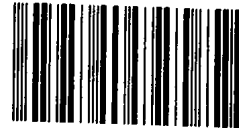


ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000265303



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

6

**ΣΥΜΒΟΛΗ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ
ΥΒΡΙΔΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΤΗΣ ΤΑΞΟΛΗΣ
ΜΕ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΔΡΑΣΗ**

ΣΕΡΑΦΕΙΜ ΠΑΠΑΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2007



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΠΑΠΑΣ ΣΕΡΑΦΕΙΜ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΣΥΜΒΟΛΗ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ
ΥΒΡΙΔΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΤΗΣ ΤΑΞΟΛΗΣ ΜΕ
ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΔΡΑΣΗ
ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

που εκπονήθηκε στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Καθηγητής Βασίλειος Τσίκαρης-Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων-Επιβλέπων Καθηγητής
Καθηγητής Αλέξιος-Λέανδρος Σκαλτσούνης-Πανεπιστήμιο ΕΚΠΑ- Μέλος συμβουλευτικής επιτροπής
Καθηγητής Λάζαρος Χατζηαράπογλου-Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων- Μέλος συμβουλευτικής επιτροπής
Καθηγήτρια Μαρία Σακαρέλλου-Δαϊτσιώτου-Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων- Μέλος εξεταστικής επιτροπής
Αναπληρωτής Καθηγητής Εμμανουήλ Μικρός-Πανεπιστήμιο ΕΚΠΑ- Μέλος εξεταστικής επιτροπής
Επίκουρος Καθηγητής Παναγιώτης Θεοδωρόπουλος-Πανεπιστήμιο Κρήτης- Μέλος εξεταστικής επιτροπής
Επίκουρος Καθηγήτρια Ευγενία Πάνου-Πομώνη-Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων- Μέλος εξεταστικής επιτροπής

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2007





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
45110 ΙΩΑΝΝΙΝΑ

Ιωάννινα, 17 Οκτωβρίου 2007

Καθηγητής Βασίλειος ΤΣΙΚΑΡΗΣ
E-mail: btsikari@cc.uoi.gr
Τηλ.: +2651098383 FAX: +2651098789

Προς
το Τμήμα Χημείας
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Θέμα: «Απονομή Διδακτορικού Διπλώματος
στον κ. Σεραφείμ Παπά»

Η επταμελής εξεταστική επιτροπή που ορίστηκε για την κρίση της Διδακτορικής Διατριβής του κ. **Σεραφείμ Παπά**, Χημικού, συνήλθε σε δημόσια συνεδρίαση στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων στις 17 Οκτωβρίου 2007, όπου παρακολούθησε την υποστήριξη της διατριβής με τίτλο: «Συμβολή στην ανάπτυξη νέων συνθετικών υβριδικών μορίων της ταξόλης με αντικαρκινική δράση».

Η επιτροπή έκρινε ομόφωνα ότι η διατριβή είναι πρωτότυπη και αποτελεί ουσιαστική συμβολή στην πρόοδο της Επιστήμης. Κατόπιν αυτού η Επιτροπή αποφάσισε να απονεμίσει στον κ. **Σεραφείμ Παπά** το Διδακτορικό Δίπλωμα Χημείας με βαθμό: *ΑΡΙΣΤΑ*

ΤΑ ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

1. Βασίλειος Τσίκαρης Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων, Επιβλέπων Καθηγητής
[Signature]
2. Λάζαρος Χατζηαράπογλου, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων, μέλος της Συμβουλευτικής επιτροπής
[Signature]
3. Μαρία Σακαρέλλου-Δαϊτσιώτου, Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων
[Signature]
4. Αλέξιος-Λεάνδρος Σκαλτσούνης Καθηγητής Φαρμακευτικού Τμήματος, Παν/μίου ΕΚΠΑ
[Signature]
5. Εμμανουήλ Μικρός, Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακευτικού Τμήματος, Παν/μίου ΕΚΠΑ
[Signature]
6. Παναγιώτης Θεοδώροπουλος Επίκουρος Καθηγητής, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Κρήτης
[Signature]
7. Ευγενία Πάνου-Πομώνη, Επίκουρος Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων
[Signature]



Στους γονείς μου Λάμπρο και Σοφία.

Στο Δάσκαλο...



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Χημείας Πεπτιδίων του Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Το θέμα της εργασίας αυτής μου το ανέθεσε ο Καθηγητής κ. Βασίλειος Τσίκαρης, τον οποίο ευχαριστώ ιδιαίτερα για την άμεση επίβλεψη του, την καθοδήγηση του, τις σημαντικότερες συμβουλές του. Η συμβολή του τόσο στη διεξαγωγή των πειραμάτων, όσο στη συγγραφή της παρούσας διατριβής ήταν για μένα πολύτιμη. Για μένα δεν ήταν απλά ο επιβλέπων καθηγητής, αλλά ο δάσκαλός μου.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή κ. Λάζαρο Χατζηαράπογλου, για την πολύτιμη συμβολή του στη διεξαγωγή των πειραμάτων και το ενδιαφέρον που έδειξε.

Επίσης ευχαριστώ τον καθηγητή κ. Λέανδρο Σκαλτσούνη και την κ. Καίτη Σωτηριάδου, μέλη της τριμελούς επιτροπής, για την πολύτιμη βοήθειά τους στην ολοκλήρωση αυτής της διατριβής.

Επιπλέον, ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Παναγιώτη Θεοδωρόπουλο και τη συνάδελφο Τόνια Ακουμιανάκη, για την διεξαγωγή των βιολογικών πειραμάτων.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Σακαρέλλο, την Καθηγήτρια κ. Μαρία Σακαρέλλου-Δαϊτσιώτου και την Επίκουρο Καθηγήτρια κ. Ευγενία Πάνου-Πομόνη για το ενδιαφέρον τους και τις συμβουλές τους κατά την εκπόνηση της εργασίας μου.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συνάδελφους μου Παναγιώτη Σταθόπουλο, Κωνσταντίνο Στρογγύλη, Ruxandra-Maria Stanica, Βιτουλαδίτη Κατερίνα, Μούση Βασίλη, Αθηνά Γκεσούλη, και Κωνσταντίνα Ρούφου για τη συνεχή ηθική υποστήριξη, την πολύτιμη βοήθεια τους και τις ανεκτίμητες συμβουλές τους κατά τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου διατριβής.



Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στους φίλους μου Τσικερδή Δημήτρη, Μούρτζη Νίκο, Κωστάκη Ευσταθιάδη, Χατζηστεργίο Κώστα και Δημήτριο Μαρκούζη για την ηθική και ψυχολογική στήριξη.

Ευχαριστώ επίσης τους συναδέλφους μου Χρήστο Παπαδόπουλο, Δήμητρα Δημητσούδη, Κωνσταντίνο Χαριλόγη, Βασιλική Κολόκα, Σαράντο Κωστίδη, Δημήτριο Κρικοριάν, Στέλλα Ζευγίτη, Θεόδωρο Σκάρλα για την ευχάριστη συνεργασία τους.

Τέλος, ευχαριστίες εκφράζονται στην κ. Ελένη Ντάφλου, γραμματέα του Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας, για την συμπαράσταση και την βοήθεια που μου παρείχε.

Ευχαριστίες εκφράζονται στην Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας και στην Ευρωπαϊκή Ένωση για την χρηματοδότηση του έργου στο πλαίσιο του προγράμματος ΠΕΝΕΔ 01ΕΔ376.

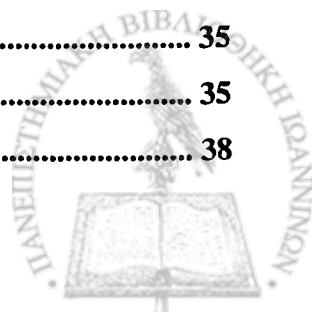
Παπάς Σεραφείμ

Ιωάννινα 2007



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

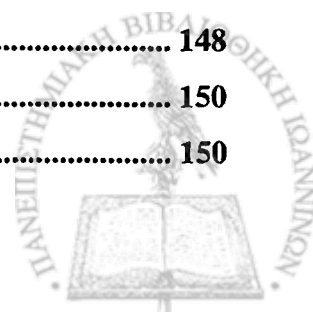
ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	1
ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ	3
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	3
1. Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ	4
1.1. Γενικά	4
1.2. Παράγοντες καρκινογένεσης.....	6
1.3. Τύποι καρκίνου	7
1.4. Θεραπευτικές προσεγγίσεις του καρκίνου.....	8
2. Η ΤΑΞΟΛΗ ΩΣ ΦΑΡΜΑΚΟ	12
3. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΤΑΞΟΛΗΣ.....	14
4. ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΧΡΗΣΗΣ ΤΗΣ ΤΑΞΟΛΗΣ.....	18
4.1. Αντοχή των καρκινικών κυττάρων στην ταξόλη- (MDR)	18
4.2. Τοξικότητα και παρενέργειες	19
4.3. Προβλήματα προμήθειας της ταξόλης.....	19
5. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΤΑΞΟΛΗΣ	21
5.1. Ολική σύνθεση	21
5.2. Βιοσύνθεση-Κυτταροκαλλιέργεια	25
5.3. Η παραγωγή από μύκητες.....	27
5.4. Απομόνωση από βελόνες και φύλλα δέντρων της 10-δεακέτυλομπακατίνης- Μερική σύνθεση της ταξόλης.....	27
6. ΣΧΕΣΗ ΔΟΜΗΣ-ΔΡΑΣΗΣ.....	29
6.1. Η παράπλευρη αλυσίδα	30
6.2. Το βόρειο ημισφαίριο	30
6.3. Το νότιο ημισφαίριο	31
7. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ-ΠΡΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΤΑΞΟΛΗΣ.....	32
7.1. Η χρήση αμινοξέων.....	33
7.2. Μόρια-μεταφορείς στο εσωτερικό των κυττάρων.....	33
7.3. Μόρια που αναγνωρίζονται από υποδοχείς που υπερ-εκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα	34
7.3.1. Στόχευση του υποδοχέα του φολικού οξέος.....	34
7.3.2. Στόχευση του υποδοχέα των ιντεργκρινών	35
7.4. Μακρομόρια με πολλαπλά αντίγραφα ταξόλης.....	35
8. ΣΥΝΘΕΤΙΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ	38



8.1. Φορές πολλαπλών αντιγονικών πεπτιδίων (MAPs)	38
8.2. Το μοντέλο TASP	39
8.3. Επαναλαμβανόμενοι ολιγοπεπτιδικοί φορείς.....	40
9. ΠΕΠΤΙΔΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ	43
9.1. Εισαγωγή	43
9.2. Χαρακτηριστικά του πεπτιδικού δεσμού.....	45
9.3. Στάδια πεπτιδικής σύνθεσης.....	46
9.4. Σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση.....	47
9.4.1. Το στερεό πολυμερές.....	50
9.4.2. Προστασία και αποπροστασία α-αμινομάδας.....	52
9.4.3. Προστασία των παράπλευρων δραστικών ομάδων των αμινοξέων	54
9.4.4. Αντιδραστήρια σύζευξης.....	56
9.4.4.1. Καρβοδυμίδια	56
9.4.4.2. Τα φωσφονικά και ουρονικά παράγωγα	59
9.5. Αποκοπή πεπτιδίου από τη ρητίνη	60
9.6. Προβλήματα κατά την διάρκεια επιμήκυνσης της πεπτιδικής αλυσίδας	62
9.6.1. Σχηματισμός ασπαρτιμιδίου	62
9.6.2. Σχηματισμός πυρογλουταμινικού οξέος.....	64
10. Ο ΘΕΙΟΑΙΘΕΡΙΚΟΣ ΔΕΣΜΟΣ.....	66
10.1. Εισαγωγή	66
10.2. Πλεονεκτήματα των θειοαιθερικών δεσμών έναντι των δισουλφιδικών.....	66
10.3. Εκλεκτική εισαγωγή της αλογονοακετυλομάδας	67
10.4. Μελέτη δραστηριότητας των αλογονοακετυλιωμένων παραγώγων	70
10.5. Σχηματισμός θειοαιθερικού δεσμού.....	70
10.6. Επίδραση του pH	71
10.7. Παράπλευρες αντιδράσεις κατά τη δημιουργία θειοαιθερικού δεσμού	71
ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ	73
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	73
11. ΣΥΝΘΕΣΗ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΠΤΙΔΙΩΝ.....	74
11.1. Αντιδραστήρια	74
11.2. Μεθοδολογία σύνθεσης	76
11.3. Τεχνικές καθαρισμού και ταυτοποίησης	79
11.4. Πειραματική πορεία σύνθεσης, καθαρισμού και ταυτοποίησης	80
11.4.1. Ac-(Lys-Aib-Gly) ₄ -NH ₂	80
11.4.2. Ac-(Glu-Aib-Gly) ₄ -NH ₂	83



11.4.3. Ac-Asi-Arg-NH ₂	85
11.4.4. Ac-Cys-Arg-Gly-Asp-Arg-NH ₂	88
11.4.5. Folyl-Cys-Arg-Gly-Asp-Ser-NH ₂	92
11.4.6. Ac-[Lys(Cys)-Aib-Gly] ₄ -OH	95
11.4.7. Ac-(Lys-Aib-Cys) _n -OH	98
11.4.8. Ac-(Lys-Aib-Cys) _n -NH ₂	103
11.4.9. Ac-Cys-(Arg-Aib-Cys) ₃ -NH ₂	110
12. ΣΥΝΘΕΣΗ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΑΞΟΛΗΣ ΚΑΙ 10-ΔΕΑΚΕΤΥΛΟΜΠΑΚΑΤΙΝΗΣ	113
12.1. Αντιδραστήρια	113
12.2. Πειραματική πορεία σύνθεσης, καθαρισμού και ταυτοποίησης	115
12.2.1. Σύνθεση της χλωροακέτυλο-C2'-ταξόλης	115
12.2.2. Σύνθεση της βρωμοακέτυλο-C2'-ταξόλης.....	116
12.2.3. Σύνθεση της ιωδοακέτυλο-C2'-ταξόλης.....	120
12.2.4. Σύνθεση της TBS-C2'-ταξόλης.....	121
12.2.5. Σύνθεση της σουκινυλο-C2'-ταξόλης.....	123
12.2.6. Σύνθεση της 10-χλωροακέτυλο-μπακατίνης	124
13. ΣΥΝΘΕΣΗ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΑΞΟΛΗΣ ΚΑΙ 10-ΔΕΑΚΕΤΥΛΟΜΠΑΚΑΤΙΝΗΣ ΟΜΟΙΟΠΟΙΗΤΑ ΠΡΟΣΔΕΔΕΜΕΝΩΝ ΣΕ ΠΕΠΤΙΔΙΑ	126
13.1. Σύνθεση του φορέα Ac-(Glu-Aib-Gly) ₄ -NH ₂ με ταξόλη.....	126
13.2. Σύνθεση του Ac-Asi-Arg-NH ₂ με ταξόλη	127
13.3. Σύνθεση του παραγώγου Ac-Cys(CH ₂ -CO-C2'taxol)-Arg-Gly-Asp-Arg-NH ₂	128
13.4. Σύνθεση του φορέα Ac-[Lys(Cys)-Aib-Gly] ₄ OH με χλωροακέτυλο-C2'-ταξόλη..	133
13.5. Σύνθεση του παραγώγου Ac-[Lys-Aib-Cys(CH ₂ -CO-C2'taxol)] ₂ -OH	134
13.6. Σύνθεση παραγώγου Ac-[Lys-Aib-Cys(CH ₂ -CO- C2'taxol)] ₄ -OH.....	136
13.7. Σύνθεση του παραγώγου Ac-[Lys-Aib-Cys(CH ₂ CO-C2'taxol)] ₂ -NH ₂	137
13.8. Σύνθεση του παραγώγου Ac-[Lys-Aib-Cys(CH ₂ CO-C2'taxol)] ₃ -NH ₂	139
13.9. Σύνθεση του παραγώγου Ac-[Lys-Aib-Cys(CH ₂ CO-C2'taxol)] ₃ -NH ₂	141
13.10. Σύνθεση του παραγώγου Ac-Cys(CH ₂ CO-C2'taxol)- [Arg-Aib-Cys(CH ₂ CO-C2'taxol)] ₃ -NH ₂	143
13.11. Σύνθεση του παραγώγου Folyl-Cys(CH ₂ CO-C2'taxol)- RGDS -NH ₂	145
13.12. Σύνθεση του παραγώγου Ac-Cys(CH ₂ CO-C10-baccatin)-RGDS-NH ₂	146
13.13. Σύνθεση του παραγώγου Tat-Cys(CH ₂ CO-C2'taxol) -NH ₂	148
14. ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ	150
14.1. Κυτταρικές σειρές	150



14.2. Κατεργασία κυττάρων.....	150
14.3. Αποτίμηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων	151
14.4. Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου.....	151
15. ΑΠΟΤΑΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	155
16. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	160
17. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	163
.....SUMMARY	168
18. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	171
19. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	191



ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η ταξόλη, ένας αντι-μιτωτικός παράγοντας που έχει απομονωθεί από το φλοιό του δέντρου *Taxus Brevifolia*, έχει δείξει σημαντική δράση έναντι διαφόρων μορφών καρκίνου όπως του μαστού, των ωοθηκών, των πνευμόνων κ.α. Η δράση της συνίσταται στην ειδική σύνδεσή της με τη β -τουμπουλίνη, μια δομική πρωτεΐνη των μικροσωληνίσκων (σταθερά σύνδεσης $10^{-6} - 10^{-7}M$). Οι μικροσωληνίσκοι είναι κυτταροσκελετικά στοιχεία που αποτελούνται από έναν "σκελετό" (core) α/β -τουμπουλίνης (μοριακό βάρος του διμερούς 110.000) και ένα περίβλημα που περιέχει μοριακούς κινητήρες (motor proteins) και σταθεροποιητικούς ή ρυθμιστικούς παράγοντες (microtubule-associated proteins-MAPs, πρωτεϊνικές κινάσες). Η ταξόλη προκαλεί ένα παρατεταμένο μιτωτικό block που ακινητοποιεί τα περισσότερα κύτταρα ανάμεσα στη μετάφαση και στην ανάφαση. Σε μικρές δόσεις καταστέλλει τη δυναμική των μικροσωληνίσκων (δηλαδή την ταχύτητα αύξησης ή συρρίκνωσης καθώς και το ρυθμό μετάβασης από μια φάση αύξησης σε μια φάση συρρίκνωσης) χωρίς να επηρεάζει τον βαθμό πολυμερισμού (συνολική μάζα πολυμερούς που σχηματίζεται τελικά σε δεδομένη συγκέντρωση α/β -τουμπουλίνης). Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις η ταξόλη προάγει τον πολυμερισμό, με συνέπεια την αύξηση της μάζας των μικροσωληνίσκων. Οι μικροσωληνίσκοι που έχουν σταθεροποιηθεί με ταξόλη είναι άκαμπτοι και δεν αποπολυμερίζονται όπως οι φυσιολογικοί, προκαλώντας το θάνατο του καρκινικού κυττάρου.

Παρά την ευρύτατη αντικαρκινική της δράση, η ταξόλη παρουσιάζει το μειονέκτημα της χαμηλής υδατοδιαλυτότητας, γεγονός που δυσκολεύει τη χρήση της με διάφορες φαρμακευτικές μορφές.

Στην εργασία αυτή και με στόχο να βελτιώσουμε την υδατοδιαλυτότητα και την ανασταλτική δράση της ταξόλης σχεδιάσαμε και συνθέσαμε σειρά πεπτιδικών παραγώγων της.

Έτσι, για την αύξηση της υδατοδιαλυτότητας των παραγώγων, σχεδιάστηκαν πεπτίδια που στηρίχθηκαν στην παρουσία φορτίων στις παράπλευρες αλυσίδες των αμινοξέων, ενώ για την αύξηση της αντικαρκινικής δράσης ακολουθήθηκαν δυο προσεγγίσεις:

- Η ενσωμάτωση πεπτιδικών αλληλουχιών (-RGD-) ή μορίων (φολικό) που αναγνωρίζονται από υπερ-εκφρασμένους υποδοχείς στις μεμβράνες των καρκινικών κυττάρων και



- Η χρήση φορέων πολλαπλών μορίων ταξόλης για τη δημιουργία μορίων που θα συμβάλλουν στην αυξημένη τοπική συγκέντρωσή της.

Για τις ανάγκες πρόσδεσης στα πεπτιδικά ανάλογα, η ταξόλη τροποποιήθηκε στη θέση 2', στην οποία εισήχθη μια αλογονοακέτυλο ομάδα.

Τα πεπτιδικά παράγωγα της ταξόλης που συντέθηκαν και μελετήθηκαν στο πλαίσιο της διατριβής αυτής είναι:



ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



1. Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ

1.1. Γενικά

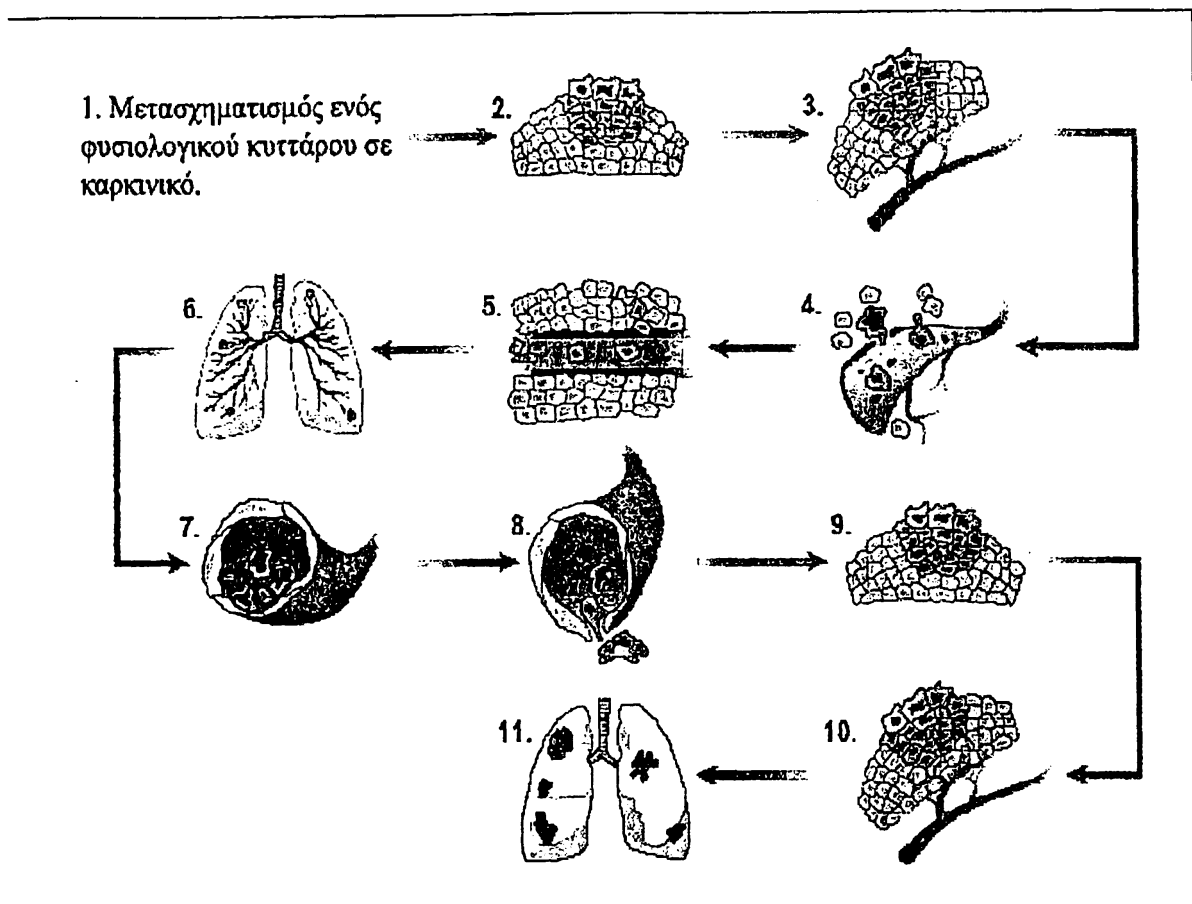
Όλα τα όργανα του σώματος αποτελούνται από κύτταρα, τα οποία διαιρούνται για να διαμορφώσουν νέα όταν το σώμα τα χρειάζεται. Ο καρκίνος είναι ομάδα ασθενειών που χαρακτηρίζονται είτε από ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό είτε από την αποτυχία των κυττάρων να πεθάνουν κανονικά. Μπορεί να εμφανιστεί σε οποιοδήποτε όργανο του σώματος, αναπτύσσεται όταν τα κύτταρα λειτουργούν ανώμαλα και συνεχίζει να διαιρεί και να παράγει νέα κύτταρα χωρίς οποιοδήποτε έλεγχο ή εντολή.

Πολύ συχνά, οι έλεγχοι που ρυθμίζουν τις κυτταρικές διαιρέσεις καταστρέφονται και έτσι ένα κύτταρο αρχίζει να αυξάνεται και να διαιρείται, παρόλο που το όργανο δεν έχει ανάγκη για περισσότερα κύτταρα του συγκεκριμένου τύπου. Όταν οι απόγονοι του κυττάρου αυτού κληρονομήσουν την τάση να μην υπακούουν στις εντολές ρύθμισης της κυτταρικής διαίρεσης, τότε τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται συνεχώς.

Η μάζα των ανεπιθύμητων αυτών κυττάρων ονομάζεται **όγκος**. Οι όγκοι μπορούν να είναι καλοήθεις, μη απειλητικοί για τη ζωή ή κακοήθεις, καρκινικοί. Τα κύτταρα στους κακοήθεις όγκους μπορούν να εισβάλουν και να βλάψουν τους παρακείμενους ιστούς και τα όργανα, με συνέπεια την καταστροφή τους. Εάν η δράση του καρκίνου σταματούσε εδώ, τότε θα ήταν εύκολο, είτε με χειρουργικό τρόπο είτε με ακτινοβολία, να αντιμετωπιστεί αποτελεσματικά.

Δυστυχώς, καρκινικά κύτταρα συχνά αποκολλώνται από τον κακοήγη όγκο και ταξιδεύουν μέσω της κυκλοφορίας του αίματος για να διαμορφώσουν νέους όγκους σε άλλα μέρη του σώματος. Αυτή η διάδοση του καρκίνου, που είναι υπεύθυνη για το μεγαλύτερο μέρος της θνησιμότητας, καλείται **μετάσταση** (σχήμα 1.1).





Σχήμα 1.1: Ένα κύτταρο μετασχηματίζεται (1). Το καρκινικό κύτταρο πολλαπλασιάζεται και συσσωρεύεται μέχρι τον σχηματισμό ενός κακοήθους όγκου (2). Αγγειογένεση: ο όγκος αποκτά έναν ανεφοδιασμό αίματος (3), ο οποίος επιτρέπει την πρόσβαση καρκινικών κυττάρων στο κυκλοφοριακό σύστημα (4). Καρκινικά κύτταρα ταξιδεύουν μέσω του αίματος (5). Σταματούν σε τριχοειδή αγγεία (6), και εμμένουν στο στρώμα των αγγείων (7). Τα κύτταρα εισβάλλουν στον λειτουργικό ιστό του οργάνου που περιβάλλει το αγγείο (8). Σε αυτό το νέο όργανο, τα καρκινικά κύτταρα συσσωρεύονται μέχρι το σχηματισμό δευτεροβάθμιων όγκων (9), οι οποίοι προκαλούν αγγειογένεση (10). Οι μεταστάσεις (δευτεροβάθμιοι όγκοι) είναι τώρα εμφανείς (11).

Η δημιουργία του καρκίνου, η καρκινογένεση, συσχετίζεται με τη μετάλλαξη, μια αλλαγή στην ακολουθία του DNA (δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ) [1]. Ο καρκίνος δημιουργείται από καρκινογόνες ουσίες, οι οποίες βλάπτουν το DNA, το μόριο που αποθηκεύει τις γενετικές πληροφορίες στα κύτταρα. Αν και μερικές γενετικές μεταλλάξεις είναι αβλαβείς στα κύτταρα, άλλες τα σκοτώνουν. Όταν οι καρκινογόνες ουσίες προκαλούν μεταλλάξεις στα γονίδια που ελέγχουν την αύξηση κυττάρων, μπορούν να προκαλέσουν τον καρκίνο. Για τη δημιουργία του καρκίνου έχουν πολύ μεγάλη σημασία δύο ομάδες γονιδίων:

- α) τα ογκογονίδια, τα οποία παρακάμπτουν τα σημεία ελέγχου της κυτταρικής διαίρεσης, προκαλώντας ανεξέλεγκτη κυτταρική αύξηση, και
- β) τα ογκο-κατασταλτικά γονίδια, τα οποία παρεμποδίζουν την ανεξέλεγκτη δράση των ογκογονιδίων.

Όταν οι καρκινογόνες ουσίες προκαλούν τις μεταλλάξεις, που ενεργοποιούν ένα ή περισσότερα ογκογονίδια ή απενεργοποιούν ένα ή περισσότερα ογκο-κατασταλτικά γονίδια, ο καρκίνος αρχίζει. Η ταχύτητα της καταβολής του σώματος από τον καρκίνο εξαρτάται από τη δύναμη της καρκινογόνου ουσίας, το χρόνο της έκθεσης σε αυτή και τη δυνατότητα του οργανισμού του ατόμου να «επισκευάσει» το χαλασμένο DNA [2].

1.2. Παράγοντες καρκινογένεσης

Πολλοί φυσικοί και τεχνητοί παράγοντες ενεργοποιούν ή ευνοούν την ανάπτυξη του καρκίνου. Οι παράγοντες αυτοί ονομάζονται **καρκινογόνα** και είναι κυρίως διάφορα χημικά προϊόντα ή διάφοροι τύποι ακτινοβολιών που προκαλούν αλλαγές στο DNA ή μεταβάλλουν τη δράση των βιολογικών μορίων και τις τιμές των διαφόρων βιολογικών διεργασιών. Καρκινογόνο δράση έχουν επίσης και αρκετοί ιοί.

• Χημικά

Τα χημικά καρκινογόνα που προκαλούν άμεση καρκινογένεση είναι διάφοροι αλκυλιωτικοί παράγοντες. Οι πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες δεν είναι άμεσα καρκινογόνες ουσίες. Εντούτοις, τα παράγωγα των ουσιών αυτών που προκύπτουν από διάφορες βιολογικές διεργασίες έχουν την ικανότητα να επάγουν την καρκινογένεση.

Τα χημικά καρκινογόνα έχουν διαφορετική δομή αλλά μια κοινή ιδιότητα: είναι ηλεκτρονιόφιλα. Η αντίδραση των ηλεκτρονιόφιλων ουσιών με το DNA είναι το πρωταρχικό καρκινογενές γεγονός και οι αλλαγές του DNA θα μεταβάλουν τελικά ένα πρωτο-ογκογονίδιο σε ογκογονίδιο.

Το κάπνισμα, που είναι η πιο συχνή αιτία καρκίνου, υπολογίζεται ότι προκαλεί το 1/3 των περιπτώσεων καρκίνου στις Η.Π.Α. Επίσης ένας σημαντικός αριθμός τροφών περιέχουν ουσίες που μπορεί να προκαλέσουν καρκίνο.



- **Ακτινοβολίες**

Οι κυριότερες πηγές ακτινοβολίας που μπορούν να προκαλέσουν καρκίνο είναι οι ακτίνες Χ, η υπεριώδης ακτινοβολία, το ραδόνιο και ορισμένα ισότοπα, όπως το ουράνιο-235. Η υπεριώδης ακτινοβολία απορροφάται άμεσα από το DNA. Καρκινογόνες ιδιότητες έχει και η ιονίζουσα ακτινοβολία, καθώς προάγει το σχηματισμό χημικά ενεργών ομάδων όταν απορροφηθεί από μόρια που περιβάλλουν το DNA. Η πιο κοινή φυσική πηγή καρκινογόνου ακτινοβολίας είναι η ηλιακή ακτινοβολία. Παρατεταμένη έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία μπορεί να προκαλέσει καρκίνο του δέρματος, περιλαμβανομένου και του μελανώματος, που είναι από τους πλέον μεταστατικούς τύπους καρκίνου.

- **Ιοί**

Αν και εμπλέκονται ως πιθανή αιτία, οι ιοί συνήθως δεν προκαλούν από μόνοι τους καρκίνο. Θεωρούνται ότι συμβάλλουν σε ένα αρχικό στάδιο της διαδικασίας οδηγώντας στον καρκίνο, ο οποίος αναπτύσσεται μόνο μετά από την έκθεση σε έναν ή περισσότερους παράγοντες.

1.3. Τύποι καρκίνου

Υπάρχουν διάφοροι τύποι καρκίνου, οι οποίοι μπορούν να διαιρεθούν σε έξι σημαντικές κατηγορίες:

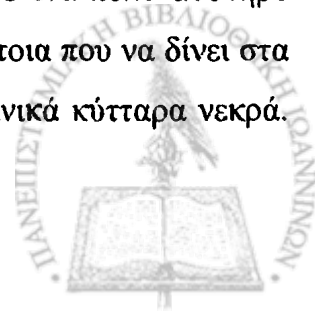
- Τα καρκινώματα, το πιο κοινό είδος καρκίνου, (περίπου το 85% των καρκίνων είναι καρκινώματα) δημιουργούνται στους ιστούς που καλύπτουν μια επιφάνεια ή μια κοιλότητα του σώματος.
- Τα σαρκώματα αρχίζουν από τον ιστό που συνδέει, υποστηρίζει ή περιβάλλει άλλους ιστούς και όργανα όπως μυς, κόκαλα και το λιπώδη ιστό (6% των καρκίνων).
- Τα λεμφώματα και οι λευχαιμίες είναι καρκίνοι που εμφανίζονται στους ιστούς, όπου τα λευκά κύτταρα του αίματος (που αντιπαλεύουν τις μολύνσεις στον οργανισμό) διαμορφώνονται, δηλαδή στο μυελό των οστών και το λεμφικό σύστημα (5%).
- Οι όγκοι εγκεφάλου, καρκίνοι που εμφανίζονται στον εγκέφαλο, οι καρκίνοι δέρματος, συμπεριλαμβανομένων των επικίνδυνων μελανωμάτων και άλλες σπάνιες μορφές καρκίνου αποτελούν το υπόλοιπο 4% των καρκίνων.



1.4. Θεραπευτικές προσεγγίσεις του καρκίνου

- Η χειρουργική επέμβαση είναι η παλαιότερη και παραμένει ακόμα η πιο κοινή θεραπεία για τον καρκίνο. Επειδή η χειρουργική επέμβαση είναι μια τοπική θεραπεία έχει επιπτώσεις μόνο στα κύτταρα της περιοχής.
- Η θεραπεία ορμονών χρησιμοποιείται για να εμποδίσει τα καρκινικά κύτταρα να προσλάβουν τις ορμόνες που χρειάζονται για να αναπτυχθούν. Χρησιμοποιείται συχνά ως συνέχιση της χειρουργικής επέμβασης.
- Η χρήση ακτινοβολίας είναι συνήθως απαραίτητη σε κάποια φάση της θεραπείας για περισσότερες από τις μισές περιπτώσεις καρκίνου. Η ακτινοβολία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ακόμη και για να συρρικνώσει έναν όγκο πριν από τη χειρουργική επέμβαση, αλλά συχνά χρησιμοποιείται και μετά από αυτήν. Οι υψηλής ενέργειας ακτίνες Χ χρησιμοποιούνται για να καταστρέψουν τα καρκινικά κύτταρα και να εμποδίσουν την ανάπτυξη και διάδοσή τους.
- Η χημειοθεραπεία είναι η χρήση φαρμάκων για την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων. Αντίθετα από τη θεραπεία χειρουργικών επεμβάσεων και ακτινοβολίας, η χημειοθεραπεία επιδρά σε όλο το σώμα. Κατά τη μέθοδο αυτή μία ουσία ή ακόμη κι ένας συνδυασμός ουσιών μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως φάρμακα. Επίσης, χρησιμοποιείται συχνά μετά από τη χειρουργική επέμβαση προκειμένου να καταστρέψει οποιαδήποτε καρκινικά κύτταρα παραμένουν στο σώμα.

Η χημειοθεραπεία είναι ένα από τα αποτελεσματικότερα όπλα στην πάλη κατά του καρκίνου. Τα περισσότερα χημειοθεραπευτικά φάρμακα είναι κυτταροτοξικά, λειτουργούν δηλαδή σκοτώνοντας κύτταρα. Ένα ιδανικό φάρμακο, λοιπόν, θα ήταν αυτό που θα κατέστρεφε επιλεκτικά τα καρκινικά κύτταρα, χωρίς να βλάψει ή να καταστρέψει τα υγιή. Πώς μπορεί όμως ένα φάρμακο να διαχωρίζει τα καρκινικά από τα υγιή κύτταρα; Είναι γεγονός πως τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται στη χημειοθεραπεία βλάπτουν και τα υγιή και τα καρκινικά κύτταρα, δεδομένου ότι τα καρκινικά κύτταρα διαφοροποιούνται ελαφρώς μόνο από τα κανονικά κύτταρα: δεν έχουν οποιοδήποτε έλεγχο στην αύξηση και την αναπαραγωγή τους. Εκτός αυτού, η βιολογική συμπεριφορά και οι χημικές διαδικασίες τους είναι σχεδόν ίδιες. Ολόκληρη η ιδέα της χημειοθεραπείας στηρίζεται σε ένα πολύ αυστηρό κριτήριο. Το φάρμακο πρέπει να χορηγείται για μια χρονική περίοδο, τέτοια που να δίνει στα κανονικά κύτταρα μια πιθανότητα να ανακτηθούν, αφήνοντας τα καρκινικά κύτταρα νεκρά.



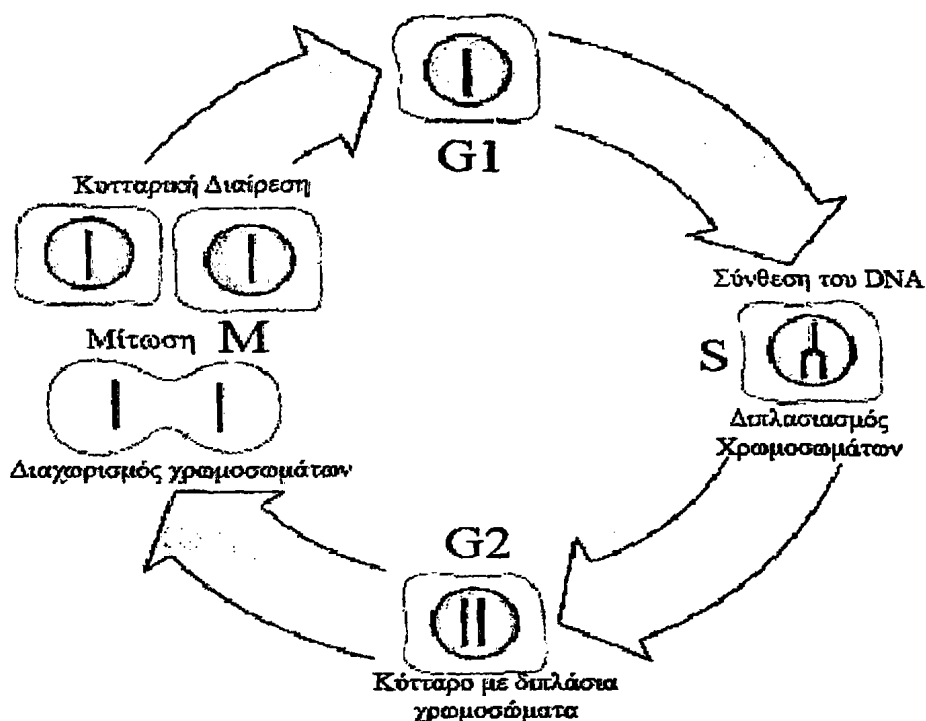
Το γεγονός πως πολλά καρκινικά κύτταρα καταστρέφονται ευκολότερα από τα υγιή, μπορεί να εξηγηθεί στις ατέλειες του μεταβολισμού του DNA, από τις οποίες προήλθε και η μετάλλαξη σε καρκινικά. Οι ατέλειες αυτές το καθιστούν ευάλωτο σε ορισμένους τύπους θεραπευτικών αγωγών.

Αν και η χημειοθεραπεία είναι ένα ισχυρό όπλο κατά του καρκίνου, τα φάρμακα αυτά, όπως έχει ειπωθεί, προκαλούν το θάνατο και των υγιών κυττάρων, όπως των κυττάρων στα έντερα, στα θυλάκια τρίχας, μεταξύ των κυττάρων του αίματος, στο μυελό των οστών, καθώς επίσης προκαλούν παρενέργειες όπως ναυτία, εμετό, τριχόπτωση, διάρροια και πτώση του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων.

Για τον σχεδιασμό ενός πιθανού αντικαρκινικού φαρμάκου καθοριστικό ρόλο διαδραματίζει η γνώση της διαδικασίας της κυτταρικής διαίρεσης (σχήμα 1.2). Ο κυτταρικός κύκλος των ευκαρυωτικών κυττάρων διαιρείται σε τέσσερα στάδια ή φάσεις. Η διαίρεση του πυρήνα, μια διεργασία γνωστή ως μίτωση και η διαίρεση του κυττάρου, γνωστή και ως κυτταροκίνηση συνιστούν την **M φάση** του κύκλου. Η περίοδος που παρεμβάλλεται ανάμεσα σε δύο φάσεις M αποκαλείται μεσόφαση και διαιρείται στις τρεις υπόλοιπες φάσεις του κύκλου. Την φάση **G1** που είναι το μεσοδιάστημα ανάμεσα στο τέλος της φάσης M και την αρχή της S. Τη φάση **S**, κατά την οποία το κύτταρο αντιγράφει το DNA του πυρήνα του και τη φάση **G2** που είναι το μεσοδιάστημα ανάμεσα στο τέλος της φάσης S και την αρχή της M. Από κοινού οι φάσεις G1 και G2 προσφέρουν επιπρόσθετο χρόνο στο κύτταρο για να αυξηθεί και να διπλασιάσει τα κυτταροπλασματικά οργανίδια του.

Για τους διάφορους τύπους καρκίνων, μπορούν να γίνουν προσεγγίσεις, έτσι ώστε τα φάρμακα να σχεδιαστούν με τρόπο που να στοχεύουν στην καταστροφή των καρκινικών κυττάρων σε κάθε μια από τις παραπάνω φάσεις.

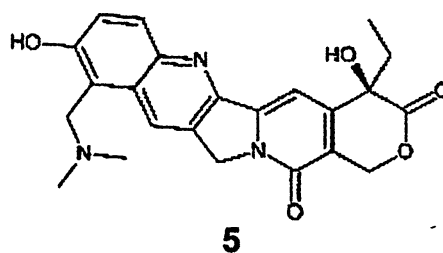
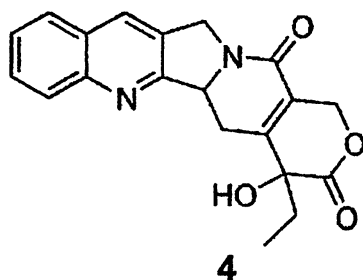
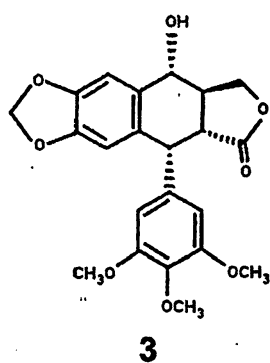
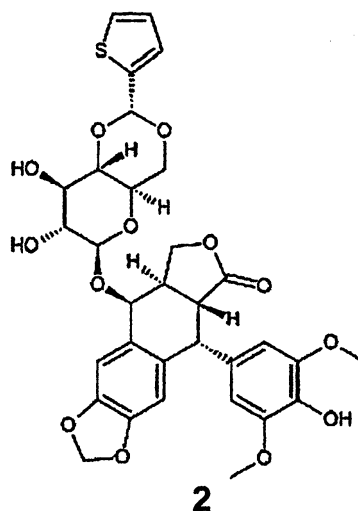
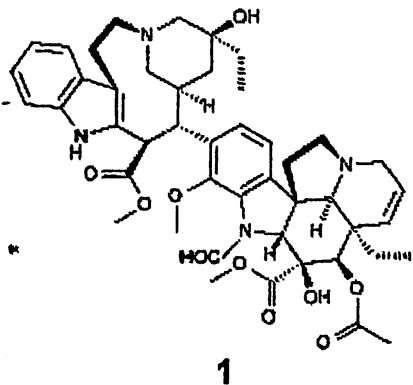




Σχήμα 1.2: Ο κυτταρικός κύκλος.

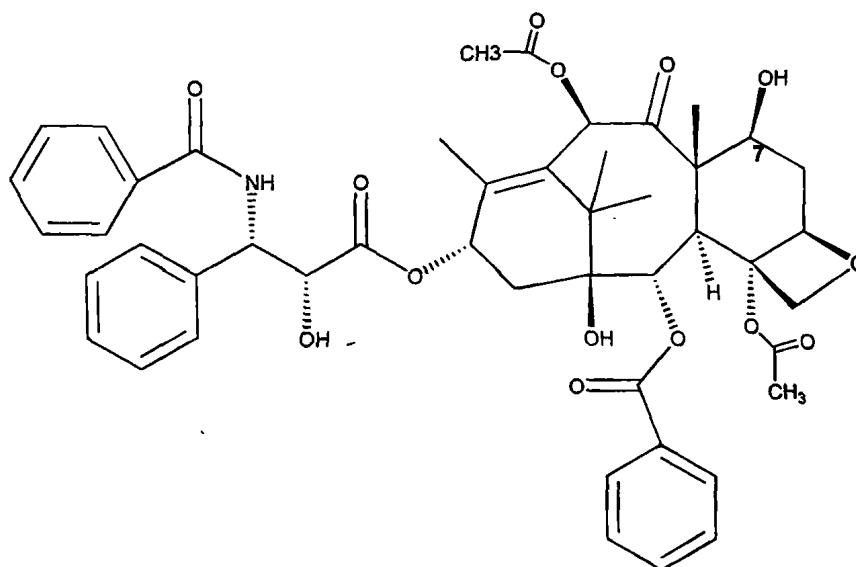
Αρκετά από τα φυτικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα δρουν ως αντιμιτωτικοί παράγοντες, εμποδίζουν δηλαδή την κυτταρική διαίρεση με την παρεμπόδιση του σχηματισμού των μικροσωληνίσκων, η σωστή λειτουργία των οποίων είναι κρίσιμη κατά την διάρκεια της μίτωσης. Η βινκριστίνη (Oncovin®, 1) απομονώθηκε από τη Vinca (*Catharanthus roseus*). Είναι ένας αντιμιτωτικός παράγοντας που χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλες ουσίες για την αντιμετώπιση αρκετών τύπων καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων της λευχαιμίας, του καρκίνου της ουροδόχου κύστης, του καρκίνου των όρχεων και των λεμφωμάτων όπως της ασθένειας Hodgkin's [3,4]. Το Teniposide (Vumon® 2), ένα χημικό ανάλογο του φυσικού προϊόντος ποδοφυλλοτοξίνη (podophyllotoxin 3), παρουσιάζει δράση έναντι της ασθένειας Hodgkin's και σε όγκους εγκεφάλου στους ενήλικους [5]. Το αλκαλοειδές camptothecin (4) απομονώθηκε αρχικά από το δέντρο *Camptotheca acuminata* και παρουσίασε καλή δραστηριότητα κατά των διάφορων καρκίνων στο εργαστήριο, αλλά η χαμηλή του διαλυτότητα αποτελεί τροχοπέδη για κλινική χρήση [6,7]. Ωστόσο, έχουν αναπτυχθεί πολλά υδατοδιαλυτά ανάλογα της camptothecin (π.χ. topotecan 5), τα οποία έχουν βρει σημαντική κλινική χρήση.





2. Η ΤΑΞΟΛΗ ΩΣ ΦΑΡΜΑΚΟ

Κατά την διάρκεια της δεκαετίας του εξήντα, το Αμερικανικό Εθνικό Αντικαρκινικό Ίδρυμά, ξεκίνησε να ερευνά φυτά τα οποία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στη χημειοθεραπεία του καρκίνου. Η διαδικασία ήταν αρκετά χρονοβόρα και πολλά εκχυλίσματα φυτών υποβλήθηκαν σε τυχαία διαλογή. Το 1963 επιβεβαιώνεται η κυτταροτοξική δράση εκχυλίσματος που λήφθηκε από το δέντρο *Taxus brevifolia* έναντι ΚΒ κυτταρικών σειρών (ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ρινοφάρυγγα), ενώ το 1966 επιβεβαιώνεται η δράση έναντι της λευχαιμίας σε ποντίκια. Το 1969 απομονώθηκε σε απόδοση 0,01% καθαρή ουσία από το φλοιό του δέντρου-τα φύλλα και ο κορμός περιείχαν πολύ λιγότερη ποσότητα- ενώ το 1971, οι Wall και Wani ανέφεραν τη δομή της (σχήμα 2.1). Η ένωση αυτή, η οποία παρουσίασε σημαντική κυτταροτοξική και αντιλευκαιμική δραστηριότητα ονομάστηκε ταξόλη [8].



Σχήμα 2.1: Το μόριο της ταξόλης.

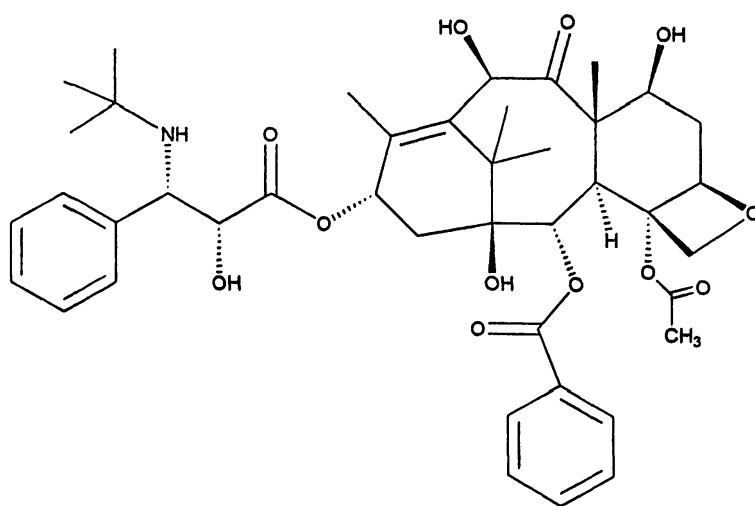
Τα προβλήματα με τη χαμηλή διαλυτότητα της στο νερό και τα χαμηλά αποθέματα της, καθυστέρησαν την διαδικασία εισαγωγής της ως φάρμακο. Παρ' όλα αυτά, συνεχίστηκαν να γίνονται μικρής κλίμακας δοκιμές σε «nude» ποντίκια, όπου η ταξόλη έδειξε σημαντική δραστηριότητα έναντι διαφόρων στερεών ανθρωπίνων όγκων. Τα «nude» ποντίκια είναι ποντίκια χωρίς έναν θύμο-αδένα, και ως εκ τούτου δεν απορρίπτουν τους ανθρώπινους όγκους. Στη βάση αυτών των δοκιμών το Αμερικανικό Εθνικό αντικαρκινικό Ίδρυμα αποφάσισε να επενδύσει στην πλήρη ανάπτυξη της ταξόλης ως αντικαρκινικό φάρμακο.



Στην ταχύτατη ανάπτυξη της ταξόλης ως αντικαρκινικού φαρμάκου συντέλεσε η ανακάλυψη του μοναδικού μηχανισμού δράσης της. Το 1978 αναφέρθηκε ότι δρα ως αντιμιμωτικό μέσο και το 1979 αναφέρθηκε ότι η δράση της συνίσταται στην προώθηση και σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων της τουμπουλίνης, οι οποίοι είναι απαραίτητοι για τη σωστή λειτουργία της μιτωτικής ατράκτου, για τη διατήρηση του σχήματος, της κινητικότητας και τη σταθεροποίηση του κυττάρου [9].

Οι κλινικές δοκιμές της ταξόλης έναντι μεγάλου αριθμού τύπων καρκίνου ξεκίνησαν το 1981. Το κύριο αντικείμενο της έρευνας στη φάση I των δοκιμών ήταν να εξεταστεί η αποτελεσματικότητα και η τοξικότητά της στον άνθρωπο. Τα διάφορα προβλήματα που οφείλονταν σε αλλεργικές αντιδράσεις (για τις οποίες δεν ευθύνεται η ταξόλη ως ουσία, αλλά το καστορέλαιο που χρησιμοποιείται ως διαλύτης) λύθηκαν με τη χορήγηση της δόσης σε εικοσιτετράωρη βάση. Η ταξόλη γρήγορα εισήλθε στη φάση II των κλινικών δοκιμών, κατά τη διάρκεια των οποίων ο Rowinsky και οι συνεργάτες του δημοσίευσαν την πρώτη εργασία για τη δράση της έναντι του καρκίνου των ωοθηκών σε προχωρημένο στάδιο [10].

Σήμερα η ταξόλη και το taxotere (σχήμα 2.2), το ημισυνθετικό της ανάλογο, χρησιμοποιούνται, ξεχωριστά ή με συνδυασμό φαρμάκων, για την αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού, των ωοθηκών και των πνευμόνων [11-14].



Σχήμα 2.2: Το taxotere.

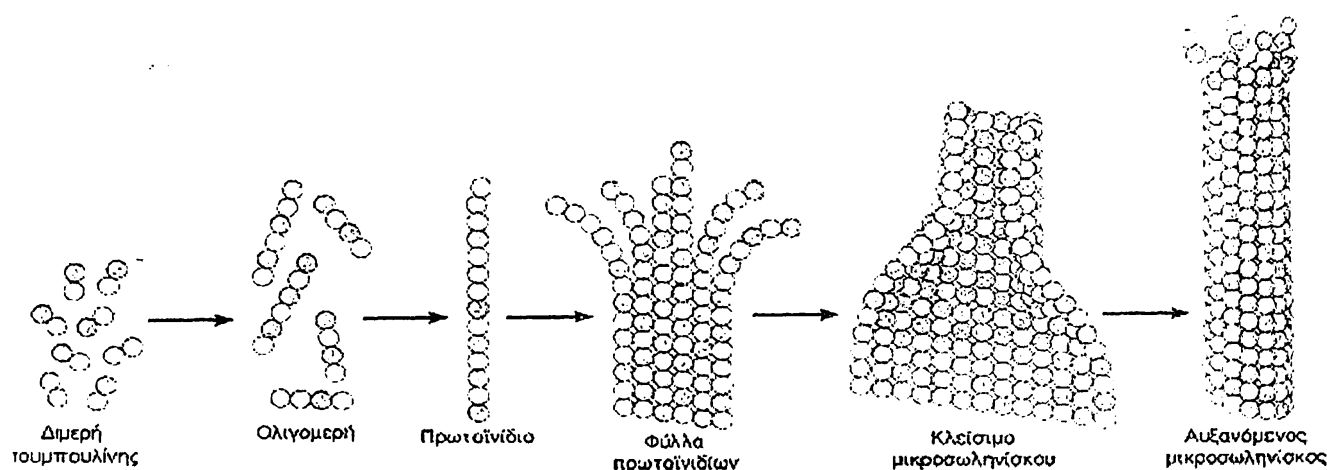
3. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΤΑΞΟΛΗΣ

Όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα έχουν ένα εσωτερικό σκελετό, τον κυτταροσκελετό, ο οποίος δίνει σε αυτά το ιδιαίτερο σχήμα τους. Ο κυτταροσκελετός επιτρέπει στα κύτταρα να μεταφέρουν κυστίδια, να πραγματοποιούν μεταβολές στο σχήμα τους και να μεταναστεύουν. Αυτή η δυναμική δομή είναι φτιαγμένη από τρία είδη ινιδιακών συγκροτημάτων: τα μικροϊνίδια, τα ενδιάμεσα ινίδια και τους μικροσωληνίσκους [15].

Οι μικροσωληνίσκοι έχουν πολλαπλούς δομικούς και συστατικούς ρόλους σε όλα σχεδόν τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Είναι μακριοί, κοίλοι κύλινδροι, που διαμορφώνονται από μόρια τουμπουλίνης. Με εξωτερική διάμετρο περίπου 300 Å, διαφοροποιούνται σαφώς από τα μικροϊνίδια (με διάμετρο 70 Å) και από τα ενδιάμεσα ινίδια (διαμέτρου 70 με 110 Å). Το άκαμπτο τοίχωμα ενός μικροσωληνίσκου είναι φτιαγμένο από μία ελικοειδή σειρά από πρωτοϊνίδια, που είναι γραμμικά πολυμερή μόρια τουμπουλίνης. Η τουμπουλίνη είναι μια ετεροδιμερή πρωτεΐνη που αποτελείται από δύο παρόμοιες, αλλά ευδιάκριτες πολυπεπτιδικές υπομονάδες, την α- και β- τουμπουλίνη, καθεμιά από αυτές συνδεδεμένη ειδικά με GTP. Και ενώ η σύνδεση του GTP με την α-υπομονάδα είναι σταθερή, η σύνδεση με τη β-υπομονάδα είναι αντιστρεπτή και μπορεί να υδρολυθεί σε GDP, ιδιότητα πολύ σημαντική για τη δυναμική των μικροσωληνίσκων.

Οι μικροσωληνίσκοι φτιάχνονται από τον αντιστρέψιμο πολυμερισμό των διμερών της τουμπουλίνης. Με τον πολυμερισμό των διμερών σχηματίζονται τα πρωτοϊνίδια που με την σειρά τους συνδέονται δίπλα-δίπλα σε φύλλα. Καθώς τα φύλλα μεγαλώνουν σε μέγεθος, συσσωρεύονται και τελικά κλείνουν για να σχηματίσουν ένα μικροσωληνίσκο, όταν ο αριθμός των πλευρικά ευθυγραμμισμένων ινιδίων φτάνει τα δεκατρία [16]. Μετά από τη διαδικασία αυτή, ο μικροσωληνίσκος επιμηκύνεται με την προσθήκη διμερών στις άκρες του σκελετού (σχήμα 3.1). Τέλος, η ινιδιακή δομή τους περιβάλλεται από ετερογενείς σταθεροποιητικούς ή ρυθμιστικούς παράγοντες (MAPs) που δίνουν βιολογικά ενεργούς μικροσωληνίσκους [17]. Οι μικροσωληνίσκοι έχουν μία ενδογενή λειτουργική πολικότητα που καθορίζει ποιο άκρο του μικροσωληνίσκου θα αναπτυχτεί πιο εύκολα με την προσθήκη υπομονάδων τουμπουλίνης. Το γρήγορα αναπτυσσόμενο άκρο είναι το “συν” (+) άκρο, στο οποίο βρίσκεται η β-τουμπουλίνη, και το άλλο είναι το “πλην” (-) άκρο [18].





Σχήμα 3.1: Σχηματισμός μικροσωληνίσκου.

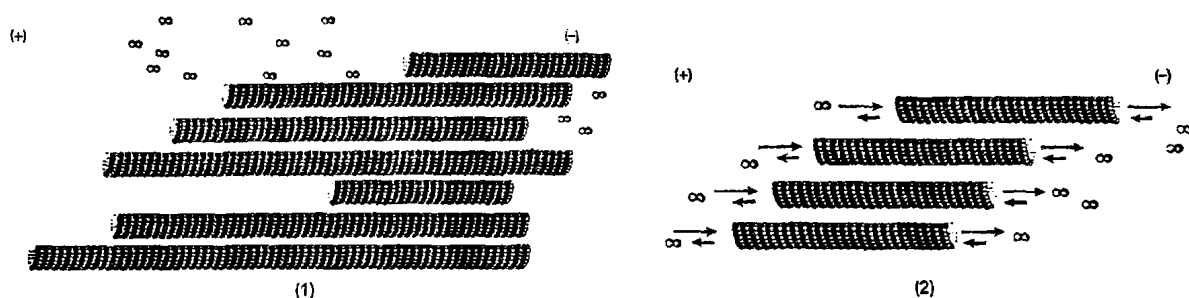
Οι βιολογικές λειτουργίες των μικροσωληνίσκων σε όλα τα κύτταρα καθορίζονται και ρυθμίζονται σε μεγάλο βαθμό από την δυναμική πολυμερισμού τους. Οι μικροσωληνίσκοι παρουσιάζουν δύο είδη δυναμικής συμπεριφοράς, τόσο σε *in vitro* συστήματα όσο και στα κύτταρα [19].

Ένα είδος δυναμικής συμπεριφοράς που είναι ιδιαίτερα προεξέχον στα κύτταρα, η αποκαλούμενη “δυναμική αστάθεια” είναι μια διαδικασία στην οποία ένα μεμονωμένο άκρο μικροσωληνίσκου μεταβάλλεται μεταξύ των φάσεων αύξησης και συρρίκνωσης (σχήμα 3.2) [20].

Η δεύτερη δυναμική συμπεριφορά είναι η κατάσταση εκείνη όπου το μήκος του μικροσωληνίσκου παραμένει σταθερό (treadmill) [21–24]. Στην περίπτωση αυτή, για κάθε μόριο τουμπουλίνης που προστίθεται στο ταχέως αναπτυσσόμενο άκρο (συν), ένα μόριο τουμπουλίνης απομακρύνεται από το βραδέως αναπτυσσόμενο άκρο (πλην) (σχήμα 3.2). Η διαδικασία αυτή δημιουργείται από την διαφορά στην κρίσιμη συγκέντρωση της τουμπουλίνης στα δύο αντίθετα άκρα του μικροσωληνίσκου, όπου κρίσιμη συγκέντρωση θεωρείται η συγκέντρωση ισορροπίας της ελεύθερης τουμπουλίνης με το άκρο του μικροσωληνίσκου.

Οι δυο αυτές δυναμικές συμπεριφορές είναι συμβατές μεταξύ τους και ένας συγκεκριμένος πληθυσμός μικροσωληνίσκων μπορεί να παρουσιάσει είτε κάποια από αυτές είτε συνδυασμό και των δύο. Οι μηχανισμοί που ελέγχουν αυτή τη διαδικασία δεν είναι πλήρως κατανοητοί, αλλά πιθανώς να εξαρτώνται από τον αριθμό των ισομορφών

τουμπουλίνης (6 για την α-τουμπουλίνη και 7 για την β-τουμπουλίνη) και ειδικά από τις ενέργειες των ρυθμιστικών πρωτεϊνών [25].



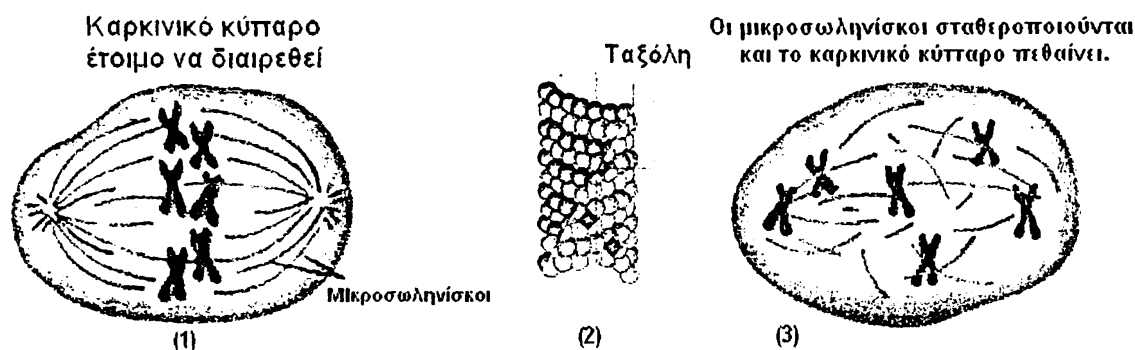
Σχήμα 3.2: Τα δύο είδη δυναμικής των μικροσωληνίσκων.

Υπό κανονικές συνθήκες, ο σχηματισμός και η αποσύνθεση των μικροσωληνίσκων είναι μια εντελώς αντιστρεπτή διαδικασία. Αυτό που κάνουν τα αντιμιτωτικά χημειοθεραπευτικά αντικαρκινικά φάρμακα είναι να μπλοκάρουν ένα συγκεκριμένο βήμα αυτής της διαδικασίας. Στη περίπτωση της ταξόλης βρέθηκε πως προάγει τον πολυμερισμό της τουμπουλίνης. Επηρεάζει την ισορροπία μικροσωληνίσκων-τουμπουλίνης και αμετάκλητα μετατρέπει τουμπουλίνη σε μικροσωληνίσκους [26,27].

Η ταξόλη δεσμεύεται πολύ πιο ισχυρά στους μικροσωληνίσκους παρά σε διμερή τουμπουλίνης. Το σημείο πρόσδεσής της εντοπίζεται στο εσωτερικό των μικροσωληνίσκων και συγκεκριμένα στη β-υπομονάδα της τουμπουλίνης [19]. Η εισχώρηση της ταξόλης στη δομή των μικροσωληνίσκων θεωρείται πως πραγματοποιείται είτε με διάχυση μέσω μικρών ανοιγμάτων στους μικροσωληνίσκους είτε εκμεταλλευόμενη τις διακυμάνσεις στο μήκος τους [28]. Η σύνδεση αυτή αυξάνει το μέγεθος των μικροσωληνίσκων, τους σταθεροποιεί, γίνονται άκαμπτοι, καθιστώντας αδύνατο για τα κύτταρα να σχηματίσουν φυσιολογικούς μιτωτικούς μηχανισμούς, μπλοκάροντάς τα στη G2/M φάση της κυτταρικής διαίρεσης (σχήμα 3.3).

Υπάρχει ένα μόνο σημείο πρόσδεσης της ταξόλης για κάθε διμερές τουμπουλίνης και η ικανότητά της για αύξηση του πολυμερισμού απαιτεί σχεδόν στοιχειομετρική 1/1 αναλογία, ένα μόριο ταξόλης για κάθε διμερές του μικροσωληνίσκου. Εντούτοις, σε αντίθεση με το μεγάλο αριθμό μορίων που απαιτούνται για την προαγωγή του πολυμερισμού, έχει διαπιστωθεί πως η πρόσδεση ενός μικρού αριθμού μορίων ταξόλης σταθεροποιεί αποτελεσματικά την δυναμική των μικροσωληνίσκων, χωρίς να αυξήσει τον πολυμερισμό

[29]. Έτσι, ένα μόνο μόριο ταξόλης ανά τις εκατοντάδες μορίων τουμπουλίνης σε ένα μικροσωληνίσκο μπορεί να μειώσει το ποσοστό συρρίκνωσής του κατά 50% περίπου.



Σχήμα 3.3: Η δράση της ταξόλης.

Η καταστολή της δυναμικής των μικροσωληνίσκων από την ταξόλη οδηγεί σε μιτωτικό μπλοκ απουσία σημαντικής συσσώρευσης μικροσωληνίσκων [30]. Σε κύτταρα HeLa η μίτωση μπλοκάρεται κατά 50% με 8 nM ταξόλης, ενώ δεν υπάρχει αύξηση της μάζας πολυμερισμένων μικροσωληνίσκων κάτω από 10 nM ταξόλης. Επιπλέον, η πολυμερισμένη μάζα αυξάνεται κατά 50% με 80 nM ταξόλης.

Η καταστολή της δυναμικής των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου εμποδίζει την κυτταρική διαίρεση να προχωρήσει από τη μετάφαση στην ανάφαση και τελικά, οδηγεί τα κύτταρα σε αποπτωτικό θάνατο.

Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί το γεγονός ότι η ταξόλη έχει και κυτταροτοξικές ιδιότητες. Μελέτες υποστηρίζουν ότι η κυτταροτοξικότητά της οφείλεται σε δευτερογενή κυτταρικά γεγονότα ή σήματα που ενεργοποιούν τη διαδικασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση), αλλά και σε διαδικασίες που προκαλούν νέκρωση των κυττάρων [31]. Η κυτταροτοξικότητά της οφείλεται επίσης σε αλλαγές της αρχιτεκτονικής του πυρηνικού φακέλου, καθώς σε όλες τις φαρμακευτικές αποτελεσματικές συγκεντρώσεις ταξόλης παρατηρούνται κύτταρα με πυρήνες ανώμαλου σχήματος, ελλείμματα στην πυρηνική λάμινα και στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη καθώς και εκτεταμένη συσσωμάτωση των συμπλόκων των πυρηνικών πόρων [32,33].

4. ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΧΡΗΣΗΣ ΤΗΣ ΤΑΞΟΛΗΣ ΩΣ ΦΑΡΜΑΚΟ

4.1. Αντοχή των καρκινικών κυττάρων στην ταξόλη

[Multidrug resistance (MDR)]

Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα χρήσης της ταξόλης ως φάρμακο είναι η αντοχή που αποκτούν τα καρκινικά κύτταρα έναντι αυτής. Το φαινόμενο αυτό [Multidrug resistance (MDR)] αναπτύσσεται κατά τη διάρκεια της θεραπείας του καρκίνου με το φάρμακο, οπότε και τα κύτταρα αποκτούν ανθεκτικότητα όχι μόνο ως προς το συγκεκριμένο, άλλα και σε άλλα, συχνά δομικά και λειτουργικά διαφορετικά [34,35]. Αυτή η δράση είναι χαρακτηριστική για τις φυσικές ετεροκυκλικές ουσίες, που χρησιμοποιούνται συχνά για την αντιμετώπιση όγκων και που έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό την μεγάλη υδροφοβικότητα τους [35]. Όπως κάθε οργανισμός έχει τον τρόπο του να υπερνικήσει την απειλητική για τη ζωή κατάσταση, έτσι και τα καρκινικά κύτταρα θέλουν επίσης να επιζήσουν, οπότε και αναπτύσσουν αντίσταση στα αντικαρκινικά φάρμακα.

Τα καρκινικά κύτταρα που παρουσιάζουν αντίσταση χαρακτηρίζονται από μικρότερη ενδοκυτταρική συγκέντρωση του φαρμάκου με το οποίο κατεργάζονται [35]. Ο μηχανισμός δράσης είναι συνδεδεμένος με την μεταφορά του φαρμάκου δια μέσου της κυτταρικής μεμβράνης. Κατά την διάρκεια της μεταφοράς, το κύτταρο προσλαμβάνει, εκτός από τα απαραίτητα γι' αυτό συστατικά για τη σωστή λειτουργία του, και φάρμακα, ενώ διάφορα επιβλαβή μεταβολικά προϊόντα μεταφέρονται έξω από αυτό. Η θεωρία της αντίστασης στα φάρμακα βασίζεται στην παρουσία και στην υπερ-έκφραση συγκεκριμένων πρωτεϊνών που βρίσκονται στη κυτταρική μεμβράνη και είναι υπεύθυνες για την άντληση των λυοφιλικών μορίων από το κύτταρο [36]. Οι καλύτερα γνωστές και καλύτερα χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες είναι η p-glycoprotein (Pgp) και η multidrug resistance protein (MRP) [37].

Τέλος, ένας προφανής μηχανισμός ανάπτυξης αντοχής στις ταξάνες γενικότερα είναι η γενετική αλλαγή της β-τουμπουλίνης. Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα [38-40], σε μερικές περιπτώσεις αντοχής παρατηρείται αλλαγή ισοτύπων, ενώ σε άλλες τα γονίδια της β- τουμπουλίνης υφίστανται σημειακές μεταλλάξεις [40,41]. Παρ' όλη την πρόοδο που έχει



σημειωθεί στην καταγραφή μεταλλάξεων της β- τουμπουλίνης, οι λεπτομέρειες του μηχανισμού ανάπτυξης αντοχής στην ταξόλη παραμένουν άγνωστες.

Όσο βαθύτερη είναι η γνώση του μηχανισμού της αντίστασης στα φάρμακα, τόσο καλύτερη και αποτελεσματικότερη είναι η παρέμβαση και επίλυση του προβλήματος.

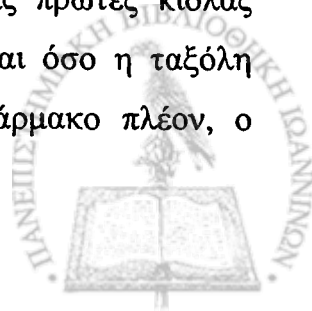
4.2. Τοξικότητα και παρενέργειες

Όπως πολλά άλλα χημειοθεραπευτικά φάρμακα, έτσι και η ταξόλη έχει τοξικότητα και παρενέργειες. Κατά τη διάρκεια των κλινικών δοκιμών, λίγο έλειψε να σταματήσουν οι δοκιμές του φαρμάκου εξαιτίας σημαντικών αλλεργικών αντιδράσεων για να αποδειχθεί τελικά ότι δεν έφταιγε μόνο η ταξόλη, άλλα κυρίως τα συστατικά του φαρμακευτικού σκευάσματος. Ένα μίγμα αιθανόλης και Cremophor EL (πολυαιθέρας του καστορελαίου) χρησιμοποιήθηκαν για να υπερκεραστεί η μικρή διαλυτότητα της ταξόλης στο νερό και να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ενέσιμη μορφή. Το Cremophor EL συγκεκριμένα, αν και είχε χρησιμοποιηθεί στη διαχείριση και άλλων φαρμάκων, θεωρείται υπεύθυνο για σειρά παρενεργειών, όπως οι αυστηρές αναφυλακτοειδείς αντιδράσεις υπερευαισθησίας, συσσώρευση των ερυθροκυττάρων και περιφερειακή νευροπάθεια [42-44].

Η ταξόλη εμφανίζει, επίσης, τις παρενέργειες που παρουσιάζονται με κάθε άλλη θεραπεία καρκίνου, όπως η τριχόπτωση και η μείωση των λευκών κυττάρων του αίματος, πράγμα που μπορεί να προκαλέσει ευαισθησία στις μολύνσεις. Η καταστολή του μυελού των οστών είναι εξίσου σημαντική και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την δόση του φαρμάκου.

4.3. Προβλήματα προμήθειας της ταξόλης

Το δεύτερο σημαντικό πρόβλημα που συνάντησε η ταξόλη ως υποψήφιο φάρμακο ήταν η απομόνωση των μεγάλων ποσοτήτων που απαιτούνται. Από τις πρώτες κιόλας κλινικές φάσεις, είχε επισημανθεί η μικρή διαθεσιμότητα του μορίου και όσο η ταξόλη περνούσε στη τελική ευθεία για την διάθεσή της στο εμπόριο ως φάρμακο πλέον, ο



προβληματισμός μεγάλωνε. Η απομόνωσή της από το φλοιό του δέντρου *Taxus brevifolia* δεν αποτελούσε βιώσιμη λύση με αποτέλεσμα να αναζητούνται εναλλακτικές πηγές. Οι έρευνες στράφηκαν κυρίως προς την ολική και μερική σύνθεση της ταξόλης καθώς και παραγώγων της, με τις κυριότερες προσπάθειες να περιγράφονται στα επόμενα κεφάλαια.



5. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΤΑΞΟΛΗΣ

Το δέντρο *Taxus brevifolia*, από το φλοιό του οποίου απομονώθηκε η ταξόλη, είναι ένα αργά αναπτυσσόμενο δέντρο, που πρέπει να φτάσει σε ηλικία 100 ετών για να είναι κατάλληλο για συγκομιδή. Με την απομάκρυνση του φλοιού, το δέντρο πεθαίνει και με δεδομένο πως χρειάζονται τέσσερα δέντρα για να ληφθούν μόλις λίγα γραμμάρια, ικανά για μια δόση ενός ασθενή, η ταξόλη δε θα μπορούσε να κατοχυρωθεί ως ευρέως διαδεδομένο φάρμακο. Για να αποφευχθεί μια ενδεχόμενη οικολογική καταστροφή του είδους *taxus* ή άλλων ειδών που περιέχουν αυτό το μόριο, ήταν περισσότερο από επιτακτικό να βρεθεί μια εναλλακτική πηγή παραγωγής αυτού του πολλά υποσχόμενου φαρμάκου [45,46].

Λύσεις που έχουν δοθεί μέχρι σήμερα είναι η ολική σύνθεσή της [47-55], η βιοσύνθεσή της [56,57], η κυτταροκαλλιέργεια [58-60], η παραγωγή από μύκητες [61,62], η απομόνωση από βελόνες και φύλλα δέντρων του είδους *taxus* και η μερική σύνθεση από 10-δεακετυλομπακατίνη III [63-66].

5.1. Ολική σύνθεση

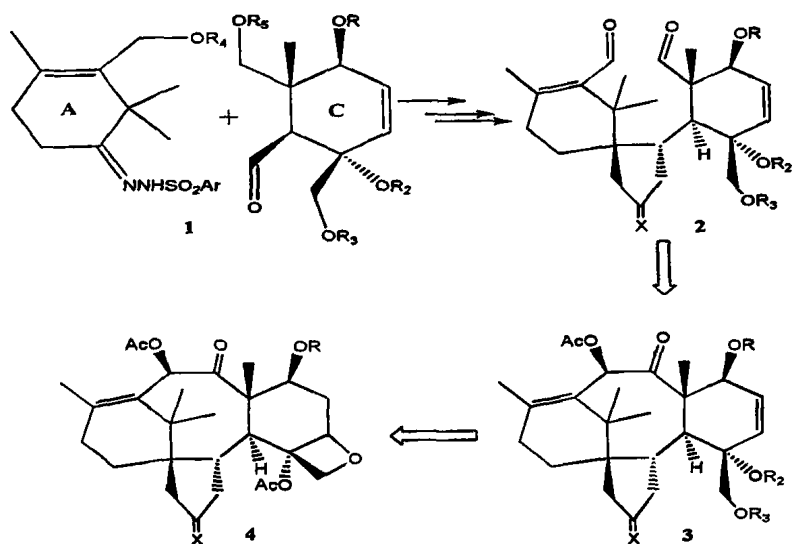
Το πολύπλοκο μόριο της ταξόλης με τους τέσσερις δακτυλίους και την παράπλευρη αλυσίδα, αποτέλεσε μεγάλη πρόκληση για τους οργανικούς χημικούς και μέχρι σήμερα μόνο έξι ολικές συνθέσεις, με διαφορετικές στρατηγικές προσεγγίσεις, έχουν καταγραφεί. Η δυσκολία έγκειται στη δημιουργία των δακτυλίων, την σύνθεση δηλαδή του μορίου της μπακατίνης. Η δημιουργία της παράπλευρης αλυσίδας και η πρόσδεσή της σε μόριο μπακατίνης είναι μια σχετικά εύκολη και μεγάλης απόδοσης διαδικασία που συζητείται στη συνέχεια. Ο τρόπος και η σειρά σύνθεσης των δακτυλίων είναι εκείνα που διαφοροποιούν τις στρατηγικές σύνθεσης.

Οι δύο πρώτες συνθέσεις δημοσιεύθηκαν σχεδόν ταυτόχρονα το 1994 από τον Nikolaou και τους συνεργάτες του και από τον Holton και τους συνεργάτες του.

Στη σύνθεσή τους, ο Nikolaou και οι συνεργάτες του ξεκίνησαν φτιάχνοντας αρχικά πρόδρομες ενώσεις του A και του C δακτυλίου ξεχωριστά (σχήμα 5.1) [47]. Οι ενώσεις προέκυψαν κυρίως από Diels–Alder αντιδράσεις. Κατόπιν οι δυο δακτύλιοι ενώθηκαν με μια αντίδραση Shapiro και διαμορφώθηκε το σύστημα 2. Μια σύζευξη McMurry 3 παρήγαγε το

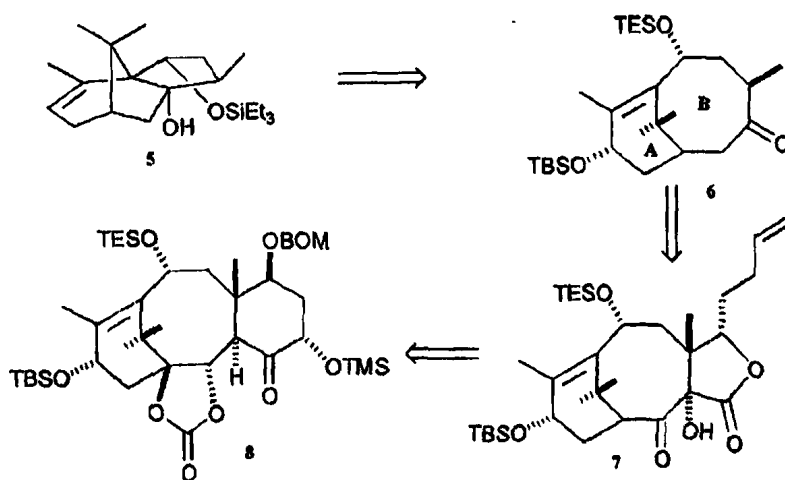


ABC σύστημα 3, από το οποίο προέκυψε το τετρακυκλικό σύστημα 4 και μετέπειτα η μπακατίνη.



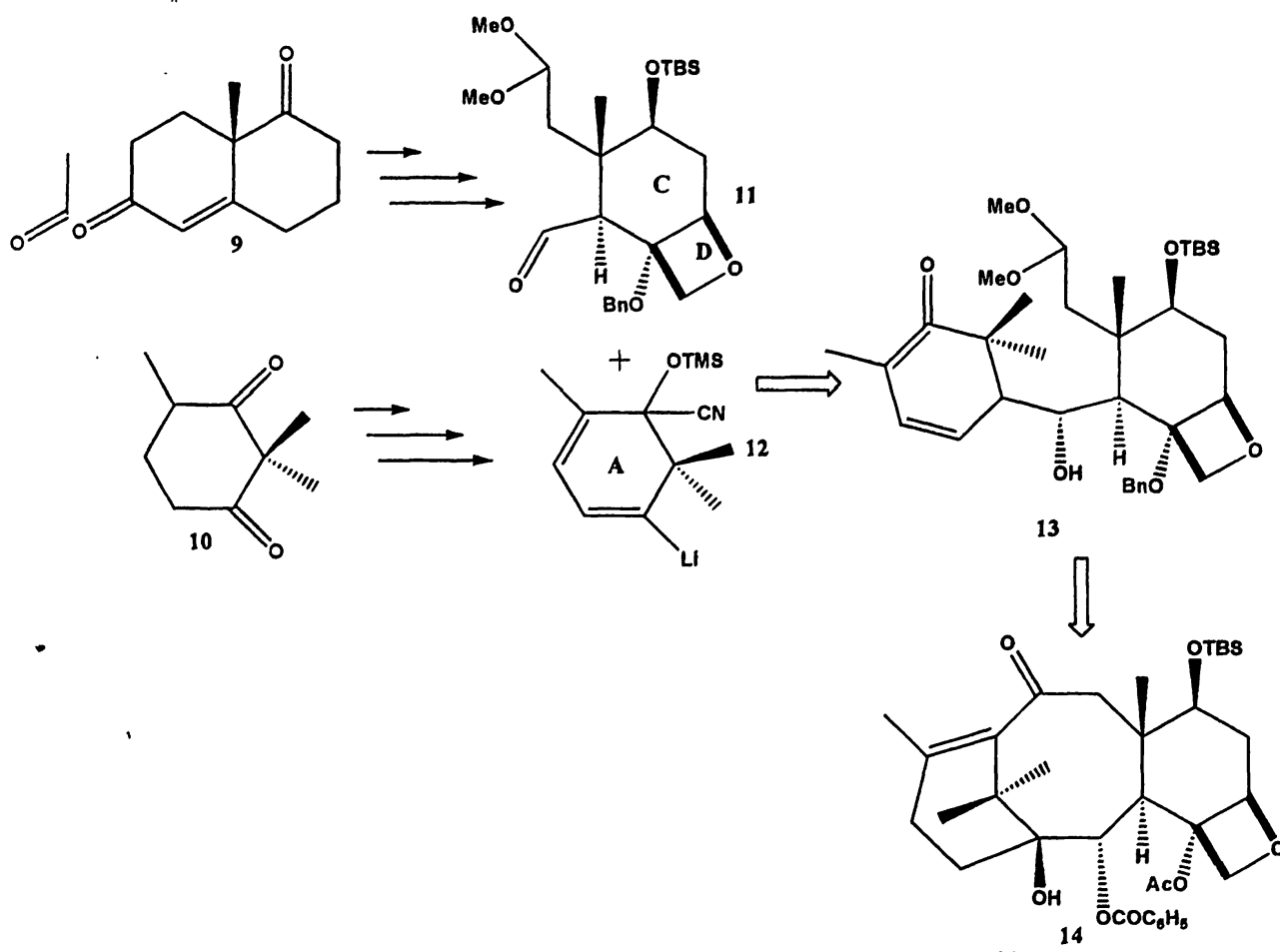
Σχήμα 5.1: Σύνθεση μπακατίνης κατά τον Nikolaou και τους συνεργάτες του. Όπου R =προστατευτικές ομάδες.

Ο Holton και οι συνεργάτες του ξεκίνησαν από το φυσικό προϊόν b- patchoulene (σχήμα 5.2) [48,49]. Από αυτό, προχώρησαν ουσιαστικά στη σύνθεση του AB δακτυλίου. Συνέχισαν με την προσαρμογή του C δακτυλίου μέσω του ενδιάμεσου 6 και κατόπιν στη σύνθεση του οξετανικού δακτυλίου, για να φτάσουν μετά από μερικά ακόμη στάδια στο μόριο της μπακατίνης.



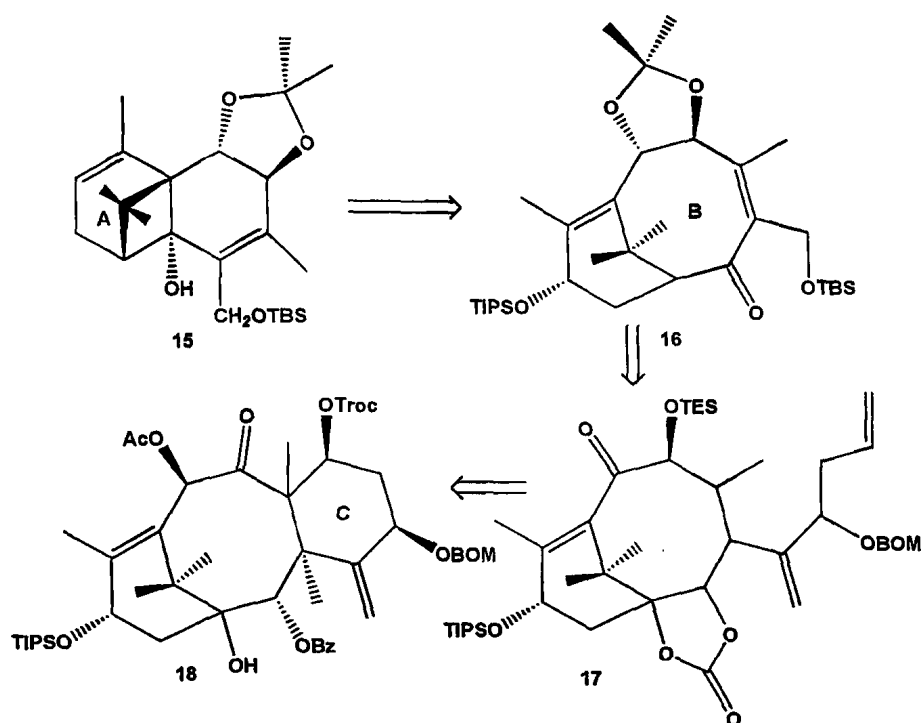
Σχήμα 5.2: Σύνθεση μπακατίνης κατά τον Holton και τους συνεργάτες του.

Η προσέγγιση στη σύνθεση της μπακατίνης από τον Danishefsky και τους συνεργάτες του, είναι η μοναδική που ξεκινά με προσχηματισμένο το D δακτύλιο **11**, ο οποίος μαζί με τον C προετοιμάστηκαν από μια Wieland–Miescher κετόνη **9** (σχήμα 5.3) [50]. Κατόπιν προσδέθηκε μια πρόδρομη ένωση του A δακτυλίου **12**, που και αυτή προερχόταν από μια κετόνη (**10**), για να σχηματιστεί ο B δακτύλιος με μια κυκλοποίηση Heck. Στη μπακατίνη κατέληξαν μετά από μια σειρά οξειδώσεων.



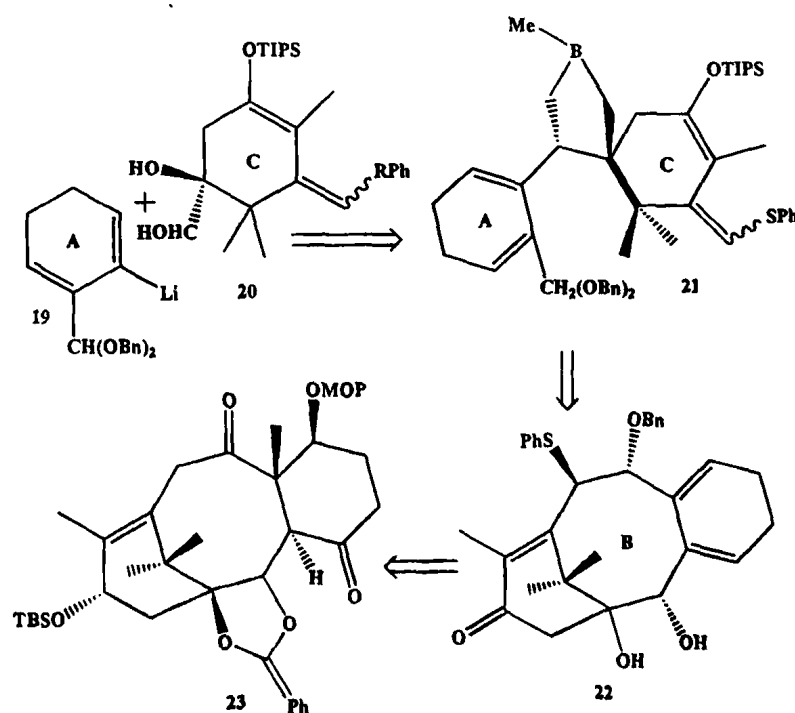
Σχήμα 5.3: Σύνθεση μπακατίνης κατά τον Danishefsky και τους συνεργάτες του.

Ο Wender και οι συνεργάτες του άρχισαν την σύνθεσή τους από την βερμπενόνη, για να καταλήξουν στο ενδιάμεσο **15**, που με οξειδωτική αποκοπή παρέχει τον AB δακτύλιο **16** (σχήμα 5.4) [52,53]. Ο C δακτύλιος προήρθε από αλδοδική συμπύκνωση **17,18** και ο σχηματισμός ολοκληρώθηκε με τη δημιουργία του οξετανικού δακτυλίου. Η γενική σύνθεση σε 37 βήματα θεωρείται ότι είναι η πιο σύντομη καταγεγραμμένη σύνθεση της ταξόλης.



Σχήμα 5.4: Σύνθεση μπακατίνης κατά τον Wender και τους συνεργάτες του.

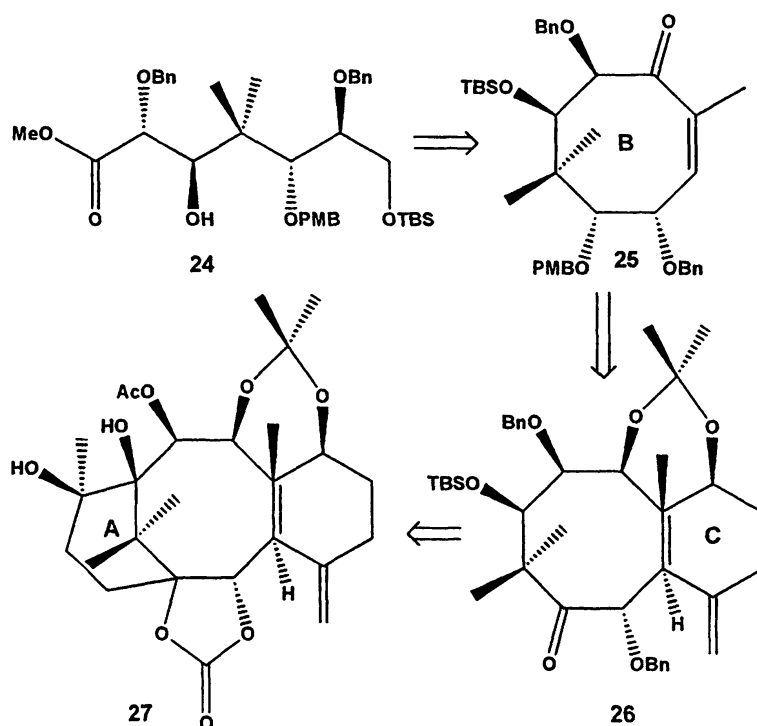
Ο Kuwajima και οι συνεργάτες του ακολούθησαν την πορεία σχηματισμού ξεχωριστά του A **19** και C δακτυλίου **20**, τα οποία μετά την ένωση τους σχηματίζουν τον B δακτύλιο **22** (σχήμα 5.5) [54]. Η τελική ενσωμάτωση του οξετανικού δακτυλίου δίνει το μόριο της μπακατίνης.



Σχήμα 5.5: Σύνθεση μπακατίνης κατά τον Kuwajima και τους συνεργάτες του.



Τέλος η σύνθεση από τον Mukaiyama και τους συνεργάτες του, που δημοσιεύτηκε το 1999, είναι μοναδική, καθώς ξεκινά από το σχηματισμό του B δακτυλίου **25** και μάλιστα από μια μη κυκλική ένωση **24** (σχήμα 5.6) [55]. Η δημιουργία των C **26** και A **27** δακτυλίων πραγματοποιούνται πάνω στο σχηματισμένο B δακτύλιο και με την προσθήκη του D, ολοκληρώνεται η σύνθεση.



Σχήμα 5.6: Σύνθεση μπακατίνης κατά τον Mukaiyama και τους συνεργάτες του.

Όλες αυτές οι προσπάθειες χαρακτηρίζονται από πολλά, πολύπλοκα και, σε μερικές περιπτώσεις, χαμηλής απόδοσης στάδια με αποτέλεσμα η συνολική απόδοση να είναι χαμηλή και σε καμία περίπτωση κάποια από αυτές να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε βιομηχανική κλίμακα.

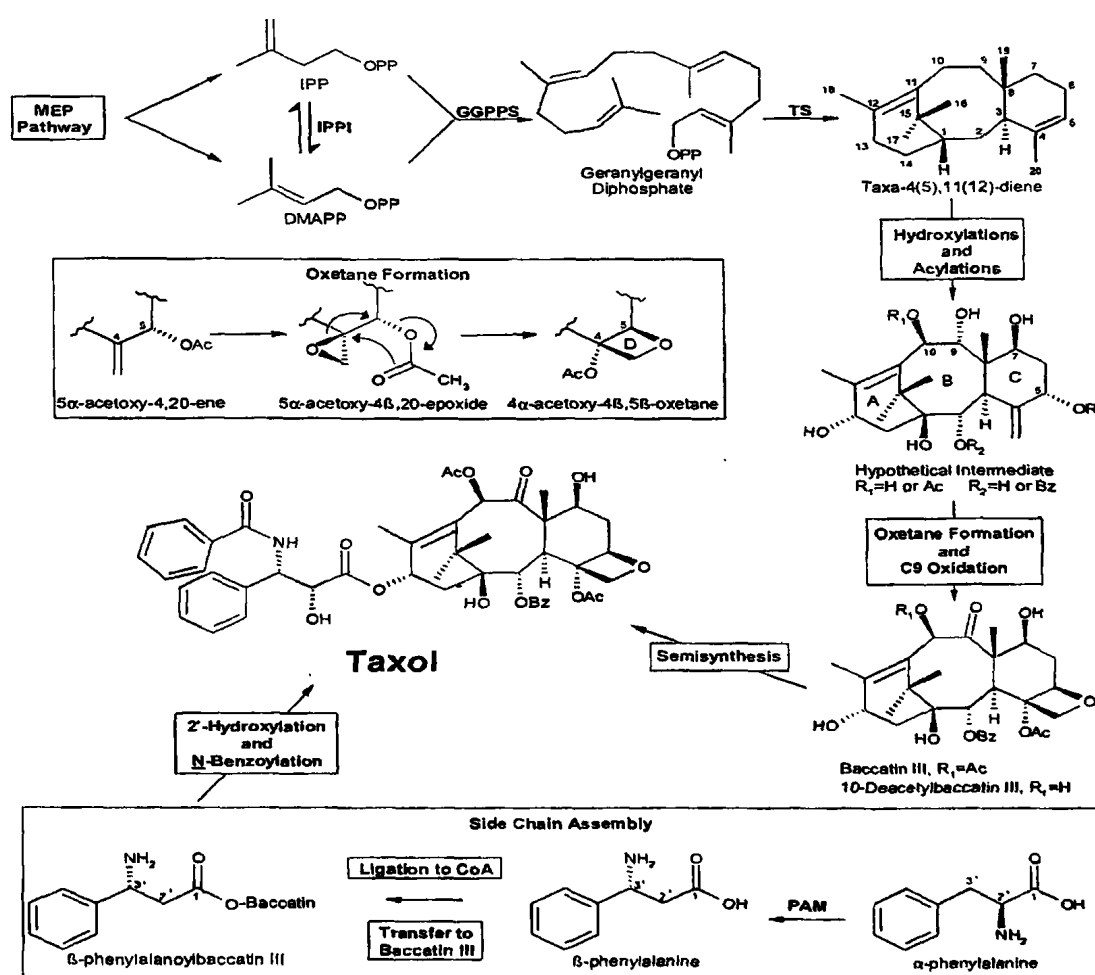
5.2. Βιοσύνθεση- Κυτταροκαλλιέργεια

Τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδο στην αποσαφήνιση του βιοσυνθετικού μηχανισμού της ταξόλης. Εκτός από μερικά ασαφή ακόμη βήματα, η βιοσυνθετική οδός έχει διευκρινιστεί και πολλά γονίδια που κωδικοποιούν ορισμένα ένζυμα, τα οποία ρυθμίζουν τα στάδια της βιοσύνθεσης έχουν χαρακτηριστεί [56].



Η βιοσύνθεση της ταξόλης στα είδη *taxus* περιλαμβάνει 19 βήματα. Ξεκινάει από diphosphate geranylgeranyl, πρόδρομο των διτερπενιοδών, που κυκλοποιείται σε ταξα-4 (5), 11(12)-διένιο.

Μετά από μια σειρά οκτώ οξυγονώσεων που μεσολαβούν τα κυτοχρώματα P450, τρία CoA –εξαρτώμενες ακυλιώσεις, μια οξείδωση στο C-9 και τον σχηματισμό του οξατενικού δακτυλίου παράγεται η μπακατίνη, στην οποία η λειτουργικά απαραίτητη C-13 παράπλευρη αλυσίδα προσαρτάται σε πέντε ακόμη στάδια (σχήμα 5.7) [57].



Σχήμα 5.7: Βιοσύνθεση της ταξόλης.

Η καλλιέργεια κυττάρων των ειδών *taxus* θεωρείται μια αρκετά ελπιδοφόρα τεχνική για την παραγωγή ταξόλης. Από την πρώτη αναφορά παραγωγής ταξόλης με τη μέθοδο Christen [58,59], έχουν αναφερθεί αρκετοί τρόποι που στηρίζονται στις καλλιέργειες διαφόρων ειδών κυττάρων *taxus*, με βελτιωμένες αποδόσεις [60].

Παρ' όλη την ιδιαίτερη επιτυχία που γνωρίζει η διαδικασία αυτή, τόσο στην παραγωγή ταξόλης όσο και στην παραγωγή ενδιάμεσων ή ακόμα και καινούργιων προϊόντων

που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως ανάλογα, εντούτοις είναι ακόμη περιορισμένη. Η χαμηλή απόδοση των προϊόντων, η ασταθής παραγωγή αυτών, καθώς επίσης και το υψηλό κόστος παραγωγής την καθιστούν, μέχρι σήμερα απαγορευτική για μεγάλης κλίμακας εμπορική χρήση.

5.3. Η παράγωγή από μύκητες

Μια εναλλακτική μέθοδος, αρκετά ελπιδοφόρα και συναρπαστική, αναφέρθηκε το 1993 όταν ο Stierle και οι συνεργάτες του ανέφεραν τον πρώτο μύκητα για την παραγωγή ταξόλης, τον *Taxomyces andreae* [61]. Αν και η παραγωγή ήταν δυστυχώς πολύ χαμηλή (24-50 ng/l), τα πλεονεκτήματα της μεθόδου, όπως η σύντομη και ραγδαία αύξηση των μυκήτων, καθιστούν σημαντικό την συνέχιση των ερευνών προς αυτή τη κατεύθυνση. Εξάλλου, ο γενετικός χειρισμός των μυκήτων επιτυγχάνεται ευκολότερα από εκείνο των φυτών, οπότε και είναι δυνατό να βελτιωθεί σημαντικά η παραγωγή με τη βοήθεια της γενετικής. Αυτό θα αποτελούσε μια νέα επιλογή για την παραγωγή ταξόλης από ζυμώσεις μυκήτων, οι οποίες θα είχαν χαμηλότερο κόστος από τις καλλιέργειες κυττάρων.

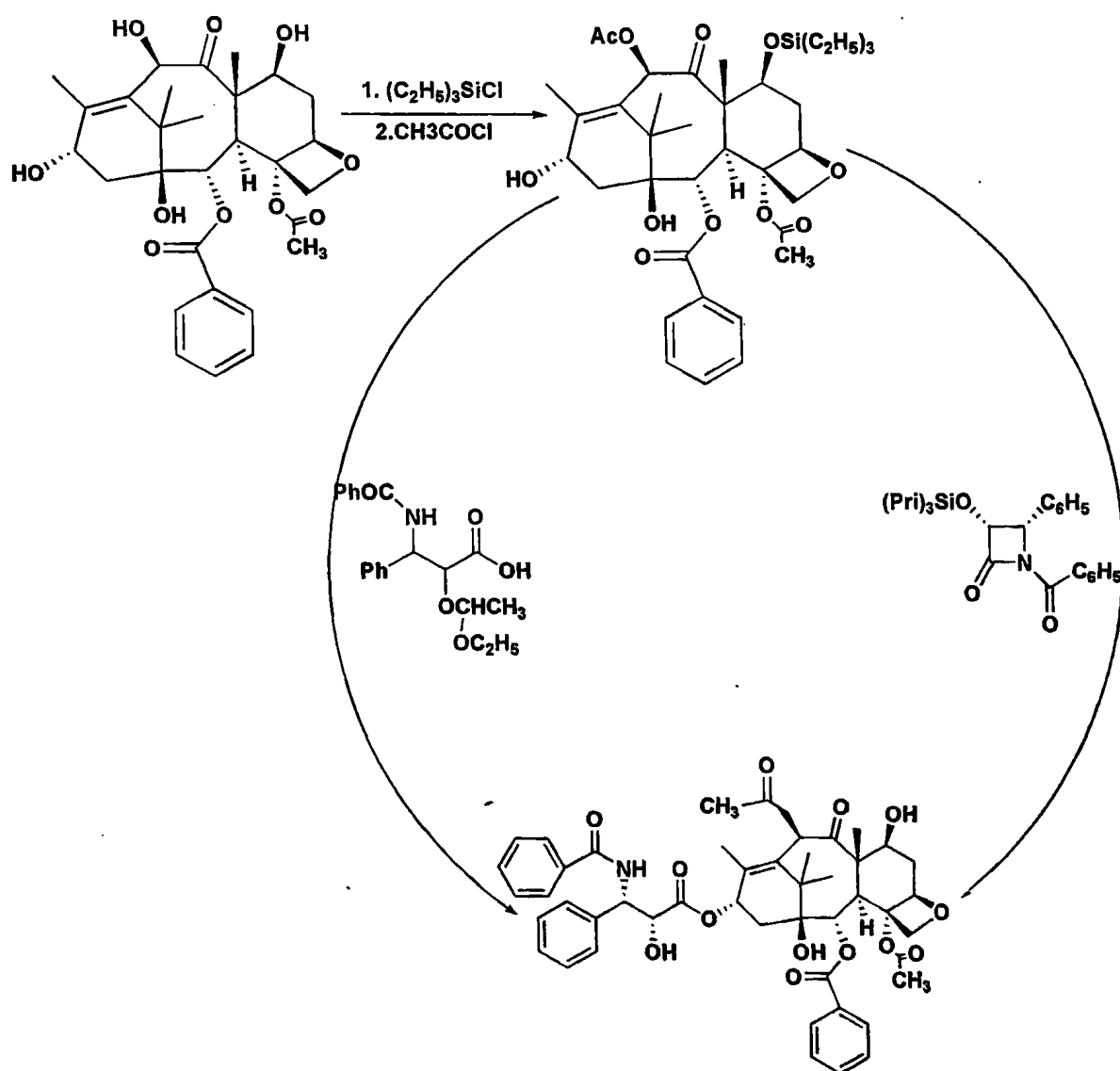
5.4. Απομόνωση από βελόνες και φύλλα δέντρων της 10-δεακετυλομπακατίνης – Μερική σύνθεση της ταξόλης

Σίγουρα η πιο αξιόπιστη λύση— όχι όμως και οριστική - για την παραγωγή της ταξόλης είναι με την ημισυνθετική μέθοδο, από τη 10-δεακετυλομπακατίνη. Το μόριο αυτό αποτελεί το μεγαλύτερο και κρίσιμότερο τμήμα της ταξόλης και μπορεί να απομονωθεί από φύλλα-βελόνες του ευρωπαϊκού ήμερου ελάτου *Taxus Baccata*. Η απομόνωσή της θεωρείται μια σχετικά εύκολη και υψηλής απόδοσης διαδικασία. Το σημαντικότερο, όμως, είναι πως δεν απαιτείται η καταστροφή του δέντρου, όπως στην περίπτωση απομόνωσης της ταξόλης, ενώ η γρήγορη ανανέωση των φύλλων μπορεί να εξασφαλίσει την συνεχή προμήθεια του μορίου, χωρίς να επηρεάζεται σημαντικά ο πληθυσμός του δέντρου.

Η μετατροπή της 10-δεακετυλομπακατίνης σε μπακατίνη γίνεται με προστασία της C-7 υδροξυλομάδας με TES-Cl και μετέπειτα ακετυλίωση της C-10 υδροξυλομάδας. Η προσθήκη της παράπλευρης αλυσίδας γίνεται είτε με εστεροποίηση με την εύκολα διαθέσιμη



(2R,3S)-N-βενζοϋλ-O-(1-αιθοξυαιθύλ)-3-φαίνυλοσερίνη είτε με αντίδραση με μια β-λακτάμη, αντίδραση που χρησιμοποιείται και βιομηχανικά (σχήμα 5.8) [63,64].

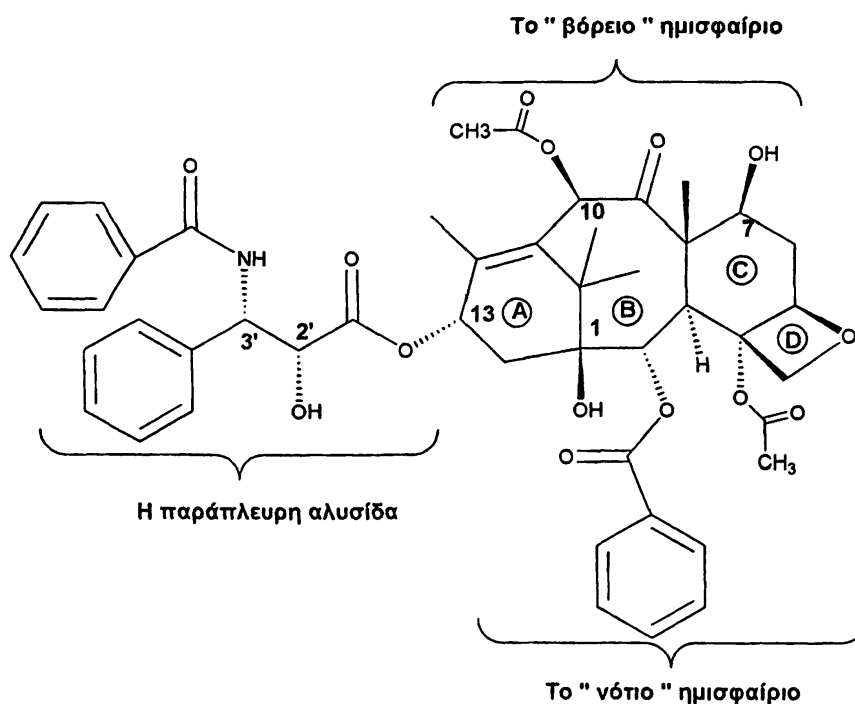


Σχήμα 5.8: Μερική σύνθεση της ταζόλης από 10-δεακετυλομπακατίνη

6. ΣΧΕΣΗ ΔΟΜΗΣ-ΔΡΑΣΗΣ

Η μελέτη και η κατανόηση της χημείας της ταξόλης, καθώς και της σχέσης της δομής με την βιολογική της δράση υπήρξε καταλυτική στην καθιέρωση, αλλά και την περαιτέρω ανάπτυξη της ως φάρμακο. Μέσα από αυτή την διαδικασία, επισημάνθηκαν οι δραστικές, απαραίτητες λειτουργικές ομάδες, αλλά και οι θέσεις που μπορούν να τροποποιηθούν, ώστε να αυξηθούν είτε η δραστικότητα είτε η χαμηλή της υδατοδιαλυτότητα. Επιπλέον, διευκρινίστηκαν δομικά χαρακτηριστικά του μορίου που είναι αρμόδιες για τις συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις του μορίου με τα κύτταρα, επιτρέποντας κατά συνέπεια, το σχεδιασμό ανάλογων με βελτιωμένη δράση. Τέλος, όλη αυτή η προσπάθεια άνοιξε διάπλατα το δρόμο για καινούργιες ολικές ή μερικές συνθέσεις του ίδιου του μορίου, γεγονός πολύ σημαντικό αν αναλογιστεί κανείς την μικρή της διαθεσιμότητα από φυσικά προϊόντα.

Και ενώ καινούργια ανάλογα δημιουργούνται συνεχώς τροποποιώντας διάφορες θέσεις του σκελετού της ταξόλης, καταβάλλεται μια προσπάθεια να προσδιοριστούν οι γενικότερες τάσεις στις τροποποιήσεις των θέσεων.



Σχήμα 6.1. Σχηματική απεικόνιση των θέσεων της ταξόλης που επιδέχονται τροποποίησης.



6.1. Η Παράπλευρη αλυσίδα

Γενικά η παρουσία της παράπλευρης αλυσίδας στο μόριο της ταξόλης θεωρείται απαραίτητη για την βιολογική της δράση, καθώς χωρίς αυτή, το μόριο της μπακατίνης δηλαδή, έχει σημαντικά μικρότερη βιολογική δράση. Έχει αποδειχθεί πως μεγάλες τροποποιήσεις οδηγούν συνήθως σε απώλεια της δραστηριότητας. Έτσι

- ✚ Απαραίτητη θεωρείται η παρουσία της ελεύθερης υδροξυλομάδας στη C'-2, ή κάποιου εστέρα που μπορεί να υδρολυθεί εύκολα [67-69].
- ✚ Η φαίνυλο ομάδα στη C'-3 μπορεί να υποβληθεί σε υποκατάσταση ή ακόμα να αντικατασταθεί από ομάδα με ανάλογη στερεοχημική παρεμπόδιση (π.χ. ισοβούτυλο-ομάδα) [70-72].
- ✚ Η παρουσία της N-ακυλο ομάδας απαιτείται, αν και δομικές αλλαγές σε αυτή την περιοχή είναι επιτρεπτές [73]. Εδώ θα πρέπει να επισημανθεί πως αντικατάσταση με N-*t*-βουτοξυκαρβόνυλομάδας, σε συνδυασμό με ελεύθερη υδροξυλομάδα στη C-10 θέση (αντί ακέτυλο ομάδας που υπάρχει στο μόριο τη ταξόλης) δίνει το συνθετικό ανάλογο *taxotere*, ένα μόριο που χρησιμοποιείται ευρύτατα στη χημειοθεραπεία [74].

6.2. Το Βόρειο ημισφαίριο

Οι τροποποιήσεις στο βόρειο ημισφαίριο της ταξόλης δεν έχουν ιδιαίτερη επίδραση στη δραστηριότητα. Αυτό πιθανώς σημαίνει ότι το τμήμα αυτό δε συμμετέχει στην αλληλεπίδραση με τους μικροσωληνίσκους. Γενικά:

- ✚ Η υδροξυλομάδα της C-7 θέσης μπορεί είτε να αφαιρεθεί είτε να ακυλωθεί χωρίς μεταβολή της δραστηριότητας από το αρχικό φάρμακο [75-80]. Η μετατροπή του σε κετόνη όμως μπορεί να προκαλέσει διάνοιξη του οξετανικού δακτυλίου και σημαντική απώλεια δραστηριότητας [81].
- ✚ Αναγωγή της κετόνης στη C-9 θέση μπορεί να γίνει χωρίς συνέπειες [82,83].
- ✚ Μετατροπή ή απομάκρυνση της ακέτυλο ομάδας στη C-10 θέση ελάχιστα επηρεάζει το μόριο [84].



6.3. Το Νότιο Ημισφαίριο

Η διαμόρφωση του νοτίου ημισφαιρίου φαίνεται να παίζει ιδιαίτερο ρόλο στην δράση του μορίου καθώς μετατροπές σ' αυτό το τμήμα επιδρούν σημαντικά στη δραστικότητα.

✚ Η απομάκρυνση της υδρόξυλομάδας από την C-1 θέση προκαλεί μικρή απώλεια δραστικότητας [85].

✚ Η βενζόξυ ομάδα είναι απαραίτητη στη δραστικότητα [86]. Εντούτοις, υποκατάσταση στο δακτύλιο μπορεί να γίνει με παράλληλη αύξηση της δραστικότητας [87]. Επίσης η στερεοχημεία της θέσης αυτής είναι σημαντική [88].

Η συγκεκριμένη στερεοχημεία της C-13 θέσης είναι απαραίτητη [89]. Ο οξετανικός δακτύλιος είναι ουσιαστικός στη δράση της ταξόλης καθώς η διάνοιξή του έχει συνέπειες τόσο στην τοξικότητα όσο και στο πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων [90-95].



7. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ- ΠΡΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΤΑΞΟΛΗΣ

Σε μια προσπάθεια να αντιμετωπισθούν προβλήματα στη χρήση της ταξόλης ως φάρμακο, έχουν προταθεί τέσσερις διαφορετικές προσεγγίσεις [96]:

- Η αλλαγή της φαρμακευτικής μορφής
- Η δημιουργία καινούργιων παραγώγων της ταξόλης με βελτιωμένα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά
- Η χορήγησή της μαζί με άλλα χημειοθεραπευτικά φάρμακα, μια μέθοδο πολλά υποσχόμενη
- Η προσωρινή τροποποίηση της ταξόλης σε μορφή προφαρμάκου.

Τα τελευταία χρόνια η στρατηγική των προφαρμάκων κερδίζει όλο και περισσότερο έδαφος, με αποτέλεσμα το 40% περίπου των προϊόντων που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση του καρκίνου να ανήκουν σε αυτή τη κατηγορία [97].

Η λογική των προφαρμάκων βασίζεται στη δημιουργία λιγότερο δραστικών ή λιγότερο κυτταροτοξικών παραγώγων, τα οποία θα μπορούσαν να μετατραπούν σε ενεργά, πρωταρχικά φάρμακα μέσα ή κοντά στα καρκινικά κύτταρα. Κάτι τέτοιο μπορεί να συμβάλει στην αρτιότερη και ασφαλέστερη αντιμετώπιση του καρκίνου, αφού, όπως έχει ειπωθεί, η χημειοθεραπεία επηρεάζει και τα υγιή κύτταρα. Γενικά τα προφάρμακα έχουν ως στόχο αφενός την βελτίωση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του φαρμάκου, αφετέρου την απελευθέρωσή του ενζυματικά ή με χημική αντίδραση στο κύτταρο [98].

Πλήθος παραγώγων ταξόλης που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προφάρμακα έχουν προταθεί στη βιβλιογραφία. Το σύνολο των προφαρμάκων αφορά μόρια ταξόλης παραγοντοποιημένα στο υδροξύλιο της θέσης C'-2 κυρίως ή/και της θέσης C-7 και αυτό, γιατί είναι οι δυο πιο δραστικές λειτουργικές ομάδες που μπορούν να ικανοποιήσουν τις προδιαγραφές για την παραγωγή προφαρμάκων. Η C'-2 θέση είναι ιδανική καθώς το υδροξύλιο της είναι απαραίτητο για την βιολογική δράση της ταξόλης, οπότε οποιαδήποτε πρόσδεση σε αυτή τη θέση οδηγεί σε παράγωγο με μειωμένη δραστικότητα, το οποίο όμως εύκολα μπορεί να απελευθερώσει ταξόλη στα κύτταρα [99]. Αντίθετα, η υδροξυλομάδα στη C-7 θέση δε θεωρείται αρκετά σημαντική στη δραστικότητα του φαρμάκου, ενώ και οι δεσμοί της με τα διάφορα μόρια είναι πιο σταθεροί από τους αντίστοιχους της C'-2 [100-102]. Επιπλέον, η παραγοντοποίηση της C'-2 θέσης μπορεί να γίνει χωρίς προηγούμενη προστασία των υπολοίπων ομάδων του μορίου.



Από την άλλη μεριά, τα μόρια που χρησιμοποιούνται για την πρόσδεση σε αυτές τις θέσεις θα πρέπει να έχουν κυρίως τα εξής χαρακτηριστικά:

- Να συμβάλλουν στην αύξηση της υδατοδιαλυτότητας του φαρμάκου
- Να βοηθούν στη μεταφορά προς το κύτταρο, αλλά και μέσα σε αυτό
- Να βοηθούν στη στόχευση των καρκινικών κυττάρων

Μερικές περιπτώσεις που απασχόλησαν και την παρούσα διατριβή είναι οι ακόλουθες:

7.1. Η χρήση αμινοξέων

Η χρήση των αμινοξέων ήταν μια προφανής λύση στην αύξηση της υδατοδιαλυτότητας. Αν και ο στόχος επιτεύχθηκε, υπήρξε σοβαρό πρόβλημα όσον αφορά στη σταθερότητα των παραγώγων αυτών σε υδατικά διαλύματα ή σε ανθρώπινο ορό, ενώ παράγωγα από την C-7 θέση παρουσίαζαν αδυναμία στην απελευθέρωση της ταξόλης [100]. Προσπάθεια λύσης του προβλήματος έγινε με την χρήση κάποιου βραχίονα, που σε ορισμένες περιπτώσεις και για συγκεκριμένα αμινοξέα έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα [101].

7.2. Μόρια-μεταφορείς στο εσωτερικό των κυττάρων

Πρόσφατα, διάφορες κατηγορίες υδατοδιαλυτών πεπτιδίων έχουν προταθεί ως ικανά μόρια που διευκολύνουν την εισαγωγή στα κύτταρα και τους ιστούς. Τα χαρακτηριστικά αυτά μπορούν να είναι αξιοποιήσιμα στο σχεδιασμό προφαρμάκων [103]. Ένα τέτοιο πεπτίδιο προέρχεται από την πρωτεΐνη HIV-tat (RKKRRQRRR), μελέτες του οποίου έδειξαν πως ολιγομερή, βασισμένα σε γουανιδομάδες, παρουσιάζουν έντονη μεμβρανική διαπερατότητα [104]. Με βάση αυτές τις μελέτες ο Wender με τους συνεργάτες του παρουσίασαν ένα οκταπεπτίδιο αργινίνης συνδεδεμένο μέσω θειαιθερικού δεσμού με τη ταξόλη [105]. Με αυτό τον τρόπο κατάφεραν να αυξήσουν την υδατοδιαλυτότητα του φαρμάκου, ενώ η απελευθέρωση της ταξόλης ήταν άμεσα εξαρτώμενη από τον εκάστοτε βραχίονα που χρησιμοποιούσαν. Παρ' όλα αυτά, δεν υπήρξαν πειραματικές αποδείξεις για την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας του φαρμάκου στα κύτταρα. Πρόσφατες μελέτες αποδίδουν στη πρωτεΐνη HIV-tat και την ικανότητα προαγωγής του πολυμερισμού της



τουμπουλίνης, ανοίγοντας έτσι και το δρόμο για σχεδίαση μορίων που θα στοχεύουν αποτελεσματικότερα τους μικροσωληνίσκους [106].

Ανάλογη προσπάθεια έγινε και από την ομάδα του Wang [107], οι οποίοι χρησιμοποίησαν το πεπτίδιο pAntp, γνωστό ως Penetratin®, που προέρχεται από την *Drosophila antennapedia homeoprotein* [108], ένα πεπτίδιο που έχει και αυτό αρκετά θετικά φορτία και που έχει δείξει ικανότητα κυτταρικής διαπερατότητας. Και αυτή η ομάδα χρησιμοποίησε βραχίονα για την πρόσδεση με την ταξόλη και την χημειοεκλεκτική αντίδραση σχηματισμού θειαιθέρα. Για άλλη μια φορά όμως δεν αποδεικνύεται η αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας.

7.3. Μόρια που αναγνωρίζονται από υποδοχείς που υπέρ-εκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα

Η στόχευση των καρκινικών κυττάρων είναι μια βασική στρατηγική στη δημιουργία προφαρμάκων, καθώς με τον τρόπο αυτό αυξάνεται η συγκέντρωση του φαρμάκου κοντά στα καρκινικά κύτταρα, ενώ επηρεάζονται λιγότερο τα υγιή. Το γεγονός πως δεν υπάρχει κάποιος μοναδικός υποδοχέας ή ένζυμο στην κυτταρική μεμβράνη που να ξεχωρίζει τα καρκινικά από τα υγιή κύτταρα, αποτελεί σημαντικό πρόβλημα στη σχεδίαση των παραγώγων. Ικανοποιητική λύση δίνεται με την στόχευση υποδοχέων και ενζύμων που εκφράζονται σε μεγαλύτερο ποσοστό στα καρκινικά κύτταρα απ' ό,τι στα φυσιολογικά [109]. Με δεδομένο πως η ταξόλη υποφέρει από έλλειψη εκλεκτικότητας, έγιναν σημαντικές προσπάθειες στο τομέα αυτό. Μερικές από αυτές είναι:

7.3.1. Στόχευση του υποδοχέα του φολικού οξέος

Αποτελεί χρήσιμο στόχο για την θεραπεία του καρκίνου καθώς υπερεκφάζεται σε πολλά είδη καρκίνου, ενώ μπορεί να μεταφέρει το φολικό οξύ ή παράγωγα αυτού μέσα στο κύτταρο. Γι' αυτό το λόγο το φολικό οξύ είναι ένα ελκυστικό μόριο για αυτή την κατηγορία προφαρμάκων. Επιπλέον είναι μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη που συνδέεται με υψηλή συγγένεια με τον υποδοχέα, είναι σταθερό σε συνθήκες αποθήκευσης και παράλληλα είναι μόριο χαμηλού κόστους [110].



Παράγωγα ταξόλης με φολικό οξύ παρασκευάστηκαν , συνδεδεμένα με μικρά μόρια πολυ(αίθυλενογλυκόλης) [111]. Μολονότι μειώθηκε η τοξικότητα του προφαρμάκου και παράλληλα διατηρήθηκε η δυνατότητα υψηλής πρόσδεσης με τον υποδοχέα, τα μόρια αυτά δεν ήταν ιδιαίτερα υδατοδιαλυτά, ενώ απέτυχαν να επιδείξουν επιλεκτική θανάτωση κυττάρων που είχαν εκφράσει τον υποδοχέα του φολικού σε μεγάλο ποσοστό

7.3.2. Στόχευση του υποδοχέα των ιντεγκρινών

Βασική λειτουργία των ιντεγκρινών που βρίσκονται στις μεμβράνες των κυττάρων, είναι να συμβάλλουν στις διαδικασίες συγκόλλησης-αναγνώρισης ανάμεσα σε κύτταρα ή ανάμεσα σε κύτταρα και εξωκυττάριους προσδέτες. [112]. Εκτός των συγκολλητικών τους λειτουργιών, οι ιντεγκρίνες μπορούν να επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων, όπως επίσης και την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων [113-117]. Η αμινοξική αλληλουχία RGD είναι ένα κοινό μοτίβο αναγνώρισης από ένα ευρύ φάσμα ιντεγκρινών [118].

Ο Chen και οι συνεργάτες του παρουσίασαν ένα παράγωγο ταξόλης με ένα διμερές κυκλικό RGD πεπτίδιο στη προσπάθεια στόχευσης των ιντεγκρινών [119]. Η ταξόλη παραγοντοποιήθηκε στη C'-2 θέση με ένα σουκινικό μόριο και προσδέθηκε ομοιοπολικά στο πεπτίδιο. Το μόριο αυτό έδειξε αυξημένη εκλεκτικότητα στη στόχευση όγκων και κυτταροτοξική δράση σε σχέση με αυτή της ταξόλης, με αποτέλεσμα να οδηγούνται σε μικρότερες δόσεις για να επιφέρουν την αντίστοιχη τοξικότητα.

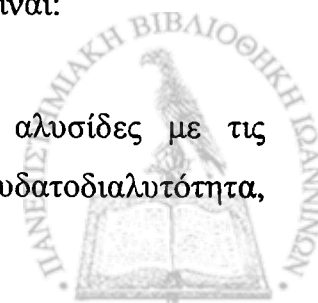
7.4. Μακρομόρια με πολλαπλά αντίγραφα ταξόλης

Τα μακρομόρια έχουν χρησιμοποιηθεί κατά κόρον ως μεταφορείς φαρμάκων στη χημειοθεραπεία του καρκίνου [120]. Το κοινό χαρακτηριστικό γνώρισμά τους είναι η δυνατότητά τους να συσσωρεύονται μέσα στους ιστούς των όγκων. Αυτή η εκλεκτική συσσώρευση συσχετίζεται με τη φύση των όγκων, καθώς τα μεγάλα μόρια μεταφέρονται εύκολα στους ιστούς όγκων, όπου η αγγειακή διαπερατότητα είναι υψηλή [121].

Μερικά από τα σημαντικότερα και περισσότερο χρησιμοποιημένα είναι:

- Πολυ(L-γλουταμινικό οξύ).

Το πολυμερές αυτό φέρει στο μόριό του τις παράπλευρες αλυσίδες με τις καρβοξυλικές ομάδες του αμινοξέος, οι οποίες του προσδίδουν αυξημένη υδατοδιαλυτότητα,



αλλά και πολλές θέσεις πρόσδεσης. Επίσης, δεν έχει αναφερθεί ανοσογονικότητα για το μόριο αυτό [122]. Ένα πολύ σπουδαίο και πετυχημένο προφάρμακο δημιουργήθηκε από αυτή τη διαδικασία. Ο Li και οι συνεργάτες του ανέφεραν τη σύνθεση παραγώγου που η ταξόλη είχε προσδεθεί, κυρίως από τη C'-2 θέση, άλλα και από την C-7, ομοιοπολικά σε πολυμερές μοριακού βάρους 36 kDa σε ποσοστό 20% κατά βάρος [123]. Τα φυσικοχημικά του χαρακτηριστικά ήταν καταπληκτικά: υψηλή υδατοδιαλυτότητα (100 mg/ml), αργή απελευθέρωση της ταξόλης σε πλάσμα και δυνατότητα χορήγησης σε μεγαλύτερες δόσεις. Επιπλέον, έδειξε εξαιρετική δράση έναντι διαφόρων όγκων, ακόμα και σε μερικούς από αυτούς που έδειχναν αντίσταση στη θεραπεία με την ταξόλη [124].

- *Πολυ(αιθυλένο γλυκόλη).*

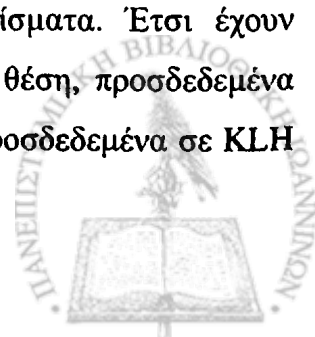
Είναι από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα πολυμερή εξαιτίας της υδροφιλικότητας του και της έλλειψης τοξικότητας. Έχουν αναφερθεί παράγωγα ταξόλης με την πολυ(αιθυλένο γλυκόλη) σε διάφορα μοριακά βάρη [125,126] των οποίων η δράση ήταν ανάλογη της ταξόλης. Η χρήση διαφόρων μορίων, κυρίως αμινοξέων, ως βραχίονες αύξησε την δράση *in vitro*, μείωσε τις παρενέργειες του φαρμάκου και είχε συγκρίσιμη δράση *in vivo* με την ταξόλη [127].

- *Πρωτεϊνικοί φορείς*

Πρωτεΐνες μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως μεταφορείς φαρμάκων. Τα κριτήρια για την επιλογή του κατάλληλου πρωτεϊνικού φορέα είναι η διαλυτότητά του, ο ικανοποιητικός αριθμός δραστικών ομάδων στις παράπλευρες αλυσίδες, ώστε να επιτευχθεί η πρόσδεση και η μικρή διασταυρωτή δράση (cross reactivity) με άλλες πρωτεΐνες. Στην περίπτωση στόχευσης καρκινικών κυττάρων προτιμώνται οι πρωτεΐνες του ορού του αίματος λόγω της συσσώρευσής τους στα καρκινικά κύτταρα [128].

Στη περίπτωση της ταξόλης έχουν αναφερθεί παράγωγα συνδεδεμένα με την C'-2 θέση της ταξόλης, μέσω της γλουταρηλοεξανοδιάμινο ομάδας με την τρανσφερίνη, γλυκοπρωτεΐνη του ορού, καθώς επίσης και με την αλβουμίνη, με τα αποτελέσματα όμως να μην είναι ενθαρρυντικά [129,130].

Η χρήση των πρωτεϊνών όμως είναι σπουδαία όσον αφορά την παραγωγή αντισωμάτων. Τα αντισώματα έναντι της ταξόλης μπορούν κάλλιστα να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη τεχνικών απομόνωσης από διάφορα φυτικά εκχυλίσματα. Έτσι έχουν αναφερθεί παράγωγα ταξόλης, κυρίως σουκινικά, τόσο από την C'-2 θέση, προσδεδεμένα στη BSA (Bovine Serum Albumin) πρωτεΐνη, όσο και από την C-7 προσδεδεμένα σε KLH



(Keyhole Limpet Haemocyanin) πρωτεΐνη [131,132]. Και στις δύο περιπτώσεις αναφέρθηκε η επιτυχής παραγωγή αντισωμάτων.

Η προσέγγιση αυτή για την παραγωγή αντισωμάτων έχει ορισμένα μειονεκτήματα καθώς:

- i. το μόριο-επίτοπος δεν αντιπροσωπεύει παρά μόνο ένα μικρό κλάσμα του μακρομορίου. Έτσι, εκτός από τα αντισώματα έναντι του μορίου, συχνά υπάρχει παραγωγή αντισωμάτων και έναντι της πρωτεΐνης, που σε πολλές περιπτώσεις είναι και τα περισσότερα.
- ii. δεν είναι δυνατό να υπολογιστεί επακριβώς ο αριθμός των moles του μορίου που προσδέθηκε στη πρωτεΐνη.
- iii. η ακριβής δομή του μορίου-επίτοπου μετά την πρόσδεσή του στη πρωτεΐνη δεν μπορεί να προσδιοριστεί.

Για την αντιμετώπιση των παραπάνω προβλημάτων έγινε προσπάθεια να συντεθούν ολιγοπεπτιδικοί φορείς, οι οποίοι δεν θα έχουν ανοσολογική απόκριση, θα φέρουν συγκεκριμένες θέσεις πρόσδεσης και δε θα επηρεάζουν τη διαμόρφωση και τη δράση του επιτόπου.

Το ζήτημα πρόσδεσης της ταξόλης σε ολιγοπεπτιδικούς φορείς απασχόλησε και την παρούσα διατριβή, οπότε κρίνεται απαραίτητο να γίνει μια μικρή αναφορά στους μέχρι σήμερα γνωστότερους και περισσότερο χρησιμοποιούμενους συνθετικούς φορείς.



8. ΣΥΝΘΕΤΙΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ

Οι συνθετικοί φορείς είναι μόρια πεπτιδικής φύσης που έχουν βιοχημικές και βιοϊατρικές εφαρμογές στα συνθετικά εμβόλια και στις ανοσοδιαγνωστικές τεχνικές ορών. Σήμερα, υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός συνθετικών φορέων, οι γνωστότεροι από τους οποίους είναι το δένδρο της λυσίνης (MAPs, Multiple Antigenic Peptides) [133-136], τα TAPs (Template Assembled Synthetic Proteins) [135-137] και οι Επαναλαμβανόμενοι Ολιγοπεπτιδικοί Φορείς SOC_n (Sequential Oligopeptide Carriers) [135,136,138-145].

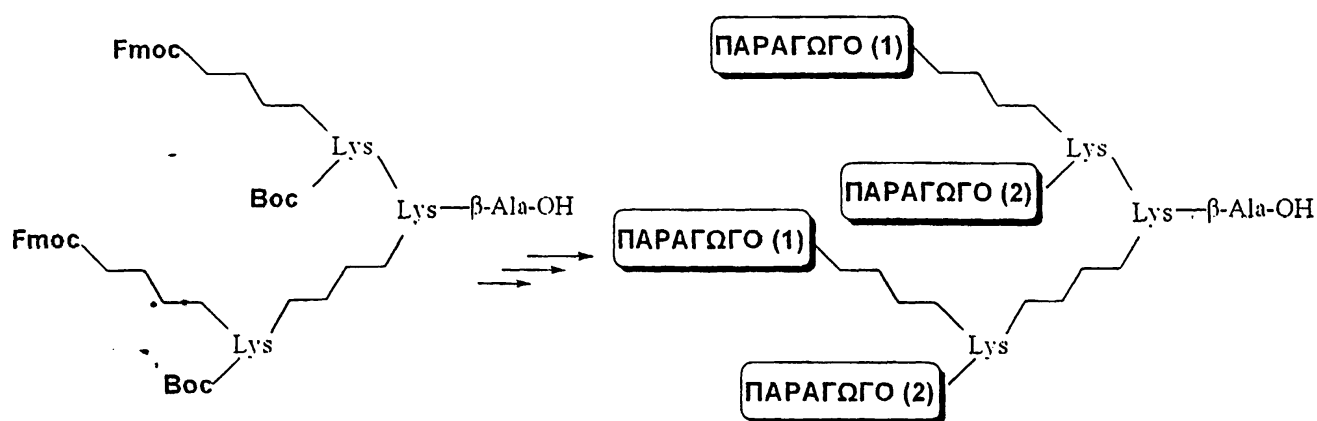
8.1. Φορέας πολλαπλών αντιγονικών πεπτιδίων (Multiple Antigenic Peptides, MAPs)

Η εισαγωγή της μεθοδολογίας των πολλαπλών αντιγονικών πεπτιδίων (MAPs) έγινε πρώτη φορά από τον J.P. Tam [133]. Στα MAPs, σε αντίθεση με τους πρωτεϊνικούς φορείς, υπάρχει μια μικρή δομική μονάδα η οποία έχει τη δυνατότητα να φέρει πολλά αντίγραφα του αντιγονικού πεπτιδίου. Αυτή αποτελείται:

- α) Ένα απλό αμινοξύ όπως είναι η γλυκίνη ή η β -αλανίνη, που παίζει το ρόλο του βραχίονα στη σύνθεση του σκελετού και
- β) Έναν διακλαδισμένο σκελετό ολιγολυσίνης, ο οποίος ποικίλλει, ανάλογα με τον αριθμό των λυσινών.

MAPs με δύο, τέσσερις, οκτώ ή δεκαέξι θέσεις πρόσδεσης μορίων είναι δυνατό να συντεθούν (σχήμα 8.1). Ο βέλτιστος αριθμός των διακλαδώσεων εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Σ' αυτούς συμπεριλαμβάνεται, μεταξύ των άλλων, η στεरिकή παρεμπόδιση που δημιουργείται κατά την πρόσδεση των μορίων στο φορέα, όπως επίσης, το μέγεθος και η διαμόρφωση των μορίων αυτών. Συνήθως, τέσσερις ή οκτώ θέσεις πρόσδεσης είναι αρκετές για να σχηματίσουν μια μήτρα μικρού μοριακού βάρους απαραίτητου για ικανοποιητική ανοσολογική απόκριση.





Σχήμα 8.1: Σχηματική αναπαράσταση των MAPs (δεύτερο επίπεδο διακλάδωσης, τέσσερις διαθέσιμες αμινομάδες).

Τα πλεονεκτήματα της χρήσης του δέντρου της λυσίνης είναι τα εξής:

- Η στοιχειομετρική αναλογία του πεπτιδίου πάνω στη μήτρα μπορεί πλήρως να προσδιοριστεί.
- Η πρωτοταγής δομή των MAPs, μπορεί να επιβεβαιωθεί με μεγάλη ακρίβεια χρησιμοποιώντας αναλυτικές μεθόδους, όπως ανάλυση αμινοξέων, εύρεση αλληλουχίας και φασματομετρία μάζας.
- Δεν είναι απαραίτητη η πρόσδεση σε πρωτεϊνικό φορέα που προκαλεί μερικές φορές ανεπιθύμητες ανοσολογικές αποκρίσεις.
- Η ποικιλία των προστατευτικών αμινομάδων επιτρέπει τον σχεδιασμό MAPs, έτσι ώστε στο τελευταίο επίπεδο του σκελετού της λυσίνης να διαχωριστούν εκλεκτικά οι α- από τις ε-αμινομάδες. Αυτό δίνει την δυνατότητα πρόσδεσης δύο διαφορετικών αντιγόνων στο ίδιο μόριο.

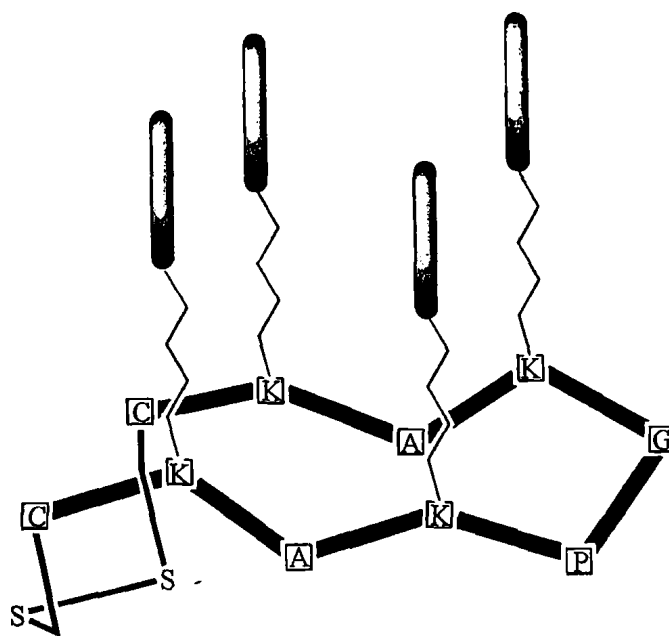
Παρόλα τα πλεονεκτήματα που παρέχουν τα MAPs υπάρχουν και κάποια μειονεκτήματα που δυσχεραίνουν τη χρήση τους. Αυτές έχουν να κάνουν κυρίως με την σύνθεση και τον καθαρισμό των MAPs ιδιαίτερα όταν αυξάνει ο αριθμός των διακλαδώσεων και το μέγεθος του μορίου που προσδένεται [146].

8.2. Το μοντέλο TASP (Template Assembled Synthetic Protein)

Μια εξίσου ενδιαφέρουσα περίπτωση συνθετικών φορέων, είναι αυτή των συστημάτων πρόσδεσης πεπτιδίων TASP, η οποία εισήχθη από τον Manfred Mutter και τους

συνεργάτες του [137]. Ο φορέας αυτός αποτελείται από ένα κυκλικό (S,S) δεκαπεπτίδιο που περιέχει τέσσερα μόρια λυσινών, με τις παράπλευρες αλυσίδες τους προσανατολισμένες στο ίδιο επίπεδο. Η πρόσδεση των μορίων γίνεται ομοιοπολικά και υπάρχει δυνατότητα –όπως με τα MAPs– να προσδεθούν τέσσερα ίδια ή διαφορετικά μόρια (σχήμα 8.2).

Νέες στρατηγικές με την εισαγωγή δύο λειτουργικών ομάδων, της αμινομάδας και της σουλφιδρυλομάδας, αυξάνουν την ικανότητα πρόσδεσης περισσότερων επιτόπων [147]. Επιπλέον, η δυνατότητα χρησιμοποίησης χημειοεκλεκτικής πρόσδεσης μορίων βελτιώνει την δυνατότητα σύνδεσης δομικά πολύπλοκων επιτόπων.



Σχήμα 8. 2: Σχηματική αναπαράσταση ενός μακρομορίου TASP.

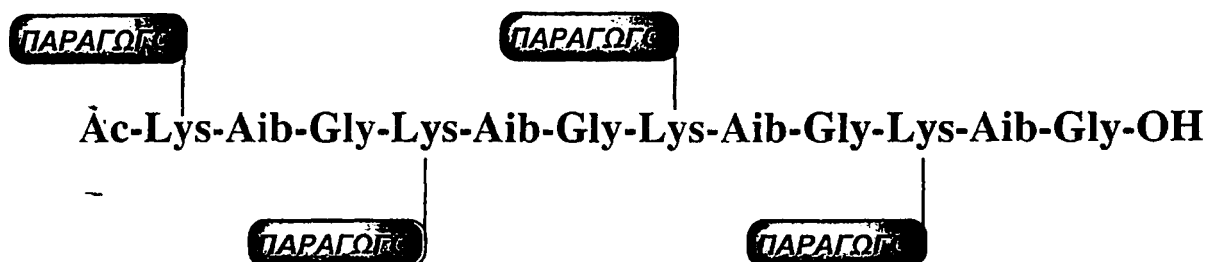
8.3. Επαναλαμβανόμενοι Ολιγοπεπτιδικοί Φορείς (Sequential Oligopeptide Carriers, SOC_n)

Ο επαναλαμβανόμενος ολιγοπεπτιδικός φορέας SOC_n-I αποτελείται από το διαδοχικό μοτίβο των τριών αμινοξέων Lys–Aib–Gly (σχήμα 8.3) και έχει γενικό τύπο Ac-(Lys–Aib–Gly)_n-OH. Ο σχεδιασμός των SOC_n [138,139] (Sequential Oligopeptide Carriers) είναι τέτοιος, ώστε οι επίτοποι που προσδένονται σε αυτόν να έχουν όσο το δυνατό λιγότερες αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους ή με τον ίδιο το φορέα. Γι' αυτό το λόγο τα αμινοξέα που επιλέχθηκαν ήταν:

- η λυσίνη ως το αμινοξύ στην N^ε ομάδα του οποίου γίνεται η ομοιοπολική πρόσδεση του επίτοπου.

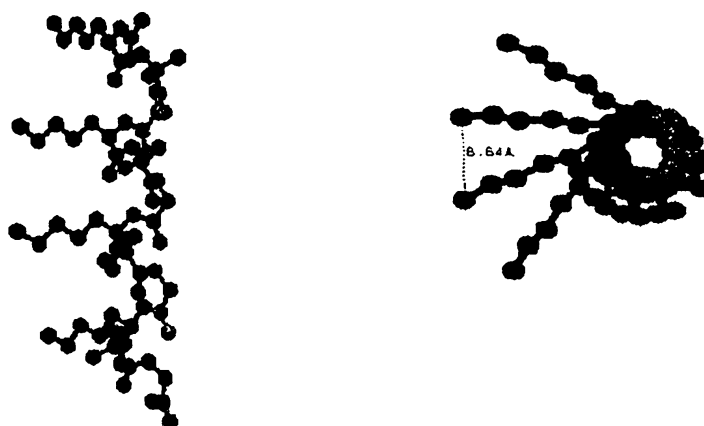


- το μη φυσικό αμινοξύ Aib (αμινοϊσοβουτυρικό οξύ) λόγω της τάσης του να επάγει ελικοειδή δομή στον πεπτιδικό σκελετό.
- η γλυκίνη η οποία επιλέχθηκε για το μικρό στερεοχημικό της όγκο.



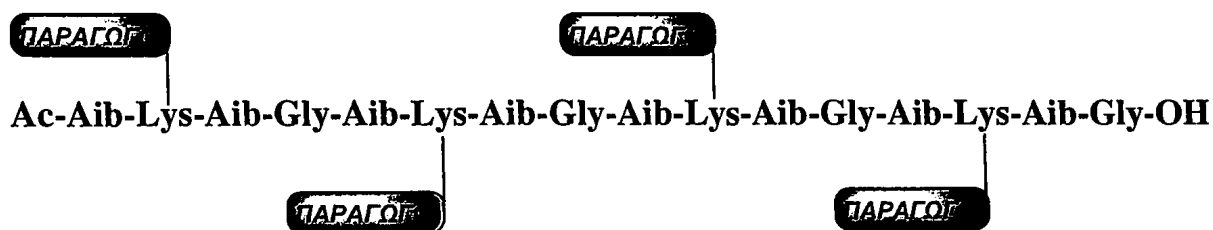
Σχήμα 8.3: Σχηματική αναπαράσταση ενός μακρομορίου SOC_4-I . Στις ε-αμινομάδες των λυσινών προσδένονται ομοιοπλικά τα αντιγονικά πεπτίδια.

Επιβεβαίωση του σχεδιασμού συνήγαγαν οι διαμορφωτικές μελέτες με 1H -NMR που έδειξαν ότι ο φορέας προσλαμβάνει δομή 3_{10} -κεκαμένης έλικας [140,141] (σχήμα 8.4). Η δομή αυτή επιτρέπει στις παράπλευρες αλυσίδες των λυσινών να διευθετούνται με τέτοιο τρόπο στο χώρο ώστε να μην αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Η κανονικότητα της δομής του μορίου του φορέα, καθώς και η απουσία διαμορφωτικών περιορισμών και στερικών παρεμποδίσεων [140,141] ευνοούν μια βέλτιστη αναγνώριση από αντισώματα και δημιουργούν ισχυρά ανοσογόνα.



Σχήμα 8.4: Η ελαχιστοποιημένη δομή του φορέα SOC_4-I .

Ο φορέας $\text{SOC}_n\text{-II}$, αποτελείται από το επαναλαμβανόμενο τετραπεπτίδιο Aib-Lys-Aib-Gly (σχήμα 8.5) και έχει αυξημένο ελικοειδή χαρακτήρα σε σύγκριση με τον φορέα $\text{SOC}_n\text{-I}$. Η διαμορφωτική μελέτη του νέου αυτού φορέα έδειξε ότι λαμβάνει δομή κανονικής 3_{10} έλικας λόγω αυξημένου ποσοστού Aib στην πεπτιδική αλληλουχία [148].

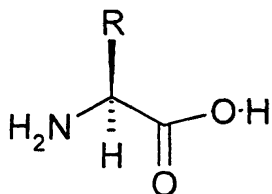


Σχήμα 8.5: Σχηματική αναπαράσταση ενός μακρομορίου $\text{SOC}_4\text{-II}$. Στις N^ϵ -αμινομάδες των λυσινών προσδένονται ομοιοπολικά τα παράγωγα...

9. ΠΕΠΤΙΔΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ

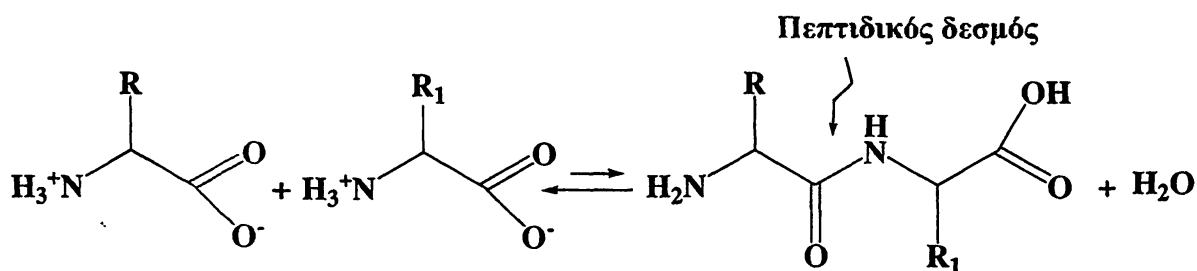
9.1. Εισαγωγή

Τα αμινοξέα αποτελούν τα δομικά συστατικά των πεπτιδίων και των πρωτεϊνών. Τα αμινοξέα που συναντώνται στις πρωτεΐνες είναι είκοσι, έχουν οπτική ενεργότητα και είναι L εναντιομερή και S στερεοχημικής διάταξης (εκτός της γλυκίνης). Έχουν τον γενικό τύπο :



όπου R είναι μια διαφορετική ομάδα για κάθε αμινοξύ που λέγεται παράπλευρη αλυσίδα, γιατί δεν συμμετέχει στον πεπτιδικό δεσμό. Τα 20 αμινοξέα (μαζί με τις συντομογραφίες) φαίνονται στον πίνακα 9.1.

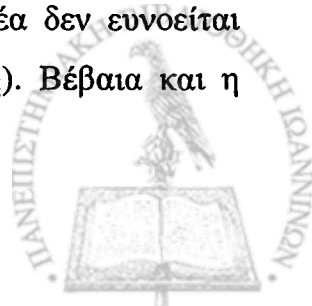
Ο σχηματισμός ενός πεπτιδικού δεσμού (ονομάζεται και αμιδικός) μεταξύ δύο αμινοξέων επιτυγχάνεται με πυρηνόφιλη προσβολή της αμινομάδας του ενός, στον καρβονυλικό άνθρακα του άλλου. Ως αποτέλεσμα της αντίδρασης δύο αμινοξέων προκύπτει ο σχηματισμός ενός διπεπτιδίου με παράλληλη απώλεια νερού και πραγματοποιείται σύμφωνα με την αντίδραση (σχήμα 9.1) [149]:



Σχήμα 9.1: Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού.

Η διαδικασία αυτή σχηματισμού ενός αμιδικού δεσμού μεταξύ δύο αμινοξέων καλείται σύζευξη (coupling).

Η ισορροπία αυτής της αντίδρασης βρίσκεται στην πλευρά της υδρόλυσης παρά της σύνθεσης. Επομένως, ο σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού από δύο αμινοξέα δεν ευνοείται θερμοδυναμικά και απαιτεί κατανάλωση ενέργειας (ενδόθερμη αντίδραση). Βέβαια και η



αντίδραση της υδρόλυσης είναι μια γενικά πολύ αργή διαδικασία με αποτέλεσμα τα πεπτίδια να θεωρούνται γενικά σταθερά σε υδατικά διαλύματα.

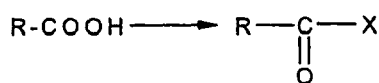
Πίνακας 9.1. Τα 20 αμινιξέα.

Γλυκίνη Gly, G	Αλανίνη Ala, A	Βαλίνη Val, V	Λευκίνη Leu, L	Ισολευκίνη Ile, I
Φαιλυναλανίνη Phe, F	Αργινίνη Arg, R	Λυσίνη Lys, K	Ασπαρτικό Asp, D	Γλουταμινικό Glu, E
Σερίνη Ser, S	Θρεονίνη Thr, T	Τυροσίνη Tyr, Y	Κυστεΐνη Cys, C	Μεθειονίνη Met, M
Προλίνη Pro, P	Ιστιδίνη His, H	Ασπαραγίνη Asn, N	Γλουταμίνη Gln, Q	Τρυπτοφάνη Trp, W

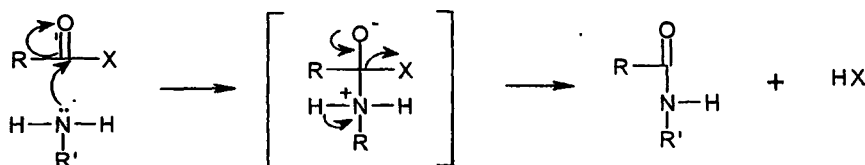
Για να πραγματοποιηθεί λοιπόν μια αντίδραση σύζευξης θα πρέπει να μετατραπεί η καρβοξυλομάδα του ενός αμινοξέος σε ένα ενδιάμεσο μεγάλης δραστηριότητας, ώστε να διευκολύνεται η πυρηνόφιλη προσβολή της αμινομάδας του αμινοξέος που πρόκειται να ακυλωθεί [150]. Η ενεργοποίηση λαμβάνει χώρα με τη χρησιμοποίηση ενός δέκτη ηλεκτρονίων X, ο οποίος αντικαθιστώντας την ομάδα -OH, αυξάνει την πολικότητα του

καρβονυλίου και επομένως του ηλεκτρονιόφιλου χαρακτήρα του ατόμου άνθρακα (σχήμα 9.2).

Ενεργοποίηση :



Σύζευξη :



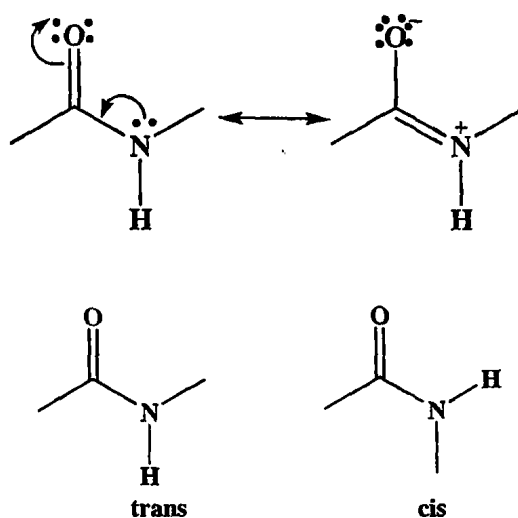
Σχήμα 9.2: Η αντίδραση ενεργοποίησης ενός αμινοξέος και η σύζευξή του με ένα άλλο.

9.2. Χαρακτηριστικά του πεπτιδικού δεσμού.

Κρυσταλλογραφικές μελέτες με ακτίνες X για τον προσδιορισμό της λεπτομερούς δομής των αμινοξέων και των πεπτιδίων έδειξαν πως η πεπτιδική ομάδα αποτελεί μια άκαμπτη και επίπεδη μονάδα, καθώς και μια σχετικά μικρή απόσταση του καρβονυλικού άνθρακα και του αζώτου. Αυτό αποδόθηκε στο μερικό χαρακτήρα διπλού δεσμού που έχει ο αμιδικός δεσμός (1,32 Å) [151]. Δεν υπάρχει ελευθερία στροφής γύρω από το δεσμό του καρβονυλικού ατόμου άνθρακα και του αζώτου στην πεπτιδική μονάδα.

Για το λόγο αυτό, ο πεπτιδικός δεσμός χαρακτηρίζεται από μεσομέρεια, η οποία και οδηγεί στην ύπαρξη δύο ισομερών μορφών, cis και trans. Η cis διάταξη είναι λιγότερο σταθερή αφού υπάρχει ένα αξιοσημείωτο φράγμα ενεργείας μεταξύ των cis και trans μορφών γενικά επικρατεί η trans μορφή. Εξαιρέση αποτελεί η προλίνη για την οποία ο πεπτιδικός δεσμός είναι δυνατόν να πάρει την cis ή την trans διαμόρφωση (σχήμα 9.3).





Σχήμα 9.3: Μεσομέρεια των *cis* και *trans* μορφών του πεπτιδικού δεσμού.

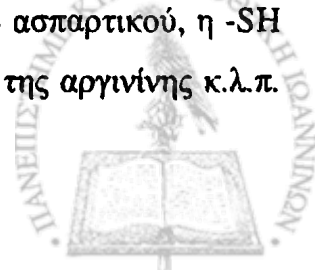
9.3. Στάδια πεπτιδικής σύνθεσης.

Μια πεπτιδική σύνθεση για να είναι επιτυχής προϋποθέτει:

- ✦ Παροδική προστασία της α-αμινομάδας του N-τελικού αμινοξέος με κατάλληλη ομάδα Υ, η οποία μειώνει τον πυρηνόφιλο χαρακτήρα της. Χαρακτηριστικό γνώρισμα αυτής της ομάδας πρέπει να είναι η σταθερότητά της κατά τη διάρκεια της σύζευξης, καθώς και η εύκολη απομάκρυνσή της σε συνθήκες που δεν καταστρέφουν τον πεπτιδικό δεσμό. Επίσης, οι ομάδες αυτές δεν πρέπει να αλλοιώνουν τη στεreoχημεία του αμινοξέος ή του πεπτιδίου. Κοινό στοιχείο των α-αμινοπροστατευτικών ομάδων είναι ότι ανήκουν στην κατηγορία των καρβαμιδικών εστέρων-ουρεθάνων, οι οποίες έχει βρεθεί ότι ελαχιστοποιούν την ρακεμίσωση του α-ασύμμετρου ατόμου άνθρακα.

- ✦ Παροδική προστασία του α-καρβοξυλίου του C-τελικού αμινοξέος. Γίνεται συνήθως με μετατροπή σε εστέρα της καρβοξυλομάδας (μεθυλ, αιθυλ, *tert*-βουτυλ, βενζυλ εστέρας). Το στάδιο αυτό απαιτείται στη σύνθεση πεπτιδίων στην υγρή φάση, ενώ δεν είναι απαραίτητο στη σύνθεση πεπτιδίων στη στερεά φάση, στην οποία το C-τελικό αμινοξύ είναι συζευγμένο στο πολυμερές μέσω της καρβοξυλικής ομάδας.

- ✦ Ημιμόνιμη προστασία των δραστικών ομάδων στις παράπλευρες αλυσίδες των αμινοξέων, όπως για παράδειγμα η ε-NH₂ της λυσίνης, το β-COOH του ασπαρτικού, η -SH της κυστεΐνης, το -OH της σερίνης και της τυροσίνης, η γουανινομάδα της αργινίνης κ.λ.π.



Χαρακτηριστικό γνώρισμα και αυτής της ομάδας πρέπει να είναι η σταθερότητά της κατά τη σύζευξη, αλλά και κατά την αποπροστασία της α-αμινομάδας.

✚ Σχηματισμός του πεπτιδικού δεσμού. Γίνεται με ενεργοποίηση του COOH του N-τελικού αμινοξέος και σύζευξη με την αμινομάδα του άλλου.

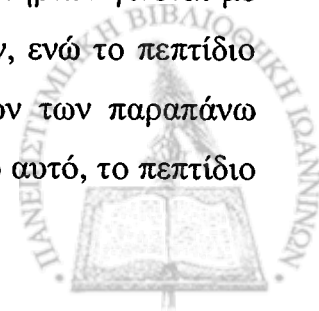
✚ Απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων. Γίνεται μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης σε συνθήκες που δεν καταστρέφουν τον πεπτιδικό δεσμό.

Η σύνθεση των πεπτιδίων μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε σε στερεή, είτε σε υγρή φάση. Η σύνθεση σε υγρή φάση παρουσιάζει αρκετά μειονεκτήματα, ιδιαίτερα στην περίπτωση πεπτιδίων σχετικά μεγάλου μήκους. Κατά την διάρκεια αυτής, καθίσταται αναγκαία η απομόνωση, ο καθαρισμός και η ταυτοποίηση των ενδιάμεσων προϊόντων σε κάθε βήμα της σύνθεσης. Τέτοιου είδους προβλήματα αντιμετωπίστηκαν επαρκώς με την εισαγωγή του πολυμερικού υποστρώματος και την ανάπτυξη της σύνθεσης σε στερεά φάση.

9.4. Σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση

Η σύνθεση των πεπτιδίων στη στερεή φάση συνέβαλε σημαντικά στην αποφυγή πολλών προβλημάτων που υπήρχαν κατά την σύνθεση των πεπτιδίων σε υγρή φάση. Πρωτεργάτης της πρωτοποριακής αυτής ιδέας, η οποία σήμανε την έναρξη μιας νέας εποχής για την πεπτιδική σύνθεση, ήταν ο R. B. Merrifield (1963), ο οποίος πρότεινε την σύνθεση ολόκληρου του πεπτιδίου πάνω σε ένα αδιάλυτο πολυμερικό υπόστρωμα (ρητίνη) [152-154].

Ξεκινώντας την σύνθεση ενός πεπτιδίου σε στερεή φάση, το C-τελικό αμινοξύ του πεπτιδίου που πρόκειται να συντεθεί προσδένεται ομοιοπολικά στο πολυμερές, μέσω ενός εστερικού ή αμιδικού δεσμού, με την N^α-αμινομάδα του, καθώς και την παράπλευρη αλυσίδα (εάν είναι απαραίτητο) του ορθογωνικά προστατευμένες. Ο όρος ορθογωνικότητα, παραπέμπει στην παράλληλη προστασία δραστικών ομάδων στο ίδιο μόριο, δίνοντας όμως την δυνατότητα εκλεκτικής απομάκρυνσης μιας εξ αυτών, χωρίς να επηρεάζεται η σταθερότητα των υπολοίπων προστατευτικών ομάδων. Ακολουθεί η αποπροστασία της N^α-αμινομάδας και η προσθήκη του ενεργοποιημένου δεύτερου αμινοξέος (κατάλληλα προστατευμένου) με σκοπό την σύζευξή του και την επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας. Η απομάκρυνση των παραπροϊόντων, αλλά και της περίσσειας των αντιδραστηρίων γίνεται με απλή έκπλυση και διήθηση με τη χρήση κατάλληλων οργανικών διαλυτών, ενώ το πεπτίδιο παραμένει προσδεδεμένο πάνω στο πολυμερές. Με την επανάληψη όλων των παραπάνω βημάτων, ολοκληρώνεται η σύνθεση του επιθυμητού πεπτιδίου. Στο σημείο αυτό, το πεπτίδιο



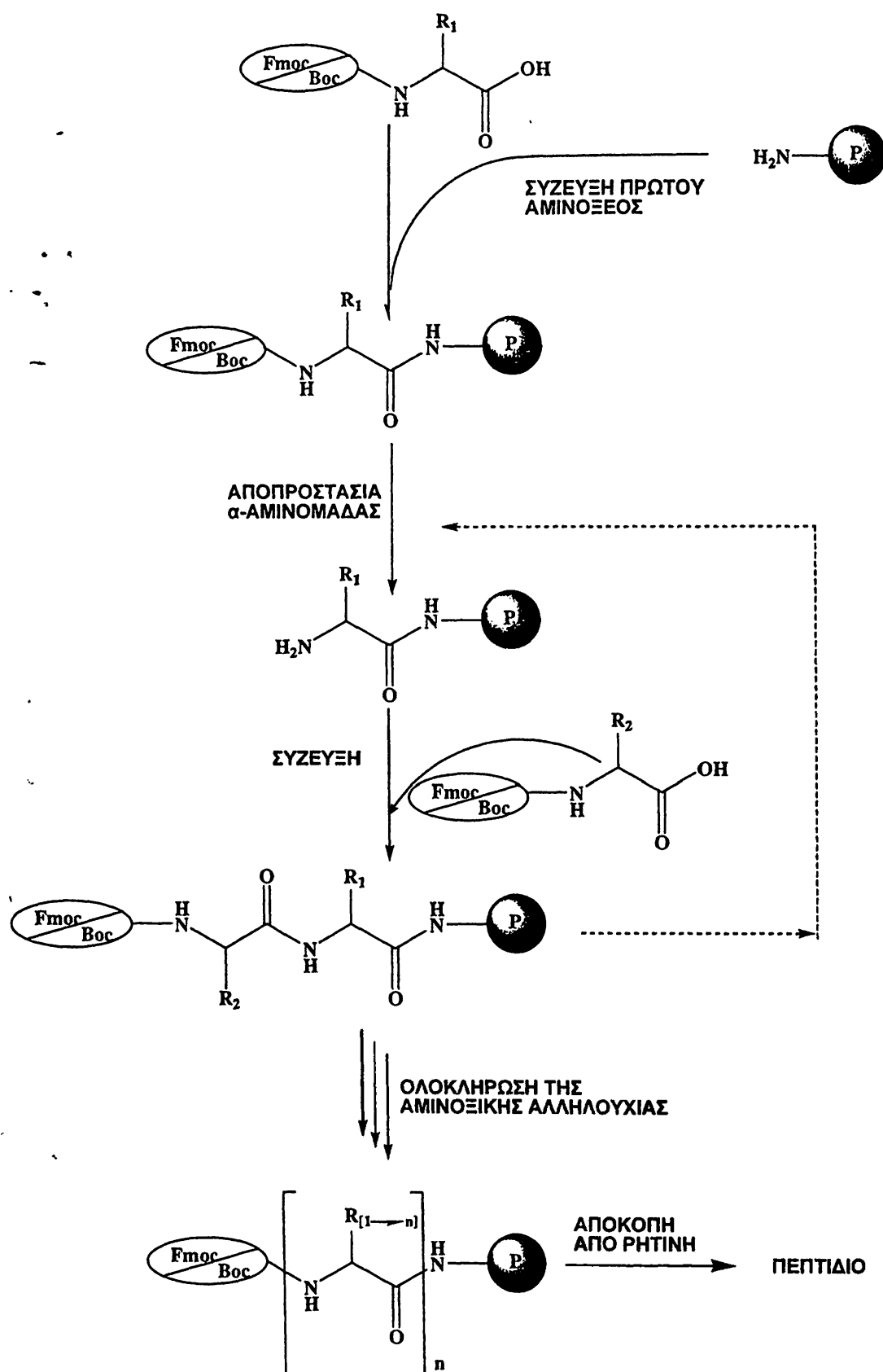
αποκόπτεται από τη ρητίνη με τη χρήση κατάλληλου αντιδραστηρίου (συνήθως κάποιο πολύ ισχυρό οξύ π.χ άνυδρο HF). Σχηματικά τα στάδια της σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση δίδονται στο σχήμα 9.4.

Τα μειονεκτήματα της μεθόδου, μπορούν να συνοψιστούν στα εξής:

- Η ταυτοποίηση του πεπτιδίου γίνεται ουσιαστικά στο τελικό προϊόν, δηλαδή μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης.
- Μη ποσοτική αποπροστασία της N^α-αμινομάδας θα δημιουργούσε στην πορεία, μια σειρά από παραπροϊόντα, δυσχεραίνοντας σημαντικά την λήψη ενός καθαρού τελικού προϊόντος.
- Επίσης, η μη ποσοτική αντίδραση σύζευξης, εκτός από τις σημαντικές απώλειες στην απόδοση, θα μπορούσε να επιφέρει εξίσου πολλά προβλήματα, σε ότι αφορά την καθαρότητα του τελικού προϊόντος.

Παρόλα αυτά, τα πλεονεκτήματα της σύνθεσης των πεπτιδίων σε στερεή φάση, είναι σαφώς πολύ περισσότερα από τα μειονεκτήματα της μεθόδου, με αποτέλεσμα σήμερα να χρησιμοποιείται ευρύτατα και με πολύ μεγάλη επιτυχία.





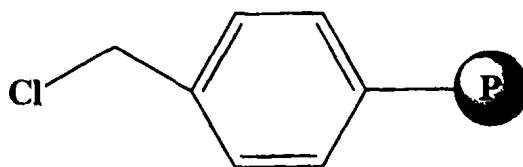
Σχήμα 9.4: Σχηματική παράσταση των σταδίων της σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση.

9.4.1. Το στερεό πολυμερές υπόστρωμα

Ένα στερεό πολυμερές που θα χρησιμοποιηθεί σε μια πεπτιδική σύνθεση, πρέπει να έχει ορισμένες φυσικές και χημικές ιδιότητες, ώστε να επιτευχθούν ποσοτικές αντιδράσεις με υψηλές αποδόσεις και όσο το δυνατό λιγότερες απώλειες. [154]. Έτσι, τα σωματίδια (κόκκοι) του πολυμερούς πρέπει :

- ✚ να έχουν κατάλληλο σχήμα και μέγεθος, ώστε η πρόσβαση των αμινοξέων προς τις δραστικές ομάδες να είναι εύκολη
- ✚ να φέρουν αρκετά ικανό αριθμό δραστικών ομάδων
- ✚ οι δραστικές αυτές ομάδες να αντιδρούν ομοιοπολικά με το καρβοξύλιο του πρώτου προς σύζευξη αμινοξέος, να δημιουργούν δεσμό ανθεκτικό στις αντιδράσεις επιμήκυνσης της πεπτιδικής αλυσίδας, αλλά ικανό να αποκόπτεται εκλεκτικά στο τέλος της σύνθεσης, χωρίς να επηρεάζει τους πεπτιδικούς δεσμούς
- ✚ να είναι χημικά αδρανές στις συνθήκες της σύνθεσης στους οργανικούς διαλύτες που χρησιμοποιούνται σε αυτή
- ✚ να διογκώνεται με τους διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην SPPS και να επιτρέπει την εύκολη διεύθυνση των αντιδραστηρίων στα σωματίδια καθώς και την εύκολη απομάκρυνση της περίσσειας αυτών και των παραπροϊόντων της αντίδρασης.

Η πρώτη επιτυχημένη ρητίνη που αναφέρθηκε ήταν η ρητίνη του Merrifield που αποτελείται από το συμπολυμερές στυρολίου –διβινυλοβενζολίου και την δραστική χλωρομέθυλο ομάδα (σχήμα 9.5). Η τελευταία, σε αντίδραση με το άλας του N^α-προστατευμένου αμινοξέος οδηγεί στην ομοιοπολική πρόσδεση του με την ρητίνη με εστερικό δεσμό.



Σχήμα 9.5: Η ρητίνη Merrifield.

Έκτοτε, έγιναν προσπάθειες ανεύρεσης καινούργιων πολυμερών με βελτιωμένες φυσικοχημικές ιδιότητες, κυρίως ως προς τη σταθερότητα του δεσμού πρόσδεσης του πεπτιδίου με το πολυμερές, τον ευκολότερο τρόπο αποκοπής του, την τροποποίηση του C-τελικού άκρου του πεπτιδίου κατά την αποκοπή (είτε ως αμίδιο είτε σαν εστέρα), καθώς

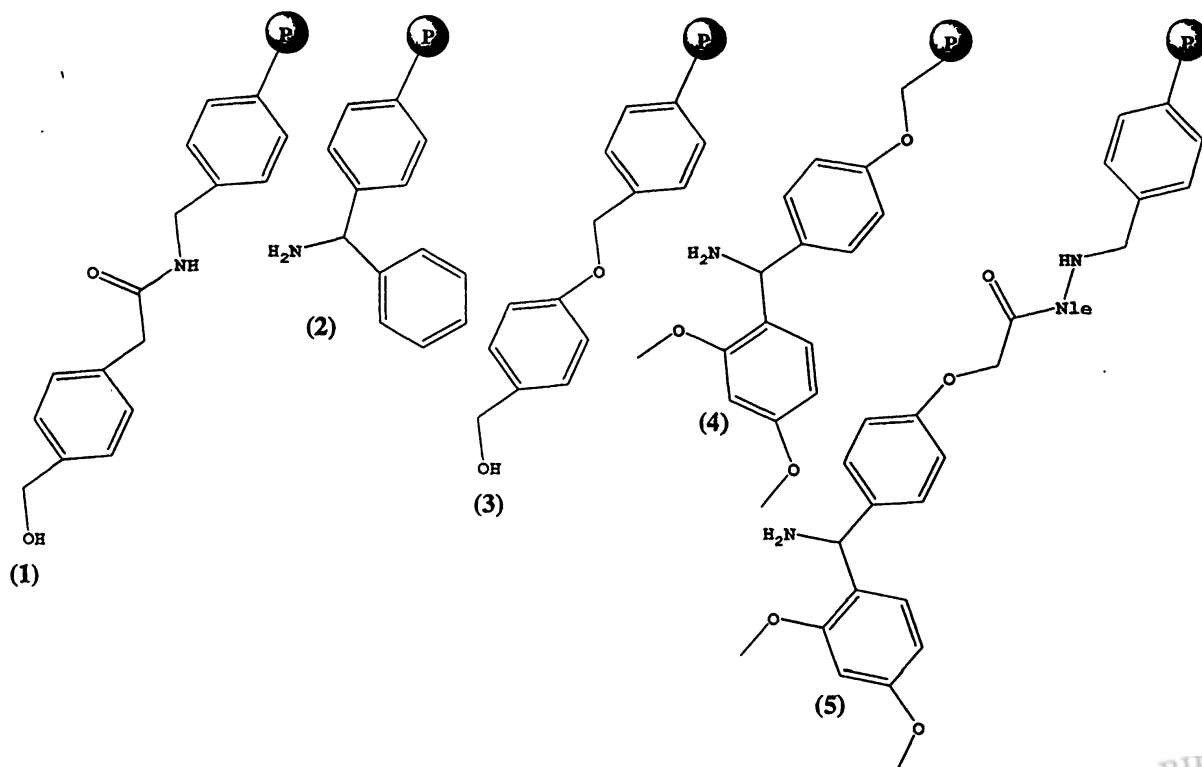
και την αύξηση του χώρου του πλέγματος, ιδιαίτερα για την σύνθεση πεπτιδίων με μεγάλες σε μήκος αλληλουχίες [155]. Έτσι προέκυψαν ρητίνες όπως :

► η φαινυλακεταμιδομεθυλο ρητίνη (PAM resin) (1), η οποία λόγω της παρουσίας της φαινυλακεταμιδο ομάδας, παρέχει αυξημένη σταθερότητα στον εστερικό δεσμό με το C-τελικό αμινοξύ, ως προς τα οξέα, ενώ παράλληλα αυξάνει τον χώρο μεταξύ του πλέγματος και της πεπτιδικής αλυσίδας [156].

► με χρήση βενζυδρυλάμινο ομάδας στην ρητίνη έγινε δυνατή η απόσπαση του πεπτιδίου, με το C-τελικό κατάλοιπο τροποποιημένο ως αμίδιο (MBHA resin) (2) [157].

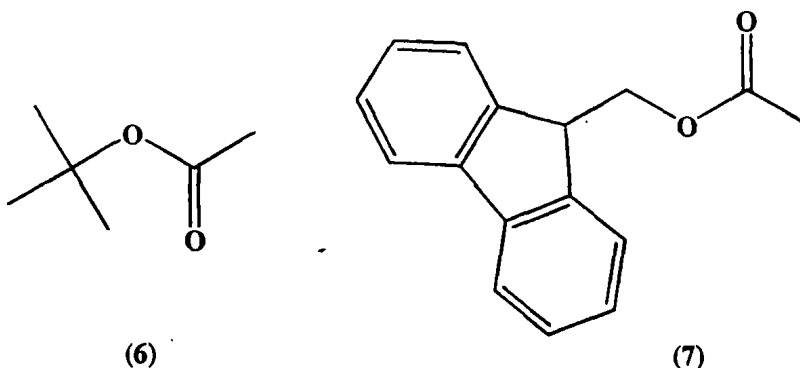
► ρητίνες που είναι σταθερές σε βασικές συνθήκες, ενώ το πεπτίδιο αποσπάται από το πολυμερές με επίδραση αραιού οξέος, όπως η p-αλκοξυβενζυλοξυβενζυλο-ρητίνη (Wang resin) (3) [158].

► η Rink Amide ρητίνη (4) {4-[2',4'-διμεθοξυ-φαινυλ-(9-φλουορενυλμεθοξυκαρβονυλ) αμινομεθυλ]-φαινοξύ} ευαίσθητη και αυτή στα οξέα και χρησιμοποιείται για τη σύνθεση πεπτιδίων σε αμιδική μορφή [159]. Η χρήση μορίου-βραχίονα συνεισφέρει στη σταθερότητα του πολυμερούς, δίνοντας την Rink Amide AM ρητίνη (5).



9.4.2. Προστασία και αποπροστασία α-αμινομάδας

Η προστασία της α-αμινομάδας των αμινοξέων και των πεπτιδίων που θα αντιδράσουν προς δημιουργία του πεπτιδικού δεσμού κρίνεται απαραίτητη ώστε να αποφεύγεται η εμπλοκή της ομάδας αυτής σε παράπλευρες αντιδράσεις και δημιουργία παραπροϊόντων. Όπως ειπώθηκε και παραπάνω, η προστασία αυτή πρέπει να είναι παροδική, δηλαδή να είναι σταθερή κατά την διάρκεια της σύζευξης και να απομακρύνεται εύκολα για την προσθήκη του επόμενου αμινοξέος. Οι ομάδες που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι η *tert*-βουτυλοξυκαρβονυλομάδα (Boc) (6) [160], που είναι ευαίσθητη στα οξέα και η 9-φλουορενυλομεθυλοκαρβονυλομάδα (Fmoc) (7) [161], ομάδα ευαίσθητη σε βάσεις. Οι δύο ομάδες, σε συνδυασμό με τις κατάλληλες ρητίνες και τις συμβατές προστατευτικές ομάδες των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων, αποτελούν τις δυο στρατηγικές σύνθεσης πεπτιδίων στην στερεά φάση- Boc/Bzl και Fmoc/*t*Bu

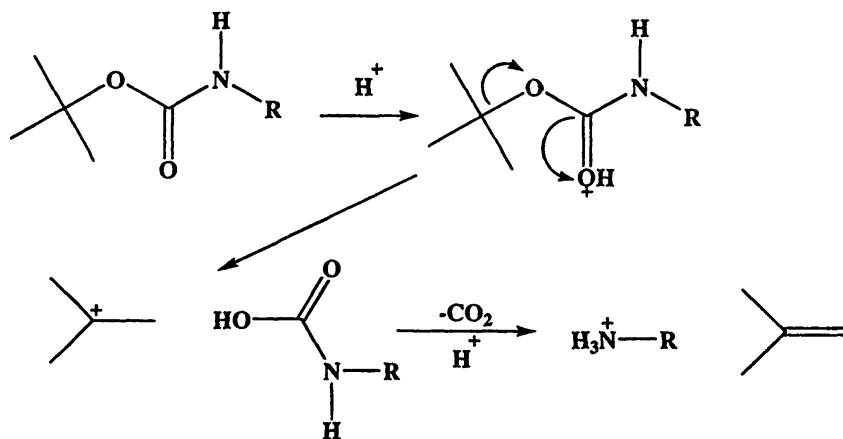


Η Boc ομάδα εισάγεται εύκολα στα αμινοξέα με την χρήση δι-*t*-βουτυλο δι-ανθρακικού εστέρα (Boc)₂O [162] ή με την χρήση 2-*t*-βουτυλοξυκαρβονυλοξιμινο-2-φαινυλακετονιτρίλιο BocON [163]. Η Fmoc ομάδα αντίστοιχα εισάγεται με τη χρήση N-(9-φλουορενυλο-μεθοξυκαρβονυλοξυηλεκτριμίδιο) (FmocOSu) [164] και 9-φλουορενυλο-μεθοξυκαρβονυλο-χλωρίδιο (FmocCl) [165].

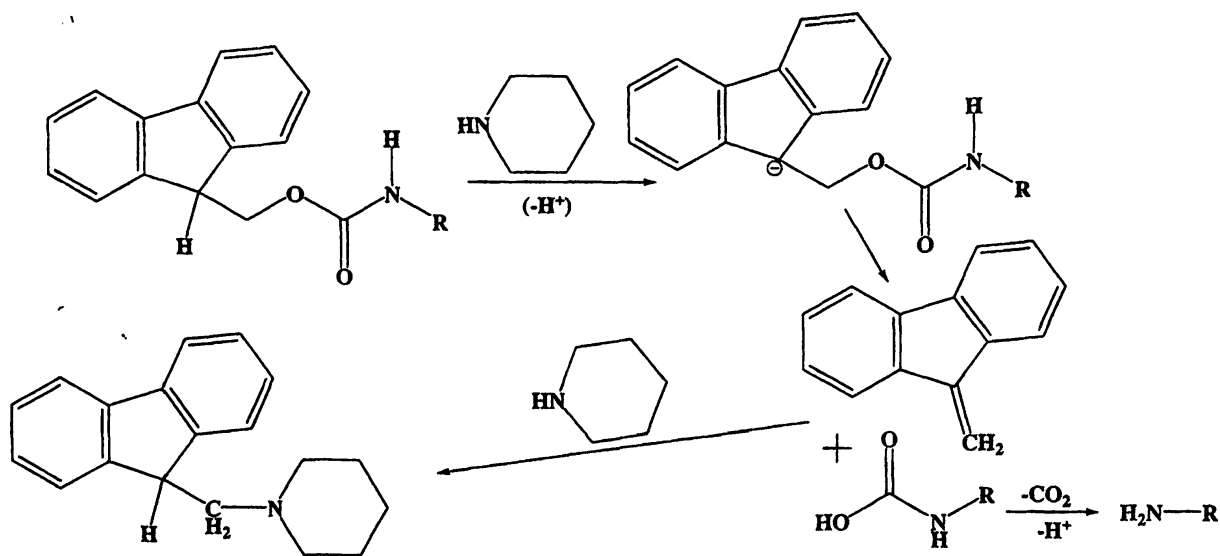
Αναφέρθηκε ήδη ότι η Boc ομάδα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στα οξέα. Συνεπώς η απομάκρυνση της γίνεται με κατεργασία με ασθενή οξέα, όπως το τριφθοροξικό οξύ (40% TFA σε CH₂Cl₂), καθώς επίσης και με άλλα όξινα αντιδραστήρια όπως HCl σε διοξάνη. Η αποπροστασία της N^α-αμινομάδας με τις παραπάνω συνθήκες έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία τριφθοροξικού άλατος, η εξουδετέρωση του οποίου γίνεται με διάλυμα διϊσοπροπυλαιθυλαμίνης (DIEA) σε DCM (7-10% v/v) (σχήμα 9.6).

Αντίστοιχα, η απομάκρυνση της Fmoc ομάδας είναι εφικτή παρουσία ασθενών βάσεων σε ήπιες συνθήκες, συνήθως με κατεργασία με διάλυμα 20% πιπεριδίνης σε DMF

(σχήμα 9.7). Η Fmoc ομάδα απομακρύνεται από την αμινο ομάδα με απόσπαση πρωτονίου παρουσία δευτεροταγών αμινών. Δημιουργείται ένα καρβαμικό οξύ, το οποίο στην συνέχεια απελευθερώνει διοξείδιο του άνθρακα και παρέχει την ελεύθερη αμίνη. Το κυριότερο πλεονέκτημα της Fmoc προστατευτικής ομάδας έναντι της Boc είναι το γεγονός ότι οι αμινομάδες λαμβάνονται κατευθείαν στην αποπρωτονιωμένη μορφή, παραλείποντας έτσι το στάδιο της εξουδετέρωσης.



Σχήμα 9.6: Αντίδραση απομάκρυνσης της N-Boc προστατευτικής ομάδας.



Σχήμα 9.7: Αντίδραση απομάκρυνσης της N-Fmoc προστατευτικής ομάδας.

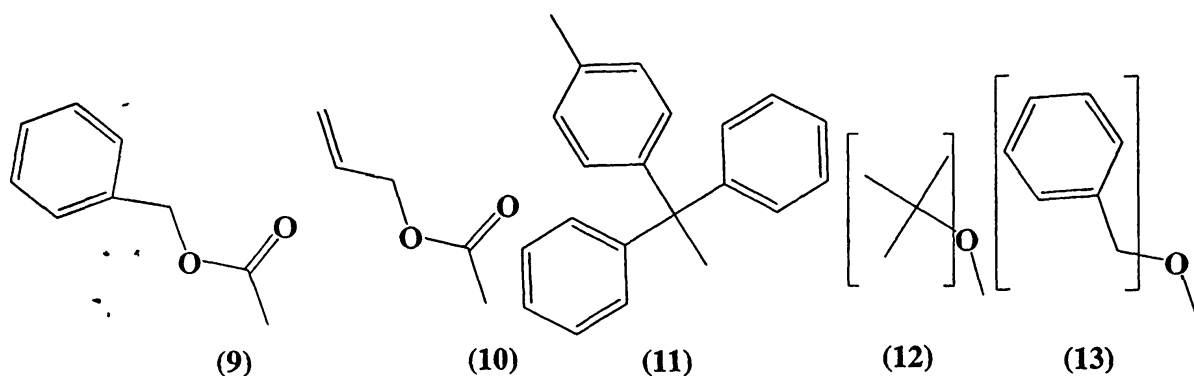
9.4.3. Προστασία των παράπλευρων δραστικών ομάδων των αμινοξέων

Με σκοπό να εμποδιστεί η διακλάδωση της επιμηκυνόμενης πεπτιδικής αλυσίδας είναι απαραίτητο να προστατευθούν οι δραστικές ομάδες των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων. Επιπλέον, πρέπει να ληφθεί υπόψη η στρατηγική που ακολουθείται κάθε φορά έτσι ώστε οι προστατευτικές ομάδες των παράπλευρων αλυσίδων να είναι σταθερές στις συνθήκες δημιουργίας του πεπτιδικού σκελετού. Υπάρχει λοιπόν ένας μεγάλος αριθμός προστατευτικών ομάδων για τις δραστικές ομάδες των παραπλεύρων αλυσίδων των αμινοξέων.

Ξεκινώντας από την προστασία της N^{ϵ} -αμινομάδας της λυσίνης, η Boc-Fmoc ομάδες που αναφέρθηκαν παραπάνω τηρούν τους κανόνες ορθογωνικότητας και μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλάξ στις N^{α} και N^{ϵ} αμινομάδες, ανάλογα την στρατηγική της σύνθεσης. Επιπλέον, στη Boc στρατηγική χρησιμοποιείται η βενζυλοξυ-καρβονυλομάδα (καρβοβενζοξυ, **Cbz** ή **Z** ομάδα) (9) [166], που προτάθηκε από τους Bergmann και Zervas, η οποία απομακρύνεται είτε με ισχυρά όξινες συνθήκες είτε με καταλυτική υδρογόνωση. Με καταλυτική υδρογόνωση απομακρύνεται και η αλλυλοξυκαρβόνυλο (**alloc**) ομάδα (10) [167], που είναι συμβατή και με τις δυο στρατηγικές. Τέλος, στην Fmoc στρατηγική χρησιμοποιείται και η Mtt ομάδα (11) [168], η οποία μπορεί να απομακρυνθεί από την πεπτιδορητίνη με ελαφρώς όξινες συνθήκες, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα συνέχισης της σύνθεσης από την N^{ϵ} αμινομάδα της λυσίνης.

Για τα καρβοξύλια του γλουταμινικού και του ασπαρτικού, ο γενικός τρόπος προστασίας τους είναι η εστεροποίηση. Έτσι η τερτ-βουτυλόξυ (**tBuO**) (12) [169] για την Fmoc και η βενζυλοξυομάδα (**OBzl**) (13) [170], για την Boc στρατηγική είναι οι πιο συνηθισμένες. Ανάλογες ομάδες χρησιμοποιούνται και για την προστασία των υδροξυλομάδων της σερίνης, της τυροσίνης και της θρεονίνης, η τερτ-βουτυλ (**tBu**) ([12]) [171] και η βενζυλομάδα (**Bzl**) ([13]) [172] με την δημιουργία αιθέρα αυτή τη φορά. Το δευτεροταγές πάντως υδροξύλιο της θρεονίνης παραμένει ως επί το πλείστον ανεπηρέαστο κατά την διάρκεια της σύνθεσης και λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης από τη μεθυλενομάδα.

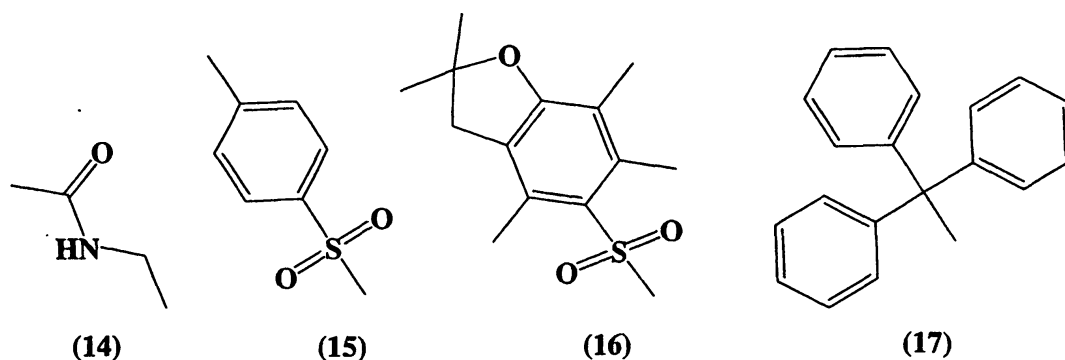




Μη απαραίτητη θεωρείται και η προστασία του θειαιθέρα της μεθειονίνης, σε αντίθεση με την σουφυδρυλομάδα της κυστεΐνης, της οποίας η πυρινοφιλία δε μπορεί να αγνοηθεί όταν πρόκειται για αντιδράσεις ακυλίωσης, όπως συμβαίνει στην σύζευξη. Επίσης, έχουν ισχυρή τάση να αφυδρογονώνονται προς δισουλφίδια ακόμα και με την απλή παρουσία αέρα. Η ακετάμιδο ομάδα (**acm**) (14) [173] είναι μια προστασία συμβατή και με τις δυο στρατηγικές.

Η προστασία της γουανιδομάδας της αργινίνης αντιμετωπίστηκε αποτελεσματικά στη μεν Boc/Bzl στρατηγική με την τόζυλο ομάδα (**Tos**) (15) [174], στην δε Fmoc/tBu με την 2,2,4,6,7- πενταμεθυλοδιυδροβενζοφουρανο-5-σουλφόνυλο ομάδα. (**Pbf**) (16) [175].

Η προστασία του ινδολίου της τρυπτοφάνης δεν θεωρείται απαραίτητη, σε αντίθεση με το ιμιδαζόλιο της ιστιδίνης. Για την προστασία του, κατά την Boc/Bzl στρατηγική συνήθως χρησιμοποιούνται τόζυλο-παράγωγα της, ενώ στην Fmoc/Bu_t συνθετική πορεία, καλύτερα αποτελέσματα παρουσιάζει το N-τριφαινυλομεθυλο παράγωγο (**Trt**) (17) [176].



Τέλος, όσον αφορά τις καρβοξαμидικές ομάδες της ασπαραγίνης και της γλουταμίνης, αν και υπάρχει πιθανότητα να χάσουν μόριο νερού κατά την διάρκεια της σύνθεσης, χρησιμοποιούνται χωρίς προστασία τις περισσότερες φορές και ιδιαίτερα στη Boc/Bzl στρατηγική. Στην Fmoc/tBu χρησιμοποιούνται και ως τριφαινυλομεθυλο- προστατευμένα.



9.4.4. Αντιδραστήρια σύζευξης

Όπως αναφέρθηκε, ο πεπτιδικός (ή αμιδικός) δεσμός είναι αποτέλεσμα της αντίδρασης της α-αμινομάδας ενός αμινοξέος με την α-καρβοξυλομάδα ενός άλλου αμινοξέος. Όμως, απαιτείται η κατάλληλη ενεργοποίηση του καρβοξυλίου του ενός αμινοξέος, η οποία επιτυγχάνεται με τους εξής τρόπους :

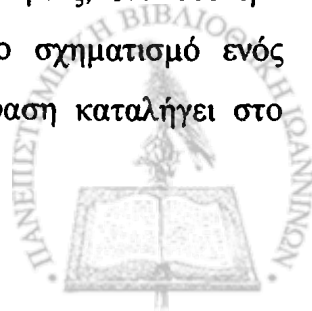
- Μέθοδος των χλωριδίων [177].
- Μέθοδος των αζιδίων [178].
- Μέθοδος των ανυδριτών [179].
- Μέθοδος των ενεργών εστέρων [178].
- Αντιδραστήρια σύζευξης [180]

Η μέθοδος των αντιδραστηρίων σύζευξης είναι η πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδος για το σκοπό αυτό.

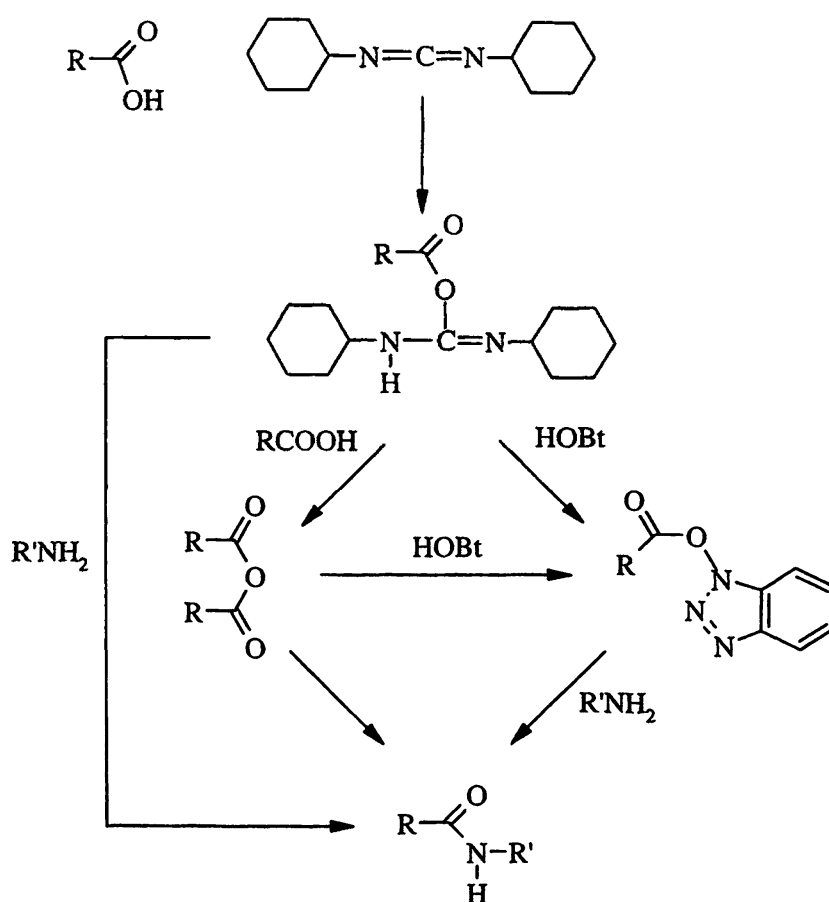
9.4.4.1. Καρβοδιμίδια

Το δικυκλοεξυλοκαρβοδιμίδιο [181,182] (DCC) εισήχθη στην πεπτιδική σύνθεση το 1955 από τους Sheehan και Hess και εξακολουθεί μέχρι και σήμερα να αποτελεί το κατ'εξοχήν χρησιμοποιούμενο αντιδραστήριο σύζευξης στη μέθοδο των καρβοδιμιδίων. Το διϊσοπροπυλοκαρβοδιμίδιο (DIPCDI) [183] είναι εξίσου αποτελεσματικό ως αντιδραστήριο σύζευξης με το DCC και σχηματίζει ως παραπροϊόν μια περισσότερο ευδιάλυτη μορφή της ουρίας. Τέλος, το EDC είναι ένα ακόμα μέλος αυτής της κατηγορίας, το μεγαλύτερο πλεονέκτημα του οποίου είναι η υδατοδιαλυτότητα.

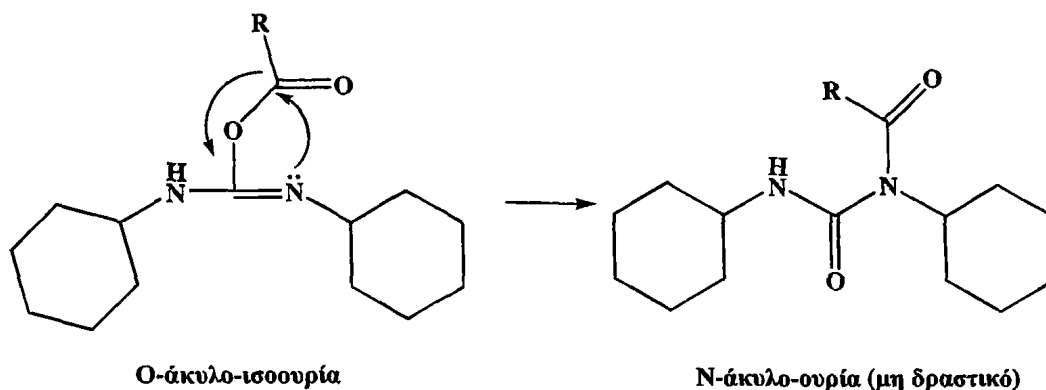
Ο μηχανισμός δράσης του DCC προσβλέπει στην *in situ* ενεργοποίηση του καρβοξυλίου και στη σύζευξη του τελευταίου με το αμινο-συστατικό. Η αντίδραση αρχικά περιλαμβάνει την προσθήκη της καρβοξυλο-ομάδας σε έναν από τους διπλούς δεσμούς του καρβοδιμιδίου, δίνοντας ως ενδιάμεσο την Ο-ακυλο-ισοουρία [184]. Στη συνέχεια, με μια αντίδραση αμινόλυσης από το άμινο-συστατικό, σχηματίζεται ο αμιδικός δεσμός μεταξύ των δύο αμινοξέων καθώς και διακυλοουρία (αδιάλυτη στους περισσότερους διαλύτες εκτός από τις αλκοόλες). Είναι δυνατόν, κατά το σχηματισμό της Ο-ακυλο-ισοουρίας, ένα δεύτερο μόριο καρβοξυλικού οξέος να οδηγήσει μέρος της αντίδρασης στο σχηματισμό ενός συμμετρικού ανυδρίτη. Παρόλα αυτά και αυτή η παράπλευρη αντίδραση καταλήγει στο επιθυμητό προϊόν, τη σύζευξη των δύο αμινοξέων (σχήμα 9.8).



Ωστόσο, υπάρχουν σημαντικά προβλήματα. Έτσι, η μεγάλη ενεργοποίηση του δραστικού ενδιάμεσου παραγώγου έχει σαν αποτέλεσμα κάποια απώλεια οπτικής καθαρότητας, όταν γίνεται η σύζευξη πεπτιδικών κλασμάτων. Περαιτέρω το πυρηνόφιλο κέντρο στο παράγωγο της O-ακυλο-ισουουρίας ανταγωνίζεται με το αμινο-συστατικό για το ακυλο-αμινοξύ [185] και ο ανταγωνισμός αυτός οδηγεί στο σχηματισμό μη δραστικών παραπροϊόντων, παραγών της N-ακυλοουρίας (σχήμα 9.9). Η ταχύτητα αυτής της μετάθεσης είναι μικρή, όταν ως διαλύτης χρησιμοποιείται ακετονιτρίλιο ή διχλωρομεθάνιο, αυξάνεται, όμως, σημαντικά σε απρωτικούς διαλύτες όπως διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) [186].



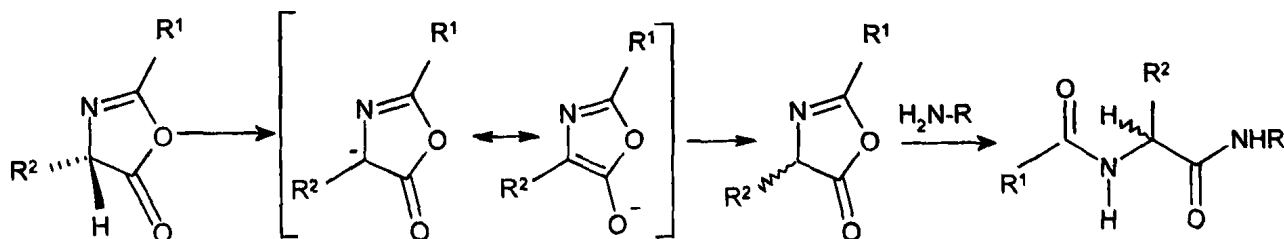
Σχήμα 9.8: Μηχανισμός αντίδρασης σύζευξης με DCC.



Σχήμα 9.9: Σχηματισμός μη δραστικών παραγώγων της N-ακυλοουρίας.

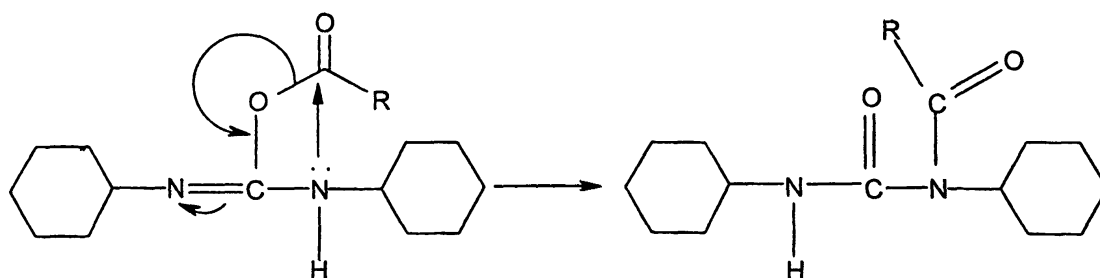
Η ρακεμοποίηση και ο σχηματισμός της N-ακυλοουρίας μπορούν να ελαττωθούν με την προσθήκη βοηθητικών πυρηνόφιλων, όπως το 1-υδρόξυβενζοτρίαζόλιο (HOBt) [187-189] που προτάθηκε από τους König και Geiger (1970). Η προσβολή της πρόσθετης αυτής ουσίας επί του ενεργού ενδιάμεσου παραγώγου O-άκυλο-ισοουρία δίνει O-ακυλο-1-υδροξυβενζοτρίαζόλιο, που είναι ένα ισχυρά ακυλιωτικό μέσο.

Η παρουσία ενός δεύτερου πυρηνόφилου στο μίγμα της αντίδρασης μειώνει τη συγκέντρωση της O-άκυλο-ισοουρίας και, ως εκ τούτου, την έκταση της ρακεμοποίησης (σχήμα 9.10). Επίσης, το HOBt σαν ασθενές οξύ εμποδίζει την αφαίρεση πρωτονίου από το οπτικά ενεργό άνθρακα και έτσι συμβάλλει μ' έναν δεύτερο τρόπο στη διατήρηση της οπτικής καθαρότητας. Τέλος, είναι επίσης σημαντικό το γεγονός ότι η χρησιμοποίηση του βοηθητικού πυρηνόφилου (HOBt) μειώνει αρκετά το χρόνο ζωής του πολύ ενεργοποιημένου ενδιάμεσου παραγώγου της O-άκυλο-ισοουρίας και επομένως την έκταση της O-N ακυλομετάθεσης που οδηγεί στο σχηματισμό παραγώγων της N-ακυλοουρίας (σχήμα 9.11). Πρέπει να σημειωθεί ότι το HOBt αναγεννιέται κατά τη διάρκεια της ακυλίωσης και έτσι η συγκέντρωσή του παραμένει σχεδόν σταθερή κατά τη διάρκεια της σύζευξης.



Σχήμα 9.10: Ρακεμοποίηση ως συνέπεια της απόσπασης πρωτονίου από οπτικά ενεργό άτομο άνθρακα.

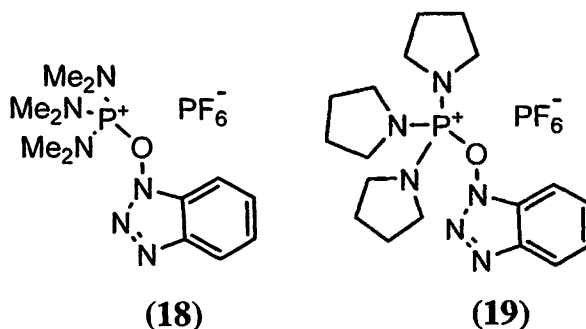




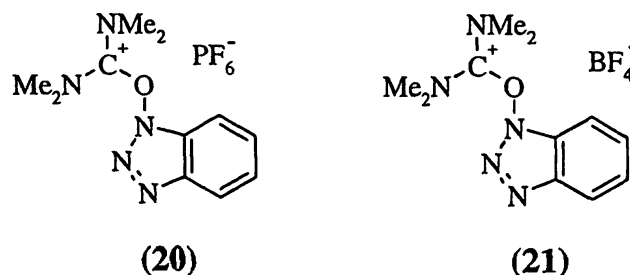
Σχήμα 9.11: *N*-ακυλο μετάθεση και σχηματισμός *N*-ακυλο-ισοουρίας.

9.4.4.2. Τα φωσφονικά και ουρονικά παράγωγα

Τα τελευταία χρόνια μεγάλη εφαρμογή ως αντιδραστήρια σύζευξης έχουν τα φωσφονικά και ουρονικά παράγωγα. Το 1*H*-βενζοτρίαζολυλο Ν-οξυτρι(διμεθυλαμινο) φωσφονικό εξαφθοροφωσφορικό άλας (BOP) (18) [190,191], αποτελεί το πρώτο σπουδαίο αντιδραστήριο της κατηγορίας, ενώ μία βελτιωμένη έκδοση του είναι το 1*H*-βενζοτρίαζολυλο Ν-οξυ-τρι(πυρρολιδινο) φωσφονικό εξαφθοροφωσφορικό άλας (PyBOP) (19) [192,193].

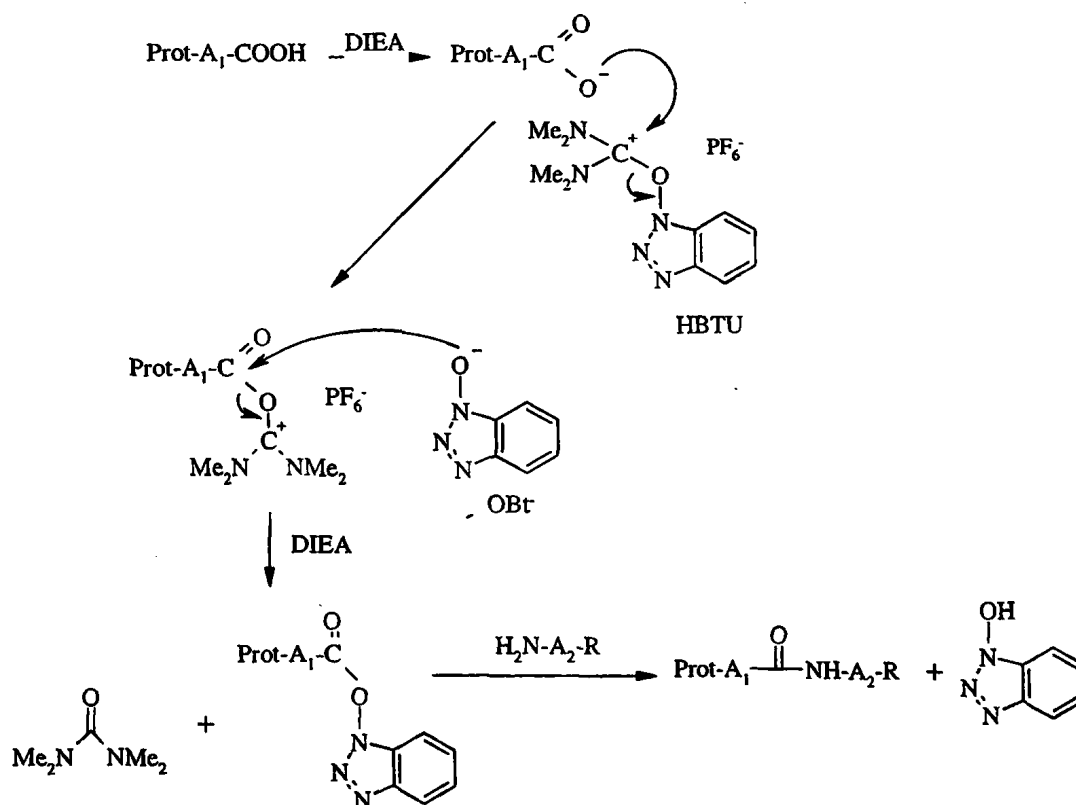


Από την κατηγορία των ουρονικών παραγώγων, ξεχωρίζει το Ο-βενζοτρίαζολυλο-τετραμεθυλο-ισοουρονικό εξαφθοροφωσφορικό παράγωγο της ουρίας (HBTU) (20) [194,195], το οποίο διακρίνεται για το χαμηλό βαθμό ρακεμοποίησης. Ένα άλλο αρκετά δημοφιλές αντιδραστήριο σήμερα, είναι το Ο-βενζοτρίαζολυλο-τετραμεθυλο-ισοουρονικό τετραβρομοφωσφορικό άλας (TBTU) (21) [196,197].



Οι πορείες που ακολουθούν τα παραπάνω αντιδραστήρια σε μία αντίδραση σύζευξης είναι σχεδόν παρόμοιες ως προς το μηχανισμό (σχήμα 9.12).

Τα φωσφονικά και ουρονικά άλατα προτιμούνται σήμερα στην πεπτιδική σύνθεση, έναντι του δικυκλοεξυλο-καρβοδιιμιδίου, στις περισσότερες των περιπτώσεων. Ιδιαίτερα με τα ουρανικά οι συζεύξεις προχωρούν ήπια και η ταχύτητα σύζευξης μπορεί να αυξηθεί με την προσθήκη HOBt. Κατά την σύζευξη με τα ουρονικά παράγωγα απαραίτητη κρίνεται η παρουσία μιας τριτοταγούς βάσης (διϊσοπροπυλ-αιθυλ-αμίνης, DIEA), η οποία μετατρέπει τα άμινο-προστατευμένα αμινοξέα σε ισχυρά ακυλιωτικά μέσα.



Σχήμα 9.12: Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού παρουσία HBTU και HOBt.

9.5. Αποκοπή πεπτιδίου από τη ρητίνη

Όταν ολοκληρωθεί η σύνθεση, απομένει η αποκοπή του πεπτιδίου από το στερεό πολυμερές. Οι συνθήκες που θα εφαρμοστούν πρέπει να είναι κατάλληλες ώστε να μην καταστραφεί το πεπτίδιο. Παράλληλα, πρέπει να επιτυγχάνεται και η αποκοπή των προστατευτικών ομάδων των δραστικών ομάδων των αμινοξέων. Στις περισσότερες περιπτώσεις αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση οξέων κατάλληλης ισχύος. Η επιλογή του οξέος

που θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται από το αντίστοιχο πολυμερές, τον δεσμό μεταξύ του C-τελικού αμινοξέος του πεπτιδίου με τη ρητίνη, καθώς και από το αν θέλουμε το πεπτίδιο να είναι πλήρως, μερικώς ή καθόλου προστατευμένο.

Συγκεκριμένα με τη Boc στρατηγική απαιτούνται πολύ ισχυρά οξέα. Αυτά που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι το υδροφθόριο (HF) ή το τριφθορομεθανοσουλφονικό οξύ TFMSA. Στην αντίστοιχη περίπτωση της Fmoc στρατηγικής χρησιμοποιούνται πιο ήπια οξέα, όπως το τριφθοροξικό οξύ TFA.

Σαν συνέπεια της ταυτόχρονης αποκοπής και των παράπλευρων προστατευτικών ομάδων των αμινοξέων, το μίγμα της αντίδρασης γίνεται πλούσιο σε ηλεκτρονιόφιλα αλκυλιωτικά σωματίδια. Για το λόγο αυτό, η αποκοπή πραγματοποιείται πάντα παρουσία μορίων παγίδων (scavengers), με σκοπό την αποφυγή παράπλευρων αντιδράσεων, μέσω δέσμευσης των σωματιδίων αυτών.

HF: Το υγρό υδροφθόριο χρησιμοποιείται συνήθως στη Boc στρατηγική. Η εξαιρετικά τοξική και διαβρωτική του ιδιότητα επιβάλλει η διαδικασία αποκοπής να πραγματοποιείται σε ειδική συσκευή με ιδιαίτερη προσοχή [198,199]. Για την αποκοπή 1g πεπτιδορητίνης απαιτούνται 10ml HF, 1ml ανισόλη και 0.5g φαινόλη. Η παρουσία κάποιων συγκεκριμένων αμινοξέων στην αλληλουχία του πεπτιδίου καθιστά μερικές φορές απαραίτητη την προσθήκη και άλλων μορίων παγίδες. Η αντίδραση αφήνεται αρχικά στην θερμοκρασία των -7 με -10°C για 30 λεπτά. Στο χρονικό αυτό διάστημα απομακρύνονται κυρίως οι προστατευτικές ομάδες και δεσμεύονται από τα μόρια παγίδες. Κατόπιν ανεβάζουμε τη θερμοκρασία στους 0°C για μία ώρα με σκοπό την αποκοπή του πεπτιδίου. Στο τέλος της διεργασίας το HF αποστάζεται υπό κενό και το μίγμα της αντίδρασης κατεργάζεται με παγωμένο αιθέρα. Η παραλαβή του πεπτιδίου πραγματοποιείται με οξικό οξύ 2N.

TFA: Στην περίπτωση της Fmoc στρατηγικής η αποκοπή του πεπτιδίου γίνεται με την επίδραση τριφθοροξικού οξέος (TFA) [200]. Απαραίτητο στάδιο πριν την αποκοπή του πεπτιδίου είναι η απομάκρυνση της N^{α} -τελικής Fmoc ομάδας. Για την αποφυγή παράπλευρων αντιδράσεων η παρουσία μορίων παγίδων είναι και σε αυτή τη περίπτωση απαραίτητη (ανισόλη, p-κρεζόλη, θειόλες, νερό, παράγωγα του σιλανίου όπως το τριϊσοπρόπυλοσιλάνιο TIS). Ο χρόνος που διαρκεί η αντίδραση ποικίλλει από 2 έως 6 ώρες, ανάλογα με τα αμινοξέα και τις προστατευτικές ομάδες που έχουν χρησιμοποιηθεί. Στη συνέχεια το TFA εξατμίζεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα και το πεπτίδιο καταβυθίζεται με τη χρήση παγωμένου αιθέρα.

9.6. Προβλήματα κατά την διάρκεια επιμήκυνσης της πεπτιδικής αλυσίδας

Κατά τη διάρκεια της πεπτιδικής σύνθεσης μπορεί να προκύψουν διάφορα προβλήματα, ανάλογα με την αλληλουχία και τα αμινοξέα που περιέχει, την επιλογή της στρατηγικής που θα ακολουθηθεί, την επιλογή των επιμέρους προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων δραστικών αλυσίδων, τη μέθοδο αποπροστασίας από αυτές και τη μέθοδο απόσπασης του πεπτιδίου από τη ρητίνη. Μερικά από αυτά είναι:

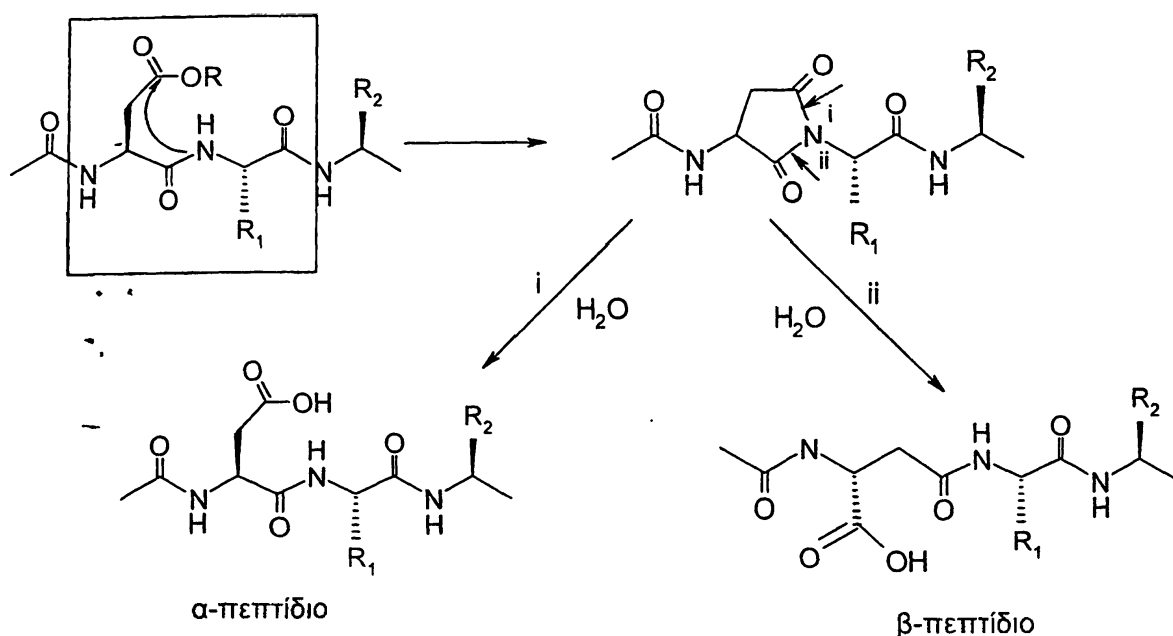
- i. Σχηματισμός ασπαρτιμιδίου
- ii. Σχηματισμός πυρρογλουταμινικού
- iii. Σχηματισμός δικετοπιπεραζινών
- iv. Ρακεμίωση

Θα αναφερθούμε διεξοδικά στις δυο πρώτες περιπτώσεις.

9.6.1. Σχηματισμός ασπαρτιμιδίου

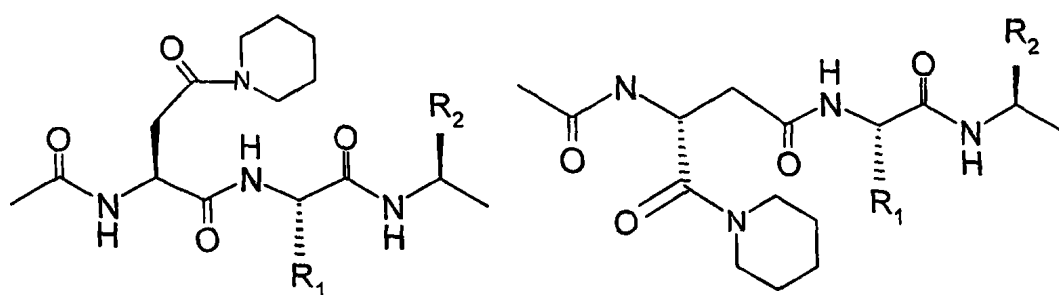
Μια συνηθισμένη παράπλευρη αντίδραση που λαμβάνει χώρα στην πεπτιδική σύνθεση είναι η κυκλοποίηση του ασπαρτικού οξέος προς σχηματισμό ασπαρτιμιδίου [201-208]. Είναι μια αντίδραση που εξαρτάται από την αλληλουχία του πεπτιδίου. Καθοριστικό ρόλο στο ποσοστό σχηματισμού του ιμιδίου διαδραματίζει το αμινοξύ που ακολουθεί το Asp στην πεπτιδική αλληλουχία (Asp-X) [201-208]. Στερικοί και ηλεκτρονικοί παράγοντες επηρεάζουν το κλείσιμο του δακτυλίου. Αμινοξέα, των οποίων οι παράπλευρες αλυσίδες τους είτε είναι δότες ηλεκτρονίων είτε δεν είναι ογκώδεις διευκολύνουν την ανεπιθύμητη κυκλοποίηση [209]. Αλληλουχίες όπως Asp-Gly, Asp-Ser, Asp-Asn, Asp-His και Asp-Ala έχουν αναφερθεί ότι είναι επιρρεπείς στον σχηματισμό ιμιδίου. Παρόμοια αντίδραση μπορεί να πραγματοποιηθεί και με το Glu, οδηγώντας σε γλουταριμίδιο [201,208]. Η υδρόλυση του ιμιδίου και στις δύο αντιδράσεις οδηγεί σε μείγμα α- και β- ή γ- πεπτιδίου όπως φαίνεται στο σχήμα 9.13 τα οποία δύσκολα διαχωρίζονται. Έτσι, οι δυο αυτές αντιδράσεις είναι ανεπιθύμητες.





Σχήμα 9.13: Σχηματισμός ασπαρτιμιδίου και υδρόλυση αυτού προς α- και β- πεπτίδιο.

Ο σχηματισμός του ασπαρτιμιδίου μπορεί να γίνει τόσο σε όξινες όσο και σε βασικές συνθήκες. Όταν χρησιμοποιούνται έντονα όξινες συνθήκες, κυρίως κατά την Boc στρατηγική κατά την αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη, λαμβάνει χώρα ο όξινα καταλυόμενος σχηματισμός του ασπαρτιμιδίου. Η προστατευτική ομάδα της παράπλευρης αλυσίδας του Asp διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό του ασπαρτιμιδίου. Με τη χρήση προστατευτικών ομάδων εκτός της Bzl, όπως π.χ. η cHex [210] μπορεί να μειωθεί ο σχηματισμός του ιμιδίου κατά την Boc στρατηγική. Κατά την Fmoc στρατηγική η χρήση της *t*Bu προστατευτικής ομάδας σε γενικές γραμμές δεν δημιουργεί προβλήματα, αν και έχει αναφερθεί στην περίπτωση αυτή σχηματισμός ασπαρτιμιδίου. Κατά την αποπροστασία της Fmoc ομάδας μπορούν να σχηματιστούν πιπεριδίνια με προσβολή της πιπεριδίνης στο ασπαρτιμίδιο (σχήμα 9.14). Η προσθήκη HOBt ή 2,4 δίνιτροφαινόλης κατά την αποκοπή της Fmoc ομάδας (0,1 M σε 20% διάλυμα της πιπεριδίνης σε DMF) μπορεί να μειώσει το πρόβλημα [211]. Μια πιο σίγουρη μέθοδος είναι η προστασία της NH του αμινοξέος που ακολουθεί το Asp με την 2 υδρόξυ-4 μεθόξυ βενζυλομάδα (Hmb) [212].

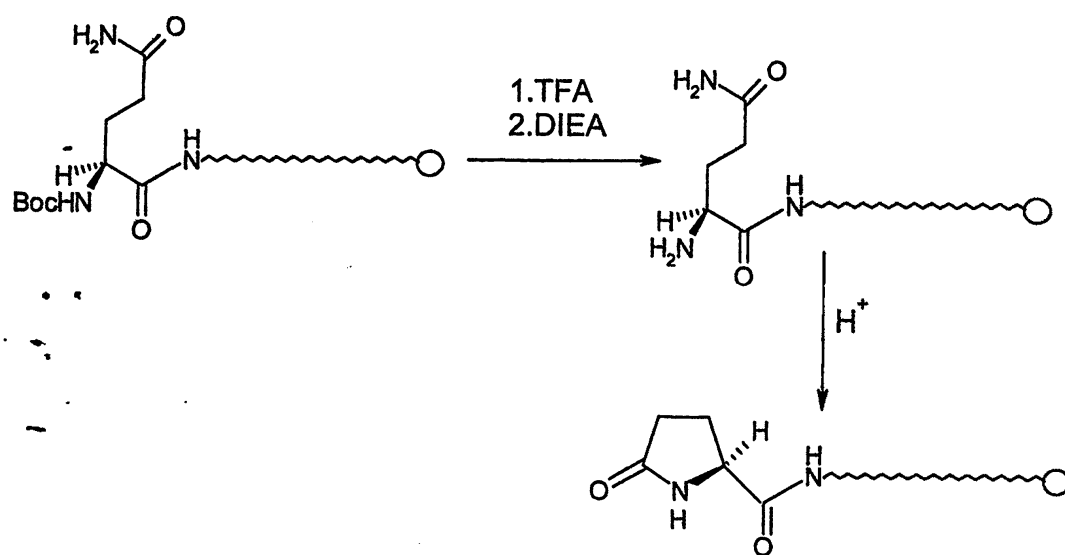


Σχήμα 9.14: Σχηματιζόμενα πιπεριδίδια.

9.6.2. Σχηματισμός πυρογλουταμινικού οξέος

Ο σχηματισμός πυρογλουταμινικού οξέος οδηγεί στην ενδομοριακή κυκλοποίηση της N τελικής Gln. Η παράπλευρη αυτή αντίδραση πραγματοποιείται σε ασθενώς όξινες συνθήκες [213,214]. Μπορεί να πραγματοποιηθεί κατά την απομάκρυνση της Boc ομάδας με τριφθοροξικό οξύ. Συχνότερα όμως παρατηρείται κατά την σύζευξη του επομένου N^α προστατευμένου αμινοξέος της Gln. Το 1-υδροξυβενζοτρίαζόλιο μαζί με το N^α προστατευμένο αμινοξύ παρέχουν τις ασθενώς όξινες συνθήκες ικανές να καταλύσουν την ανεπιθύμητη κυκλοποίηση. Για το λόγο αυτό δεν πρέπει να χρησιμοποιείται σαν αντιδραστήριο σύζευξης σε αυτό το στάδιο. Ο σχηματισμός πυρογλουταμινικού οξέος φαίνεται στο σχήμα 9.15. Μετά το σχηματισμό του πυρογλουταμινικού δεν είναι δυνατή η επιμήκυνση της αλυσίδας.

Η χρήση υδροχλωρικού οξέος σε διοξάνη για την απομάκρυνση της Boc προστατευτικής ομάδας ακολουθούμενη από ανάστροφη προσθήκη [215] των αντιδραστηρίων σύζευξης και του επόμενου αμινοξέος στην πεπτιδορηνίνη, μπορεί να αποτρέψει την παράπλευρη αυτή αντίδραση. Άλλος τρόπος είναι η προσθήκη του αμινοξέος ως προσχηματισμένου ενεργού εστέρα [213]. Άλλα πρωτόκολλα βασίζονται στην *in situ* εξουδετέρωση της πεπτιδορηνίνης, μετά από την αποκοπή της Boc προστατευτικής ομάδας από την Gln. Ο σχηματισμός του πυρογλουταμινικού οξέος είναι ένα πρόβλημα που συνήθως δεν συναντάται κατά την Fmoc στρατηγική.



Σχήμα 9.15: Σχηματισμός πυρογλουταμινικού οξέος.

10. Ο ΘΕΙΟΑΙΘΕΡΙΚΟΣ ΔΕΣΜΟΣ

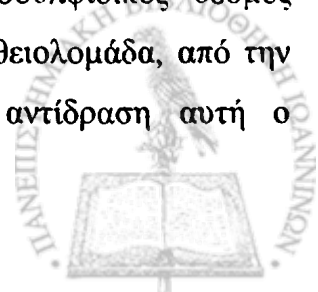
10.1. Εισαγωγή

Η χημεία του θείου και ειδικότερα της σουλφιδρυλικής ομάδας ($-SH$) κερδίζει όλο και περισσότερο έδαφος τα τελευταία χρόνια στη σύνθεση πεπτιδίων και πρωτεϊνών, αλλά και στη πρόσδεση δραστικών μορίων σε αυτά. Έτσι, εκτός από τον σχηματισμό δισουλφιδικού δεσμού, της αντίδρασης αφυδρογόνωσης δύο σουλφιδρυλομάδων προς σχηματισμό $-S-S-$ δεσμού, η χρήση του θειαιθέρα αποδεικνύεται αρκετά δημοφιλής. Ο θειοαιθερικός δεσμός ($-CH_2-S-CH_2-$) σχηματίζεται μεταξύ μιας σουλφιδρυλικής ομάδας ($-SH$) (συνήθως αυτή ανήκει στη Cys) και μιας αλογονοακετυλιωμένης ομάδας ($X-CH_2-CO-$), η οποία βρίσκεται είτε στο ίδιο μόριο, δημιουργώντας έτσι ένα δακτύλιο είτε σε διαφορετικό. Ο θειοαιθερικός δεσμός αποτελεί μια από τις σημαντικότερες χημειοεκλεκτικές αντιδράσεις που χρησιμοποιούνται στη σύνθεση μεγάλων πρωτεϊνών μέσω της σύνδεσης πεπτιδικών τμημάτων και είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο 'εργαλείο' της χημειοεκλεκτικής σύνδεσης (*chemoselective ligation*) [216-218]. Οι πρωτεΐνες όμως, οι οποίες σχηματίζονται με τον τρόπο αυτό διαφέρουν από τις φυσικές, αφού έχουν ενσωματωμένη μια μη φυσική χαρακτηριστική ομάδα στην πλευρά της σύνδεσης [217].

Πάντως, οι θειοαιθερικοί δεσμοί απαντώνται στη φύση σε μια οικογένεια πεπτιδίων γνωστά ως λαντιβιοτικά (lantibiotics), όπως η νισινή και η επιδερμίνη. Αυτά παράγονται από βακτηριακούς μικροοργανισμούς, ενώ αρκετά έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες [219,220].

10.2. Πλεονεκτήματα των θειοαιθερικών δεσμών έναντι των δισουλφιδικών

Οι δύο αυτοί δεσμοί παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές, οι οποίες αφορούν κυρίως τη σταθερότητα του δεσμού ιδιαίτερα *in vivo*. Μελέτες σχετικές με την ενζυμική σταθερότητα τόσο του θειοαιθερικού, όσο και του δισουλφιδικού δεσμού έδειξαν ότι ο πρώτος είναι πολύ περισσότερο ανθεκτικός στην ενζυματική αποικοδόμηση που μπορεί να πραγματοποιηθεί σε διάφορα βιολογικά υγρά [221,222]. Βέβαια και τα δυο κυκλικά ανάλογα επέδειξαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα έναντι του γραμμικού. Επιπλέον, ο δισουλφιδικός δεσμός συμμετέχει στη γρήγορη αντίδραση θειοανταλλαγής με μια ελεύθερη θειολομάδα, από την οποία μπορεί να προκύψουν πολλά παραπροϊόντα [221]. Στην αντίδραση αυτή ο

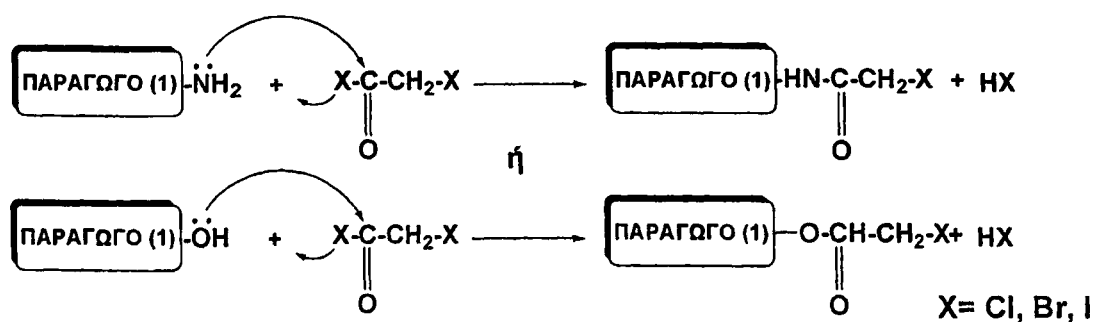


θειοαιθερικός δεσμός δεν συμμετέχει, γεγονός που αποδεικνύει την επιπρόσθετη σταθερότητα του δεσμού αυτού. Μια άλλη ιδιότητα του θειοαιθερικού δεσμού είναι και η σταθερότητα του σε συνθήκες οξειδοαναγωγής στις οποίες ο δισουλφιδικός δεσμός είναι εξαιρετικά ασταθής [219]. Επομένως, η δημιουργία ενός ιδιαίτερα σταθερού δεσμού, όπως του θειοαιθερικού, στις συνθήκες που επικρατούν *in vivo* στα διάφορα βιολογικά συστήματα, αποτελεί μια ιδιαίτερα ελκυστική προσέγγιση στο σχεδιασμό φαρμακευτικών πεπτιδομιμητικών αναλόγων.

10.3. Εκλεκτική εισαγωγή της αλογονοακετυλομάδας

Η εισαγωγή της αλογονοακετυλομάδας αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1987, όταν η χλωροακετυλομάδα προσδέθηκε στο N-τελικό άκρο ενός προστατευμένου πεπτιδίου. Η κατεργασία του κάτω από τις ισχυρές συνθήκες αποκοπής του πεπτιδίου από τη ρητίνη με HF έδειξε ότι η χλωροακετυλομάδα παρέμεινε άθικτη [223]. Τα αλογονοακετυλιωμένα πεπτίδια χρησιμοποιούνται πλέον ευρύτατα και μπορούν να συντεθούν εύκολα και σε μεγάλες αποδόσεις.

Η αλογονοακετυλομάδα εισάγεται στο πεπτίδιο ή σε κάποιο παράγωγο με την αντίδραση της αλογονοακετυλίωσης (σχήμα 10.1). Η αλογονοακετυλίωση είναι μια πυρηνόφιλη προσβολή, η οποία πραγματοποιείται μέσω SN_2 μηχανισμού. Το ελεύθερο ζεύγος ηλεκτρονίων προσβάλλει τον καρβονυλικό άνθρακα του ενεργοποιημένου ακέτυλου αλογονιδίου.



Σχήμα 10.1: Αλογονοακετυλίωση με αλογονοακέτυλο αλογονίδιο.

Η ομάδα Y πρέπει να είναι μια καλή αποχωρούσα ομάδα, ώστε να αντικαθίσταται από την αμινομάδα απελευθερώνοντας ταυτόχρονα HX. Πρόκειται ουσιαστικά για ενεργοποίηση του



καρβοξυλίου και, όπως στην περίπτωση των αμινοξέων, αυτή μπορεί να γίνει με αλογόνωση, με ενεργούς εστέρες είτε μέσω συμμετρικών ανυδριτών.

✚ Αλογονοακετυλίωση με $XCOCH_2X$

Τα αλογονοακέτυλο αλογονίδια, όπως το ιωδοακέτυλο ιωδίδιο ($ICOCH_2I$), το βρωμοακέτυλο βρωμίδιο ($BrCOCH_2Br$) και το χλωροακέτυλο χλωρίδιο ($ClCOCH_2Cl$) χρησιμοποιούνται ευρύτατα για την εισαγωγή της αλογονοακετυλομάδας ($-COCH_2X$). Όταν πρόκειται για αντιδράσεις σε στερεά φάση τα αντιδραστήρια αυτά χρησιμοποιούνται σε περίσσεια. Περίσσεια 5 ισοδυνάμων αλογονιδίου για κάθε αμινομάδα είναι αρκετή, έχουν όμως αναφερθεί και μεγαλύτερες περιπτώσεις έως και 10 ισοδύναμα [223]. Για την πρόσδεση της αλογονοακετυλομάδας σε υγρή φάση είναι δυνατή και η χρησιμοποίηση 1/1 αναλογίας. Μάλιστα έτσι μπορεί να γίνει εκλεκτική παραγοντοποίηση μιας συγκεκριμένης ομάδας, όταν στο ίδιο μόριο υπάρχουν και άλλες δραστικές ομάδες, αρκεί βέβαια να διαφέρουν σε δραστηριότητα.

Για την διεξαγωγή της αντίδρασης χρησιμοποιούνται οι διαλύτες DMF, ή DCM ή ακόμα και σε μίγμα των διαλυτών. Η αντίδραση γίνεται υπό αργό και σε σκοτάδι καθώς τα αντιδραστήρια αυτά, ιδιαίτερα το βρωμοακέτυλο βρωμίδιο, είναι εξαιρετικά ευαίσθητα στον ατμοσφαιρικό αέρα και στο φως. Το pH της αντίδρασης ρυθμίζεται περίπου 7-9 (βέλτιστο pH 8) με DIEA σε τακτά χρονικά διαστήματα εφόσον κατά τη διάρκεια της, απελευθερώνεται οξύ HX το οποίο μειώνει το pH [223].

✚ Αλογονοακετυλίωση με XCH_2COOH .

Η αλογονοακετυλίωση με αλογονοξέα όπως το ιωδοξικό οξύ (ICH_2COOH) ή το βρωμοξικό οξύ ($BrCH_2COOH$) ή το χλωροξικό οξύ ($ClCH_2COOH$) απαιτεί την ενεργοποίηση της καρβοξυλομάδας με κάποιο αντιδραστήριο σύζευξης και το σχηματισμό του αντίστοιχου ανυδρίτη μέσω του οποίου πραγματοποιείται η αντίδραση. Συνήθως χρησιμοποιείται το DIC [225-228] ως αντιδραστήριο σύζευξης και σπανιότερα το DCC [229]. Το αλογονοξικό οξύ διαλύεται σε DMF ή DCM ή σε μίγμα των διαλυτών αυτών και στο διάλυμα που προκύπτει προστίθεται το DIC. Η αναλογία των αντιδραστηρίων μπορεί να είναι 1/1 ή 2/1 (XCH_2COOH/DIC). Το διάλυμα αφήνεται για 15-30 λεπτά υπό ανάδευση, ώστε να γίνει η ενεργοποίηση της καρβοξυλομάδας.



✚ *Αλογονοακετυλίωση με $(\text{ICH}_2\text{CO})_2\text{O}$ ή $(\text{ClCH}_2\text{CO})_2\text{O}$*

Το στάδιο της ενεργοποίησης του οξέος μπορεί να παρακαμφθεί χρησιμοποιώντας κατευθείαν τον αλογονοξικό ανυδρίτη. Από τους τρεις αλογονοξικούς ανυδρίτες μόνο ο βρωμοξικός ανυδρίτης δεν είναι εμπορικά διαθέσιμος, πιθανώς εξαιτίας της αστάθειάς του.

✚ *Χλωροακετυλίωση με $\text{ClCH}_2\text{COOPcp}$.*

Τέλος, η χλωροακετυλίωση μιας αμινομάδας μπορεί να γίνει με χλωροξικό πενταχλωροφαινυλεστέρα ($\text{ClCH}_2\text{COOPcp}$) [230,231]. Πρόκειται για ένα ενεργό εστέρα ο οποίος δεν χρησιμοποιείται συχνά.

✚ *Μετατροπή ενός αλογονοακετυλιωμένου παραγώγου σε ένα άλλο περισσότερο δραστικό.*

Η παρασκευή ενός ιωδοακετυλιωμένου παραγώγου (IAc-παραγώγο) μπορεί να γίνει με απλή αντικατάσταση ενός χλωρίου (ή βρωμίου) με ιώδιο στο χλώρο- (ή βρώμο-) ακετυλιωμένο παράγωγο (ClAc- ή BrAc- παράγωγο). Η μετατροπή αυτή γίνεται με κατεργασία του χλώρο- ή βρώμο- ακετυλιωμένου παραγώγου με κεκορεσμένο διάλυμα KI σε διάλυμα ούριας 6M και σε εύρος pH 2-7. Με τον ίδιο τρόπο, χρησιμοποιώντας κεκορεσμένο διάλυμα KBr ή με διάλυμα υδροβρωμικής γουανιδίνης 6M, μπορούμε να μετατρέψουμε ένα χλωροακετυλιωμένο παράγωγο σε βρωμοακετυλιωμένο. Η μετατροπή του ClAc- παράγωγο σε IAc- παράγωγο είναι πιο γρήγορη από τη μετατροπή ClAc- παράγωγο σε BrAc- παράγωγο [232]. Τα ιωδοακέτυλο και βρωμοακέτυλο παράγωγα είναι πολύ πιο δραστικά από τα χλωροακέτυλο παράγωγα, βασικό όμως μειονέκτημα τους είναι η αστάθεια τους στις συνθήκες παρασκευής και αποθήκευσής τους.



10.4. Μελέτη δραστηριότητας των αλογονοακετυλιωμένων παραγώγων

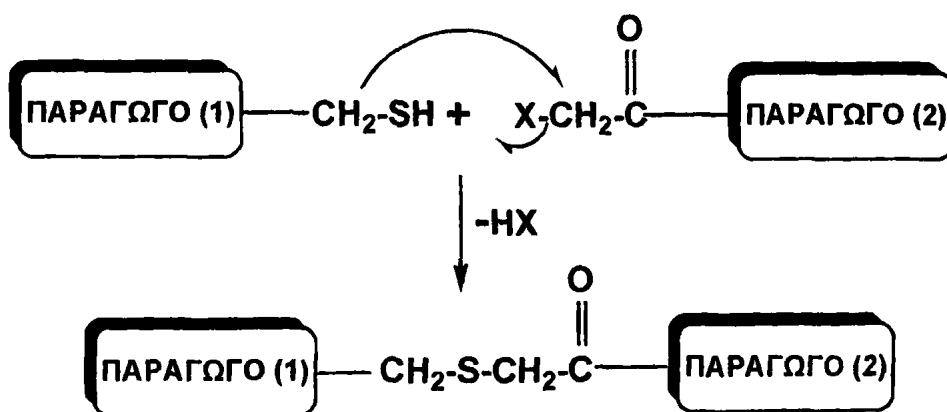
Η διαφορά δραστηριότητας των αλογονοακετυλιωμένων παραγώγων γέννησε την ανάγκη εύρεσης τρόπου μετατροπής σε ένα περισσότερο δραστικό ανάλογο. Η μελέτη της δραστηριότητας έγινε με την χρήση ίδιων χλωρο-, βρωμο- ιωδο- ακετυλιωμένων πεπτιδίων με την ίδια σουλφυδριλομάδα και σε διάφορα pH [233].

Από τη μελέτη αυτή προέκυψε ότι δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές στις αποδόσεις των αντιδράσεων. Αντίθετα, η ταχύτητα της αντίδρασης με βρωμοακέτυλο-πεπτίδιο ήταν μιας τάξης μεγέθους μεγαλύτερη από αυτήν με χλωροακέτυλο-πεπτίδιο [232,233]. Η σύγκριση της ταχύτητας σχηματισμού θειοαιθερικού δεσμού μεταξύ του βρωμοακέτυλο-πεπτιδίου και του ιωδοακέτυλο-πεπτιδίου δεν έδειξε σημαντικές διαφορές. Συμπερασματικά, κατατάσσοντας τα αλονοακέτυλο-πεπτίδια κατά αύξουσα δραστηριότητα έχουμε την εξής σειρά:



10.5. Σχηματισμός θειοαιθερικού δεσμού

Η αντίδραση σχηματισμού θειοαιθέρα είναι μια χημιοεκλεκτική αντίδραση. Ο θειοαιθερικός δεσμός δημιουργείται γρήγορα, κάτω από ήπιες αλκαλικές συνθήκες, μεταξύ μια ελεύθερης θειολομάδας και μιας αλογονοακετυλιωμένης αμινομάδας.



Σχήμα 10.2: Σχηματισμός θειοαιθερικού δεσμού διαμοριακά.



Η πυρηνόφιλη αντίδραση για τη δημιουργία θειοαιθερικού δεσμού γίνεται με S_N2 μηχανισμό. Η ελεύθερη σουλφυδριλομάδα προσβάλλει τον άνθρακα του μεθυλενίου, η αλογονομάδα αποχωρεί και υποκαθίσταται από τη θειολομάδα με ταυτόχρονη απελευθέρωση HX . Τα θειολικά ανιόντα συγκαταλέγονται μεταξύ των καλύτερων πυρηνόφιλων και οι αποδόσεις σε αυτές τις S_N2 αντιδράσεις είναι συνήθως υψηλές.

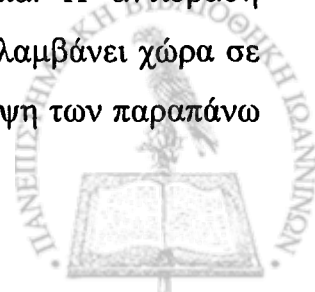
Η μεγάλη εκλεκτικότητα της αντίδρασης κάνει την προστασία των υπολοίπων δραστικών ομάδων μη απαραίτητη, γεγονός το οποίο κάνει την αντίδραση ιδιαίτερα εύχρηστη. Σε αυτό συμβάλλει και το γεγονός ότι η αντίδραση δημιουργίας ενός θειοαιθερικού δεσμού πραγματοποιείται συνήθως σε υδατικά διαλύματα.

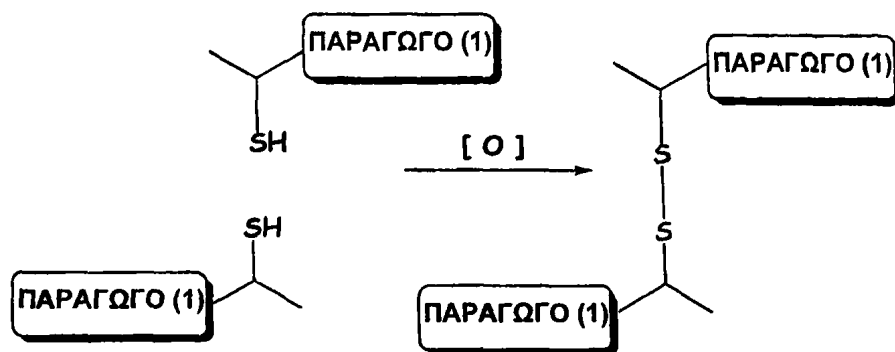
10.6. Επίδραση του pH

Η δημιουργία του θειοαιθερικού δεσμού λαμβάνει χώρα σε ήπιες αλκαλικές συνθήκες και σε τιμές pH 7-9. Η ρύθμιση της τιμής του στην περιοχή αυτή κρίνεται απαραίτητη, εφόσον κατά τη διάρκεια της αντίδρασης απελευθερώνεται οξύ, το οποίο μπορεί να μεταβάλλει το pH σε χαμηλότερες τιμές. Μελέτη της επίδρασης του pH για μια δεδομένη αλογονό-αποχωρούσα ομάδα έδειξε ότι η ταχύτητα της αντίδρασης αυξήθηκε με την αύξηση του pH [232]. Το αποτέλεσμα αυτό αναμενόταν, δεδομένου του γεγονότος ότι η συγκέντρωση του θειοανιόντος, του δραστικού πυρηνόφιλου, αυξάνεται με την αύξηση του pH. Σε τιμές pH μικρότερες του 7, η αντίδραση δεν ευνοείται, ενώ σε τιμές μεγαλύτερες του 9 υπάρχει κίνδυνος διμερισμού, μέσω δισουλφιδικών γεφυρών. Το ευνοϊκότερο pH για την αντίδραση είναι περίπου 8.

10.7. Παράπλευρες αντιδράσεις κατά τη δημιουργία θειοαιθερικού δεσμού

Το πιο συνηθισμένο πρόβλημα κατά τη διάρκεια της αντίδρασης σχηματισμού θειοαιθερικού δεσμού είναι η δημιουργία δισουλφικής γέφυρας μεταξύ των ελεύθερων θειολομάδων. Αυτή η ανεπιθύμητη αντίδραση οδηγεί στο διμερισμό του ενός εκ των δυο αντιδρώντων, ο οποίος δε μπορεί να αποφευχθεί με ιδιαίτερη ευκολία. Η αντίδραση σχηματισμού τόσο του θειοαιθερικού όσο και του δισουλφιδικού δεσμού λαμβάνει χώρα σε ελαφρώς αλκαλικές συνθήκες, γεγονός το οποίο έχει ως αποτέλεσμα τη λήψη των παραπάνω πιθανών παραπροϊόντων.





Σχήμα 10.3: Σχηματισμός διμερούς.

Η αντίδραση σχηματισμού θειοαιθερικού δεσμού είναι πιο γρήγορη έναντι της αντίδρασης σχηματισμού δισουλφιδικού δεσμού εξαιτίας της μεγαλύτερης δραστηρότητας της αλογολοακετυλιωμένης ομάδας σε σύγκριση με την ελεύθερη θειολομάδα. Το γεγονός αυτό φανερώνει ότι η έκταση του προβλήματος δεν είναι ιδιαίτερα μεγάλη, παρόλα αυτά μπορεί να αντιμετωπιστεί με τους εξής τρόπους για το διαμοριακό σχηματισμό θειοαιθερικού δεσμού:

- ➔ Χρησιμοποιώντας πυκνά διαλύματα του αλογονοακετυλιωμένου παραγώγου και μικρή περίσσεια αυτού έναντι του παραγώγου που περιέχει τη θειολομάδα.
- ➔ Η προσθήκη του παραγώγου που περιέχει τη θειολομάδα στο διάλυμα της αντίδρασης γίνεται σε μικρές ποσότητες. Προτιμάται το παράγωγο αυτό να προστίθεται ως στερεό, αφού σε διαλυμένη μορφή υπάρχει κίνδυνος διαμερισμού. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται διάλυμα, το pH του να είναι όξινο αφού σε όξινες συνθήκες δεν ευνοείται η δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών.

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



11. ΣΥΝΘΕΣΗ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ

Στη παρούσα διατριβή συντέθηκαν τα παρακάτω πεπτίδια:

1. Ac-(Lys-Aib-Gly)₄-NH₂
2. Ac-(Glu-Aib-Gly)₄-NH₂
3. Ac-Asi-Arg-NH₂
4. Ac-Cys-Arg-Gly-Asp-Arg-NH₂
5. Folyl-Cys-Arg-Gly-Asp-Ser-NH₂
6. Ac-[Lys(Cys)-Aib-Gly]₄-NH₂
7. Ac-(Lys-Aib-Cys)_n-OH με n=2,4
8. Ac-(Lys-Aib-Cys)_n-NH₂ με n=2-4
9. Ac-Cys-(Arg-Aib-Cys)₃-NH₂

11.1. Αντιδραστήρια

Η σύνθεση των πεπτιδίων πραγματοποιήθηκε με βάση τις αρχές της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση κατά Merrifield [152-154]. Ως πολυμερικό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκαν οι :

- p-αλκοξυβενζυλοξυβενζυλ-ρητίνη (Wang ρητίνη),
- 4-[2',4'-διμεθοξυ-φαινυλ-(9-φλουορενυλμεθοξυκαρβονυλ)αμινομεθυλ]-φαινοξυ (Rink Amide ρητίνη)

Για την σύζευξη των αμινοξέων στην πεπτιδορητίνη χρησιμοποιήθηκαν τα:

- ☒ DIC (δισοπρόπυλο καρβοδιμίδιο), DCC (δικυκλοεξυλοκαρβοδιμίδιο) TBTU (βενζοτρίαζολ-τετραμεθυλο-ουρονικό τετραφθοροβορικό άλας) και το HBTU (βενζοτρίαζολ-τετραμεθυλο-ουρονικό εξαφθοροφωσφορικό άλας) ως αντιδραστήρια σύζευξης (Bachem, Neosystem Laboratoire)
- ☒ HOBt (1- υδροξυβενζοτρίαζόλιο) ως βοηθητικό πυρηνόφιλο (Novabiochem) καθώς επίσης και η



☑ διϊσοπροπυλαιθυλαμίνη (DIEA) ως τριτοταγής βάση για να δημιουργηθεί το καρβοξυλικό άλας του προστατευμένου αμινοξέος και να ιονιστεί το HOBt (Merk-Schuchard).

Τα προστατευμένα αμινοξέα που χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση των παραπάνω πεπτιδίων ήταν τα εξής:

● Fmoc-Lys(Boc)-OH	M.B: 468,5
● Fmoc-Lys(Mtt)-OH	M.B: 624,8
● Fmoc-Aib-OH	M.B: 325,4
● Fmoc-Gly-OH	M.B: 297,3
● Fmoc-Glu(OtBu)-OH	M.B: 425,5
● Fmoc-Asp(OtBu)-OH	M.B: 411,5
● Fmoc-Asp(OBz)-OH	M.B: 445,5
● Fmoc-Arg(Pdf)-OH	M.B: 648,8
● Fmoc-Cys(Trt)-OH	M.B: 585,7

Η σύζευξη των αμινοξέων έγινε χρησιμοποιώντας αναλογία 3/3/3/1 : αμινοξύ/ HOBt/DIC (ή το εκάστοτε αντιδραστήριο σύζευξης) /meq ρητίνης. Ως διαλύτης στην αντίδραση σύζευξης χρησιμοποιήθηκε μίγμα διχλωρομεθάνιο (DCM): διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) σε αναλογία 1:1, ενώ για τις εκπλύσεις της πεπτιδορητίνης χρησιμοποιήθηκαν :

- DCM (LABSCAN Ltd, Ireland) και το
- DMF (LABSCAN)

Άλλα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την σύνθεση των πεπτιδίων ήταν :

- ⇒ ο οξικός ανυδρίτης (Ac_2O) σε διάλυμα πυριδίνης για την αντίδραση ακετυλίωσης,
- ⇒ το φολικό οξύ (folic acid) σε διάλυμα διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) και DMF
- ⇒ πιπεριδίνη (Fluka) για την αποπροστασία της Fmoc- ομάδας,
- ⇒ το τριφθοροοξικό οξύ (TFA) (Merk-Schuchard, Germany) για την απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων και την αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη,
- ⇒ το τριϊσοπροπυλοσιλάνιο (TIS) και η αίθυλδιθειόλη (EDT) ως μόρια παγίδα για τα καρβοκατιόντα,
- ⇒ το διμεθόξυ βενζόλιο (DMB) ως μόριο παγίδα κατά την αποκοπή πεπτιδίων από την Rink Amide ρητίνη.

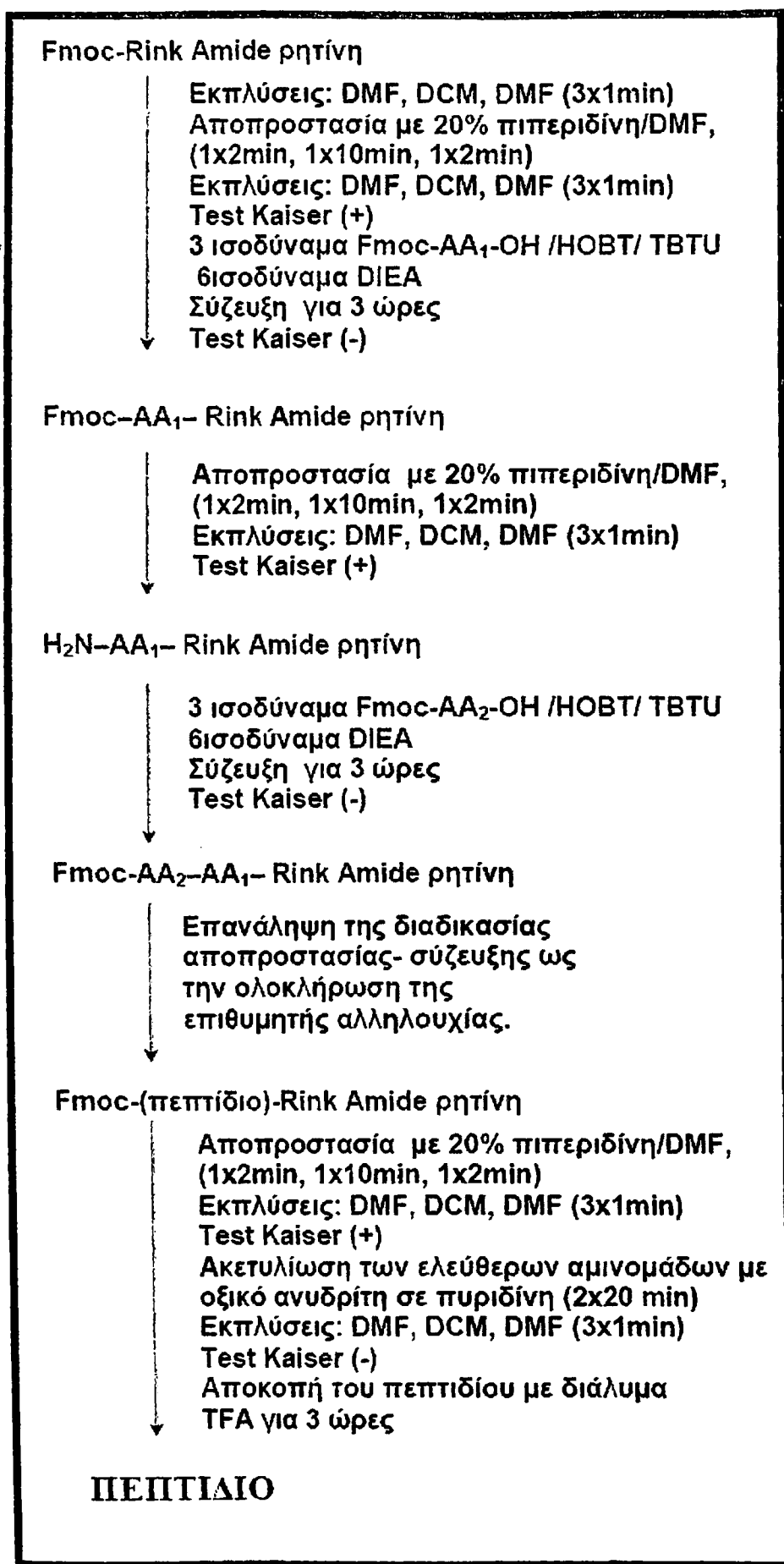


11.2. Μεθοδολογία σύνθεσης

Η σύνθεση των πεπτιδίων έγινε σύμφωνα με την μεθοδολογία της Fmoc/tBu στρατηγικής. Ένα γενικό σχήμα της πορείας που ακολουθήθηκε, ξεκινώντας από την Rink Amide ρητίνη καθώς τα περισσότερα πεπτίδια συντέθηκαν σε αυτή, παρατίθεται στο σχήμα 11.1.

Η αποπροστασία από την Fmoc ομάδας της ρητίνης έγινε με διάλυμα 20% πιπεριδίνης σε διμέθυλοφορμαμίδιο. Αφού γίνει η απομάκρυνση των παραπροϊόντων με τους κατάλληλους διαλύτες, όπως φαίνεται στο σχήμα 11.1, η αποπροστασία της α-αμινομάδας διαπιστώθηκε με test Kaiser [234]. Το test βασίζεται στην αντίδραση της νινυδρίνης με πρωτοταγείς αμίνες, η οποία δίνει ένα μπλε χρώμα (Ruhemann's purple). Πραγματοποιείται με προσθήκη μερικών σταγόνων από τα διαλύματα α) 2ml KCN 0,001 M σε 100ml πυριδίνη, β) 5gr νινυδρίνης σε 100 ml αιθανόλης και γ) 400mgf φαινόλης σε 100ml αιθανόλης, σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει μερικούς κόκκους ρητίνης. Θέρμανση στους 100 °C για 30 sec προκαλεί χρωματισμό των κόκκων, όταν υπάρχουν ελεύθερες αμινομάδες.

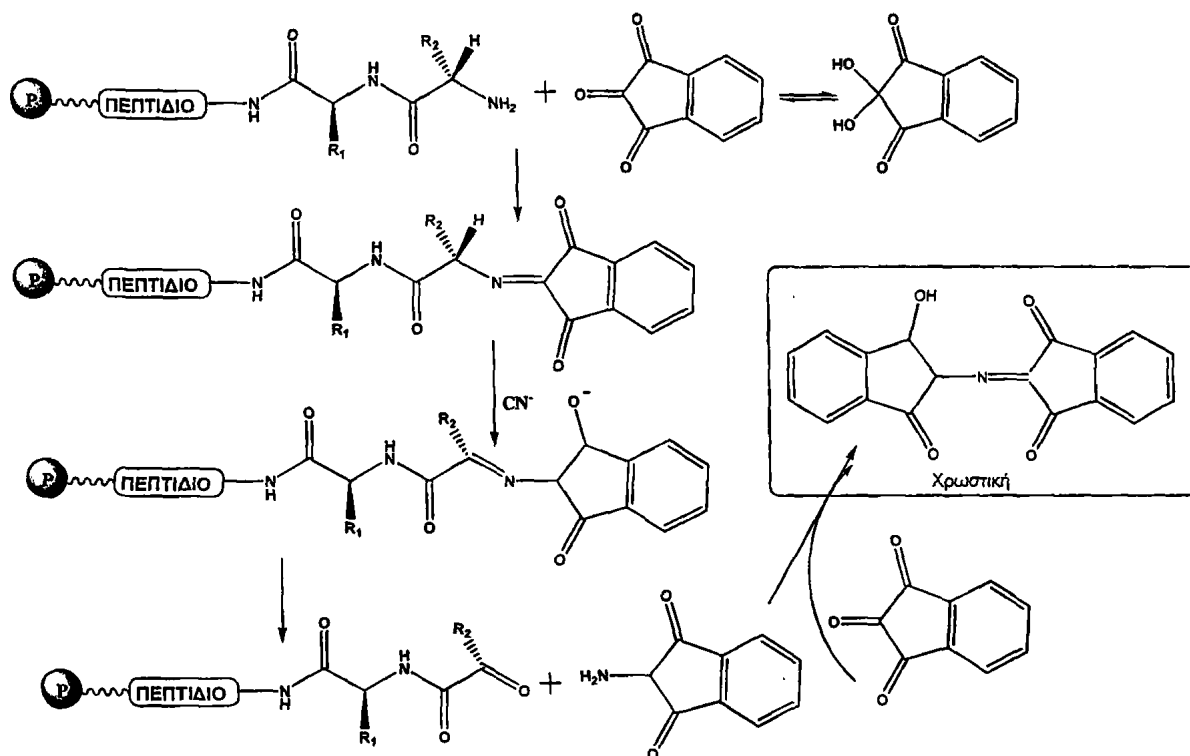




Σχήμα 11.1: Πορεία σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση με την Fmoc/tBu μεθοδολογία.



Πρέπει να τονιστεί πως η αντίδραση της νινυδρίνης είναι ένας ποιοτικός και όχι ποσοτικός προσδιορισμός ανίχνευσης ελεύθερων αμινομάδων (σχήμα 11.2). Αξίζει τέλος να σημειωθεί ότι η γλυκίνη εμφανίζει καφέ χρώμα κατά την αποκοπή της Fmoc ομάδας, ενώ το αμινοϊσοβουτυρικό στις περισσότερες των περιπτώσεων δεν εμφανίζει χρώμα.



Σχήμα 11.2: Αντίδραση νινυδρίνης.

Η σύζευξη του επομένου προστατευμένου αμινοξέος επιτυγχάνεται με την προσθήκη κατάλληλων αντιδραστηρίων σύζευξης DIC ή TBTU ή HBTU ενώ η ταυτόχρονη χρήση του HOBt συμβάλλει στην αύξηση της ταχύτητας της σύζευξης αλλά και ελαττώνει τον κίνδυνο της ρακεμοποίησης του ενεργοποιημένου ενδιάμεσου. Η παρουσία τριτοταγούς βάσης (DIEA) σε περίσσεια ήταν απαραίτητη καθώς βασικές συνθήκες απαιτούνται κατά την ενεργοποίηση του αμινοξέος. Η αντίδραση της σύζευξης ελέγχεται ξανά με test Kaiser. Η απουσία χρώματος στους κόκκους της πεπτιδορητίνης αποτελεί ένδειξη για την ολοκλήρωση της αντίδρασης. Με ανάλογα βήματα αποπροστασίας-σύζευξης, επιμηκύνθηκε η αλυσίδα έως ότου ολοκληρωθεί η σύνθεση του επιθυμητού πεπτιδίου.

Μετά την προσθήκη του τελευταίου αμινοξέος και την αποπροστασία της N^α τελικής αμινομάδας ακολούθησε είτε ακετυλίωσή της με οξικό ανυδρίτη (Ac₂O) σε διάλυμα πυριδίνης, είτε σύζευξη του φολικού οξέος σε διάλυμα DMSO, με DCC ως αντιδραστήριο σύζευξης και HOBt ως βοηθητικό πυρινόφιλο. Τα πεπτίδια αποκόπηκαν από την ρητίνη με

παράλληλη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων. Ως αντιδραστήριο αποκοπής αρχικά χρησιμοποιήθηκε διάλυμα TFA παρουσία νερού και TIS ως μόρια παγίδες, (όταν το πεπτιδίο περιείχε κυστεΐνη τότε στο μίγμα προστίθεται και η EDT). Με το πρωτόκολλο αυτό όμως παρατηρήθηκε ένα παραπροϊόν σε μεγάλη απόδοση, το οποίο οφειλόταν στην μερική αποσύνθεση της ρητίνης. Για την αντιμετώπιση του προβλήματος χρησιμοποιήθηκε ως διάλυμα αποκοπής TFA/TIS/DMB σε αναλογία 92,5/2,5/5 ανεξάρτητα από την παρουσία κυστεΐνης στην αλληλουχία του πεπτιδίου [235].

Η πεπτιδορηνίνη και το μίγμα αποκοπής τοποθετούνται σε σφαιρική φιάλη και κατεργάζονται για τουλάχιστον 3 ώρες. Στη συνέχεια η ρητίνη διηθείται και το διήθημα εξατμίζεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα. Για την καλύτερη απομάκρυνση του TFA, στο υπόλειμμα προστίθεται μίγμα DCM/εξανίου 1/1 κατ' όγκον και επανασυμπυκνώνεται. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι την ποσοτική απομάκρυνση του TFA. Στο υπόλειμμα προστίθεται παγωμένος αιθέρας για την καταβύθιση του πεπτιδίου, το οποίο μετά από διήθηση και διάλυσή του σε υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 2N, λυοφιλοποιείται.

11.3. Τεχνικές καθαρισμού και ταυτοποίησης

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

❶ Υγρή χρωματογραφία ανάστροφης φάσης και υψηλής διαχωριστικής ικανότητας RP-HPLC (Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography) [236].

➤ Αναλυτική RP-HPLC, (Waters 600s) κατά την οποία καθορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες για το σύστημα έκλυσης και

➤ Ημιπαρασκευαστική RP-HPLC, (Waters PrepLC 4000 System).

➤ Παρασκευαστική RP-HPLC, (Waters PrepLC 4000 System).

Ο μηχανισμός διαχωρισμού στην χρωματογραφία ανάστροφης φάσης βασίζεται στην αλληλεπίδραση του πεπτιδίου, που είναι διαλυμένο στην κινητή, υδατική φάση και στην υδρόφοβη στάσιμη φάση που αποτελεί το υλικό πλήρωσης της στήλης. Αυτό αποτελείται από ανθρακικές αλυσίδες, μήκους από 4 έως 18 άτομα άνθρακα, που είναι συνδεδεμένες σε επιφάνεια πυριτίου. Για τον καθαρισμό μικρών πεπτιδίων με αρκετά φορτία χρησιμοποιούνται υλικά με πολλά ανθρακοάτομα (κολώνες C18) και με κινητή φάση που μεταβάλλεται προς την λιγότερο πολική σύσταση διαλυτών ενώ για τα μεγάλα και με υψηλό



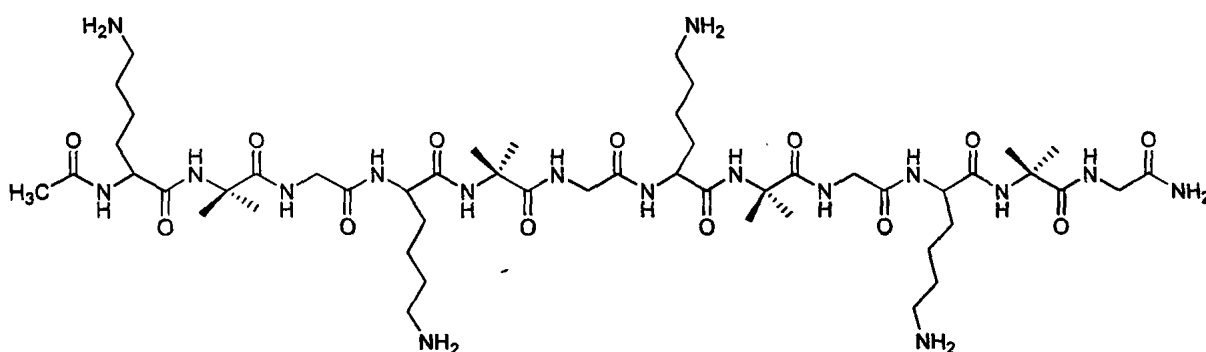
ποσοστό υδρόφοβων αμινοξέων πεπτίδια ενδείκνυνται τα υλικά πλήρωσης με μικρές αλυσίδες ατόμων άνθρακα ώστε να μην συγκρατούνται υπερβολικά ισχυρά στην υδρόφοβη στάσιμη φάση.

②Φασματοσκοπία μάζας Electrospray Ionisation (ESI-MS) σε συσκευή Micromass Platform LC Quadrupole [237].

Το ESI-MS πλεονεκτεί έναντι άλλων φασματοσκοπικών μεθόδων καθώς επιτρέπει την πολύ ευαίσθητη ανάλυση των μικρών, μεγάλων και ασταθών μορίων όπως τα πεπτίδια, οι πρωτεΐνες, οι ολιγοσακχαρίτες. Και αυτό γιατί δεν παράγει ιόντα από το προς ανάλυση δείγμα, αλλά εξάγει τα ήδη υπάρχοντα από το διάλυμα.

11.4. Πειραματική πορεία σύνθεσης, καθαρισμού και ταυτοποίησης

11.4.1. Ac-(Lys-Aib-Gly)₄-NH₂



M.T.: C₅₀H₉₃N₁₇O₁₃

MB=1140,4

Η σύνθεση του φορέα πραγματοποιήθηκε με βάση της αρχές της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση κατά Merrifield. Ως πολυμερικό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε η Rink Amide ρητίνη με υποκατάσταση 0.8mmol/g. Για τη σύνθεση 0,25 mmol πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκαν 313,51 mg ρητίνης.

Για την προστασία της παράπλευρης αλυσίδας της λυσίνης χρησιμοποιήθηκε η Mtt ομάδα, η οποία μπορεί να απομακρυνθεί εκλεκτικά από την πεπτιδορητίνη, με ελαφρώς όξινης συνθήκες, χωρίς να παρατηρείται αποκοπή του πεπτιδίου απ' τη ρητίνη. Κάτι τέτοιο επιτρέπει την συνέχιση της σύνθεσης από την αμινομάδα της παράπλευρης αλυσίδας της λυσίνης.

Η σύζευξη των αμινοξέων έγινε χρησιμοποιώντας τριπλάσια περίσσεια τόσο του προστατευμένου αμινοξέος όσο και των αντιδραστηρίων σύζευξης. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε η αναλογία 3/3/3/1 : αμινοξύ/ HOBt/TBTU/ρητίνη, ενώ ως διαλύτης το

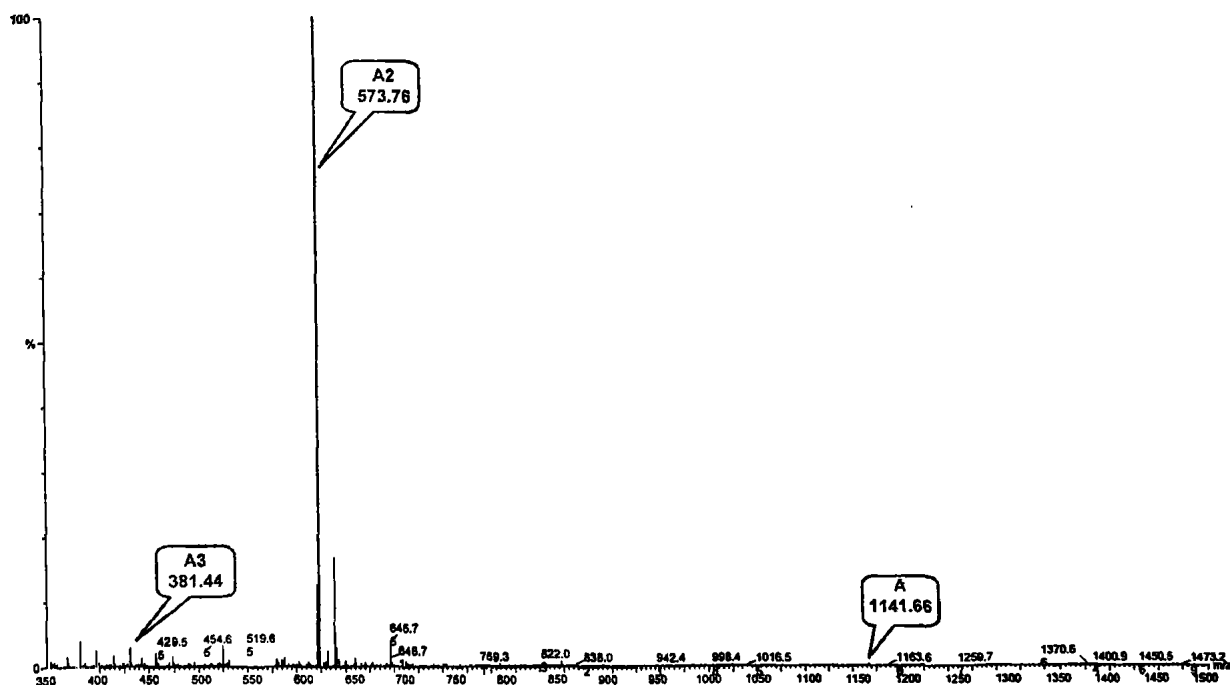
μίγμα διχλωρομεθάνιο (DCM): διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) σε αναλογία 1:1. Το διμεθυλοφορμαμίδιο που χρησιμοποιήθηκε κατά την σύζευξη είχε υποστεί απόσταξη υπεράνω νινυδρίνης, προκειμένου να δεσμευτούν οι πρωτοταγείς αμίνες που προκύπτουν ως παραπροϊόντα της διάσπασής του. Τέλος, για της εκπλύσεις της πεπτιδορρητίνης χρησιμοποιήθηκαν ως διαλύτες το DCM και το DMF. Μετά το τέλος της σύνθεσης, η πεπτιδορρητίνη μεταφέρθηκε για ξήρανση υπό κενό μέχρι σταθερού βάρους. Ελήφθησαν 742,09 mg πεπτιδορρητίνης. Η απόδοση σύνθεσης υπολογίστηκε **93,2 %**.

Η αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη και η ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων, έγινε με κατεργασία της πεπτιδορρητίνης με τριφθοροξικό οξύ (95% TFA), παρουσία τριϊσοπροπυλοσιλανίου (2,5% TIS) και απεσταγμένου νερού (2,5% H₂O) ως μόρια παγίδες των καρβοκατιόντων. 244,33 mg πεπτιδορρητίνης και το διάλυμα TFA/H₂O/TIS τοποθετήθηκαν σε σφαιρική φιάλη και αφέθηκαν υπό ανάδευση για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε διήθηση της ρητίνης και εκπλύσεις της με TFA. Το διήθημα συμπυκνώθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό. Στο υπόλειμμα προστέθηκε μίγμα DCM/εξανίου (1/1, v/v) και επανασυμπυκνώθηκε. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε τέσσερις φορές για την καλύτερη απομάκρυνση του TFA. Η καταβύθιση του πεπτιδίου έγινε με την προσθήκη παγωμένου αιθέρα και παραμονή μία νύχτα της -4°C. Ακολούθησε διήθηση και το ίζημα διαλύθηκε σε οξικό οξύ 2N και λυοφιλοποιήθηκε. Ελήφθησαν 93,2 mg πεπτιδίου (**$\alpha=97,7 \%$**).

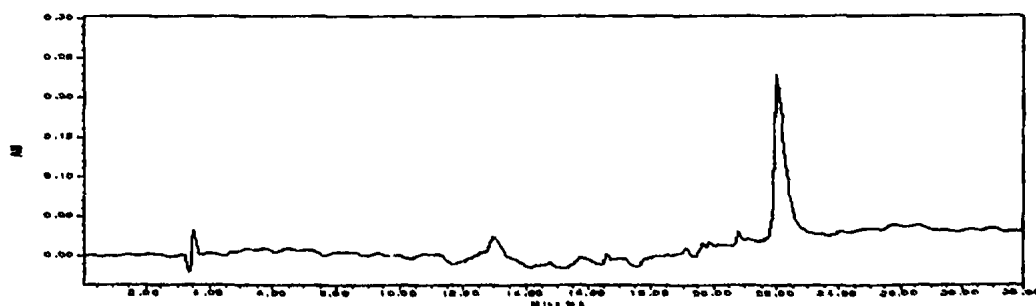
Ο καθαρισμός του πεπτιδίου έγινε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC σε στήλη C₁₈ Discovery, 25cm x 10mm. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA, για 30 min. Η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από A/B:95/5 σε A/B:60/40. Η ταχύτητα ροής καθορίστηκε στα 4.7 ml/min και η ανίχνευση έγινε στα 214 nm. Μετά την συλλογή και την ταυτοποίηση όλων των κλασμάτων με φασματοσκοπία μάζας Electrospray Ionization (ESI-MS) διαπιστώθηκε η ύπαρξη του επιθυμητού πεπτιδίου (**$\alpha=42,8\%$**). Στο σχήμα 11.3 δίνεται το φάσμα μάζας του καθαρού πεπτιδίου και στο σχήμα 11.4 η αναλυτική HPLC για την οποία το πρόγραμμα βαθμίδωσης (gradient) και το σύστημα των διαλυτών έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν:



Χρόνος (min)	H ₂ O/0,1% TFA	CH ₃ CN/0,1% TFA	Ροή (ml/min)
0	90	10	1
30	50	50	1

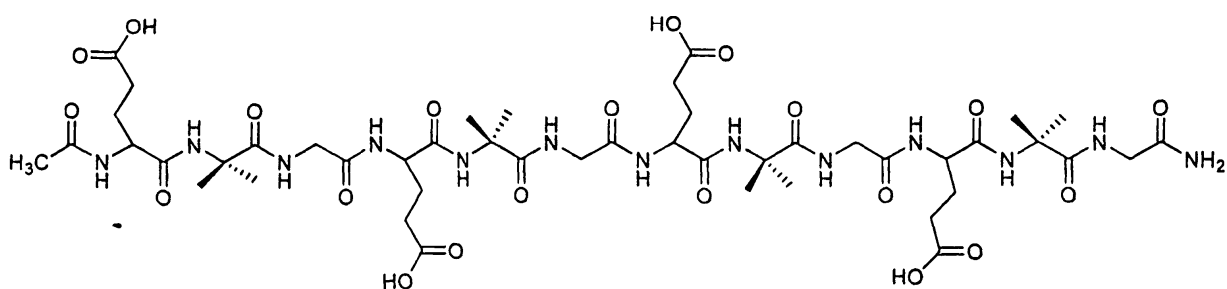


Σχήμα 11.3: ESI-MS φάσμα μάζας του καθαρού πεπτιδίου $\text{Ac}-(\text{Lys-Aib-Gly})_4\text{-NH}_2$ στο οποίο φαίνονται τα μοριακά ιόντα $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}/2$, $[M+3H]^{3+}/3$. Υπολογισθέν $M.B.=1140,4$. Ευρεθέν $M.B.=1140,66$.



Σχήμα 11.4: Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού πεπτιδίου $\text{Ac}-(\text{Lys-Aib-Gly})_4\text{-NH}_2$. Ανίχνευση στα 214nm.

11.4.2. Ac-(Glu-Aib-Gly)₄-NH₂



M.T.: C₄₆H₇₃N₁₃O₂₁

MB=1144,3

- Η σύνθεση του πεπτιδίου έγινε σε Rink Amide AM ρητίνη με υποκατάσταση 0,52 meq/g ακολουθώντας την μεθοδολογία της Fmoc/tBu στρατηγικής. Για τη σύνθεση 0,5 mmol πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκαν 982,9 mg ρητίνης. Τα αμινοξέα εισήχθησαν στον πεπτιδικό σκελετό ως N^α-Fmoc παράγωγα και η αντίδραση σύζευξης έγινε με TBTU παρουσία HOBt και DIEA σε αναλογίες Fmoc-αμινοξύ/TBTU/HOBt/DIEA: 1/1/1/3. Για την προστασία της παράπλευρης ομάδας του γλουταμινικού επιλέχθηκε η tert-βουτυλομάδα (OtBu).

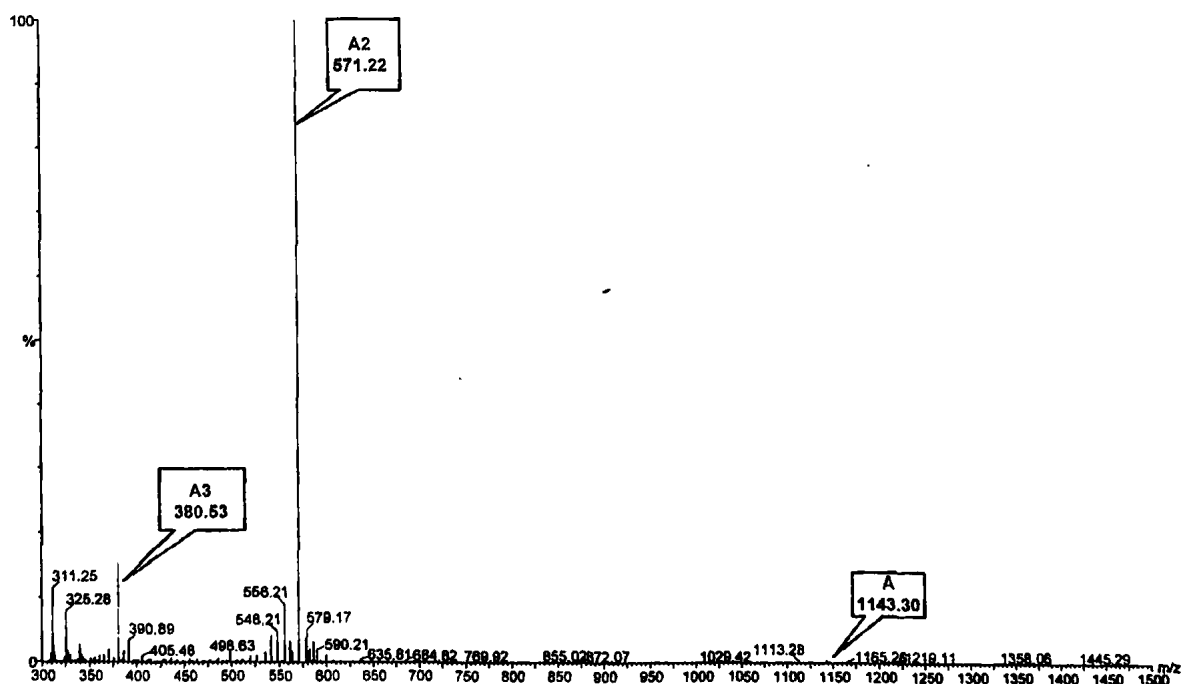
Μετά την προσθήκη του τελευταίου προστατευμένου γλουταμινικού οξέος, η πεπτιδορητίνη συλλέχθηκε και ξηράθηκε. Από τα 1611,07 mg ζυγίστηκαν 1408,3 mg στα οποία απομακρύνθηκε η Fmoc ομάδα και ακετυλιώθηκε η N-τελική αμινομάδα. Ελήφθησαν 1358,3 mg πεπτιδορητίνης με την απόδοση να υπολογίζεται στο **99%**.

Η αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη και η ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων, έγινε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης με τριφθοροξικό οξύ (95% TFA), παρουσία τριϊσοπροπυλοσιλανίου (2,5% TIS) και απεσταγμένου νερού (2,5% H₂O) ως μόρια παγίδες των καρβοκατιόντων. 1358,3 mg πεπτιδορητίνης και το διάλυμα TFA/H₂O/TIS αφέθηκαν υπό ανάδευση για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε διήθηση της ρητίνης και εκπλύσεις της με TFA. Το διήθημα συμπυκνώθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό, προστέθηκε DCM/εξάνιο (1/1, v/v) και επανασυμπυκνώθηκε. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε τέσσερις φορές για την καλύτερη απομάκρυνση του TFA. Η καταβύθιση του πεπτιδίου έγινε με την προσθήκη παγωμένου αιθέρα. Ακολούθησε διήθηση και το ίζημα διαλύθηκε σε οξικό οξύ 2N και λυοφιλοποιήθηκε. Ελήφθησαν 441,8 mg πεπτιδίου (**α=96,5%**).

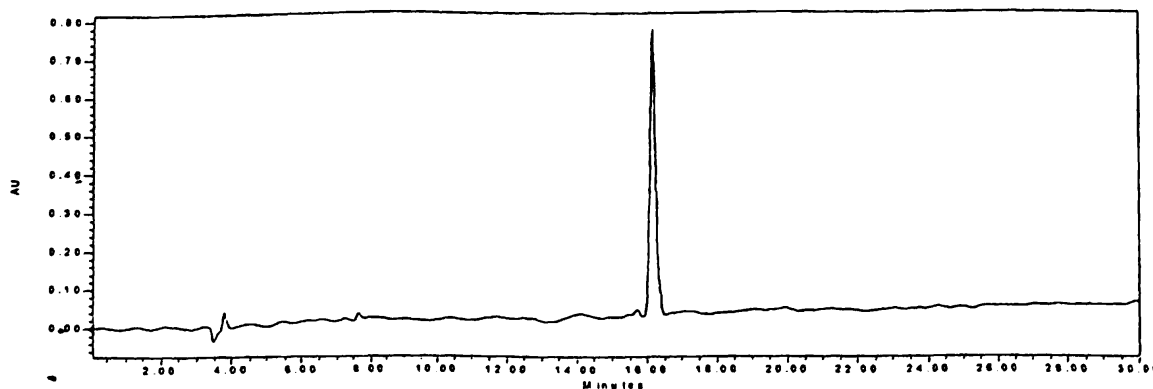
Ο καθαρισμός 42 mg Ac-(Glu-Aib-Gly)₄-NH₂ έγινε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC σε στήλη C₁₈ Discovery, 25cm x 10mm. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA, για 30 min. Η βαθμίδωση των διαλυτών

έκλουσης ήταν γραμμική από A/B:85/15 σε A/B:60/40. Η ταχύτητα ροής καθορίστηκε στα 4.7 ml/min και η ανίχνευση έγινε στα 214 nm. Μετά την συλλογή και την ταυτοποίηση όλων των κλασμάτων με φασματοσκοπία μάζας Electrospray Ionization (ESI-MS) διαπιστώθηκε η ύπαρξη του επιθυμητού πεπτιδίου (ελήφθησαν 19,3 mg καθαρού πεπτιδίου, $\alpha=45,9\%$). Στο σχήμα 11.5 δίνεται το φάσμα μάζας του επιθυμητού πεπτιδίου και στο σχήμα 11.6 η αναλυτική HPLC για την οποία το πρόγραμμα βαθμίδωσης (gradient) και το σύστημα των διαλυτών έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν:

Χρόνος (min)	H ₂ O/0,1% TFA	CH ₃ CN/0,1% TFA)	Ροή (ml/min)
0	90	10	1
30	50	50	1



Σχήμα 11.5: ESI-MS φάσμα μάζας του καθαρού πεπτιδίου $\text{Ac}-(\text{Glu-Aib-Gly})_4\text{-NH}_2$ στο οποίο φαίνονται τα μοριακά ιόντα $[M-H]^-$, $[M-2H]^{2-}/2$, $[M-3H]^{3-}/3$. Υπολογισθέν $M.B.=1144,15$. Ευρεθέν $M.B.=1144,3$.

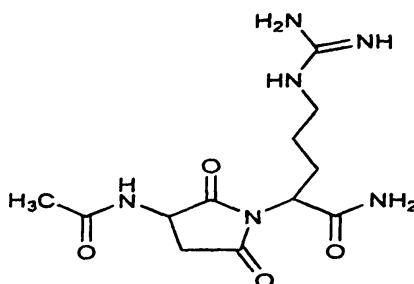


Σχήμα 11.6: Χρωματογράφημα αναλυτικής *RP-HPLC* του καθαρού πεπτιδίου *Ac-(Glu-Aib-Gly)₄-NH₂*. Ανίχνευση στα 214nm.

11.4.3. Ac-Asi-Arg-NH₂

M.T. : C₁₂H₂₀N₆O₄

M. B.: 312,32

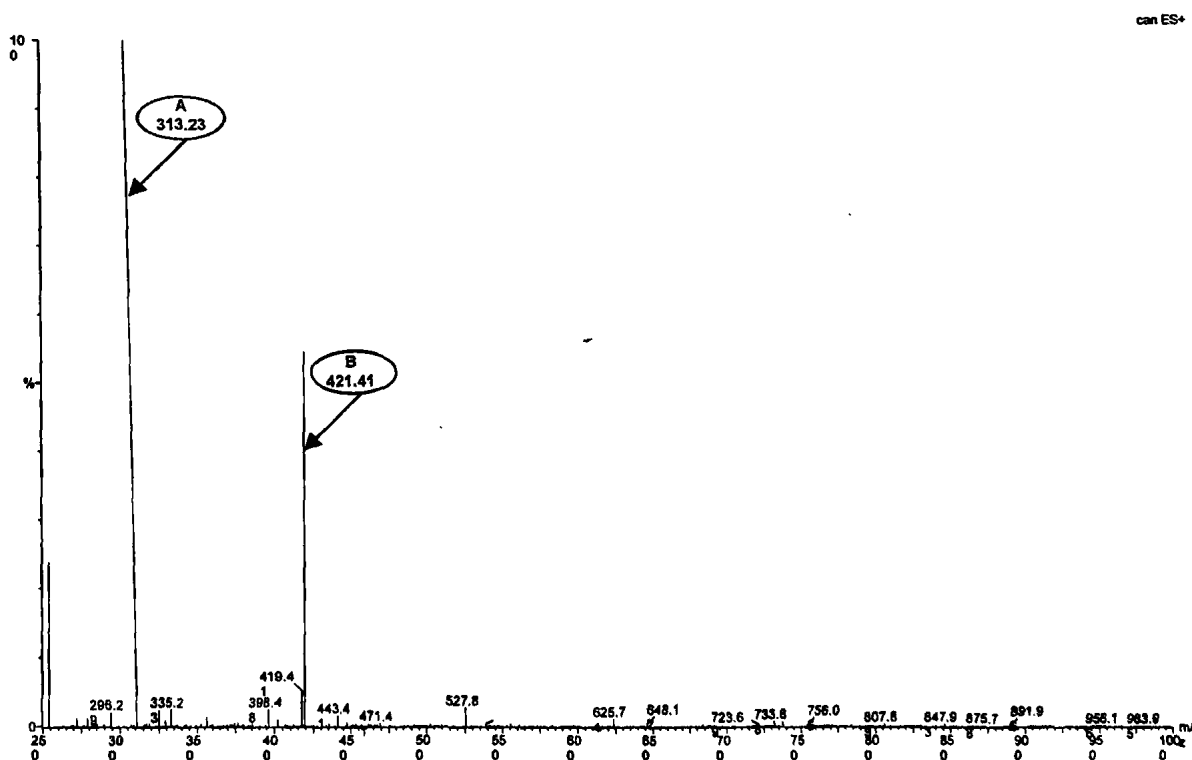


Για την σύνθεση 1,28 mmol πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκαν 1,52 gr Rink Amide ρητίνης με υποκατάσταση 0,8 meq/gr. Τα αμινοξέα εισήχθησαν ως N^α-Fmoc παράγωγα, ενώ η πλευρικές προστασίες ήταν, για την Arg η Pbf ομάδα και για το Asp η OBzl ομάδα. Η επιλογή της OBzl ομάδας για την προστασία του ασπαρτικού έγινε για την πιο ποσοτική μετατροπή του πεπτιδίου σε ασπατιμίδιο καθώς έχει δειχθεί πως αυτή η ομάδα ευνοεί περισσότερο τον σχηματισμό του [238]. Οι αντιδράσεις σύζευξης έγιναν με HBTU παρουσία HOBt και DIEA σε αναλογίες Fmoc-αμινοξύ/HBTU/HOBt/DIEA: 1/1/1/2. Μετά τη ολοκλήρωση της σύνθεσης, η N-τελική του αμινομάδα ακετυλιώθηκε με διάλυμα με 30 eq οξικού ανυδρίτη σε διάλυμα πυριδίνης (~15 ml). Η πεπτιδορητίνη ξηράθηκε μέχρι σταθερού βάρους και ζυγίστηκε 2,02 g. Στη συνέχεια και για τον σχηματισμό του ασπαρτιμιδίου ακολούθησε κατεργασία ενός γραμμαρίου πεπτιδορητίνης για 1 ώρα με διάλυμα 20% πιπεριδίνης σε DMF. Μετά την διήθηση και τις εκπλύσεις, η πεπτιδορητίνη μεταφέρθηκε σε ξηραντήρα κενού για ξήρανση και αφέθηκε μέχρις ότου σταθεροποιηθεί το βάρος της που βρέθηκε 960 mg. Ακολούθησε υπολογισμός της απόδοσης σύνθεσης η οποία βρέθηκε $\alpha = 98\%$.

Η αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη έγινε με τριφθοροξικό οξύ (19ml TFA), παρουσία τριόσοπροπυλοσιλανίου (500μl TIS) και απεσταγμένου νερού (500μl H₂O) ως

μόρια παγίδες των καρβοκατιόντων. Το μίγμα αφέθηκε με ανάδευση για 3 ώρες. Ακολούθησε διήθηση της ρητίνης και εκπλύσεις της με TFA. Το διήθημα συμπυκνώθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό προστέθηκε DCM/εξάνιο (1/1, v/v) και επανασυμπυκνώθηκε. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε τέσσερις φορές για την καλύτερη απομάκρυνση του TFA. Η καταβύθιση του πεπτιδίου έγινε με την προσθήκη παγωμένου αιθέρα. Ακολούθησε διήθηση και το ίζημα διαλύθηκε σε οξικό οξύ 2N και λυοφιλοποιήθηκε. Ελήφθησαν 151 mg πεπτιδίου ($\alpha = 66,5 \%$).

Από το φάσμα μάζας του ακάθαρτου πεπτιδίου (σχήμα 11.7) φάνηκε πως ο σχηματισμός του ασπαρτιμιδίου δε προχώρησε ποσοτικά καθώς εμφανίζεται μοριακό ιόν που αντιστοιχεί στο Ac-Arg-Asp(OBzl)-NH₂. Αυτό συμβαίνει γιατί η OBzl ομάδα είναι σταθερή στις όξινες συνθήκες αποκοπής του πεπτιδίου στη Fmoc στρατηγική.



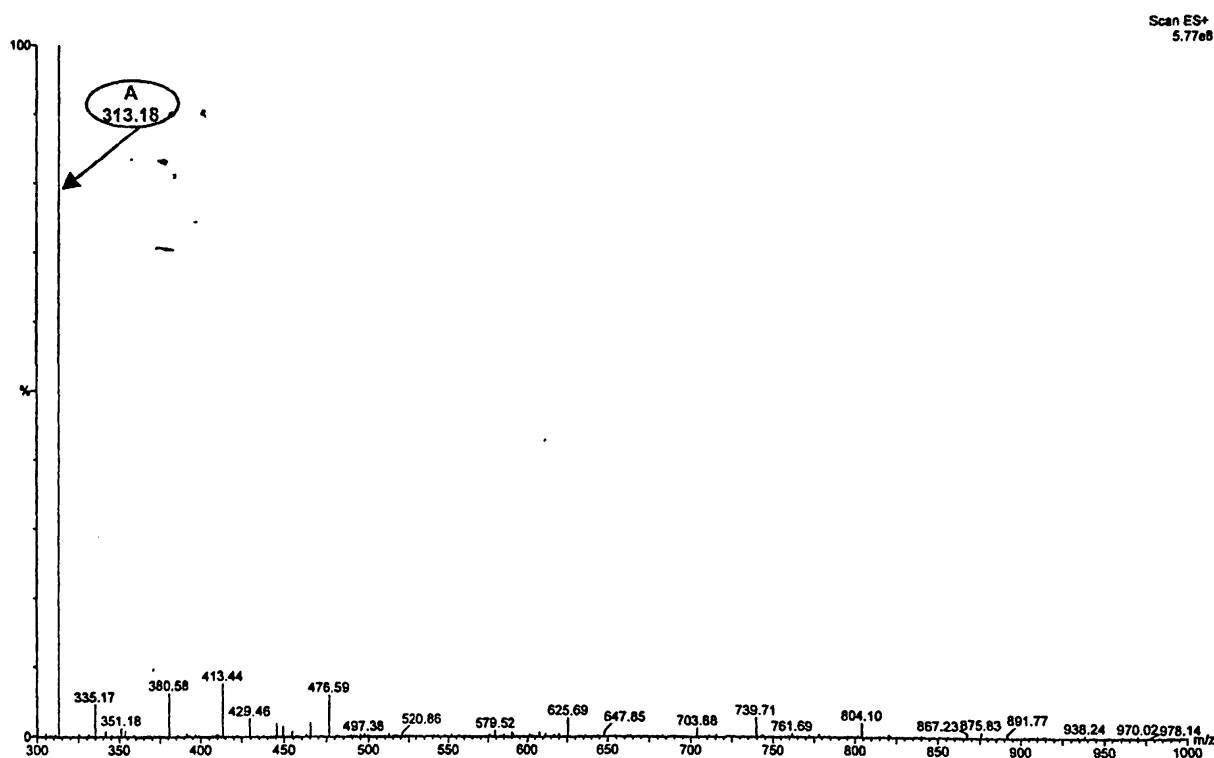
Σχήμα 11.7: Φάσμα μάζας ESI (Electrospray Ionization) του ακάθαρτου πεπτιδίου στο οποίο φαίνεται τα δύο μοριακά ιόντα που αντιστοιχούν σε

Ac-Asi-Arg-NH₂ με αναμενόμενο M.B. = 312,32 . Βρέθηκε MB = 312,23.

Ac-Arg-Asp(Obzl)-NH₂ με αναμενόμενο M.B. = 420,46. Βρέθηκε MB = 420,41.

Ο καθαρισμός του πεπτιδίου έγινε σε ημιπαρασκευαστική RP-HPLC, με χρήση βαθμιδωτού προγράμματος έκλουσης (gradient), (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA, σε αναλογία, από 98/2 έως 50/50 ροής 4.7ml/min και συνολικό χρόνο έκλουσης 30min. Με

αυτή τη διαδικασία καθαρίστηκαν 42,7 mg πεπτιδίου από τα οποία τελικά ελήφθησαν 17,3 mg επιθυμητού προϊόντος. Το επιθυμητό πεπτίδιο (φάσμα μάζας στο σχήμα 11.8) απομονώθηκε σε απόδοση 40.5%.

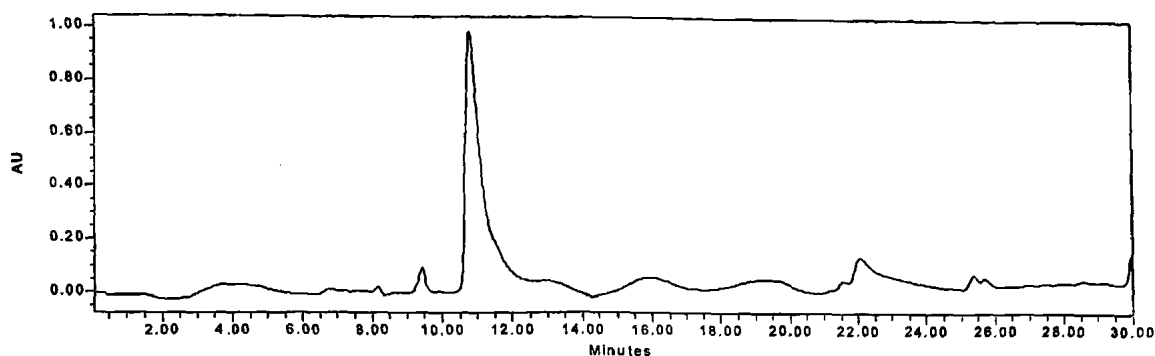


Σχήμα 11.8: Φάσμα μάζας ESI (Electrospray Ionization) του καθαρού πεπτιδίου Ac-Asi-Arg-NH₂ με αναμενόμενο M.B. = 312,32 . Βρέθηκε M.B. = 312,18.

Για την αναλυτική HPLC του πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω πρόγραμμα βαθμίδωσης (gradient) και σύστημα διαλυτών:

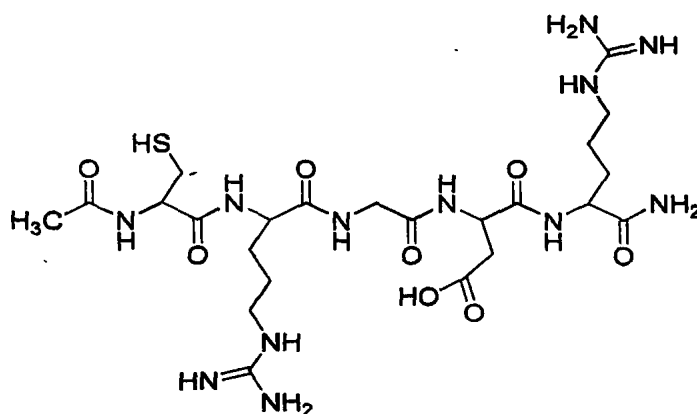
Χρόνος (min)	H ₂ O/0,1% TFA	CH ₃ CN/0,1% TFA	Ροή (ml/min)
0	90	10	1
30	60	40	1

Το χρωματογράφημα αναλυτικής HPLC δίνεται στο σχήμα 11.9.



Σχήμα 11.9: Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού πεπτιδίου **Ac-Asi-Arg-NH₂** Ανίχνευση στα 214nm.

11.4.4. Ac-Cys-Arg-Gly-Asp-Arg-NH₂



M.T. : C₂₃H₄₂N₁₂O₈S

M. B.: 646,72

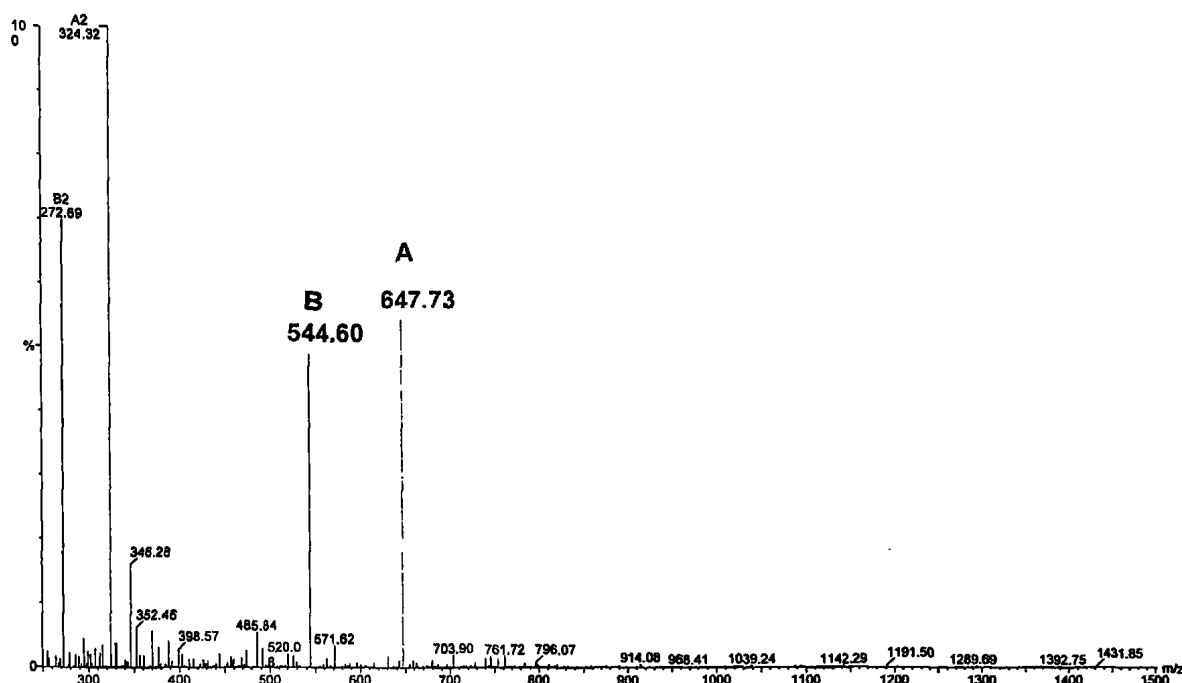
Για τη σύνθεση 0,465 mmol πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκαν 582 mg ρητίνης Rink Amide με υποκατάσταση 0,8 meq/gr. Τα αμινοξέα εισήχθησαν στον πεπτιδικό σκελετό ως N^α-Fmoc παράγωγα και η αντίδραση σύζευξης έγινε είτε με HBTU παρουσία HOBt και DIEA, είτε, για την περίπτωση της Fmoc-Cys(Trt)-OH, με DIC και HOBt, αφού το συγκεκριμένο αμινοξύ όταν χρησιμοποιηθεί με τα συνήθη ουρονικά άλατα και με την DIEA ως βάση δίνει εναντιομερή σε ποσοστό 5-35% [239]. Οι προστασίες των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων που χρησιμοποιήθηκαν είχαν ως εξής: το β-COOH του ασπαρτικού οξέος ήταν με τη μορφή του tert-βουτυλεστέρα (OtBu), η σουλφιδρυλομάδα της κυστεΐνης ήταν προστατευμένη με την τριφαινυλομεθυλομάδα (Trt), ενώ η προστασία των γουανιδομάδων

των αργινινών έγινε με την 2,2,5,7,8- πενταμεθυλοδιϋδροφουρανο-5-σουλφονυλο ομάδα (Pbf). Μετά την σύζευξη της δεύτερης αργινίνης, το πεπτίδιο ξηράθηκε. Η πορεία της σύνθεσης συνεχίστηκε με 373,1 mg πεπτιδορητίνης στα οποία προστέθηκε μια κυστεΐνη και η N-τελική του αμινομάδα ακετυλιώθηκε με με 30 eq οξικού ανυδρίτη σε διάλυμα πυριδίνης (~15 ml). Το πεπτίδιο ξηράθηκε και ζυγίστηκε 381,3 mg ($\alpha=99\%$).

Η αποκοπή από την ρητίνη έγινε με διάλυμα τριφθοροξικού οξέος 94%. Επειδή στην αμινοξική αλληλουχία εμπεριέχεται η κυστεΐνη, σαν μόριο παγίδα, μαζί με το νερό (2,5%) και το τριυδροπύροσουλάνιο (1%), χρησιμοποιήθηκε και η αίθυλοδιθειώλη (EDT) σε ποσοστό 2,5% στο μίγμα αποκοπής, για την αποφυγή οξείδωσης της σουφιδριλομάδας της.

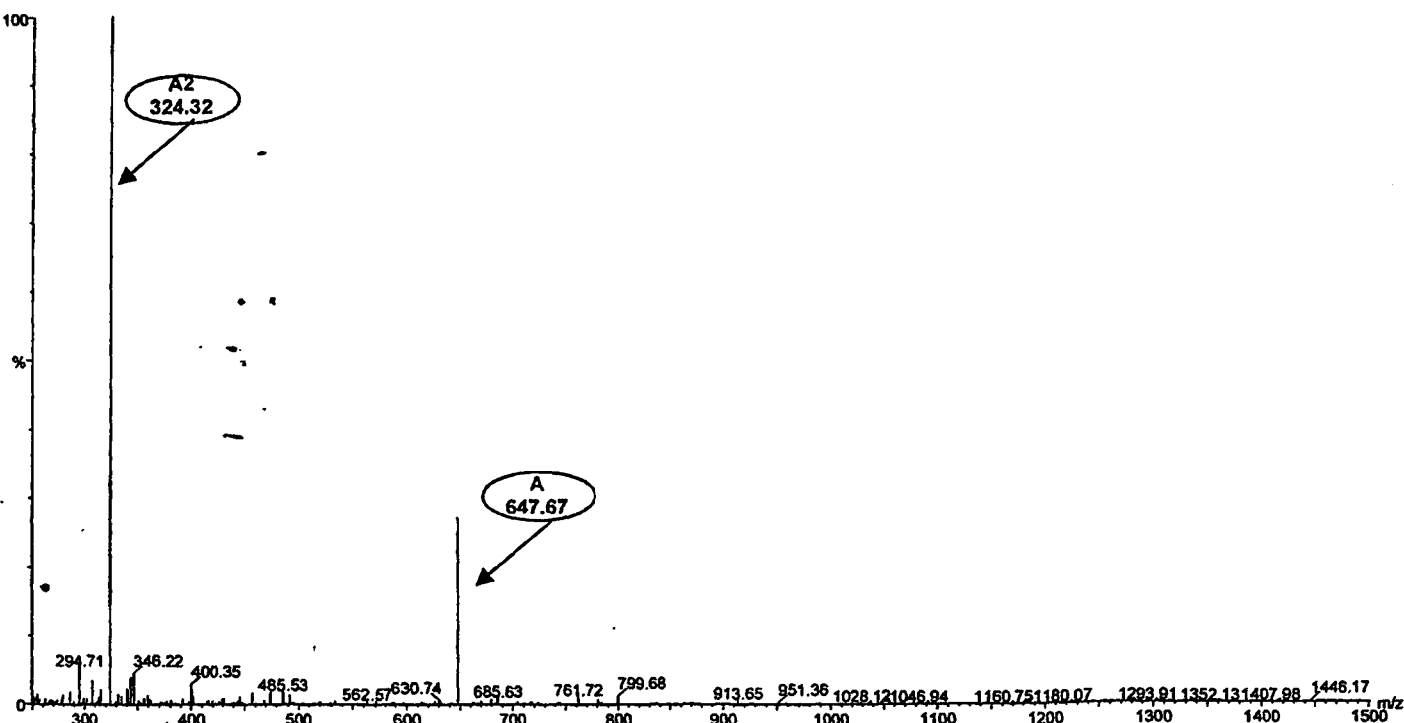
- Το μίγμα αφέθηκε με ανάδευση για 4 ώρες. Ακολούθησε διήθηση της ρητίνης και εκπλύσεις της με TFA. Το διήθημα συμπυκνώθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό, προστέθηκε DCM/εξάνιο (1/1, v/v) και επανασυμπυκνώθηκε. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε τέσσερις φορές για την καλύτερη απομάκρυνση του TFA. Η καταβύθιση του πεπτιδίου έγινε με την προσθήκη παγωμένου αιθέρα. Η παραλαβή του πεπτιδίου έγινε με εκχύλιση με οξικό οξύ 2N. Ύστερα από λυοφιλοποίηση της υδατικής στοιβάδας ελήφθησαν 66 mg πεπτιδίου ($\alpha=66\%$). Στο φάσμα μάζας του ακάθαρτου πεπτιδίου (σχήμα 11.10) ανιχνεύτηκαν δυο κύρια προϊόντα.



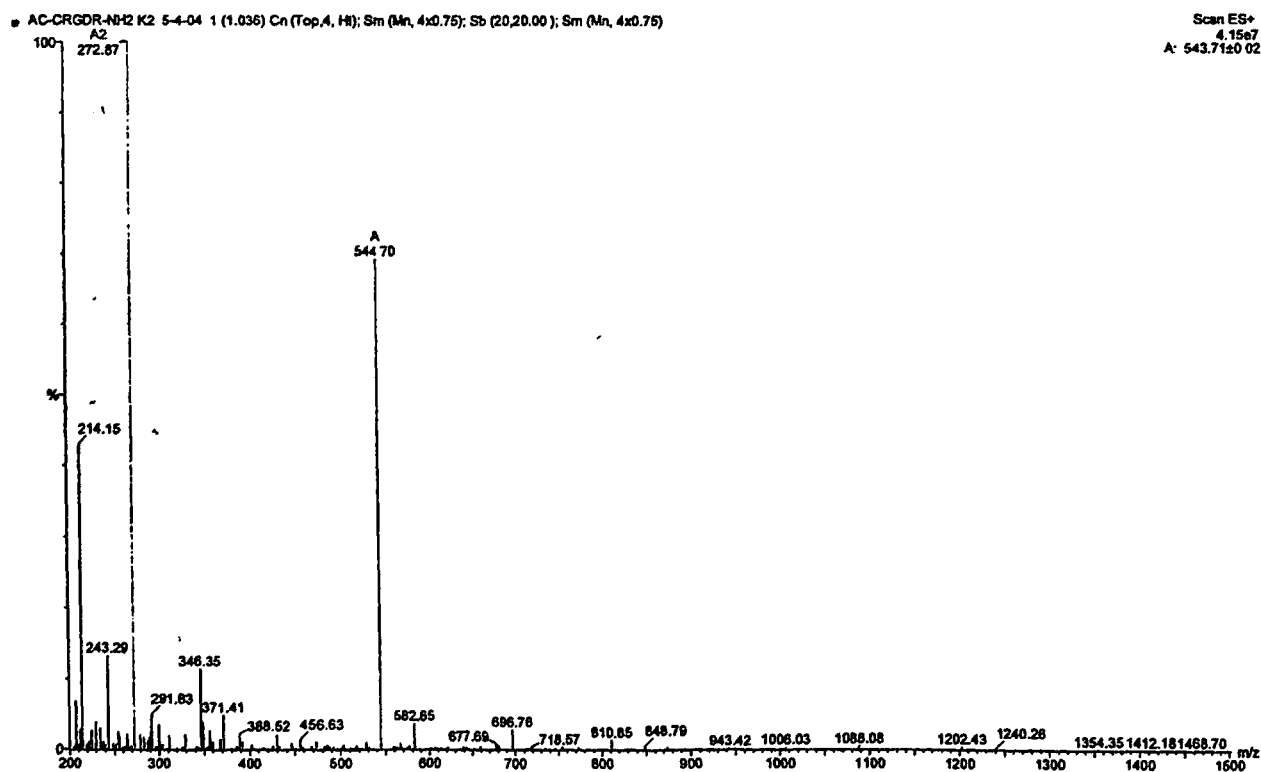


Σχήμα 11.10: Φάσμα μάζας ESI του ακάθαρτου πεπτιδίου στο οποίο φαίνεται τα δύο μοριακά ιόντα που αντιστοιχούν σε *Ac-Cys-Arg-Gly-Asp-Arg-NH₂* με αναμενόμενο *M.B.* = 646,72 και *Ac-Arg-Gly-Asp-Arg-NH₂* με αναμενόμενο *M.B.* = 543,58.

Ο καθαρισμός του πεπτιδίου έγινε σε ημιπαρασκευαστική RP-HPLC, με χρήση βαθμιδωτού προγράμματος έκλουσης (gradient) και διαλύτες (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA, σε αναλογία, από 98/2 έως 50/50 με ταχύτητα ροής 4.7ml/min και συνολικό χρόνο έκλουσης 30min. Με την διαδικασία αυτή καθαρίστηκαν 56 mg πεπτιδίου για να απομονωθούν δυο κύριες κορυφές, με την μια να αντιστοιχεί στο επιθυμητό πεπτίδιο *Ac-Cys-Arg-Gly-Asp-Arg-NH₂* (15,1 mg και απόδοση καθαρισμού α=26,8%) και την άλλη στο *Ac-Arg-Gly-Asp-Arg-NH₂*, σε πεπτίδιο χωρίς την κυστεΐνη (σχήματα 11.11 και 11.12).



Σχήμα 11.11: Φάσμα μάζας ESI του καθαρού πεπτιδίου *Ac-Cys-Arg-Gly-Asp-Arg-NH₂* με αναμενόμενο *M.B.* = 646,72. Βρέθηκε *M.B.* = 646,76.



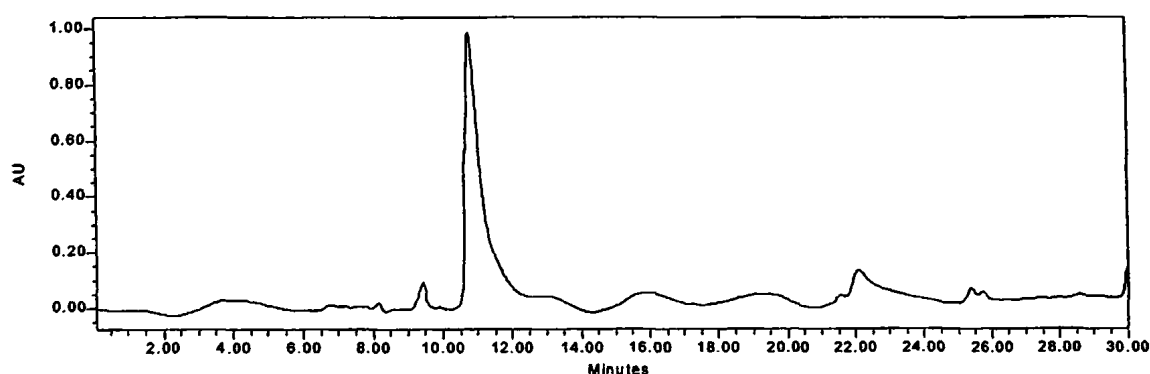
Σχήμα 11.12: Φάσμα μάζας ESI του καθαρού πεπτιδίου *Ac-Arg-Gly-Asp-Arg-NH₂* με αναμενόμενο *M.B.* = 543,58. Βρέθηκε *M.B.* = 543,7.



Για την αναλυτική HPLC του καθαρού πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω πρόγραμμα βαθμίδωσης (gradient) και σύστημα διαλυτών:

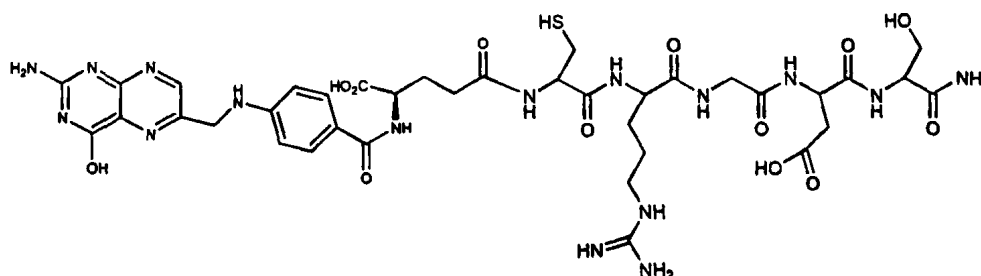
Χρόνος (min)	H ₂ O/0,1% TFA	CH ₃ CN/0,1% TFA)	Ροή (ml/min)
0	90	10	1
30	50	50	1

Το χρωματογράφημα αναλυτικής HPLC δίνεται στο σχήμα 11.13.



Σχήμα 11.13: Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού πεπτιδίου Ac-Cys-Arg-Gly-Asp-Arg-NH₂. Ανίχνευση στα 214nm.

11.4.5 Folyl-Cys-Arg-Gly-Asp-Ser-NH₂

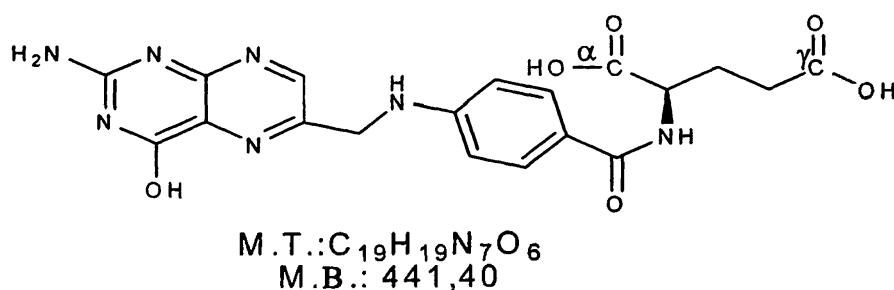


M.T. :C₃₇H₅₀N₁₆O₁₃S

M.B.: 958,96

Σε 203,3 mg πεπτιδορηνίνης με 0,1mmol Fmoc-RGDS πεπτιδίου, αφού απομακρύνθηκε η Fmoc ομάδα με κατεργασία με διάλυμα πιπεριδίνης σε DMF, προστέθηκε το

Fmoc-Cys(Trt)-OH με τη χρήση DIC ως αντιδραστηρίου σύζευξης και HOBt ως βοηθητικού πυρηνόφιλου. Αποπροστατεύεται η N^α τελική αμινομάδα και η σύζευξη του φολικού γίνεται με DCC, ως αντιδραστηρίου σύζευξης και HOBt ως βοηθητικού πυρηνόφιλου, σε διαλύτη DMSO που επιλέχθηκε ως καλύτερος για την διάλυση του φολικού. Τα αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν σε εξαπλάσια περίσσεια και η αντίδραση αφέθηκε για 24 ώρες απουσία φωτός. Με την ολοκλήρωση της σύζευξης, η πεπτιδορητίνη ξηράθηκε και ζυγίστηκε 244,3 mg ($\alpha=95\%$). Η χρήση του φολικού χωρίς προηγούμενη προστασία μιας εκ των δύο καρβοξυλομάδων (σχήμα 11.14) δεν εξασφαλίζει την εκλεκτικότητα της αντίδρασης καθώς και οι δύο ομάδες μπορούν εξίσου να αντιδράσουν. Έχει δειχθεί πως αφενός η αντίδραση ενεργοποίησης- και μετέπειτα σύζευξης- προχωρά γρηγορότερα από το γ-καρβοξύλιο, αφετέρου δεν έχει παρατηρηθεί σημαντική διαφορά στη βιολογική δράση του φολικού είτε συνδέεται από το α - είτε το γ-καρβοξύλιο [240].



Σχήμα 11.14: Το μόριο του φολικού οξέος.

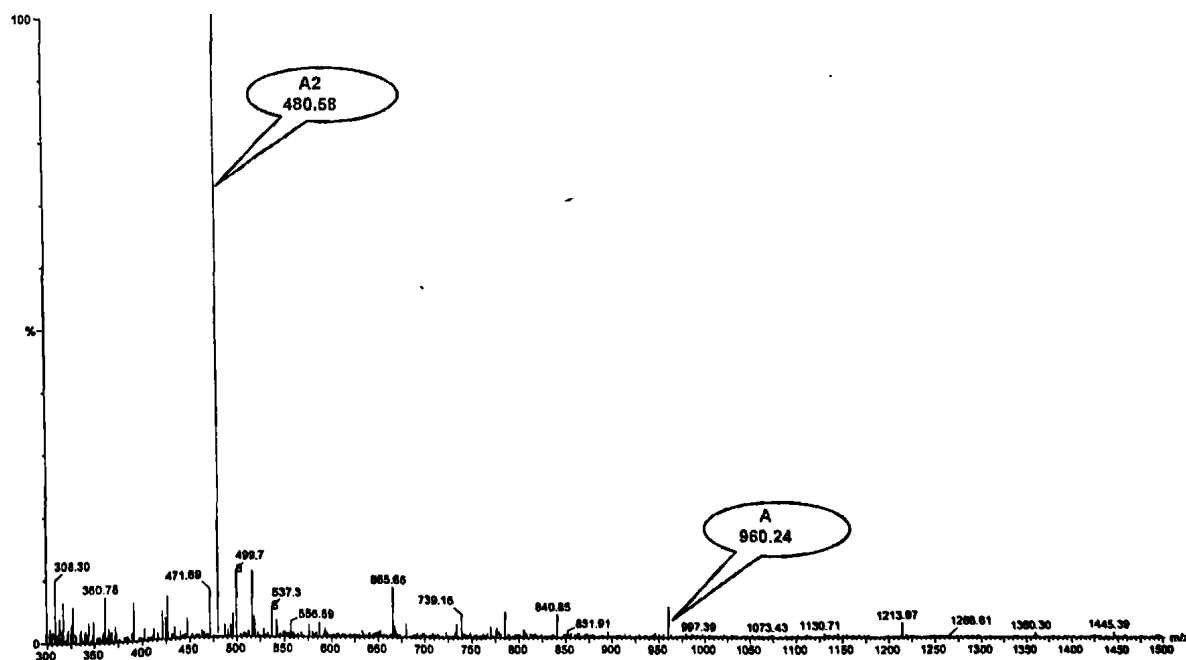
Το πεπτίδιο κόπηκε από την ρητίνη με κατεργασία σε διάλυμα TFA (9,25ml). Αυτή τη φορά ως μόρια παγίδες χρησιμοποιήθηκαν το τριυσοπρόπυλοσιλάνιο (Tis-0,25ml) και το διμεθόξυ βενζόλιο (DMB-0,5 ml), καθώς έχει δειχθεί πως η χρήση αυτών στο διάλυμα αποκοπής από την Rink Amide ελαττώνει τα παραπροϊόντα που οφείλονται στην αποικοδόμηση της ρητίνης. Το μίγμα αφέθηκε με ανάδευση για 3 ώρες. Ακολούθησε διήθηση της ρητίνης και εκπλύσεις της με TFA. Το διήθημα συμπυκνώθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό, προστέθηκε DCM/εξάνιο (1/1, v/v) και επανασυμπυκνώθηκε. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε τέσσερις φορές για την καλύτερη απομάκρυνση του TFA. Η καταβύθιση του πεπτιδίου έγινε με την προσθήκη παγωμένου αιθέρα. Το πεπτίδιο διαλύθηκε σε διάλυμα οξικού 2N και λυοφιλοποιήθηκε. Απομονώθηκαν 93,66 mg ($\alpha=99\%$).

Ο καθαρισμός του πεπτιδίου έγινε σε παρασκευαστική RP-HPLC, με χρήση βαθμιδωτού προγράμματος έκλουσης (gradient) και διαλύτες (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA, σε αναλογία, από 90/10 έως 50/50 με ταχύτητα ροής 20 ml/min και συνολικό χρόνο έκλουσης 30min. Το επιθυμητό πεπτίδιο (φάσμα μάζας στο σχήμα 11.15) απομονώθηκε σε απόδοση **11,3%** αφού απομονώθηκαν 8 από τα 68 mg που χρησιμοποιήθηκαν.

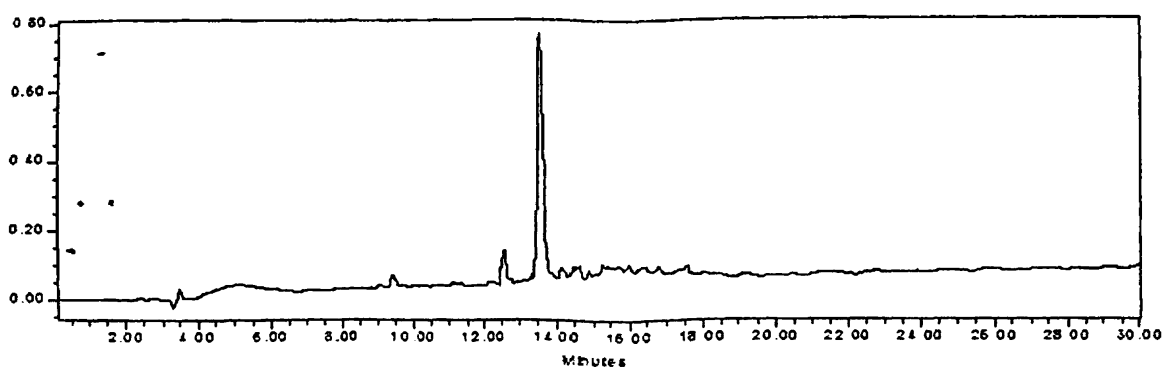
Για την αναλυτική HPLC του πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω πρόγραμμα βαθμίδωσης (gradient) και σύστημα διαλυτών:

Χρόνος (min)	H ₂ O/0,1% TFA	CH ₃ CN/0,1% TFA	Ροή (ml/min)
0	90	10	1
30	50	50	1

Το χρωματογράφημα αναλυτικής HPLC δίνεται στο σχήμα 11.16.

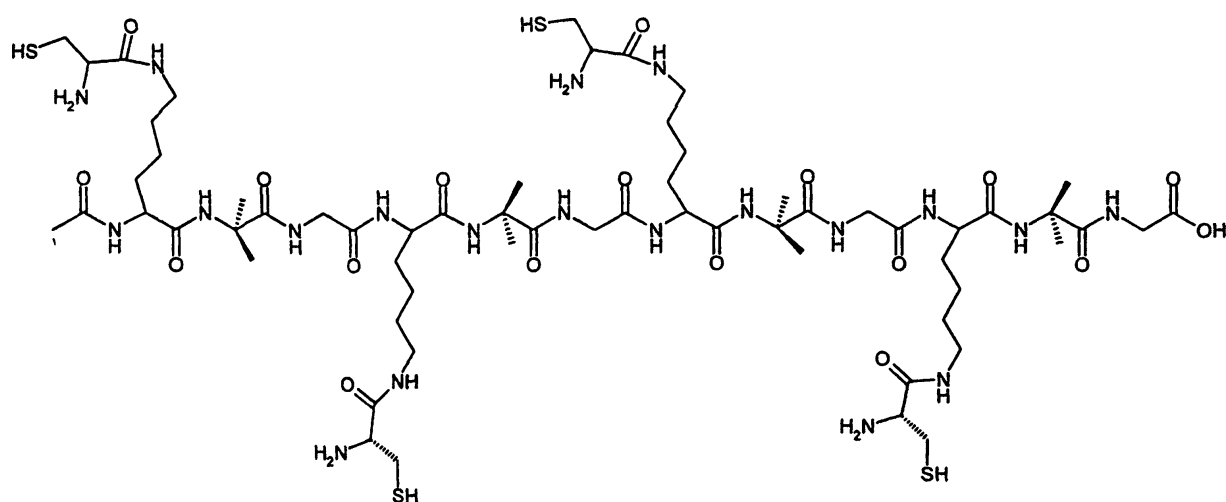


Σχήμα 11.15: Φάσμα μάζας ESI (Electrospray Ionization) του καθαρού πεπτιδίου *Folyl-Cys-Arg-Gly-Asp-Ser-NH₂* με αναμενόμενο M.B.=959,96. Βρέθηκε M.B.=959,24.



- Σχήμα 11.16: Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού πεπτιδίου *Folyl-Cys-Arg-Gly-Asp-Arg-NH₂*. Ανίχνευση στα 214nm.

11.4.6. Ac-[Lys(Cys)-Aib-Gly]₄-OH



M.T.: C₆₂H₁₁₂N₂₀O₁₈S₄

M.B.:1553,95

Η σύνθεση του Ac-[Lys(Cys)-Aib-Gly]₄-OH έγινε σε Wang ρητίνη ακολουθώντας την μεθοδολογία της Fmoc/tBu στρατηγικής. Ζυγίστηκαν 428 mg Wang ρητίνης αρχικής υποκατάστασης 0,75 meq υδροξυλομάδων/g ρητίνης. Οι προστασίες των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων που χρησιμοποιήθηκαν είχαν ως εξής: για την λυσίνη χρησιμοποιήθηκε η Mtt ομάδα έτσι ώστε να μπορεί να απομακρυνθεί εκλεκτικά από τον πεπτιδικό σκελετό, χωρίς να επηρεάσει την σύνδεση του πεπτιδίου με την ρητίνη, δίνοντας τη δυνατότητα σύζευξης του επόμενου αμινοξέος στην παράπλευρη αλυσίδα της λυσίνης [241].

Η σύζευξη του πρώτου αμινοξέος (Fmoc-Gly-OH) έγινε με 3 eq DCC, παρουσία 3 eq HOBt και 1% w/v διαλύματος DMAP για 1 ώρα. Κατόπιν έγινε Fmoc τιτλοδότηση για την μέτρηση της υποκατάστασης. Η μέτρηση έγινε σε λίγα mg πεπτιδορρητίνης τα οποία κατεργάστηκαν με διάλυμα 40% πιπεριδίνης σε DMF. Η ποσότητα της Fmoc προσδιορίστηκε φωτομετρικά με φασματοσκοπία UV-VIS στα 300,6 nm, όπου και απορροφά. Η τελική υποκατάσταση (σε meq/g πεπτιδορρητίνης) υπολογίστηκε με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Υποκατάσταση} = \frac{\alpha \times V}{\varepsilon \times m \times l}$$

α : μέγιστη απορρόφηση στα 300,6 nm της Fmoc ομάδας

V: ο όγκος της ογκομετρικής φιάλης x μετά την αραιώση

ε : συντελεστής μοριακής απορρόφησης ($M^{-1}cm^{-1}$)

g: βάρος δείγματος σε g

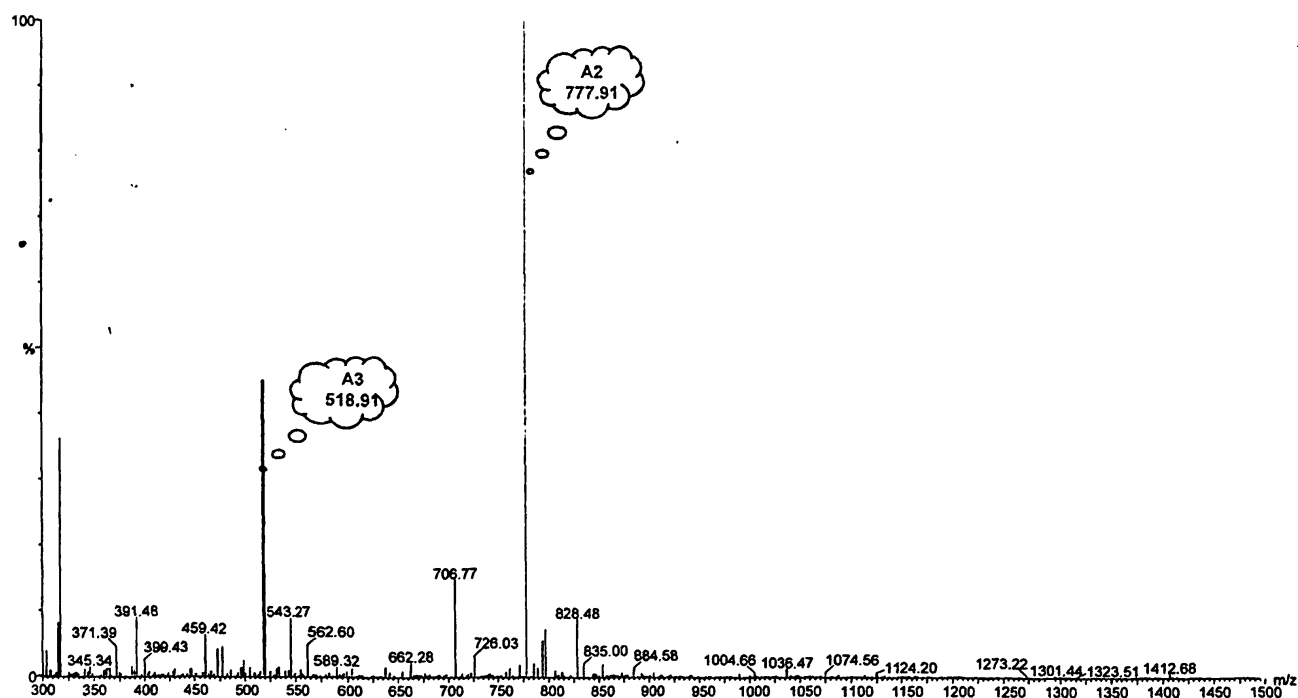
l: μήκος κυψελίδας σε cm

Η καινούργια υποκατάσταση υπολογίστηκε 0,35 meq /g ρητίνης. Έγινε ακετυλίωση των ελεύθερων υδροξυλομάδων με τριάντα ισοδύναμα οξικού ανυδρίτη σε διάλυμα πυριδίνης (~15 ml) για 20 λεπτά και τα επόμενα αμινοξέα εισήχθησαν στον πεπτιδικό σκελετό ως N^{α} -Fmoc παράγωγα. Η αντίδραση σύζευξης έγινε με TBTU παρουσία HOBt και DIEA σε αναλογίες Fmoc-αμινοξύ/TBTU/HOBt/DIEA: 1/1/1/3. Μετά την προσθήκη της τέταρτης λυσίνης και την ακετυλίωση της N^{α} τελικής αμινομάδας της έγινε εκλεκτική απομάκρυνση της Mtt ομάδας από τις N^{ϵ} ομάδες των λυσινών με την επίδραση διαλύματος 1,8% TFA σε DCM (9x2 min) [168,241]. Η ύπαρξη ελεύθερων αμινομάδων πιστοποιήθηκε με test Kaiser (+) οπότε και συνεχίστηκε η σύνθεση του επιθυμητού πεπτιδίου με την προσθήκη της κυστεΐνης.

Η αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη και η ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων, έγινε με κατεργασία της πεπτιδορρητίνης με τριφθοροξικό οξύ (94% TFA), παρουσία τρισοπροπυλοσιλανίου (1% TIS) και απεσταγμένου νερού (2,5% H_2O) ως μόρια παγίδες των καρβοκατιόντων, καθώς και αίθυλοδιθειόλη (2,5% EDT) για την προστασία της κυστεΐνης της οξειδωση. Η ποσότητα της πεπτιδορρητίνης και το διάλυμα TFA/ H_2O / TIS/ EDT αφέθηκαν υπό ανάδευση για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε διήθηση της ρητίνης και εκπλύσεις της με TFA. Το

διήθημα συμπυκνώθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό. Προστέθηκε DCM/εξάνιο (1/1, v/v) και επανασυμπυκνώθηκε. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε τέσσερις φορές για την καλύτερη απομάκρυνση του TFA. Η καταβύθιση του πεπτιδίου έγινε με την προσθήκη παγωμένου αιθέρα. Το πεπτίδιο διαλύθηκε σε διάλυμα οξικού 2N και λυοφιλοποιήθηκε. Απομονώθηκαν 101, 2 mg ($\alpha=44,1\%$).

Ο καθαρισμός του πεπτιδίου έγινε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC σε στήλη C₁₈ Discovery, 25cm x 10mm. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA, για 30 min, ενώ η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από A/B:95/5 σε A/B:50/50. Με την διαδικασία αυτή καθαρίστηκαν 35 mg πεπτιδίου. Μετά την συλλογή και την ταυτοποίηση όλων των κλασμάτων με φασματοσκοπία μάζας Electrospray Ionization (ESI-MS) διαπιστώθηκε η ύπαρξη του επιθυμητού πεπτιδίου, από το οποίο απομονώθηκαν 8,8 mg ($\alpha=25,14\%$). Στο σχήμα 11.17 δίνεται το φάσμα μάζας του.



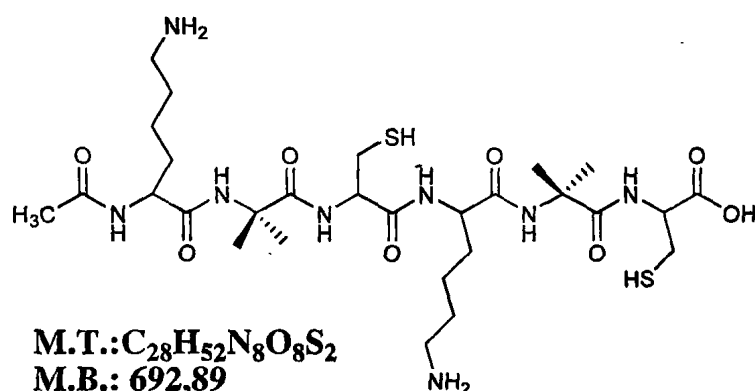
Σχήμα 11.17: ESI-MS φάσμα μάζας του πεπτιδίου *Ac-[Lys(Cys)-Aib-Gly]₄-OH* στο οποίο φαίνονται τα μοριακά ιόντα $[M+2H]^{2+}/2$, $[M+3H]^{3+}/3$. Υπολογισθέν *M.B.*=1553,95. Ευρεθέν *M.B.*=1553,75.

11.4.7. Ac-(Lys-Aib-Cys)_n-OH

Για τη σύνθεση των πεπτιδίων του τύπου Ac-(Lys-Aib-Cys)_n-OH χρησιμοποιήθηκαν 509 mg Wang ρητίνης, αρχικής υποκατάστασης 0,75 meq /g ρητίνης, ακολουθώντας την μεθοδολογία της Fmoc/tBu στρατηγικής. Η σύζευξη του πρώτου αμινοξέος έγινε με 3 eq αμινοξύ, 3 eq DCC, παρουσία 3 eq HOBT και 1% w/v διαλύματος DMAP για 1 ώρα. Κατόπιν έγινε Fmoc τιτλοδότηση σε λίγα mg πεπτιδορητίνης για μέτρηση της υποκατάστασης, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Η νέα υποκατάσταση υπολογίστηκε 0,55 meq /g πεπτιδορητίνης.

Μετά την ακετυλίωση των ελεύθερων υδρόξυλομάδων, η σύνθεση συνεχίστηκε μέχρι την ολοκλήρωση της δεύτερης επαναλαμβανόμενης τριάδας αμινοξέων Fmoc-(Lys-Aib-Cys)₂-Wang. Η πεπτιδορητίνη ξηράθηκε και η ποσότητα ζυγίστηκε. Ελήφθησαν 1067 mg.

A) Ac-(Lys-Aib-Cys)₂-OH

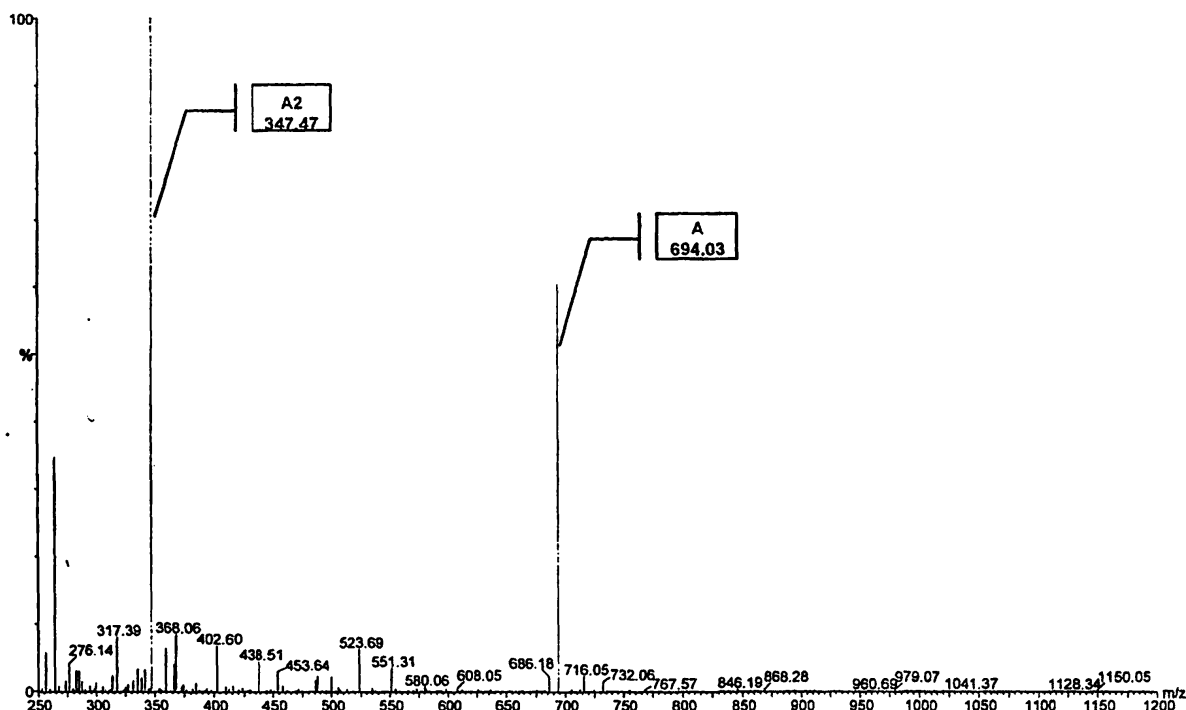


Σε 212 mg Fmoc-(Lys-Aib-Cys)₂-Wang πεπτιδορητίνης έγινε αποπροστασία της N-τελικής αμινομάδας της λυσίνης, ακετυλίωσή της με οξικό ανυδρίτη (όπως έχει αναφερθεί παραπάνω) και αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη με ταυτόχρονη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων.

Η κατεργασία της πεπτιδορητίνης έγινε με τριφθοροξικό οξύ (94% TFA), παρουσία τρισυπροπυλοσιλανίου (1% TIS), απεσταγμένου νερού (2,5% H₂O) καθώς και (2,5% EDT), ως μόρια παγίδες των καρβοκατιόντων. Ακολούθησε διήθηση της ρητίνης και εκπλύσεις της με TFA. Το διήθημα συμπυκνώθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό. Στο υπόλειμμα προστέθηκε DCM/εξάνιο (1/1, v/v) και επανασυμπυκνώθηκε. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε τέσσερις φορές για την καλύτερη απομάκρυνση του TFA. Η καταβύθιση του

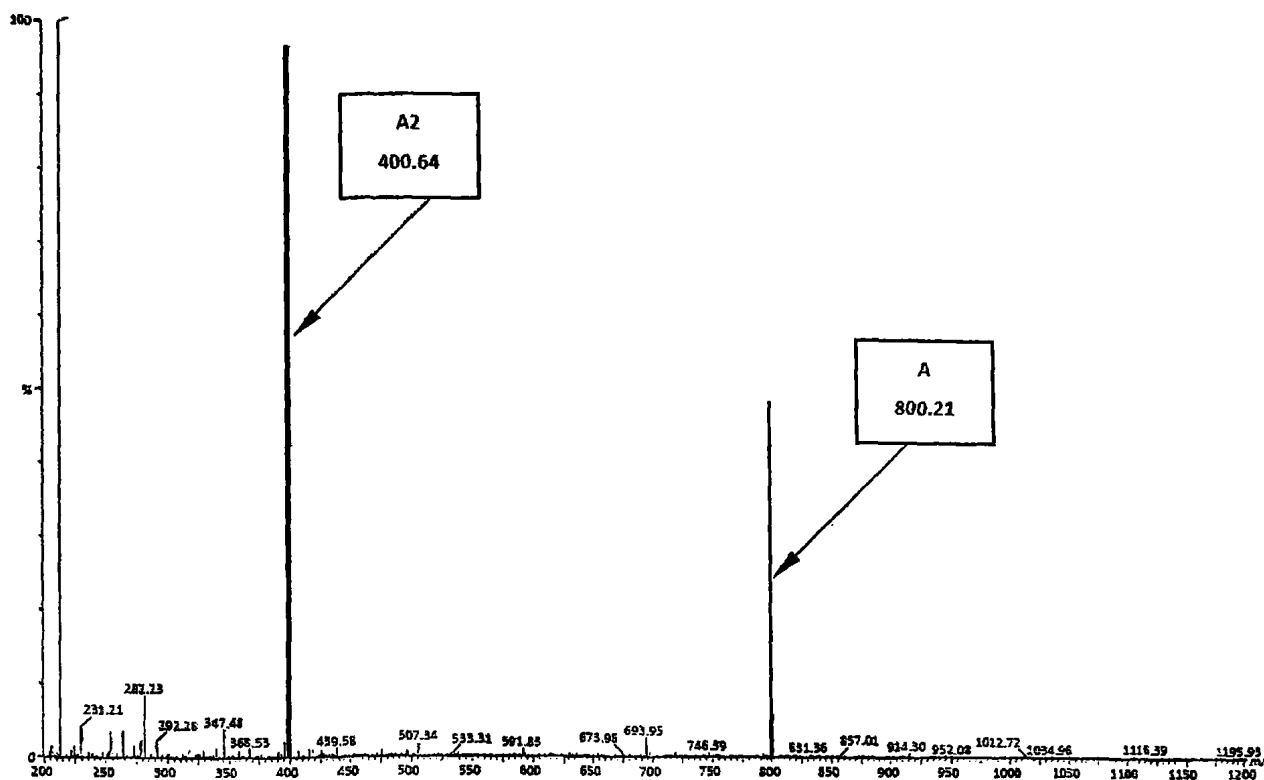
πεπτιδίου έγινε με την προσθήκη παγωμένου αιθέρα. Το πεπτίδιο διαλύθηκε σε διάλυμα οξικού 2N και λυοφιλοποιήθηκε. Απομονώθηκαν 37,1 mg ($\alpha=95,6\%$).

Το πεπτίδιο που απομονώθηκε, καθαρίστηκε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC σε στήλη C_{18} Discovery, 25cm x 10mm. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (A) $H_2O/0,1\%$ TFA, (B) $CH_3CN/0,1\%$ TFA, για 30 min, ενώ η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από A/B: 90/ 10 σε A/B: 50/50. Από τα 37,1 mg που καθαρίστηκαν, ελήφθησαν 15 mg του επιθυμητού πεπτιδίου ($\alpha=40,43\%$). Στο σχήμα 11.18 δίνεται το φάσμα μάζας του.



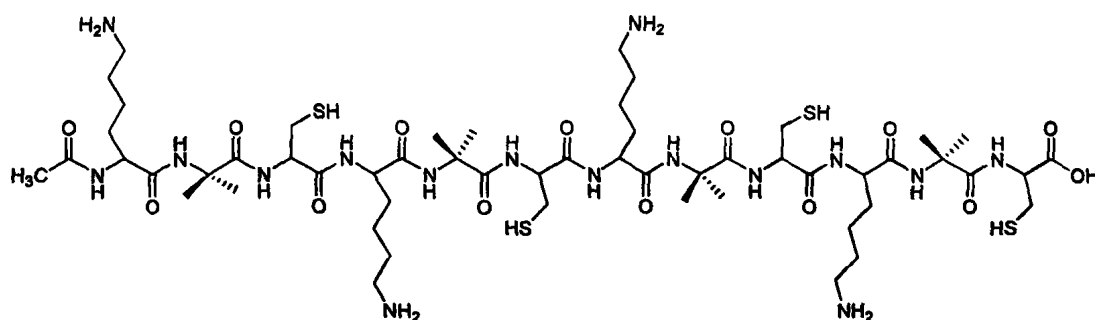
Σχήμα 11.18: ESI-MS φάσμα μάζας του καθαρού πεπτιδίου $Ac-(Lys-Aib-Cys)_2-OH$ στο οποίο φαίνονται τα μοριακά ιόντα $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}/2$. Υπολογισθέν $M.B.=692,9$. Ευρεθέν $M.B.=693,03$

Από τον καθαρισμό απομονώθηκε και ένα παραπροϊόν με μοριακό βάρος +106 Da από αυτό του πεπτιδίου. Το προϊόν αυτό (φάσμα μάζας στο σχήμα 11.19) οφείλεται στην αποικοδόμηση της ρητίνης κατά τη διάρκεια της αποκοπής του πεπτιδίου.



Σχήμα 11.19: ESI-MS φάσμα μάζας του παραπροϊόντος με *M.B.* +106 *Da* από αυτό του πεπτιδίου *Ac-(Lys-Aib-Cys)₂-OH*. Φαίνονται τα μοριακά ιόντα $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}/2$. Ευρεθέν *M.B.*=799,21.

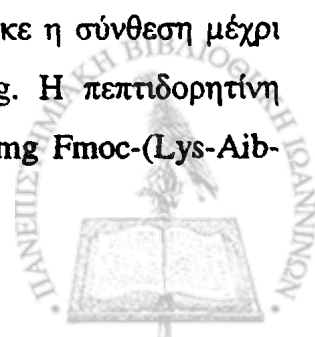
B) *Ac-(Lys-Aib-Cys)₄-OH*



M.T.: $C_{54}H_{100}N_{16}O_{14}S_4$

M.B.: 1325,73

Σε 833,2 mg Fmoc-(Lys-Aib-Cys)₂-Wang πεπτιδορρητίνης συνεχίστηκε η σύνθεση μέχρι την ολοκλήρωση του τετραμερούς φορέα Fmoc-(Lys-Aib-Cys)₄-Wang. Η πεπτιδορρητίνη ξηράθηκε και ζυγίστηκε. Ελήφθησαν 1115,3 mg. Από αυτά σε 547,1 mg Fmoc-(Lys-Aib-

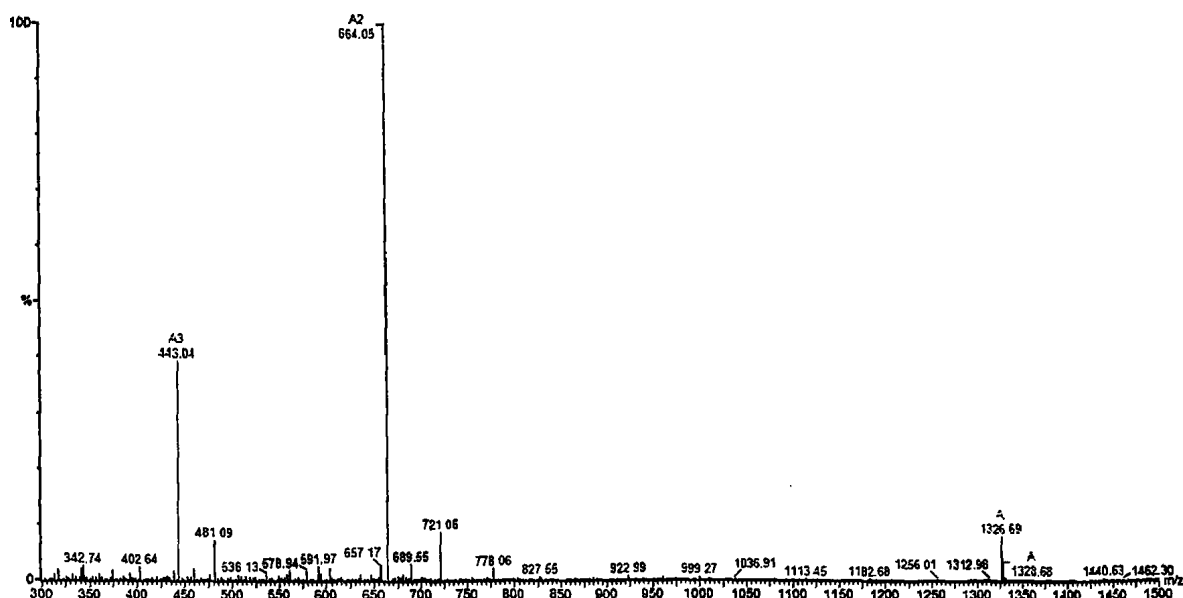


Cys)₄-Wang πεπτιδορητίνης έγινε αποπροστασία της N^α-τελικής αμινομάδας της λυσίνης, ακετυλίωσή της με οξικό ανυδρίτη και ξήρανσή της. Ελήφθησαν ζυγίστηκε 470,9 mg ($\alpha=97,8\%$).

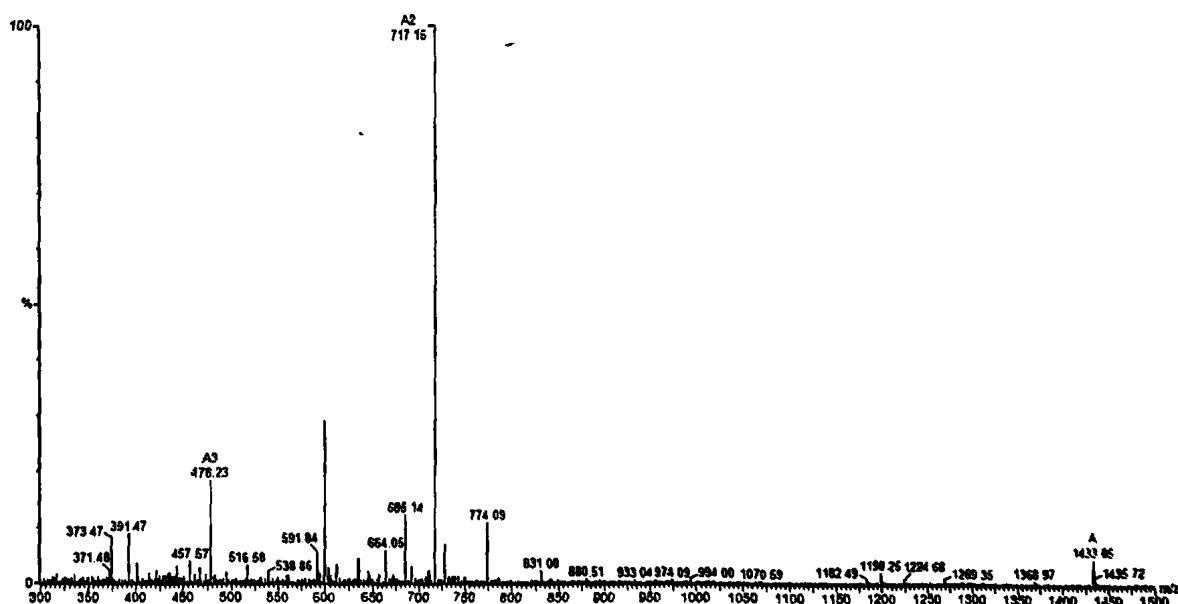
Ο φορέας αποκόπηκε από τη ρητίνη με διάλυμα TFA/H₂O/TIS/EDT σε αναλογία 9,4/2,5/1/2,5 για 3 ώρες. Ακολούθησε διήθηση της ρητίνης και εκπλύσεις της με TFA. Το διήθημα συμπυκνώθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό. Στο υπόλειμμα προστέθηκε DCM/εξάνιο (1/1, v/v) και επανασυμπυκνώθηκε. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε τέσσερις φορές για την καλύτερη απομάκρυνση του TFA. Η καταβύθιση του πεπτιδίου έγινε με την προσθήκη παγωμένου αιθέρα. Το πεπτίδιο διαλύθηκε σε διάλυμα οξικού 2N και λυοφιλοποιήθηκε. Απομονώθηκαν 152 mg ($\alpha=95,6\%$).

Καθαρίστηκαν 30,9 mg με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC σε στήλη C₁₈ Discovery, 25cm x 10mm. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA, για 30 min, ενώ η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από A/B:90/ 10 σε A/B: 50/50. Απομονώθηκαν 9,3 mg ($\alpha=30,1\%$). Και σε αυτή την περίπτωση απομονώθηκε παραπροϊόν με M.B. +106 Da από αυτό του πεπτιδίου (σχήματα 11.20 και 11.21). Το γεγονός αυτό δείχνει ότι ο σχηματισμός του παραπροϊόντος σχετίζεται με την ύπαρξη της Cys ως C-τελικό αμινοξύ (βλέπε κεφάλαιο συζήτησης).





Σχήμα 11.20: ESI-MS φάσμα μάζας του καθαρού πεπτιδίου $\text{Ac}-(\text{Lys-Aib-Cys})_4\text{-OH}$ στο οποίο φαίνονται τα μοριακά ιόντα $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}/2$, $[M+3H]^{3+}/3$. Υπολογισθέν $M.B.=1325,73$. Ευρεθέν $M.B.=1325,7$.

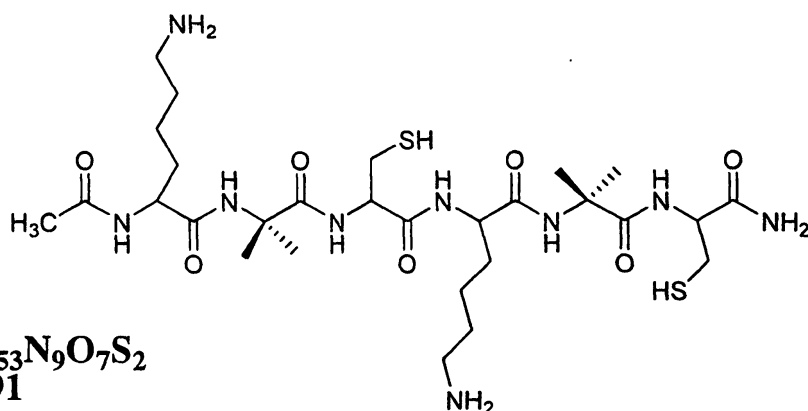


Σχήμα 11.21: ESI-MS φάσμα μάζας του παραπροϊόντος με $M.B. +106 \text{ Da}$ από αυτό του πεπτιδίου $\text{Ac}-(\text{Lys-Aib-Cys})_4\text{-OH}$. Φαίνονται τα μοριακά ιόντα $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}/2$, $[M+3H]^{3+}/3$. Ευρεθέν $M.B.=1432,06$.

11.4.9. Ac-(Lys-Aib-Cys)_n-NH₂

Για τη σύνθεση 0,391 mmol πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκαν 488,7 mg ρητίνης Rink Amide με υποκατάσταση 0,8 meq/gr. Τα αμινοξέα εισήχθησαν στον πεπτιδικό σκελετό ως N^α-Fmoc παράγωγα και η αντιδράσεις σύζευξης έγινε με 3 eq αμινοξύ, 3 eq DCC, παρουσία 3 eq HOBT. Οι προστασίες των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων που χρησιμοποιήθηκαν είχαν ως εξής: η N^ε ομάδα της λυσίνης ήταν προστατευμένη με την tert-βουτυλοξυ καρβονυλομάδα (Boc) και η σουλφιδρυλομάδα της κυστεΐνης ήταν προστατευμένη με την τρίτυλο ομάδα (Trt). Η σύνθεση συνεχίστηκε μέχρι την ολοκλήρωση της δεύτερης επαναλαμβανόμενης τριάδας αμινοξέων για τον σχηματισμό του Fmoc-(Lys-Aib-Cys)₂-Rink Amide. Η πεπτιδορητίνη ξηράθηκε και η ποσότητα που ελήφθει ήταν 964,4 mg.

I) Ac-(Lys-Aib-Cys)₂-NH₂



Σε 385,7 mg πεπτιδορητίνης έγινε αποπροστασία της N-τελικής αμινομάδας της λυσίνης, ακετυλίωσή της με οξικό ανυδρίτη σε διάλυμα πυριδίνης και ξήρανσή της. Ελήφθησαν 368,1 mg ($\alpha=98,77\%$).

Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη με ταυτόχρονη απομάκρυνση των παράπλευρων προστατευτικών ομάδων έγινε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης με τριφθοροξικό οξύ (92,5% TFA), παρουσία τρισοπροπυλοσιλανίου (2,5% TIS) και διμεθοξυβενζόλιο (5% DMB) ως μόρια παγίδες των καρβοκατιόντων. Η ποσότητα της πεπτιδορητίνης και το διάλυμα του TFA αφέθηκαν υπό ανάδευση για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε διήθηση της ρητίνης και εκπλύσεις της με TFA. Το διήθημα συμπυκνώθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό. Στο υπόλειμμα προστέθηκε DCM/εξάνιο (1/1, v/v) και επανασυμπυκνώθηκε. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε τέσσερις φορές για την καλύτερη

απομάκρυνση του TFA. Η καταβύθιση του πεπτιδίου έγινε με την προσθήκη παγωμένου αιθέρα. Το πεπτίδιο διαλύθηκε σε διάλυμα οξικού 2N και λυοφιλοποιήθηκε. Απομονώθηκαν 83 mg ($\alpha=76,7\%$).

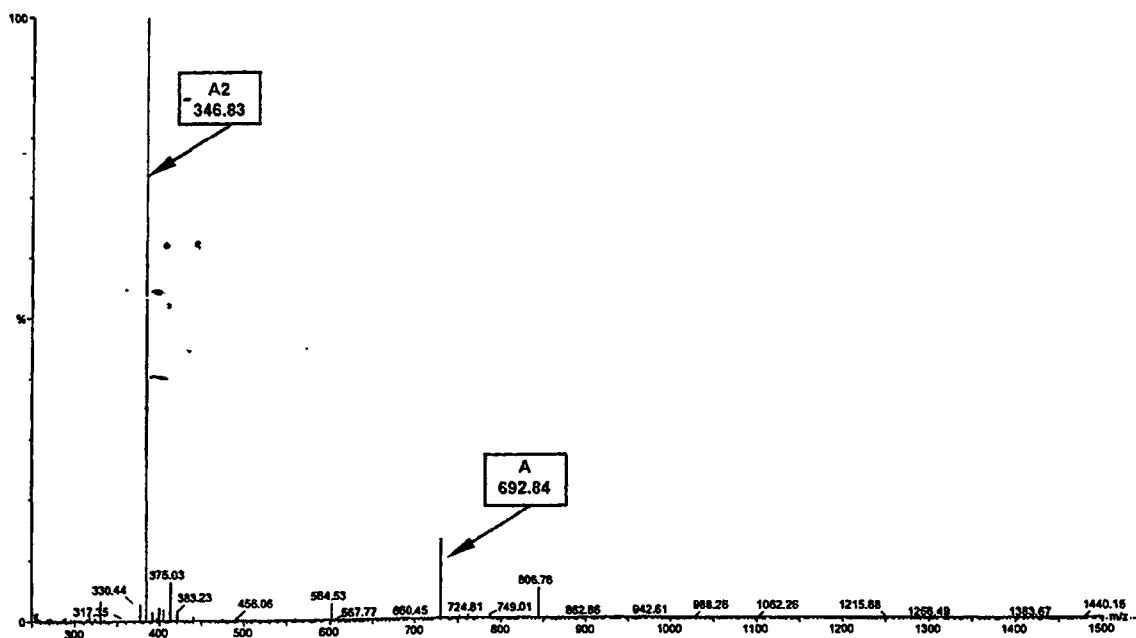
30 mg καθαρίστηκαν με παρασκευαστική RP-HPLC σε στήλη C₁₈ Interchrom 25cm x 21,2mm. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA, για 30 min, ενώ η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από A/B: 95/5 σε A/B: 50/50. Απομονώθηκαν 12 mg ($\alpha=40\%$). Στο σχήμα 11.22 δίνεται το φάσμα μάζας του.

Για την αναλυτική HPLC του πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω πρόγραμμα βαθμίδωσης (gradient) και σύστημα διαλυτών:

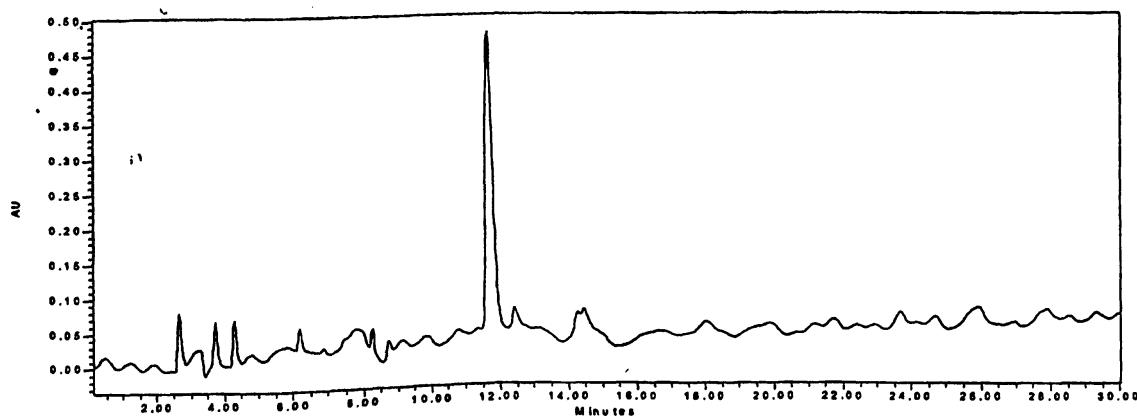
Χρόνος (min)	H ₂ O/0,1% TFA	CH ₃ CN/0,1% TFA)	Ροή (ml/min)
0	90	10	1
30	50	50	1

Το χρωματογράφημα αναλυτικής HPLC δίνεται στο σχήμα 11.23.



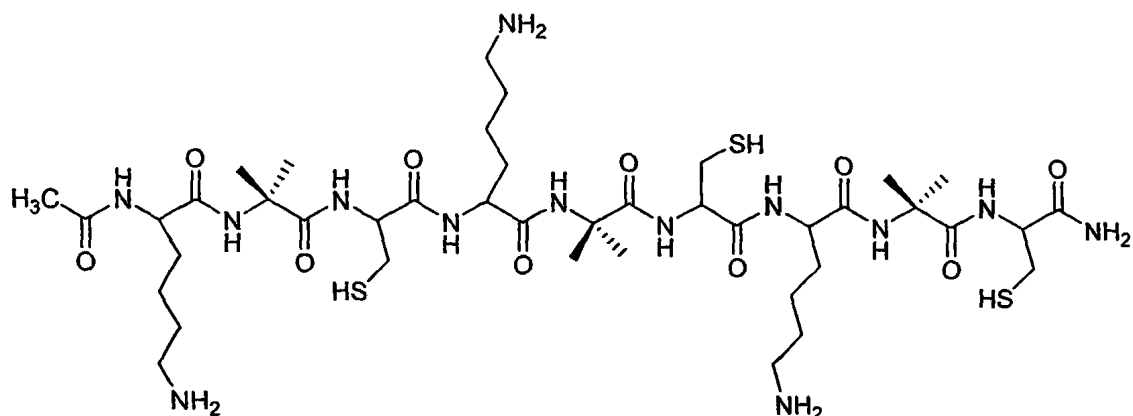


Σχήμα 11.22: ESI-MS φάσμα μάζας του καθαρού πεπτιδίου $\text{Ac}-(\text{Lys-Aib-Cys})_2\text{-NH}_2$ στο οποίο φαίνονται τα μοριακά ιόντα $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}/2$. Υπολογισθέν $M.B.=691,9$. Ευρεθέν $M.B.=691,84$.



Σχήμα 11.23: Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού πεπτιδίου $\text{Ac}-(\text{Lys-Aib-Cys})_2\text{-NH}_2$. Ανίχνευση στα 214nm.

II) Ac-(Lys-Aib-Cys)₃-NH₂



M.T.: C₄₁H₇₇N₁₃O₁₀S₃
M.B.: 1008,33

Στα 578,7 mg πεπτιδορητίνης Fmoc-(Lys-Aib-Cys)₂-Rink Amide συνεχίστηκε η σύνθεση μέχρι την ολοκλήρωση του τριμερούς φορέα Fmoc-(Lys-Aib-Cys)₃-Rink Amide. Μετά την ξήρανση ελήφθησαν 673 mg πεπτιδορητίνης.

Σε 230 mg αυτής έγινε αποπροστασία της N-τελικής αμινομάδας της λυσίνης, ακετυλίωσή της με οξικό ανυδρίτη σε διάλυμα πυριδίνης και ξήρανσή της. Ελήφθησαν 210,9 mg (α = 88,6 %).

Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη με ταυτόχρονη απομάκρυνση των παράπλευρων προστατευτικών προστατευτικών ομάδων έγινε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης με τριφθοροξικό οξύ (92,5% TFA), παρουσία τριϊσοπροπυλοσιλανίου (2,5% TIS) και διμεθόξυβενζόλιο (5% DMB) ως μόρια παγίδες των καρβοκατιόντων. Η ποσότητα της πεπτιδορητίνης και το διάλυμα του TFA αφέθηκαν υπό ανάδευση για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε διήθηση της ρητίνης και εκπλύσεις της με TFA. Το διήθημα συμπυκνώθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα. Στο υπόλειμμα προστέθηκε DCM/εξάνιο (1/1, v/v) και επανασυμπυκνώθηκε. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε τέσσερις φορές για την καλύτερη απομάκρυνση του TFA. Η καταβύθιση του πεπτιδίου έγινε με την προσθήκη παγωμένου αιθέρα. Το πεπτίδιο διαλύθηκε σε διάλυμα οξικού 2N και λυοφιλοποιήθηκε. Απομονώθηκαν 64 mg (α =80,95 %).

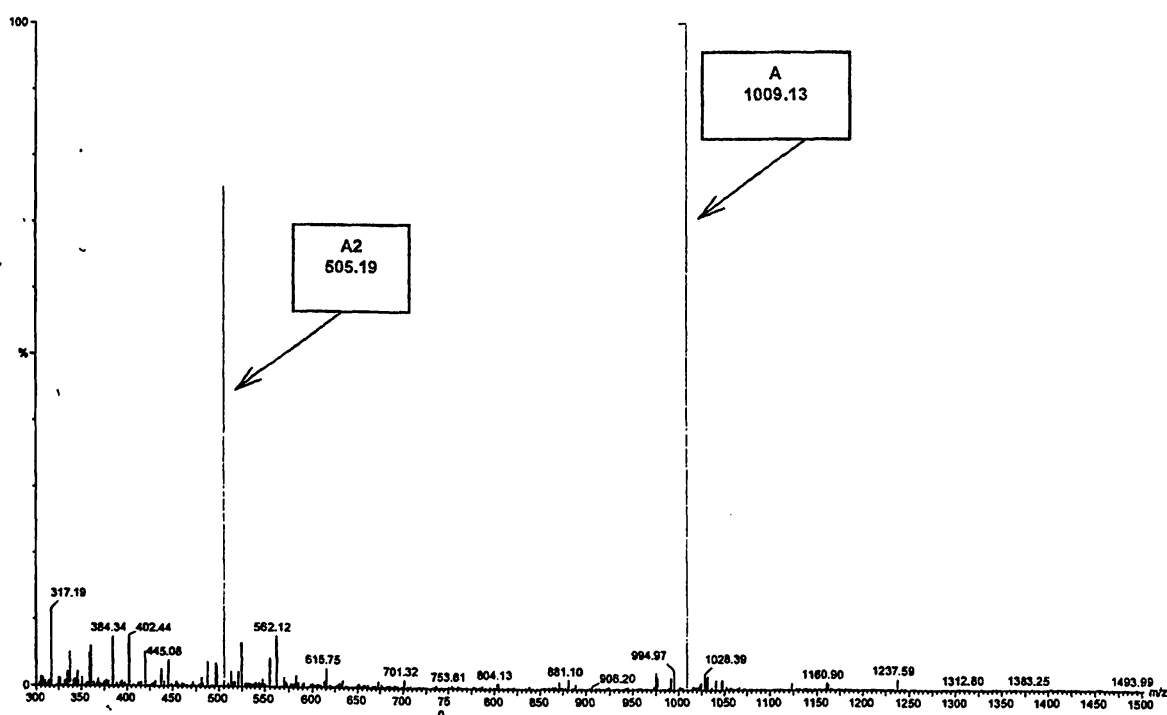
18 mg καθαρίστηκαν με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC σε στήλη C₁₈ Discovery, 25cm x 10mm. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA, για 30 min, ενώ η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από A/B: 90/10

σε A/B: 50/50. Απομονώθηκαν 5,1 mg ($\alpha=28,8\%$). Στο σχήμα 11.24 δίνεται το φάσμα μάζας του.

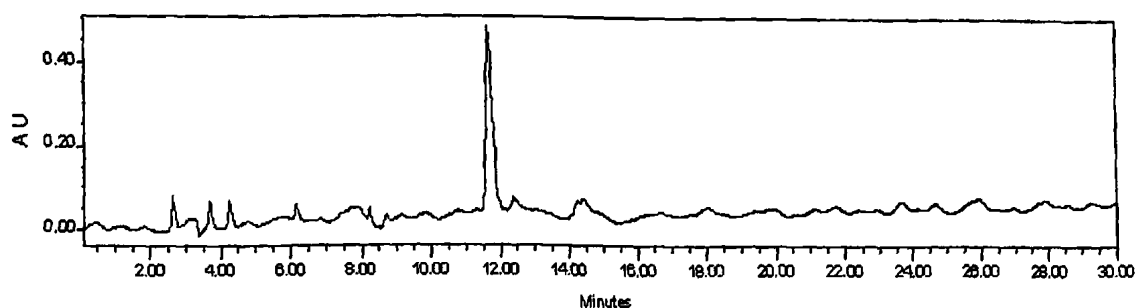
Για την αναλυτική HPLC του πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω πρόγραμμα βαθμίδωσης (gradient) και σύστημα διαλυτών:

Χρόνος (min)	H ₂ O/0,1% TFA	CH ₃ CN/0,1% TFA	Ροή (ml/min)
0	95	5	1
30	50	50	1

Το χρωματογράφημα αναλυτικής δίνεται στο σχήμα 11.25.

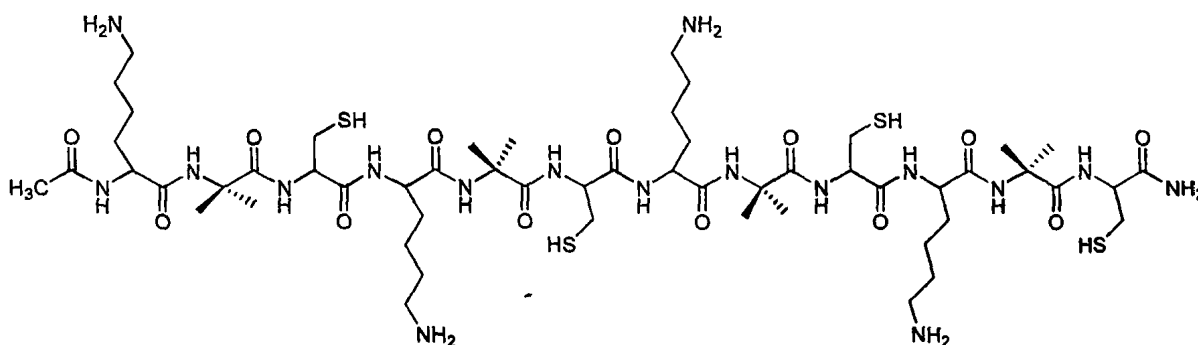


Σχήμα 11.24: ESI-MS φάσμα μάζας του καθαρού πεπτιδίου $\text{Ac}-(\text{Lys-Aib-Cys})_3\text{-NH}_2$ στο οποίο φαίνονται τα μοριακά ιόντα $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}/2$. Υπολογισθέν $M.B.=1008,33$. Ευρεθέν $M.B.=1008,18$.



Σχήμα 11.25: Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού πεπτιδίου $\text{Ac}-(\text{Lys-Aib-Cys})_3\text{-NH}_2$. Ανίχνευση στα 214nm.

III) $\text{Ac}-(\text{Lys-Aib-Cys})_4\text{-NH}_2$



M.T.: $\text{C}_{54}\text{H}_{101}\text{N}_{17}\text{O}_{13}\text{S}_4$
M.B: 1324,75

Στα 325,4 mg πεπτιδορητίνης $\text{Fmoc}-(\text{Lys-Aib-Cys})_3\text{-Rink Amide}$ συνεχίστηκε η σύνθεση μέχρι την ολοκλήρωση του τετραμερούς φορέα $\text{Ac}-(\text{Lys-Aib-Cys})_4\text{-Rink Amide}$. Μετά την ξήρανση ελήφθησαν 0,8 mg ($\alpha = 98,4 \%$).

Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη με ταυτόχρονη απομάκρυνση των παράπλευρων προστατευτικών προστατευτικών ομάδων έγινε με κατεργασία της πεπτιδορητίνης με τριφθοροξικό οξύ (92,5% TFA), παρουσία τρισυπροπυλοσιλανίου (2,5% TIS) και διμεθόξυβενζόλιο (5% DMB) ως μόρια παγίδες των καρβοκατιόντων. Η ποσότητα της πεπτιδορητίνης και το διάλυμα του TFA αφέθηκαν υπό ανάδευση για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε διήθηση της ρητίνης και εκπλύσεις της με TFA. Το διήθημα συμπυκνώθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό. Στο υπόλειμμα προστέθηκε DCM/εξάνιο (1/1, v/v) και επανασυμπυκνώθηκε. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε τέσσερις

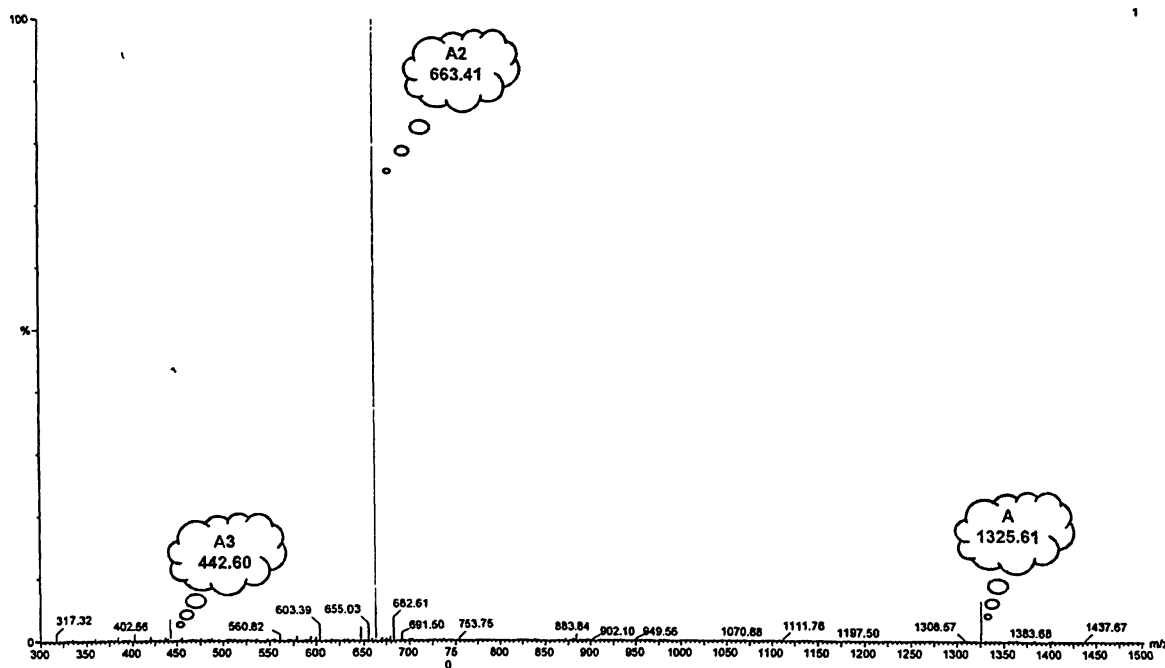
φορές για την καλύτερη απομάκρυνση του TFA. Η καταβύθιση του πεπτιδίου έγινε με την προσθήκη παγωμένου αιθέρα. Το πεπτίδιο διαλύθηκε σε διάλυμα οξικού 2N και λυοφιλοποιήθηκε. Απομονώθηκαν 134,3 mg ($\alpha=86,2\%$).

42 mg καθαρίστηκαν με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC σε στήλη C₁₈ Discovery, 25cm x 10mm. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA, για 30 min, ενώ η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από A/B: 95/5 σε A/B: 50/50. Απομονώθηκαν 18 mg ($\alpha=42,3\%$). Στο σχήμα 11.26 δίνεται το φάσμα μάζας του.

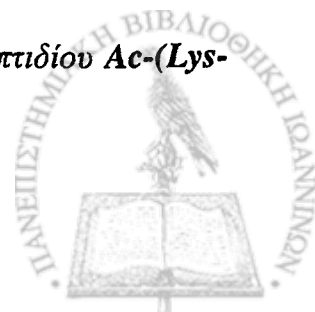
- Για την αναλυτική HPLC του πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω πρόγραμμα βαθμίδωσης (gradient) και σύστημα διαλυτών:

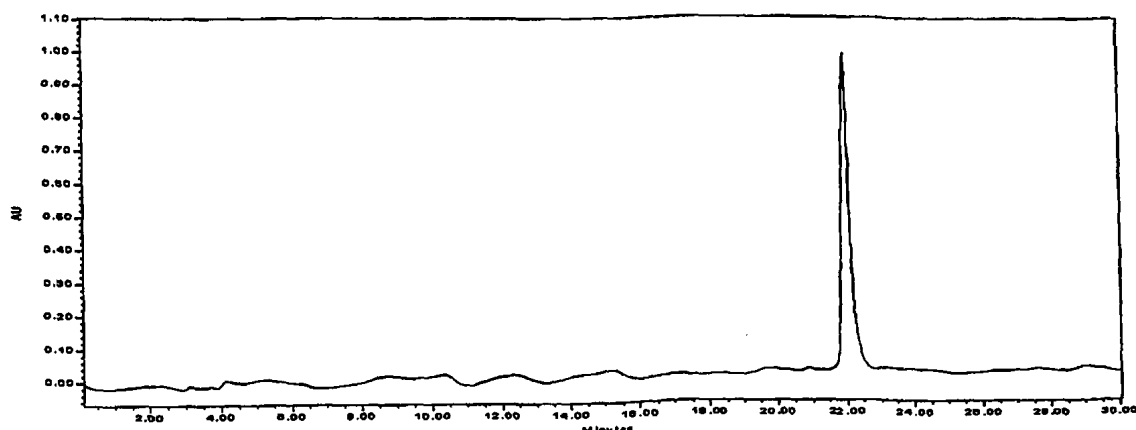
Χρόνος (min)	H ₂ O/0,1% TFA	CH ₃ CN/0,1% TFA	Ροή (ml/min)
0	90	10	1
30	50	50	1

Το χρωματογράφημα αναλυτικής δίνεται στο σχήμα 11.27.



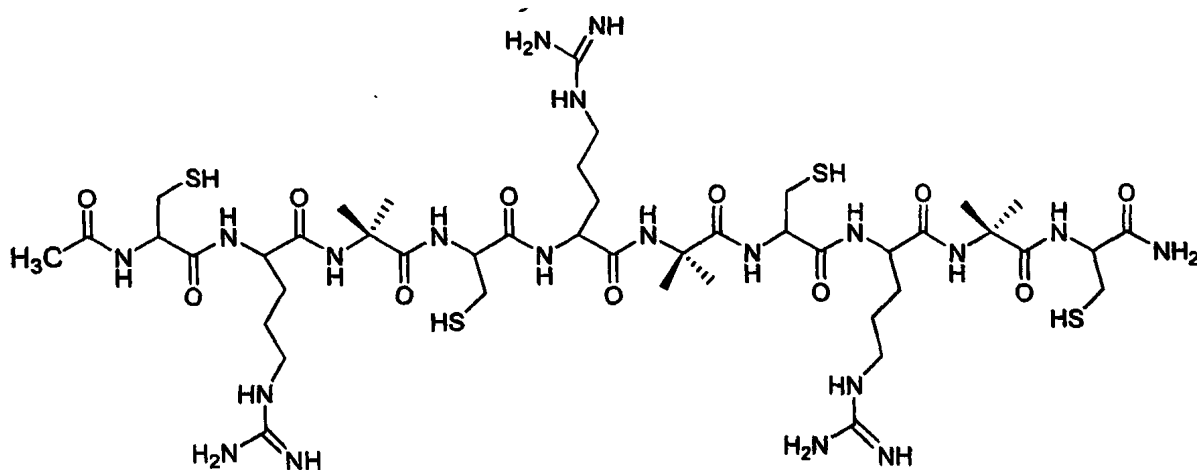
Σχήμα 11.26 : Φάσμα μάζας ESI (Electrospray Ionization) του καθαρού πεπτιδίου Ac-(Lys-Aib-Cys)₄-NH₂ με αναμενόμενο M.B.=1324,7. Βρέθηκε M.B.=1324,61.





Σχήμα 11.27: Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού πεπτιδίου *Ac-(Lys-Aib-Cys)₄-NH₂*. Ανίχνευση στα 214nm.

11.4.10 Ac-Cys-(Arg-Aib-Cys)₃-NH₂



M.T.: C₄₄H₈₂N₂₀O₁₁S₄
M.B.: 1195.51

Για τη σύνθεση του πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκαν 448,1 mg ρητίνης Rink Amide με υποκατάσταση 0,8 meq/gr. Τα αμινοξέα εισήχθησαν στον πεπτιδικό σκελετό ως N^α-Fmoc παράγωγα και η αντίδραση σύζευξης έγινε με 3 eq DIC και 3 eq HOBT. Οι προστασίες των

παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων που χρησιμοποιήθηκαν είχαν ως εξής: οι σουλφιδρυλομάδες των κυστεϊνών ήταν προστατευμένες με την τριφαινυλομεθυλομάδα (Trt), ενώ η πρόστασία των γουανιδομάδων των αργινινών έγινε με την 2,2,5,7,8-πενταμεθυλοδϋδροφουρανο-5-σουλφονυλο ομάδα (Pbf).

Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του Fmoc-Cys-(Arg-Aib-Cys)₃-Rink Amide, η πεπτιδορρητίνη ξηράθηκε και ζυγίστηκε. Ελήφθησαν 1210 mg.

Σε 300 mg πεπτιδορρητίνης, η N^α-τελική αμινομάδα της κυστεϊνης ακετυλιώθηκε με 30 eq οξικού ανυδρίτη σε διάλυμα πυριδίνης (~15 ml). Μετά την ξήρανση ελήφθησαν 343,8 mg πεπτιδορρητίνης ($\alpha=95,8\%$).

- Η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη, με ταυτόχρονη απομάκρυνση των παράπλευρων προστατευτικών προστατευτικών ομάδων, έγινε με κατεργασία της πεπτιδορρητίνης με τριφθοροξικό οξύ (9,3ml TFA), παρουσία τρισοπροπυλοσιλανίου (0,2ml TIS), αιθυλοδιθειόλη (0,25ml EDT) και απεσταγμένο νερό (0,25 ml H₂O), ως μόρια παγίδες των καρβοκατιόντων. Η ποσότητα της πεπτιδορρητίνης και το διάλυμα του TFA αφέθηκαν υπό ανάδευση για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε διήθηση της ρητίνης και εκπλύσεις της με TFA. Το διήθημα συμπυκνώθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό. Στο υπόλειμμα προστέθηκε DCM/εξάνιο (1/1, v/v) και επανασυμπυκνώθηκε. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε τέσσερις φορές για την καλύτερη απομάκρυνση του TFA. Η καταβύθιση του πεπτιδίου έγινε με την προσθήκη παγωμένου αιθέρα. Το πεπτίδιο διαλύθηκε σε διάλυμα οξικού 2N και λυοφιλοποιήθηκε. Απομονώθηκαν 84,8 mg ($\alpha=78,8\%$).

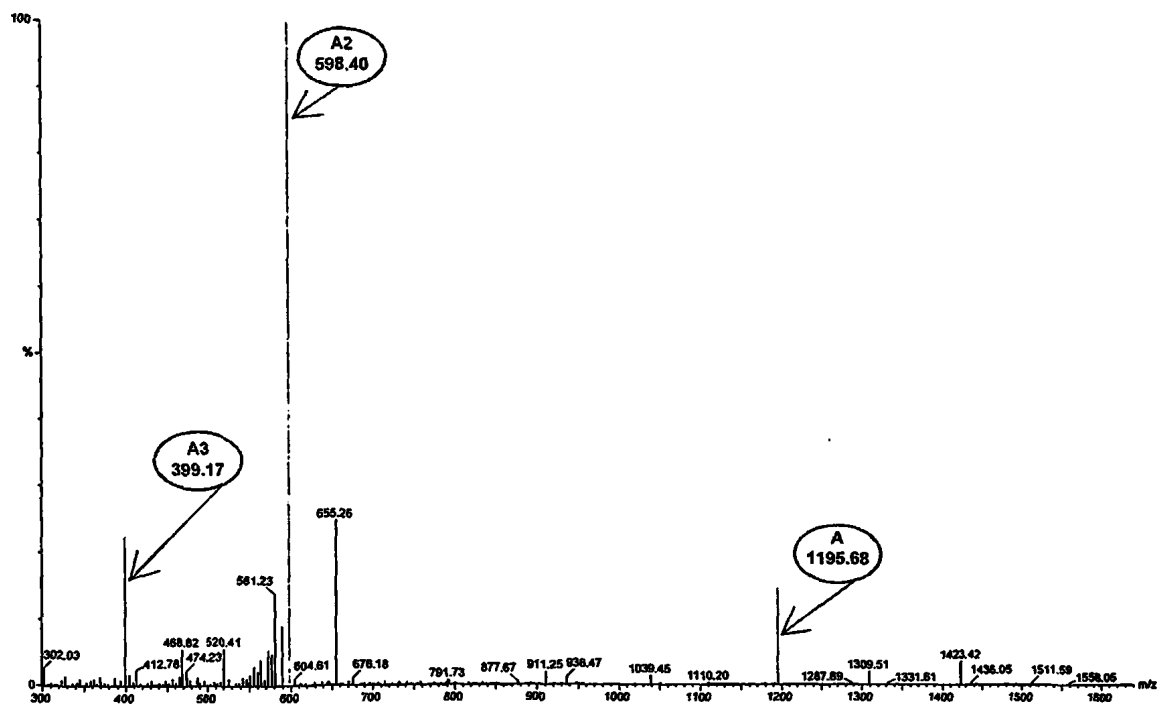
18 mg πεπτιδίου καθαρίστηκαν με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC σε στήλη C₁₈ Discovery, 25cm x 10mm. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA, για 30 min, ενώ η βαθμίδωση των διαλυτών έκλουσης ήταν γραμμική από A/B: 90/10 σε A/B: 50/50. Απομονώθηκαν 6,2 mg πεπτιδίου($\alpha=34,4\%$). Στο σχήμα 11.28 δίνεται το φάσμα μάζας του.

Για την αναλυτική HPLC του πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω πρόγραμμα βαθμίδωσης (gradient) και σύστημα διαλυτών:

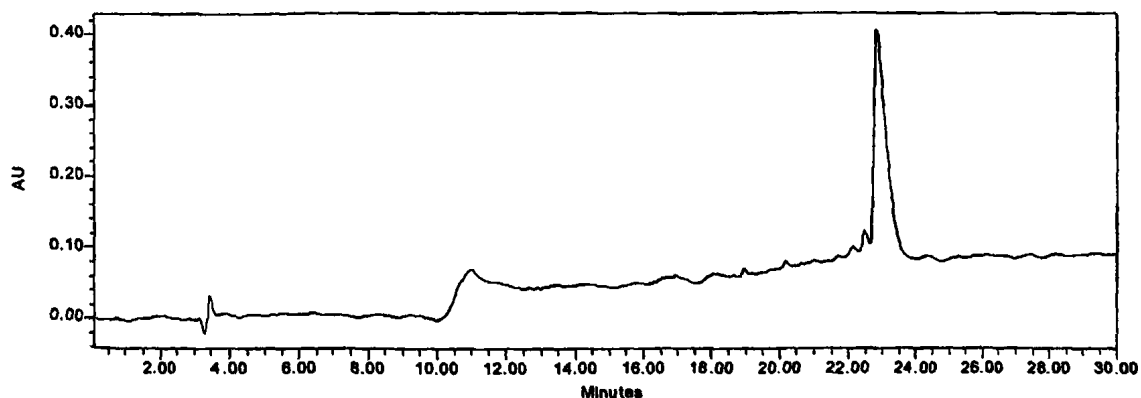
Χρόνος (min)	H ₂ O/0,1% TFA	CH ₃ CN/0,1% TFA	Ροή (ml/min)
0	95	5	1
30	50	50	1

Το χρωματογράφημα αναλυτικής HPLC δίνεται στο σχήμα 11.29.





Σχήμα 11.28: Φάσμα μάζας ESI (Electrospray Ionization) του καθαρού πεπτιδίου Ac-Cys-(Arg-Aib-Cys)₃-NH₂ με αναμενόμενο MB=1195,51. Βρέθηκε M.B.=1194,68.



Σχήμα 11.29: Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του καθαρού πεπτιδίου Ac-Cys-(Arg-Aib-Cys)₃-NH₂. Ανίχνευση στα 214nm.

12. ΣΥΝΘΕΣΗ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΑΞΟΛΗΣ ΚΑΙ 10- ΔΕΑΚΕΤΥΛΟΜΠΑΚΑΤΙΝΗΣ

Η ομοιοπολική πρόσδεση της ταξόλης και της 10-δεακέλυτο μπακατίνης – η οποία απομονώθηκε από το Πανεπιστήμιο της Αθήνας - έγινε :

- με την δημιουργία εστερικού δεσμού, με ένα από τα υδροξύλια των μορίων και το καρβοξύλιο του γλουταμινικού ή του ασπαρτιμιδίου, οπότε και η ταξόλη ή η 10-δεακετυλομπακατίνη χρησιμοποιήθηκαν χωρίς καμία τροποποίηση
- με την δημιουργία θειαιθερικού δεσμού, με την σουλφυδριλομάδα της κυστεΐνης και κατάλληλα παραγοντοποιημένων, με αλογόνο ακέτυλο ομάδες, μορίων της ταξόλης και της 10-δεακέτυλο μπακατίνης.

Για το σκοπό αυτό συντέθηκαν:

1. η χλωροακέτυλο-C2'-ταξόλη
2. η βρωμοακέτυλο-C2'-ταξόλη
3. η ιωδοοακέτυλο-C2'-ταξόλη
4. η TBS-C2'-ταξόλη
5. η σουκινυλο-C2'-ταξόλη
6. η 10-χλωροακέτυλο-μπακατίνη

Το μόριο της ταξόλης έχει τρεις υδροξυλομάδες από τις οποίες μπορεί να προχωρήσει μια αντίδραση. Η υδροξυλομάδα όμως της C2' θέσης είναι πολύ πιο δραστική από τις άλλες δύο, οπότε δίνεται η δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί η ταξόλη χωρίς άλλη προστασία και σε ισομοριακές αντιδράσεις να θεωρούμε πως προχωρούν αποκλειστικά από αυτή τη θέση.

12.1. Αντιδραστήρια

Όλες οι συνθέσεις των παραγώγων έγιναν στην υγρή φάση, σε διαλύτες:

- DCM διχλωρομεθάνιο
- DMF διμεθυλο φορμαμίδιο



- THF τετραυδροφουράνιο

Για την παραγοντοποίηση των υδροξυλομάδων των μορίων χρησιμοποιήθηκαν

1. χλωροξικός ανυδρίτης
2. βρωμοξικό βρωμίδιο
3. ιωδοξικός ανυδρίτης
4. tert-βουτυλοδιμεθυλο σιλυλο χλωρίδιο (TBS-Cl)
5. σουκινικό ανυδρίτη

καθώς επίσης

- N,N-δισοπροπύλ-αιθύλ-αμίνης (DIEA)
- Διμεθυλο αμινο πυριδίνη (DMAP)
- Ιμιδαζόλιο
- Πυριδίνη

για την δημιουργία βασικών συνθηκών όπου αυτές ήταν απαραίτητες

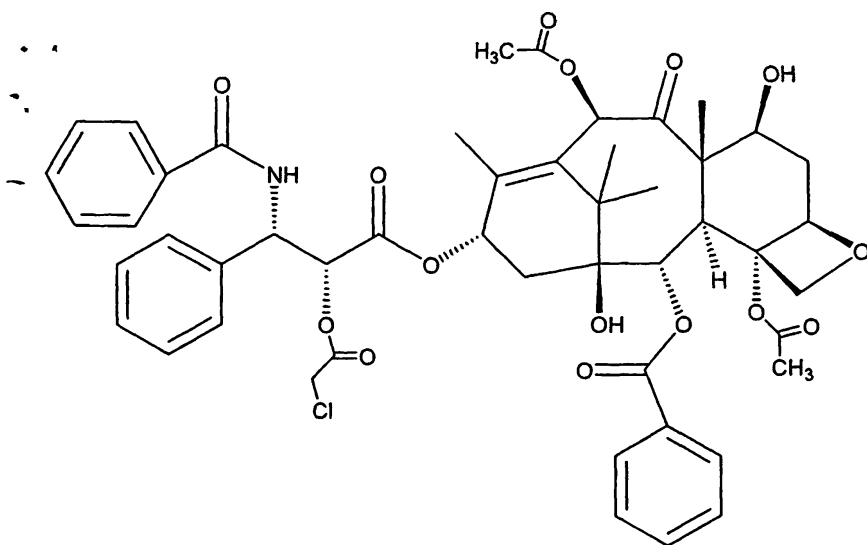
και τέλος:

- $\text{Yb}(\text{Otf})_3$ [Ytterbium(III) triflate], ως οξύ κατά Lewis, για τον προσανατολισμό της χλωροακετυλίωσης της 10- δεακέτυλο μπακατίνης στη θέση 10, και όχι στην 7, που βιβλιογραφικά δίνεται ως θέση με μεγαλύτερη δραστικότητα [242].



12.2. Πειραματική πορεία σύνθεσης, καθαρισμού και ταυτοποίησης

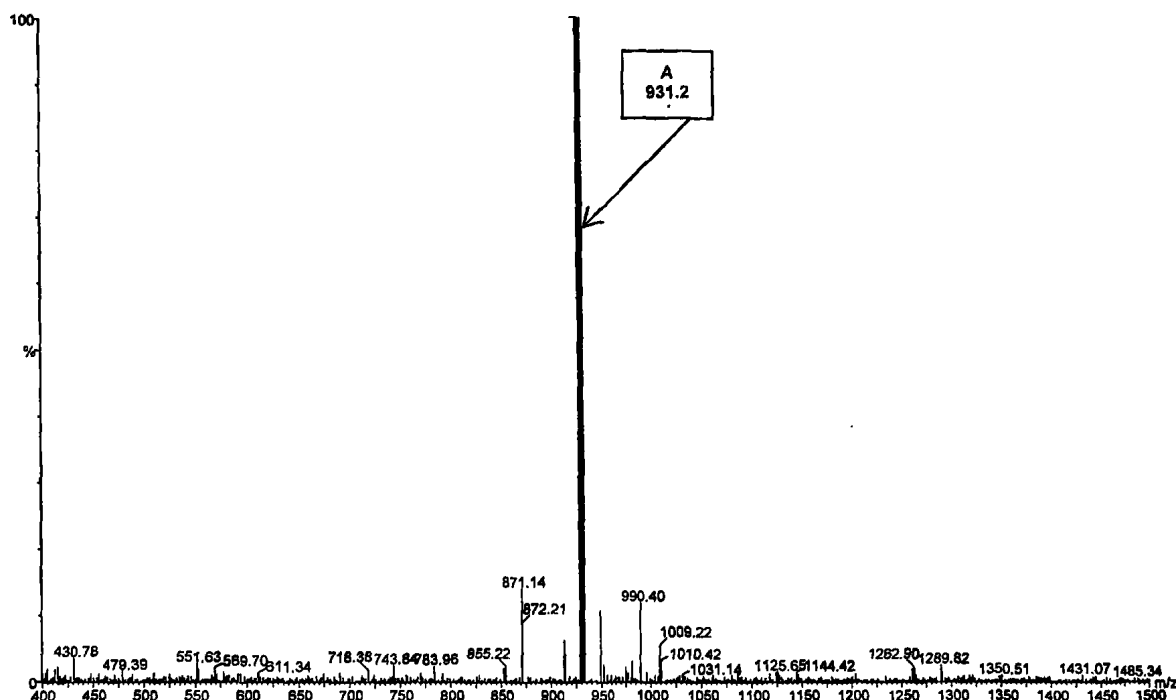
12.2.1. Σύνθεση της χλωροακέτυλο-C2'-ταξόλης



M.B.=930.43

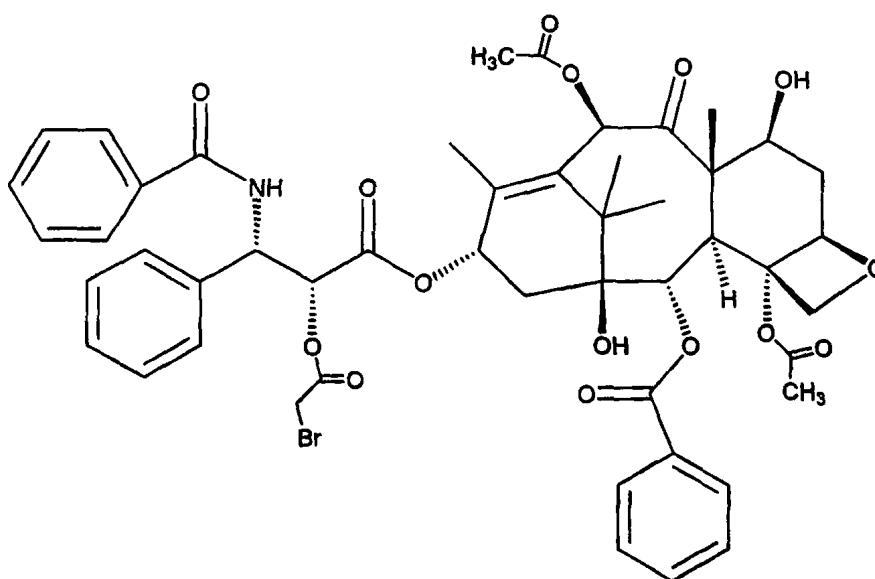
Η σύνθεση της χλωροακέτυλο-C2'-ταξόλης έγινε σε διχλωρομεθάνιο (DCM) σε ατμόσφαιρα N₂, στους 0° C για 1h και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 3h, με αντίδραση 0,014 mmol (12 mg) ταξόλης και 0,017 mmol (2,9 mg) χλωροξικού ανυδρίτη παρουσία 0.017 mmol (2,9 μl) N,N-δισοπροπύλ-αιθύλ-αμίνης (DIEA). Η παρακολούθηση της αντίδρασης έγινε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS. Το δείγμα αποτελούταν από 15μl μίγματος αντίδρασης, αραιωμένο με 400 μl H₂O/CH₃CN-0,1% TFA, 1/1, v/v. Μετά το τέλος της αντίδρασης, το μίγμα εκπλύθηκε διαδοχικά με 0,1 N HCl –για την απομάκρυνση της περίσσειας της DIEA- και κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃ –για την απομάκρυνση της περίσσειας του ανυδρίτη. Η οργανική φάση ξηραίνεται με Na₂SO₄ και ο διαλύτης εξατμίζεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα, λαμβάνοντας λευκό ίζημα. Στη συνέχεια η ουσία διαλύθηκε σε H₂O-0,1%TFA /CH₃CN 0,1%TFA, 1:1 (v/v) και καθαρίστηκε σε ημιπαρασκευαστική HPLC, με χρήση βαθμιδωτού προγράμματος έκλυσης (gradient), με διαλύτες (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA, σε αναλογία, από 90/10 έως 5/95 με ταχύτητα ροής 4,7 ml/min και συνολικό χρόνο έκλυσης 30min. Στο σχήμα 12.1 δίνεται το φάσμα μάζας του.

Συνολική (όλων των σταδίων) απόδοση 70%.



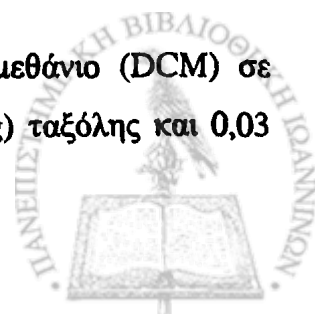
Σχήμα 12.1: ESI-MS φάσμα μάζας της χλωροακέτυλο-C2'-ταξόλης στο οποίο φαίνεται το μοριακό ιόν $[M+H]^+$. Υπολογισθέν $M.B.=930,43$. Ευρεθέν $M.B.=930,2$.

12.2.2. Σύνθεση της βρωμοακέτυλο-C2'-ταξόλης



$M.B.=974,8$

Η σύνθεση της βρωμοακέτυλο-C2'-ταξόλης έγινε σε διχλωρομεθάνιο (DCM) σε ατμόσφαιρα N_2 στους $0^\circ C$ για 3h, με αντίδραση 0,022 mmol (18,8 mg) ταξόλης και 0,03

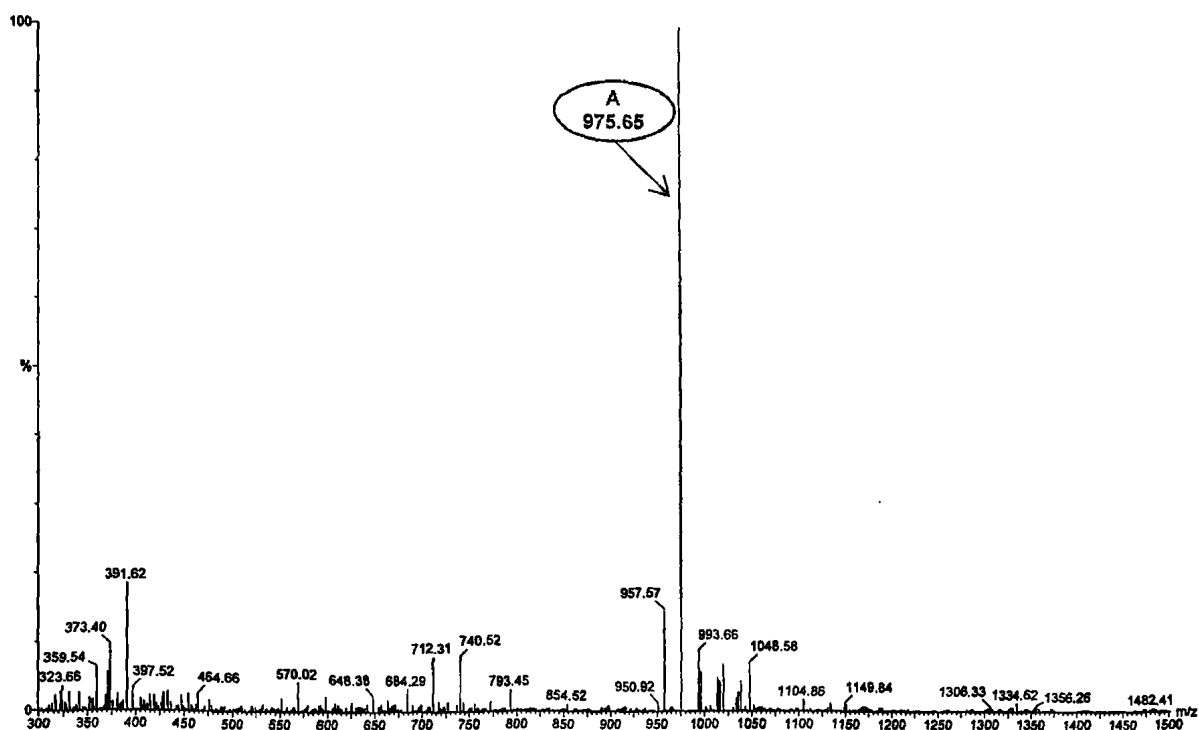


mmol (2,6 μ l) βρωμοξικού βρωμιδίου παρουσία 0,06 mmol (10,3 μ l) N,N-δισοπροπύλ-αιθύλ-αμίνης (DIEA). Η παρακολούθηση της αντίδρασης έγινε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS, όπως προηγουμένως. Μετά το τέλος της αντίδρασης το μίγμα εκπλύθηκε διαδοχικά με 0,1 N HCl, κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃, ξηράνθηκε με Na₂SO₄ και ο διαλύτης εξατμίσθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα, λαμβάνοντας το προϊόν ως σκουρόχρωμο ίζημα. Στη συνέχεια η ουσία διαλύθηκε σε H₂O(0,1% TFA)/ CH₃CN(0,1% TFA), 1:1, (v/v) και καθαρίστηκε σε ημιπαρασκευαστική HPLC. με χρήση βαθμιδωτού προγράμματος έκλουσης (gradient), με διαλύτες H₂O(0,1% TFA)/CH₃CN(0,1% TFA) σε αναλογία, από 60/40 έως 5/95, ταχύτητα ροής 4.7 ml/min και συνολικό χρόνο έκλουσης 30min. Συνολική (όλων των σταδίων) απόδοση 78%. Στο σχήμα 12.2 δίνεται το φάσμα μάζας του. Για την αναλυτική HPLC του πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω πρόγραμμα βαθμίδωσης (gradient) και σύστημα διαλυτών:

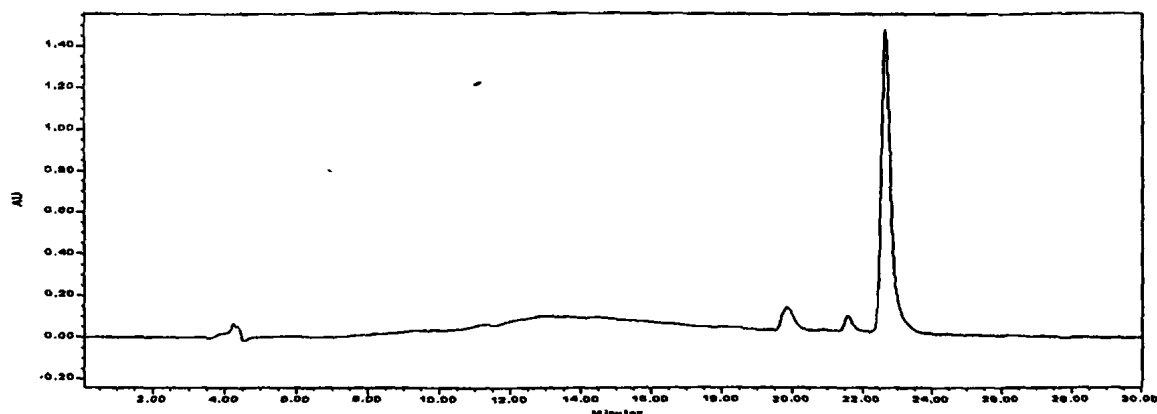
<i>Χρόνος (min)</i>	<i>H₂O/0,1% TFA)</i>	<i>CH₃CN/0,1% TFA</i>	<i>Ροή (ml/min)</i>
0	60	40	1
30	5	95	1

Γι αυτό το σκοπό 1 mg βρωμοακέτυλο-C2'-ταξόλης διαλύθηκε σε 260 μ l CH₃CN (+0,1% TFA) και 200 μ l H₂O (+0,1% TFA). Το χρωματογράφημα αναλυτικής HPLC δίνεται στο σχήμα 11.3.





Σχήμα 12.2: ESI-MS φάσμα μάζας της βρωμοακέτυλο-C2'-ταξόλης στο οποίο φαίνεται το μοριακό ιόν $[M+H]^+$. Υπολογισθέν $M.B.=974,84$. Ευρεθέν $M.B.=974,65$.



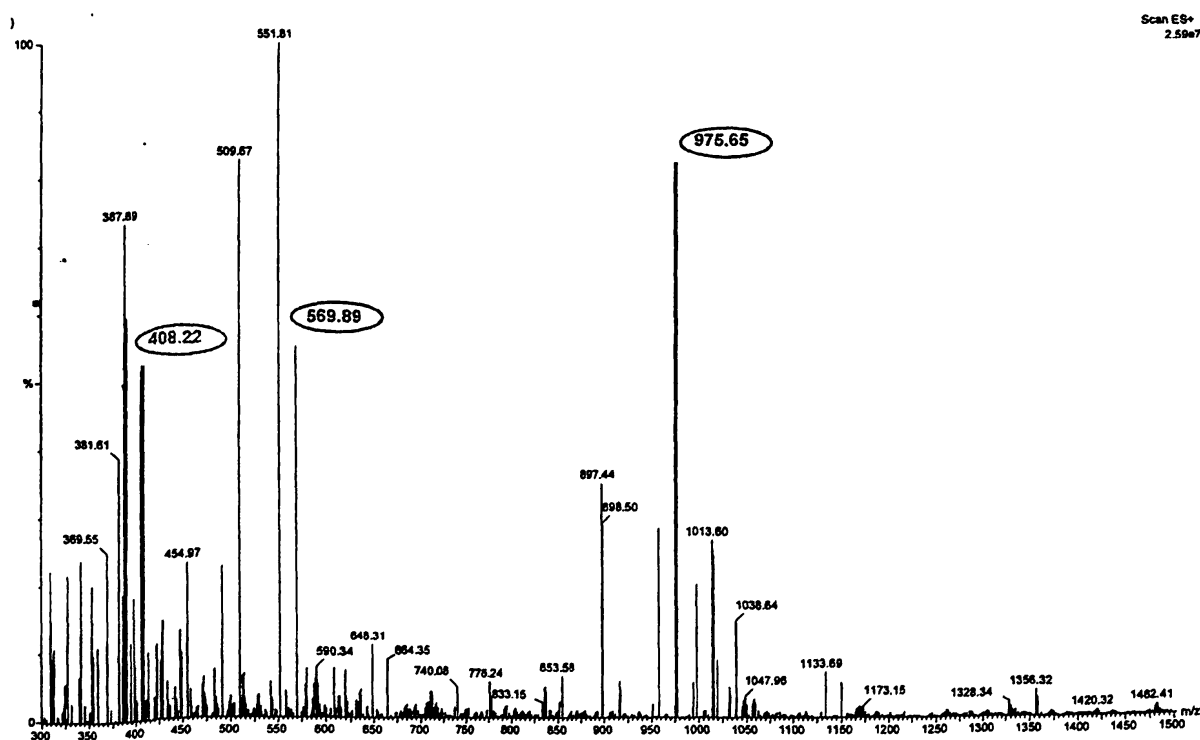
Σχήμα 12.3: Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC της βρωμοακέτυλο-C2'-ταξόλης. Ανίχνευση στα 214nm.

Για να αποδειχθεί πως η αντίδραση της βρωμοακετυλίωσης προχωρά μόνο από τη C2' θέση της ταξόλης, έγιναν πειράματα με το ESI-MS. Είναι γνωστό πως αυξάνοντας το cone voltage του οργάνου, εμφανίζονται στο φάσμα μοριακά ιόντα που οφείλονται σε θραυσματοποίηση της ταξόλης και αφορούν την παράπλευρη αλυσίδα της και το μόριο της 13- δεακετυλομπακατίνης [243]. Ανάλογα λοιπόν με τα μοριακά ιόντα που θα εμφανιζόταν στο φάσμα, θα μπορούσαμε να κρίνουμε την πορεία της αντίδρασης.

Ενώ στο φάσμα του σχήματος 12.2 που πάρθηκε σε cone voltage 30 V φαίνεται μόνο το μοριακό ιόν της βρωμοακέτυλο-ταξόλης, αυξάνοντας, στο ίδιο δείγμα, το cone voltage στο 60 V (σχήμα 12. 4), εμφανίζονται μοριακά ιόντα που αντιστοιχούν

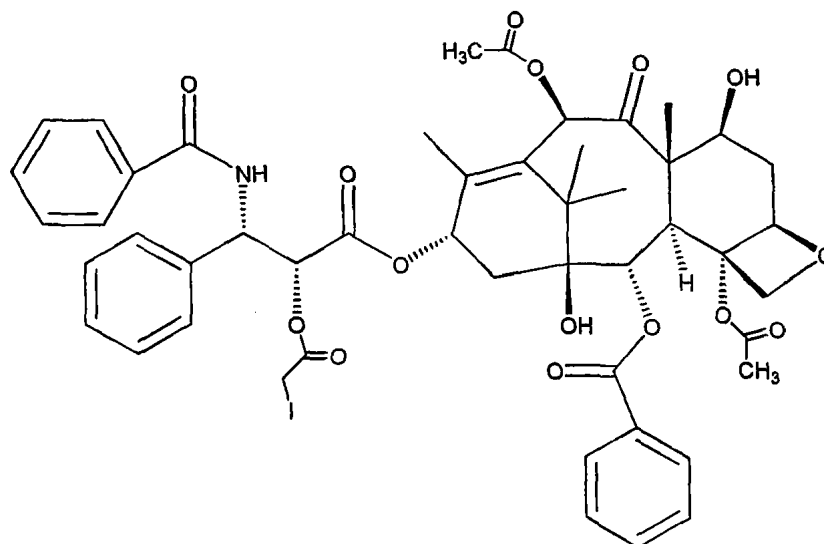
- Στην παράπλευρη αλυσίδα της ταξόλης με την βρωμοακέτυλο ομάδα στη C2' θέση (χρωματισμένο με πράσινο χρώμα) .
- Στο μόριο της 13-δευδροξυ-μπακατίνης (χρωματισμένο με μοβ χρώμα) .

Αυτά τα στοιχεία, σε συνδυασμό με το γεγονός πως κανένα μοριακό ιόν που να αντιστοιχεί σε μόριο μπακατίνης που να φέρει μια βρωμοακέτυλο ομάδα (+121 Da από το πράσινο μοριακό ιόν), αποτελούν αποδείξεις για την θέση της παραγοντοποίησης.



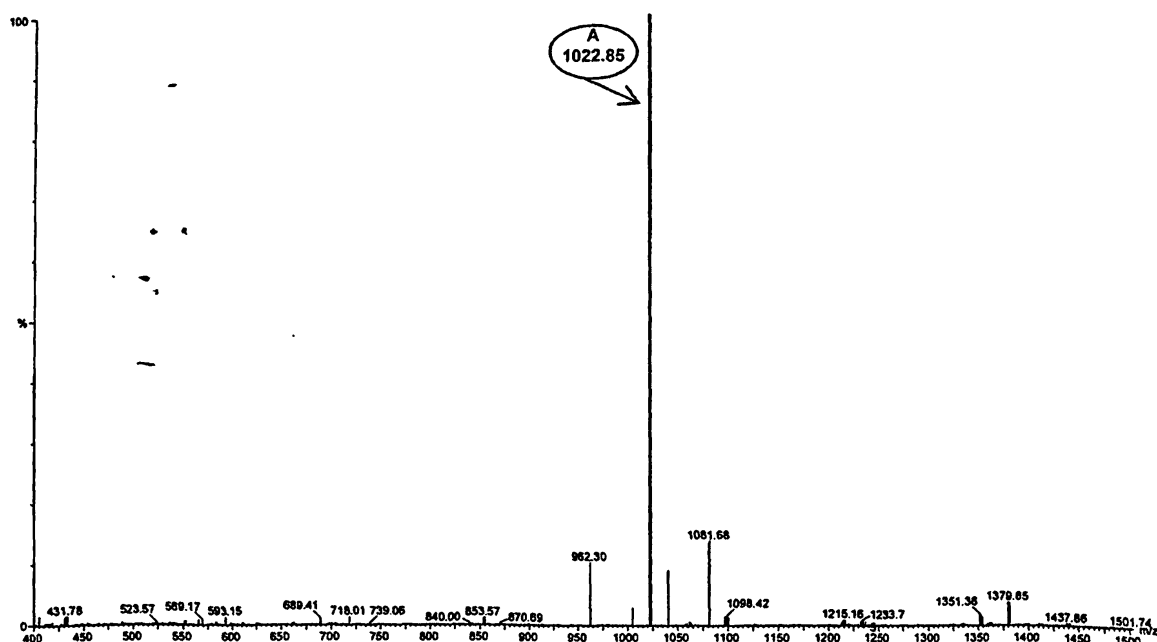
Σχήμα 12.4: ESI-MS φάσμα μάζας της βρωμοακέτυλο-C2'-ταξόλης σε cone voltage 60 V.

12.2.3. Σύνθεση της ιωδοακέτυλο-C2'-ταξόλης



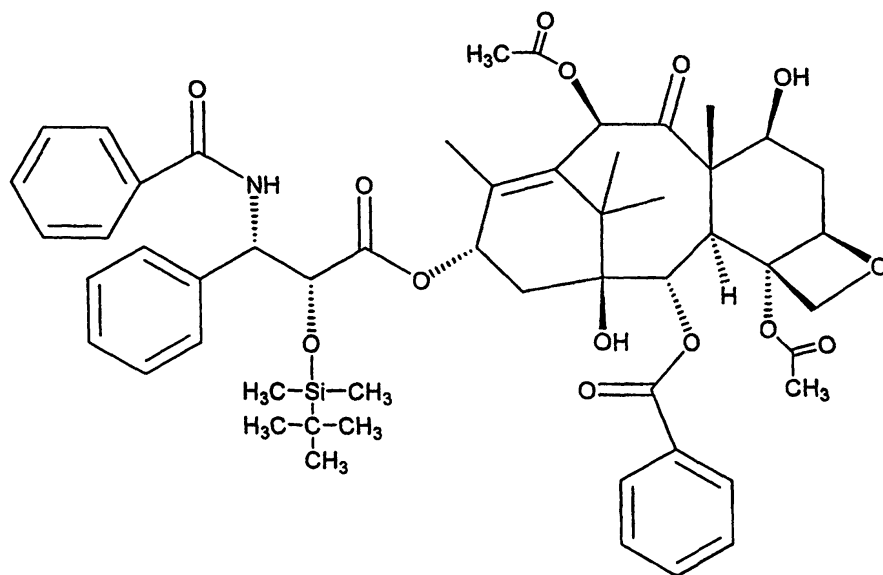
M.B.:1021,84

Η σύνθεση της ιωδοακέτυλο-C2'-ταξόλης έγινε σε διχλωρομεθάνιο (DCM) σε ατμόσφαιρα Ar στους 0° C για 3h, με αντίδραση 0,012 mmol (10,2 mg) ταξόλης και 0,02 mmol (7 mg) ιωδοξικού ανυδρίτη, παρουσία 0,02 mmol (3,4 μ l) N,N-δισοπροπύλ-αιθύλαμίνης (DIEA). Η παρακολούθηση της αντίδρασης έγινε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS, όπως προηγουμένως. Μετά από το τέλος της αντίδρασης, το μίγμα εκπλύθηκε διαδοχικά με 0,1 N HCl, κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃. Η οργανική φάση ξηράθηκε με Na₂SO₄ και ο διαλύτης εξατμίσθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα, λαμβάνοντας το προϊόν ως ίζημα. Στη συνέχεια η ουσία διαλύθηκε σε H₂O·0,1%TFA/CH₃CN·0,1%TFA, 1/1, (v/v) και καθαρίστηκε σε ημιπαρασκευαστική HPLC με χρήση βαθμιδωτού προγράμματος έκλουσης (gradient), (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA, σε αναλογία, από 50/50 έως 5/95, ταχύτητα ροής 4,7 ml/min και συνολικό χρόνο έκλουσης 30min. Συνολική (όλων των σταδίων) απόδοση 75%. Στο σχήμα 12.5 δίνεται το φάσμα μάζας του καθαρού προϊόντος.



Σχήμα 12.5: ESI-MS φάσμα μάζας της ιωδοακέτυλο- $C2'$ -ταξόλης στο οποίο φαίνεται το μοριακό ιόν $[M+H]^+$. Υπολογισθέν $M.B.=1021,84$. Ευρεθέν $M.B.=1021,85$.

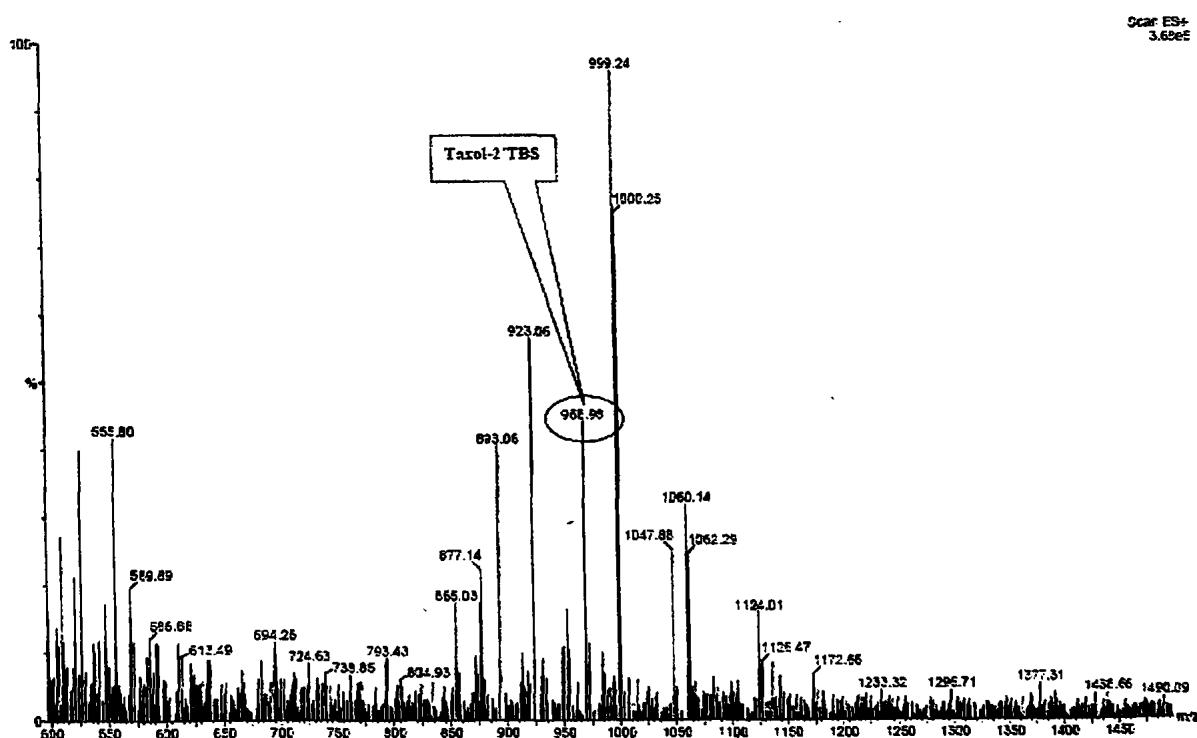
12.2.4. Σύνθεση της TBS- $C2'$ -ταξόλης



$M.B = 968,13$

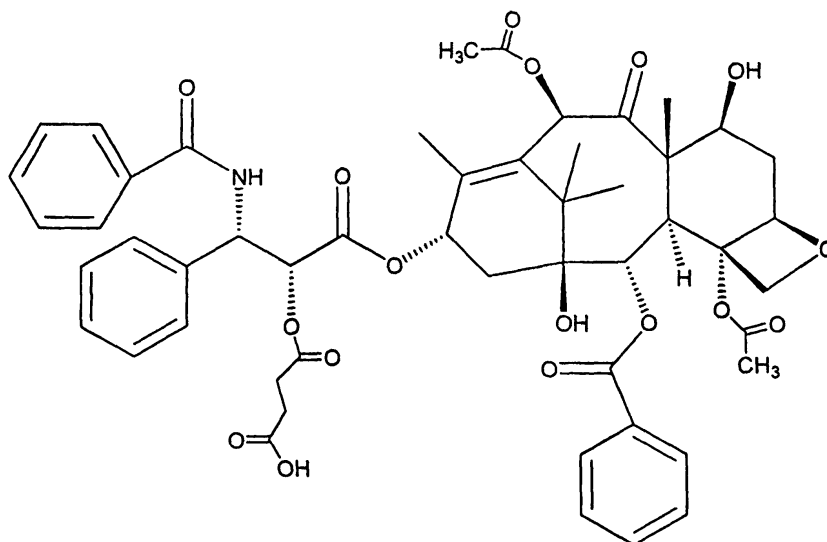
Η παραγοντοποίηση της ταξόλης με *tert*-butyl-dimethyl silyl chloride (TBS-Cl) στη θέση $C2'$, έγινε δοκιμαστικά, σε μικρή ποσότητα, στην υγρή φάση [244]. 2,06 mg ταξόλης (0,0024 mmol) διαλύθηκαν σε 500μl άνυδρου DMF. Σε αυτό προστέθηκαν 0,83 mg

ιμιδαζολίου (0,012 mmol) και 1,82 mg (0,012 mmol) TBS-Cl. Η παρουσία ιμιδαζολίου ήταν απαραίτητη για της βασικές συνθήκες της αντίδρασης. Η αντίδραση αφέθηκε στους 60 °C για 2 ώρες και μετά, για μία ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στο μίγμα της αντίδρασης προστέθηκαν 5 ml οξικού αιθυλεστέρα και εκπλύθηκε με νερό και άλμη. Η οργανική φάση στεγνώθηκε με Na₂SO₄. Αν και το προϊόν ανιχνεύτηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS, δεν έγινε δυνατός ο καθαρισμός και απομόνωσή του σε στερεά μορφή, ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην πρόσδεση πεπτιδίων.



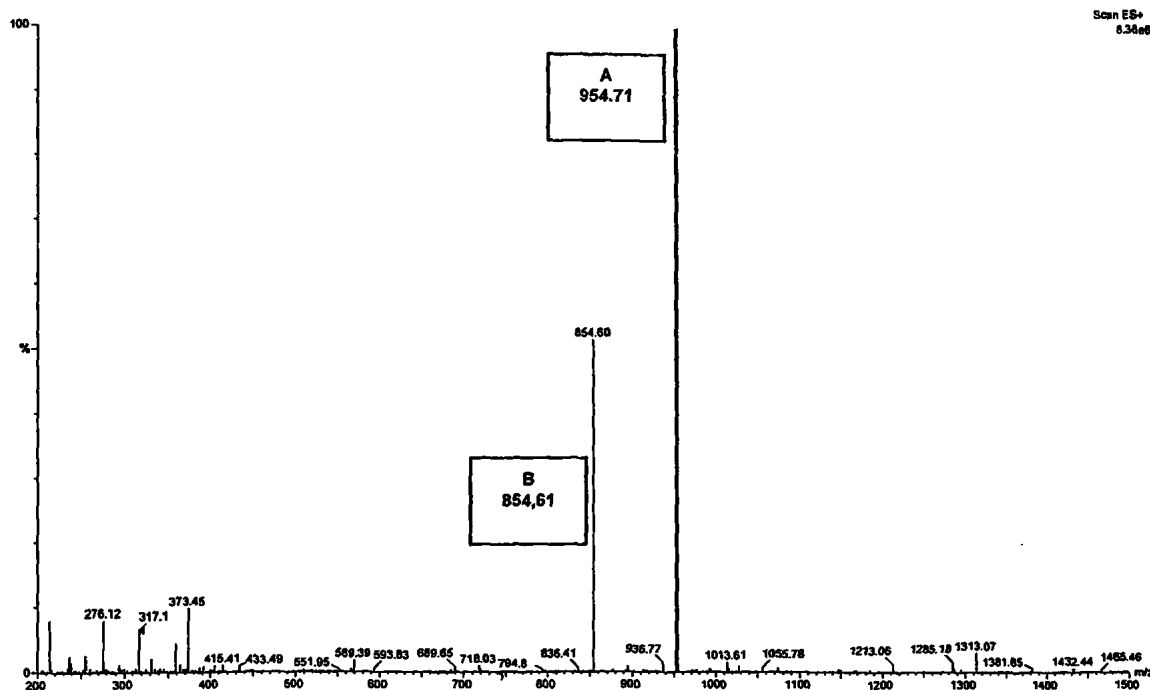
Σχήμα 12.6: ESI-MS φάσμα μάζας της TBS-C2'-ταξόλης στο οποίο φαίνεται το μοριακό ιόν $[M+H]^+$. Δεν επιτεύχθηκε καλύτερος καθαρισμός του προϊόντος.

12.2.5. Σύνθεση της σουκινυλο-C2'-ταξόλης



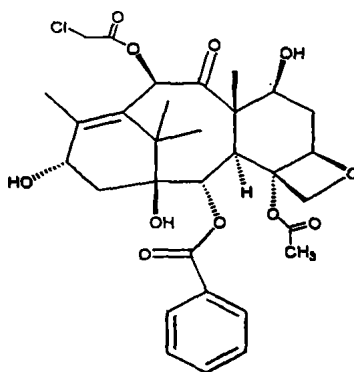
M.B.:953,98

Σε 1,5 ml DCM διαλύθηκαν 0,0117 mmol (10 mg) ταξόλης και 0,027 mmol (2,7 mg) σουκινικό ανυδρίτη. Στο διάλυμα προστέθηκαν 0,0585 mmol (5 μ l) πυριδίνης και η αντίδραση αφέθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η παρακολούθησή της έγινε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS, όπως προηγουμένως. Η αντίδραση αφέθηκε για 2 μέρες. Μετά από το τέλος της αντίδρασης, το μίγμα εκπλύθηκε με 0,1 N HCl, έγινε ξήρανση με Na₂SO₄ και ο διαλύτης εξατμίσθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα, λαμβάνοντας το προϊόν ως λευκό ίζημα. Ο καθαρισμός έγινε σε ημιπαρασκευαστική HPLC. με χρήση βαθμιδωτού προγράμματος έκλουσης (gradient), με διαλύτες (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA, σε αναλογία, από 50/50 έως 30/70 με ταχύτητα ροής 4,7ml/min και συνολικό χρόνο έκλουσης 30min. Στο φάσμα μάζας του τελικού προϊόντος εμφανίζεται και το μοριακό ιόν της ταξόλης πράγμα που δείχνει πως η ταξόλη συνυπάρχει με την σουκινυλο C2'-ταξόλη. Συνολική (όλων των σταδίων) απόδοση 71%. Στο σχήμα 12.6 δίνεται το φάσμα μάζας του τελικού προϊόντος.



Σχήμα 12.7: ESI-MS φάσμα μάζας της σουκινυλο-C2'-ταξόλης στο οποίο φαίνεται το μοριακό ιόν $[M+H]^+$, Υπολογισθέν M.B.=953,98. Ευρεθέν M.B.=953,71. Επίσης φαίνεται και ένα μοριακό ιόν που αντιστοιχεί στην ταξόλη.

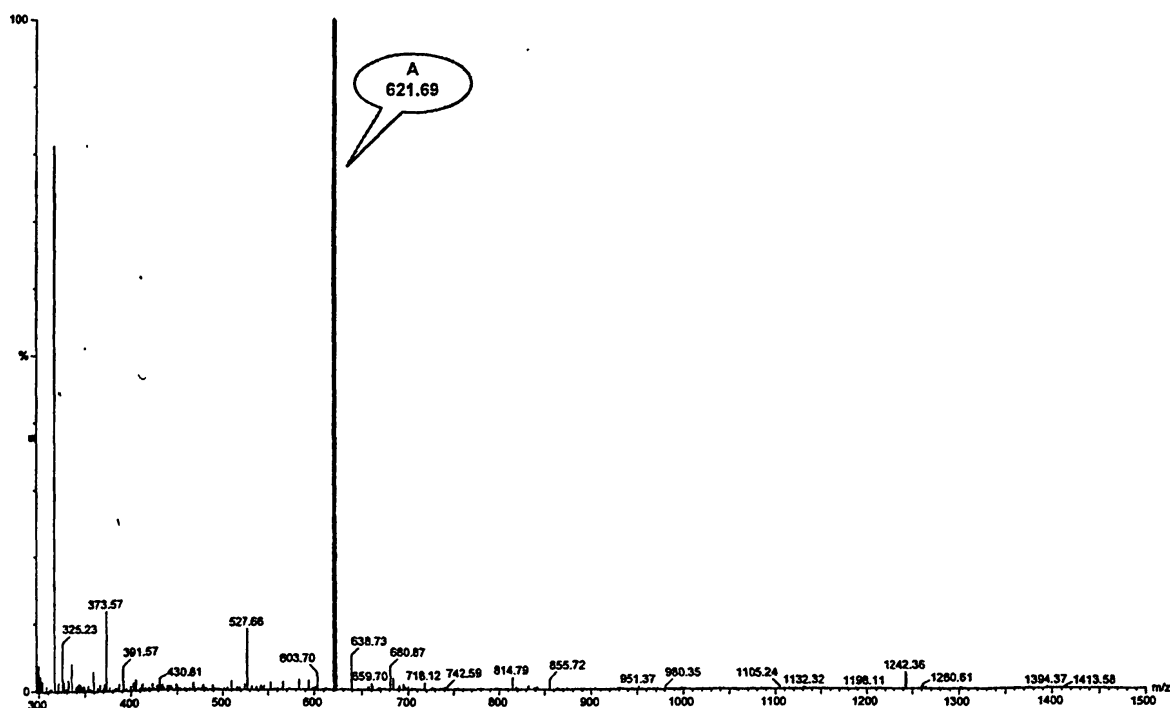
12.2.6 . Σύνθεση της 10-χλωροακέτυλο-μπακατίνης



M.B.:621,07

Σε 0,016 mmol (8,9 mg) 10-δεακέτυλομπακατίνης διαλυμένα σε THF, προστέθηκαν 0,16 μmol (0,17 mg) $Yb(OTf)_3$ ως οξύ κατά Lewis, για τον προσανατολισμό της χλωροακετυλίωσης της 10- δεακέτυλο μπακατίνης στη θέση 10. Το μίγμα αφέθηκε για 15 λεπτά και προστέθηκαν 0,51 mmol (88 mg) χλωροξικού ανυδρίτη. Η αντίδραση παρακολούθηθηκε με ESI-MS και μετά 8 ώρες ο διαλύτης εξατμίζεται σε περιστροφικό

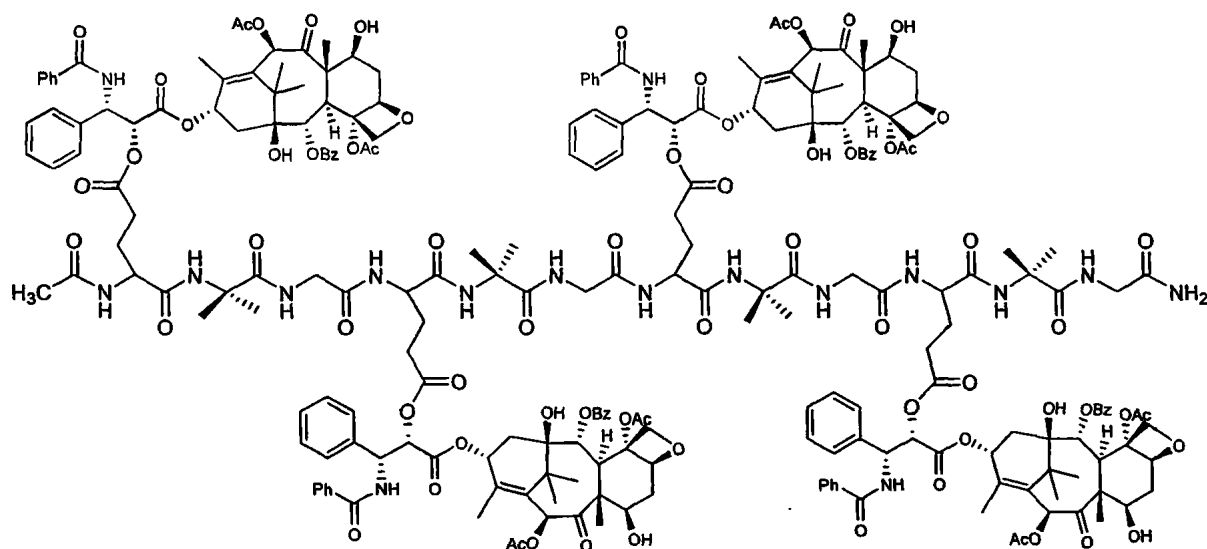
εξατμιστήρα. Προστέθηκε DCM, το μίγμα εκπλύθηκε με 0,1 N HCl, έγινε ξήρανση με Na_2SO_4 και ο διαλύτης εξατμίσθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα, λαμβάνοντας το προϊόν ως λευκό ίζημα, το οποίο καθαρίσθηκε σε ημιπαρασκευαστική HPLC. με χρήση βαθμιδωτού προγράμματος έκλουσης (gradient), (A) $\text{H}_2\text{O}/0,1\%$ TFA, (B) $\text{CH}_3\text{CN}/0,1\%$ TFA, σε αναλογία, από 80/20 έως 20/80, ταχύτητα ροής 4.7ml/min και συνολικό χρόνο έκλουσης 30min. Συνολική (όλων των σταδίων) απόδοση 66%. Στο σχήμα 12.8 δίνεται το φάσμα μάζας του καθαρού προϊόντος.



Σχήμα 12.8: ESI-MS φάσμα μάζας της 10-χλωροακέτυλο-μπακατίνης στο οποίο φαίνεται το μοριακό ιόν $[M+H]^+$. Υπολογισθέν $M.B.=621,07$. Ευρεθέν $M.B.=620,69$.

13. ΣΥΝΘΕΣΗ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΑΞΟΛΗΣ ΚΑΙ 10-ΔΕΑΚΕΤΥΛΟΜΠΑΚΑΤΙΝΗΣ ΟΜΟΙΟΠΟΛΙΚΑ ΠΡΟΣΔΕΔΕΜΕΝΩΝ ΣΕ ΠΕΠΤΙΔΙΑ

13.1. Σύζευξη του φορέα Ac-(Glu-Aib-Gly)₄-NH₂ με ταξόλη

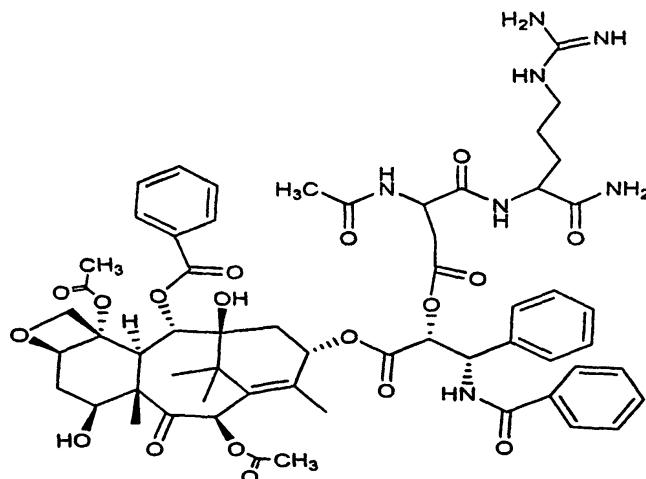


M.B.:4487,82

Η σύνθεση του παραγώγου έγινε στην υγρή φάση. Χρησιμοποιήθηκαν 4,37 μmol (5 mg) φορέα Ac-(Glu-Aib-Gly)₄-NH₂, 0,0193 mmol (14,93 mg) ταξόλης, 0,0193 mmol (3 μl) DIC και 0,0193 mmol (2,95 mg) HOBt. Η αντίδραση έγινε σε διαλύτη DMF (διμεθυλοφορμαμίδιο) για 4 ώρες. Στο μίγμα της αντίδρασης προστέθηκε AcOEt (οξικός αιθυλεστέρας) και ακολούθησε εκχύλιση με νερό. Η υδατική φάση λυοφιλοποιήθηκε και ελήφθη λευκό ίζημα, το οποίο διαλύθηκε σε CH₃CN / H₂O, 1/1, v/v και οδηγήθηκε σε ημιπαρασκευαστική RP-HPLC σε στήλη C₁₈ Discovery, 25cm x 10mm. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% TFA, για 30 min με σταθερό μίγμα διαλυτών 70(A) / 30(B).

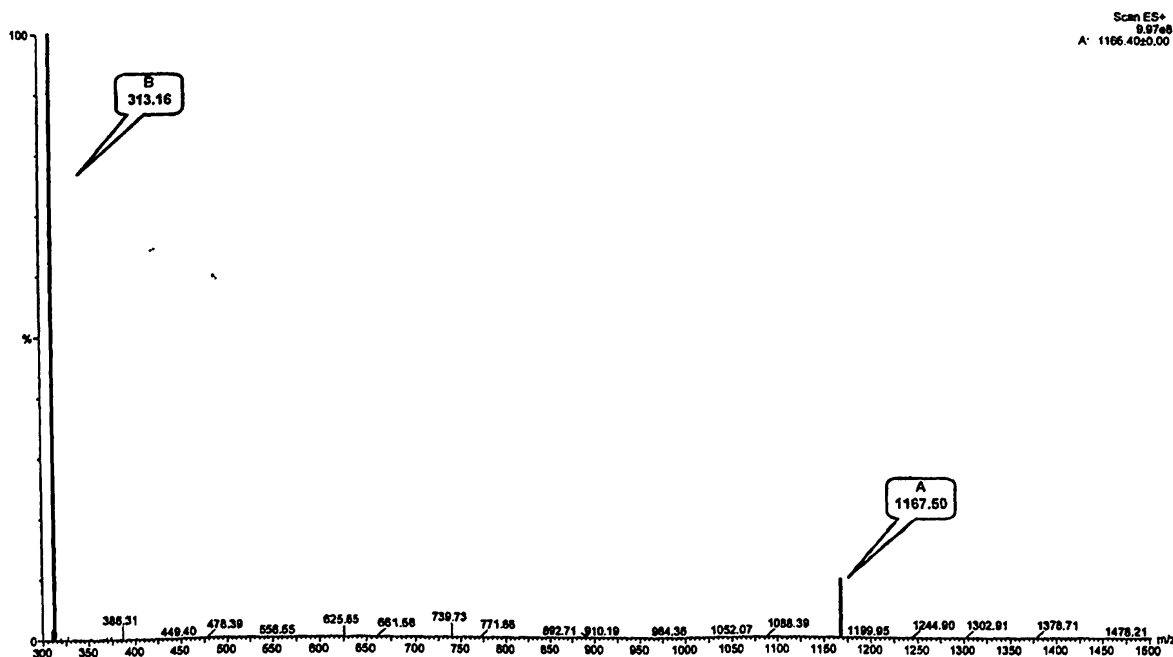
Η απουσία φορτίου στο μόριο και η ευκολία θραυσματοποίησής του στο ESI-MS, αποτέλεσαν σημαντικά προβλήματα τόσο στην παρακολούθηση της πορείας της αντίδρασης όσο και στην ταυτοποίηση του τελικού προϊόντος.

13.2. Σύζευξη του Ac-Asi-Arg-NH₂ με ταξόλη



M.B.:1166,23

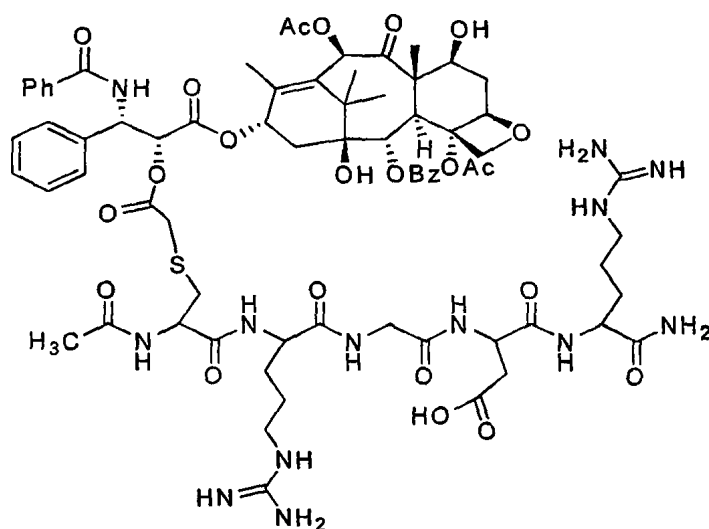
Σε διάλυμα CH₃CN/DMF 900 μl /100 μl, διαλύθηκαν 3,2 μmol (1 mg) Ac-Asi-Arg-NH₂ και 3,2 μmol (2,73 mg) ταξόλης. Σε αυτό προστέθηκε DIEA (2% ως προς το διάλυμα, 20 μl) για βασικές συνθήκες, η αντίδραση τοποθετήθηκε σε ελαιόλουτρο, στους 60° C και παρακολουθήθηκε με ESI-MS. Ενώ λοιπόν ανιχνεύτηκε το προϊόν στο φάσμα μάζας (σχήμα 13.1), η απόδοσή της ήταν μικρή, αφού το φάσμα μάζας δε βελτιώθηκε ούτε μετά από 2 μέρες.



Σχήμα 13.1: ESI-MS φάσμα μάζας του Ac-Asi-Arg-NH₂ με ταξόλη. Φαίνεται το προϊόν και το πεπτίδιο.



13.3. Σύνθεση του παραγώγου Ac-Cys(CH₂-CO-C2'taxol)-Arg-Gly-Asp-Arg-NH₂



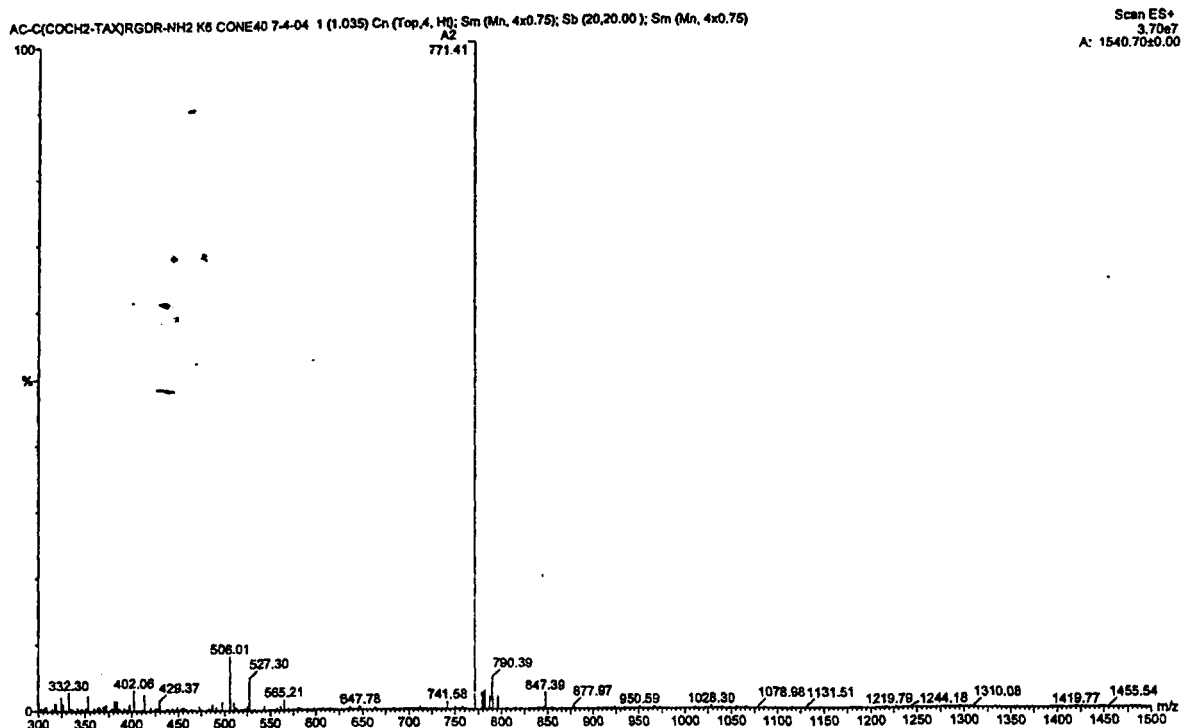
M.B.:1550,7

Σε 0,0117mmol (10,2 mg) πεπτιδίου Ac-Cys-Arg-Gly-Asp-Arg -NH₂·2TFA διαλυμένο σε 0,5 ml DMF υπό ατμόσφαιρα Ar, προστέθηκαν 0,012 mmol (11,2 mg) χλωροακέτυλο-C2'-ταξόλης και 0,013 mmol DIEA (2,2 μl) και το μίγμα αφέθηκε να αντιδράσει για 3 ώρες. Η αντίδραση παρακολουθήθηκε με ESI-MS. Μετά από 3,5 h προστέθηκαν H₂O-0,1%TFA/CH₃CN-0,1%TFA 1/1 v/v και το μίγμα, χωρίς άλλη επεξεργασία, ενέθηκε σε ημιπαρασκευαστική HPLC. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1% και πρόγραμμα βαθμίδωσης (gradient) από 95% A σε 5% για 30 min. Συνολική απόδοση 38%. Στο σχήμα 13.2 δίνεται το φάσμα μάζας του. Στην αναλυτική HPLC του πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω πρόγραμμα βαθμίδωσης (gradient) και σύστημα διαλυτών:

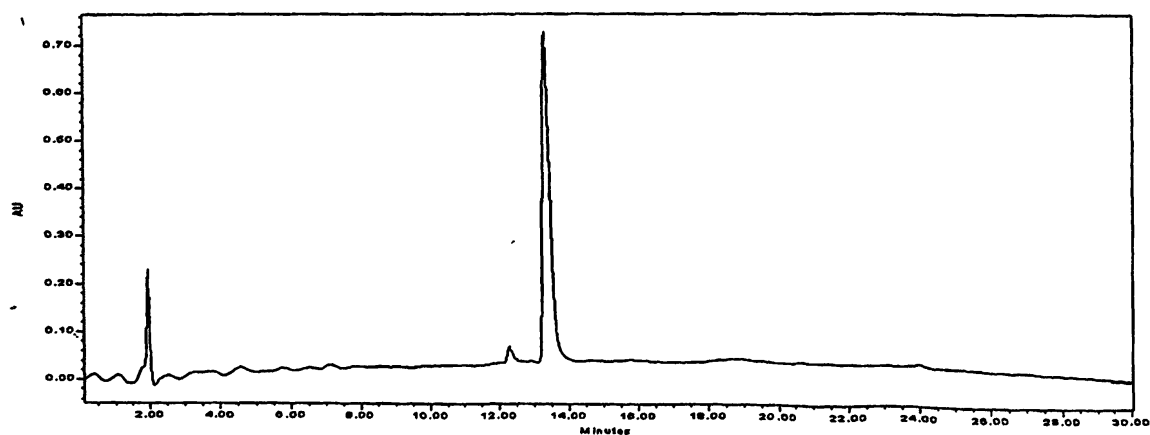
Χρόνος (min)	H ₂ O/0,1% TFA	CH ₃ CN/0,1% TFA	Ροή (ml/min)
0	85	15	1
30	10	90	1

Για το σκοπό αυτό 0,51 mg πεπτιδίου διαλύθηκαν σε μίγμα 250 μl CH₃CN (+0,1% TFA) και 100 μl H₂O (+0,1% TFA). Το χρωματογράφημα αναλυτικής HPLC δίνεται στο σχήμα 13.3.



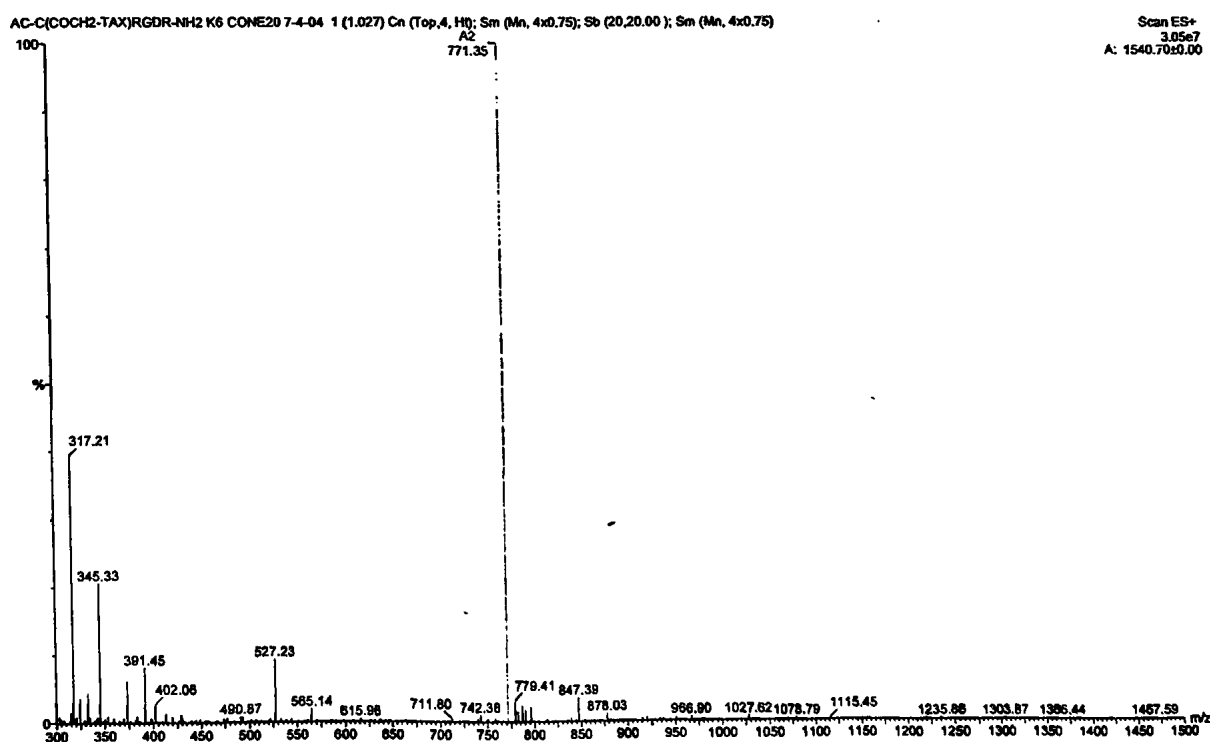


Σχήμα 13.2 : ESI-MS φάσμα μάζας του πεπτιδίου $\text{Ac-C(CH}_2\text{CO-C2'taxol)RGDR-NH}_2$ στο οποίο φαίνονται το μοριακό ιόν $[M+2H]^{2+}/2$. Υπολογισθέν $M.B.=1540,7$ Ευρεθέν $M.B.=1540,7$

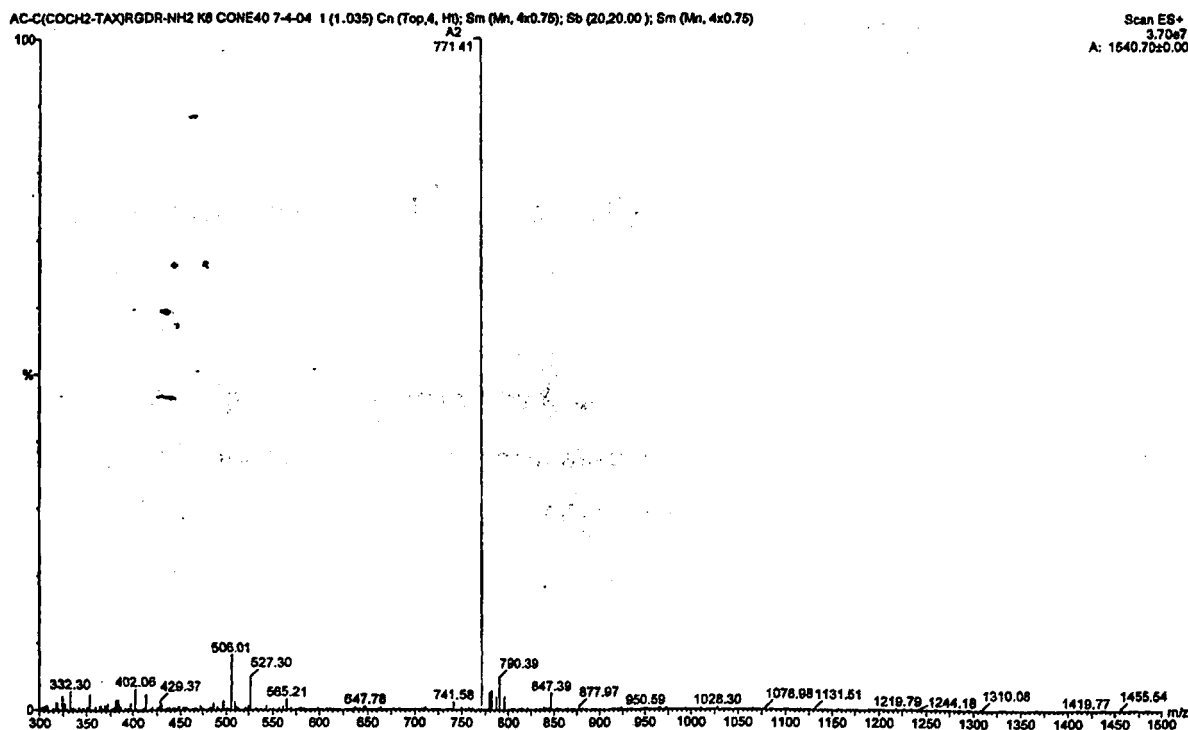


Σχήμα 13.3: Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του $\text{Ac-C(CH}_2\text{CO-C2'taxol)RGDR-NH}_2$. Ανίχνευση στα 214nm.

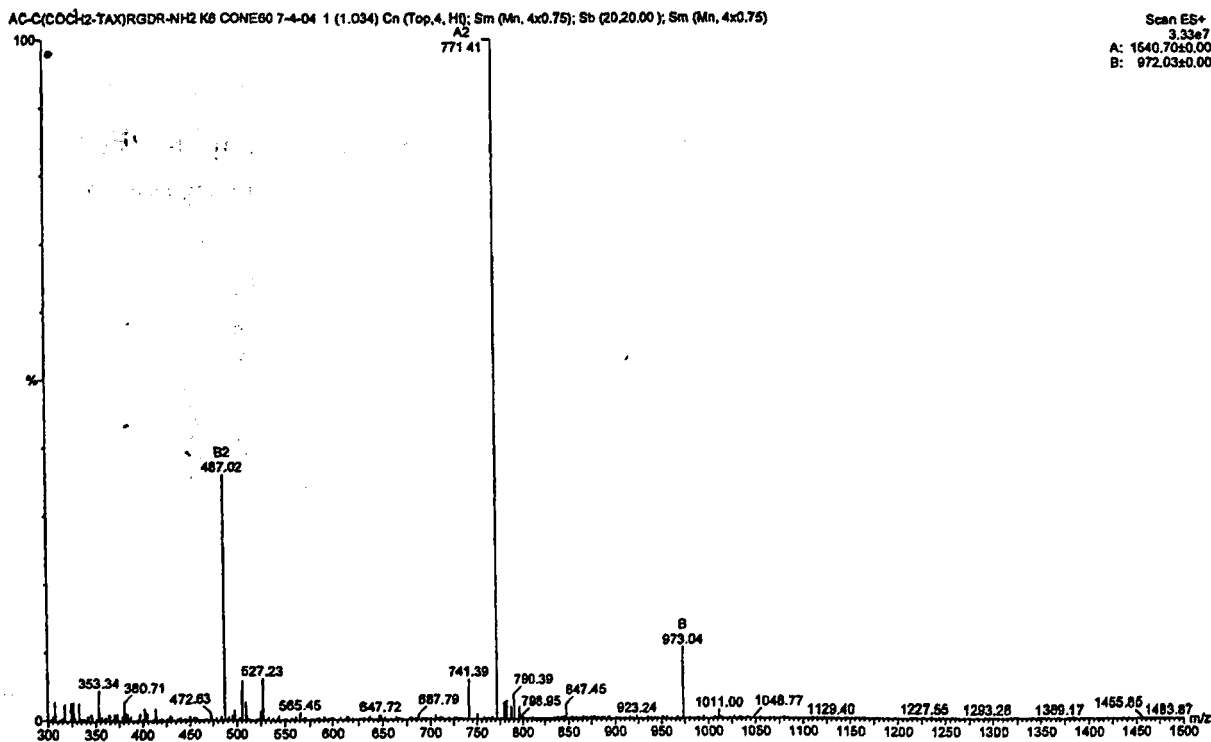
Στο παράγωγο αυτό έγιναν δοκιμές σε διαφορετικές συνθήκες στο ESI-MS και συγκεκριμένα το ίδιο δείγμα μελετήθηκε σε διαφορετικά cone voltage. Έτσι πάρθηκαν 4 φάσματα σε cone 30, 40, 60 και 80 V. Ενώ το παράγωγο δίνει το ίδιο φάσμα στα μικρά cone voltage (30, 40 V) στα μεγαλύτερα (60, 80 V) εμφανίζεται και ένα νέο προϊόν το οποίο αυξάνεται με την αύξηση του cone voltage. Στα σχήματα 13.4, 13.5, 13.6 και 13.7 παραθέτονται τα φάσματα μάζας στις διάφορες τιμές του cone voltage.



Σχήμα 13.4: ESI-MS φάσμα μάζας του παραγώγου $\text{Ac-C(CH}_2\text{CO-C2'axol)RGDR-NH}_2$ σε cone voltage 30 V.

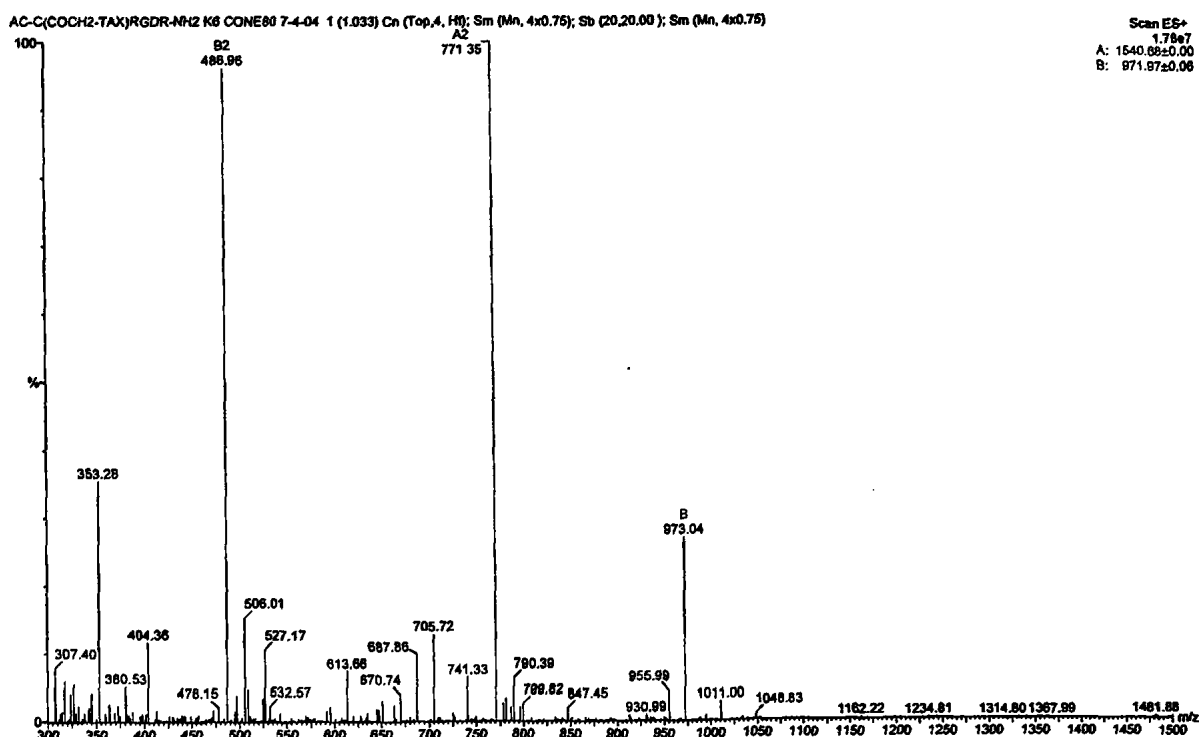


Σχήμα 13.5: ESI-MS φάσμα μάζας του παραγώγου Ac-C(CH₂CO- C2' taxol)RGDR-NH₂ σε cone voltage 40 V.



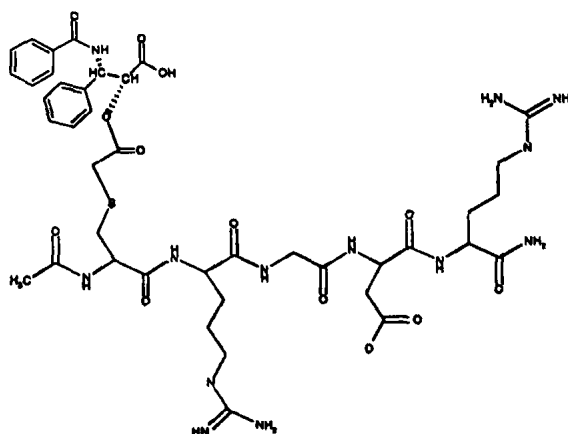
Σχήμα 13.6: ESI-MS φάσμα μάζας του παραγώγου Ac-C(CH₂CO- C2' taxol)RGDR-NH₂ σε cone voltage 60 V.





Σχήμα 13.7: ESI-MS φάσμα μάζας παραγώγου $Ac-C(CH_2CO-C2'taxol)RGDR-NH_2$ σε cone voltage 80 V.

Οι νέες κορυφές που εμφανίζονται στα φάσματα σε μεγαλύτερο cone voltage, αποδίδονται στο προϊόν θραυσματοποίησης που αντιστοιχεί στη διάσπαση ανάμεσα στο υδροξυλικό οξυγόνο και τον άνθρακα C13, όπως φαίνεται παρακάτω:



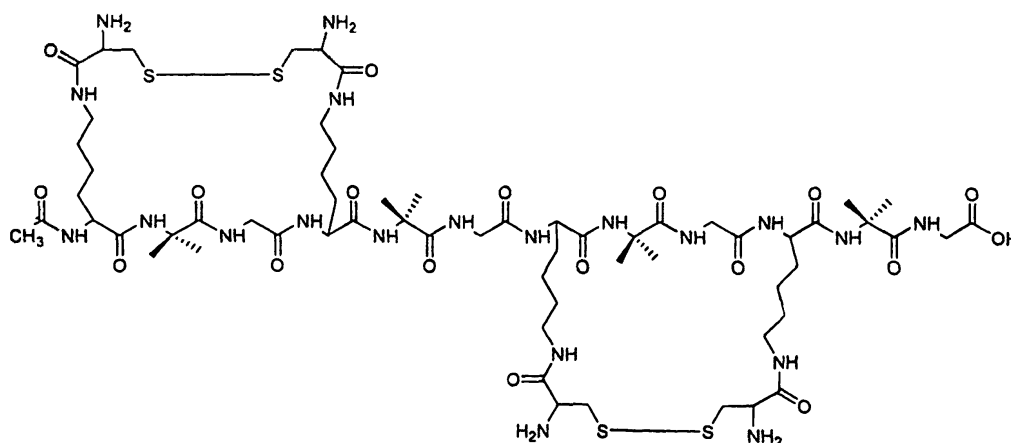
M.B.:972,07

Το αποτέλεσμα αυτό αποδεικνύει ότι η αντίδραση της χλωροακετυλίωσης της ταξόλης προχώρησε από τον άνθρακα C2' όπως αναμένονταν, καθώς δεν ανιχνεύτηκε παράγωγο που

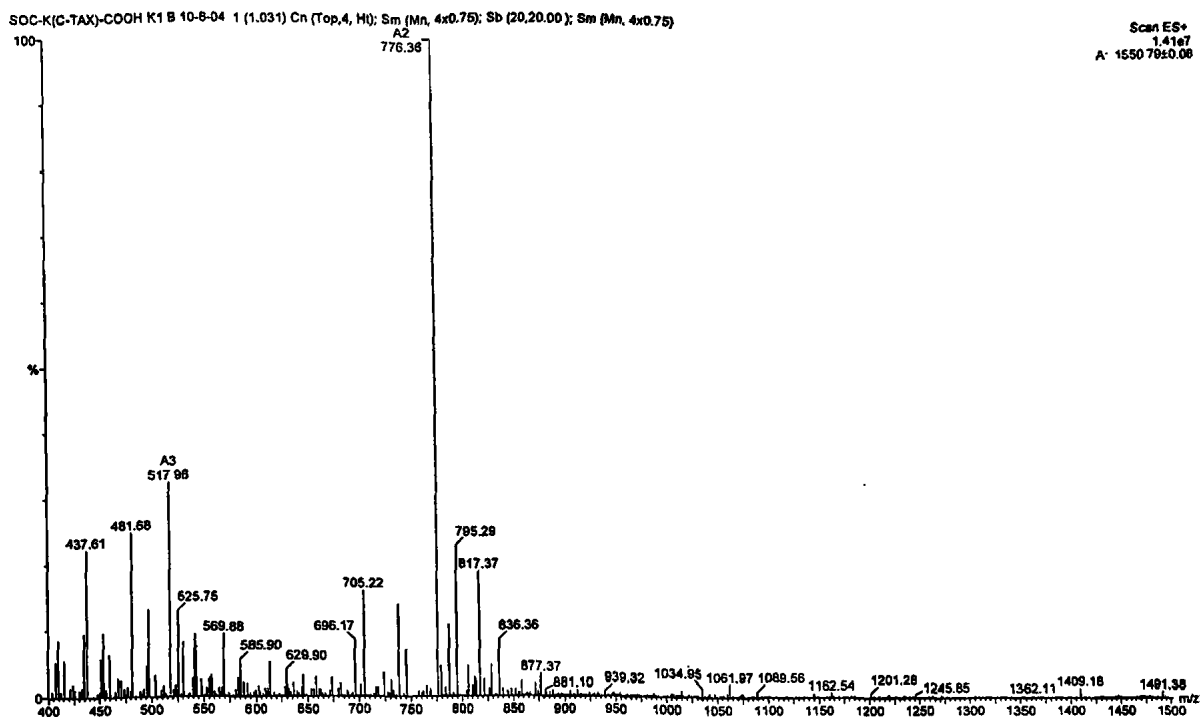
μετά την διάσπαση του μορίου στις συνθήκες του MS, να είναι συνδεδεμένο στο πεπτίδιο από το άνθρακα C7.

13.4. Σύζευξη του φορέα Ac-[Lys(Cys)-Aib-Gly]₄-OH με χλωροακέτυλο-C2'-ταξόλη

Η αντίδραση έγινε στην υγρή φάση. 0,017 mmol (15,8 mg) χλωροακέτυλο-C2'-ταξόλης διαλύθηκαν σε DMF σε ατμόσφαιρα Ar. Στο διάλυμα προστέθηκαν 0,0028 mmol (4,33 mg) φορέα Ac-[Lys(Cys)-Aib-Gly]₄-OH σε μικρές ποσότητες. Προστέθηκαν 0,025 mmol (4,3 μl) DIEA και αφέθηκε να αντιδράσει για 3 ώρες. Η αντίδραση παρακολουθήθηκε με ESI-MS. Στη συνέχεια προστέθηκαν 4ml μίγματος H₂O/0,1% TFA / CH₃CN/0,1% 1/1 v/v και το μίγμα, χωρίς άλλη επεξεργασία, ενέθηκε σε HPLC. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1%, με βαθμίδωση (gradient) από 95% A σε 5%. Μετά την συλλογή και την ταυτοποίηση όλων των κλασμάτων με φασματοσκοπία μάζας Electrospray Ionization (ESI-MS) δε διαπιστώθηκε η ύπαρξη του επιθυμητού παραγώγου. Αντίθετα ανιχνεύθηκε κορυφή που αντιστοιχεί στο φορέα με δύο δισουλφιδικές γέφυρες (σχήματα 13.8, 13.9). Αυτό μπορεί να εξηγηθεί με το γεγονός ότι η διαμόρφωση που παίρνει ο φορέας (3₁₀ έλικα) φέρνει τις παράπλευρες αλυσίδες προς την ίδια κατεύθυνση έτσι ώστε να ευνοούνται οι δισουλφιδικοί ενδομοριακοί δεσμοί.

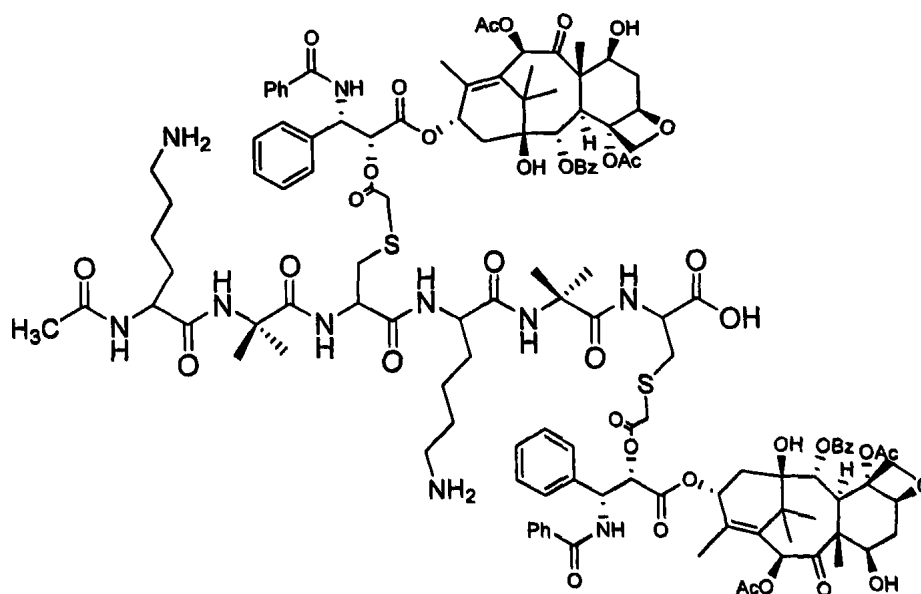


Σχήμα 13.8: Πιθανές ενδομοριακές (S,S) κυκλοποιήσεις στο μόριο του φορέα *M.B=1550*.



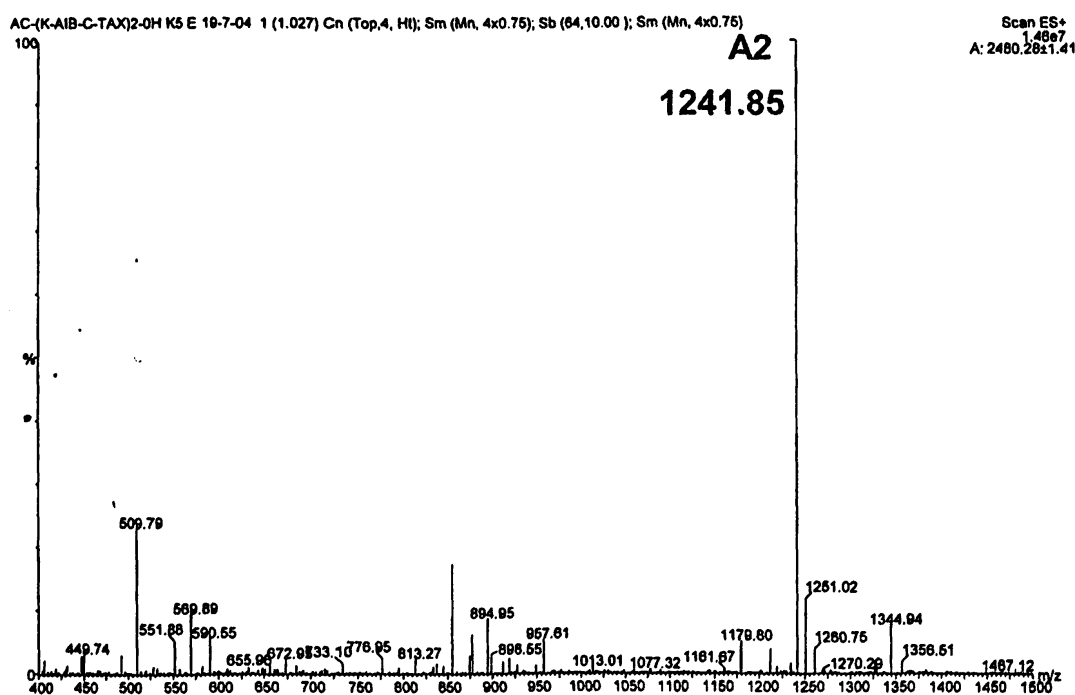
Σχήμα 13.9: ESI-MS φάσμα μάζας του φορέα, στο οποίο φαίνονται τα μοριακά ιόντα $[M+2H]^{2+}/2$, $[M+3H]^{3+}/3$ που αντιστοιχούν σε μόριο με δυο ενδομοριακές δισουλφιδικές γέφυρες. Αναμενόμενο M.B.=1550 Ευρεθέν M.B.=1550,79.

13.5. Σύνθεση του παραγώγου Ac-[Lys-Aib-Cys(CH₂-CO-C2'taxol)]₂-OH



M.B.:2480,75

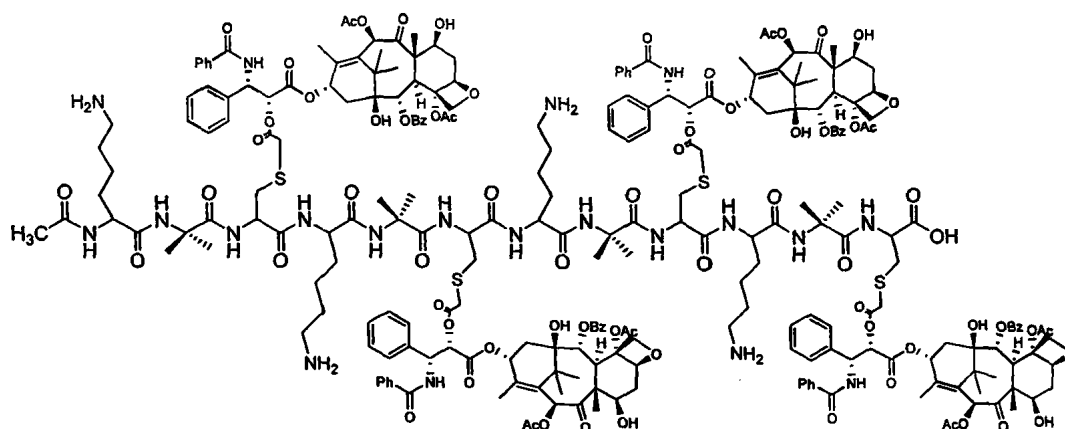
Σε 0,009 mmol (8,37 mg) χλωροακέτυλο-C2'-ταξόλης διαλυμένο σε DMF υπό ατμόσφαιρα Ar, προστέθηκαν 0,012 mmol (2,1 μ l) DIEA και 0,0032 mmol (2,9 mg) πεπτιδίου Ac-(Lys-Aib-Cys)₂-OH·2TFA σε μικρές ποσότητες και αφέθηκε να αντιδράσει για 5 ώρες. Η αντίδραση παρακολουθήθηκε με ESI-MS. Στη συνέχεια προστέθηκαν 4ml μίγματος H₂O/0,1% TFA / CH₃CN/0,1% 2/1, v/v και το μίγμα, χωρίς άλλη επεξεργασία, ενέθηκε σε HPLC. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1%, με βαθμίδωση (gradient) από 95% A σε 5%. Μετά την συλλογή και την ταυτοποίηση όλων των κλασμάτων με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS διαπιστώθηκε η ύπαρξη του επιθυμητού παραγώγου (σχήμα 13.10). Απόδοση $\alpha=39\%$.



Σχήμα 13.10: ESI-MS φάσμα μάζας του παραγώγου Ac-[Lys-Aib-Cys(CH₂-CO- C2'taxol)]₂-OH στο οποίο φαίνεται το μοριακό ιόν $[M+2H]^{2+}/2$. Υπολογισθέν M.B.=2480,8. Ευρεθέν M.B.=2480,28.



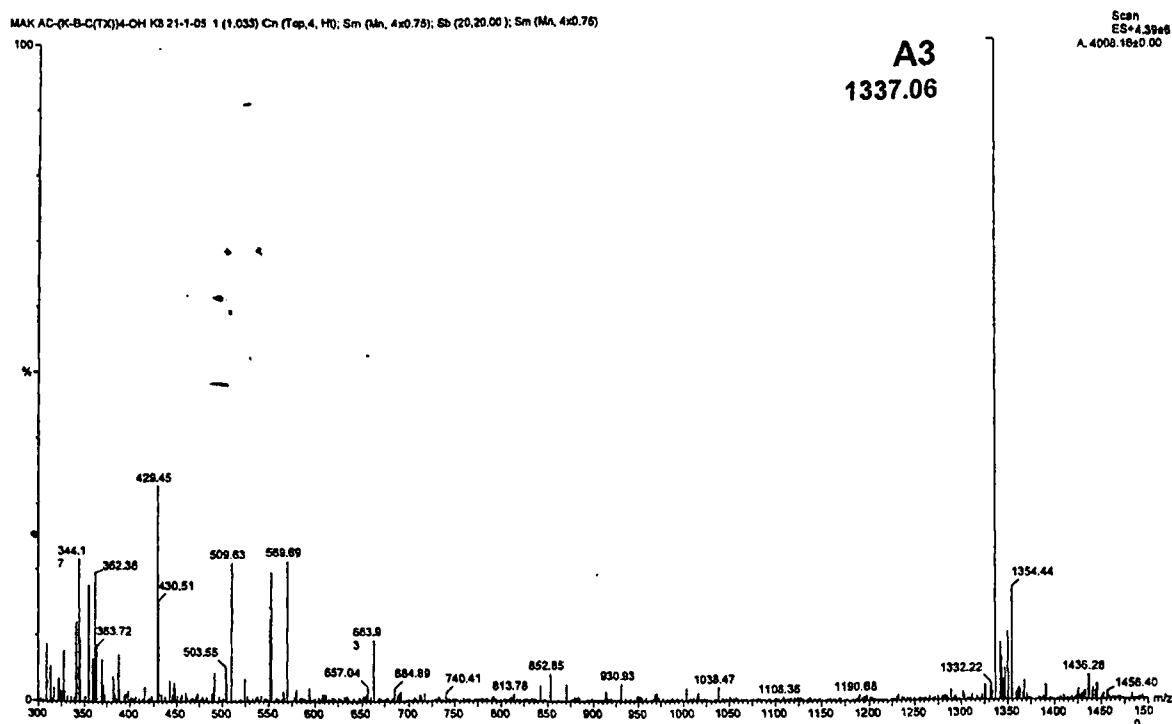
13.6. Σύνθεση παραγώγου Ac-[Lys-Aib-Cys(CH₂-CO- C2'taxol)]₄-OH



M.B.: 4901,44

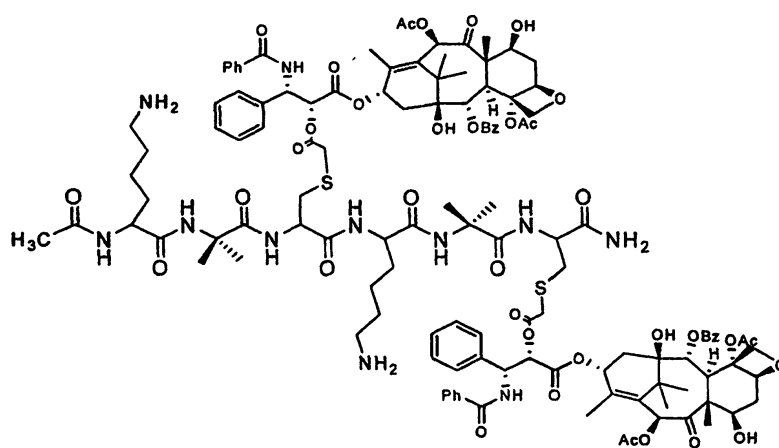
Σε 3,3 μmol (3,1mg) χλωροακέτυλο-C2'-ταξόλης διαλυμένης σε DMF υπό ατμόσφαιρα Ar, προστέθηκαν 0, 56 μmol (2,9 mg) πεπτιδίου Ac-(Lys-Aib-Cys)₄-OH·4TFA σε μικρές ποσότητες και 0,011 mmol (1,34 mg) DMAP και αφέθηκε να αντιδράσει για 32 ώρες. Η αντίδραση παρακολουθήθηκε με ESI-MS. Στη συνέχεια προστέθηκαν 4ml μίγματος H₂O/0,1% TFA / CH₃CN/0,1% 1/1 v/v και το μίγμα, χωρίς άλλη επεξεργασία, ενέθηκε σε HPLC. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1%, με βαθμίδωση (gradient) από 90% A σε 5%.

Μετά την συλλογή και την ταυτοποίηση όλων των κλασμάτων με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS δεν διαπιστώθηκε η ύπαρξη του επιθυμητού παραγώγου, παρά μόνο του προϊόντος που αντιστοιχεί σε φορέα με προσδεμένα ομοιοπολικά τρία μόρια ταξόλης (σχήμα 13.11).



13.11: ESI-MS φάσμα μάζας του φορέα $Ac-(Lys-Aib-Cys)_4-OH$ στο οποίο έχουν προσδεθεί 3 μόρια ταξόλης. Φαίνεται το μοριακό ιόν $[M+3H]^{3+}/3$. Υπολογισθέν $M.B=4007,51$. Ευρεθέν $M.B=4008,18$.

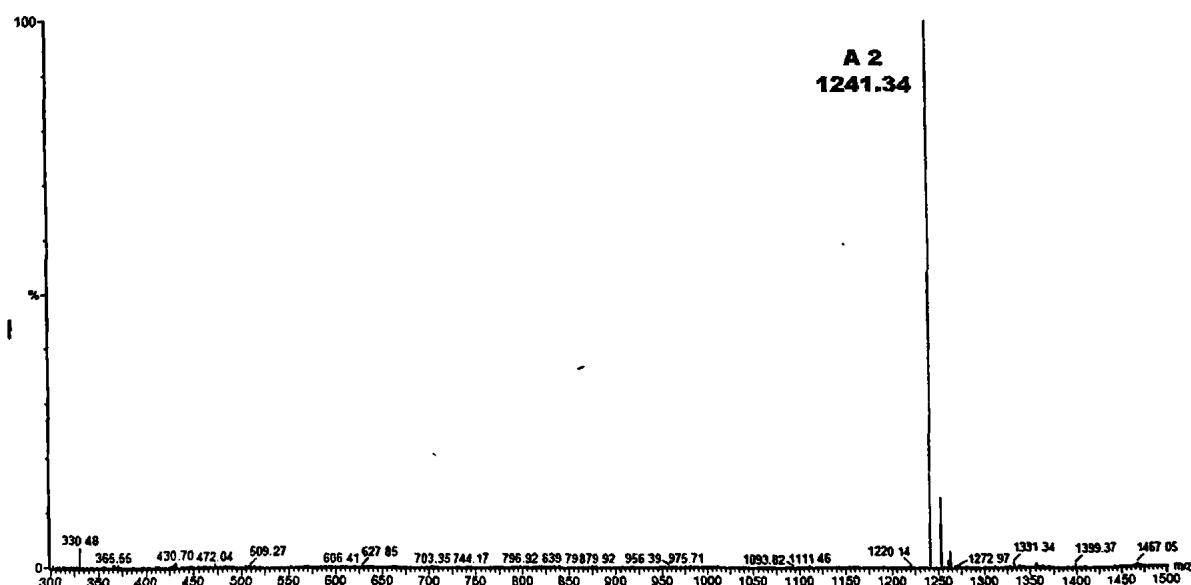
13.7. Σύνθεση του παραγώγου $Ac-[Lys-Aib-Cys(CH_2CO-C2'taxol)]_2-NH_2$



M.B.: 2479.76

Σε 1,5 ml μίγματος CH_3CN/H_2O , (2/1, v/v), διαλύθηκαν 0,0121 mmol (11,3 mg) χλωροακέτυλο-C2'-ταξόλης στους $0^\circ C$ και σε ατμόσφαιρα N_2 . Στο μίγμα προστέθηκαν 0,023

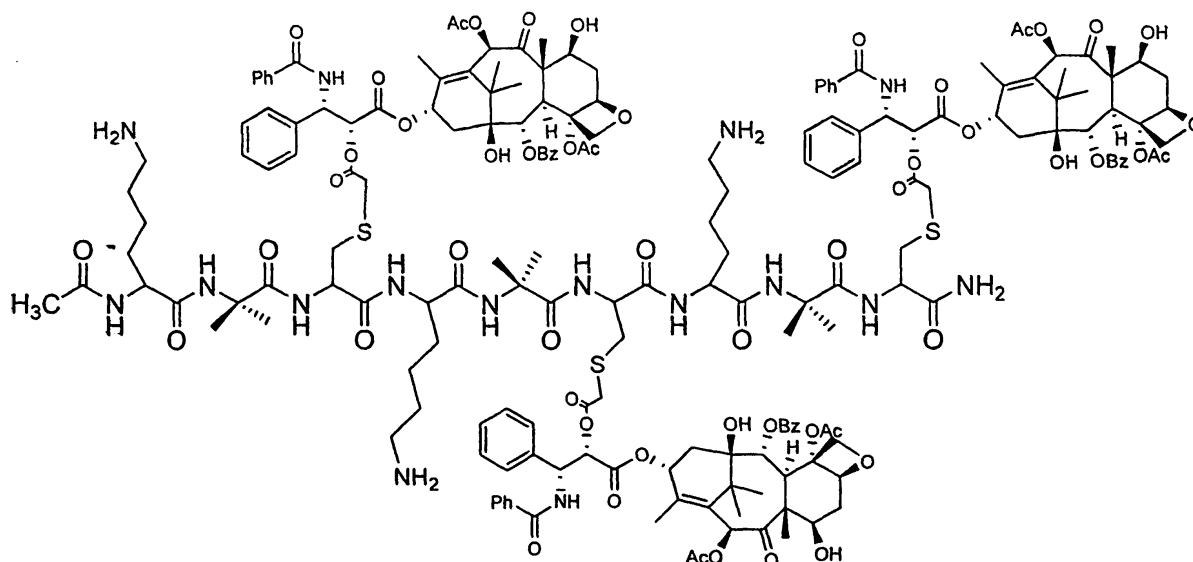
mmol (4 μ l) DIEA και σταδιακά σε μορφή στερεού 0,0041 mmol (3,8 mg) πεπτιδίου Ac-(Lys-Aib-Cys)₂-NH₂·2TFA. Το pH της αντίδρασης διατηρήθηκε σταθερό στη τιμή ~7 με προσθήκη DIEA. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με ESI-MS. Στη συνέχεια προστέθηκαν 4ml μίγματος H₂O/0,1% TFA / CH₃CN/0,1% (1/1, v/v) και το μίγμα, χωρίς άλλη επεξεργασία, ενέθηκε σε HPLC. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1%, με βαθμίδωση (gradient) από 70% A σε 30%. για 40 λεπτά. Το επιθυμητό προϊόν απομονώθηκε σε συνολική (όλων των σταδίων) απόδοση 40% και ταυτοποιήθηκε με ESI-MS (σχήμα 13.12).



Σχήμα13.12: ESI-MS φάσμα μάζας του παραγώγου Ac-[Lys-Aib-Cys(CH₂-CO- C2'taxol)]₂-NH₂ στο οποίο φαίνεται το μοριακό ιόν $[M+2H]^{2+}/2$. Υπολογισθέν M.B.=2479,76. Ευρεθέν M.B.=2480,6.



13.8. Σύνθεση του παραγώγου Ac-[Lys-Aib-Cys(CH₂CO-C2'taxol)]₃-NH₂

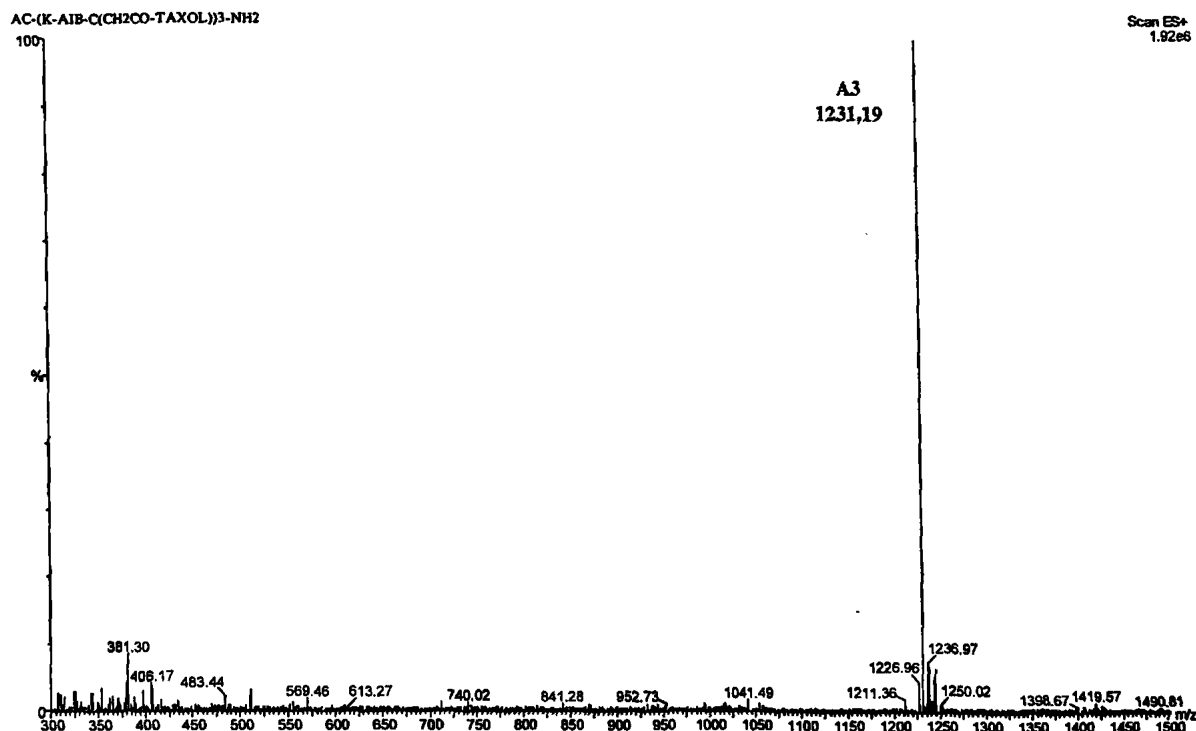


M.B.:3690,11

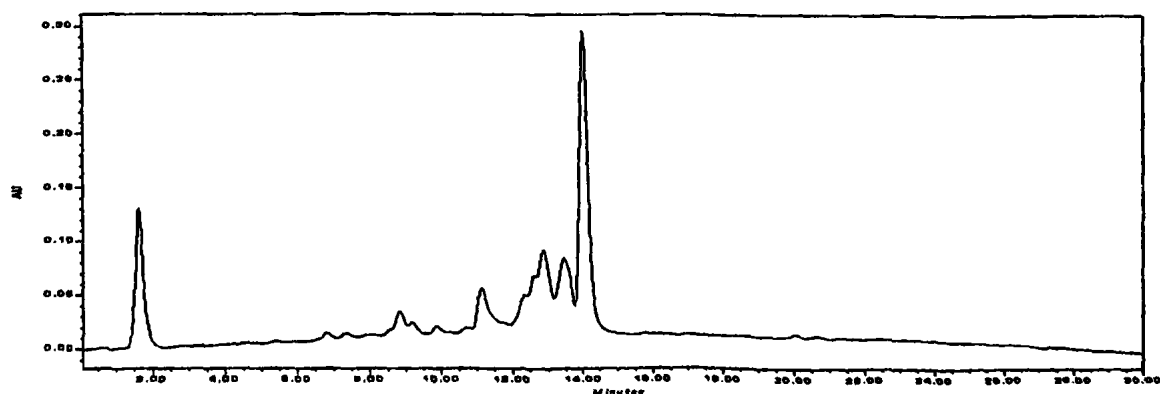
Σε 1,5 ml μίγματος CH₃CN/ H₂O, 2/1, v/v /, διαλύθηκαν 0,0118 mmol (11,5 mg) βρωμοακέτυλο-C2'-ταξόλης στους 0°C και σε ατμόσφαιρα N₂. Στο μίγμα προστέθηκαν 0,0234 mmol (4 μl) DIEA και σταδιακά, σε μορφή στερεού 0,0033 mmol (4,5 mg) πεπτιδίου Ac-(Lys-Aib-Cys)₃-NH₂·3TFA. Το pH της αντίδρασης διατηρήθηκε σταθερό στη τιμή ~7 με προσθήκη DIEA. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με ESI-MS. Στη συνέχεια προστέθηκαν 4ml μίγματος H₂O/0,1% TFA / CH₃CN/0,1% (1/1, v/v) και το μίγμα, χωρίς άλλη επεξεργασία, ενέθηκε σε HPLC. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1%, με βαθμίδωση (gradient) από 90% A σε 5% για 40 λεπτά. Το επιθυμητό προϊόν απομονώθηκε σε συνολική (όλων των σταδίων) απόδοση 32% και ταυτοποιήθηκε με ESI-MS (σχήμα 13.13). Για την αναλυτική HPLC του πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω πρόγραμμα βαθμίδωσης (gradient) και σύστημα διαλυτών:

Χρόνος (min)	H ₂ O/0,1% TFA	CH ₃ CN/0,1% TFA	Ροή (ml/min)
0	60	40	1
30	5	95	1

Για το σκοπό αυτό 0,53 mg προϊόντος διαλύθηκαν σε 150 μ l CH_3CN (+0,1% TFA) και 200 μ l H_2O (+0,1% TFA). Το χρωματογράφημα αναλυτικής HPLC δίνεται στο σχήμα 13.14.

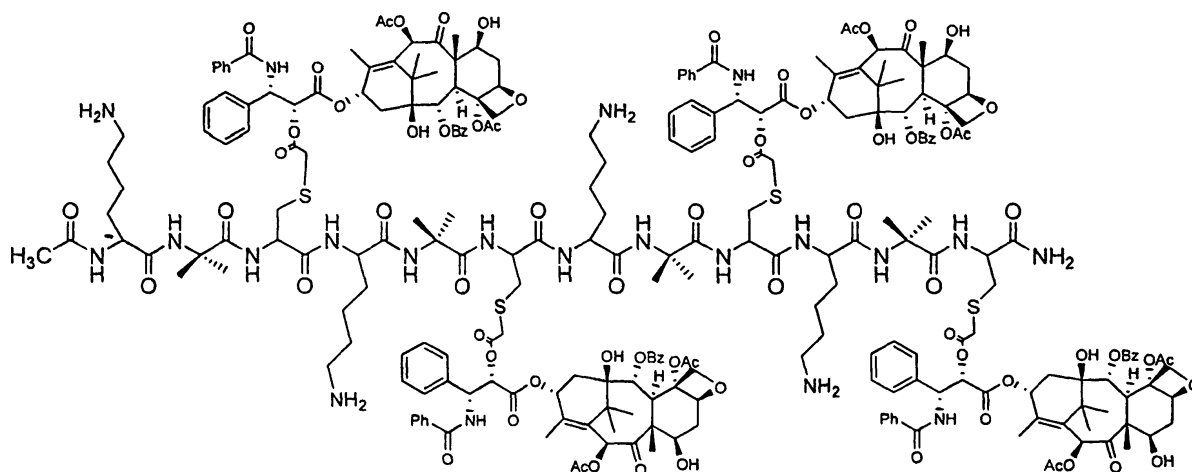


Σχήμα 13.13 : ESI-MS φάσμα μάζας του παραγώγου $\text{Ac-[Lys-Aib-Cys(CH}_2\text{-CO- C2' taxol)]}_3\text{-NH}_2$ στο οποίο φαίνεται το μοριακό ιόν $[M+3H]^{3+}/3$. Υπολογισθέν $M.B.=3690,11$. Ευρεθέν $M.B.=3690,57$.



Σχήμα 13.14: Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του $\text{Ac-[Lys-Aib-Cys(CH}_2\text{-CO- C2' taxol)]}_3\text{-NH}_2$. Ανίχνευση στα 214nm.

13.9. Σύνθεση του παραγώγου Ac-[Lys-Aib-Cys(CH₂CO-C2'taxol)]₄-NH₂



M.B.:4900,45

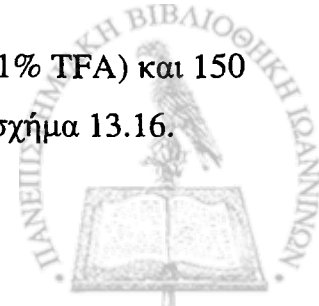
Σε 1,5 ml μίγματος CH₃CN/ H₂O (2/1, v/v), διαλύθηκαν 0,015 mmol (14,6 mg) βρωμοακέτυλο-C2'-ταξόλης στους 0°C και σε ατμόσφαιρα N₂. Στο μίγμα προστέθηκαν 0,029 mmol (5 μl) DIEA για βασικές συνθήκες και σταδιακά σε μορφή στερεού 0,0025 mmol (4,4 mg) πεπτιδίου Ac-(Lys-Aib-Cys)₄-NH₂·4TFA. Το pH της αντίδρασης διατηρήθηκε σταθερό στη τιμή ~7 με προσθήκη DIEA. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με ESI-MS, διακόπηκε. Στη συνέχεια προστέθηκαν 4ml μίγματος H₂O/0,1% TFA / CH₃CN/0,1% 1/1 v/v και το μίγμα, χωρίς άλλη επεξεργασία, ενέθηκε σε HPLC. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το

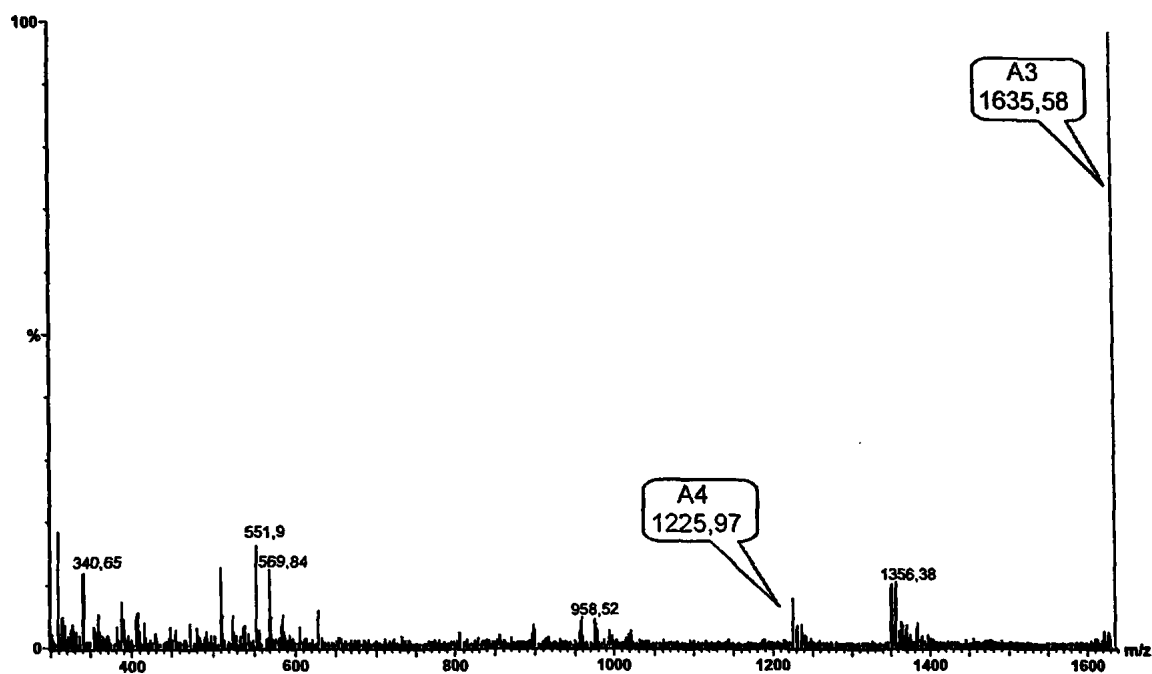
A: 70% H₂O·0,1%TFA /30% CH₃CN ·0,1%TFA

B: 5% H₂O·0,1%TFA /95% CH₃CN ·0,1%TFA, από 100% A σε 0% για 40 λεπτά. Το επιθυμητό προϊόν απομονώθηκε σε συνολική (όλων των σταδίων) απόδοση **27%** και ταυτοποιήθηκε με ESI-MS (σχήμα 13.15). Για την αναλυτική HPLC του πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω πρόγραμμα βαθμίδωσης (gradient) και σύστημα διαλυτών:

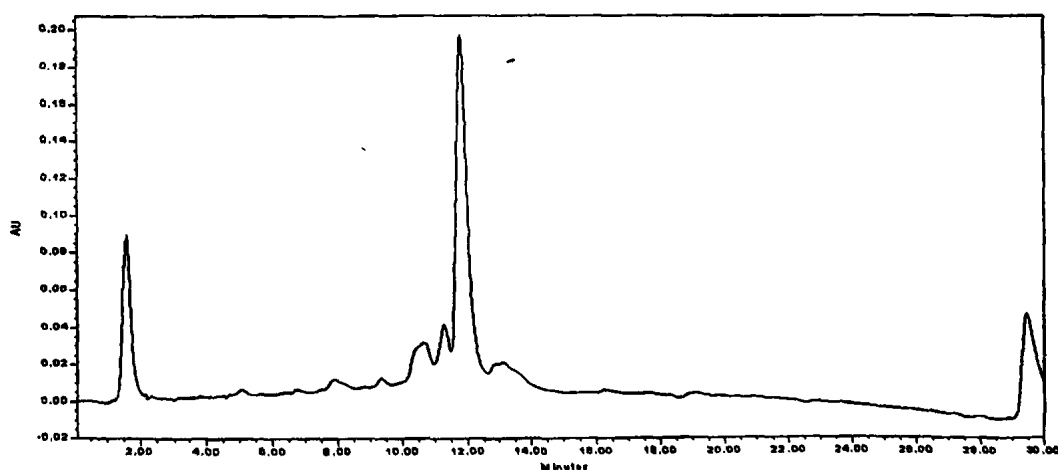
Χρόνος (min)	H ₂ O/0,1% TFA)	CH ₃ CN/0,1% TFA	Ροή (ml/min)
0	50	50	1
30	5	95	1

Γι αυτό το σκοπό 0,42 mg προϊόντος διαλύθηκαν σε 150 μl CH₃CN (+0,1% TFA) και 150 μl H₂O (+0,1% TFA). Το χρωματογράφημα αναλυτικής HPLC δίνεται στο σχήμα 13.16.



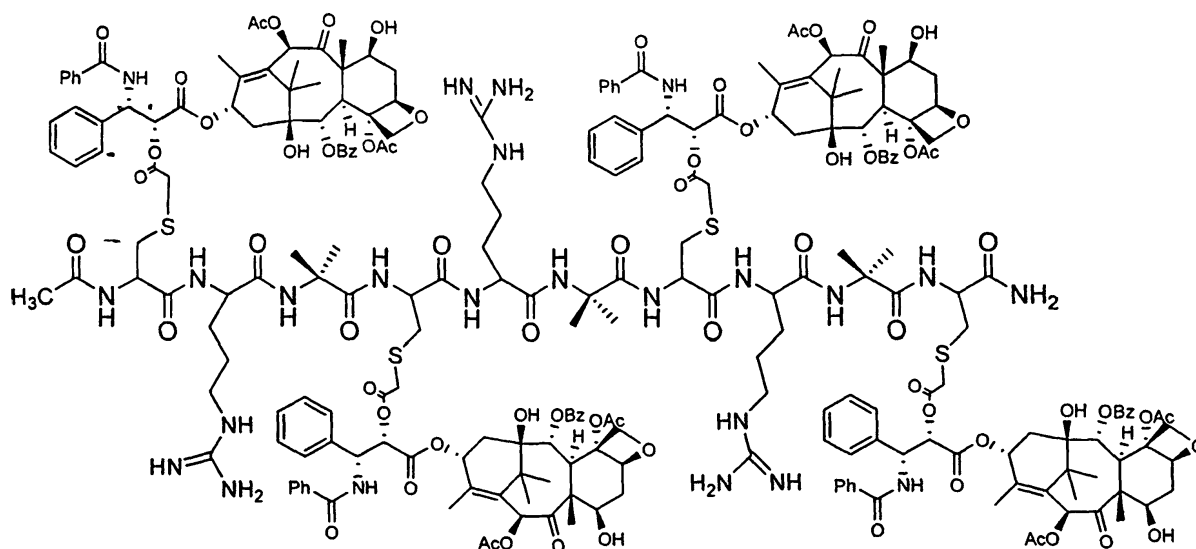


Σχήμα 13.15: ESI-MS φάσμα μάζας του παραγώγου $\text{Ac-[Lys-Aib-Cys(CH}_2\text{-CO-C2'taxol)]}_4\text{-NH}_2$. Υπολογισθέν $M.B.=4900,45$. Ενρεθέν $M.B.=4901,5$.



Σχήμα 13.16: Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του $\text{Ac-[Lys-Aib-Cys(CH}_2\text{-CO-C2'taxol)]}_4\text{-NH}_2$. Ανίχνευση στα 214nm.

13.10. Σύνθεση του παραγώγου



M.B.:4771,22

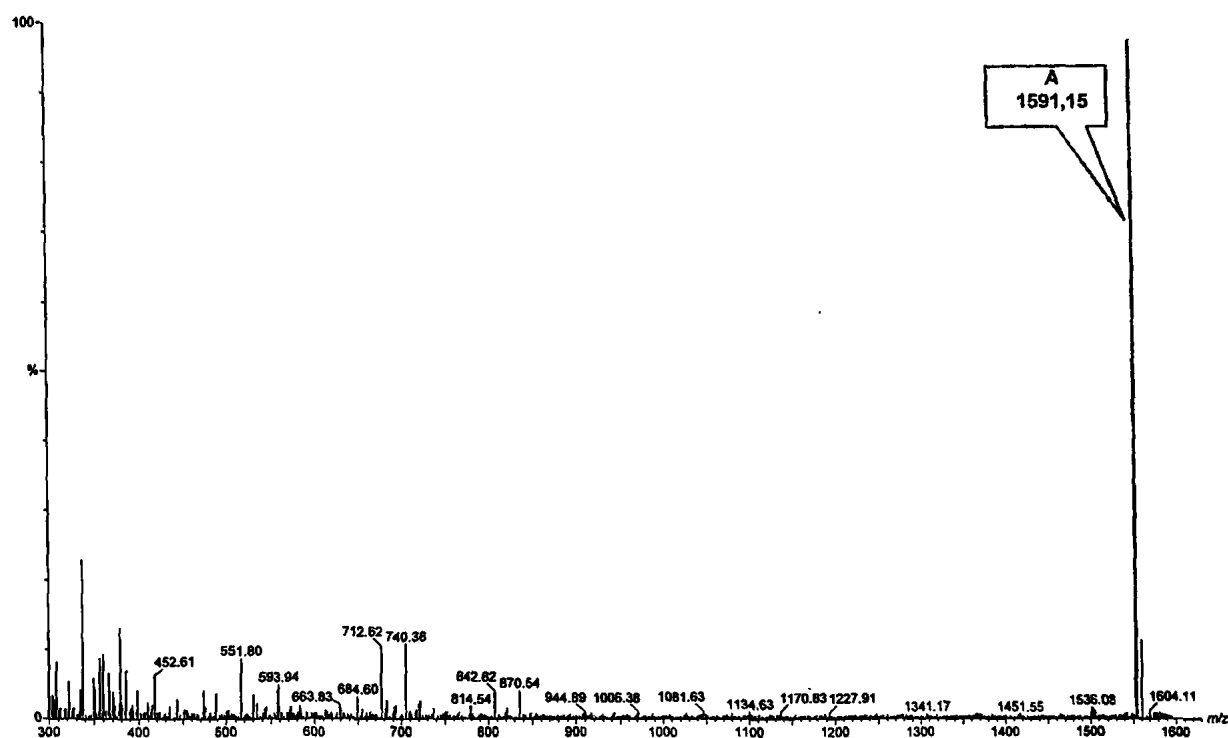
Σε 1,2 ml μίγματος CH₃CN/ H₂O, (3/1, v/v), διαλύθηκαν 0,0039 mmol (4 mg) ιωδοακέτυλο-C2'-ταξόλης στους -8°C και σε ατμόσφαιρα Ar. Στο μίγμα προστέθηκαν 0,004mmol (0,7μl) mmol DIEA για βασικές συνθήκες και σταδιακά, σε μορφή στερεού, 0,9 mmol (1,1 mg) πεπτιδίου Ac-Cys-(Arg-Aib-Cys)₃-NH₂. Το pH της αντίδρασης διατηρήθηκε σταθερό στη τιμή ~7 με προσθήκη DIEA. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με ESI-MS. Στη συνέχεια προστέθηκαν 4ml μίγματος H₂O/0,1% TFA / CH₃CN/0,1% 1/1 v/v και το μίγμα, χωρίς άλλη επεξεργασία, ενέθηκε σε HPLC. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το:

A: 70% H₂O·0,1%TFA /30% CH₃CN ·0,1%TFA

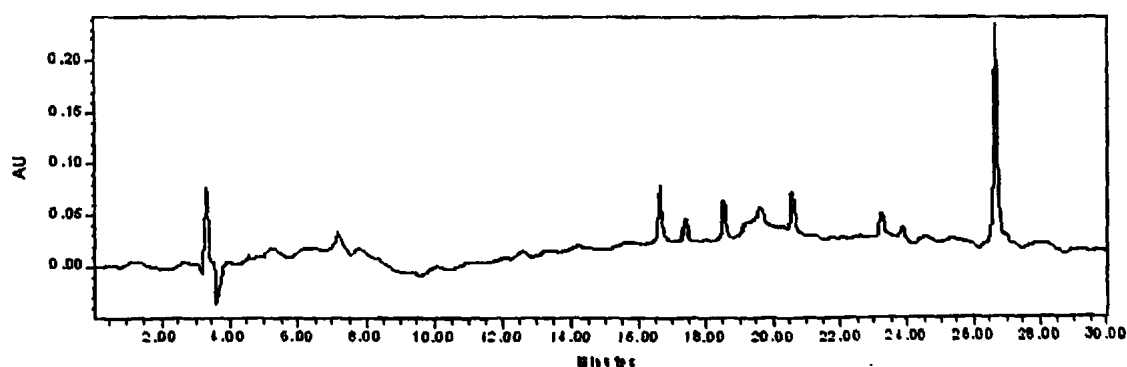
B: 5% H₂O·0,1%TFA /95% CH₃CN ·0,1%TFA, με βαθμίδωση από 80% A σε 10% για 40 λεπτά. Το επιθυμητό προϊόν απομονώθηκε σε συνολική (όλων των σταδίων) απόδοση **23%** και ταυτοποιήθηκε με ESI-MS (σχήμα 13.17). Για την αναλυτική HPLC του πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω πρόγραμμα βαθμίδωσης (gradient) και σύστημα διαλυτών:

Χρόνος (min)	H ₂ O/0,1% TFA	CH ₃ CN/0,1% TFA	Ροή (ml/min)
0	80	20	1
30	10	90	1

Γι αυτό το σκοπό 0,2 mg προϊόντος διαλύθηκαν σε 150 μl CH_3CN (+0,1% TFA) και 150 μl H_2O (+0,1% TFA). Το χρωματογράφημα αναλυτικής HPLC δίνεται στο σχήμα 13.18



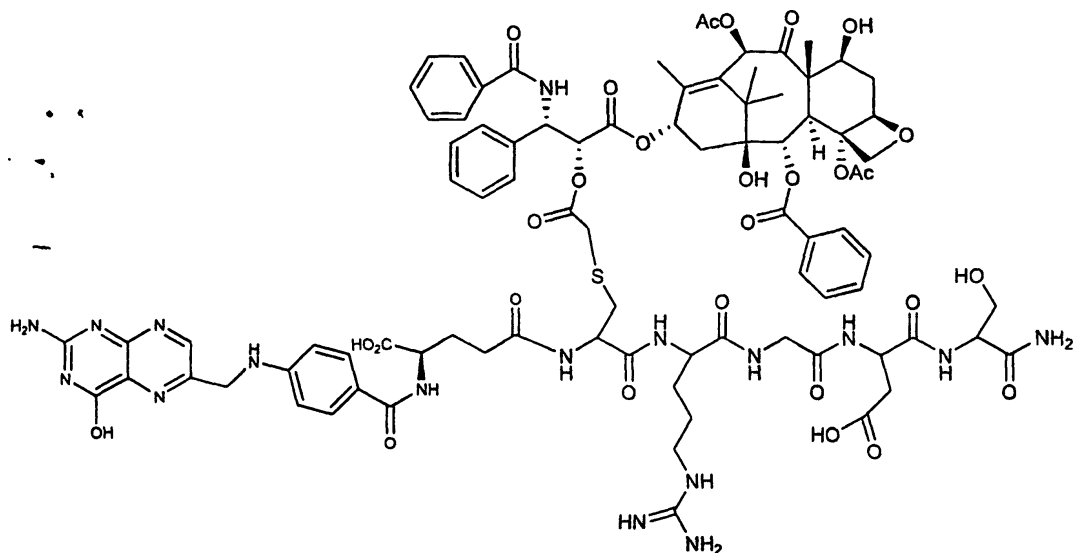
Σχήμα 13.17: ESI-MS φάσμα μάζας του παραγώγου *Ac-Cys(CH₂CO-C2'taxol)- [Arg-Aib-Cys(CH₂CO-C2'taxol)]₃-NH₂*. Υπολογισθέν Μ.Β.=4771,22. Ευρεθέν Μ.Β.=4770,45.



Σχήμα 13.18: Χρωματογράφημα αναλυτικής RP-HPLC του *Ac-Cys(CH₂CO-C2'taxol)- [Arg-Aib-Cys(CH₂CO-C2taxol)]₃-NH₂*. Ανίχνευση στα 214nm.

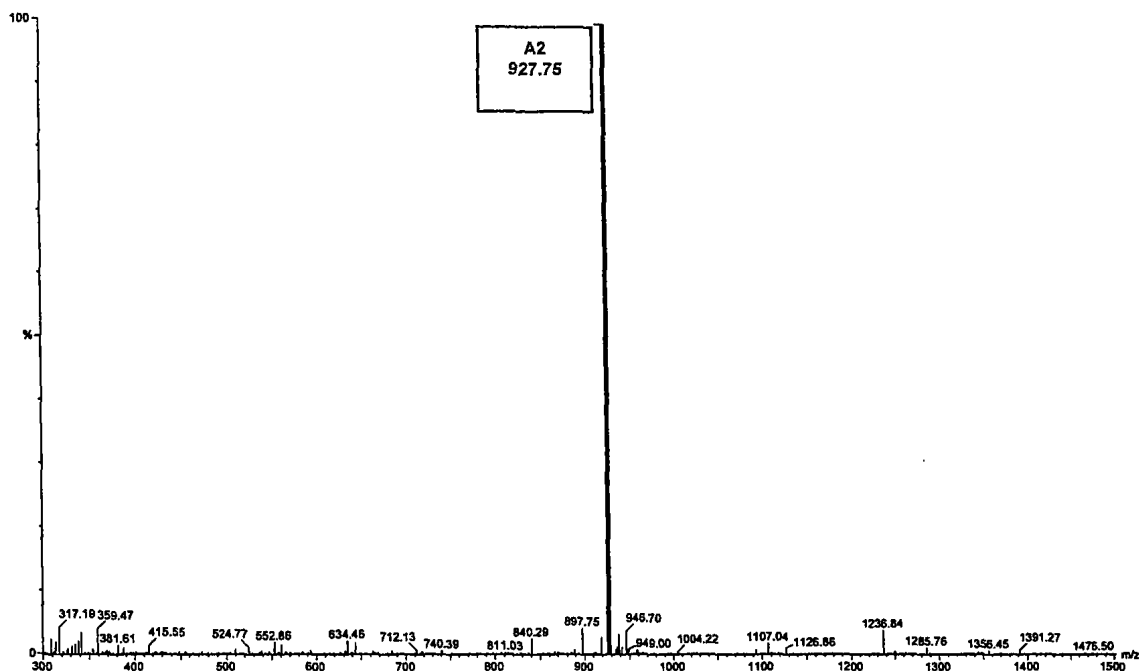
13.11. Σύνθεση του παραγώγου

Folyl-Cys(CH₂CO-C2'taxol)-Arg-Gly-Asp-Ser-NH₂



M.B.: 1852,88

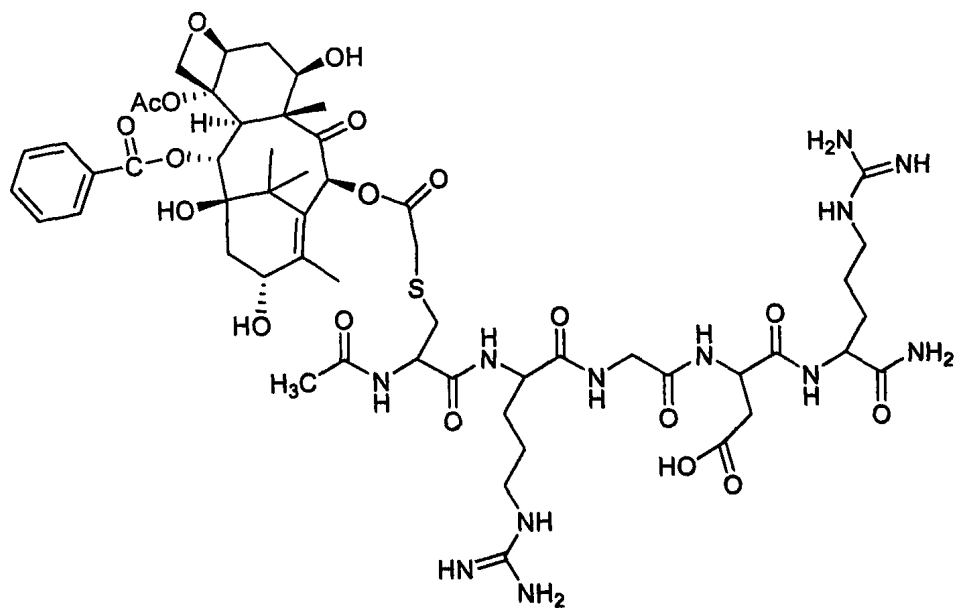
Σε 1,4 ml μίγματος CH₃CN/ H₂O/DMF, (2/1/1, v/v/v), διαλύθηκαν 0,0031 mmol (3 mg) βρώμοακτύλο-C2'-ταξόλης στους 0°C και σε ατμόσφαιρα N₂. Στο μίγμα προστέθηκαν 0,003 mmol (0,53 μl) DIEA για βασικές συνθήκες και σταδιακά, σε μορφή στερεού, 0,0028 mmol (3,0 mg) πεπτιδίου Folyl-Cys-Arg-Gly-Asp-Ser-NH₂·TFA. Το pH της αντίδρασης διατηρήθηκε σταθερό στη τιμή ~7 με προσθήκη DIEA. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με ESI-MS Στη συνέχεια προστέθηκαν 4ml μίγματος H₂O/0,1% TFA / CH₃CN/0,1% 1/1 v/v και το μίγμα, χωρίς άλλη επεξεργασία, ενέθηκε σε HPLC. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (A) H₂O/0,1% TFA, (B) CH₃CN/0,1%, με βαθμίδωση (gradient) από 80% A σε 5% για 40 λεπτά. Το επιθυμητό προϊόν απομονώθηκε σε συνολική (όλων των σταδίων) απόδοση **12%** και ταυτοποιήθηκε με ESI-MS (σχήμα 13.19).



Σχήμα 13.19: ESI-MS φάσμα μάζας του παραγώγου *Folyl-Cys(CH₂CO-C2' taxol)-Arg-Gly-Asp-Ser-NH₂*. Υπολογισθέν *M.B.* = 1852,88. Ευρεθέν *M.B.* = 1853,5.

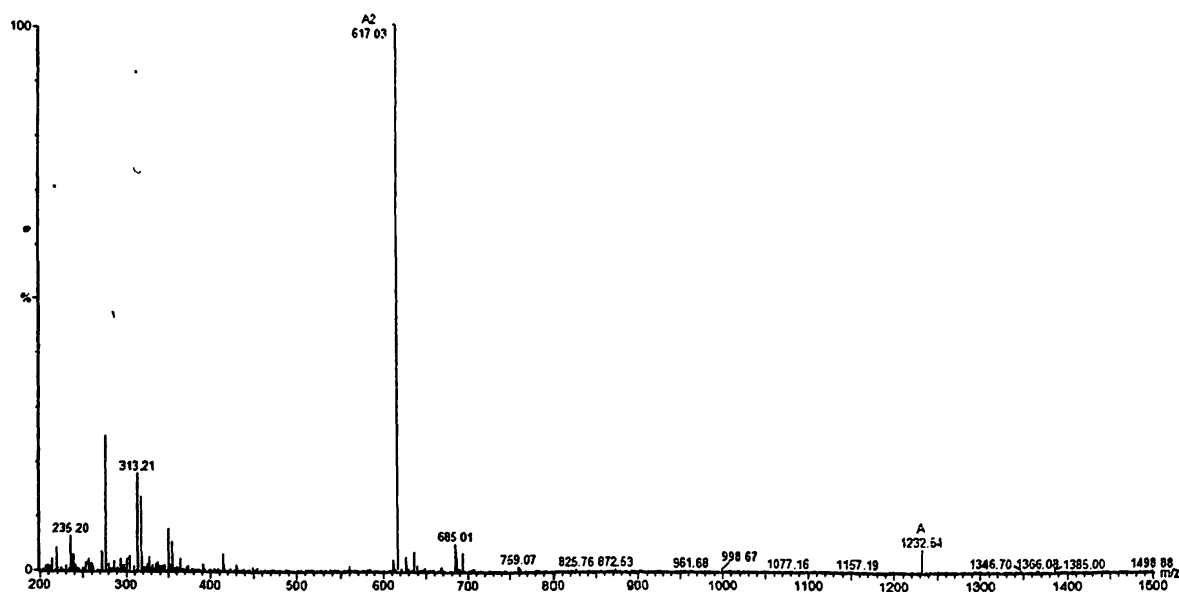
13.12. Σύνθεση του παραγώγου

Ac-Cys(CH₂CO-C10-baccatin)-Arg-Gly-Asp-Arg-NH₂



M.B.:1231,33

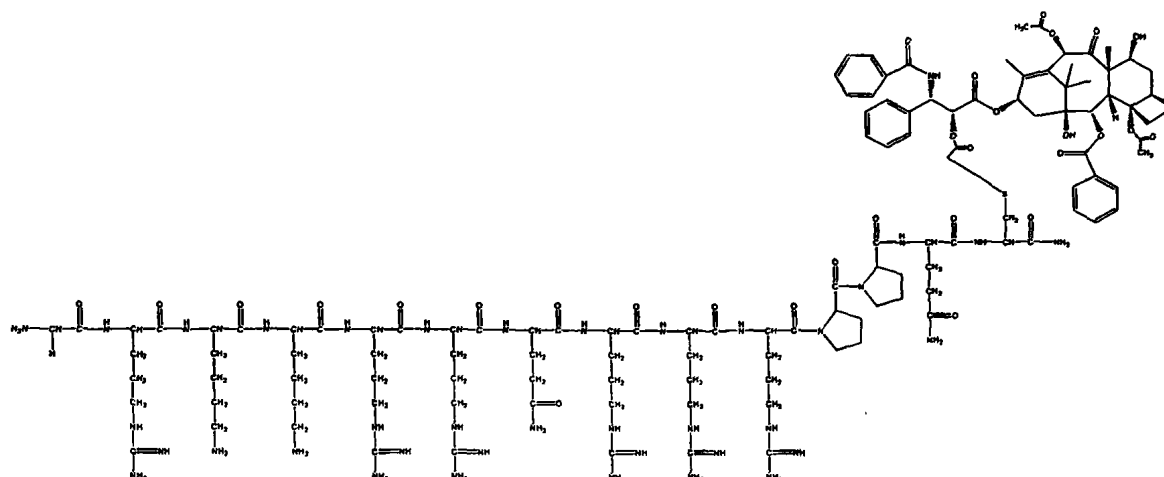
Σε 0,8 ml μίγματος $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$, (2/1/1, v/v/v), διαλύθηκαν 0,0016 mmol (1 mg) της 10-χλωροακέτυλο-μπακατίνης σε ατμόσφαιρα Ar . Στο μίγμα προστέθηκαν 0,015 mmol (0,53 μl) DIEA για βασικές συνθήκες και σταδιακά, σε μορφή στερεού, 0,0013 mmol (0,8 mg) πεπτιδίου $\text{Ac-Cys-Arg-Gly-Asp-Arg-NH}_2 \cdot 2\text{TFA}$. Το pH της αντίδρασης διατηρήθηκε σταθερό στη τιμή ~7 με προσθήκη DIEA. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με ESI-MS. Στη συνέχεια προστέθηκαν 4ml μίγματος $\text{H}_2\text{O}/0,1\% \text{TFA} / \text{CH}_3\text{CN}/0,1\% 1/1$ v/v και το μίγμα, χωρίς άλλη επεξεργασία, ενέθηκε σε HPLC. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (A) $\text{H}_2\text{O}/0,1\% \text{TFA}$, (B) $\text{CH}_3\text{CN}/0,1\%$, με βαθμίδωση (gradient) από 95% A σε 20% για 30 λεπτά. Το επιθυμητό προϊόν απομονώθηκε σε συνολική (όλων των σταδίων) απόδοση 18% και ταυτοποιήθηκε με ESI-MS (σχήμα 13.20).



Σχήμα 13.20: ESI-MS φάσμα μάζας του παραγώγου $\text{Ac-Cys}(\text{CH}_2\text{CO-C10-baccatin})\text{-Arg-Gly-Asp-Arg-NH}_2$. Υπολογισθέν $M.B. = 1231,3$. Ευρεθέν $M.B. = 1231,54$.



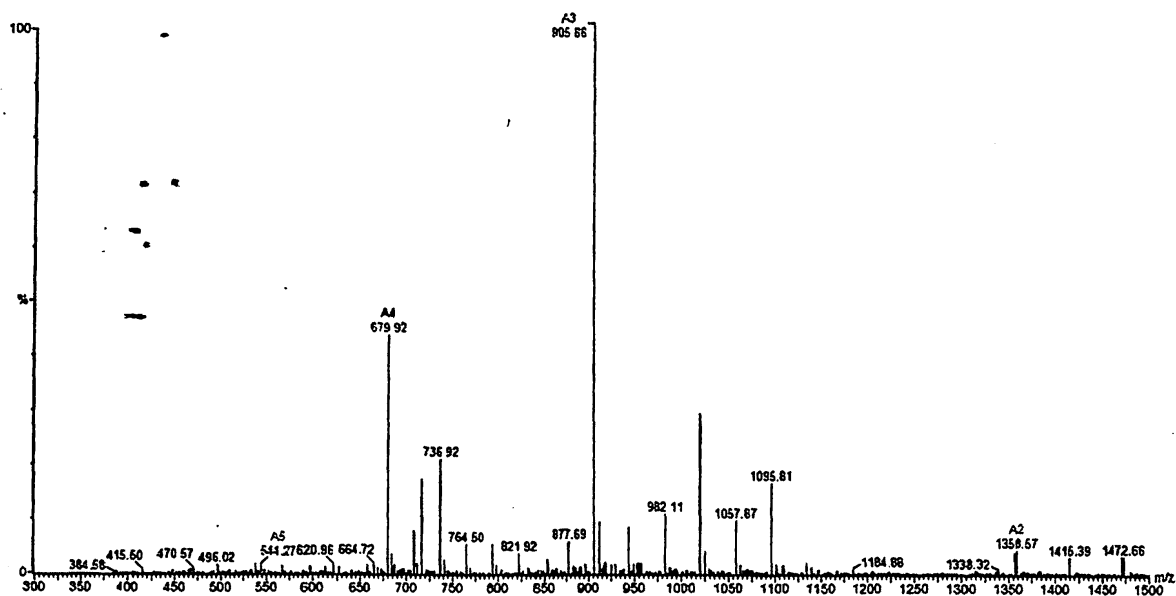
13.13. Σύνθεση του παραγώγου Tat-Cys(CH₂CO-C2'taxol)-NH₂*



M.B.=2715,1

Σε 0,6 ml μίγματος CH₃CN/ H₂O, 2/1, v/v, διαλύθηκαν 0,0037 mmol (3,6 mg) βρωμοακέτυλο-C2'-ταξόλης σε ατμόσφαιρα N₂. Στο μίγμα προστέθηκαν 0,0056 mmol (0,95 μl) DIEA για βασικές συνθήκες και σταδιακά, σε μορφή στερεού, 0,0036 mmol (6,7 mg) πεπτιδίου Tat-Cys-NH₂. Το pH της αντίδρασης διατηρήθηκε σταθερό στη τιμή 7 με προσθήκη DIEA. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με ESI-MS. Στη συνέχεια προστέθηκαν 4,5 ml μίγματος H₂O/0,1% TFA / CH₃CN/0,1% 1/1 v/v και το μίγμα, χωρίς άλλη επεξεργασία, ενέθηκε σε HPLC. Ως σύστημα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το (Α) H₂O/0,1% TFA, (Β) CH₃CN/0,1%, με βαθμίδωση (gradient) από 98% Α σε 30% για 40 λεπτά. Το επιθυμητό προϊόν απομονώθηκε σε συνολική (όλων των σταδίων) απόδοση **19%** και ταυτοποιήθηκε με ESI-MS (σχήμα 13.21).

**Η ποσότητα του Tat-Cys -NH₂ πεπτιδίου μου χορηγήθηκε από τον συνάδελφο Παναγιώτη Σταθόπουλο.*



Σχήμα 13.21: ESI-MS φάσμα μάζας του παραγώγου *Tat-Cys(CH₂CO-C2' taxol) -NH₂*. Υπολογισθέν M.B.=2715,1. Ευρεθέν M.B.=2714,62.

14. ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ

Τα βιολογικά πειράματα έγιναν στο τμήμα Επιστημών Υγείας, στην Ιατρική σχολή του Παναπιστημίου της Κρήτης, από την συνάδελφο Τόνια Ακουμιανάκη, υπό την επίβλεψη του επίκουρου καθηγητή κ. Παναγιώτη Θεοδωρόπουλο.

Ο έλεγχος της βιολογικής δραστηριότητας της ταξόλης και των συνθετικών πεπτιδικών παραγώγων, περιλαμβάνει την εκτίμηση της αναστολής της κυτταρικής διαίρεσης, τη μελέτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, καθώς και την ανίχνευση μορφολογικών αλλοιώσεων στο δίκτυο των μικροσωληνίσκων.

14.1. Κυτταρικές σειρές

Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές HeLa (ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα τραχήλου), DU (ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη) και MCF-7 (ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού), προμηθευμένα από την American Type Tissue Culture Collection (Manassas, VA). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πλαστικά τρυβλία στους 37 °C και σε ατμόσφαιρα 5% CO₂. Τα HeLa και DU αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό Dulbecco's MEM, ενώ τα MCF-7 καλλιεργήθηκαν σε Dulbecco's MEM-Ham's F-12 με την προσθήκη 10 μg/ml ινσουλίνης. Όλα τα μέσα αγοράστηκαν από την Biochrom (Berlin, Germany) και συμπληρώθηκαν με 10% FBS (fetal bovine serum), πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη.

14.2. Κατεργασία κυττάρων

Για να προσεγγιστεί ένα ποσοστό της τάξεως του 50-60%, τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν είτε σε πλαστικά τρυβλία είτε σε καλυπτρίδες, επωάστηκαν με ταξόλη ή τα πεπτιδικά παράγωγα αυτής που διαλύθηκαν σε θρεπτικό υλικό σε διάφορες συγκεντρώσεις, στους 37 °C για 24 ώρες. Κατόπιν, τα φάρμακα απομακρύνθηκαν και τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν έως και 72 ώρες απουσία φαρμάκων.



14.3. Αποτίμηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό σε τρυβλία καλλιέργειας 24 οπών (24 well plates) και μετά από ποικίλες μορφές κατεργασίας, η ανάπτυξη των κυττάρων χρωματίστηκε με την προσθήκη διαλύματος MTT (0.5mg/ml σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS). Το MTT προσλαμβάνεται από τα ζωντανά κύτταρα και δημιουργεί ενδοκυττάριας κρυσταλλικές δομές κυανού χρώματος. Το ποσοστό ζωντανών κυττάρων προκύπτει από την μέτρηση της απορρόφησης του έγχρωμου διαλύματος, συγκρινόμενο με καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν κάτω από τις ίδιες ακριβώς συνθήκες χωρίς την επίδραση φαρμάκων. Όλα τα αποτελέσματα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού προέκυψαν από 8 μετρήσεις τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

14.4. Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου

Τα προσκολλημένα κύτταρα υποβλήθηκαν σε κατεργασία με θρυψίνη, εκπλύθηκαν με PBS και υπέστησαν κατεργασία προκειμένου να χρωματίσουν το DNA, χρησιμοποιώντας το DNA-Prep Coulter Reagent Kit (Beckman Coulter). Τα δείγματα υπεβλήθησαν σε FACS σε Coulter Epics Elite.

Η βιολογική δραστηριότητα των αναλόγων αρχικά αξιολογήθηκε σε σχέση με την ικανότητά τους να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων του τραχήλου, του μαστού και του προστάτη. Ίδιες συγκεντρώσεις ταξόλης και των πεπτιδικών παραγώγων που περιέχουν δύο, τρία ή τέσσερα μόρια αυτής Ac-[Lys-Aib-Cys(CH₂CO-2'-ταξόλη)]_n-NH₂ με n=2-4, προστέθηκαν σε καλλιέργειες κυττάρων για 24 ώρες. Τα φάρμακα στη συνέχεια απομακρύνθηκαν και τα κύτταρα επωάστηκαν για 72 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς την παρουσία των ουσιών. Το ποσοστό των βιώσιμων κυττάρων καθορίστηκε μετρώντας την απορρόφηση του MTT και η τιμή IC₅₀ που μετρήθηκε (η συγκέντρωση που αναστέλλει το 50% του πολλαπλασιασμού των κυττάρων) για το καθένα από τα παρουσιάζεται στο πίνακα 14.1.



Πίνακας 14.1: Οι τιμές IC_{50} της ταξόλης και των πεπτιδικών παραγώγων της, με γενικό τύπο $Ac-[Lys-Aib-Cys(CH_2CO-2'-taxol)]_n-NH_2$, με δύο (διμερές), τρία (τριμερές) και τέσσερα (τετραμερές) μόρια ταξόλης.

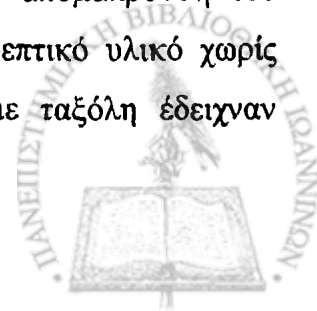
	Ταξόλη	Διμερές	Τριμερές	Τετραμερές
HeLa	1.29nM	1.31nM	1.70nM	0.96nM
DU	2.67nM	2.85nM	3.88nM	1.30nM
MCF-7	0.90nM	0.62nM	3.00nM	0.64nM

Όλα τα παράγωγα έδειξαν τιμές IC_{50} της τάξεως του nanomolar. Ωστόσο, το τετραμερές ανάλογο ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων περισσότερο αποτελεσματικά από οποιοδήποτε άλλο ανάλογο συμπεριλαμβανομένης και της ταξόλης. Θα πρέπει, επίσης, να σημειωθεί ότι η ανασταλτική δράση του τετραμερούς στα HeLa και στα DU κύτταρα υπήρξε στατιστικά υψηλότερη από αυτήν της ταξόλης, ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιήθηκε σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (σχήμα 14.1). Επιπλέον, τα DU κύτταρα υπήρξαν πιο ευαίσθητα στο τετραμερές σε σύγκριση με τα HeLa κύτταρα. Συγκεκριμένα, το τετραμερές ήταν πιο αποτελεσματικό από την ταξόλη όταν χρησιμοποιήθηκε σε DU κύτταρα, σε συγκεντρώσεις από 1 έως 10 nM, ενώ στα HeLa υπήρξε αποτελεσματικότερο μόνο σε 1 και 3 nM.

Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι στα καρκινικά κύτταρα το τετραμερές άσκησε ευρεία κυτταροτοξική επίδραση (μείωση του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων κάτω από τον αρχικό πληθυσμό) σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις (10 nM) από την ταξόλη (20 nM).

Προκειμένου να κατανοηθεί η αυξημένη ανασταλτική δράση του τετραμερούς, ερευνήθηκε η επίδρασή του, σε σύγκριση με την επίδραση της ταξόλης, όσον αφορά τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη G2/M φάση, τη μορφολογία του πυρήνα και την οργάνωση του πυρηνικού φακέλου στα HeLa και DU κύτταρα.

Ο πίνακας 14.2 δείχνει ότι το τετραμερές υπήρξε πιο αποτελεσματικό από την ταξόλη όσον αφορά την αναστολή των HeLa και DU κυττάρων, τα οποία είχαν υποστεί κατεργασία για 24 ώρες με 10 nM με το κάθε φάρμακο. Το σημαντικότερο όμως ήταν πως η ανασταλτική επίδραση συνεχίστηκε και στις δυο κυτταρικές σειρές και μετά την απομάκρυνση του τετραμερούς και επιπλέον επώαση των κυττάρων για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό χωρίς φάρμακο. Παρόμοια διαδικασία για τα κύτταρα που επωάστηκαν με ταξόλη έδειχναν

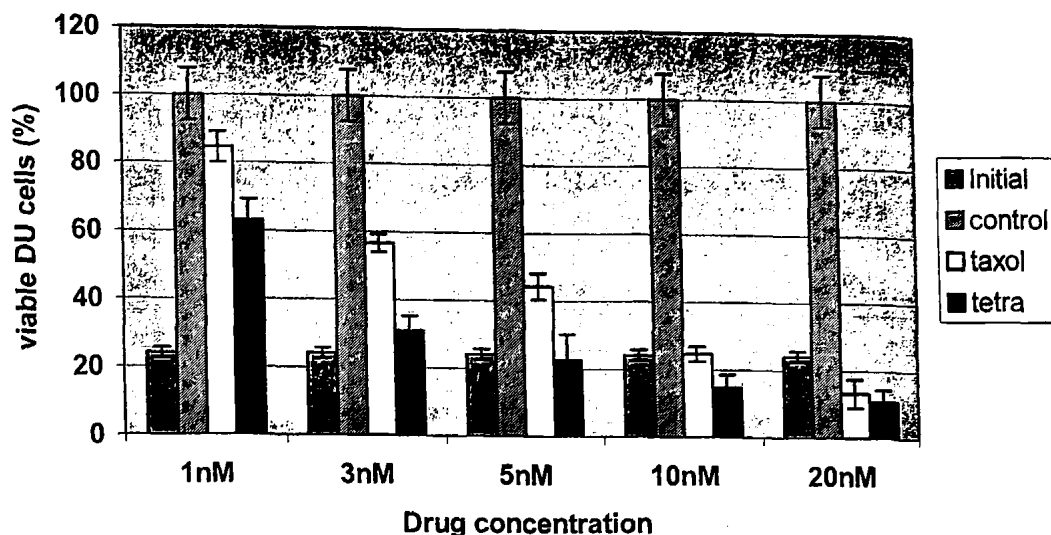


ποσοστά του G2/M πληθυσμού ίδια με αυτά που δεν υπέστησαν καμιά κατεργασία από οποιαδήποτε φάρμακο (control). Φαίνεται δηλαδή πως, ενώ μετά την απομάκρυνση της ταξόλης τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσονται ξανά, φτάνοντας τον αρχικό τους πληθυσμό μέσα σε 24 ώρες, δεν συμβαίνει το ίδιο και στην περίπτωση του τετραμερούς, το οποίο συνεχίζει την ανασταλτική του δράση για τουλάχιστον 24 ώρες, στην συγκεκριμένη συγκέντρωση.

Πίνακας 14.2. Το ποσοστό % των HeLa και DU κυττάρων στην G2/M φάση σε κύτταρα που δεν έχουν υποβληθεί σε καμιά κατεργασία (control) και σε κύτταρα που κατεργάστηκαν είτε με ταξόλη είτε με το τετραμερές Ac-[Lys-Aib-Cys(CH₂CO-2'-taxol)]₄-NH₂ για 24 ώρες και μετά την απομάκρυνσή τους, καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό για ακόμη 24 ώρες (24h+24h).

Παράγωγο/συγκέντρωση	Hela		DU	
	24h	24h+24h	24h	24h+24h
Ταξόλη/3nM	11	12	26	23
Ταξόλη/10nM	41	23	48	26
Τετραμερές/3nM	19	20	30	32
Τετραμερές/10nM	52	47	60	54
Control	20	19	26	24





Σχήμα 14.1: Η βιωσιμότητα HeLa και DU κυττάρων ύστερα από επώαση για 24 ώρες σε διάφορες συγκεντρώσεις paclitaxel (taxol) και του αναλόγου Ac-[Lys-Aib-Cys(CH₂CO-2'-taxol)]₄-NH₂, (tetra), απομάκρυνση των φαρμάκων και συνέχεια της καλλιέργειας σε θρεπτικό υλικό για 72 ώρες. Τα βιώσιμα κύτταρα καθορίστηκαν χρησιμοποιώντας MTT. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστά των βιώσιμων κυττάρων έναντι των μη επεξεργασμένων κυττάρων (control). Ο αρχικός πληθυσμός κυττάρων πριν από οποιαδήποτε επεξεργασία δείχνεται όπως "initial".



15. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

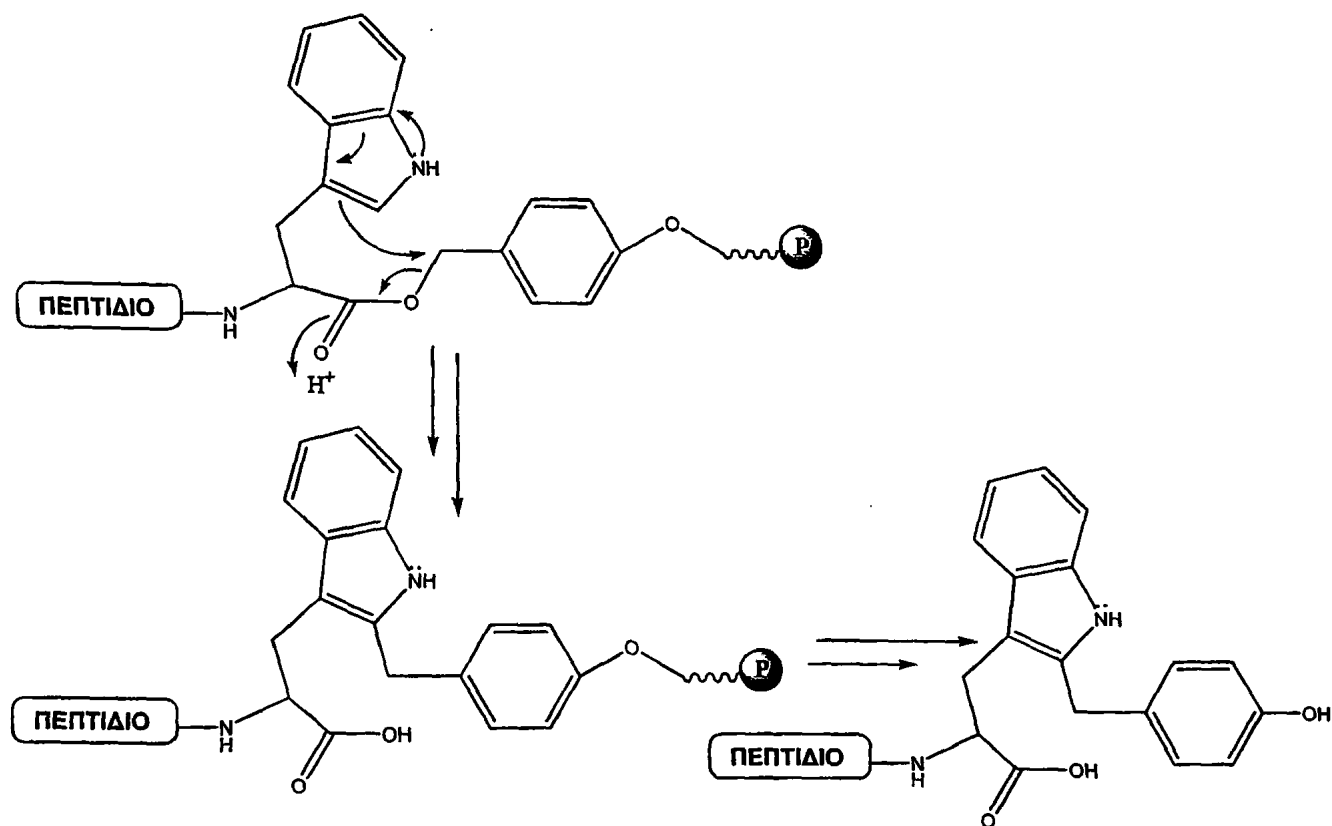
Στο πλαίσιο της εργασίας αυτής έγινε προσπάθεια ανάπτυξης παραγώγων της ταξόλης, τα οποία να διαθέτουν μεγαλύτερη υδατοδιαλυτότητα, διατηρώντας ή/και αυξάνοντας την αντικαρκινική της δράση. Η προσέγγιση που επιλέχθηκε ήταν η ομοιοπολική πρόσδεση υδατοδιαλυτών πεπτιδικών αναλόγων στη ταξόλη. Η θέση πρόσδεσης που επιλέχθηκε ήταν η C2' καθώς έχει αποδειχθεί ότι το υδροξύλιο στη θέση αυτή μπορεί να εστεροποιηθεί εκλεκτικά χωρίς να χάνονται οι κυτταροτοξικές ιδιότητες της ταξόλης.

Η επιλογή των πεπτιδικών αναλόγων έγινε με κριτήρια όπως υδατοδιαλυτότητα, στοχευμένη αναγνώριση από υποδοχείς που υπέρ-εκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα, δημιουργία συνθηκών τοπικά αυξημένης συγκέντρωσης ταξόλης και δυνατότητα καλύτερης διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης.

Κατά την σύνθεση των πεπτιδικών αναλόγων παρουσιάστηκαν προβλήματα, όπως ο σχηματισμός ασπαρτιμιδίου και η αλκυλίωση του C-τελικού αμιδικού αζώτου, στη περίπτωση χρήσης της Rink Amide ρητίνης. Με τη χρήση διαφόρων πεπτιδικών μοντέλων, που δεν αποτελούν αντικείμενο αυτής της διατριβής, μελετήθηκαν εκτεταμένα τα προβλήματα αυτά και ορισμένα αντιμετωπίστηκαν με επιτυχία στο εργαστήριό μας [235].

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι ένα σημαντικό ποσοστό πεπτιδίων της κυστεΐνης που συντέθηκε στη Wang ρητίνη εμφανίζεται με αυξημένο μοριακό βάρος κατά 106 Da. Η εμφάνιση παραπροϊόντων λόγω αποικοδόμησης της ρητίνης Wang κατά τη διαδικασία αποκοπής του πεπτιδίου έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα για τα πεπτίδια που εμπεριέχουν τρυπτοφάνη (σχήμα 15.1). Η μελέτη τέτοιων πεπτιδίων απέδειξε ότι το παραπροϊόν αυτό οφείλεται στην αλκυλίωση του ινδολικού δακτυλίου της [245]. Προσπάθειες για την αποφυγή ή την μείωση του σχηματισμού του παραπροϊόντος με τη χρήση διαφόρων μιγμάτων αποκοπής δεν απέδωσαν.





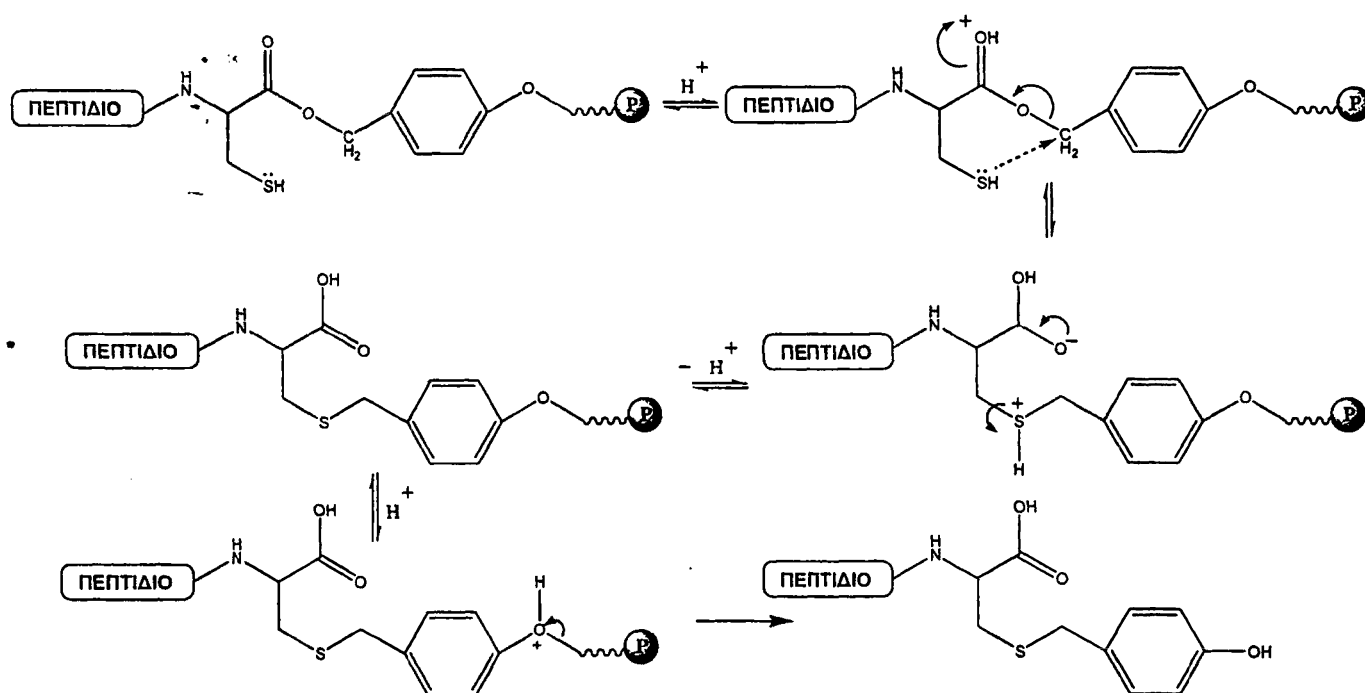
Σχήμα 15.1: Μηχανισμός αλκυλίωσης πεπτιδίου, με C-τελικό αμινοξύ την Trp, από την Wang ρητίνη. Το τελικό παραπροϊόν εμφανίζεται με μοριακό βάρος +106 Da.

Παρόμοιο πρόβλημα σχηματισμού παραπροϊόντων με μοριακό βάρος + 106 Da παρατηρήθηκε και στη περίπτωση χρήσης της Rink Amide ρητίνης, ανεξάρτητα από την αλληλουχία του πεπτιδίου. Στην περίπτωση αυτή, η αλκυλίωση γίνεται στο καρβόξυ-τελικό αμιδικό άζωτο και η αποφυγή του επιτυγχάνεται με την χρήση διμεθοξυβενζολίου στο μίγμα αποκοπής [235].

Η ανίχνευση παραπροϊόντων με μοριακό βάρος αυξημένο κατά 106 Da σε πεπτίδια που περιέχουν Cys και τα οποία συντίθενται σε Wang ρητίνη, αποδεικνύει ότι το πρόβλημα της αποικοδόμησης της ρητίνης και η αλκυλίωση διαφόρων αμινοξέων είναι ιδιαίτερα σημαντικό. Το γεγονός ότι παρά την ύπαρξη δυο ή τεσσάρων Cys στο μόριο, εμφανίζεται μόνο το μονοαλκυλιωμένο παραπροϊόν θα πρέπει μάλλον να συσχετισθεί με την παρουσία της Cys ως C-τελικό αμινοξύ. Ένας πιθανός μηχανισμός αλκυλίωσης της C-τελικής κυστεΐνης προτείνεται στο σχήμα 15.2. Ο σχηματισμός ενδιάμεσου εξαμελούς δακτυλίου φαίνεται να ευνοεί την αλκυλίωση της. Η χρήση διαφόρων μιγμάτων αποκοπής των

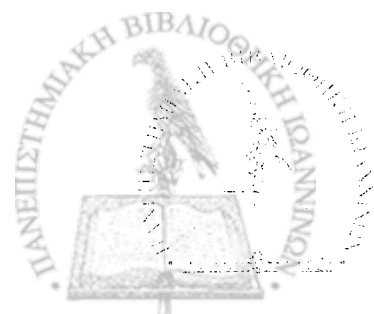


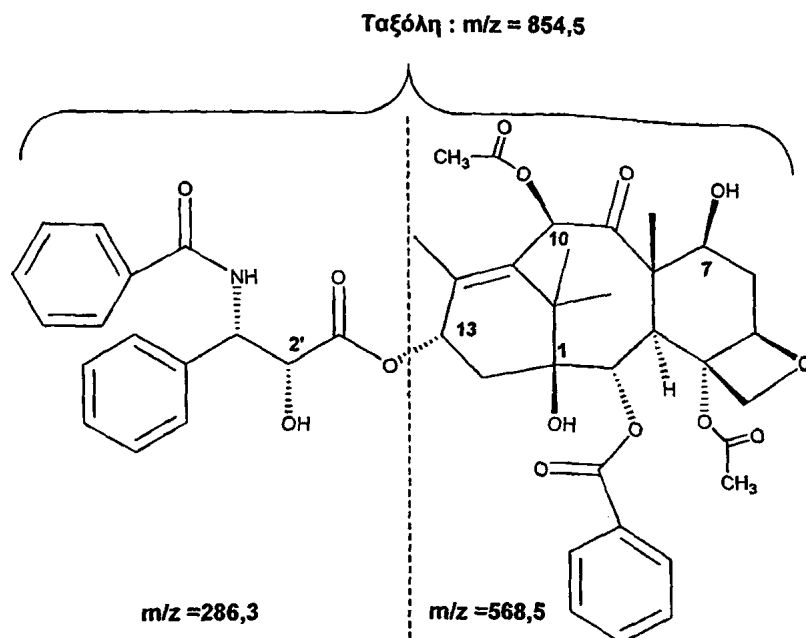
πεπτιδίων από τη ρητίνη δεν περιόρισε το πρόβλημα. Για τη μελέτη του προβλήματος αυτού σχεδιάστηκε σειρά πεπτιδικών μοντέλων, η σύνθεση των οποίων είναι σε εξέλιξη.



Σχήμα 15.2.: Προτεινόμενος μηχανισμός αποκοπής πεπτιδίου από την Wang ρητίνη, με C-τελικό αμινοξύ την Cys. Το παραπροϊόν εμφανίζεται με αλκυλιωμένη την Cys και μοριακό βάρος +106 Da.

Η αλογονοακετυλίωση της ταξόλης έγινε με επιτυχία στη θέση C2' χωρίς να απαιτηθεί οποιαδήποτε άλλη παροδική προστασία των υπολοίπων υδροξυλομάδων. Η ταυτοποίηση της θέσης της αλογονοακετυλίωσης έγινε χρησιμοποιώντας την φασματοσκοπία ESI-MS. Η αύξηση του εφαρμοζόμενου cone voltage οδηγεί σε θραυσματοποίηση του μορίου, κάτι που δεν είναι σύνηθες στο ESI-MS, με αποτέλεσμα να καθίσταται εφικτή η ταυτοποίηση της αλογονοακετυλιωμένης ομάδας. Η θραυσματοποίηση συμβαίνει στο δεσμό ανάμεσα στον άνθρακα C13 και το οξυγόνο (σχήμα 15.3).





Σχήμα 15.3: Το μόριο της ταξόλης. Με διακεκομμένη γραμμή παρουσιάζεται το σημείο θραυσματοποίησης και τα ανάλογα μοριακά ιόντα που εμφανίζονται στο ESI-MS φάσμα, σε μεγάλες τιμές cone voltage.

Οι αποδόσεις όλων των αντιδράσεων αλογονοακετυλίωσης της ταξόλης στη θέση 2' ήταν αρκετά καλές (>70%), ενώ δεν παρατηρήθηκαν προβλήματα σχετικά με την σταθερότητά τους.

Οι προσπάθειες ομοιοπολικής πρόσδεσης της ταξόλης μέσω εστερικού δεσμού στη θέση 2' είτε με τον φορέα Ac-(Glu-Aib-Gly)₄-NH₂ είτε με το πεπτίδιο Ac-Asi-Arg-NH₂, δεν απέδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα. Ιδιαίτερα με τον φορέα δεν κατέστη εφικτό να ανιχνευτεί το επιθυμητό προϊόν στο μίγμα της αντίδρασης. Σ' αυτό πιθανά συμβάλλουν τόσο η μικρή σταθερότητα του εστερικού δεσμού όσο και η απουσία φορτίου στο μόριο.

Η ομοιοπολική πρόσδεση της ταξόλης μέσω θειαιθερικού δεσμού έγινε με επιτυχία στο σύνολο των συμπλεγμάτων που δοκιμάστηκαν. Ιδιαίτερο πρόβλημα παρουσιάστηκε στις περιπτώσεις χρήσης των φορέων Ac-[Lys(Cys)-Aib-Gly]-OH₄, Ac-(Lys-Aib-Cys)₄-OH. Στην πρώτη περίπτωση, η δημιουργία ενδομοριακών δισουλφιδικών δεσμών φαίνεται να ευνοείται σε σημαντικό βαθμό πιθανά λόγω και της διαμόρφωσης του φορέα (3₁₀ έλικα), η οποία ευνοεί τον προσανατολισμό των παράπλευρων αλυσίδων των λυσινών προς την ίδια πλευρά του μορίου. Το γεγονός αυτό φέρνει κοντά τις κυστεΐνες, με αποτέλεσμα να σχηματίζονται εύκολα και ανεξάρτητα από την αραίωση που χρησιμοποιείται οι ενδομοριακοί δισουλφιδικοί δεσμοί. Στην περίπτωση του Ac-(Lys-Aib-Cys)₄-OH, παρά τις προσπάθειες

που έγιναν δεν κατέστη εφικτό να συντεθεί το σύμπλεγμα του φορέα με 4 ταξόλες προσδεδεμένες παρά μόνο αυτό με 3. Το γεγονός, ότι στο φορέα Ac-(Lys-Aib-Cys)₂-OH δεν υπήρξαν ιδιαίτερα προβλήματα ομοιοπολικής πρόσδεσης της ταξόλης, παραπέμπει σε διαμορφωτικούς παράγοντες του Ac- (Lys-Aib-Cys)₄-OH, οι οποίοι δεν ευνοούν την πρόσδεση του τέταρτου μορίου της ταξόλης. Οι παράγοντες αυτοί σχετίζονται πιθανά με το C- τελικό άκρο, καθώς το πρόβλημα ξεπεράστηκε με τη μετατροπή του C- τελικού καρβοξυλίου σε αμίδιο [Ac- (Lys-Aib-Cys)₄-NH₂], φορέα στον οποίο τα τέσσερα μόρια της ταξόλης προσδέθηκαν αρκετά εύκολα οδηγώντας στο επιθυμητό προϊόν σε μια αρκετά καλή συνολική απόδοση (~27%).

Χωρίς ιδιαίτερες δυσκολίες και σε αρκετά καλές αποδόσεις συντέθηκαν όλα τα υπόλοιπα πεπτιδικά παράγωγα της ταξόλης (πίνακας 15.1).

Πίνακας 15.1: Τα πεπτιδικά παράγωγα της ταξόλης.

Παράγωγο	Αναμενόμενο M.B.	Ευρεθέν M.B.	Συνολική Απόδοση(%)
Ac-[Lys-Aib-Cys(CH ₂ CO-C2'taxol)] ₂ -OH	2480,8	2480,28	39
Ac-[Lys-Aib-Cys(CH ₂ CO-C2'taxol)] ₂ -NH ₂	2478,90	2480,68	40
Ac-[Lys-Aib-Cys(CH ₂ CO-C2'taxol)] ₃ -NH ₂	3690,11	3690,57	32
Ac-[Lys-Aib-Cys(CH ₂ CO-C2'taxol)] ₄ -NH ₂	4900,45	4901,50	27
Ac-Cys(CH ₂ CO-C2'taxol)- [Arg-Aib-Cys(CH ₂ CO- C2'taxol)] ₃ -NH ₂	1852,88	1853,5	23
Ac-Cys(CH ₂ CO-C2'taxol)-Arg-Gly-Asp-Arg-NH ₂	1540,70	1540,82	38
Folyl-Cys(CH ₂ CO-C2'taxol)-Arg-Gly-Asp-Ser-NH ₂	1852,88	1853,50	12
Tat-Cys(CH ₂ CO-C2'taxol) -NH ₂	2715,1	2714,6	19

Όπως και στην περίπτωση των αλογονοακετυλιωμένων παραγώγων της ταξόλης, έτσι και στην περίπτωση των πεπτιδικών παραγώγων της, η αύξηση των τιμών του cone voltage στον φασματογράφο ESI-MS οδηγεί στην θραυσματοποίηση του μορίου στο δεσμό C13-O παρέχοντας έτσι μια επιπλέον σοβαρή ένδειξη για τη θέση αλογονοακετυλίωσης της ταξόλης, αλλά και ταυτοποίησης του τελικού πεπτιδικού παραγώγου της.

Απ' όλα τα αλογονοπαράγωγα της ταξόλης που χρησιμοποιήθηκαν για την ομοιοπολική πρόσδεσή της στα πεπτιδικά ανάλογα, η βρωμοακέτυλο ταξόλη φαίνεται να



δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα, πιθανά λόγω της αρκετά μεγαλύτερης δραστικότητάς της, η οποία συμβάλλει στον περιορισμό του διμερισμού του συστατικού που φέρει την κυστεΐνη. Διαφοροποιήσεις παρατηρήθηκαν στην έκταση του διμερισμού μέσω διαμοριακών δισουλφιδικών δεσμών κατά την αντίδραση σχηματισμού του θειοαιθερικού δεσμού. Επίσης, όπως άλλωστε είναι αναμενόμενο, η έκταση διαφοροποιούταν σ' όλα τα παράγωγα, ανάλογα με τη φύση των πεπτιδικών αναλόγων.

Η υδατοδιαλυτότητα των παραγώγων του πίνακα 15.1 ήταν πολύ καλή, ιδιαίτερα αυτών που φέρουν -RGD- αλληλουχία. Αντίθετα, αυτή μειώνεται με την αύξηση του αριθμού των μορίων της ταξόλης, στην περίπτωση των φορέων πολλαπλών μορίων. Τη μικρότερη υδατοδιαλυτότητα παρουσιάζει το παράγωγο Ac-Cys(CH₂CO-C2'taxol)- [Arg-Aib-Cys(CH₂CO-C2'taxol)]₃-NH₂.

Ο έλεγχος της ικανότητας των αναλόγων να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων στις κυτταρικές σειρές Hela, MCF-7 και Du έδειξε ότι όλα διαθέτουν μια ανασταλτική δράση με IC₅₀ στην περιοχή των nM, παρόμοια με αυτή της ταξόλης. Τη μεγαλύτερη ανασταλτική δράση στις κυτταρικές σειρές Hela και Du έδειξε το ανάλογο Ac-[Lys-Aib-Cys(CH₂CO-C2'taxol)]₄-NH₂ η οποία ήταν στατιστικά μεγαλύτερη από αυτήν της ταξόλης, ιδιαίτερα σε μικρές συγκεντρώσεις (πίνακας 14.2).

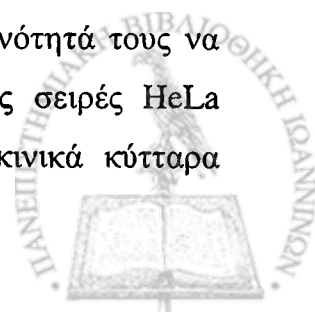
16. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στα πλαίσια της διατριβής αυτής σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν πεπτιδικά παράγωγα της ταξόλης με στόχο την βελτίωση της υδατοδιαλυτότητας και της ανασταλτικής δράσης του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Η ομοιοπολική πρόσδεση της ταξόλης στα πεπτιδικά ανάλογα επιχειρήθηκε να γίνει από τη θέση 2' μέσω εστερικού ή θειοαιθερικού δεσμού. Τα συμπεράσματα της εργασίας αυτής μπορούν να συνοψιστούν στα παρακάτω:

- ➔ Κατά τη σύνθεση των πεπτιδικών αναλόγων που χρησιμοποιήθηκαν στην ομοιοπολική πρόσδεση της ταξόλης εντοπίστηκαν προβλήματα που σχετίζονται με την εμφάνιση παραπροϊόντων αλκυλίωσης των αμινοξέων ως αποτέλεσμα της αποικοδόμησης των ρητινών Rink Amide και Wang, κατά τη διαδικασία αποκοπής του πεπτιδίου από τη ρητίνη. Για πρώτη φορά εντοπίστηκε το πρόβλημα της ισχυρής τάσης της αλκυλίωσης της Cys όταν αυτή βρίσκεται ως C-τελικό άκρο στην Wang ρητίνη.



- ➔ Η αλογονοακετυλίωση της ταξόλης μπορεί να γίνει με πολύ καλές αποδόσεις στη θέση 2', χωρίς να απαιτείται η παροδική προστασία των υπολοίπων υδροξυλομάδων του μορίου.
- ➔ Δεν παρατηρήθηκαν προβλήματα σταθεροποίησης των αλογονοακετυλιωμένων στη θέση 2' παραγώγων της ταξόλης, γεγονός που επιτρέπει την χρήση τους σε αντιδράσεις σχηματισμού θειοαιθερικού δεσμού.
- ➔ Η ομοιοπολική πρόσδεση της ταξόλης μέσω εστερικού δεσμού, με την παράπλευρη καρβοξυλομάδα του γλουταμινικού σε πεπτίδια, είναι ιδιαίτερα δύσκολη, καθώς η απαιτούμενη ενεργοποίηση του καρβοξυλίου μπορεί να οδηγήσει σε παραπροϊόντα (π.χ. γλουταριμίδια) που, είτε έμμεσα απενεργοποιούν την καρβονυλομάδα, είτε οδηγούν σε στερεοχημικά παρεμποδισμένα κέντρα αντίδρασης.
- ➔ Η χρήση φορέων του τύπου Ac-(Lys-Aib-Cys)₄-OH για ομοιοπολική πρόσδεση μέσω θειοαιθερικού δεσμού από την παράπλευρη αλυσίδα της Cys, δεν συνίσταται καθώς διαμορφωτικοί πιθανά λόγοι στους οποίους η C-τελική Cys συμμετέχει, ευνοούν την πρόσδεση 3 αντί 4 μορίων. Αντίθετα, η μετατροπή του C-τελικού καρβοξυλίου στην αμιδική του μορφή, στο φορέα Ac-(Lys-Aib-Cys)₄-NH₂ δεν φαίνεται να παρουσιάζει το παραπάνω πρόβλημα.
- ➔ Η ταυτοποίηση της παραγοντοποίησης της 2' θέσης της ταξόλης μπορεί να γίνει εύκολα με την βοήθεια του ESI-MS, αυξάνοντας την τιμή του εφαρμοζόμενου cone voltage κατά τη λήψη των φασμάτων. Οι αυξανόμενες τιμές cone voltage ευνοούν τη θραυσματοποίηση της ταξόλης στο δεσμό C13-O.
- ➔ Η σύνθεση πεπτιδικών παραγώγων με κατάλληλα τροποποιημένη ταξόλη στη θέση 2', μέσω θειοαιθερικού δεσμού, μπορεί να γίνει σχετικά εύκολα και σε καλές αποδόσεις.
- ➔ Από τα αλογονοακετυλιωμένα παράγωγα στη θέση 2' της ταξόλης, η βρωμοακετυλιωμένη ταξόλη φαίνεται να δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα στις αντιδράσεις σχηματισμού του θειοαιθερικού δεσμού.
- ➔ Τα πεπτιδικά παράγωγα ταξόλης που περιέχουν την RGD αλληλουχία διαθέτουν σημαντικά αυξημένη υδατοδιαλυτότητα. Αντίθετα, η υδατοδιαλυτότητα στα παράγωγα της σειράς Ac-[Lys-Aib-Cys(-CH₂CO-2' taxol)]_n-NH₂ με n=2-4, μειώνεται με την αύξηση των προσδεδμένων μορίων της ταξόλης.
- ➔ Όλα τα παράγωγα της ταξόλης που δοκιμάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων στις σειρές HeLa (ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα τραχήλου), DU (ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα



προστάτη) και MCF-7 (ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού), έδειξαν ανασταλτική δράση με τιμές IC_{50} στη περιοχή συγκεντρώσεων της τάξης nM, παρόμοια με αυτή της ταξόλης.

- ➔ Το ανάλογο $Ac-[Lys-Aib-Cys(-CH_2CO-2'taxol)]_4-NH_2$ παρουσίασε ανασταλτική δράση στις κυτταρικές σειρές HeLa και DU, στατιστικά μεγαλύτερη από αυτή της ταξόλης.
- ➔ Η ενσωμάτωση αλληλουχιών (-RGD-) ή μορίων (φολικού) στα παράγωγα της ταξόλης που αναγνωρίζονται από υπερ-εκφρασμένους υποδοχείς στα καρκινικά κύτταρα δεν φαίνεται να βελτιώνουν την ανασταλτική δράση.

17. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ταξόλη είναι ένας αντιμιτωτικός παράγοντας που έχει απομονωθεί από εκχυλίσματα του φλοιού του δέντρου *Taxus Brevifolia*. Το μόριο αυτό έχει δείξει σημαντική δράση έναντι διαφόρων μορφών καρκίνου, όπως του μαστού, των πνευμόνων, των ωοθηκών κ.α. Η κλινική



του δράση επεκτείνεται συνεχώς καθιστώντας το ως το κατεξοχήν αντικαρκινικό φάρμακο στις χημειοθεραπείες.

Η δράση της ταξόλης συνίσταται στην προώθηση και σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων της τουμπουλίνης, τα οποία είναι απαραίτητα για τη σωστή λειτουργία της μιτωτικής ατράκτου για τη διατήρηση του σχήματος, της κινητικότητας και τη σταθεροποίηση του κυττάρου. Οι μικροσωληνίσκοι αποτελούνται από ένα σκελετό α/β τουμπουλίνης που έχουν την ικανότητα να πολυμερίζονται και να αποπολυμερίζονται. Η ταξόλη συνδέεται ειδικά με την β-τουμπουλίνη, προάγοντας τον πολυμερισμό, με συνέπεια την αύξηση της μάζας των μικροσωληνίσκων, οι οποίοι σταθεροποιούνται, γίνονται άκαμπτοι, δεν αποπολυμερίζονται όπως οι φυσιολογικοί, προκαλώντας το θάνατο του καρκινικού κυττάρου.

Ενώ η δράση της ταξόλης είναι εξαιρετική, η χρήση της δημιούργησε σκεπτικισμό και αυτό γιατί έχει 2 σοβαρά προβλήματα ως υποψήφιο φάρμακο για ανάπτυξη.

- Μεγάλο πρόβλημα αποτελεί η απομόνωσή της από το εκχύλισμα του φλοιού του δέντρου. Είναι χαρακτηριστικό πως αρχικά απομονώθηκε, μετά από επίπονη και δύσκολη διαδικασία, σε απόδοση μόλις 0,014% !
- Έχει χαμηλή υδατοδιαλυτότητα, ως εκ τούτου δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη συνήθη ενέσιμο μορφή παρά μόνο με τη χρήση καστορέλαιου, το οποίο όμως προκαλεί πολλές παρενέργειες.

Πολλές προσπάθειες έγιναν στην κατεύθυνση της αντιμετώπισης των παραπάνω προβλημάτων, τόσο όσον αφορά την αύξηση της διαθεσιμότητάς του-με την μερική ή ολική σύνθεσή της- όσο και στην βελτίωση των φυσικών και χημικών της ιδιοτήτων έτσι ώστε να γίνει ευκολότερη και αποτελεσματικότερη η χρήση της ως φάρμακο. Μια τέτοια προσέγγιση είναι και αυτή των προφαρμάκων που βασίζεται στη δημιουργία λιγότερο δραστικών ή λιγότερο κυτταροτοξικών παραγώγων τα οποία θα μπορούσαν να μετατραπούν σε ενεργά, πρωταρχικά φάρμακα μέσα ή κοντά στα καρκινικά κύτταρα.

Στην παρούσα εργασία σχεδιάσαμε και συνθέσαμε σειρά πεπτιδικών παραγώγων της ταξόλης, με στόχο να βελτιώσουμε την υδατοδιαλυτότητα και την ανασταλτική δράση της. Συγκεκριμένα παρουσιάζονται:

- Ο σκοπός της διατριβής και αναλύεται το σκεπτικό που οδήγησε στο σχεδιασμό και την σύνθεση των πεπτιδικών αναλόγων της ταξόλης.
- Στο κεφάλαιο 1 γίνεται μια εισαγωγή στην παθολογία του καρκίνου, τον τρόπο που δημιουργείται, που εξαπλώνεται και τους τρόπους αντιμετώπισής του.



- Στο κεφάλαιο 2 γίνεται μια σύντομη αναφορά στην ιστορία της ταξόλης, από την ανακάλυψή της στο εκχύλισμα του δέντρου *Taxus Brevifolia*, έως την χρήση της ως φάρμακο στην χημειοθεραπεία του καρκίνου.
- Στο κεφάλαιο 3 περιγράφεται λεπτομερώς ο κυτταροστατικός, αλλά και ο κυτταροτοξικός μηχανισμός δράσης της ταξόλης έναντι των καρκινικών κυττάρων. Επίσης, γίνεται αναφορά στους μικροσωληνίσκους και τον ρόλο τους στη λειτουργία του κυττάρου.
- Στο κεφάλαιο 4 περιγράφονται οι δυσκολίες που παρουσιάζονται στην χρήση της ταξόλης ως φάρμακό και αφορούν τόσο το φαρμακευτικό σκεύασμα που προκαλεί παρενέργειες όσο και την τοξικότητα της ίδιας.
- Στο κεφάλαιο 5 περιγράφονται οι προσπάθειες που έχουν καταγραφεί για την λύση της αύξησης της διαθεσιμότητας της ταξόλης. Έτσι, εκτός από τις προτάσεις για ολική ή μερική σύνθεση της ταξόλης, καινούργιες τεχνικές καταγράφονται, όπως η βιοσύνθεσή της, η κυτταροκαλλιέργεια και η παραγωγή από μύκητες.
- Στο κεφάλαιο 6 γίνεται μια λεπτομερή αναφορά στις δραστικές ομάδες του μορίου της ταξόλης και κατά πόσο μια οποιαδήποτε τροποποίησή τους επηρεάζει την δραστηρότητά της.
- Στο κεφάλαιο 7 γίνεται αναφορά στην ανάπτυξη των προφαρμάκων της ταξόλης. Επισημαίνονται τα πεπτιδικά κυρίως μόρια που έχουν χρησιμοποιηθεί, καθώς και ο τρόπος σύνδεσης της ταξόλης σε αυτά (εστερικός, θειοαιθερικός).
- Στο κεφάλαιο 8 παρουσιάζονται οι συνθετικοί ολιγοπεπτιδικοί φορείς, οι γνωστότεροι από τους οποίους είναι το δένδρο της λυσίνης (MAPs, Multiple Antigenic Peptides), τα TAPs (Template Assembled Synthetic Proteins) και οι Επαναλαμβανόμενοι Ολιγοπεπτιδικοί Φορείς SOC_n (Sequential Oligopeptide Carriers).
- Στο κεφάλαιο 9 αναλύεται η πεπτιδική σύνθεση και συγκεκριμένα πραγματοποιείται αναδρομή στις τεχνικές σύνθεσης πεπτιδίων και στα αντιδραστήρια σύζευξης που χρησιμοποιούνται στη πεπτιδοχημεία. Ακολουθεί παρουσίαση των πολυμερικών υποστρωμάτων και των αμινοπροστατευτικών ομάδων που χρησιμοποιούνται κατά την πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση. Τέλος, συζητούνται τα προβλήματα που δημιουργούνται από παράπλευρες αντιδράσεις κατά την πεπτιδική σύνθεση.
- Στο κεφάλαιο 10 περιγράφεται αναλυτικά ο τρόπος αλογονοακετυλίωσης μιας αμινο ή υδρόξυλο ομάδας, καθώς επίσης και η εκλεκτική αντίδρασή της με μια σουλφυδρίλο-ομάδα.
- Τα κεφάλαια 11 έως 14 αποτελούν το πειραματικό συνθετικό μέρος της εργασίας και σε αυτά περιγράφονται λεπτομερώς όλες οι συνθέσεις των πεπτιδίων, των παραγοντοποιημένων μορίων της ταξόλης και των πεπτιδικών αναλόγων της.



- Στο κεφάλαιο 14 παρουσιάζονται τα βιολογικά αποτελέσματα των πεπτιδικών αναλόγων της ταξόλης του γενικού τύπου $\text{Ac-[Lys-Aib-Cys(CH}_2\text{CO-C2'taxol)]}_n\text{-NH}_2$ με $n=2-4$, στις διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές και συγκρίνονται με την δράση της.
- Στα κεφάλαια 15 και 16 αναλύονται τα αποτελέσματα της εργασίας και παρατίθενται τα συμπεράσματα από αυτή, μερικά από τα οποία είναι:
 - Κατά τη σύνθεση των πεπτιδικών αναλόγων που χρησιμοποιήθηκαν στην ομοιοπολική πρόσδεση της ταξόλης εντοπίστηκαν προβλήματα που σχετίζονται με την εμφάνιση παραπροϊόντων αλκυλίωσης των αμινοξέων, ως αποτέλεσμα της αποικοδόμησης των ρητινών Rink Amide και Wang, κατά τη διαδικασία αποκοπής του πεπτιδίου από τη ρητίνη. Για πρώτη φορά εντοπίστηκε το πρόβλημα της ισχυρής τάσης της αλκυλίωσης της Cys όταν αυτή βρίσκεται ως C-τελικό άκρο στην Wang ρητίνη.
 - Η αλογονοακετυλίωση της ταξόλης μπορεί να γίνει με πολύ καλές αποδόσεις στη θέση 2', χωρίς να απαιτείται η παροδική προστασία των υπολοίπων υδροξυλομάδων του μορίου.
 - Δεν παρατηρήθηκαν προβλήματα σταθεροποίησης των αλογονοακετυλιωμένων στη θέση 2' παραγώγων της ταξόλης, γεγονός που επιτρέπει την χρήση τους σε αντιδράσεις σχηματισμού θειοαιθερικού δεσμού.
 - Η ομοιοπολική πρόσδεση της ταξόλης μέσω εστερικού δεσμού, με την παράπλευρη καρβοξυλομάδα του γλουταμινικού σε πεπτίδια, είναι ιδιαίτερα δύσκολη, καθώς η απαιτούμενη ενεργοποίηση του καρβοξυλίου μπορεί να οδηγήσει σε παραπροϊόντα (π.χ. γλουταριμίδια) που, είτε έμμεσα απενεργοποιούν την καρβονυλομάδα είτε οδηγούν σε στερεοχημικά παρεμποδισμένα κέντρα αντίδρασης.
 - Η χρήση φορέων του τύπου $\text{Ac-(Lys-Aib-Cys)}_4\text{-OH}$ για ομοιοπολική πρόσδεση μέσω θειοαιθερικού δεσμού από την παράπλευρη αλυσίδα της Cys, δεν συνίσταται καθώς διαμορφωτικοί πιθανά λόγοι στους οποίους η C-τελική Cys συμμετέχει, ευνοούν την πρόσδεση 3 αντί για 4 μορίων. Αντίθετα, η μετατροπή του C-τελικού καρβοξυλίου στην αμιδική του μορφή, στο φορέα $\text{Ac-(Lys-Aib-Cys)}_4\text{-NH}_2$ δεν φαίνεται να παρουσιάζει το παραπάνω πρόβλημα.
 - Η ταυτοποίηση της παραγοντοποίησης της 2' θέσης της ταξόλης μπορεί να γίνει εύκολα με την βοήθεια του ESI-MS αυξάνοντας την τιμή του εφαρμοζόμενου cone voltage κατά τη λήψη των φασμάτων. Οι αυξανόμενες τιμές cone voltage ευνοούν τη θρασματοποίηση της ταξόλης στο δεσμό C13-O.

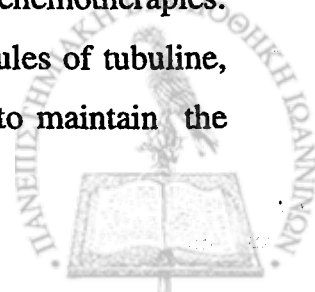


- Η σύνθεση πεπτιδικών παραγώγων με κατάλληλα τροποποιημένη ταξόλη στη θέση 2', μέσω θειοαιθερικού δεσμού, μπορεί να γίνει σχετικά εύκολα και σε καλές αποδόσεις.
- Από τα αλογονοακετυλιωμένα παράγωγα στη θέση 2' της ταξόλης, η βρωμοακετυλιωμένη ταξόλη φαίνεται να δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα στις αντιδράσεις σχηματισμού του θειοαιθερικού δεσμού.
- Τα πεπτιδικά παράγωγα ταξόλης που περιέχουν την RGD αλληλουχία διαθέτουν σημαντικά αυξημένη υδατοδιαλυτότητα. Αντίθετα η υδατοδιαλυτότητα στα παράγωγα της σειράς $\text{Ac-[Lys-Aib-Cys(-CH}_2\text{CO-2' taxol)]}_n\text{-NH}_2$ με $n=2-4$, μειώνεται με την αύξηση των προσδεδμενών μορίων ης ταξόλης.
- Όλα τα παράγωγα της ταξόλης που δοκιμάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων στις σειρές HeLa (ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα τραχήλου), DU (ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη) και MCF-7 (ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού), έδειξαν ανασταλτική δράση με τιμές IC_{50} στη περιοχή συγκεντρώσεων της τάξης nM, παρόμοια με αυτήν της ταξόλης.
- Το ανάλογο $\text{Ac-[Lys-Aib-Cys(-CH}_2\text{CO-2' taxol)]}_4\text{-NH}_2$ παρουσίασε ανασταλτική δράση στις κυτταρικές σειρές HeLa και DU, στατιστικά μεγαλύτερη από αυτή της ταξόλης.
- Η ενσωμάτωση αλληλουχιών (-RGD-) ή μορίων (φολικού) στα παράγωγα της ταξόλης που αναγνωρίζονται από υπερ-εκφρασμένους υποδοχείς στα καρκινικά κύτταρα δεν φαίνεται να βελτιώνουν την ανασταλτική δράση.
- Στο κεφάλαιο 17 δίνονται περιληπτικά το αντικείμενο και τα αποτελέσματα της διατριβής, στην ελληνική και αγγλική γλώσσα.
- Στο κεφάλαιο 18 περιλαμβάνει τις βιβλιογραφικές αναφορές της παρούσας εργασίας.
- Τέλος, το κεφάλαιο 19 παρατίθενται οι συντομογραφίες που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα διατριβή, καθώς και οι δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά, σε πρακτικά συνεδρίων και οι ομιλίες που προέκυψαν.



SUMMARY

Taxol is an antimitotic factor that has been isolated from extracts from the bark of the tree *Taxus Brevifolia*. This molecule has been shown to have important action against various forms of cancer, as those of the breast, the lungs, the ovaries. Its clinical action is being continuously extended, rendering it the most eminent anticancer medicine in chemotherapies. The activity of taxol consists in the promotion and stabilization of microtubules of tubuline, that are necessary for the proper function of the mitotic spindle in order to maintain the



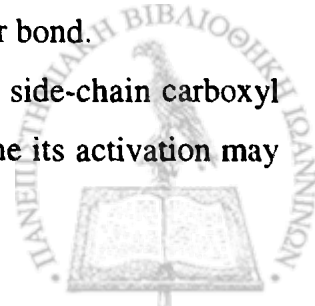
shape, mobility and the stabilization of the cell. The microtubules consist of a core of α/β tubulines that have the ability to polymerize and to depolymerize. Taxol interacts with β -tubuline, promoting polymerization, having as a result the increase of the mass of the microtubules, that are stabilized, become inflexible, do not polymerize as the normal ones do, thus causing the death of the cancer cell. Although the activity of taxol is exceptional, its use generates some scepticism since its development as a potential drug meets two main problems.

- Firstly, its isolation from the extracts from the bark of the tree. It is important to notice that it was initially isolated after a laborious and difficult process, with a yield hardly 0,014%!
- It has a low water solubility, therefore it cannot be used in the usual pharmaceutical form apart from a parallel use with castor oil which however causes a lot of side effects.

A lot of efforts have been made to tackle the above problems, the increase of its availability (by semi- or total synthesis) and the improvement of its physical and chemical properties, so as to render the use of taxol, as a drug, easier and more effective. A pertinent approach is through prodrugs, which is based on the creation of less active or less cytotoxic prodrugs that could be transformed into active, primary drugs within or near the cancer cells.

The conclusions of this work can be summarized as follows:

- ➔ During the synthesis of peptide analogues, that were used in the covalent attachment of taxol, there were observed some problems concerning the appearance of alkylated byproducts, as a result of the decomposition of the Rink Amide and Wang resins, during the procedure of cleavage of the peptide from the resin. For the first time, there was observed the problem of the strong tendency for alkylation of the Cys when it is positioned as C-terminal in the Wang resin.
- ➔ The halogenoacetylation of taxol can take place at 2' position with satisfactory yields, without the need for temporary protection of the rest of the hydroxyl group of the molecule.
- ➔ There was not observed stability problems of the 2' halogenoacetylated products of taxol, allowing their use in reactions for the formation of thioether bond.
- ➔ The covalent attachment of taxol through an ester bond, with the side-chain carboxyl group of glutamic acid in peptides, is especially difficult, since its activation may



lead in byproducts (i.e. glutarimides) which either indirectly deactivate the carboxyl group or lead in blocked stereochemical centres of reaction.

- ➔ The use of the carrier $\text{Ac}-(\text{Lys-Aib-Cys})_4\text{-OH}$ for covalent attachment through a thioether bond, is not recommended since possible conformational factors, in which the C-terminal Cys participates, lead to the attachment of 3 instead of 4 molecules. On the contrary, in the carrier $\text{Ac}-(\text{Lys-Aib-Cys})_4\text{-NH}_2$ does not seem to appear the same problem.
- ➔ The identification of the modified taxol at position 2' can be easily performed by means of ESI-MS. Increasing the applied cone voltage value a fragmentation of taxol occurs at the C13-O bond.
- ➔ The reaction of peptide products with suitably modified taxol in position 2' to form a thioether bond, can be easily done and in satisfactory yields.
- ➔ From the halogenoacetylated products of taxol in position 2', the bromoacetylated taxol seems to offer the best results in the formation of the thioether bond.
- ➔ The peptide-taxol derivatives that contain the RGD sequence have considerably increased water solubility. On the contrary, water solubility of the products of the type $\text{Ac}-(\text{Lys-Aib-Cys}(-\text{CH}_2\text{CO}-2' \text{ taxol}))_n\text{-NH}_2$ where $n=2-4$, decreases with the increase of the attached molecules of taxol.
- ➔ All products of taxol which were tested in respect to their ability to inhibit the proliferation of cancer cells in HeLa lines (human epithelial cervical cancer cells), DU (human cancer cells of prostate) and MCF-7 (human breast cancer cells), showed inhibitory activity with IC_{50} in the concentration range of nM, similar to that of taxol.
- ➔ The analogue $\text{Ac}-(\text{Lys-Aib-Cys}(-\text{CH}_2\text{CO}-2' \text{ taxol}))_4\text{-NH}_2$ showed inhibitory activity in cell lines HeLa και DU, statistically larger than that of taxol.
- ➔ The integration of sequences (-RGD-) or molecules (of folic acid) within the products of taxol, which are identified by over-expressed receptors in cancer cells, do not seem to enhance the inhibitory activity.



18. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

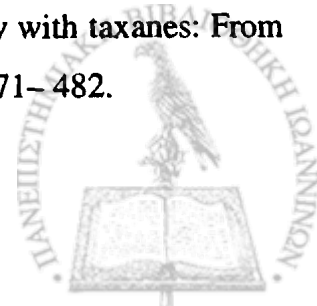
1. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular Biology of The Cell 3rd Edition*, Garland Publishing: New York, 1994.
2. Ward DE. *The Cancer Handbook: A Guide for the Nonspecialist*, Cushing-Malloy: Michigan, 1994.
3. Neuss N, Neuss MN. Therapeutic Use of Bisindole Alkaloids from *Ctaharanthus* in *The Alkaloids*. Volume 37, Brossi A, Suffness M. Ed.; Academic Press: New York, 1990, 229-239.



4. Eric JL, Wen YL. *Structure Activity Relationship Analysis of Anticancer Chinese Drugs and Related Plants*; Oriental Healing Arts Institute: California, **1985**.
5. Kingston DGI. In *Cancer Growth and Progression; Cancer Growth in Man*, Wooley PV. Ed.; Kluwer Academic Publishers: **1989**, 152-158.
6. Wall ME, Wani MC, Cook CE, Palmer KH, McPhail AT, Sim GA. Plant Antitumor Agents: I. The Isolation and Structure of Camptothecin, A Novel Alkaloidal Leukemia and Tumor Inhibitor from *Camptotheca acuminata*. *J. Am. Chem. Soc.* 1966; **88**: 3888-3890.
7. Suffness, M.; Cordell, G. A. Antitumor Alkaloids. Brossi, A.; Ed.; Academic Press: New York. *The Alkaloids*. 1985; **25**:1-369.
8. Wani M, Taylor H, Wall M, Coggon P, McPhail A. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc.* 1971; **193**: 2325-2327.
9. Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature*. 1979; **277**: 665-667.
10. McGuire WP, Rowinsky EK, Rosenshein NB, Grumbine FC, Ettinger DS, Armstrong DK, Donehower RC. Taxol: a unique antineoplastic agent with significant activity in advanced ovarian epithelial neoplasms. *Ann. Int. Med.* 1989; **111**: 273-279.
11. Gueritte-Voegelein F, Senilh V, David B, Guenard D, Potier P. Chemical studies of 10-deacetylbaccatin III. Hemisynthesis of taxol derivatives. *Tetrahedron* 1986; **42**: 4451-60.
12. Ozols, RF. Progress in ovarian cancer: an overview and perspective. *EJC Suppl.* 2003; **1**: 43-55.
13. Piccart MJ, Cardoso F. Progress in systemic therapy for breast cancer: an overview and perspectives. *EJC Suppl.* 200; **31**: 56-69.
14. Davies AM, Lara PN, Mack PC, Gandara DR. Docetaxel in non-small cell lung cancer: a review. *Expert Opin. Pharmacother.* 2003; **4**: 553-565.
15. Stryer L. Οριακή φυσιολογία .*Βιοχημεία*. Τόμος II. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης. 1995.
16. Evans L, Mitchison T, Kirschner M. Influence of the centrosome on the structure of nucleated microtubules. *J. Cell Biol.* 1985; **100**: 1185-91.
17. Desai A, Mitchison TJ. Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 1997; **13**: 83-117.



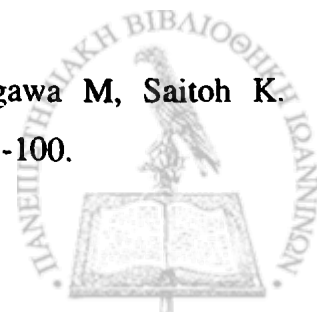
18. Allen C, Borisy GG. Structural polarity and directional growth of microtubules of *Chlamydomonas* flagella. *J. Mol. Biol* 1974; **90**: 381–402.
19. Jordan M, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Cancer Reviews*. 2004; **4**: 253–265.
20. Mitchison TJ, Kirschner M. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 1984; **312**: 237–242.
21. Margolis RL, Wilson L. Opposite end assembly and disassembly of microtubules at steady state in vitro. *Cell*. 1978; **13**: 1–8.
22. Rodionov VI, Borisy GG. Microtubule treadmilling in vivo. *Science*. 1997; **275**: 215–218.
23. Shaw SL, Kamyar R, Ehrhardt DW. Sustained microtubule treadmilling in *Arabidopsis* cortical arrays. *Science*. 2003; **300**: 1715–1718.
24. Panda D, Miller HP, Wilson L. Rapid treadmilling of MAP-free brain microtubules *in vitro* and its suppression by tau. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1999; **96**: 12459–12464.
25. Wilson L, Panda D, Jordan MA. Modulation of microtubule dynamics by drugs: a paradigm for the actions of cellular regulators. *Cell Struct. Funct*. 1999; **24**: 329–335.
26. Horwitz SB. Mechanism of action of taxol. *Ter. pharm. sci*. 1992; **13**: 134–136.
27. Jordan MA. Mechanism of Action of Antitumor Drugs that Interact with Microtubules and Tubulin. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents*. 2002; **2**: 1–17.
28. Nogales E. Structural insights into microtubule function. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2001; **30**: 397–420.
29. Derry WB, Wilson L, Jordan MA. Substoichiometric binding of taxol suppresses microtubule dynamics. *Biochemistry*. 1995; **34**: 2203–2211.
30. Horwitz SB. How to make taxol from scratch. *Nature*. 1994; **367**: 593–594.
31. Blagosklonny MV, Fojo T. Molecular effects of paclitaxel: myths and reality (a critical review). *Int. J. Cancer*. 1999; **83**: 151–156.
32. De Bree E, Rosing H, Beijnen JH, Romanos J, Michalakis J, Georgoulas V, Tsiftsis DD. Pharmacokinetic study of docetaxel in intraoperative hyperthermic i.p. chemotherapy for ovarian cancer. *Anticancer Drugs*. 2003; **14**: 103–110.
33. De Bree E, Theodoropoulos PA, Rosing H, Michalakis J, Romanos J, Beijnen JH, Tsiftsis DD. Treatment of ovarian cancer using intraperitoneal chemotherapy with taxanes: From laboratory bench to bedside. *Cancer Treatment Reviews*. 2006; **32**: 471–482.



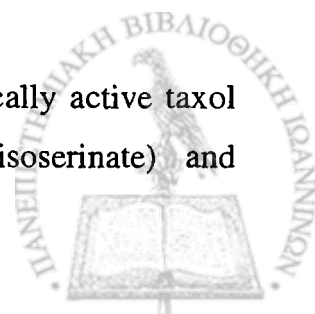
34. Sikic BI. Modulation of multidrug resistance: at the threshold. *J. Clin. Oncol.* 1993; **11**: 1629-1635.
35. Szachowicz-Petelska B, Figaszewski Z, Lewandowski W. Mechanisms of transport across cell membranes of complexes contained in antitumour drugs *Inter. Jour. Pharm.* 2001; **222**: 169-182.
36. Twentyman PR. Transport proteins in drug resistance: biology and approaches to circumvention. *J Intern Med Suppl.* 1997; **740**: 133-137.
37. Aszalos A, Ross DD. Biochemical and clinical aspects of efflux pump related resistance to anti-cancer drugs. *Anticancer Res.* 1998; **18**: 2937-2944.
38. Kyu-Ho Han E, Gehrke L, Tahir SK, Credo R.B, Cherian SP, Sham H, Rosenberg SH, Ng S. Modulation of drug resistance by alpha-tubulin in paclitaxel-resistant human lung cancer cell lines. *Eur. J. Cancer.* 2000; **36**: 1565-1571.
39. Ranganathan S, Benetatos CA, Colarusso PJ, Dexter DW, Hudes GR. Altered beta-tubulin isotype expression in paclitaxel-resistant human prostate carcinoma cells. *Br. J. Cancer.* 1998; **77**: 562-566
40. Kavallaris M, Kuo DY.-S, Burkhardt CA, Regl DL, Norris MD, Haber M, Horwitz SB. Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression of specific b-tubulin isotypes. *J. Clin. Invest.*, 1997; **100**: 1282-1293.
41. Monzo M, Rosell R, Sanchez JJ, Lee JS, O'Brate A, Gonzalez-Larriba JL, Alberola V, Lorenzo, JC, Nunez L, Ro JY, Martin C. Paclitaxel resistance in non-small-cell lung cancer associated with beta-tubulin gene mutations. *J. Clin. Oncol.* 1999; **17**: 1786-1793.
42. Howrie DL, Ptachcinski RJ, Griffith BP, Hardesty RJ, Rosentel JT, Burckart GJ, Venkataraman R. Anaphylactoid reactions asociated with parenteral cyclosporine use: possible role of Cremophor EL. *Drug Intell. Clin. Pharm.* 1985; **19**: 425-427.
43. O'Dwyer PJ, King SA, Fortner CL, Leyland-Jones B. Hypersensitivity reactions to teniposide (VM26): an analysis. *J. Surg. Oncol.* 1986; **4**: 1262-1269.
44. Gelderblom H, Verweij J, Nooter K, Sparreboom V. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *Eur. J. Cancer.* 2001; **37**: 1590-1598.
45. Cobb DF, O'Hara KL, Chadwick OD. Effects of variations in stand structure on development of mixed-species stands in eastern Washington. *Canadian Journal of Forest Research.* 1993; **23**: 545-552.



46. Si-Shen F, Guofeng H. Effect of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol) from nanospheres of biodegradable polymer[J]. *Journal of Controlled Release*. 2001; **71**: 53-69.
47. Nicolaou KC, Zang Z, Liu JJ, Ueno H, Nantermet PG, Guy RK, Claiborne CF, Renaud J, Couladouros EA, Paulvannan K, Sorensen EJ. Total Synthesis of Taxol. *Nature*, 1994; **367**: 630-634.
48. Holton RA, Somoza C, Kim HB, Liang F, Biediger RJ, Boatman PD, Shindo M, Smith CC, Kim S, Nadizadeh H, Suzuki Y, Tao C, Vu P, Tang S, Zhang P, Murthi KK, Gentile LN, Liu JH. First total synthesis of taxol. 1. Functionalization of the B ring. *J. Am. Chem. Soc.* 1994; **116**: 1597-1598.
49. Holton RA, Somoza C, Kim HB, Liang F, Biediger RJ, Boatman PD, Shindo M, Smith CC, Kim S, Nadizadeh H, Suzuki Y, Tao C, Vu P, Tang S, Zhang P, Murthi KK, Gentile LN, Liu JH. First total synthesis of taxol. 2. Completion of the C and D rings. *J. Am. Chem. Soc.*, 1994; **116**: 1599-1600.
50. Masters JJ, Link JT, Snyder LB, Young WB, Danishefsky SJ. A total synthesis of taxol. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1995; **34**: 1723-1726.
51. Danishefsky SJ, Masters JJ, Link JT, Snyder L B, Young WB, Magee TV, Jung DK, Isaacs RCA, Bornmann WG, Alaimo CA, Coburn CA, DiGrandi MJ. Total Synthesis of Baccatin III and Taxol. *J. Am. Chem. Soc.* 1996; **118**: 2843-2859.
52. Wender PA, Badham NF, Conway SP, Floreancing PE, Glass TE, Granicher C, Houze JB, Janichen J, Lee D, Marquess DG, McGrane PL, Meng W, Mucciario TP, Muhlenbach M, Natchus MG, Paulsen H, Rawlins DB, Satkofsky J, Shuker AJ, Sutton JC, Taylor RE, Tomooka K. The pinene path to Taxanes. 5. stereocontrolled synthesis of a versatile taxane precursor. *J. Am. Chem. Soc.* 1997; **119**: 2755-2756.
53. Wender PA, Badham NF, Conway SP, Floreancing PE, Glass TE, Houze JB, Krauss NE, Lee D, Marquess DG, McGrane PL, Meng W, Natchus MG, Shuker AJ, Sutton JC, Taylor RE. The pinene path to Taxanes. 6. A concise stereocontrolled synthesis of taxol. *J. Am. Chem. Soc.* 1997; **119**: 2757-2758.
54. Kusama H, Hara R, Kawahara S, Nishimori T, Kashima H, Nakamura N, Morihira K, Kuwajima I. Enantioselective total synthesis of (-)-taxol *J. Am. Chem. Soc.* 2000; **122**: 3811-3820.
55. Mukaiyama T, Shiina I, Iwadare H, Sakoh H, Tani Y, Hasegawa M, Saitoh K. Asymmetric total synthesis of taxol. *Proc. Japan. Acad.* 1997; **73**: 95-100.



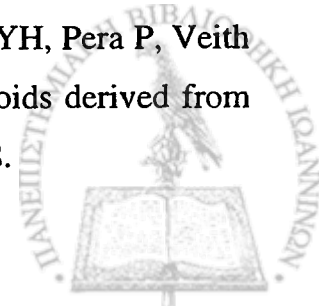
56. Croteau R, Ketchum REB, Long RM, Kasper R, Wildung MR. Taxol biosynthesis and molecular genetics. *Phytochemistry Reviews*. 2006; **5**: 75–97.
57. Huang QL, Roessner CA, Croteau R, Scott AI. Engineering *Escherichia coli* for the Synthesis of Taxadiene, a Key Intermediate in the Biosynthesis of Taxol. *Bioorg. Med. Chem.* 2001; **9**: 2237-2242.
58. Christen AA, Bland J, Gibson DM Cell cultures as a means to produce Taxol. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 1989; **30**: 566.
59. Christen AA, Gibson DM, Bland J. *US Patent*. 1991, 5019504.
60. Hu YM, Gan FY, Lu CH, Ding HS, Shen YM. Production of Taxol and related taxanes by cell suspension cultures of *Taxus yunnanensis*. *Acta. Bot. Sin.* 2003; **45**: 373-378.
61. Stierle A, Strobel G., Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew. *Science* 1993; **260**: 214-216.
62. Li JY, Stroble G, Sidhu R, Hess WM, Ford EJ. Endophytic Taxol producing fungi from bald cypress, *Taxodium distichum*. *Microbiology*. 1996; **142**: 2223-2226.
63. Denis JN, Greene AE, Guenard D, Guéritte-Voegelein F, Mangatal L, Potier P. Highly efficient practical approach to natural Taxol. *J. Am. Chem. Soc.* 1988; **110**: 5917-5919.
64. Denis JN, Greene AE, Serra AA, Luche MJ. An efficient, enantioselective synthesis of the taxol side chain. *J. Org. Chem.* 1986; **51**: 46-50.
65. Holton RA. Workshop on Taxol and Taxus, 1991. Eur. Pat. Appl. EP400,971 1990; *Chem. Abstr.* 1990, **114**, 16456817.
66. Ojima I, Habus I, Zhao M, Georg GI, Jayasinghe LR. Efficient and practical asymmetric synthesis of the taxol C-13 side chain, N-benzoyl-(2R,3S)-3-phenylisoserine, and its analogs via chiral 3-hydroxy-4-aryl-beta.-lactams through chiral ester enolate-imine cyclocondensation. *J. Org. Chem.* 1991; **56**: 1681-1683.
67. Denis JN, Greene AE, Serra AA, Luche MJ. An efficient, enantioselective synthesis of the taxol side chain . *J. Org. Chem.* 1986; **51**: 46-50.
68. Kant J, Huang S, Wong H, Fairchild C, Vyas D, Farina V. Studies toward structure-activity relationships of taxol®: synthesis and cytotoxicity of taxol® analogues with C-2' modified phenylisoserine side chains. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1993; **3**: 2471-2474.
69. Magri NF, Kingston DGI. Modified Taxols, 4. Synthesis and biological activity of taxols modified in the side chain. *J. Nat. Prod.*, 1988; **51**: 298-306.
70. Georg GI, Cheruvallath ZS, Himes RH, Mejillano MR. Novel biologically active taxol analogues: Baccatin III 13-(N-(p-chlorobenzoyl)-(2'R,3'S)-3'-phenylisoserinate) and



- Baccatin III 13-(N-benzoyl-(2'R,3'S)-3'-(p-chlorophenyl)isoserinate). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1992; **2**: 295-298.
71. Georg GI, Cheruvallath ZS, Himes RH, Mejillano MR. Semisynthesis and biological activity of taxol analogues: baccatin III 13-(N-benzoyl-(2'R,3'S)-3'-(p-tolyl)isoserinate), baccatin III 13-(N-(p-toluoyl)-2'R,3'S)-3'-phenylisoserinate), baccatin III 13-(N-benzoyl-(2'R,3'S)-3'-(p-trifluoromethylphenyl)isoserinate), and baccatin III 13-(N-(p-trifluoromethylbenzoyl)-(2'R,3'S)-3'-phenylisoserinate). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1992; **2**: 1751-1754.
 72. Kingston DGI. *History and Chemistry*, In McGuire, W. P., Rowinsky, E. K. (Eds), Taxol in cancer treatment, 1995, New York: Marcel Dekker, pp. 21-27.
 73. Ma W, Park GL, Gomez GA, Neider MH, Adams TL, Aynsley JS, Sahai OP, Smith RJ, Stahlhut RW, Hyland PJ, Bitsch F, Shackleton C. New bioactive taxoids from cell cultures of *taxus baccata*. *J. Nat. Prod.* 1994; **57**: 116-122.
 74. Lataste H, Senilh V, Wright M, Guenard D, Potier P. Relationships between the structures of taxol and baccatine III derivatives and their in vitro action on the disassembly of mammalian brain and *Physarum* amoebal microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 1984; **81**: 4090-4094.
 75. Mathew AE, Mejillano MR, Nath JP, Himes RH, Stella V. Synthesis and evaluation of some water-soluble prodrugs and derivatives of taxol with antitumor activity. *J. Med. Chem.* 1992; **35**: 145-151. (again?)
 76. Kingston DGI, Samaranayake G, Ivey CA. The chemistry of taxol, a clinically useful anticancer agent. *J. Nat. Prod.* 1990; **53**: 1-12.
 77. Senilh V, Belchert S, Colin M, Guenard D, Picot F, Potier P, Varenne P. Mise en Évidence de Nouveaux Analogues du Taxol Extraits de *Taxus baccata*. *J. Nat. Prod.* 1984; **47**: 131-137.
 78. Chaudhary AG, Rimoldi JM, Kingston, DGI. Modified taxols. 10. Preparation of 7-deoxytaxol, a highly bioactive taxol derivative, and interconversion of taxol and 7-epi-taxol. *J. Org. Chem.*, 1993; **58**: 3798-3799.
 79. Chen SH, Huang S, Kant J, Fairclid C, Wei J, Farina V. Synthesis of 7-deoxy- and 7,10-dideoxytaxol via radical intermediates. *J. Org. Chem.* 1993; **58**: 5028-5029.
 80. Magri NF, Kingston DGI. Modified taxols. 2. Oxidation products of taxol. *J. Org. Chem.* 1986; **51**: 797-802.



81. Klein LL. Synthesis of 9-dihydrotaxol: A novel bioactive taxane. *Tetrahedron Lett.* 1993; **34**: 2047-2050.
82. Georg GI, Cheruvallath ZS, Vander Velde DG. Stereoselective synthesis of 9 β -hydroxytaxanes via reduction with samarium diiodide. *Tetrahedron Lett.*, 1995; **36**: 1783-1786.
83. Kant J, O'Keeffe WS, Chen SH, Farina V, Fairchild C, Johnston K, Kadow JF, Long BH, Vyas D. A chemoselective approach to functionalize the C-10 position of 10-deacetylbaccatin III. Synthesis and biological properties of novel C-10 Taxol® analogues. *Tetrahedron Lett.* 1994; **35**: 5543-5546.
84. Kingston DGI, Chordia MD, Jagtap PG. Synthesis and biological evaluation of 1-deoxypaclitaxel analogues. *J. Org. Chem.* 1999; **64**: 1814-1822.
85. Chordia DM, Kingston DGI. Synthesis and biological evaluation of 2-*epi*-paclitaxel. *J. Org. Chem.* 1996; **61**: 799-801.
86. Datta A, Jayasinghe L, Georg G. 4-Deacetyltaxol and 10-Acetyl-4-deacetyltaxotere: Synthesis and Biological Evaluation I. *J. Med. Chem.* 1994; **37**: 4258-4260.
87. Neidigh KA, Gharpure MM, Rimoldi JM, Kingston DGI, Jiang YQ, Hamel E. Synthesis and biological evaluation of 4-deacetylpaclitaxel. *Tetrahedron Lett.* 1994; **35**: 6839-6842.
88. Chen SH, Kadow JF, Farina V, Fairchild C, Johnston K. First syntheses of novel paclitaxel(taxol) analogs modified at the C4-position. *J. Org. Chem.* 1994; **59**: 6156-6158.
89. Georg GI, Ali SM, Boge TC, Datta A, Falborg L, Himes RH. Selective C-2 and C-4 deacylation and acylation of taxol: The first synthesis of a C-4 substituted taxol analogue. *Tetrahedron Lett.* 1994; **35**: 8931-8934.
90. Chen SH, Fairchild C, Long BH. Synthesis and biological evaluation of novel C-4 aziridine-bearing paclitaxel (taxol) analogs. *J. Med. Chem.* 1995; **38**: 2263-2267.
91. Chen SH, Wei JM, Long BH, Fairchild CA, Carboni J, Mamber SW, Rose WC, Johnston K, Casazza AM, Kadow JF, Farina V, Vyas DM, Doyle TW. Novel C-4 paclitaxel (Taxol®) analogs: potent antitumor agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1995; **5**: 2741-2746.
92. Hoemann MZ, Vander Velde D, Aube J, Georg GI. Synthesis of 13-*epi*-Taxol via a transannular delivery of a borohydride reagent. *J. Org. Chem.* 1995; **60**: 2918-2921.
93. Ojima I, Slater JC, Kuduk SD, Takeuchi CS, Gimi RH, Sun CM, Park YH, Pera P, Veith JM, Bernacki RJ. Syntheses and structure-activity relationships of taxoids derived from 14 β -Hydroxy-10-deacetylbaccatin III. *J. Med. Chem.* 1997; **40**: 267-278.



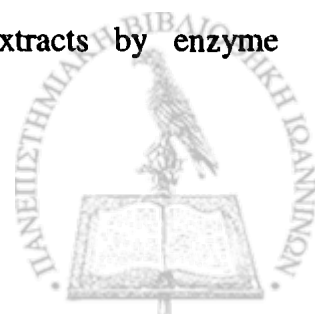
94. Samaranayake G, Magri NF, Jitrangsri C, Kingston DG.. Modified taxols. 5. Reaction of taxol with electrophilic reagents and preparation of a rearranged taxol derivative with tubulin assembly activity. *J. Org. Chem.* 1991; **56**: 5114-5119.
95. Wang M, Cornett B, Nettles J, Liotta DC, Snyder JP. The oxetane ring in taxol. *J. Org. Chem.* 2000; **65**: 1059-1068.
96. Skwarczynski M, Hayashi Y, Kiso Y. Paclitaxel prodrugs: toward smarter delivery of anticancer agents. *J Med Chem.* 2006; **49**: 7253-7269.
97. Stella VJ. Prodrug as therapeutics. *Expert Opin. Ther. Pat.* 2004; **14**: 277-280.
98. Sinhababu AK., Thakker DR. Prodrugs of anticancer agents. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 1996; **19**: 241-273
99. Kingston DGI. Recent advances in the chemistry of Taxol. *J.Nat. Prod.* 2000; **63**: 726-734.
100. Vyas DM. Paclitaxel (Taxol) Formulation and Prodrugs. In *The Chemistry and Pharmacology of Taxol and Its Derivatives*; Ed.; Farina, V., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1995; pp 103-130.
101. Paradis R, Page M. New active paclitaxel amino acids derivatives with improved water solubility. *Anticancer Res.* 1998; **18**: 2711- 2716.
102. Damen EWP, Wiegerinck PHG, Braamer L, Sperling D, de Vos D, Scheeren HW. Paclitaxel esters of malic acid as prodrugs with improved water solubility. *Bioorg. Med. Chem.* 2000; **8**: 427- 432.
103. Langel, U. (2002) *Cell Penetrating Peptides: Processes and Applications* , CRC Press, Boca Raton, FL
104. Rothbard JB, Jessop TC, Wender PA. Adaptive translocation: the role of hydrogen bonding and membrane potential in the uptake of guanidinium-rich transporters into cells. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2005; **57**: 495-504.
105. Kirschberg TA, VanDeusen CL, Rothbard JB, Yang M, Wender PA. Arginine-based molecular transporters: the synthesis and chemical evaluation of releasable Taxol-transporter conjugates. *Org. Lett.* 2003; **5**: 3459-3462.
106. de Mareuil J, Carre M, Barbier P, Campbell GR, Lancelot S, Opi S, Esquieu D, Watkins JD, Prevot C, Braguer D, Peyrot V, Loret EP. HIV-1 Tat protein enhances Microtubule polymerization. *Retrovirology.* 2005; **2**: 5-15.



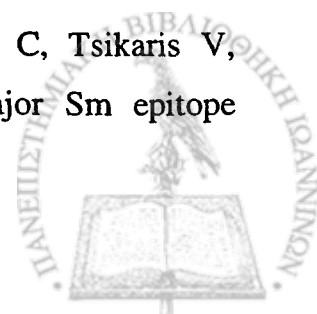
107. Wang S, Zhelev, N. Z.; Duff, S.; Fischer, P. M. Synthesis and biological activity of conjugates between paclitaxel and the cell delivery vector penetratin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006, **16**, 2628- 2631.
108. Le Roux I, Joliot AH, Bloch-Gallego E, Prochiantz A, Volovitch M. Neurotrophic activity of the Antennapedia homeodomain depends on its specific DNA-binding properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993; **90**: 9120-9124.
109. Huang PS, Oliff A. Drug-targeting strategies in cancer therapy. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2001; **11**: 104-110.
110. Leamon CP, Reddy JA. Folate-targeted chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2004; **56**: 1127-1141.
111. Lee JW, Lu JY, Low PS, Fuchs PL. Synthesis and evaluation of Taxol-folic acid conjugates as targeted antineoplastics. *Bioorg. Med. Chem.* 2002; **10**: 2397-2414.
112. Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N. Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood.* 1998; **91**: 2645-2657.
113. Eliceiri BP, Cheresh DA. The role of α_v integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development *J. Clin. Invest.* 1999; **103**: 1227-1230.
114. Hynes RO. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell.* 1987; **48(4)**: 549-554.
115. Hynes RO. A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nature Med.* 2002; **8**: 918 - 921.
116. Hynes RO. Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion *Cell.* 1992; **69**: 11-25.
117. Gottschalk KE, Kessler H. The structures of integrins and integrin- ligand complexes: implications for drug design and signal transduction. *Angew. Chem.* 2002; **114**: 3919-3927.
118. Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1996; **12**: 697-715.
119. Chen X, Plasencia C, Hou Y, Neamati N. Synthesis and biological evaluation of dimeric RGD peptide-paclitaxel conjugate as a model for integrin-targeted drug delivery. *J. Med. Chem.* 2005; **48**: 1098-1106.
120. Nori A, Kopecek J. Intracellular targeting of polymer-bound drugs for cancer chemotherapy. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2005; **57**: 609-636.



121. Hoste K, De Winne K, Schacht E. Polymeric prodrugs. *Int. J. Pharm.* 2004; **277**: 119-131.
122. Li C. Poly(L-glutamic acid)-anticancer drug conjugates. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2002; **54**: 695-713.
123. Li C, Yu DF, Newman RA, Cabral F, Stephens LC, Hunter N, Milas L, Wallace S. Complete regression of well-established tumors using a novel water-soluble poly(L-glutamic acid)-paclitaxel conjugate. *Cancer Res.* 1998; **58**: 2404-2409.
124. Li C, Price JE, Milas L, Hunter NR, Ke S, Yu DF, Chamsangavej C, Wallace, S. Antitumor activity of poly(L-glutamic acid)-paclitaxel on syngeneic and xenografted tumors. *Clin. Cancer Res.* 1999; **5**: 891-897.
125. Greenwald RB, Pendri A, Bolikal D, Gilbert CW. Highly water soluble taxol derivatives: 2'-polyethylene glycol esters as potential prodrugs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1994; **4**: 2465-2470.
126. Greenwald RB, Gilbert CW, Pendr, A, Conover CD, Xia J, Martinez A. Drug delivery systems: water soluble Taxol 2'-poly- (ethylene glycol) ester prodrugs. Design and in vivo effectiveness. *J. Med. Chem.* 1996; **39**: 424-431.
127. Feng X, Yuan YJ, Wu JC. Synthesis and evaluation of watersoluble paclitaxel prodrugs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2002; **12**: 3301-3303.
128. Kratz F, Beyer U. Serum proteins as drug carriers of anticancer agents: a review. *Drug Delivery.* 1998; **5**: 281-299.
129. Bicomumpaka C, Page M. In vitro cytotoxicity of paclitaxel-transferrin conjugate on H69 cells. *Oncol. Rep.* 1998; **5**: 1381-1383.
130. Dosio F, Brusa P, Crosasso P, Arpicco S, Cattel, L. Preparation, characterization and properties in vitro and in vivo of a paclitaxel albumin conjugate. *J. Controlled Release.* 1997; **47**: 293-304.
131. Leu JG, Chen BX, Schiff PB, Erlanger BF. Characterization of polyclonal and monoclonal anti-taxol antibodies and measurement of taxol *Cancer Res.* 1993; **53**: 1388-1391
132. Grothaus PG, Bignami GS, O'Malley S, Harada KE, Byrnes JB, Waller DF, Raybould TJG, McGuire MT, Alvarádo B. Taxane-specific monoclonal antibodies: measurement of taxol, baccatin III. and "total taxanes" in *taxus brevifolia* extracts by enzyme immunoassay. *Journal Of Natural Products.* 1995; **58**: 1003-1014.

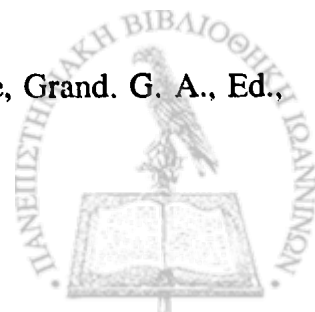


133. Tam JP. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988; **85**: 5409-5013.
134. Tam JP. Recent advances in multiple antigen peptides. *J. Immunol. Meth.* 1996; **196**: 17-32.
135. Veprek P, Jezek J. Peptide and glycopeptide dendrimers. Part I. *J. Pept. Sci.* 1999; **5**: 203-220.
136. Veprek P, Jezek J. Peptide and glycopeptide dendrimers. Part II. *J. Pept. Sci.* 1999; **5**: 203-220.
137. Tuchscherer, G, Mutter M. Templates in protein de novo design. *J. Biotechn.* 1995; **41**: 197-210.
138. Sakarellos-Daitsiotis M, Tsikaris V, Vlachoyiannopoulos PG, Tzioufas AG, Moutsopoulos HM, Sakarellos C. Peptide carriers: A helicoids-type sequential oligopeptide carrier (SOCn) for multiple anchoring of antigenic/immunogenic peptides. *Methods (San Diego)*. 1999; **19**: 133-141.
139. Sakarellos-Daitsiotis M, Tsikaris V, Sakarellos C, Vlachoyiannopoulos PG, Tzioufas AG, Moutsopoulos HM. A new helicoids-type sequential oligopeptide carrier (SOCn) for developing potent antigens and immunogens. *Vaccine*, 1999; **18**: 302-310.
140. Tsikaris V, Sakarellos C, Sakarellos-Daitsiotis M, Orlewski P, Marraud M, Cung MT, Vatzaki E, Tzartos S. Construction and application of a new class of sequential oligopeptide carriers (SOCn) for multiple anchoring of antigenic peptides-application to the acetylcholine receptor (AChR) main immunogenic region. *Int. J. Biol. Macromol.* 1996; **19**: 195-205.
141. Tsikaris V, Sakarellos C, Cung MT, Marraud, M, Sakarellos-Daitsiotis M. Concept and design of a new class of sequential oligopeptide carriers (SOC) for covalent attachment of multiple antigenic peptides. *Biopolymers*. 1996; **38**: 291-293.
142. Vlachoyiannopoulos PG, Petrovas C, Tzioufas AG, Alexopoulos C, Tsikaris V, Guialis A, Nakopoulou L, Sakarellos-Daitsiotis M, Sakarellos C, Davaris P, Moutsopoulos HM. No evidence of epitope spreading after immunization with the major Sm epitope P-P-G-M-R-P-P anchored to sequential oligopeptide carriers (SOCs). *J. Autoimmun.* 2000; **14**: 53-61.
143. Petrovas CJ, Vlachoyiannopoulos, PG, Tzioufas AG, Alexopoulos C, Tsikaris V, Sakarellos-Daitsiotis M, Sakarellos C, Moutsopoulos HM. ("A major Sm epitope

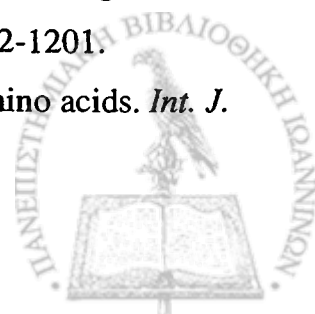


anchored to sequential oligopeptide carriers is a suitable antigenic substrate to detect anti-Sm antibodies. *J. Immunol. Meth.*, 1998; **220**: 59-68.

- 144.**Alexopoulos C, Tsikaris V, Rizou C, Panou-pomonis E, Sakarellos-Daitsiotis M, Sakarellos C, Vlachoyiannopoulos PG, Moutsopoulos HM. A diepitopic sequential oligopeptide carrier (SOCn) as mimic of the Sm autoantigen; synthesis, conformation and biological assays. *J. Pept. Sci.* 2001; **7**: 105-114.
- 145.**Yiannaki EE, Tzioufas AG, Bachmann M, Hantoumi J, Tsikaris V, Sakarellos-Daitsiotis M, Sakarellos C, Moutsopoulos H.M. "The value of synthetic linear epitope analogues of La/SSB for the detection of autoantibodies to La/SSB; specificity, sensitivity and comparison of methods. *Clin. Exp.Immunol.* 1998; **112**: 152-158.
- 146.**Basak A, Boudreault A, Chen A, Chretien M, Seidah NG, 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. Pept. Sci.* 1995; **1**: 385-395.
- 147.**Peluso S, Dumy P, Eggleston IM, Garrouste P, Mutter M. Protein mimetics (TASP) by sequential condensation of peptide loops to an immobilised topological template. *Tetrahedron.* 1997; **53**: 7231-7236.
- 148.**Alexopoulos C, Tsikaris V, Rizou C, Sakarellos-Daitsiotis M, Sakarellos C, Cung MT, Marraud M, Vlachoyiannopoulos PG, Moutsopoulos HM. The position of the LysN epsilon H2-grafted antigens along the sequential oligopeptide carrier, Ac-(Aib-Lys-Aib-Gly)_n (SOCn-II), influences the antibody recognition: application to the Sm main autoimmune epitope. *Biopolymers.* 2000; **54**: 1-10.
- 149.**McMurry J. Βιομόρια: αμινοξέα, πεπτίδια και πρωτεΐνες. *Οργανική Χημεία*. Τόμος II. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης. 1999.
- 150.**Miklos Bodanzsky. *Peptide Chemistry: A Practical Textbook*. 2nd Rev. Edition. Springer Verlag, New York. 1993.
- 151.**Jones M.Jr. Introduction to amino acids and polyamino acids (Peptides and Proteins). *Organic Chemistry*. New York. 1997.
- 152.**Tam JP, DiMarchi RD, Merrifield RB. Design and synthesis of a multi-detachable benzhydrylamine-resin for solid phase peptide synthesis, *Tetrahedron Letters*. 1981; **22**: 2851-2854.
- 153.**Fields GB, Tian Z, Barany G. Synthetic Peptides. A user's Guide, Grand. G. A., Ed., W. H. Freeman, New York, 1992.



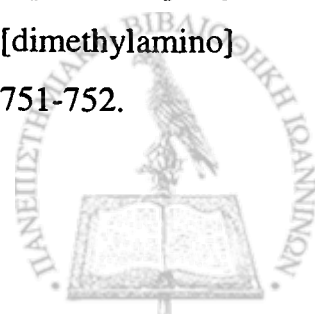
154. Merrifield RB. in: *Peptides. Synthesis, Structures and Applications*, Gutte B. (Ed.), Academic Press, New York, (1995) 93.
155. Sarin VK, Kent SBH, Mitchell AR, Merrifield RB. A general-approach to the quantitation of synthetic efficiency in solid-phase peptide-synthesis as a function of chain-length. *J. Am. Chem. Soc.* 1984; **106**: 7845-7850.
156. Mitchell AR, Ken SBH, Engelhard M, Merrifield RB. New synthetic route to tert-butyloxycarbonylaminoacyl- 4-(oxymethyl) phenylacetamidomethyl -resin, an improved support for solid-phase peptide-synthesis. *J. Org. Chem.* 1978; **43(14)**: 2845-2852.
157. Matsueda GR, Stewart JM. A p-methylbenzhydrylamine resin for improved solid-phase synthesis of peptide amides. *Peptides*. 1981; **2**: 45-50.
158. Meldal M. in: *Methods in Enzymology*, Vol. 289, *Solid-Phase Peptide Synthesis*, Fields, G. B., Eds, Academic Press, San Diego, (1997) 83.
159. Rink H. Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin. *Tetrahedron Lett.* 1987; **28**: 3787-3790.
160. Anderson GW, McGregor AC. t-Butyloxycarbonylamino acids and their use in peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 1957; **79**: 6180-6183.
161. Carpino LA, Han GA. The 9-fluorenylmethoxycarbonyl function, a new base-sensitive amino-protecting group. *J. Org. Chem.* 1970; **92**: 5748-5756.
162. Moroder L, Hallet A, Wunsch E, Keller O, Wersin G. Di-tert.-butyl-dicarbonate, a useful tert.-Butyloxycardonylating reagent. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 1976; **357**: 1651-1653.
163. Itoh M, Hagiwara D, Kawiya T. A new tert- butyloxycarbonylating reagent, 2 - tert-butyloxycarbonyloxyimino - 2 - phenylacetonitrile. *Tetrahedron Lett.* 1975; **16**: 4393-4394.
164. Lapatsanis L, Miliadis G, Froussios K, Kolovos M. Synthesis of N-2,2,2-(Trichloroethoxycarbonyl)-L-amino acids involving succinimidoxo anion as a leaving group in amino acid protection. *Synthesis*. 1983; 671-673.
165. Bolin DR, Sytwu I, Humiec F, Meienhofer J. Preparation of oligomer-free N^α-Fmoc and N^α-urethane amino acids. *Int. J. Pept. Protein. Res.* 1989; **33**: 353-359.
166. Bergmann M, Zervas, L. Max Bergmann and Leonidas Zervas: Uber ein allgemeines Verfahren der Peptid-Synthese. *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* 1932; **65**: 1192-1201.
167. Loffet A, Zhang HX. Allyl-based groups for side-chain protection of amino acids. *Int. J. Pept. Protein. Res.* 1993; **42**: 346-351.



168. Aletras A, Barlos K, Gatos D, Koutsogianni S, Mamos P. Preparation of the very acid-sensitive Fmoc-Lys(Mtt)-OH. Application in the synthesis of side-chain to side-chain cyclic peptides and oligolysine cores suitable for the solid-phase assembly of MAPs and TASPs. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1995; **45**: 488-496.
169. Chang CD, Waki M, Ahmad M, Meienhofer J, Lundell EO, Haug, JD. Preparation and properties of N^α-9-fluorenylmethyloxycarbonylamino acids bearing tert-butyl side chain protection. *Int. J. Pep. Protein. Res.* 1980; **15**: 59-66.
170. Hong Z, Yali W, Voelter W. A New Strategy for the Synthesis of Asp-Gly Units-Containing Glycopeptides Using Fmoc/Bzl Protection. *Tetrahedron Lett.* 1995; **36**: 8767-8770.
171. Wunsch E, Jentsch J. *Chem. Ber.* 1964; **97**: 2490-2496.
172. Sugano H, Miyoshi M. A convenient synthesis of N-tert-butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-serine. *J. Org. Chem.* 1976; **41**: 2352-2353.
173. Bodanszky M, Bednarek MA. Derivatives of S-9-fluorenylmethyl-L-cysteine., *Int. J. Pept. Protein. Res.* 1982; **20**: 434-437.
174. Ramachandran J, Li CH. Preparation of Crystalline N^G-Tosylarginine Derivatives. *J. Org. Chem.* 1962; **27**: 4006-4008.
175. Carpino LA, Shroff H, Triolo SA, Mansour ME, Wenschuh H, Albericio F. The 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl group (Pbf) as arginine side chain protectant. *Tetrahedron Lett.* 1993; **34**: 7829-7832.
176. Sieber P, Riniker B. Protection of histidine in peptide synthesis: A Reassessment of the trityl group. *Tetrahedron Lett.* 1987; **28**: 6031-6040.
177. Carpino LA, Chao HG, Beyermann M, Bienert M. ((9-Fluorenylmethyl)oxy)carbonyl amino-acid chlorides in solid-phase peptide- synthesis. *J. Org. Chem.* 1991; **56**(8): 2635-2642.
178. Bodanzsky M. in: *The peptides. Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 1, *Major Methods of peptide bond formation*. Gross, E., and Meyenhofer, J., Eds., Academic Press, New York, (1979) 105.
179. Meyenhofer J. in: *The peptides. Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 1, *Major Methods of peptide bond formation*. Gross, E., and Meyenhofer, J., Eds., Academic Press, New York, (1979) 263.



180. Rich DH, Singh, J. in: *The peptides. Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 1, *Major Methods of peptide bond formation*. Gross, E., and Meyenhofer, J., Eds., Academic Press, New York, (1979) 241
181. Sheeman JC, Hess GP. A new method of forming peptide bonds. *J. Am. Chem. Soc.* 1955; **77**: 1067-1068.
182. Kalir R, Warshawsky A, Fridkin M, Patchornik A. New useful reagents for peptide synthesis. Insoluble active esters of polystyrene-bound 1-hydroxybenzotriazole. *Eur. J. Biochem.* 1975; **59**: 55-61.
183. Izdebski J, Pachulska M, Orlowska A. N-cyclohexyl-N'-isopropylcarbodiimide: a hybrid that combines the structural features of DCC and DIC. *Int. J. Pept. Protein. Res.* 1994; **45**: 414-419.
184. Smith M, Moffatt JG, Khorana HG. Carbodiimides. VIII. Observations of the reactions of carbodiimides with acids and some new applications in the synthesis of phosphoric acids esters. *J. Am. Chem. Soc.* 1958; **80**: 6204-6212.
185. Merrifield RB, Woolley DW. The synthesis of L-Seryl-L-histidyl-L-leucyl-L-valyl-L-glutamic acid, a peptide with streptogenin activity, *J. Am. Chem. Soc.* 1956; **78**: 4646-4649.
186. Bates HS, Jones JH, Ramage WI, Witty MJ. in *Peptides*. (1980) *Proceedings of the 16th European Peptide Symposium*, BrunPeldt, K., Ed., Scriptor, Copenhagen, 185.
187. König W. Greiger R. Eine neue methode zur synthese von peptiden: Aktivierung der carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter zusatz von 1-Hydroxybenzotriazolen. *Chem. Ber.* 1970; **103**: 788-798.
188. König W. Greiger, R. N-Hydroxyverbindungen als katalysatoren für die aminolyse aktivierter ester. *Chem. Ber.* 1973; **106**: 3626-3635.
189. Prasad K.U, Iqbal MA, and Urry DW. Utilization of 1-Hydroxybenzotriazole in mixed anhydride coupling reactions. *Int. J. Pep. Protein. Res.* 1985; **25**: 408-413.
190. Castro B, Dormoy JR, Evin G, Selve C. Reactifs de couplage peptidique I(1)- 1' hexafluorophosphate de benzotriazolyl N-oxytrisdimethylamino phosphonium (B.O.P). *Tetrahedron Lett.* 1975; **16**: 1219-1222.
191. Castro B, Dourtoglou B, Dormay JR, Evin G, Selve, C, Ziegler JC. Peptide coupling reagents. VI. A novel, cheaper preparation of benzotriazolyl oxytris [dimethylamino] phosphonium hexafluorophosphate (BOP reagent). *Synthesis.* 1976; **18**: 751-752.



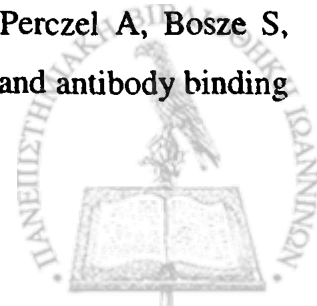
192. Coste J, Le Nguyen D, Castro B. PyBOP: A new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product. *Tetrahedron Lett.* 1990; **31**: 205-208.
193. Hoeg-Jensen T, Jakobsen MH, Olsen CE, Holm A. Formation of peptide thioamides by use of Fmoc amino monothioacids and PyBOP. *Tetrahedron Lett.* 1991; **32**: 7617-7620.
194. Knorr R, Trzeciak A, Bannawarth W, Gillsen D. New coupling reagents in peptide chemistry. *Tetrahedron Lett.* 1989; **30**: 1927-1930.
195. Dourtoglou V, Gross B, Lambropoulou V, Ziodrou C. O-Benzotriazolyl-N, N, N', N'-tetramethyloronium hexafluorophosphate as coupling reagent for the synthesis of peptides of biological interest. *Synthesis.* 1984; 572-574.
196. Dourtoglou V, Ziegler ZC, Gross B. A new method of glycosylation: anomeric hydroxyl activation by iminium salts. *Tetrahedron Lett.* 1979; **45**: 4367-4370.
197. Bernatowicz MS, Daniels SB, Koster H. A comparison of acid labile linkage agents for the synthesis of peptide C-terminal amides. *Tetrahedron Lett.* 1989; **30**: 4645-4648.
198. Stewart JM, Young JD. Solid phase peptide synthesis. *Pierce Chemical Company*, Rockford. 1984.
199. Tam JP, Heath WF, Merrifield RB. SN_2 deprotection of synthetic peptides with low concentration of HF in dimethyl sulfide evidence and application in peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 1983; **105**: 6442-6445.
200. Albericio F, Kneib-Cordonier N, Biancalana S, Gera L, Masada RI, Hudson D, Barany G. Preparation and application of the 5-(4-(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)aminomethyl-3,5-dimethoxyphenoxy)-valeric acid (PAL) handle for the synthesis of C-terminal peptide amides under mild conditions. *J. Org. Chem.* 1990; **55**: 3730-3743.
201. Bodanszky M, Kwei JH. Side reactions in peptide synthesis. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1978; **12**: 69-74.
202. Bodanszky M, Tolle JC, Desmane SS, Bodanszky A. Side reactions in peptide synthesis. VI., *Int. J. Pept. Protein Res.* 1978; **12**: 57-68.
203. Baba T, Sugiyama H, Seto S. Rearrangement of α - to β - aspartyl peptide with anhydrous hydrogen fluoride. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 1973; **21**: 207-209.
204. Folsch G. Synthesis of phosphopeptides. V. Further dipeptides, tripeptides, and O-phosphorylated derivatives of L-serine. *Acta Chem. Scand.* 1966; **20**: 459-473.
205. Merrifield RB. New approaches to the chemical synthesis of peptides. *Recent Prog. Horm. Res.* 1967; **23**: 451-482.



206. Ondetti MA, Deer JT, Sheehan J, Pluscec J, Kocy O. Side reactions in the synthesis of peptides containing the aspartylglylyl sequence. *Biochemistry*, 1968; **7**: 4069-4074.
207. Sondheimer E, Holley RW. Imides from asparagine and glutamine. *J. Am. Chem. Soc.* 1954; **76**: 2467-2470.
208. Tam P, Riemen MW, Merrifield RB. Mechanism of Aspartimide Formation: The Effects of protecting Groups, Acid, Base, Temperature and Time. *Peptide Research*. 1988; **17**: 6-18.
209. Feinberg RS, Merrifield RB. Modification of peptides containing glutamic acid by hydrogen fluoride-anisole mixtures. γ -acylation of anisole or the glutamyl nitrogen. *J. Am. Chem. Soc.* 1975; **97**: 3285-3494.
210. Tam JP, Wong TW, Rieman MW, Tjoeng FS, Merrifield RB. Cyclohexyl ester as a new protecting group for aspartyl peptides to minimize aspartimide formation in acidic and basic treatments. *Tetrahedron Lett.* 1979; **42**: 4033-4036.
211. Dolling R, Beyermann M, Haenel J, Kernchen F, Krause E, Franke P, Brudel M, Bienert M. Piperidine-mediated side product formation for Asp(oBu^t)-containing peptides. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1994; 853-854.
212. Packman LC. N-2-Hydroxy-4-Methoxybenzyl (Hmb) backbone protection strategy prevents double aspartimide formation in a 'difficult' peptide sequence. *Tetrahedron Lett.* 1995; **36**: 7523-7526.
213. Dalcol I, Rabanal F, Ludevid MD, Albericio F, Giralt E. Convergent Solid Phase Peptide Synthesis: An Efficient Approach to the Synthesis of Highly Repetitive Protein Domains. *J. Org. Chem.* 1995; **60**: 7575-7581.
214. DiMarchi R, Tam JP, Kent SBH, Merrifield RB. Weak acid-catalyzed pyrrolidone carboxylic acid formation from glutamine during solid phase peptide synthesis. Minimization by rapid coupling. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1982; **19**: 88-93.
215. Orłowska A, Witkowska E, Izdebski J. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1987; **30**: 141.
216. Papas S, Strogylis C, Tsikaris, V. Synthetic approaches for total chemical synthesis of proteins and protein-like macromolecules of branched architecture. *Current Organic Chemistry*. 2006; **10**: 1727-1744
217. Walker MA. Protein synthesis by chemical ligation of unprotected peptides in aqueous solution. *Chem. Int. Ed. Engl.* 1997; **10**: 1069-1071
218. Potocky T. Chemoselective ligation of proteins and glycoproteins. 2002



219. Li P, Rolle, PP. Cyclization strategies in peptide derived drug design. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2002; **2**: 325-341.
220. Mustapa MFM, Harris R, Esposito D, Chubb NAL, Mould J, Schultz D, Driscoll PC, Tabor AB. Synthesis of cyclic peptide containing norlanthionine: Effect of the thioether bridge on peptide conformation. *J. Org. Chem.* 2003; **68**: 8193-8198.
221. Jones DS, Coutts SM, Gamino CA, Inverson GM, Linnik MD, Randaw ME, Ton-Nu HT, Victoria EJ. Multivalent thioether- peptide conjugates: B cell tolerance of an anti-peptide immune response. *Bioconjugate Chem.* 1999; **10**: 480-488
222. Tugyi R, Mezo G, Fellinger E, Andreu D, Hudecz F. The effect of cyclization on the enzymatic degradation of herpes simplex virus glycoprotein D derived epitope peptide. *J. Peptide Sci.* 2005; **11**: 642-649.
223. Robey AF. Selective and facile cyclization of N-chloroacetylated peptides from the C₄ domain of HIV Gp₁₂₀ in LiCl/DMF solvent systems. *J. of Peptide Res.* 2000; **56**: 115-120.
224. Gazal S, Gellerman G, Glukhov E, Gilon C. Synthesis of novel protected N^a (ω -thioacyl) amino acid building units and their incorporation in backbone cyclic disulfide and thioetheric bridged peptides. *J. Peptide Res.* 2001; **58**: 527-539.
225. Grandjean C, Gras-Masse H, Melnyk O. Synthesis of clustered glycoside-antigen conjugates by two one-pot, orthogonal, chemoselective ligation reactions: Scope and limitations. *Chem. Eur. J.* 2001; **7**: 230-239.
226. Roberts KD, Lambert JN, Ede NJ, Bray AD. Efficient synthesis of thioether-based cyclic peptides libraries. *Tetrahedron Letters* 1998; **39**: 8357-8360.
227. Brunel MF, Dawson PE. Synthesis of constrained helical peptides by thioether ligation: application to analogs of gp41. *Chem. Commun. (J. Chem. Soc. Sect. D)* 2005; **20**: 2552-2554.
228. Bonnet D, Thiam K, Loing E, Melnyk O, Gras-Masse H. Synthesis by chemoselective ligation and biological evaluation of novel cell-permeable PKC- ζ pseudosubstrate lipopeptides. *J. Med. Chem.* 2001; **44**: 468-471.
229. Lung FDT, King CR, Roller PP. Development of non phosphorylated cyclic thioether peptide binding to Grb2-SH2 domain. *Letters in Peptide Science*. 1999; **6**: 45-49.
230. Schlosser G, Mezo G, Kiss R, Vass E, Majer Z, Fejlbjerg M, Perczel A, Bosze S, Welling-Wester S, Hudecz F. Synthesis, solution structure analysis and antibody binding



- of cyclic epitope peptides from glycoprotein D of Herpes simplex virus type I. *Biophysical Chemistry*. 2003; **106**: 155-171.
231. Mezo G, Manea M, Jakab A, Kapuvári B, Bosze S, Schlosser G, Przybylski M, Hudecz F. Synthesis and structural characterization of bioactive peptide conjugates using thioether linkage approaches. *J. Peptide Sci.* 2004; **10**: 701-713.
232. Englebretsen DR, Garnham B, Alewood PF. A cassette ligation strategy with thioether replacement of three Gly-Gly peptide bonds: Total chemical synthesis of the 101 residue protein early pregnancy factor [ψ (CH₂S)^{28-29,56-57, 76-77}]. *J. Org. Chem.* 2002; **67**: 5883-5889.
233. Futaki S, Ishikawa T, Niwa M, Kitagawa K, Yagami T. Embodying a stable α -helical protein structure through. Efficient chemical ligation via thioether formation. *Bioorg. Med. Chem.* 1997; **5**: 1883-1891.
234. Kaiser E, Colestock RL, Bossinger CD, Cook PI. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* 1970; **34**: 595.
235. Stathopoulos P, Papas S, Kostidis S, Tsikaris V. C-terminal N-alkylated peptide amides resulting from the linker decomposition of the Rink amide resin. A new cleavage mixture prevents their formation. *J. Peptide Sci.* 2006; **12**: 227-232.
236. Mant CT, Hodges RS. "High – Performance Liquid Chromatography of Peptides and proteins: Separation, Analysis and Conformation", *CRC Press, Inc., 2000 Corporate Blvd, N.W., Boca Rata, Florida*. 1991.
237. Caprioli MR, Malorni A, Sindona G. "Mass Spectrometry in Biomolecular Sciences", *Kluwer Academic Publishers*. 1993.
238. Stathopoulos P, Papas S, Kostidis S, Tsikaris V. α - and β - Aspartyl Peptide Ester Formation via Aspartimide Ring Opening. *J. Peptide Sci.* 2005; **11**: 658-664.
239. Angell YM, Alsina J, Albericio F, Barany G. Practical protocols for stepwise solid-phase synthesis of cysteine-containing peptides. *J. Peptide Res.* 2002; **60**: 292–299.
240. Leamon C, Reddy JA. Folate-targeted chemotherapy. *Adv. Drug Del. Reviews.* 2004; **56**: 1127-1141.
241. Li D, Elbert DL. The kinetics of the removal of the *N*-methyltrityl (Mtt) group during the synthesis of branched peptides. *J Pept Res* 2002; **60**: 300–303.

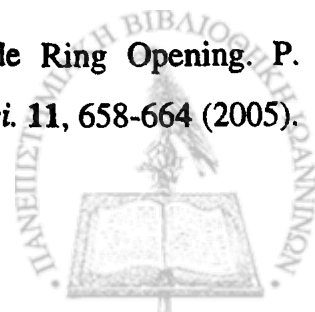


242. Damen EWP, Braamer L, Scheeren JW. Lanthanide trifluoromethanesulfonate catalysed selective acylation of 10-deacetylbaocatin III. *Tetrahedron Lett.* 1998; **39**: 6081-6082.
243. Poon GK, Wade J, Bloomer J, Clarke SE, Maltas J. Rapid screening of taxol metabolites in human microsomes by liquid chromatography/ electrospray ionization-mass spectrometry. *Rapid Communication In Mass Spectrometry* 1996; **10**: 1165-1168.
244. Georg GI, Harriman GCB, Datta A, Ali S, Cheruvallath Z, Dutta D, Vander Velde DG, Himes RH. The Chemistry of the Taxane Diterpene: Stereoselective Reductions of Taxanes. *J. Org. Chem.* 1998; **63**: 8926-8934.
245. Giraud M, Cavelier F, Martinez J. A side-reaction in the SPPS of Trp-containing peptides. *J. Pept. Sci.* 1999; **5**: 457-461.

19. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

I) ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. α - and β - Aspartyl Peptide Ester Formation via Aspartimide Ring Opening. P. Stathopoulos, S. Papas, S. Kostidis and V. Tsikaris. *J. Peptide Sci.* **11**, 658-664 (2005).



2. Synthetic approaches for total chemical synthesis of proteins and protein-like macromolecules of branched architecture. **S. Papas**, C. Strongylis and V. Tsikaris, *Curr. Org. Chem.* **10**, 1727-744 (2006).
3. C-terminal N-alkylated peptide amides resulting from the linker decomposition of the Rink amide resin. A new cleavage mixture prevents their formation. P. Stathopoulos, **S. Papas**, S. Kostidis and V. Tsikaris. *J. Peptide Sci.* **12**, 227-232 (2006).
4. «Synthesis and antitumor activity of peptide-paclitaxel conjugates». **S. Papas**, T. Akoumianaki, Ch. Kalogiros, L. Hadjiarapoglou, P. A. Theodoropoulos and V. Tsikaris. *J. Peptide Sci.* (2007) in press

II) ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΒΙΒΛΙΩΝ ΔΙΕΘΝΩΝ ΚΑΙ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ

1. α - and β -aspartyl peptide esters formation via aspartimide ring opening. P. Stathopoulos, **S. Papas**, S. Kostidis V. Tsikaris. In "Peptides 2004" (Flegel, M., Fridkin, M., Gilon, C., Slaninova, J., Eds.), 2004, pp.307-308.
2. α - and β - aspartyl peptide esters formation via aspartimide ring opening. P. Stathopoulos, **S. Papas**, S. Kostidis V. Tsikaris. 4th Hellenic Forum on Bioactive Peptides, (P.A. Cordopatis, E. Manessi-Zoupa and G.N. Pairas Eds.), TYPORAMA-Tachytypo Ltd, Patras, Greece, 2005, pp. 179-186.

III) ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ (abstract) ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΚΑΙ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Paclitaxel covalently bound to peptides and sequential oligopeptide carriers: synthesis and antitumor activity. **S. Papas**, C. Kalogiros, L. Hadjiarapoglou, T. Akoumianaki, P. Theodoropoulos and V. Tsikaris. 29th European Peptide Symposium, Gdansk, Poland. *J. Peptide Sci. Suppl.* **12**, pp. 226, 2006.
2. Formation of C-terminal N-alkylated amide byproducts in fmoc-based solid phase peptide synthesis. **S. Papas**, P. Stathopoulos and V. Tsikaris. 29th European Peptide Symposium, Gdansk, Poland. *J. Peptide Sci. Suppl.* **12**, pp. 116, 2006.
3. C-τελικά αλκυλιωμένα αμιδια πεπτιδίων κατά την σύνθεση σε στερεά φάση με την FMOC- στρατηγική. Ένα νέο μίγμα αντιδραστηρίων αποκοπής αποτρέπει τον



- σχηματισμό τους. Π. Σταθόπουλος, Σ. Παπάς και Β. Τσίκαρης. Πρακτικά 20^{ου} Πανελλήνιου Συνεδρίου Χημείας, Ιωάννινα, 2005, σελ. 213.
4. C-terminal alkylated peptide amides in Fmoc-based solid phase peptide synthesis. A new cleavage mixture prevents the formation of alkylated peptides. S. Papas, P. Stathopoulos and V. Tsikaris. 5^ο Hellenic Forum on Bioactive Peptides, Patras, Greece, Book of Abstracts 2006, pp. 50.
 5. Synthesis and antitumor activity of peptide-paclitaxel conjugates. S. Papas, C. Kalogiros, L. Hadjiarapoglou, T. Akoumianaki, P. Theodoropoulos and V. Tsikaris. 5^ο Hellenic Forum on Bioactive Peptides, Patras, Greece, Book of Abstracts 2006, pp. 38.
 6. Σύνθεση παραγώγων ταξόλης ομοιοπολικά προσδεδεμένων σε πεπτίδια και συνθετικούς φορείς πολλαπλών αντιγόνων. Σ. Παπάς, Χ. Καλόγηρος, Λ. Χατζηαράπογλου και Β. Τσίκαρης. Πρακτικά 20^{ου} Πανελλήνιου Συνεδρίου Χημείας, Ιωάννινα, 2005, σελ. 36.
 7. C-τελικά αλκυλιωμένα αμιδια πεπτιδίων κατά την σύνθεση σε στερεά φάση με την FMOC- στρατηγική. Ένα νέο μίγμα αντιδραστηρίων αποκοπής αποτρέπει τον σχηματισμό τους. Π. Σταθόπουλος, Σ. Παπάς και Β. Τσίκαρης. Πρακτικά 20^{ου} Πανελλήνιου Συνεδρίου Χημείας, Ιωάννινα, 2005, σελ. 213.

IV) Συντομογραφίες

- ⊕ **2-Cl-Z:** (2-Chlorobenzyloxycarbonyl), 2-Χλωροβενζυλοξυκαρβονυλο
- ⊕ **Ala (A):** (Alanine), Αλανίνη
- ⊕ **Arg (R):** (Arginine), Αργινίνη
- ⊕ **Asn (N):** (Asparagine), Ασπαραγίνη
- ⊕ **Asp (D):** (Aspartate), Ασπαρτικό
- ⊕ **Boc:** (tert-Butoxycarbonyl), τερτ-Βουτυλοξυκαρβόνυλο.



- **BOP:** [Benzotriazole-1-yl-oxy-tris(dimethylamino)-phosphonium hexafluorophosphate], εξαφθοροφωσφορικό αλας του βενζοτριαζολυλ-τρεις(διμεθυλαμινο) φωσφωνίου.
- **Bzl:** (Benzyl), Βένζυλο
- **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
- **ELISA:** (Enzyme-Linked-ImmunoSorbent Assay), Μέθοδος του Ενζυμοσυνδέτου Ανοσοπροσροφητικού Προσδιορισμού.
- **FBS:** (fetal bovine serum)
- **Fmoc:** (9-Fluorenylmethoxycarbonyl), 9-Φλουορενελμεθοξεκαρβονυλο.
- **Gln (Q):** (Glutamine), Γλουταμίνη
- **Glu (E):** (Glutamate), Γλουταμινικό
- **Gly (G):** (Glycine), Γλυκίνη
- **HBTU:** [2-(1H-Benzotriazole-1-yl)1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate], βενζοτριαζολ-τετραμεθυλο-ουρονικο-εξαφωσφορικό αλας.
- **HF:** (Hydrogen Fluoride), Υγρό Υδροφθόριο
- **HPLC:** (High Pressure Liquid Chromatography), υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης
- **His (H):** (Histidine), Ιστιδίνη
- **HOBt:** (N-Hydroxybenzotriazole), N-Υδροξυβενζοτριαζόλιο
- **Ile (I):** (Isoleukine), Ισολευκίνη
- **Leu (L):** (Leukine), Λευκίνη
- **Lys (K):** (Lysine), Λυσίνη
- **MeOH:** (Methanol), Μεθανόλη
- **Met (M):** (Methionine), Μεθειονίνη
- **MTT:** (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazol blue),
- **PBS:** διάλυμα φωσφορικού νατρίου
- **Phe (F):** (Phenylalanine), Φαινυλαλανίνη
- **Pro (P):** (Proline), Προλίνη



- ☞ **PyBOP:** (Benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate), εξαφθοροφωσφορικό αλας του βενζοτριαζολυλ-τρεις-πυρρολικδικο φωσφωνίου.
- ☞ **Ser (S):** (Serine), Σερίνη
- ☞ **TBTU:** [2-(1H-Benzotriazole-1-yl)1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate], βενζοτριαζολ-τετραμεθυλο-ουρονικο-τετραφθοροβορικό αλας.
- ☞ **TBS-Cl:** tert-butyl-dimethyl silyl chloride
- ☞ **tBu:** (tert-Butyl), τερτ-Βουτυλο
- ☞ **TFA:** (Trifluoroacetic acid), Τριφθοροξικό οξύ
- ☞ **Thr (T):** (Threonine), Θρεονίνη
- ☞ **TMS:** (Tetramethylsilane), Τετραμεθυλοσιλάνιο
- ☞ **Tos:** (Tosyl), Τοζυλ.
- ☞ **Trp (W):** (Tryptophane), Τρυπτοφάνη
- ☞ **Trt:** (Trityl), Τριτυλο.
- ☞ **Tyr (Y):** (Tyrosine), Τυροσίνη
- ☞ **Val (V):** (Valine), Βαλίνη
- ☞ **Yb(OTf)₃:** [Ytterbium(III) triflate]

