βάρος, M.B=1663,90

3^ο Στάδιο: Σύνθεση του Palm-SOC₄-[HKYPC(Acm)STTNC(Acm)SPK(CH=N-O)]₄-NH₂
(8)

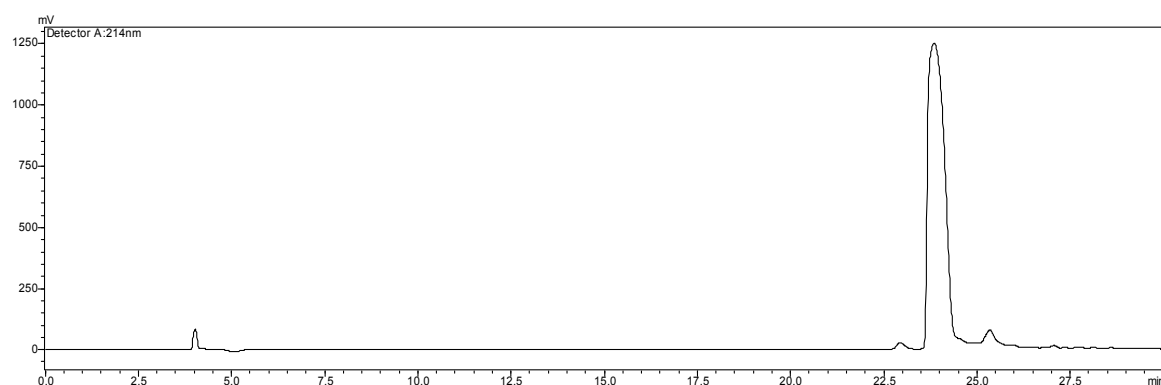


MB = 8208,36

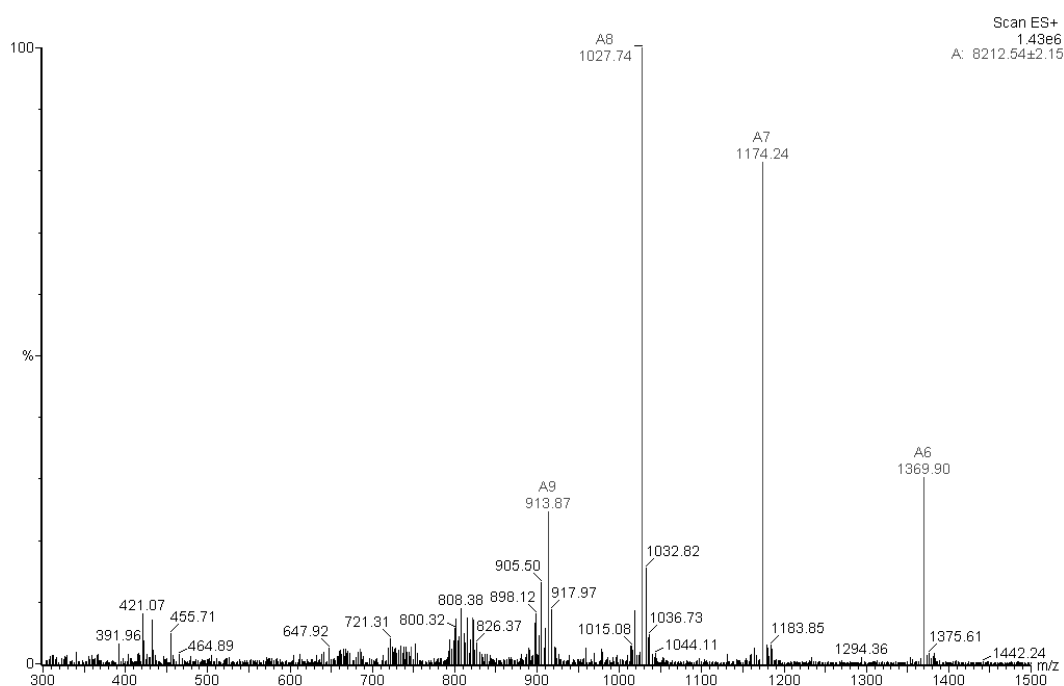
M.T: C₃₄₈H₅₅₃N₁₀₅O₁₀₉S₈

Σε σφαιρική φιάλη που βρίσκεται σε υδρόλουτρο σε θερμοκρασία 35°C προστέθηκαν **17,57 mg** αλδεϋδικού παραγώγου και διαλύθηκαν υπό ανάδευση σε **1,06 ml H₂O**. Στο υπό ανάδευση διάλυμα προστέθηκε το διάλυμα του φορέα (**3,6 mg, 0,22 ml H₂O**) και **6.34 ml** ρυθμιστικό διάλυμα **οξικού οξέος-οξικού νατρίου** pH= 4,6. Η αντίδραση αφέθηκε για 4 ημέρες κατά τη διάρκεια των οποίων παρακολουθούνταν με φασματομετρία μάζας Electronspray Ionization (ESI-MS).

Το μίγμα της αντίδρασης οδηγήθηκε στην ημιπαρασκευαστική RP-HPLC για καθαρισμό. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από **A/B: 90/10** σε **A/B: 50/50** σε **30 min**. Η απόδοση της αντίδρασης ήταν **47%**. Η καθαρότητα του πεπτιδίου ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC (**Σχήμα 7.43**) η δε ταυτοποίησή του έγινε με φασματομετρία μάζας Electronspray Ionization (ESI-MS) (**Σχήμα 7.44**).

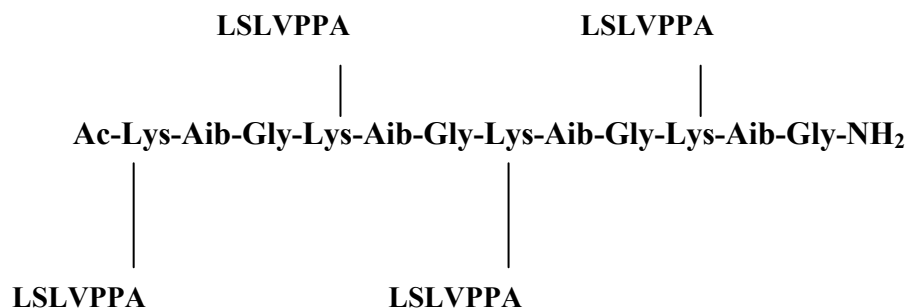


Σχήμα 7.43 Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του πεπτιδικού αναλόγου **Palm-SOC₄-[HKYPC(Acm)STTNC(Acm)SPK(CH=N-O)]₄-NH₂**. Σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA σε αναλογία A/B: 90/10 ως A/B: 50/50 για 30 min.



Σχήμα 7.44 Φάσμα μάζας ESI (Electrospray Ionization) του πεπτιδικού αναλόγου **Palm-SOC₄-[HKYPC(Acm)STTNC(Acm)SPK(CH=N-O)]₄-NH₂**. Υπολογισθέν μοριακό βάρος, M.B= 8208,36. Ευρεθέν μοριακό βάρος, M.B= 8212,54

7.12 Σύνθεση του Ac-SOC₄-(LSLVPPA)₄-OH (9)



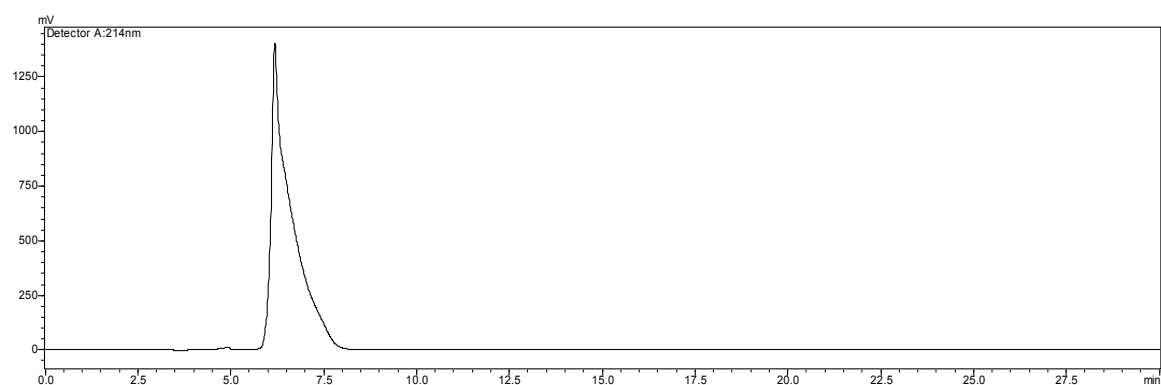
M.B =3852,73

M.T: C₁₈₂H₃₁₂N₄₄O₄₆

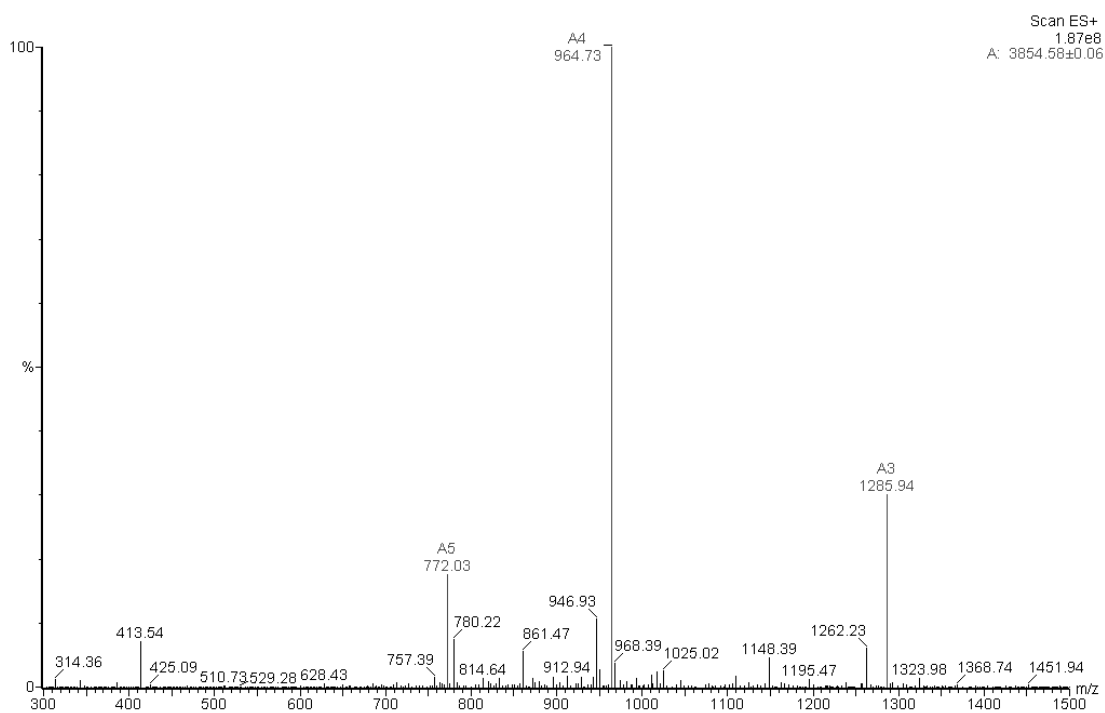
Αρχικά έγινε η σύνθεση του τμήματος του φορέα Ac-[Lys(Fmoc)-Aib-Gly]₄-PAM ρητίνη ακολουθώντας την Boc-στρατηγική σε Boc-Gly-PAM ρητίνη (1,6 gr) στην οποία είχε γίνει μείωση υποκατάστασης (0,63mmol). Τα αμινοξέα εισήχθηκαν ως Boc-παράγωγα με τις αντίστοιχες προστασίες όπως αναφέρθηκαν πιο πάνω. Όταν προστέθηκε η N-τελική Boc-Lys(Fmoc)-OH έγινε απομάκρυνση της Boc-ομάδας και ακολούθησε ακετυλίωση με οξικό ανυδρίτη σε πυριδίνη. Ακολούθησε ξήρανση της πεπτιδορητίνης σε ξηραντήρα κενού υπεράνω P₂O₅. Η απόδοση σύνθεσης του φορέα πριν την αποκοπή του από την ρητίνη ήταν **80%**. Η πεπτιδορητίνη χωρίστηκε στα δύο για την σύνθεση των αναλόγων (9), (10).

Για το ανάλογο (9) χρησιμοποιήθηκαν 1,13gr πεπτιδορητίνης. Τα αμινοξέα εισήχθηκαν ως Boc-παράγωγα με τις αντίστοιχες προστασίες όπως αναφέρθηκαν πιο πάνω. Όταν ολοκληρώθηκε η σύνθεση, η πεπτιδορητίνη μεταφέρθηκε σε ξηραντήρα κενού για ξήρανση υπεράνω P₂O₅. Η απόδοση σύνθεσης πριν την αποκοπή του από την ρητίνη ήταν **78%**. Η αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη καθώς και η επεξεργασία και η παραλαβή του έγινε σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε πιο πάνω. Η απόδοση αποκοπής από τη ρητίνη ήταν **93%**.

Ο καθαρισμός του πεπτιδίου έγινε σε ημιπαρασκευαστική RP-HPLC. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από **A/B: 70/30** σε **A/B: 20/80** σε **30 min**. Η απόδοση καθαρισμού ήταν **27%**. Η καθαρότητα του πεπτιδίου ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC (**Σχήμα 7.45**) η δε ταυτοποίησή του έγινε με φασματομετρία μάζας Electronspray Ionization (ESI-MS) (**Σχήμα 7.46**).

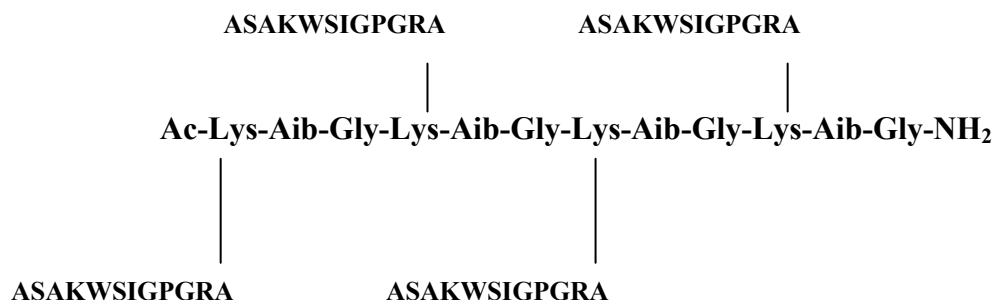


Σχήμα 7.45 Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του **Ac-SOC₄-(LSLVPPA)₄-OH**. Σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA, με κλιμακούμενη βαθμίδωση σε αναλογία **A/B: 70/30** ως **A/B: 20/80** για **30 min**.



Σχήμα 7.46 Φάσμα μάζας ESI (Electrospray Ionization) του **Ac-SOC₄-(LSLVPPA)₄-OH**. Υπολογισθέν μοριακό βάρος, M.B=3852,73 Ευρεθέν μοριακό βάρος, M.B=3854,58

7.13 Σύνθεση του Ac-SOC₄-(ASAKWSIGPGRA)₄-OH (10)

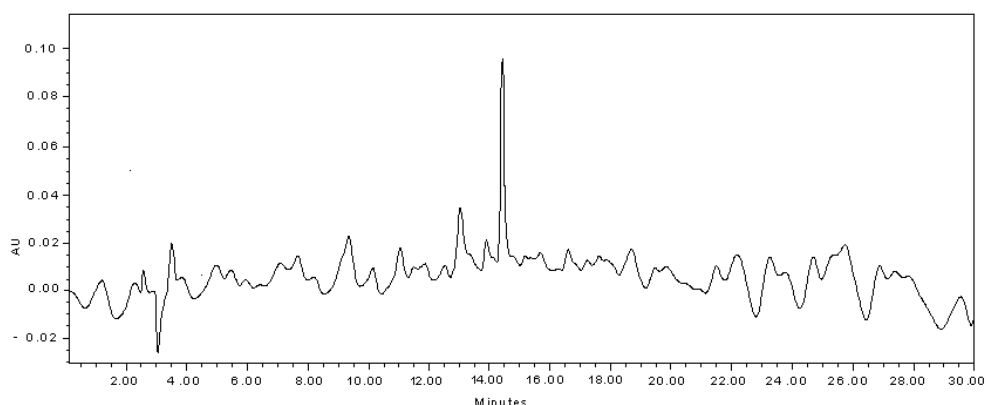


M.B = 5870,75

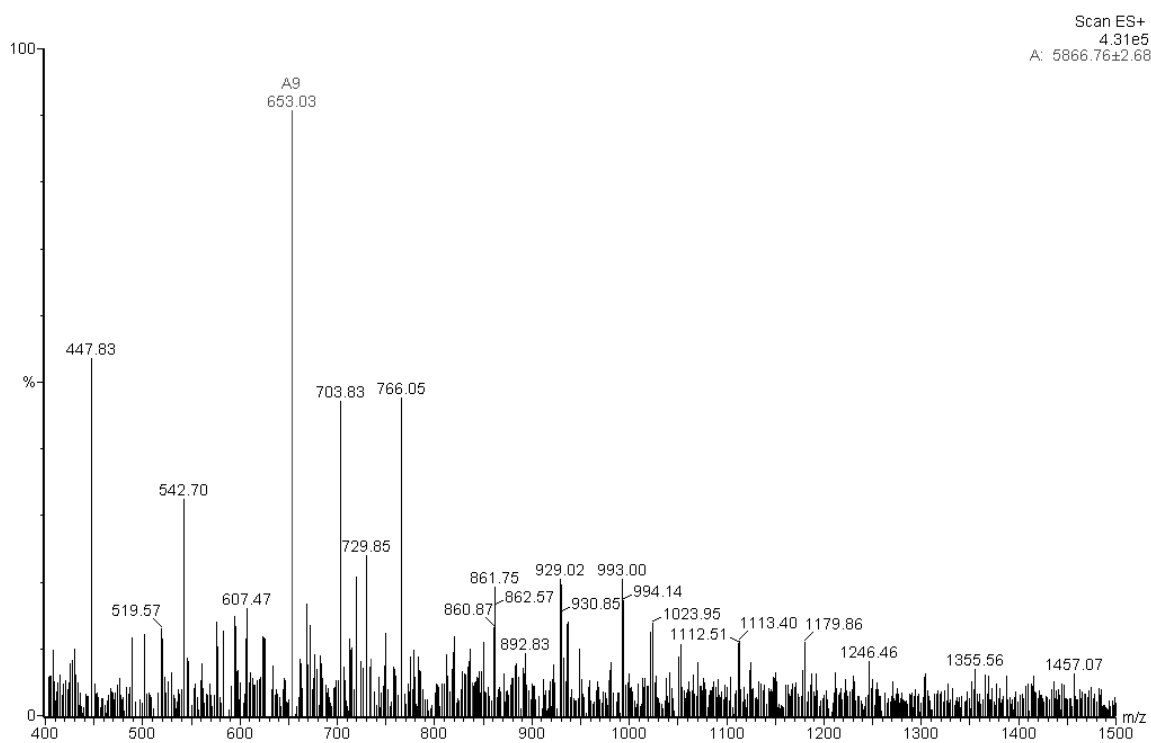
M.T: C₂₆₂H₄₂₄N₈₄O₇₀

Για το ανάλογο (10) χρησιμοποιήθηκαν 1,11gr πεπτιδορητίνης. Τα αμινοξέα εισήχθησαν ως Boc-παράγωγα με τις αντίστοιχες προστασίες όπως αναφέρθηκαν πιο πάνω. Όταν ολοκληρώθηκε η σύνθεση, η πεπτιδορητίνη μεταφέρθηκε σε ξηραντήρα κενού για ξήρανση υπεράνω P₂O₅. Η απόδοση σύνθεσης πριν την αποκοπή του από την ρητίνη ήταν **71%**. Η αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη καθώς και η επεξεργασία και η παραλαβή του έγινε σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε πιο πάνω. Η απόδοση αποκοπής από τη ρητίνη ήταν **90%**.

Ο καθαρισμός του πεπτιδίου έγινε σε ημιπαρασκευαστική RP-HPLC. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από **A/B: 90/10** σε **A/B: 20/80** σε **30 min**. Η απόδοση καθαρισμού ήταν **10%**. Η καθαρότητα του πεπτιδίου ελέγχθηκε με αναλυτική RP-HPLC (**Σχήμα 7.47**) η δε ταυτοποίησή του έγινε με φασματομετρία μάζας Electrospray Ionization (ESI-MS) (**Σχήμα 7.48**).



Σχήμα 7.47 Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του **Ac-SOC₄-(ASAKWSIGPGRA)₄-OH**. Σύστημα έκλουσης (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA, με κλιμακούμενη βαθμίδωση σε αναλογία A/B: 70/30 ως A/B: 20/80 για 30 min.



Σχήμα 7.48 Φάσμα μάζας ESI (Electrospray Ionization) του **Ac-SOC₄-(ASAKWSIGPGRA)₄-OH**. Υπολογισθέν μοριακό βάρος, M.B= 5870,75 Ευρεθέν μοριακό βάρος, M.B= 5866,76

Κεφάλαιο 8^ο

ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ

- Εισαγωγή
- Ανοσοποίηση ποντικών με SOC-συμπλέγματα T-κυτταρικών επιτόπων της HA του ιού της γρίπης των πτηνών H5N1 και αξιολόγηση της προστατευτικής ανοσίας
- Δραστικότητα των SOC₄-συμπλεγμάτων (7)-(10) με ορούς ασθενών LTNP (Long-term non progressors) και ασθενών με εξέλιξη της ασθένειας HIV (HIV-progressors)
- Ανοσοποίηση ποντικών με το Ac-SOC₄-(ASAKWSIGPGRA)₄-OH σύμπλεγμα (10) και αξιολόγηση της χυμικής ανοσολογικής απόκρισης με ELISA

8.1 Εισαγωγή

Για την αξιολόγηση των πεπτιδικών αναλόγων που συντέθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή διεξήχθησαν βιολογικά πειράματα στα εξής ερευνητικά Ινστιτούτα:

1) Ινστιτούτο Ανοσολογίας Fridrich-Löffler Institut στη Γερμανία (Tubingen) υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Oliver Planz, στα πλαίσια του Ερευνητικού Ευρωπαϊκού Προγράμματος Euroflu.

Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν τα εξής SOC-συμπλέγματα:

- Ac-SOC₄-[Ac₂, (VWTYNAELLK(CH=N-O))₂]-NH₂ (2)
- Ac-SOC₄-[Ac₂, (YNNTNQEDLK(CH=N-O))₂]-NH₂ (3)
- Ac-SOC₄-[Ac₂, (QLRDNAKELK(CH=N-O))₂]-NH₂ (4)
- Ac-SOC₄-[Ac₂, (MPFHNIHPLK(CH=N-O))₂]-NH₂ (5)

Τα SOC-συμπλέγματα (2)-(5), περιέχουν αντίστοιχα τις πεπτιδικές αλληλουχίες VWTYNAELL, YNNTNQEDL, QLRDNAKEL, MPFHNIHPL, που αποτελούν T-κυτταρικούς επιτόπους της H5 (HA) του ιού της γρίπης των πτηνών που προβλέφθηκαν με υπολογιστικές μεθόδους βάσει της συγγένειας τους με μόρια MHC ποντικών.

2) Ινστιτούτο Βιοϊατρικής Έρευνας Georg-Speyer-Haus στη Γερμανία (Φρανκφούρτη) υπό την επίβλεψη της Δρ. Ursula Dietrich.

Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν τα εξής SOC-συμπλέγματα:

- **Palm-SOC₄-[LLTTNKDGAK(CH=N-O)]₄-NH₂ (7)**
- **Palm-SOC₄-[HKYPC(Acm)STTNC(Acm)SPK(CH=N-O)]₄-NH₂ (8)**
- **Ac-SOC₄-(LSLVPPA)₄-OH (9)**
- **Ac-SOC₄-(ASAKWSIGPGRA)₄-OH (10)**

Τα SOC-συμπλέγματα (7)-(10), περιέχουν αντίστοιχα τις πεπτιδικές αλληλουχίες **LLTTNKDGA**, **HKYPCSTTNCSP**, **LSLVPPA**, **ASAKWSIGPGRA**, που αποτελούν μιμητικούς επιτόπους (mimotopes) της gp120 πρωτεΐνης του ιού HIV για αντισώματα ασθενών που είναι φορείς του ιού, αλλά δεν έχουν ασθενήσει εδώ και πολλά χρόνια (LTNP-Long-term non progressors). Οι παραπάνω επίτοποι προσδιορίστηκαν με την τεχνική έκθεσης σε φάγους.

8.2 Ανοσοποίηση ποντικών με SOC-συμπλέγματα T-κυτταρικών επιτόπων της HA του ιού της γρίπης των πτηνών H5N1 και αξιολόγηση της προστατευτικής ανοσίας

Τα SOC-συμπλέγματα που χρησιμοποιήθηκαν στις ανοσοποιήσεις, όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, είναι τα (2)-(5). Οι ανοσοποιήσεις έγιναν με σκοπό να μελετηθεί η ανοσογονικότητα των συγκεκριμένων αναλόγων ως πιθανοί T-κυτταρικοί επίτοποι της αιμοσυγκολλητίνης H5 (HA), καθώς και η ικανότητά τους να προκαλούν προστατευτική ανοσία έναντι του ιού της γρίπης των πτηνών H5N1.

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο ανοσοποίησης τα πεπτίδια διαλύθηκαν σε ddH₂O. Την ημέρα 0, τέσσερις ομάδες 6 θηλυκών C57BI/6 ποντικών ανοσοποιήθηκαν υποδόρια με 50μg από το κάθε SOC-σύμπλεγμα γαλακτωματοποιημένου σε Complete Freund's Adjuvant (CFA). Την 25^η και 50^η ημέρα ακολούθησαν δυο επαναληπτικές ανοσοποιήσεις με μισές δόσεις (25μg) των SOC-συμπλεγμάτων γαλακτωματοποιημένου σε Incomplete Freund's Adjuvant (IFA). 25 ημέρες μετά την τρίτη επαναληπτική ανοσοποίηση τα ποντίκια μολύνθηκαν ενδορινικά με ιό της γρίπης H5N1 (MB1) [2 x 10⁵ pfu (100x MLD₅₀)]. Τα ποσοστά επιβίωσης προσδιορίστηκαν μετά από περίοδο 14 ημερών.

Τα αποτελέσματα φαίνονται στον **Πίνακα 8.1**. Ως μετρήσεις control μελετήθηκαν ομάδες ποντικών που ανοσοποιήθηκαν μόνο με το φορέα SOC₄, το ανοσοενισχυτικό (Adjuvant) καθώς και ποντίκια που δεν υποβλήθηκαν σε καμία ανοσοποίηση.

Πίνακας 8.1 Αριθμός ανοσοποιημένων ποντικών που πέθαναν και επιβίωσαν μετά από μόλυνση με τον ιό της γρίπης H5N1

SOC-συμπλέγματα	Ποντίκια	
	που πέθαναν	Ποντίκια που επιβίωσαν
Ac-SOC ₄ -[Ac ₂ , (VWTYNAELLK(CH=N-O)) ₂]-NH ₂ (2)	5	1
Ac-SOC ₄ -[Ac ₂ , (YNNTNQEDLK(CH=N-O)) ₂]-NH ₂ (3)	4	2
Ac-SOC ₄ -[Ac ₂ , (QLRDNAKELK(CH=N-O)) ₂]-NH ₂ (4)	6	0
Ac-SOC ₄ -[Ac ₂ , (MPFHNIHPLK(CH=N-O)) ₂]-NH ₂ (5)	6	0
Φορέας	6	0
adjuvant	6	0
Χωρίς ανοσοποίηση	6	0

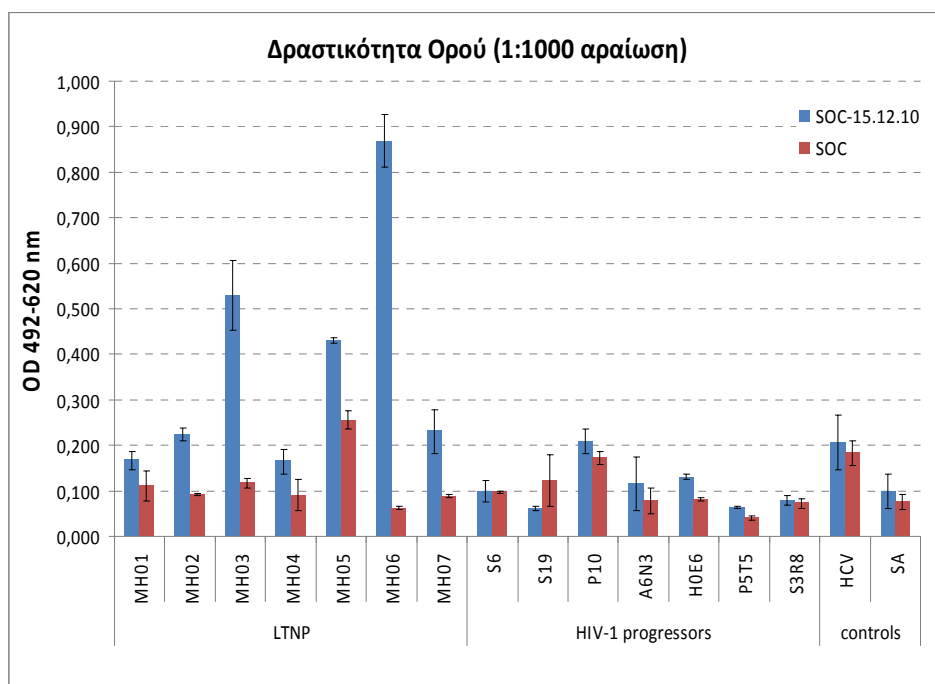
Από τον **Πίνακα 8.1** φαίνεται πως η ανοσοποίηση και με τα τέσσερα SOC-συμπλέγματα γενικά δεν εμφάνισε σημαντική προστασία έναντι του ιού της γρίπης των πτηνών H5N1. Ειδικότερα, τα SOC- συμπλέγματα (4), (5) δεν εμφάνισαν καθόλου προστασία εφόσον και τα έξι ποντίκια από κάθε ομάδα πέθαναν. Επίσης, μεταξύ των SOC-συμπλεγμάτων (2), (3) η ανοσοποίηση με το Ac-SOC₄-[Ac₂, (YNNTNQEDLK(CH=N-O))₂]-NH₂ (3) εμφάνισε καλύτερη προστασία έναντι της μόλυνσης από τον ιό της γρίπης των πτηνών H5N1. Πιο συγκεκριμένα, η ανοσοποίηση με το σύμπλεγμα (3) επέφερε μικρή προστασία καθώς τελικά επιβίωσαν δυο από τα έξι ποντίκια (33% ποσοστό επιβίωσης) που μολύνθηκαν με το ιό της γρίπης των πτηνών H5N1 σε σύγκριση με το σύμπλεγμα (2) που επιβίωσε μόνο 1 ποντίκι (17% ποσοστό επιβίωσης).

8.3 Πειράματα διασταυρωτής αντίδρασης των SOC₄-συμπλεγμάτων (7)-(10) με ορούς ασθενών LTNP (Long-term non progressors) και ασθενών με εξέλιξη της ασθένειας (HIV-progressors)

Τα SOC₄-συμπλέγματα (7)-(10) μελετήθηκαν για τη δραστικότητά τους με ορούς ασθενών που είναι θετικοί στον ιό HIV, ειδικότερα με ορούς ασθενών LTNP καθώς και με ορούς ασθενών HIV-progressors, με σκοπό να προσδιοριστεί αν αποτελούν μέρος διατηρημένων επιτόπων ικανών να αντιδρούν με περισσότερους από ένα ορούς ασθενών. Παράλληλα μελετήθηκε και η δραστικότητα του φορέα Ac-SOC₄-(Ac₄)-NH₂ και με τις δυο

ομάδες ορών για να διαπιστωθεί αν εμφανίζει κάποια δραστικότητα λόγω κάποιας εξειδικευμένης αντίδρασης. Ο προσδιορισμός της δραστικότητας έγινε με πειράματα ELISA.

Τα SOC₄-συμπλέγματα (7)-(9) δεν εμφάνισαν κάποια σημαντική δραστικότητα και δεν παρουσιάζονται κάποια αποτελέσματα γι' αυτά. Για το Ac-SOC₄-(ASAKWSIGPGRA)₄-OH (10) σύμπλεγμα τα αποτελέσματα φαίνονται στο **Σχήμα 8.1**.



Σχήμα 8.1 Δραστικότητα του Ac-SOC₄-(ASAKWSIGPGRA)₄-OH (10) με ορούς ασθενών LTNP και HIV-progressors

Από το **Σχήμα 8.1** προκύπτει πως το σύμπλεγμα (10) εμφανίζει μεγαλύτερη και ισχυρότερη δραστικότητα με ορούς ασθενών LTNP. Ο φορέας μόνος του δεν εμφάνισε καμία σημαντική δραστικότητα και με τις δυο ομάδες των ορών. Η ευρεία αντίδραση του συμπλέγματος (10) με ορούς ασθενών LTNP επιβεβαιώνει την πιθανή ύπαρξη διατηρημένου επιτόπου. Επίσης η ακεραιότητα του επιτόπου βεβαιώνει τον πιθανό ρόλο του ως ανοσογόνο για την παραγωγή αντισωμάτων που μπορούν να επάγουν προστασία κατά τον εμβολιασμό.

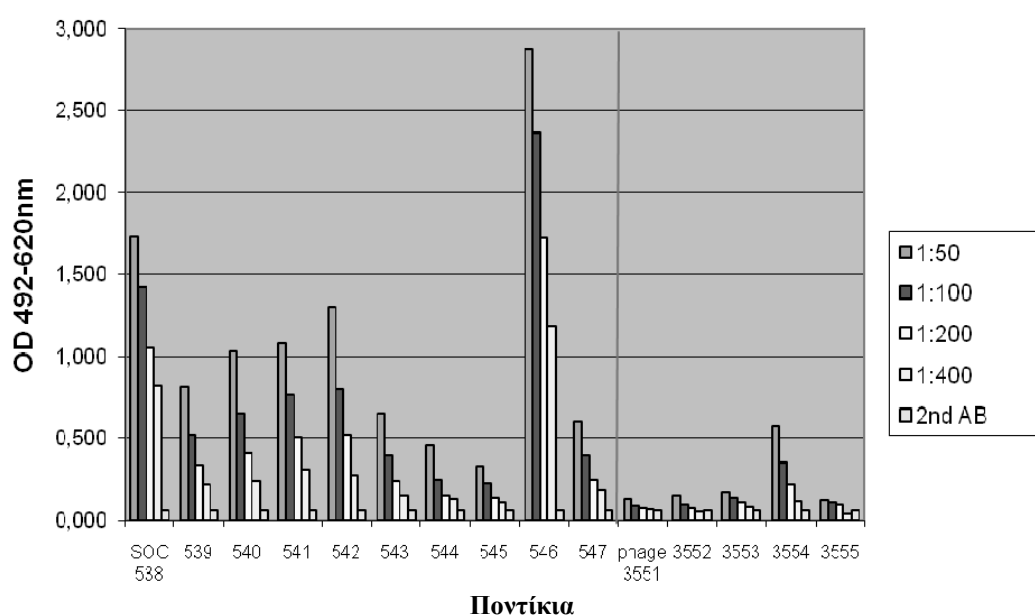
8.4 Ανοσοποίηση ποντικών με το Ac-SOC₄-(ASAKWSIGPGRA)₄-OH σύμπλεγμα (10) και αξιολόγηση της δραστικότητας των αντι-ορών τους in vitro

Οι ανοσοποιήσεις ποντικών και η αξιολόγηση της δραστικότητας των αντι-ορών τους in vitro (ELISA) έγιναν για να προσδιορίσουμε την ικανότητα του μιμητικού επιτόπου

ASAKWSIGPGRA που είναι προσδεδεμένος στο φορέα SOC₄ να επάγει HIV-εξουδετερωτικά αντισώματα και με τελικό σκοπό να αποδειχθεί ότι ο επιλεγμένος επίτοπος πράγματι μιμείται επιτόπους για τα HIV-εξουδετερωτικά αντισώματα που είναι παρόντα στον ορό ασθενών LTNP.

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο ανοσοποίησης ποντίκια Balb/C ανοσοποιήθηκαν 5 φορές (ημέρες: 0, 7, 14, 21, 28) υποδόρια με το Ac-SOC₄-(ASAKWSIGPGRA)₄-OH (10) σύμπλεγμα (50μg/100μl PBS/MPL). Τα ποντίκια θανατώθηκαν 10 ημέρες μετά την τελευταία επαναληπτική ανοσοποίηση. Οι αντι-οροί που συλλέχθηκαν χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα ELISA ώστε να αξιολογηθεί η δραστικότητα τους με το Ac-SOC₄-(ASAKWSIGPGRA)₄-OH (10) καθώς και με το φορέα Ac-SOC₄-(Ac₄)-NH₂. Και στις δυο περιπτώσεις τα αποτελέσματα συγκρίνονται με τη δραστικότητα αντι-ορών ποντικίων που ανοσοποιήθηκαν με τους αντίστοιχους φάγους.

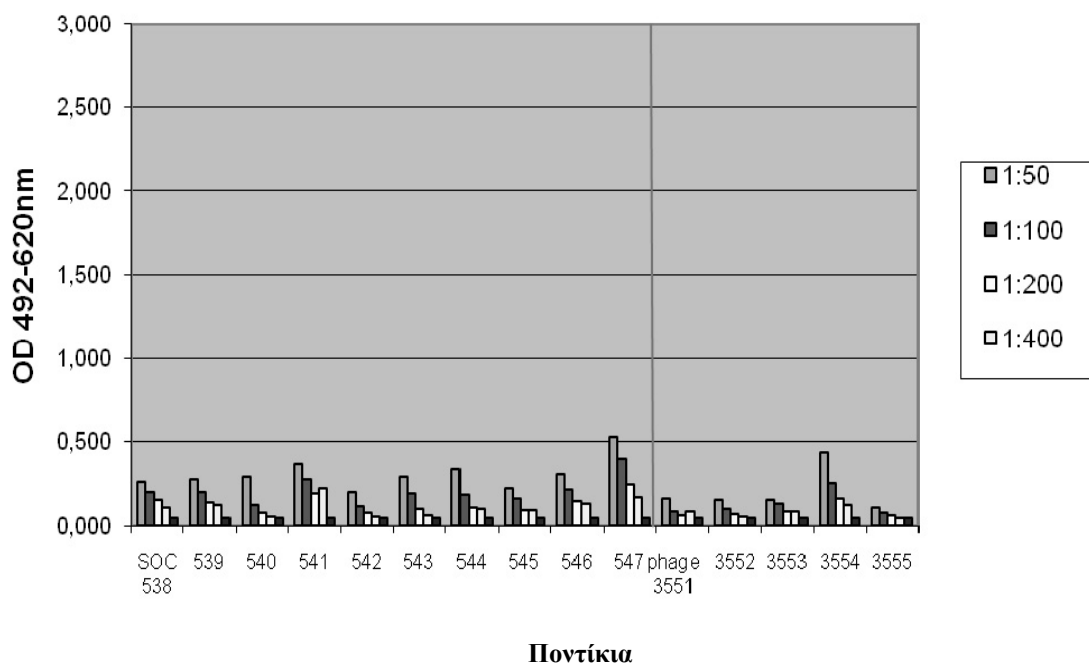
Τα αποτελέσματα των πειραμάτων ELISA φαίνονται στα **Σχήματα 8.2** και **8.3**.



Σχήμα 8.2 Δραστικότητα του Ac-SOC₄-(ASAKWSIGPGRA)₄-OH (10) με α) αντι-ορούς ποντικίων (538-547) ανοσοποιημένων με το σύμπλεγμα (10) β) αντι-ορούς ποντικίων (3551-3555) ανοσοποιημένων με τους αντίστοιχους φάγους

Από το **Σχήμα 8.2** προκύπτει, για διάφορες αραιώσεις, ότι το SOC-σύμπλεγμα (10) αντιδρά ισχυρά με τους αντι-ορούς των ποντικίων (538-547). Μεταξύ των διαφόρων αραιώσεων υψηλότερη δραστικότητα εμφανίζεται σε αραιώσεις 1:50 και 1:100. Παράλληλα

οι αντι-οροί των ποντικών (3551-3555), που ανοσοποιήθηκαν μόνο με τους αντίστοιχους φάγους, δεν εμφανίζουν σημαντική δραστικότητα. Πιστοποιείται έτσι ότι ποντίκια που ανοσοποιήθηκαν με το σύμπλεγμα (10) αναπτύσσουν υψηλούς τίτλους ειδικών αντισωμάτων έναντι του πεπτιδίου απ' ότι μετά από ανοσοποίηση με τους αντίστοιχους φάγους, καθώς επίσης και ότι ο φορέας SOC αποτελεί ιδανικό υπόστρωμα πρόσδεσης επιτόπων για την αύξηση της ανοσογονικότητάς τους.



Σχήμα 8.3 Δραστικότητα του φορέα Ac-SOC₄-(Ac₄)-NH₂ με α) αντι-ορούς ποντικών (538-547) ανοσοποιημένων με το σύμπλεγμα (10) β) αντι-ορούς ποντικών (3551-3555) ανοσοποιημένων με τους αντίστοιχους φάγους

Από το **Σχήμα 8.3** προκύπτει, για διάφορες αραιώσεις, ότι οι αντι-οροί ποντικών (538-547) ανοσοποιημένων με το σύμπλεγμα (10) εμφανίζουν χαμηλή δραστικότητα με το φορέα Ac-SOC₄-(Ac₄)-NH₂, όπως επίσης και οι αντι-οροί ποντικών που ανοσοποιήθηκαν με τους αντίστοιχους φάγους. Επιβεβαιώνεται έτσι η εξειδίκευση της πρόσδεσης του επιτόπου μέσω της ελάχιστης αναγνώρισης του φορέα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9^ο

Αποτελέσματα–Συζήτηση

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα συνεχιζόμενα κρούσματα μόλυνσης από τον υψηλής παθογένειας ιό της γρίπης των πτηνών H5N1 (HPAIV H5N1) και τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας HIV στον ανθρώπινο πληθυσμό, αποτελούν κύρια απειλή για την δημόσια υγεία εξαιτίας της έλλειψης αποτελεσματικών θεραπευτικών μέσων. Η ανάπτυξη ασφαλών και αποτελεσματικών εμβολίων έναντι αυτών των ιών αποτελεί κύρια προτεραιότητα στο χώρο της έρευνας.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή σχεδιάστηκαν, παρασκευάστηκαν και μελετήθηκαν, ως προς την βιολογική τους δράση, μακρομοριακά πεπτιδικά συμπλέγματα διακλαδισμένης δομής υποψήφιων πεπτιδικών επιτόπων των ιών HPAIV H5N1 και HIV, με απώτερο σκοπό την ανάπτυξη προστατευτικής ανοσίας και διαγνωστικών. Τα SOC-συμπλέγματα που παρουσιάστηκαν και μελετήθηκαν αποτελούν ανασυνδυασμένα μοντέλα των πρωτεϊνών HA και gp120 και μιμούνται σε διαφορετικό βαθμό το καθένα τις αντίστοιχες αντιγονικές ιδιότητες των προαναφερθέντων πρωτεϊνών.

Λόγω του μικρού μεγέθους οι πεπτιδικοί επίτοποι δεν μπορούν να είναι ανοσογονικοί από μόνοι τους. Για να ενισχυθεί η ανοσογονικότητα των πεπτιδικών επιτόπων θα πρέπει να συνδεθούν με μόρια-φορείς. Για το λόγο αυτό οι υποψήφιοι πεπτιδικοί επίτοποι προσδέθηκαν σε ένα τεχνητό φορέα SOC₄. Ο συγκεκριμένος φορέας αποτελείται από το μοτίβο (-Lys-Aib-Gly-) όπου η πρόσδεση του πεπτιδικών επιτόπων γίνεται στην ε-NH₂ της Lys. Από μελέτες έχει βρεθεί ότι ο φορέας υιοθετεί ελικοειδή μορφή, η οποία επιτρέπει στα προσδεδεμένα αντιγονικά πεπτίδια να λαμβάνουν έναν καθορισμένο προσανατολισμό στο χώρο χωρίς να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους ή με τον φορέα και επιπλέον να διατηρούν την «ενεργό» τους διαμόρφωση.

Η μέθοδος της χημειοεκλεκτικής σύνδεσης αποτελεί την πιο σημαντική πρόσφατη εξέλιξη στην ολική σύνθεση μακρομορίων. Δυο απροστάτευτα πεπτιδικά τμήματα που ενσωματώνουν μοναδικές δραστικές ομάδες αντιδρούν μεταξύ τους σε υδατικό περιβάλλον, παράγοντας το πολυπεπτίδιο-στόχο. Μια από τις μεθόδους χημειοεκλεκτικής σύνδεσης περιλαμβάνει το σχηματισμό δεσμού οξίμης μεταξύ μια ασθενούς βάσης και μιας αλδεϋδης υπό όξινες συνθήκες. Σε διάφορες μελέτες διακλαδισμένων πεπτιδικών μακρομορίων ως υποψήφιων για την ανάπτυξη εμβολίων η συγκεκριμένη μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί για την ολική σύνθεση αυτών των μορίων. Επίσης οι χημειοεκλεκτικές μέθοδοι εμφανίζουν αρκετά πλεονεκτήματα ως προς την απόδοση σύνθεσης, τον καθαρισμό και το χαρακτηρισμό σε

σχέση με την εξ' ολοκλήρου βήμα-προς-βήμα πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση (SPPS) τέτοιων μακρομορίων.

Πιο συγκεκριμένα, οι πεπτιδικοί T-κυτταρικοί επίτοποι της H5 (HA) του HPAIV H5N1 που προβλέφθηκαν με υπολογιστικές μεθόδους προσδέθηκαν στον Επαναλαμβανόμενο Ολιγοπεπτιδικό Φορέα (Sequential Oligopeptide Carrier: SOC_n) Ac-SOC₄-[2Ac, (NH₂OCH₂C(O))₂]-NH₂ σε δυο αντίγραφα με χημειοεκλεκτική σύνδεση μέσω σχηματισμού δεσμού οξίμης. Ο επίτοπος T₈ έχει προβλεφθεί ως HTL επίτοπος (Helper T-lymphocytes, Βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα), ενώ οι επίτοποι T₂, T₄, T₆ ως CTL (Cytotoxic T-lymphocytes, Κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα). Τα SOC-συμπλέγματα που προέκυψαν δοκιμάστηκαν σε πειράματα ανοσοποιήσεων ποντικών για την αξιολόγηση της ανοσογονικότητας των συγκεκριμένων αναλόγων, καθώς και της ικανότητά τους να προκαλούν προστατευτική ανοσία έναντι του ιού της γρίπης των πτηνών H5N1.

Όσο αφορά τους πιθανούς HIV επιτόπους, αυτοί αποτελούν μιμητικούς επιτόπους της gp120 πρωτεΐνης του ιού HIV για αντισώματα ασθενών που είναι φορείς του ιού, αλλά δεν έχουν ασθενήσει εδώ και πολλά χρόνια (LTNP: Long-term non progressors). Οι παραπάνω επίτοποι προσδιορίστηκαν με την τεχνική έκθεσης σε φάγους. Ακολούθως, οι πεπτιδικές αλληλουχίες προσδέθηκαν στον Επαναλαμβανόμενο Ολιγοπεπτιδικό Φορέα SOC₄ σε τέσσερα αντίγραφα είτε με την εξ' ολοκλήρου βήμα-προς-βήμα πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση κατά Merrifield, είτε μέσω χημειοεκλεκτικής σύνδεσης με σχηματισμό δεσμού οξίμης σε υγρή φάση. Τα SOC-συμπλέγματα που προέκυψαν δοκιμάστηκαν για διασταυρωτή αντίδραση με ορούς ασθενών LTNP και HIV-progressors (φορείς που νοσούν), με σκοπό να προσδιοριστεί αν αποτελούν μέρος διατηρημένων επιτόπων ικανών να αντιδρούν με περισσότερους από ένα ορούς ασθενών. Επίσης έγιναν ανοσοποιήσεις ποντικών με σκοπό να αξιολογηθεί η ικανότητα των επιτόπων να επάγουν αντισώματα.

I. Σχεδιασμός, σύνθεση, καθαρισμός και χαρακτηρισμός του φορέα Ac-SOC₄-[2Ac, (NH₂OCH₂C(O))₂]-NH₂ και των SOC-συμπλεγμάτων T-κυτταρικών επιτόπων της H5 (HA) του HPAIV H5N1

11. Ac-SOC₄-(Ac₂, Aoa₂)-NH₂ (Φορέας)

M.B = 1370,57

M.T: C₅₈H₁₀₃N₁₉O₁₉

12. Ac-SOC₄-[Ac₂, (VWTYNAELLK(CH=N-O))₂]-NH₂ (SOC₄-T₂ επίτοπος της HA H5N1)

M.B: 3917,44

M.T: C₁₈₀H₂₇₉N₄₇O₅₁

- 13. Ac-SOC₄-[Ac₂, (YNNTNQEDLK(CH=N-O))₂]-NH₂** (SOC₄-T₄ επίτοπος της HA H5N1)
 MB = 3921,16 M.T: C₁₆₄H₂₅₉N₅₁O₆₁
- 14. Ac-SOC₄-[Ac₂, (QLRDNAKELK(CH=N-O))₂]-NH₂** (SOC₄-T₆ επίτοπος της HA H5N1)
 MB = 3873,38 M.T: C₁₆₄H₂₈₃N₅₅O₅₃
- 15. Ac-SOC₄-[Ac₂, (MPFHNIHPLK(CH=N-O))₂]-NH₂** (SOC₄-T₈ επίτοπος της HA H5N1)
 MB = 3911,62 M.T: C₁₇₈H₂₇₇N₅₃O₄₃S₂

Ο φορέας Ac-SOC₄-(Ac₂, Aoa₂)-NH₂ (1) παρασκευάστηκε εξ'ολοκλήρου με τη βήμα-προς-βήμα πεπτιδική σύνθεση κατά Merrifield. Τα συμπλέγματα (2)-(5) παρασκευάστηκαν με χημειοεκλεκτική σύνδεση μέσω σχηματισμού δεσμού οξίμης σε υγρή φάση σε τρία στάδια: Στο **πρώτο στάδιο** πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του επιτόπου με SPPS. Στο **δεύτερο στάδιο** πραγματοποιήθηκε η δημιουργία αλδεϋδομάδας στον πεπτιδικό επίτοπο μέσω οξείδωσης και στο **τρίτο στάδιο** έγινε η σύνδεση του αλδεϋδικού επιτόπου με το φορέα Ac-SOC₄-(Ac₂, Aoa₂)-NH₂ (1), μέσω σχηματισμού δεσμού οξίμης.

Ο καθαρισμός των (1)-(5) αναλόγων έγινε με ημιπαρασκευαστική υγρή χρωματογραφία ανάστροφης φάσης και υψηλής διαχωριστικής ικανότητας RP-HPLC (Reverse Phase – High Performance Liquid Chromatography), η δε ταυτοποίησή τους με αναλυτική RP-HPLC (**Σχήματα 7.5, 7.11, 7.17, 7.23, 7.29**) και φασματομετρία μάζας ESI (Electrospray Ionization) (**Σχήματα 7.6, 7.12, 7.18, 7.24, 7.30**). Η απόδοση σύνθεσης του φορέα ήταν **48%**, ενώ οι αποδόσεις σύνθεσης των (2)-(5) αναλόγων κυμάνθηκαν από **33-67%**.

II. Σχεδιασμός, σύνθεση, καθαρισμός και χαρακτηρισμός του φορέα Palm-SOC₄-(Aoa)₄-NH₂ και των SOC-συμπλεγμάτων μιμητικών HIV επιτόπων

- 16. Palm-SOC₄-(Aoa)₄-NH₂** (Φορέας)
 M.B = 1628,96 M.T: C₇₂H₁₃₃N₂₁O₂₁
- 17. Palm-SOC₄-[LLTTNKDGAK(CH=N-O)]₄-NH₂** (SOC₄-επίτοπος της gp120 HIV)
 MB = 6017,90 M.T: C₂₆₀H₄₅₃N₇₇O₈₅
- 18. Palm-SOC₄-[HKYPC(Acm)STTNC(Acm)SPK(CH=N-O)]₄-NH₂** (SOC₄-επίτοπος της gp120 HIV)
 MB = 8208,36 M.T: C₃₄₈H₅₅₃N₁₀₅O₁₀₉S₈
- 19. Ac-SOC₄-(LSLVPPA)₄-OH** (SOC₄-επίτοπος της gp120 HIV)

M.B = 3852,73

M.T: C₁₈₂H₃₁₂N₄₄O₄₆

20. Ac-SOC₄-(ASAKWSIGPGRA)₄-OH (SOC₄-επίτοπος της gp120 HIV)

M.B = 5870,75

M.T: C₂₆₂H₄₂₄N₈₄O₇₀

Τα ανάλογα (6), (9) και (10) παρασκευάστηκαν εξ'ολοκλήρου με τη SPPS. Τα SOC-συμπλέγματα (7), (8) παρασκευάστηκαν μέσω χημιοεκλεκτικής σύνδεσης με σχηματισμό δεσμού οξίμης σε υγρή φάση με την ίδια διαδικασία σταδίων όπως αναφέρθηκε πιο πάνω.

Ο καθαρισμός των (6)-(10) αναλόγων έγινε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC, η δε ταυτοποίησή τους με αναλυτική RP-HPLC (**Σχήματα 7.31, 7.37, 7.43, 7.45, 7.47**) και φασματομετρία μάζας ESI (**Σχήματα 7.32, 7.38, 7.44, 7.46, 7.48**). Η απόδοση σύνθεσης του φορέα ήταν **86%** ενώ οι αποδόσεις σύνθεσης των (7)-(10) αναλόγων κυμάνθηκαν από **24-80%**.

III. ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ:

III. A) Ανοσοποίηση ποντικών με SOC-συμπλέγματα T-κυτταρικών επιτόπων της HA του HPAIV H5N1 και αξιολόγηση της προστατευτικής ανοσίας

Τα SOC-συμπλέγματα (2)-(5) χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα ανοσοποιήσεων ποντικών με σκοπό να αξιολογήσουμε την ικανότητά τους να προκαλούν προστατευτική ανοσία έναντι του HPAIV H5N1. Κατά την ανοσολογική απόκριση έναντι της ιικής μόλυνσης παράγονται εξίσου αντισώματα και ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα. Υπάρχουν αναφορές που δείχνουν ότι η ειδική απόκριση αντισωμάτων IgG έναντι του ιού της γρίπης είναι εξαρτώμενη από CD4⁺ T-κύτταρα ενώ άλλες που περιγράφουν ανεξάρτητες αποκρίσεις αντισωμάτων από CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα. Άλλες έρευνες επισημαίνουν ότι κυτταροτοξική (CTL) απόκριση εκτός από την ισχυρή δημιουργία αντισωμάτων είναι πιο αποτελεσματική στην πρόληψη έναντι της νόσου. Από τα αποτελέσματα του **πίνακα 8.1** προκύπτουν τα εξής:

Οι ανοσοποιήσεις ποντικών με τα SOC-συμπλέγματα (2)-(5) γενικά δεν εμφάνισαν σημαντική προστασία. Από τα τέσσερα SOC-συμπλέγματα μόνο τα ανάλογα (4) και (5) εμφάνισαν ποσοστά επιβίωσης **33%** και **17%** αντίστοιχα, προσδίδοντας έτσι μια μικρή ανοσογονική δραστηριότητα στο SOC-σύμπλεγμα (4). Αύξηση των αντιγράφων του αντίστοιχου επιτόπου πάνω στο φορέα από δύο σε τέσσερα ίσως θα μπορούσε πιθανόν να βελτιώσει την ανοσογονική δραστηριότητά του.

III. Β) Πειράματα διασταυρωτής αντίδρασης των SOC₄-σμπλεγμάτων (7)-(10) με ορούς ασθενών LTNP (Long-term non progressors) και ασθενών με εξέλιξη της ασθένειας (HIV-progressors)

Τα SOC-σμπλέγματα (7)-(10) μελετήθηκαν για διασταυρωτή αντίδραση με ορούς ασθενών LTNP και HIV-progressors, με σκοπό να προσδιοριστεί η πιθανή ύπαρξη διατηρημένου επιτόπου ικανού να αντιδρά με περισσότερους από ένα ορούς ασθενών. Συγκριτικά μελετήθηκε και η δραστηριότητα του φορέα Ac-SOC₄-(Ac₄)-NH₂ με τους αντίστοιχους ορούς ασθενών για να διαπιστωθεί αν εμφανίζει κάποια δραστηριότητα λόγω κάποιας εξειδικευμένης αντίδρασης.

Τα SOC₄-σμπλέγματα (7)-(9) δεν εμφάνισαν κάποια σημαντική δραστηριότητα. Από το **Σχήμα 8.1** προκύπτει πως το σμπλέγμα Ac-SOC₄-(ASAKWSIGPGRA)₄-OH (10) αντιδρά ισχυρότερα με ορούς ασθενών LTNP. Επιβεβαιώνεται έτσι η πιθανή ύπαρξη διατηρημένου επιτόπου καθώς επίσης και ο πιθανός ρόλος του επιτόπου ως ανοσογόνο για την παραγωγή αντισωμάτων που μπορούν να επάγουν προστασία κατά τον εμβολιασμό. Ο φορέας μόνος του δεν εμφάνισε καμία σημαντική δραστηριότητα και με τις δυο ομάδες των ορών, επιβεβαιώνοντας έτσι την εξειδικευμένη αντίδραση μόνο του επιτόπου με τα αντισώματα και όχι του φορέα.

III. Γ) Ανοσοποίηση ποντικών με το Ac-SOC₄-(ASAKWSIGPGRA)₄-OH σμπλέγμα (10) και αξιολόγηση της δραστηριότητας των αντι-ορών τους in vitro

Το SOC-σμπλέγμα (10) χρησιμοποιήθηκε σε ανοσοποιήσεις ποντικών με σκοπό να προσδιορίσουμε την ικανότητα του επιτόπου να επάγει HIV-εξουδετερωτικά αντισώματα καθώς και να αξιολογηθεί η δραστηριότητά του με τα επαγόμενα HIV-εξουδετερωτικά αντισώματα επιβεβαιώνοντας σε τελική ανάλυση ότι ο επίτοπος πράγματι μιμείται επιτόπους για τα HIV-εξουδετερωτικά αντισώματα που είναι παρόντα στον ορό ασθενών LTNP.

Από το **Σχήμα 8.2** προκύπτει πως το σμπλέγμα (10) αντιδρά ισχυρά με τους αντι-ορούς των ποντικών που ανοσοποιήθηκαν με το SOC-σμπλέγμα (10). Υψηλότερη δραστηριότητα εμφανίζεται σε αραιώσεις 1:50 και 1:100, με καλύτερη αυτή σε αραιώση 1:50. Παράλληλα οι αντι-οροί ποντικών που ανοσοποιήθηκαν μόνο με τους αντίστοιχους φάγους, δεν εμφανίζει σημαντική δραστηριότητα με SOC-σμπλέγμα (10). Από τα αποτελέσματα αυτά πιστοποιείται η ικανότητα του σμπλέγματος (10) να επάγει υψηλούς τίτλους ειδικών αντισωμάτων έναντι του πεπτιδίου απ' ότι μετά από ανοσοποίηση με τους αντίστοιχους

φάγους, καθώς επίσης και ο ρόλος του φορέα SOC για την αποτελεσματική αύξηση της ανοσογονικότητάς ενός επιτόπου. Επιπλέον, από το **Σχήμα 8.3** προκύπτει ότι ο φορέας Ac-SOC₄-(Ac₄)-NH₂ εμφανίζει χαμηλή δραστικότητα και με τις δυο ομάδες αντι-ορών ανοσοποιημένων ποντικών, επιβεβαιώνοντας έτσι την εξειδίκευση πρόσδεσης του επιτόπου μέσω της ελάχιστης αναγνώρισης του φορέα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10^ο

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την παρούσα διδακτορική διατριβή μπορούν να εξαχθούν τα εξής συμπεράσματα:

- Συντέθηκαν αλδεϋδικά παράγωγα υποψήφιων πεπτιδικών επιτόπων της H5 (HA) του HPAIV H5N1 και της gp120 πρωτεΐνης του ιού HIV με ικανοποιητικές αποδόσεις και σε ικανοποιητικό βαθμό καθαρότητας, μετά από τροποποίηση των αντίστοιχων αλληλουχιών τους με προσθήκη του μοτίβου –Lys(Ser) στο C-τελικό άκρο και οξείδωση.
- Συντέθηκαν με επιτυχία πεπτιδικά μακρομόρια με διακλαδισμένη δομή (M.B ~3.8 KDa έως ~8.2 KDa) μέσω χημειοεκλεκτικής σύνδεσης των αλδεϋδικών παραγώγων με τον SOC φορέα με σχηματισμό δεσμού οξίμης σε καλές αποδόσεις και υψηλή καθαρότητα. Βεβαιώνοντας τη σημασία της μεθόδου για την ολική σύνθεση τέτοιων μακρομοριακών συμπλεγμάτων.
- Πειράματα ανοσοποιήσεων που έγιναν με SOC-συμπλέγματα που έφεραν πιθανούς T-κυτταρικούς επίτοπους της H5 (HA) του HPAIV H5N1 σε δυο αντίγραφα εμφάνισαν μικρή προστατευτική ανοσία, με το SOC-T₄ σύμπλεγμα να εμφανίζει το μεγαλύτερο ποσοστό (33%), προσδίδοντας έτσι μια μικρή ανοσογονικότητα στον αντίστοιχο επίτοπο. Τα ευρήματα αυτά επισημαίνουν μια πιθανή ενεργοποίηση των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων, τα οποία απαιτούν την αναγνώριση επιτόπων που δεσμεύονται σε MHC-I μόρια αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων. Συμπεραίνεται έτσι ότι το προηγούμενο σύμπλεγμα μπορεί να εφαρμοστεί για την πρόκληση προστατευτικής ανοσίας. Περαιτέρω μελέτες με πιθανή αύξηση των αντιγράφων των επιτόπων στο φορέα καθώς και κατάλληλη τροποποίηση του N-τελικού άκρου του φορέα με προσθήκη ομάδων με βεβαιωμένη ανοσοενισχυτική δράση μπορεί να βελτιώσει ακόμη καλύτερα τη δραστηριότητα του συγκεκριμένου επιτόπου.
- Από μελέτες διασταυρωτής αντίδρασης που έγιναν με SOC-συμπλέγματα μιμητικών επιτόπων της gp120 πρωτεΐνης του ιού HIV με ορούς ασθενών LTNP και HIV-progressors, το Ac-SOC₄-(ASAKWSIGPGRA)₄-OH (10) σύμπλεγμα αντέδρασε ισχυρότερα με ορούς ασθενών LTNP. Επιβεβαιώνεται έτσι η ακεραιότητα του συγκεκριμένου επιτόπου καθώς και η πιθανή ύπαρξη διατηρημένου επιτόπου ως υποψήφιου για εμβόλιο.
- Από πειράματα ανοσοποιήσεων ποντικών με το Ac-SOC₄-(ASAKWSIGPGRA)₄-OH (10) σύμπλεγμα και in vitro ανάλυση της δραστηριότητας των αντι-ορών, πιστοποιείται ο ρόλος του φορέα SOC₄ για την αποτελεσματική αύξηση της ανοσογονικότητας του επιτόπου καθώς και η εξειδίκευση πρόσδεσης του επιτόπου μέσω της ελάχιστης αναγνώρισης του

φορέα. Το $\text{Ac-SOC}_4\text{-(ASAKWSIGPGRA)}_4\text{-OH}$ (10) σύμπλεγμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη προστατευτικής ανοσίας και έχει πολλές πιθανότητες να εξελιχθεί σ' ένα αποτελεσματικό εμβόλιο κατά του HIV.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1) Βιβλιογραφία 1^ο Κεφαλαίου

Γενική Βιβλιογραφία

1. Guyton, Φυσιολογία του Ανθρώπου, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας
2. Ράπτη ΣΑ, Εσωτερική Παθολογία, Επιστημονικές Εκδόσεις “Γρηγόριος Παρησιανός”
Παρισιανού ΜΓ
3. Janeway, Travers, (Μουτσόπουλος Χ.Μ., Βλαχογιαννόπουλος Π.Γ.), Κλινική Ανοσοβιολογία, 2^η Έκδοση, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης
4. Abbas A.K, Lichtman A.H, (Τζάρτος ΙΣ, Μαμαλάκη Α, Σαμάρκος Μ), Βασική Ανοσολογία, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης
5. Α.Δ. Τσελέπη-Δ.Κ. Τσουκάτου, Στοιχεία Φυσιολογίας του Ανθρώπου, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
6. Roitt I., Brostoff J., Male D., (Κουσουλάκος Σ.), Ανοσολογία, 6^η Έκδοση, Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιανού Α.Ε
7. Goldsby R, Kindt T, Osborne B, Kuby J, (Γαιτανάκη Α, Μπαξεβάνης Κ), Ανοσολογία, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης

2) Βιβλιογραφία 2^{ου} Κεφαλαίου

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ - Στοιχεία Ιολογίας

Γενική Βιβλιογραφία

1. Τσότηος Α, Ιατρική Ιολογία (Γενική-Κλινική-Εργαστηριακή), Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας
2. Δρ. Μπουσιάκου-Καλκάνη Ε, Ιολογία, εκδόσεις Έλλην

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ - Ιός της Γρίπης – Ιός τη γρίπης των πτηνών (H5N1)

Γενική Ελληνική Βιβλιογραφία

- 1Α. Δρ. Μπουσιάκου-Καλκάνη Ε, Ιολογία, εκδόσεις Έλλην
- 2Α. Τσότηος Α, Ιατρική Ιολογία (Γενική-Κλινική-Εργαστηριακή), Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας

Γενική Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

- 3Α. Lamb R.A, Influenza, Encyclopedia of Virology (Third Edition, Mahy B.W.J, Van Regenmortel M.H.V, Academic Press, 2008) p 95-104
- 4Α. Garcia-Sastre A, Influenza, Encyclopedia of Microbiology (Third Edition, Schaechter M, Academic Press, 2009) p 414-420
- 5Α. Flint S.J, Enquist L.W, Krug R.M, Racaniello V.R, Skalka A.M, Principles of virology: Molecular Biology, Pathogenesis and Control, ASM Press (2000)

Βιβλιογραφία

1. Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. J Virol 2005;**79**:2814–22
2. Salomon R, Webster RG., The Influenza Virus Enigma, Cell, **136** (2009), 402-410
3. Zambon C.M, The pathogenesis of influenza in humans, Rev. Med. Virol. 2001; 11: 227–241
4. Cox NJ, Bender CA. The molecular epidemiology of influenza viruses. Semin Virol 1995; 6: 359–370
5. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. Microbiol Rev 1992;**56**:152–79.

6. Cinatl Jr, Michaelis M, Doerr HW, The threat of avian influenza A (H5N1). Part I: epidemiologic concerns and virulence determinants, *Med Microbiol Immunol* (2007) 196:181–190
7. Menno D. de Jong, Hien TT, Avian influenza A (H5N1), *Journal of Clinical Virology*, **35** (2006), 2-13
8. Ito, T. Interspecies transmission and receptor recognition of influenza A viruses. *Microbiol. Immunol.* 44, (2000), 423–430
9. Couceiro JN, Paulson JC, Baum LG. Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. *Virus Res* 1993;29:155–65
10. Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:4620–4
11. Ito T, Couceiro JN, Kelm S, Baum LG, Krauss S, Castrucci MR, et al. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol* 1998;72:7367–73
12. Ha Y, Stevens DJ, Skehel JJ, Wiley DC (2001) X-ray structures of H5 avian and H9 swine influenza virus hemagglutinins bound to avian and human receptor analogs. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:11181–11186
13. Connor RJ, Kawaoka Y, Webster RG, Paulson JC. Receptor specificity in human, avian and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology* 1994;205:17–23
14. Rogers GN, Paulson JC, Daniels RS, Skehel JJ, Wilson IA, Wiley DC. Single amino acid substitutions in influenza haemagglutinin change receptor specificity. *Nature* 1983;304:76–78
15. Vines A, Wells K, Matrosovich M, Castrucci MR, Ito T, Kawaoka T. The role of influenza A virus haemagglutinin residues 226 and 228 in receptor specificity and host range restriction. *J Virol* 1998;72:7626–7631
16. Matrosovich M, Tuzikov N, Bovin A, Gambaryan A, Klimov A, Castrucci MR, Donatelli I, Kawaoka Y. Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, H3 avian influenza virus haemagglutinins after their introduction into mammals. *J Virol* 2000;74:8502–8512
17. Nobusawa E, Aoyama T, Kato H, Suzuki Y, Tateno Y, Nakajima K. Comparison of complete amino acid sequences and receptor-binding properties among 13 serotypes of haemagglutinins of influenza A viruses. *Virology* 1991;182:475–485

18. White J, Kartenbeck J, Helenius A (1982) Membrane fusion activity of influenza virus. *EMBO J* 1:217–222
19. Klenk HD, Rott R, Orlich M, Blodorn J (1975) Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology* 68:426–439
20. Shortridge KF, Zhou NN, Guan Y, Gao P, Ito T, Kawaoka Y, Kodihalli S, Krauss S, Markwell D, Murti KG, Norwood M, Senne D, Sims L, Takada A, Webster RG (1998) Characterization of avian H5N1 influenza viruses from poultry in Hong Kong. *Virology* 252:331–342
21. Peiris JSM, de Jong MD, Guan Y (2007) Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health. *Clin Microbiol Rev* 20:243–267
22. Okazaki K, Takada A, Ito T, Imai M, Takakuwa H, Hatta M, Ozaki H, Tanizaki T, Nagano T, Ninomiya A, Demenev VA, Tyaptirganov MM, Karatayeva TD, Yamnikova SS, Lvov DK, Kida H (2000) Precursor genes of future pandemic influenza viruses are perpetuated in ducks nesting in Siberia. *Arch Virol* 145:885–893
23. Duan L, Campitelli L, Fan XH, Leung YH, Vijaykrishna D, Zhang JX, Donatelli I, Delogu M, Li KS, Foni E, Chiapponi C, Wu WL, Kai H, Webster RG, Shortridge KF, Peiris JSM, Smith GJ, Chen H, Guan Y (2007) Characterization of low pathogenic H5 subtype influenza viruses from Eurasia: Implications for the origin of highly pathogenic H5N1 viruses. *J Virol* 81:7529–7539
24. de Jong JC, Claas EC, Osterhaus AD, Webster RG, Lim WL (1997) A pandemic warning? *Nature*, 389:554
25. Chen H, Deng G, Li Z, Tian G, Li Y, Jiao P, Zhang L, Liu Z, Webster RG, Yu K (2004) The evolution of H5N1 influenza viruses in ducks in southern China. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:10452–10457
26. Li KS, Guan Y, Wang J, Smith GJ, Xu KM, Duan L, Rahardjo AP, Puthavathana P, Buranathai C, Nguyen TD, Estoepangestie AT, Chaisingh A, Auewarakul P, Long HT, Hanh NT, Webby RJ, Poon LL, Chen H, Shortridge KF, Yuen KY, Webster RG, Peiris JSM (2004) Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature* 430:209–213
27. Ellis TM, Bousfield RB, Bissett LA, Dyrting KC, Luk GS, Tsim ST, Sturm-Ramirez K, Webster RG, Guan Y, Peiris JSM (2004) Investigation of outbreaks of highly pathogenic

H5N1 avian influenza in waterfowl and wild birds in Hong Kong in late 2002. *Avian Pathol* 33:492–505

28. Peiris JSM, Yu WC, Leung CW, Cheung CY, Ng WF, Nicholls JM, Ng TK, Chan KH, Lai ST, Lim WL, Yuen KY, Guan Y (2004) Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease. *Lancet* 363:617–619

29. Chen H, Li Y, Li Z, Shi J, Shinya K, Deng G, Qi Q, Tian G, Fan S, Zhao H, Sun Y, Kawaoka Y (2006) Properties and dissemination of H5N1 viruses isolated during an influenza outbreak in migratory waterfowl in western China. *J Virol* 80:5976–5983

30. World Health Organization (2005) Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia. *Emerg Infect Dis* 11:1515–1521

31. Smith GJ, Naipospos TS, Nguyen TD, de Jong MD, Vijaykrishna D, Usman TB, Hassan SS, Nguyen TV, Dao TV, Bui NA, Leung YH, Cheung CL, Rayner JM, Zhang JX, Zhang LJ, Poon LL, Li KS, Nguyen VC, Hien TT, Farrar J, Webster RG, Chen H, Peiris JSM, Guan Y (2006) Evolution and adaptation of H5N1 influenza virus in avian and human hosts in Indonesia and Vietnam. *Virology* 350:258–268

32. World Health Organization (2006) Antigenic and genetic characteristics of H5N1 viruses and candidate H5N1 vaccine viruses developed for potential use as pre-pandemic vaccines. *Wkly Epidemiol Rec* 81:328–330

33. Smith GJ, Fan XH, Wang J, Li KS, Qin K, Zhang JX, Vijaykrishna D, Cheung CL, Huang K, Rayner JM, Peiris JSM, Chen H, Webster RG, Guan Y (2006a) Emergence and predominance of an H5N1 influenza variant in China. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:16936–16941

34. Hulse-Post DJ, Sturm-Ramirez KM, Humberd J, Seiler P, Govorkova EA, Krauss S, Scholtissek C, Puthavathana P, Buranathai C, Nguyen TD, Long HT, Naipospos TS, Chen H, Ellis TM, Guan Y, Peiris JSM, Webster RG (2005) Role of domestic ducks in the propagation and biological evolution of highly pathogenic H5N1 influenza viruses in Asia. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:10682–10687

35. Keawcharoen J, van Riel D, van Amerongen G, Bestebroer T, Beyer WE, van Lavieren R, Osterhaus AD, Fouchier RA, Kuiken T (2008) Wild ducks as long-distance vectors of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). *Emerg Infect Dis* 14:600–607

36. Hatta M, Gao P, Halfmann P, Kawaoka Y (2001) Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* 293:1840–1842

37. Keawcharoen J, Oraveerakul K, Kuiken T, Fouchier RA, Amonsin A, Payungporn S, Noppornpanth S, Wattanodorn S, Theambooniers A, Tantilertcharoen R, Pattanarangsarn R, Arya N, Ratanakorn P, Osterhaus AD, Poovorawan Y (2004) Avian influenza H5N1 in tigers and leopards. *Emerg Infect Dis* 10:2189–2191
38. Kuiken T, Rimmelzwaan G, van Riel D, van Amerongen G, Baars M, Fouchier RA, Osterhaus AD (2005) Avian H5N1 influenza in cats. *Science* 306:241
39. Rimmelzwaan GF, van Riel D, Baars M, Bestebroer TM, van Amerongen G, Fouchier RA, Osterhaus AD, Kuiken T (2006) Influenza A virus (H5N1) infection in cats causes systemic disease with potential novel routes of virus spread within and between hosts. *Am J Pathol* 168:176–183
40. Songserm T, Amonsin A, Jam-on R, Sae-Heng N, Pariyothorn N, Payungporn S, Theamboonlers A, Chutinimitkul S, Thanawongnuwech R, Poovorawan Y (2006) Fatal avian influenza A H5N1 in a dog. *Emerg Infect Dis* 12:1744–1747
41. Govorkova EA, Rehg JE, Krauss S, Yen HL, Guan Y, Peiris JSM, Nguyen DT, Hanh TH, Puthavathana P, Hoang TL, Buranathai C, Lim W, Webster RG, Hoffmann E (2005) Lethality to ferrets of H5N1 influenza viruses isolated from humans and poultry in 2004. *J Virol* 79:2191–2198
42. Salomon R, Franks J, Govorkova EA, Ilyushina NA, Yen HL, Hulse-Post DJ, Humberd J, Trichet M, Rehg JE, Webby RJ, Webster RG, Hoffmann E (2006) The polymerase complex genes contribute to the high virulence of the human H5N1 influenza virus isolate A/Vietnam/1203/04. *J Exp Med* 203:689–697
43. Neumann G, Kawaoka Y (2006) Host range restriction and pathogenicity in the context of influenza pandemic. *Emerg Infect Dis* 12:881–886
44. Yen H-L, Webster R. G, Pandemic Influenza as a Current Threat, *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Compans R.W, Orenstein W.A, Springer, 2009), p 3-24
45. bdel-Ghafar AN, Chotpitayasunondh T, Gao Z, Hayden FG, Nguyen DH, de Jong MD, Naghdaliyev A, Peiris JSM, Shindo N, Soeroso S, Uyeki TM (2008) Update on avian influenza A (H5N1) virus infection in humans. *N Engl J Med* 358:261–273
46. Beigel JH, Farrar J, Han AM, Hayden FG, Hyer R, de Jong MD, Lochindarat S, Nguyen TK, Nguyen TH, Tran TH, Nicoll A, Touch S, Yuen KY (2005) Avian influenza A (H5N1) infection in humans. *N Engl J Med* 353:1374–1385

47. de Jong MD, Bach VC, Phan TQ, Vo MH, Tran TT, Nguyen BH, Beld M, Le TP, Truong HK, Nguyen VV, Tran TH, Do QH, Farrar J (2005a) Fatal avian influenza A (H5N1) in a child presenting with diarrhea followed by coma. *N Engl J Med* 352:686–691
- de Jong MD, Simmons CP, Thanh TT, Hien VM, Smith GJ, Chau TN, Hoang DM, Chau NV, Khanh TH, Dong VC, Qui PT, Cam BV, Ha DQ, Guan Y, Peiris JSM, Chinh NT, Hien TT, Farrar J (2006) Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat Med* 12:1203–1207
49. Gu J, Xie Z, Gao Z, Liu J, Korteweg C, Ye J, Lau LT, Lu J, Gao Z, Zhang B, McNutt MA, Lu M, Anderson VM, Gong E, Yu AC, Lipkin WI (2007) H5N1 infection of the respiratory tract and beyond: a molecular pathology study. *Lancet* 370:1137–1145
50. Ungchusak K, Auewarakul P, Dowell SF, Kitphati R, Auwanit W, Puthavathana P, Uiprasertkul M, Boonnak K, Pittayawonganon C, Cox NJ, Zaki SR, Thawatsupha P, Chittaganpitch M, Khontong R, Simmerman JM, Chunsutthiwat S (2005) Probable person-to-person transmission of avian influenza A (H5N1). *N Engl J Med* 352:333–340
51. Kandun IN, Wibisono H, Sedyaningsih ER, Yusharmen, Hadisoedarsuno W, Purba W, Santoso H, Septiawati C, Tresnaningsih E, Heriyanto B, Yuwono D, Harun S, Soeroso S, Giriputra S, Blair PJ, Jeremijenko A, Kosasih H, Putnam SD, Samaan G, Silitonga M, Chan KH, Poon LL, Lim W, Klimov A, Lindstrom S, Guan Y, Donis R, Katz J, Cox N, Peiris JSM, Uyeki TM (2006) Three Indonesian clusters of H5N1 virus infection in 2005. *N Engl J Med* 355:2186–2194
52. Potter CW (1998) Chronicle of influenza pandemics. In: Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ (eds) *Textbook of influenza*. Blackwell, London, pp 3–26
53. Capua I, Marangon S (2007) Control and prevention of avian influenza in an evolving scenario. *Vaccine* 25:5645–5652
54. Finkelstein DB, Mukatira S, Mehta PK, Obenauer JC, Su X, Webster RG, Naeve CW (2007) Persistent host markers in pandemic and H5N1 influenza viruses. *J Virol* 81:10292–10299
55. Maines TR, Chen LM, Matsuoka Y, Chen H, Rowe T, Ortin J, Falcon A, Nguyen TH, Mai LQ, Sedyaningsih ER, Harun S, Tumpey TM, Donis RO, Cox NJ, Subbarao K, Katz JM (2006) Lack of transmission of H5N1 avian-human reassortant influenza viruses in a ferret model. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:12121–12126
56. Kuiken T, Rimmelzwaan G, van Riel D, van Amerongen G, Baars M, Fouchier RA, Osterhaus AD (2005) Avian H5N1 influenza in cats. *Science* 306:241

57. Palese P (2004) Influenza: old and new threats. *Nat Med* 10:S82-S87
58. Shortridge KF (1992) Pandemic influenza: a zoonosis? *Semin Respir Infect* 7:11–25
59. Gilbert M, Xiao X, Pfeiffer DU, Epprecht M, Boles S, Czarnecki C, Chaitaweesub P, Kalpravidh W, Minh PQ, Otte MJ, Martin V, Slingenbergh J (2008) Mapping H5N1 highly pathogenic avian influenza risk in Southeast Asia. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:4769–4774
60. Yen H-L, Webster R.G, Pandemic Influenza as a Current Threat, *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Compans R.W, Orenstein W.A, **333**), 2009, 3-24
61. Subbarao K., Joseph T., Scientific barriers to developing vaccines against avian influenza viruses, *Nature Reviews Immunology*, 2007, 1-12
62. Kilbourne, E. D., Laver, W. G., Schulman, J. L., Webster, R. G. Antiviral activity of antiserum specific for an influenza virus neuraminidase. *J. Virol.* 2, 281–288 (1968)
63. Murphy, B. R., Kasel, J. A., Chanock, R. M. Association of serum anti-neuraminidase antibody with resistance to influenza in man. *N. Engl. J. Med.* 286, 1329–1332 (1972)

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ - Ιός της Ανθρώπινης Ανοσοανεπάρκειας (HIV)

Γενική Ελληνική Βιβλιογραφία

- 1B. Δρ. Μπουσιάκου-Καλκάνη Ε, Ιολογία, εκδόσεις Έλλην
- 2B. Τσότσος Α, Ιατρική Ιολογία (Γενική-Κλινική-Εργαστηριακή), Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας
- 3B. Abbas A.K, Lichtman A.H, (Τζάρτος ΙΣ, Μαμαλάκη Α, Σαμάρκος Μ), Βασική Ανοσολογία, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης
- 4B. Goldsby R, Kindt T, Osborne B, Kuby J, (Γαιτανάκη Α, Μπαξεβάνης Κ), Ανοσολογία, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης
- 5B. Μαργαρίτης Α.Χ, Γαλανόπουλος Β.Κ, Κεραμάρης Κ.Ε, Μαρίνος Ε.Σ, Παπασιδέρη Ι.Σ, Στραβοπόδης Δ.Ι, Τρουγκάκος Ι.Π, Βιολογία του κυττάρου (4^η έκδοση), Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας
- 6B. Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J., (Δ. Γεωργακόπουλος, Γ. Διαλλινάς, Γ. Ζαχαριουδάκης, Αμ. Καραγκούνη-Κύρτσου, Θ. Κοκκορόγιαννης, Σ. Φριλίγγος, Στ. Χατζηλουκάς, Χρ. Χριστιάς), Βιολογία των μικροοργανισμών, Τόμος Ι, ΙΙ, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης

Γενική Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

- 7B. Hunter E, Retroviruses: General Features, Encyclopedia of Virology (Third Edition, Mahy B.W.J, Van Regenmortel M.H.V, Academic Press, 2008) p 459-467
- 8B. Peters P.J, Kilmarx P.H, Mastro T.D, AIDS: Global Epidemiology, Encyclopedia of Virology (Third Edition, Mahy B.W.J, Van Regenmortel M.H.V, Academic Press, 2008), p 58-68
- 9B. Van Heuverswyn F, Peeters M, Human Immunodeficiency Viruses: Origin, Encyclopedia of Virology (Third Edition, Mahy B.W.J, Van Regenmortel M.H.V, Academic Press, 2008), p 525-533
- 10B. Votteler J, Schubert U, Human Immunodeficiency Viruses: Molecular Biology, Encyclopedia of Virology (Third Edition, Mahy B.W.J, Van Regenmortel M.H.V, Academic Press, 2008), p 517-524
- 11B. Fan H, Retroviruses, Encyclopedia of Microbiology (Third Edition, Schaechter M, Academic Press, 2009) p 519-534
- 12B. Kaushik S, Levy J.A, HIV/AIDS, Encyclopedia of Microbiology (Third Edition, Schaechter M, Academic Press, 2009) p 391-413
- 13B. Carter J.B, Saunders V.A, Virology: Principles and applications, John Wiley & Sons Ltd, 2007, p 185-211

Βιβλιογραφία

1. Kwong P.D., Wyatt R., Robinson J., Sweet R.W., Sodroski J., Hendrickson W.A., Structure of an HIVgp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody, Nature, 393, 1998, 648-659
2. Leonard, C.K. et al. Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cell. J. Biol. Chem. 265, 10373–10382 (1990)

3) Βιβλιογραφία 3^{ου} Κεφαλαίου

Βιβλιογραφία

1. Sakarellos-Daitsiotis M, Krikorian D, Panou-Pomonis E, Constantinos Sakarellos, Artificial Carriers: A Strategy for Constructing Antigenic/Immunogenic Conjugates, Current Topics in Medicinal Chemistry, 2006, 6, 1715-1735
2. Sela, M. Antigenicity: Some molecular aspects. Science 1969, 166, 1365-1374
3. Arnon, R.; Maron, E.; Sela, M.; Anfinsen, C.B. Antibodies reactive with native lysozyme elicited by a completely synthetic antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1971, 68, 1450-1455
4. Sela, M. Immunological studies with synthetic polypeptides. Adv. Immunol. 1966, 5, 29-129
5. Muller, S. Use of synthetic peptides for the analysis of B-cell epitopes in autoantigens. In NATO ASI Series, Vol. H 80. Autoimmunity: Experimental Aspects. Zomali, M.; Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1994, pp 75-89.
6. Elkon, K.B. Use of synthetic peptides in the detection and quantification of autoantibodies. Mol. Biol. Rep. 1992, 16, 207-212.
7. Sakarellos-Daitsiotis, M.; Panou-Pomonis, E. Peptides as probes for studying autoimmune diseases. In Research Trends, Current Topics in Peptide & Protein Research. Richard, R.; T.C. 17/250(3), Poojapura Trivandrum-695012, India, 2004, 6, pp 81-91.
8. Lerner, R. A. Tapping the immunological repertoire to produce antibodies of predetermined specificity. Nature 1982, 299, 592-596
9. Lerner, R. A. Antibodies of predetermined specificity in biology and medicine. Adv. Immunol. 1984, 36, 1-44
10. Arnon, R.; Van Regenmortel, M. H. V. Structural basis of antigenic specificity and design of new vaccines. FASEB J. 1999, 6, 3265-3274
11. Walter, G. Production and use of antibodies against synthetic peptides. J. Immunol. Methods, 1986, 88, 149-161
12. Harlow, E.; Lane, D. Antibodies. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory 1985
13. Briand, J. P.; Muller, S.; Van Regenmortel, M. H. V. Synthetic peptides as antigens: pitfalls of conjugation methods. J. Immunol. Methods 1985, 78, 56-69
14. Schutze, M. P.; LeClerc, C.; Jolivet, F.; Audibert, F.; Chedid, L. Carrier-induced epitopic suppression, a major issue for future synthetic vaccines. J. Immunol. 1985, 135, 2319-2322

15. Jacob, C. O.; Arnon, R.; Sela, M. Effect of carrier on the immunogenic capacity of synthetic cholera vaccine. *Mol. Immunol.* 1985, 22, 1333-1339
16. Dent, A. H. Conjugation methods. In the immunoassay handbook. Wild, D.; Nature publishing group, 2nd edition, 2001, pp 211-228
17. Audibert, F.; Jolivet, M.; Chedid, L.; Arnon, R.; Sela, M. Successful immunization with a totally synthetic diphtheria vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1982, 79, 5042-5046
18. Veprek, P.; Jezek, J. Peptide and glycopeptide dendrimers. Part I. *J. Peptide Sci.* 1999, 5, 5-23
19. Veprek, P.; Jezek, J. Peptide and glycopeptide dendrimers. Part II. *J. Peptide Sci.* 1999, 5, 203-220
20. Kaumaya, P. T.; Berndt, K. D.; Heidorn, D. B.; Trehwella, J.; Kezdy, F. J.; Goldberg, E. Synthesis and biophysical characterization of engineered topographic immunogenic determinants with alpha alpha topology. *Biochemistry* 1990, 29, 13-23
21. Kobs-Conrad, S.; Lee, H.; DiGeorge, A. M.; Kaumaya, P. T. Engineered topographic determinants with alpha beta, beta alpha beta, and beta alpha beta alpha topologies show high affinity binding to native protein antigen (lactate dehydrogenase-C4). *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 25285-25295
22. Sundaram, R.; DaKappagari, N. K.; Kaumaya, P. T. Synthetic peptides as cancer vaccines. *Biopolymers* 2002, 66, 200-216
23. Kaumaya, P. T.; Kobs-Conrad, S.; Seo, Y. H.; Lee, H.; VanBuskirk, A. M.; Feng, N., Sheridan, J.; Stevens, V. Peptide vaccines incorporating a "promiscuous" T-cell epitope by pass certain haplotype restricted immune responses and provide broad spectrum immunogenicity. *J. Mol. Recognit.* 1993, 6, 81-94
24. Tam, J. P. High-density multiple antigen-peptide system for preparation of antipeptide antibodies. *Methods Enzymol.* 1989, 168, 7-15
25. Posnett, D. N.; Tam, J. P. Multiple antigenic peptide method for producing antipeptide site-specific antibodies. *Methods Enzymol.* 1989, 178, 739-746
26. Tam J. P.; Lu, Y. A. Coupling difficulty associated with interchain clustering and phase transition in solid phase peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 12058-12063
27. Tam, J. P. Macropeptide structures. Synthesis of peptide dendrimers and protein mimetics. In Houben-Weyl, *Methods of Organic Chemistry. Synthesis of Peptides and Peptidomimetics.* Goodman, M.; Felix, A.; Moroder, L.; Toniolo, C. (eds). Thieme: Stuttgart, 2003, E22d: 129-168

28. Merrifield, R. B. Solid-phase peptide synthesis. In *Peptides: Synthesis, Structures and Applications*. Gutte, B. (ed). Academic Press, San Diego, 1995, pp 93-169
29. Stewart, J. M.; Young, J. D. *Principles of Peptide Synthesis*, Second ed. Pierce Chemical Co, Rockford IL, 1984
30. Bodansky, M. *Principles of Peptide Synthesis*, Second ed. Springer: Berlin, 1993
31. Basak, A.; Boudreault, A.; Chen, A.; Chretien, M.; Seidah, N. G.; Lazure, C. Application of the multiple antigenic peptides (MAP) strategy to the production of prohormone convertases antibodies: synthesis characterization and use of 8-branched immunogenic peptides. *J. Peptide Sci.* 1995, 1, 385-395
32. Keah, H. H.; Kacorius, E.; Hearn, M. T. W. Direct synthesis and characterization of multidendritic peptides for use as immunogens. *J. Peptide Res.* 1998, 51, 2-8
33. Benz, H. The role of solid-phase fragment condensation in peptide synthesis. *Synthesis* 1994, 337-358
34. Kaiser, E. T.; Nihara, H.; Laforet, G. A.; Kelly, J. W.; Walters, L.; Findeis, M.A.; Sasaki, T. Peptide and Protein synthesis by segment synthesis-condensation. *Science* 1989, 243, 187-192
35. Tam J. P.; Xu, J.; Eom, K. D. Methods and strategies of peptide ligation. *Biopolymers (Pep. Sci.)* 2001, 60, 194-205
36. Sadler, K.; Tam, J. P. Peptide dendrimers: applications and synthesis. *Rev. Mol. Biotechnol.* 2002, 90, 195-229
37. Shao, J.; Tam, J. P.; Unprotected peptides as building blocks for the synthesis of peptide dendrimers with oxime, hydrazone, and thiazolidine linkages. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 3893-3899
38. Tam, J. P.; Spetzler, J. C. Chemoselective approaches to the preparation of peptide dendrimers and branched artificial proteins using unprotected peptides as building blocks. *Biomed. Peptide Protein Nucl. Acids* 1995, 1, 123-132
39. Tam, J. P.; Clavijo, P.; Lu, Y-A.; Nussenzweig, V. ; Nussenzweig, R.; Zavala, F. Incorporation of T and B epitopes of the circumsporozoite protein in a chemically defined synthetic vaccine against malaria. *J. Exp. Med.* 1990, 171, 299-306
40. Chai, S. K.; Clavijo, P.; Tam, J. P.; Zavala, F. Immunogenic properties of multiple antigen peptide systems containing defined T and B epitopes. *J. Immunol.* 1992, 149, 2385-2390
- 41) Levi, M.; Ruden, M.; Birx, D.; Loomis, L.; Redfield, R.; Lovgren, K.; Akerblom, L.; Sandstrom, E.; Wahren, B. Effects of adjuvants and multiple antigen peptides on humoral and

- cellular immune responses to gp 160 of HIV-1. *J. Acquired Immune Defic. Syndr.* 1993, 6, 855-864
42. Nardelli, B.; Defoort, J. P.; Huang, W.; Tam, J.P. Design of a complete synthetic peptide – based AIDS vaccine with a built-in adjuvant. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 1992, 8, 1405-1407
 43. Wang, L. X.; Ni, J.; Singh, S. Carbohydrate-centered maleimide cluster as a new type of templates for multivalent peptide assembling. synthesis of multivalent HIV-1 gp41 peptides. *Bioorg. Med. Chem.* 2003, 11, 159-166
 44. Briand, J. P.; Barin, C.; Van Regenmortel, M. H. V.; Müller, S. J. Application and limitations of multiple antigen peptide (MAP) system in the production and evaluation of anti-peptide and antiprotein antibodies. *J. Immunol. Methods* 1992, 156, 255-265
 45. Waldron, E. E.; Murray, P.; Kolar, Z.; Young, L.; Reynolds, G.; Baumforth, K.; Toomey, S.; Astley, S.; Perera, S. A.; Nelson, P. N. Reactivity and isotype profiling of monoclonal antibodies using multiple antigenic peptides. *Hybrid. Hybridomics* 2002, 21, 393-398
 46. Mahale, S. D.; Pereira, J.; Natraj, U.; Iyer, K. S. Comparison of antibodies raised against the peptide 10-24 of chicken riboflavin carrier protein (cRCP) by classical and multiple antigen peptide (MAP) approaches. *J. Immunol. Methods* 1996, 190, 215-219
 47. Audibert, F.; Jolivet, M.; Chedid, L.; Arnon, R.; Sela, M. Successful immunization with a totally synthetic diphtheria vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1982, 79, 5042-5046
 48. Sela, M. In *Molecules, cells and parasites in immunology*; Larralde, C.; Wills, K.; Ortiz-Ortiz, L.; Sela, M.; Eds.; Academic Press: New York, 1980; pp 215-218
 49. Langbeheim H., Amon R., Sela M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1976, 73,4636
 50. Muller G.M., Shapiro, I.M., Arnon R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, 79, 569
 51. Hudecz, F., Szekerke, M. *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 1985, 50, 103
 52. Mezo, G., Hudecz, F., Kajtar, J., Szokan, Gy., Szekerke, M., *Biopolymers*, 1989, 25, 1801
 53. Sakarellos-Daitsiotis M., Tsikaris V., Vlachoyiannopoulos P.G., Tzioufas A., Moutsopoulos H., M. Sakarellos, C., *Methods: A companion to Methods in Enzymology*, 1999, 19, 133
 54. Sakarellos-Daitsiotis M.; Tsikaris V.; Sakarellos C., Vlachoyiannopoulos P.G., Tzioufas A., Moutsopoulos H., M. *Vaccine*, 2000, 18, 302
 55. Alexopoulos Ch, Tsikaris V., Rizou C., Sakarellos-Daitsiotis M., Sakarellos C., Cung, M.T., Marraud M., Vlachoyiannopoulos P.G., Moutsopoulos H.M., *Biopolymers*, 2000, 54, 1
 56. Mezo G., Kajtar J., Nagy I., Szekerke M., Hudecz F., *Biopolymers*, 1997, 42, 719

57. Hudecz, F. Manipulation of epitope function by modification of peptide structure: a minireview. *Biologicals* 2001, 29, 197-207
58. Mezö, G., Oliveira E., Krikorian D., Feijlbrieff M., Jakab A., Tsikaris V., Sakarellos C., Welling-Wester S., Andreu D., Hudecz F., Synthesis and comparison of antibody recognition of conjugates containing herpes simplex virus type 1 glycoprotein D epitope VII. *Bioconjug. Chem.* 2003, 14, 1260-1269
59. Mutter M., Tuchscherer, *Cell Mol. Life Sci.*, 1997: 53, 851
60. Alexopoulos Ch., Sakarellos-Daitsiotis M., Sakarellos C., Synthetic carriers: sequential oligopeptide carriers SOC_n-I and SOC_n-II as an innovative and multifunctional approach. *Curr. Med. Chem.* 2005, 12, 1469-1479
61. Bindra V., Kuki, A., Conformational preferences of oligopeptides rich in alpha-aminoisobutyric acid. III. Design, synthesis and hydrogen bonding in 3(10)-helices. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1994, 44, 539-548
62. Tsikaris V., Sakarellos C., Cung M. T., Marraud M., Sakarellos-Daitsiotis M., Concept and design of a new class of sequential oligopeptide carriers (SOC) for covalent attachment of multiple antigenic peptides. *Biopolymers* 1996, 38, 291-293
63. Alexopoulos Ch., Tsikaris V., Rizou C., Sakarellos-Daitsiotis M., Sakarellos, C., Cung, M. T., Marraud, M., Vlachoyiannopoulos, P.G., Moutsopoulos, M. The position of the LysN epsilon H2-grafted antigens along the sequential oligopeptide carrier, Ac-(Aib-Lys-Aib-Gly)_n (SOC_n-II), influences the antibody recognition: application to the S_m main autoimmune epitope. *Biopolymers* 2000, 54, 1-10
64. Alexopoulos, Ch., Tsikaris, V., Rizou, C., Panou-Pomonis, E., Sakarellos-Daitsiotis, M., Sakarellos, C., Vlachoyiannopoulos, P.G., and Moutsopoulos, H.M. 2001, *J. Pept. Sci.*, 7, 105
65. Sakarellos-Daitsiotis, M., Alexopoulos, Ch., and Sakarellos, C. 2004, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 34, 761
66. Tsikaris V., Sakarellos C., Sakarellos-Daitsiotis M., Orlewski P., Marraud M., Cung M.T., Vatzaki E., Tzartos S., 1996, *Int. J. Biol. Macromol.*, 19, 195
67. Tsikaris, V., Detsikas, E., Sakarellos-Daitsiotis, M., Sakarellos, C., Vatzaki, E., Tzartos, S. J., Marraud, M., and Cung, M.T. 1993, *Biopolymers*, 33, 1123
68. Alexopoulos, Ch., Krikorian, D., Panou-Pomonis, E., Sakarellos-Daitsiotis, M., Sakarellos, C., 2005, *Protein Peptide Lett.*, 12, 601
69. Tsikaris, V., Vlachoyiannopoulos, P.G., Panou-Pomonis, E., Marraud, M., Sakarellos, C., Moutsopoulos, H.M., and Sakarellos-Daitsiotis, M. 1996, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 48, 319

70. Routsias J.G., Dotsika E., Touloupi E., Papamattheou M., Sakarellos C., Sakarellos-Daitsiotis M., Moutsopoulos H.M., Tzioufas, A.G. 2003, *J. Autoimmun.*, 21, 17
71. Sotiriadou K.P., Remoundos M.S., Katsikas M.C., Tzinia A.K., Tsikaris V., Sakarellos C., Tzartos S.J. 1992, *J. Biol. Chem.*, 267, 13980
72. Tsikaris V., Sakarellos C., Sakarellos-Daitsiotis M., Cung M.T., Marraud M., Konidou G., Tzinia A., Sotiriadou K.P., 1996, *Pept. Res.*, 9, 240.
73. Vlachoyiannopoulos P.G., Petrovas C., Tzioufas A.G., Alexopoulos Ch., Tsikaris V., Guialis A., Nakopoulou L., Sakarellos-Daitsiotis M., Sakarellos C., Davaris P., Moutsopoulos H. M., 2000, *J. Autoimmun.*, 14, 53
74. Krikorian D., Panou-Pomonis E., Voitharou C., Sakarellos C., Sakarellos-Daitsiotis M., 2005, *Bioconjug. Chem.*, 16, 812
75. Yiannaki E., Vlachoyiannopoulos P.G., Manousakis M.N., Sakarellos C., Sakarellos-Daitsiotis M., Moutsopoulos H.M., Tzioufas A.G. 2000, *Clin. Exp. Immunol.*, 121, 551

4) Βιβλιογραφία 4^{ου} Κεφαλαίου

Γενική Βιβλιογραφία

- 1A. Sewald N., Jakubke H-D, Peptides: Chemistry and Biology, 2002, Wiley-VCH
- 2A. Leo Benoiton N., Chemistry of peptide synthesis, 2006, Taylor & Francis Group
- 3A. Miklos Bodanzsky, "*Peptide Chemistry: A Practical Textbook*", 2nd Rev. Edition. Springer Verlag, 1993, New York
- 4A. Goodman M., Toniolo C., Moroder L., Felix A., Synthesis of Peptides and Peptidomimetics (Methods in Organic Chemistry), Houben-Weyl, 2003, 1-5, European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd
- 5A. Barrett G.C., Elmore D.T., Amino Acids and Peptides, 2004, Cambridge University Press
- 6A. Sewald N., Jakubke H-D Peptides from A to Z, 2008, Wiley-VCH

Βιβλιογραφία

1. Kimmerlin T., Seebach D., '100 years of peptide synthesis': ligation methods for peptide and protein synthesis with applications to b-peptide assemblies, J. Peptide Res. 65, (2005) 229–260
2. J.H. Jones, W. I. Ramage, J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1978, 472
3. J.H. Jones, A.V. Stachulsky, J. Chem. Soc., Perkin Trans. I 1979, 2261
4. A. R. Mitchell, B.W. Erickson, M.N. Ryabtsev, R.S. Hedges, R. B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 1976, 98, 7357
5. A. R. Mitchell, S. B.H. Kent, M. Engelhardt, R. B. Merrifield, J. Org. Chem. 1978, 43, 2845
6. G. R. Matsueda, J.M. Stewart, Peptides 1981, 2, 45
7. W. D. Fuller, M. Goodman, F. R. Naider, Y.F. Zhu, Biopolymers 1996, 40, 183
8. H. Rink, Tetrahedron Lett. 1987, 28, 3787
9. Story, S.C., Aldrich, J.V. (1992) Preparation of protected peptide amides using the Fmoc chemical protocol. Comparison of resins for solid phase synthesis. Int J Pept Protein Res. 39, 87-92
10. Benoiton N.L., Sometimes it is neither a racemisation nor an epimerisation but an enantiomerisation. A plea for preciseness in the use of terms describing stereomutations in peptide synthesis. Int. J. Pept. Prot. Res. 44, 399, 1994

11. Stathopoulos P, Papas S, Kostidis S, and Tsikaris V. α - and β - Aspartyl peptide ester formation via aspartimide ring opening. *J. Peptide Sci.* **11**: 658–664 (2005)
12. Cynthia A.G., Gregg B.F., Trifluoroacetic Acid Cleavage and Deprotection of Resin-Bound Peptides Following Synthesis by Fmoc Chemistry, *METHODS IN ENZYMOLOGY*, **289**, 67-83

5) Βιβλιογραφία 5^{ου} Κεφαλαίου

Γενική Βιβλιογραφία

- 1A. Chan W.C., White P.D., Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis A Practical Approach, Oxford University Press
- 2A. Goodman M., Felix A., Moroder L., Toniolo C., Houben-Weyl Methods in Organic Chemistry: Synthesis of Peptides and Peptidomimetics, Workbench Edition, Georg Thieme Verlag Stuttgart, Volume 1-5

Βιβλιογραφία

1. Papas S., Strongylis C., Tsikaris V., Synthetic Approaches for Total Chemical Synthesis of Proteins and Protein-Like Macromolecules of Branched Architecture, Current Organic Chemistry, 10, (14), 2006, 1727-1744
2. Erlanger B.F., Borek F., Beiser S.M., Lieberman S.J., Biol. Chem., 288, 1957, 713
3. Pochon S., Buchegger F., Pelegrin A., Mach J.-P., Offord R.E., Ryser, J.E., Rose. K., Int. J. Cancer, 43, 1989, 1188
4. Rose K., J. Am. Chem. Soc., 116, 1994, 30
5. Tuchscherer G., Tetrahedron Lett., 34, 1993, 8419
6. Shao J., Tam J.P., J. Am. Chem. Soc, 117, 1995, 3893
7. Pallin T. D., Tam J.P., J. Chem. Soc, Chem. Commun., (1995), 2021
8. Geoghegan K.F., Stroh J.G., Site-directed conjugation of nonpeptide groups to peptides and proteins via periodate oxidation of a 2-amino alcohol. Application to modification at N-terminal serine, 3, 1992, 138–146
9. Gaertner, H. F., Rose, K., Cotton, R., Timms. D., Gamble, R., and Offord, R. E., 1992, Bioconjugate Chem., 3, 262

ΠΕΡΙΛΗΨΗ-SUMMARY

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι μολυσματικές ασθένειες που προκαλούνται από τον υψηλής παθογένειας ιό της γρίπης των πτηνών H5N1 (High Pathogenic Avian Influenza Viruses H5N1: HPAIV H5N1) και τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας HIV (Human Immunodeficiency virus) εξακολουθούν να αποτελούν σοβαρή απειλή για τη δημόσια υγεία εξαιτίας της έλλειψης αποτελεσματικών θεραπευτικών μέσων. Ειδικότερα, από το 1997 και μετά έχει παρατηρηθεί ευρεία εξάπλωση του HPAIV H5N1 με συνεχιζόμενα κρούσματα μολυσματικότητας, τόσο μεταξύ των πτηνών όσο και απευθείας μετάδοσης του ιού από τα πτηνά στους ανθρώπους, αυξάνοντας κατά πολύ τη θνησιμότητα στον ανθρώπινο πληθυσμό και την ανησυχία για μια επερχόμενη πανδημία γρίπης. Παράλληλα, ο ιός HIV που προκαλεί την ασθένεια της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας, αποτελεί την αιτία μόλυνσης περισσότερων από 42 εκατομμυρίων ανθρώπων σε ολόκληρο τον κόσμο με περισσότερους από 17 εκατομμύρια θανάτους. Η ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού και ασφαλούς εμβολίου έναντι αυτών των ιών αποτελεί άμεση προτεραιότητα στο πεδίο της έρευνας.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο σχεδιασμός, η σύνθεση και ανοσογονική μελέτη υποψήφιων πεπτιδικών επιτόπων των ιών HPAIV H5N1 και HIV με απώτερο σκοπό την ανάπτυξη προστατευτικής ανοσίας και διαγνωστικών.

Για να ενισχυθεί η ανοσογονικότητα των πεπτιδικών επιτόπων θα πρέπει να συνδεθούν με μόρια-φορείς. Για το λόγο αυτό οι υποψήφιοι πεπτιδικοί επίτοποι προσδέθηκαν σε ένα τεχνητό φορέα SOC₄. Ο συγκεκριμένος φορέας αποτελείται από το μοτίβο (-Lys-Aib-Gly-), όπου η πρόσδεση των πεπτιδικών επιτόπων γίνεται στην ε-NH₂ της Lys. Από μελέτες έχει βρεθεί ότι ο φορέας υιοθετεί ελικοειδή μορφή η οποία επιτρέπει στα προσδεδεμένα αντιγονικά πεπτίδια να λαμβάνουν έναν καθορισμένο προσανατολισμό στο χώρο χωρίς να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους ή με τον φορέα και επιπλέον να διατηρούν την «ενεργό» τους διαμόρφωση.

Υποψήφιοι T-κυτταρικοί επίτοποι της αιμοσυγκολλητίνης (HA) H5 του ιού της γρίπης των πτηνών H5N1 προσδιορίστηκαν με υπολογιστικές μεθόδους. Τα ανάλογα αυτά προσδέθηκαν στον Επαναλαμβανόμενο Ολιγοπεπτιδικό Φορέα (Sequential Oligopeptide Carrier: SOC_n) Ac-SOC₄-[2Ac, (NH₂OCH₂C(O))₂]-NH₂ σε δυο αντίγραφα με χημειοεκλεκτική σύνδεση μέσω σχηματισμού δεσμού οξίμης με μια διαδικασία τριών σταδίων. Στο **πρώτο στάδιο** πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του επιτόπου και του φορέα με SPPS. Στο **δεύτερο στάδιο** πραγματοποιήθηκε η δημιουργία αλδεϋδομάδας στον πεπτιδικό

επίτοπο μέσω οξείδωσης και στο **τρίτο στάδιο** έγινε η σύνδεση του αλδεϋδικού επιτόπου με το φορέα $\text{Ac-SOC}_4\text{-(Ac}_2\text{, Aoa}_2\text{)-NH}_2$ μέσω σχηματισμού δεσμού οξίμης. Τα παραπάνω SOC-σμπλέγματα χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα ανοσοποιήσεων σε ποντίκια. Τα SOC-σμπλέγματα εμφάνισαν μικρή προστατευτική ανοσία, με το SOC-T₄ σύμπλεγμα να εμφανίζει το μεγαλύτερο ποσοστό (33%), προσδίδοντας έτσι μια μικρή ανοσογονικότητα στον αντίστοιχο επίτοπο.

Επίσης, προσδιορίστηκαν υποψήφιοι HIV επίτοποι για αντισώματα ασθενών που δεν έχουν ασθενήσει εδώ και πολλά χρόνια (Long-term non progressors, LTNP) με την τεχνική έκθεσης σε φάγους. Οι επίτοποι αυτοί προσδέθηκαν στον Επαναλαμβανόμενο Ολιγοπεπτιδικό Φορέα (Lys-Aib-Gly)₄ σε τέσσερα αντίγραφα είτε με τη βήμα-προς-βήμα πεπτιδική σύνθεση είτε με χημειοεκλεκτική σύνδεση μέσω σχηματισμού δεσμού οξίμης. Από πειράματα διασταυρωτής αντίδρασης των SOC-σμπλεγμάτων με ορούς ασθενών LTNP και HIV-progressors, το σύμπλεγμα $\text{Ac-SOC}_4\text{-(ASAKWSIGPGRA)}_4\text{-OH}$ (10) αντέδρασε ισχυρότερα με ορούς ασθενών LTNP, επιβεβαιώνοντας την πιθανή ύπαρξη διατηρημένου επιτόπου ως υποψήφιου για εμβόλιο. Επίσης, έγιναν ανοσοποιήσεις ποντικών με το σύμπλεγμα $\text{Ac-SOC}_4\text{-(ASAKWSIGPGRA)}_4\text{-OH}$ (10) και από τα αποτελέσματα πιστοποιήθηκε ο ρόλος του φορέα SOC_4 για την αποτελεσματική αύξηση της ανοσογονικότητας του επιτόπου, σε σχέση με τους φάγους, καθώς και η εξειδίκευση πρόσδεσης του επιτόπου μέσω της ελάχιστης αναγνώρισης του φορέα. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι το σύμπλεγμα (10) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη προστατευτικής ανοσίας και εμβολίων.

SUMMARY

Infectious diseases caused by the Highly Pathogenic Avian Influenza virus H5N1 (HPAIV H5N1) and human immunodeficiency virus HIV (Human Immunodeficiency virus) continue to pose a major threat to public health due to the absence of effective therapeutic means. More specific, since 1997 HPAIV H5N1 continuous to spread and infect birds among each other and humans by direct transmission from birds, increasing the mortality in the human population and the concern for an upcoming influenza pandemic. On the other hand, the HIV virus that causes the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) is the cause of the infection of more than 42 million people around the world with more than 17 million deaths. The development of an effective and safe vaccine against these viruses is a high priority on research.

The aim of the present study is the design, synthesis and the immunogenic evaluation of candidate peptide epitopes of the HPAIV H5N1 and HIV virus in order to develop protective immunity and diagnostics.

In order to enhance the immunogenicity of peptide epitopes, they must be conjugated to carrier-molecules. Therefore, the candidate peptide epitopes were anchored on an artificial SOC₄ carrier. The SOC₄ carrier is formed by the repetitive motif (-Lys-Aib-Gly-) where the peptide epitopes are anchored on the Lys-N^εH₂ groups. It was found that the helical conformation of the tetrameric SOC₄ induces a favorable arrangement of the conjugated epitopes without interacting with each other or with the carrier and also retain their initial “active” conformation.

Candidate T-cell epitopes of the H5 (HA) HPAIV H5N1 were predicted by computational methods. These epitopes were coupled on the Sequential Oligopeptide Carrier **Ac-SOC₄-[2Ac, (NH₂OCH₂C(O))₂]-NH₂** in two copies by chemoselective oxime bond formation in three steps. In the **first step** the synthesis of the peptide epitopes and the SOC carrier was performed by SPPS. At the **second step** the creation of aldehyde groups on the epitopes was performed by oxidation and at the **third step** the ligation of the aldehyde epitope on the Ac-SOC₄-(Ac₂, Aoa₂)-NH₂ carrier was performed by oxime bond formation. These SOC-conjugates were used on mice immunizations. The SOC-conjugates induced small protective immunity, with the SOC-T₄ conjugate showing maximum percentage (33%), giving thus a low immunogenicity on the corresponding epitope.

Also, candidate HIV-1 epitopes for antibodies present in long-term non-progressors (LTNP) were identified by the phage display technique. These epitopes were coupled on the Sequential Oligopeptide Carrier (Lys-Aib-Gly)₄ in four copies either by the step-by-step peptide solid phase synthesis or by chemoselective oxime bond formation. Cross-reactivity experiments of the SOC-conjugates with sera of LTNP and HIV-progressors, showed that the Ac-SOC₄-(ASAKWSIGPGRA)₄-OH (10) conjugate reacted stronger with patient sera LTNP, confirming the possible existence of preserved epitope as candidate for vaccine. Mice immunizations were also performed with Ac-SOC₄-(ASAKWSIGPGRA)₄-OH (10) conjugate. The results confirmed the role of the SOC₄ carrier to effectively enhance the epitope immunogenicity and the specificity of the epitope binding with the minimum carrier interaction. It is concluded that conjugate (10) can be used for the development of protective immunity and vaccines.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

- AChR:** acetylcholine receptor: υποδοχέας ακετυλοχολίνης
- AFC:** antibody forming cell: κύτταρα που σχηματίζουν αντίσωμα
- Aib:** Aminoisobutyric: αμινο-ισοβουτυρικό
- AIDS:** Acquired Immunodeficiency Syndrome: Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας
- Ala (A):** Alanine: Αλανίνη
- Aoa:** aminooxyacetic acid: Αμινοξικό οξύ
- APCs:** antigen presenting cells: αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα
- Arg (R):** Arginine: Αργινίνη
- ARV:** AIDS-Associated Retrovirus: Ιός σχετιζόμενος με το σύνδρομο AIDS
- Asn (N):** Asparagine: Ασπαραγίνη
- Asp (D):** Aspartate: Ασπαρτικό
- Boc:** tert-Butoxycarbonyl: τερτ-Βουτυλοξυκαρβόνυλο
- BSA:** Bovine Serum Albumin: Αλβουμίνη Βοός
- Bzl:** (Benzyl), Βένζυλο
- C:** constant: σταθερή
- Cbz:** carbobenzoxy: καρβοβενζόξυ
- CD (1,2,3,4,5,7,8,9,10,19,20,21,23):** Cluster Designation (Cluster of Differentiation) Ομάδα διάκρισης ή ομάδα διαφοροποίησης
- CD:** Circular Dichroism: Κυκλικός Διχρωισμός
- cDNA:** complementary DNA: συμπληρωματικό DNA
- CDRs:** Complementarity determining regions: περιοχές καθορισμού συμπληρωματικότητας
- CH:** σταθερή περιοχή βαριάς αλυσίδας αντισώματος
- cIg:** κυτοπλασμική ανοσοσφαιρίνη
- CL:** σταθερή περιοχή ελαφριάς αλυσίδας αντισώματος
- CTLs:** Cytotoxic T Lymphocyte: κυτταροτοξικό T λεμφοκύτταρο
- Cys (C):** Cysteine: Κυστεΐνη
- DCC:** N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide: N,N'-Δικυκλοεξυλοκαρβοδιμίδιο
- DCM:** Dichloromethane: Διχλωρομεθάνιο
- DIC:** N,N'-Diisopropylcarbodiimide: N,N'-Δισοπροπυλκαρβοδιμίδιο
- DIEA:** Diisopropylamine: Δισοπροπυλοαιθυλαμίνη
- DMF:** Dimethylformamide: Διμεθυλοφορμαμίδιο
- DMSO:** Dimethylsulfoxide: Διμεθυλοσουλφοξείδιο

DN: Double Negative: διπλά αρνητικά T-λεμφοκύτταρα

DNA: Deoxyribonucleic acid: δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ

DP: Double Positive: Διπλά θετικά T-λεμφοκύτταρα

dsRNA: double stranded: δίκλωνο RNA

EDT: αιθανεδιθειόλη

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay: ενζυμική ανοσοπροσροφητική μέθοδος προσδιορισμού

env: envelope: γονίδιο φάκελος

ESI-MS: Electrospray Ionization Mass-Spectrometry: Φασματομετρία Μάζας με ηλεκτροψεκασμό

Fab: Fragment antigen binding: αντιγονοσυνδέον θραύσμα

Fc: Fragment Crystallizing: Κρυσταλλούμενο Θραύσμα

Fmoc: (9-Fluorenylmethoxycarbonyl), 9-Φλουορενελμεθοξεκαρβονυλο

gag: group specific antigen: αντιγόνο ειδικό για ομάδα

gp: glycoprotein: γλυκοπρωτεΐνη

Gln (Q): (Glutamine), Γλουταμίνη

Glu (E): (Glutamate), Γλουταμινικό

Gly (G): (Glycine), Γλυκίνη

HA: heamagglutinin: αιμοσυγκολλητίνη

HBTU: [2-(1H-Benzotriazole-1-yl)1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate]: βενζοτριαζολ-τετραμεθυλο-ουρονικο-εξαφωσφορικό αλας.

HF: Hydrogen Fluoride: Υγρό Υδροφθόριο

High Pathogenic Avian Influenza Viruses H5N1: HPAIV H5N1: υψηλής παθογένειας ιό

His (H): Histidine: Ιστιδίνη

HIV-1 progressors: ασθενείς με πρόοδο της ασθένειας

HIV: Human Immunodeficiency Virus: Ιός της Ανθρώπινης Ανοσοανεπάρκειας

HLA-I, II (A,-B-C και DR,-DP-DQ-DM-DO): Human Lymphocyte Antigens: Αντιγόνα Ανθρώπινων Λεμφοκυττάρων τάξης I, II

Hmb: 2-υδροξυ-4-μεθοξυβενζυλο ομάδα

HOBt: N-Hydroxybenzotriazole: N-Υδροξυβενζοτριαζόλιο

HPLC: High Pressure Liquid Chromatography: υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης

HTLV-III: human T-cell leukemia virus: ανθρώπινος T-λεμφοκυτταροτρόπος ιός-III

HSV: Herpes Simplex Virus: απλός ιός έρπη

IFN- α , β , γ : Ιντερφερόνη α , β και γ

Ig: ανοσοσφαιρίνες

IL: ιντερλευκίνη

Ile (I): (Isoleukine), Ισολευκίνη

IN: integrase: ιντεγκράση

KLH: Keyhole Limpet Hemocyanin: αιμοκυανίνη

LAV-1: Lymphadenopathy Associated Virus-1: Ιός Λεμφαδενοπάθειας-1

Leu (L): (Leukine), Λευκίνη

Long-term non progressors: LTNP: ασθενείς φορείς του ιού αλλά δεν έχουν ασθενήσει εδώ και πολλά χρόνια

Lys (K): (Lysine), Λυσίνη

M: matrix protein: θεμέλια πρωτεΐνη

mAg: monoclonal antibody: μονοκλωνικό αντίσωμα

MAPs: Multiple Antigen Peptide System: σύστημα πολλαπλών αντιγονικών πεπτιδίων

MeOH: Methanol: Μεθανόλη

mRNA: messenger RNA: αγγελιοφόρο RNA

Met (M): Methionine: Μεθειονίνη

MHC-I, II: Major Histocompatibility Complex: Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας τάξης I, II

NA: neuraminidase: νευραμινιδάση

NK natural killer cells: φυσικά φονικά κύτταρα

NP: nucleoprotein: νουκλεοπρωτεΐνη

NS: non-structural protein: μη-δομική πρωτεΐνη

OVA: ovalbumin: αλβουμίνη

PA: polymerase acidic protein: πολυμεράση όξινη πρωτεΐνη

PB: polymerase basic protein: πολυμεράση βασική πρωτεΐνη

PCP: Pneumocystis carinii pneumonia: πνευμονία οφειλόμενη στον ευκαιριακό μυκητιακό παθογόνο

Phe (F): Phenylalanine: Φαινυλαλανίνη

pI: Isoelectric point: ισοηλεκτρικό σημείο

pol: polymerase: γονίδιο πολυμεράση

PR: protease: πρωτεάση

Pro (P): (Proline), Προλίνη

PyBOP: Benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate: εξαφθοροφωσφορικό αλας του βενζοτριαζολυλ-τρεις-πυρρολικιδινο φωσφονίου

Ser (S): Serine: Σερίνη

sIg: επιφανειακή ανοσοσφαιρίνη

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

RNA: Ribonucleic acid: ριβονουκλεϊνικό οξύ

RNP: ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο

RT: reverse transcriptase: αντίστροφη μεταγραφάση

Sequential Oligopeptide Carriers: SOC_n: Επαναλαμβανόμενοι Ολιγοπεπτιδικοί Φορείς

SIV: Simian immunodeficiency viruses: Ιοί ανοσοανεπάρκειας πιθήκων

SIVcpz: Simian immunodeficiency viruses chimpanzee: Ιοί ανοσοανεπάρκειας χιμπατζήδων

SP: Single Positive: μονά θετικά T-λεμφοκύτταρα

SPPS: Solid Phase Peptide Synthesis: μέθοδος σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση

ssRNA: single stranded: μονόκλωνο RNA

tat: transactivator protein: πρωτεΐνη ενεργοποιητής μεταγραφής

TASPs: Template-Assembled Synthetic Proteins: σύστημα πρόσδεσης πεπτιδίων

TBTU: [2-(1H-Benzotriazole-1-yl)1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate]: βενζοτριαζολ-τετραμεθυλο-ουρονικο-τετραφθοροβορικό αλας

tBu: tert-Butyl: τερτ-Βουτυλο

TCR: T λεμφοκυτταρικός υποδοχέας

Tc: κυτταροτοξικά T-κύτταρα

TFA: Trifluoroacetic acid: Τριφθοροξικό οξύ

TFMSA: τριφθορομεθυλοσουλφονικό οξύ

TGF-β: Transforming Growth Factor: παράγοντας μετασχηματισμού του κυττάρου

T_H: Βοηθητικά T-κύτταρα

Thr (T): Threonine: Θρεονίνη

TMS: Tetramethylsilane: Τετραμεθυλοσιλάνιο

TIS: τριϊσοπροπυλοσιλάνιο

TNF-α,-β: Tumor Necrosis Factor: παράγων νέκρωσης όγκων

tRNAs: transfer-RNA: μεταφορικό RNA

Trp (W): Tryptophane: Τρυπτοφάνη

Trt: Trityl: Τριτυλο

Tyr (Y): Tyrosine: Τυροσίνη

Val (V): (Valine), Βαλίνη

V: variable: μεταβλητή

VH: μεταβλητή περιοχή βαριάς αλυσίδας αντισώματος

Vpr: Viral protein R: ιική πρωτεΐνη R

VL: μεταβλητή περιοχή ελαφριάς αλυσίδας αντισώματος