ΙΦΙΓΕΝΕΙΑΣ ΒΟΥΡΒΙΔΟΥ - ΦΩΤΑΚΗ
ΔΙΔΑΚΤΟΡΟΣ ΧΗΜΙΚΟΥ

ΠΕΡΙ ΟΞΥΤΟΚΙΝΗΣ

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΕΠΙ ΥΦΗΓΕΣΙΑ,

ΑΘΗΝΑΙ 1965

ND. 2679

ΙΦΙΓΕΝΕΙΑΣ ΒΟΥΡΒΙΔΟΥ - ΦΩΤΑΚΗ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΟΣ ΧΗΜΙΚΟΥ

ΕΘΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΤΕΚΜΗΡΙΩΣΕΩΝ

ΠΕΡΙ ΟΞΥΤΟΚΙΝΗΣ

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΕΠΙ ΥΦΗΓΕΣΙΑ

ΑΘΗΝΑΙ 1965

ΑΦΙΕΡΟΥΤΑΙ

ΕΙΣ ΤΟ **ΙΔΡΥΜΑ ΚΡΑΤΙΚΩΝ ΥΠΟΤΡΟΦΙΩΝ**
ΚΑΙ ΤΟ **ΒΑΣΙΛΙΚΟΝ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ**

ΕΙΣ ΕΝΔΕΙΞΙΝ ΕΥΓΝΩΜΟΣΥΝΗΣ

Ἡ ἐργασία αὕτη ἐξεπονήθη εἰς τὸ Ἐργαστήριον Ὀργανικῆς Χημείας τοῦ Πανεπιστημίου Ἀθηνῶν. Αἱ σχετικαὶ δαπάναι διετέθησαν ὑπὸ τοῦ Βασιλικοῦ Ἱδρύματος Ἐρευνῶν μέσῳ τοῦ Πανεπιστημίου Ἀθηνῶν.

Πρὸς τὸν Διευθυντὴν τοῦ Ἐργαστηρίου Ὀργανικῆς Χημείας, Καθηγητὴν κ. **Λ. Ζέρβαν,** ἐκφράζω τὰς θερμάς μου εὐχαριστίας διὰ τὴν συμπαράστασίν του καθ' ὅλην τὴν ἐπιστημονικήν μου ἐξέλιξιν.

Εὐχαριστῶ ἐπίσης τὸν Καθηγητὴν κ. Ζέρβαν, διότι ἔθεσεν εἰς τὴν διάθεσίν μου ὅλα τὰ ἐπιστημονικὰ ὄργανα καὶ τὰς συσκευὰς τοῦ Ἐργαστηρίου Ὀργανικῆς Χημείας, διὰ τὴν ἀντιμετώπισιν εἰδικῶν πειραματικῶν δυσχερειῶν συναφῶν πρὸς τὴν φύσιν τοῦ θέματός μου. Δι' ὡρισμένην πειραματικὴν ἐργασίαν ἐχρησιμοποίησα τὸν αὐτόματον συλλέκτην κλασμάτων τοῦ Ἐργαστηρίου Βιομηχανικῆς Χημείας, τὸν Διευθυντὴν τοῦ ὁποίου Καθηγητὴν κ. Ι. Ζαγανιάρην καὶ εὐχαριστῶ.

Εὐχαριστῶ ἐπίσης τὸν Καθηγητὴν κ. V. du Vigneaud, Department of Biochemistry, Cornell University, U. S. A. διὰ τὴν ἀποστολὴν δείγματος καθαρᾶς ὀξυτοκίνης, ὡς καὶ διὰ τὴν διεξαγωγὴν βιολογικοῦ ἐλέγχου ἐπὶ τῶν ἡμετέρων παρασκευασμάτων ὀξυτοκίνης. Εὐχαριστῶ ὁμοίως τὸν Dr. J. Rudinger, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czechoslovak Academy of Science, διὰ τὴν ἐκτέλεσιν ἐπίσης βιολογικοῦ ἐλέγχου.

Σύντομος πρόδρομος ἀνακοίνωσις μέρους τῆς ἐργασίας ταύτης ἐδημοσιεύθη εἰς τὸ περιοδικὸν Experientia, τομ. 20, σελ. 487, 1964.

Αἱ μικροαναλύσεις ἐξετελέσθησαν εἰς τὸ Ἐργαστήριον Μικροαναλύσεων τοῦ Β.Ι.Ε. ἀπὸ τὸν Δρα κ. Χ. Μάντζον, τὸν ὁποῖον εὐχαριστῶ. Εὐχαριστῶ ἐπίσης θερμῶς τὸν ἐπιστημονικὸν συνεργάτην μου, χημικὸν κ. Β. Μπαρδάκον, διὰ παρασχεθεῖσαν βοήθειαν κατὰ τὴν διάρκειαν ἐκτελέσεως μέρους τῆς παρούσης ἐργασίας.

'Η ὀρθὴ ὀνομασία τῆς ὁρμόνης εἶναι **ὠκυτοκίνη (ocytocin)**, ὡς προερχομένη ἐκ τῶν ἑλληνικῶν λέξεων ὠ κ ὺ ς καὶ τ ό κ ο ς (βλ. Γ. 'Ιωακείμογλου «Φαρμακολογία καὶ Συνταγολογία» τόμος 2, σελ. 402, 'Αθῆναι 1954, E. Bricas καὶ Cl. Fromageot «Naturally Occuring Peptides» εἰς Advances in Protein Chemistry, Vol. VIII, σελ. 93, Academic Press Inc., 1953). 'Εν τούτοις ἡ ὀνομασία **oxytocin** ἐπεκράτησε πλήρως, ὡς ἐμφαίνεται καὶ ἐκ τῆς παρατιθεμένης βιβλιογραφίας (βλ. σελ. 77). 'Η χρησιμοποίησις ὑφ' ἡμῶν τῆς ὀνομασίας **ὀξυτοκίνη** ἐγένετο ἀποκλειστικῶς καὶ μόνον πρὸς τὸν σκοπὸν ἀποκαταστάσεως συνδέσμου μετὰ τῆς διεθνοῦς βιβλιογραφίας.

ΣΥΜΒΟΛΙΚΗ ΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ

Διὰ τὴν ἀπεικόνισιν τῶν συντακτικῶν τύπων τῶν πεπτιδίων ἔχει γίνη παραδεκτὴ κατὰ τὰ τελευταῖα ἔτη μία «στενογραφικὴ γραφή», εἰς τὴν ὁποίαν τ' ἀμινοξέα παρίστανται διὰ τῶν τριῶν ἀρχικῶν των γραμμάτων. Αἱ διάφοροι ἐπίσης προστατευτικαὶ ὁμάδες, αἱ χρησιμοποιούμεναι εἰς τὴν πεπτιδικὴν Χημείαν, σημειοῦνται δι' ἑνός, δύο ἢ τριῶν γραμμάτων. Ἡ «στενογραφικὴ γραφὴ» τῶν ἀμινοξέων καὶ προστατευτικῶν ὁμάδων ἐπροτάθη ἀρχικῶς ὑπὸ τῶν Brand καὶ Edsall τῷ 1943. Κατὰ τὴν διάρκειαν τοῦ 3ου Εὐρωπαϊκοῦ Συμποσίου Πεπτιδικῆς Χημείας εἰς Basel Ἑλβετίας (1960) ὡρίσθη ἐπιτροπή, διὰ νὰ μελετήσῃ συντμήσεις χρησίμους διὰ δημοσιεύσεις ἐπὶ θεμάτων πεπτιδικῆς Χημείας. Ἡ ἐπιτροπὴ λαβοῦσα ὑπ' ὄψιν καὶ τοὺς «προσωρινοὺς κανόνας ἐπὶ συντμήσεων καὶ συμβόλων» τῆς διεθνοῦς Ἑνώσεως Καθαρᾶς καὶ Ἐφηρμοσμένης Χημείας, προέβη εἰς προτάσεις, αἱ ὁποῖαι ἐδημοσιεύθησαν εἰς τὰ πρακτικὰ τοῦ 5ου Εὐρωπαϊκοῦ Συμποσίου Πεπτιδικῆς Χημείας τοῦ συνελθόντος εἰς Oxford Ἀγγλίας (1962). Αἱ προτάσεις αὗται ἠκολουθήθησαν καὶ εἰς τὴν παροῦσαν ἐργασίαν.

Πρὸς διευκόλυνσιν τῶν ἀναγνωστῶν τῆς παρούσης διατριβῆς δίδομεν κατωτέρω τὸν κώδικα τῆς χρησιμοποιηθείσης «στενογραφικῆς γραφῆς».

I. Συντμήσεις ἀμινοξέων

Gly = γλυκίνη

Leu = λευκίνη

Pro = προλίνη

Asp = ἀσπαραγινικὸν ὀξὺ μὲ ἐλεύθερον τὸ β-COOH

$$\mathrm{Asp(NH_2)},\ \underset{\displaystyle \mathrm{NH_2}}{\mathrm{Asp}},\ \overset{\displaystyle \mathrm{NH_2}}{\mathrm{Asp}} = \text{ἀσπαραγίνη}$$

Glu = γλουταμινικὸν ὀξὺ μὲ ἐλεύθερον γ-COOH

$$\mathrm{Glu(NH_2)},\ \underset{\displaystyle \mathrm{NH_2}}{\mathrm{Glu}},\ \overset{\displaystyle \mathrm{NH_2}}{\mathrm{Glu}} = \text{γλουταμίνη}$$

Ile = ἰσολευκίνη

Tyr = τυροσίνη μὲ ἐλευθέραν τὴν -OH ὁμάδα τῆς πλευρικῆς ἁλύσου.

Tyr , Tyr = τυροσίνη μὲ ὑποκατεστημένην τὴν -OH ὁμάδα

Cys = κυστεΐνη μὲ ἐλευθέραν τὴν -SH ὁμάδα

Cys , Cys = κυστεΐνη μὲ ὑποκατεστημένην τὴν -SH ὁμάδα

Cys Cys , Cys , Cys Cys = κυστίνη (γέφυρα θείου)

Phe = φαινυλαλανίνη
Arg = ἀργινίνη
Ser = σερίνη

Τὰ αὐτὰ σύμβολα ἀμινοξέων γραφόμενα μὲ παῦλαν (—) ἀριστερὰ τοῦ συμβόλου δεικνύουν ὑποκατάστασιν εἰς τὴν α-ἀμινομάδα, μὲ παῦλαν δεξιὰ ὑποκατάστασιν εἰς τὴν α-καρβοξυλικὴν ὁμάδα καὶ μὲ δύο παύλας, π. χ. —Glv—, ὑποκατάστασιν τόσον εἰς τὴν α-ἀμινομάδα, ὅσον καὶ εἰς τὴν α-καρβοξυλικὴν ὁμάδα, ἤτοι ἔνταξιν ἐντὸς πεπτιδίου ἢ ἄλλης ἑνώσεως.

II. Συντμήσεις προστατευτικῶν ὁμάδων

Z = καρβοβενζοξυομάς, $C_6H_5CH_2OCO$—
Tos = τοζυλομάς, $CH_3C_6H_4SO_2$—
BZL = βενζυλομάς, $C_6H_5CH_2$—
Bz = βενζουλομάς, C_6H_5CO—
Ac = ἀκετυλομάς, CH_3CO—
TRI = τριτυλομάς, $(C_6H_5)_3C$—
DPM = διφαινυλομεθυλομάς, $(C_6H_5)_2CH$—
BOC = t-βουτυλοξυκαρβονυλομάς, $(CH_3)_3COCO$—
NPS = ο-νιτροφαινυλοσουλφενυλομάς, $NO_2C_6H_4S$—
OMe = μεθυλεστήρ, CH_3O—
OEt = αἰθυλεστήρ, C_2H_5O—
ONP = p-νιτροφαινυλεστήρ, $NO_2C_6H_4O$—

III. Ἄλλαι συντμήσεις

NEt_3 = τριαιθυλαμίνη
DCCI = δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμίδιον
DMF = διμεθυλοφορμαμίδιον

Σημείωσις: Τὰ ἀναγραφόμενα ἐντὸς τοῦ κειμένου ἀμινοξέα θεωροῦνται ὡς ἀνήκοντα εἰς τὴν L-στερεοχημικὴν οἰκογένειαν, ἐκτὸς ἐὰν ἄλλως πως σημειοῦται.

Α΄ ΘΕΩΡΗΤΙΚΟΝ ΜΕΡΟΣ

Σήμερον θεωρεῖται αὐτονόητον, ὅτι πρωτεΐναι καὶ πεπτίδια ἀνήκουν εἰς τὸ αὐτὸ πεδίον ἐρεύνης. Πρὸ 30 περίπου ἐτῶν ὁ συσχετισμὸς πρωτεϊνῶν καὶ πεπτιδίων ἦτο ἀπόρροια περισσότερον χημικῆς διαισθήσεως καὶ ὀλιγώτερον ἀπόρροια πειραματικῶν ἐπιτευγμάτων. Βεβαίως κατὰ τὸν χρόνον ἐκεῖνον ἡ ἀντίληψις περὶ τῆς πεπτιδικῆς συστάσεως τῶν πρωτεϊνῶν ἦτο εὐρύτατα διαδεδομένη καὶ εἰς γενικὰς γραμμὰς παραδεδεγμένη, πάντως ὅμως ἦτο ἀκόμη θεωρία.

Ἡ ἀποφασιστικὴ περίοδος διὰ τὴν ἀπόδειξιν τῆς συντάξεως τῶν πρωτεϊνῶν ὑπῆρξεν ἡ περίοδος ἐκείνη, κατὰ τὴν ὁποίαν ἀπεκαλύφθη καὶ διηρευνήθη πλήρως ἡ «εἰδίκευσις» τῶν πρωτεολυτικῶν φυραμάτων. Τοῦτο, μὲ τὴν σειράν του, κατέστη δυνατὸν μόνον χάρις εἰς τὰς ἐν τῷ μεταξὺ πραγματοποιηθείσας προόδους εἰς τὴν ἀνεύρεσιν νέων μεθόδων πεπτιδικῶν συνθέσεων. Ἡ πλήρης διερεύνησις τῆς εἰδικεύσεως τῶν πρωτεολυτικῶν ἐνζύμων, ἡ διαμόρφωσις νέων ἐργαστηριακῶν μεθόδων ἀπομονώσεως καὶ καθαρισμοῦ πολυπλόκων ἑνώσεων, ὡς καὶ ἡ εἰσαγωγὴ νέων ἀναλυτικῶν μεθόδων πρὸς μελέτην τῶν προβλημάτων πρωτεϊνῶν καὶ πεπτιδίων εἶχον ὡς ἀποτέλεσμα τὴν διαπίστωσιν τῆς πεπτιδικῆς φύσεως τῆς πρωτοταγοῦς συντάξεως τῶν πρωτεϊνῶν. Ἡ πεπτιδικὴ θεωρία ἀπεδείχθη ὡς ἀναμφισβητήτως ὀρθή. Τὸ γεγονὸς τοῦτο ἐπηύξησε τὸ ἐνδιαφέρον τῶν ἐρευνητῶν διὰ τὰ πεπτίδια.

Παραλλήλως ὅμως πρὸς τὰ ἀνωτέρω διεπιστώθη καὶ τὸ ἑξῆς σημαντικὸν γεγονός: Αἱ καταλυτικαὶ ἰδιότητες τῶν πρωτεολυτικῶν φυραμάτων ἢ ἡ εἰδικὴ βιολογικὴ δρᾶσις ὡρισμένων πολυπεπτιδίων ἢ ὡρισμένων πρωτεϊνῶν δὲν ὀφείλονται εἰς τὴν ὕπαρξιν ἀγνώστων τινῶν συστατικῶν ἢ ἀγνώστου ἐπὶ μέρους συντάξεως τοῦ μορίου των ἀλλ' εἶναι συνάρτησις τῆς φύσεως, τοῦ ἀριθμοῦ καὶ τῆς ἀλληλουχίας τῶν ἀμινοξέων εἰς τὴν πεπτιδικὴν ἅλυσον. Οὕτω π. χ. τὸ πρωτεολυτικὸν φύραμα πεψίνη — μία πρωτεΐνη — καταλύει τὴν ὑδρόλυσιν ἄλλων πρωτεϊνῶν ἀκόμη καὶ πεπτιδίων. Ἡ βραδυκινίνη — μία ὁρμόνη τῶν ἱστῶν, ἀπὸ συντακτικῆς δὲ ἀπόψεως ἓν ἐννεαπεπτίδιον — ἀσκεῖ ἰδιάζουσαν βιολογικὴν δρᾶσιν ἐπὶ τῶν λείων μυῶν καὶ τῆς πιέσεως τοῦ αἵματος.

Τὴν ἀφετηρίαν διὰ τὰς σημαντικὰς ταύτας προόδους — καὶ μάλιστα εἰς σχετικῶς βραχὺ χρονικὸν διάστημα — τῆς Χημείας τῶν πρωτεϊνῶν καὶ

πεπτιδίων ἀπετέλεσεν ἡ καθαρὰ Ὀργανικὴ Χημεία καὶ αἱ συνθετικαὶ αὐτῆς μέθοδοι. Τὸ πλέον χαρακτηριστικὸν παράδειγμα τῆς σημασίας τῶν νέων χημικῶν μεθόδων ἀποτελεῖ ἡ ἀπομόνωσις εἰς χημικῶς καθαρὰν κατάστασιν, ἡ ἀνεύρεσις τῆς χημικῆς των συντάξεως καὶ ἡ συνθετικὴ παρασκευὴ ὁρμονῶν πολυπεπτιδικῆς φύσεως, ποὺ ἀπαντοῦν εἰς τὴν ὑπόφυσιν, τῆς ὀξυτοκίνης καὶ τῆς βασοπρεσσίνης. Ἡ παράλληλος σύνθεσις πολλῶν «ἀναλόγων» τῶν ὁρμονῶν τούτων κατέστησεν δυνατὴν τὴν μελέτην τῶν σχέσεων βιολογικῆς δράσεως καὶ συντάξεως. Περαιτέρω ἡ σύνθεσις τῆς ὀξυτοκίνης ἀπετέλεσε τὸ ἔναυσμα διὰ τὴν δοκιμασίαν καὶ χρησιμοποίησιν τῶν νέων χημικῶν μεθόδων εἰς τὴν σύνθεσιν ἀκόμη πολυπλοκωτέρων πεπτιδικῶν ὁρμονῶν, ὅπως ἡ κορτικοτροπίνη (ACTH). Ἀπό τινος αἱ συνθετικαὶ μέθοδοι προσβάλλουν καὶ αὐτὰς τὰς προσβάσεις τῶν πρωτεϊνῶν. Τὰ πρῶτα ἀποτελέσματα, ἡ σύνθεσις μεγάλων τμημάτων πρωτεϊνικῶν μορίων, ἀκόμη καὶ αὐτὴ ἡ συνθετικὴ παρασκευή — ἔστω καὶ μὲ ἐλαχίστην ἀπόδοσιν — ὑλικοῦ παρουσιάζοντος τὰς βιολογικὰς δράσεις τῆς ἰνσουλίνης ἀποτελοῦν τὸν πρόλογον νέων κατορθωμάτων τῆς συνθετικῆς Χημείας. Παραλλήλως ὅμως πρὸς τὴν πρόοδον ταύτην καθίσταται σαφές, ὅτι αἱ νέαι χημικαὶ μέθοδοι, ἰδίως αἱ συνθετικαί, πρέπει νὰ τελειοποιηθοῦν ἔτι περαιτέρω καὶ νὰ προσαρμοσθοῦν εἰς τὰς ηὐξημένας ἀπαιτήσεις τῆς σημερινῆς Χημείας καὶ Βιοχημείας.

Ἡ παροῦσα διατριβὴ ἀποτελεῖ μίαν συμβολὴν εἰς τὴν Χημείαν τῆς ὀξυτοκίνης, ἡ ὁποία ὡς ἀνωτέρω ἐλέχθη, ἐξήσκησε τόσον μεγάλην ἐπιρροὴν ἐπὶ τῆς προόδου τῆς Χημείας τῶν πρωτεϊνῶν καὶ πεπτιδίων.

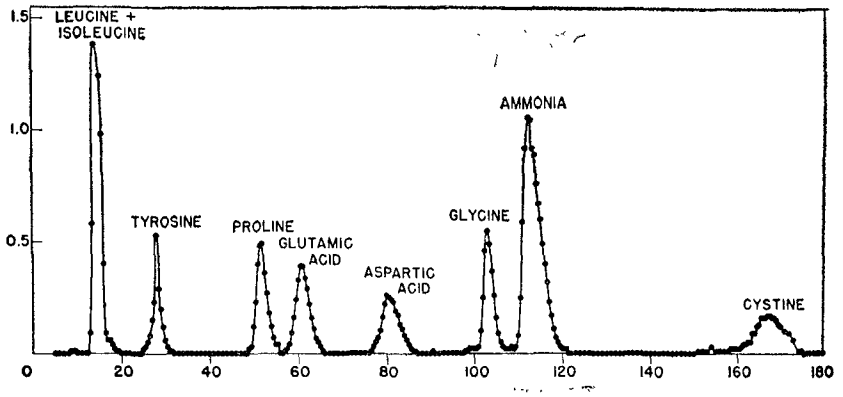
Ἀπομόνωσις ὁρμονῶν τοῦ ὀπισθίου λοβοῦ τῆς ὑποφύσεως.

Ἡ βιολογικὴ δρᾶσις τῶν ὁρμονῶν τοῦ ὀπισθίου λοβοῦ τῆς ὑποφύσεως, ὀξυτοκίνης καὶ βασοπρεσσίνης ἦτο γνωστὴ ἀπὸ μακροῦ. Οἱ Oliver καὶ Schäfer (1) τῷ 1895 ἀνεκάλυψαν, ὅτι ἐκχυλίσματα τῆς ὑποφύσεως ἐνιέμενα εἰς θηλαστικὰ προκαλοῦν αὔξησιν τῆς πιέσεως τοῦ αἵματος (pressor effect). Τῷ 1898 ὁ Howell (2) ἔδειξεν, ὅτι ἡ πηγὴ τῆς βιολογικῆς δραστικότητος εὑρίσκεται εἰς τὸν ὀπίσθιον λοβὸν τῆς ὑποφύσεως. Ἔκτοτε διεπιστώθησαν καὶ ἄλλαι βιολογικαὶ δράσεις τῶν ἐκχυλισμάτων τῆς ὑποφύσεως, ὅπως ἡ ἱκανότης συστολῆς τῆς μήτρας, ἡ ὠκυτόκιος ἐπίδρασις (uterine contracting, oxytocic effect) ὑπὸ τοῦ Dale (3) τῷ 1906, ἡ ἐπίδρασις ἐπὶ τῆς ἐκθλίψεως τοῦ γάλακτος (milk ejecting effect) ὑπὸ τῶν Ott καὶ Scott (4) τῷ 1910, ἡ κατασταλτικὴ ἐπίδρασις ἐπὶ τῆς πιέσεως τοῦ αἵματος τῶν πτηνῶν (avian depressor effect) ὑπὸ τῶν Paton καὶ Watson (5) τῷ 1912 καὶ ἡ ἀντιδιουρητικὴ ἐπίδρασις (antidiuretic effect) ὑπὸ τοῦ von den Velden (6), τῷ 1913.

Κατ' ἀρχὰς αἱ διαφόρου εἴδους βιολογικαὶ δραστικότητες ἀπεδίδοντο εἰς μίαν οὐσίαν, ἀλλὰ τῷ 1928 ὁ Kamm καὶ οἱ συνεργάται του (7) παρεσκεύασαν συμπεπυκνωμένα ἐκχυλίσματα τῆς ὑποφύσεως, εἰς τὰ ὁποῖα εἶχον ἐπιτύχει μερικὸν διαχωρισμὸν τῆς ὠκυτοκίου δράσεως, ὀφειλομένης εἰς τὴν ὀνομασθεῖσαν ὀξυτοκίνην, ἀπὸ τῆς ἀγγειοτόνου δραστικότητος, ὀφειλομένης εἰς τὴν ὀνομασθεῖσαν βασοπρεσσίνην. Τὸ πρῶτον ὅμως καθαρὸν παρασκεύασμα ὀξυτοκίνης φυσικῆς προελεύσεως, παρεσκευάσθη ὑπὸ τῶν du Vigneaud καὶ Livermore (8) χάρις εἰς τὴν ἐν τῷ μεταξὺ διαμορφωθεῖσαν ὑπὸ τοῦ Craig μέθοδον καθαρισμοῦ οὐσιῶν διὰ κατανομῆς κατ' ἀντιρροήν (9). Ὁ ποσοτικὸς προσδιορισμὸς τῶν συνιστώντων τὴν καθαρὰν ὀξυτοκίνην ἀμινοξέων ἐγένετο ἐπὶ τῇ βάσει τῆς ἐπίσης προσφάτως, τότε, διαμορφωθείσης μεθόδου τῶν Stein καὶ Moore (10).

Ἀπομόνωσις τῆς ὀξυτοκίνης καὶ βασοπρεσσίνης, εἰς καθαρὰν κατάστασιν.

Οἱ du Vigneaud καὶ Livermore (8) χρησιμοποιοῦντες ὡς ἀρχικὴν οὐσίαν κλάσματα ὀξυτοκίνης παρασκευασθέντα κατὰ τὴν μέθοδον τοῦ Kamm, ὑπέβαλον ταῦτα εἰς καθαρισμὸν ἐπὶ τῇ βάσει τῆς ὡς ἄνω μεθόδου τοῦ Craig. Οὕτω διὰ κατανομῆς μεταξὺ 0,05 % ὀξεικοῦ ὀξέος καὶ δευτεροταγοῦς βουτανόλης ἔλαβον βιολογικῶς ἐνεργὸν κλᾶσμα, τοῦ ὁποίου



Σχῆμα 1. — Διαχωρισμὸς τῶν ἀμινοξέων τοῦ ὑδρολύματος ὀξυτοκίνης, διὰ στήλης ἀμύλου κατὰ Stein καὶ Moore (ψ= συγκέντρωσις εἰς millimoles, x = ὑγρὸν ἐκλούσεως εἰς ml). Ἐκ τοῦ: A Trail of Research etc., V. du Vigneaud, Cornell University Press, σ. 174, 1952.

ἡ συμπεριφορὰ ἐδείκνυεν, ὅτι ἀπετελεῖτο ἀπὸ ὁμοιογενῆ οὐσίαν. Τὴν οὐσίαν ταύτην ὑπέβαλον εἰς ὑδρόλυσιν (11) καὶ εἰς τὸ ὑδρόλυμα προσδιώ-

ρισαν ποσοτικῶς τὰ περιεχόμενα ἀμινοξέα μὲ τὴν μέθοδον Stein καὶ Moore (βλ. σχῆμα 1). Ἀποτέλεσμα τῆς ἀναλύσεως ταύτης ἦτο ἡ διαπίστωσις, ὅτι ἡ ὀξυτοκίνη ἀποτελεῖται ἐξ ὀκτὼ ἀμινοξέων εἰς μοριακὴν ἀναλογίαν 1 : 1 καὶ ἐκ τριῶν μορίων ἀμμωνίας. Ὁ προσδιορισμὸς τοῦ μοριακοῦ βάρους τοῦ ὡς ἄνω καθαροῦ παρασκευάσματος ὀξυτοκίνης, διὰ τοῦ θερμοηλεκτρικοῦ ὀσμωμέτρου (13), ἔδωσε τιμὴν ἴσην περίπου πρὸς 1.000. Ἐκ τῆς καθαρᾶς ταύτης ὀξυτοκίνης παρεσκευάσθη καὶ τὸ πρῶτον κρυσταλλικὸν ἅλας μετὰ φλαβιανικοῦ ὀξέος (12).

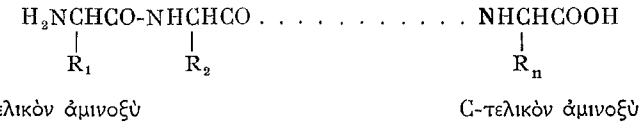
Παραλλήλως πρὸς τὰς μελέτας αὐτὰς ἀπεμονώθη ὑπὸ τοῦ du Vigneaud, ἐπίσης ἐκ τῆς ὑποφύσεως βοός, καὶ ἡ προκαλοῦσα ὑπέρτασιν ὁρμόνη βασοπρεσσίνη καὶ διεπιστώθη, ὅτι αὕτη περιέχει 3 μόρια ἀμμωνίας, 6 ἀμινοξέα ὅμοια μὲ τὴν ὀξυτοκίνην καὶ δύο διάφορα, ἤτοι φαινυλαλανίνην ἀντὶ ἰσολευκίνης καὶ ἀργινίνην ἀντὶ λευκίνης.

Ἡ ἀπομόνωσις τῶν ὁρμονῶν τούτων εἰς χημικῶς καθαρὰν κατάστασιν, ὁ προσδιορισμὸς τοῦ μοριακοῦ βάρους, ὡς καὶ τῶν συνιστώντων τὸ μόριον φυσικῶν ἀμινοξέων, ἀπετέλεσαν τὴν ἀφετηρίαν διὰ τὴν διερεύνησιν τοῦ συντακτικοῦ καὶ στερεοχημικοῦ αὐτῶν τύπου.

Ἐξεύρεσις τῆς συντάξεως καὶ εἰδικώτερον τῆς ἀλληλουχίας τῶν ἀμινοξέων εἰς πεπτιδικὴν ἅλυσον (sequential analysis).

Κατωτέρω ἀναφέρονται αἱ σπουδαιότεραι μέθοδοι ἀνευρέσεως τῆς συντάξεως:

I. Μέθοδοι ἐξευρέσεως τῶν N-τελικῶν ἀμινοξέων, ἤτοι τῶν ἀμινοξέων τῶν εὑρισκομένων εἰς τὸ ἄκρον τῆς πεπτιδικῆς ἁλύσου, τὸ φέρον ἐλευθέραν α-ἀμινομάδα.

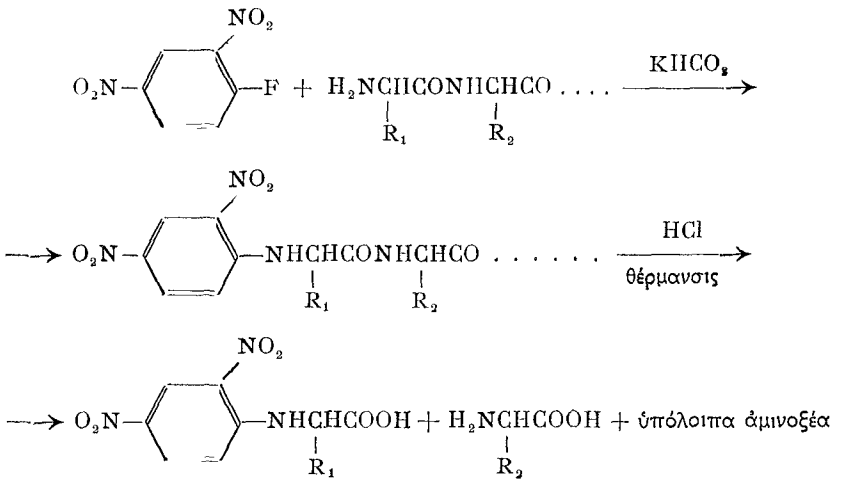


Α'. Χημικαὶ μέθοδοι. Αἱ μέθοδοι αὗται συνίστανται εἰς τὴν δέσμευσιν τῆς ἐλευθέρας ἀμινομάδος διὰ μιᾶς εἰδικῆς ὁμάδος ἀνθεκτικῆς ἔναντι ὑδρολυτικῶν ἀντιδραστηρίων καὶ ἐν συνεχείᾳ ἀπόσπασιν τοῦ οὕτως ὑποκατεστημένου N-τελικοῦ ἀμινοξέος ἐκ τοῦ ὑπολοίπου μορίου τῇ ἐπιδράσει ὑδρολυτικῶν μέσων.

Χρησιμοποιοῦνται δύο κυρίως μέθοδοι:

α) ***Ἡ δινιτροφαινυλο-μέθοδος τοῦ*** Sanger (14). Ὡς ἀντιδραστήριον

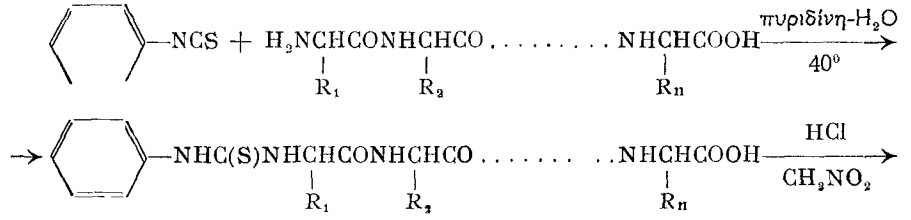
διὰ τὴν ὑποκατάστασιν τῆς ἀμινομάδος χρησιμοποιεῖται τὸ 1-φθορο-2,4-δινιτροβενζόλιον, τὸ ὁποῖον ἀντιδρᾷ εἰς ἀλκαλικὸν περιβάλλον μὲ τὴν ἐλευθέραν ἀμινομάδα πεπτιδίου ἢ πρωτεΐνης πρὸς σχηματισμὸν δινιτροφαινυλοπαραγώγου (DNP-παράγωγον).

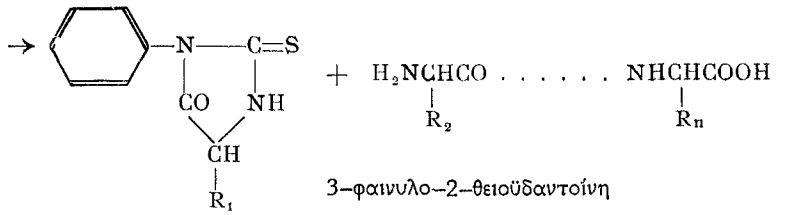


(N-DNP-ἀμινοξύ, κίτρινον)

Τὸ οὕτω ληφθὲν N-DNP-παράγωγον ὑποβάλλεται ἐν συνεχείᾳ εἰς ὑδρόλυσιν δι' ὀξέος καὶ τὰ προϊόντα τῆς ὑδρολύσεως, N-DNP-ἀρχικὸν ἀμινοξὺ καὶ ὑπόλοιπα ἐλεύθερα ἀμινοξέα, διαχωρίζονται χρωματογραφικῶς. Ἐφ' ὅσον ὅλα τὰ DNP-παράγωγα τῶν ἀμινοξέων εἶναι γνωστά, ἡ πιστοποίησις τῆς ταυτότητος τοῦ κατὰ τὴν ὡς ἄνω διαδικασίαν ληφθέντος N-DNP-ἀμινοξέος εἶναι εὔκολος.

β) ***Ἡ ἀποικοδόμησις κατὰ*** Edman (15). Κατὰ τὴν μέθοδον ταύτην τὸ πεπτίδιον ἢ ἡ πρωτεΐνη κατεργάζονται μὲ φαινυλοϊσοθειοκυανικὸν ἐστέρα καὶ ἐκ τοῦ προκύπτοντος φαινυλοϊσοθειοκυανικοῦ παραγώγου τῇ ἐπιδράσει HCl, εἰς ἄνυδρα διαλυτικά, ἀποσπᾶται τὸ πρῶτον ἀμινοξὺ ὑπὸ μορφὴν φαινυλοθειοϋδαντοΐνης, ἐνῷ ἡ ὑπόλοιπος πεπτιδικὴ ἅλυσος παραμένει ἀναλοίωτος:





3–φαινυλο–2–θειοϋδαντοίνη

Ἡ ἀποσπωμένη θειοϋδαντοΐνη ἐκχυλίζεται δι' αἰθέρος καὶ προσδιορίζεται εἴτε κατόπιν ὑδρολύσεως πρὸς τὸ ἀρχικὸν ἀμινοξύ, ἢ καὶ ὡς τοιαύτη.

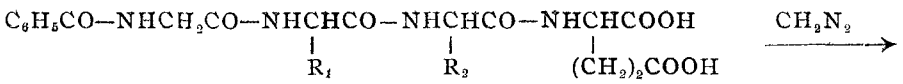
Θεωρητικῶς ἡ ἀποικοδόμησις δύναται νὰ ἐπαναληφθῇ καὶ οὕτω νὰ χρησιμοποιηθῇ διὰ τὸν προσδιορισμὸν τῆς ἀλληλουχίας ὅλων τῶν ἀμινοξέων τοῦ πεπτιδίου. Πρακτικῶς ὅμως, μόνον δι' ἕνα μικρὸν ἀριθμὸν (π.χ. 3 - 5) διαδοχικῶν ἀμινοξέων δύναται νὰ δώσῃ σαφῆ ἀποτελέσματα.

Β'. Ἐνζυματικαὶ μέθοδοι. Τὸ ἔνζυμον λευκιναμινοπεπτιδάση (16) ὑδρολύει πεπτιδικοὺς δεσμοὺς ἀνήκοντας εἰς ἀμινοξέα μὲ ἐλευθέραν ἀμινομάδα, ἤτοι διασπᾶ μίαν πεπτιδικὴν ἅλυσον Α - Β - Γ - Δ... ἐκ τοῦ Ν-τελικοῦ τμήματός της πρὸς τὸ ἀρχικὸν ἀμινοξὺ Α καὶ τὸ πεπτίδιον Β - Γ - Δ... Ἡ ἐπίδρασις τοῦ φυράματος συνεχίζεται μόλις ἐμφανισθῇ ἡ νέα ἐλευθέρα ἀμινομὰς τοῦ ἑπομένου ἀμινοξέος Β. Οὕτω ἡ ὑδρόλυσις τοῦ πεπτιδικοῦ δεσμοῦ μεταξὺ τοῦ ἀμινοξέος Β καὶ τοῦ ὑπολοίπου τῆς πεπτιδικῆς ἁλύσου Γ-Δ... ἄρχεται πρὶν ἢ ὁλοκληρωθῇ ἡ ἀπόσπασις τοῦ ἀμινοξέος Α. Τὸ αὐτὸ ἰσχύει καὶ διὰ τὰ ἑπόμενα ἀμινοξέα Γ, Δ κλπ. Ἐξ ἄλλου, σχετικαὶ ἔρευναι ἀπέδειξαν ὅτι, τὰ διάφορα ἀμινοξέα ἀποσπῶνται μὲ διάφορον ταχύτητα ἐκ τῆς πεπτιδικῆς ἁλύσου, ἡ διαφορὰ δὲ αὕτη εἶναι πολλάκις σημαντική. Ἐκ τῆς σχετικῆς ταχύτητος ἐμφανίσεως τῶν ἐλευθέρων ἀμινοξέων Α, Β, Γ, Δ, συμπεραίνεται περὶ τῆς ἀλληλουχίας αὐτῶν εἰς τὸ Ν - τελικὸν τμῆμα τῆς πεπτιδικῆς ἁλύσου.

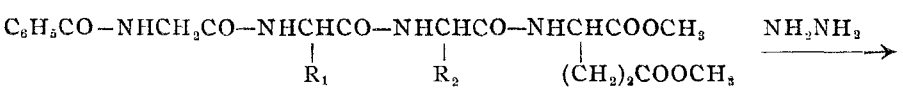
ΙΙ. Μέθοδοι ἐξευρέσεως τῶν C - τελικῶν ἀμινοξέων, ἤτοι τῶν ἀμινοξέων τῶν εὑρισκομένων πρὸς τὸ ἄκρον τῆς ἁλύσου τὸ φέρον ἐλεύθερον καρβοξύλιον.

Α'. **Χημικαὶ μέθοδοι.** Ἐκ τῶν διαφόρων μεθόδων ἀναφέρομεν τὰς κάτωθι :

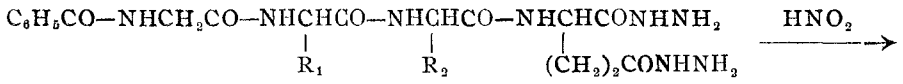
α) Τῷ 1936 οἱ Bergmann καὶ Zέρβας (17) διεμόρφωσαν μέθοδον διὰ τῆς ὁποίας τὸ C-τελικὸν ἀμινοξὺ μιᾶς πεπτιδικῆς ἁλύσου μετατρέπεται εἰς ἀλδεΰδην μὲ ἓν ἄτομον ἄνθρακος ὀλιγώτερον, διατηρουμένης τῆς ὑπολοίπου ἁλύσου. Ἡ σειρὰ τῶν πραγματοποιουμένων ἀντιδράσεων ἔχει ὡς κατωτέρω :



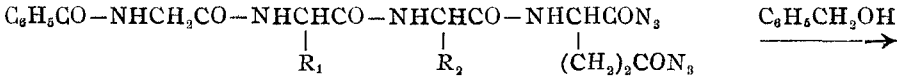
Βενζοϋλο - γλυκυλο - αλανυλο - λευκυλο - γλουταμινικὸν ὀξὺ



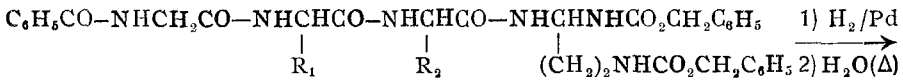
Ἐστὴρ



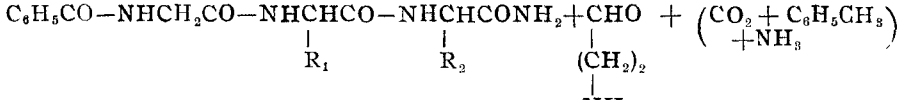
Ὑδραζίδιον



Ἀζίδιον



Βενζοϋλο - ουρεθάνη

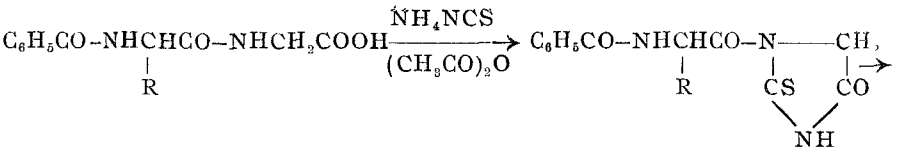


Βενζοϋλο - γλυκυλο - αλανυλο - λευκιναμίδιον, β-ἀμινοπροπιονικὴ ἀλδεΰδη (ἐκ τοῦ γλουταμινικοῦ ὀξέος)

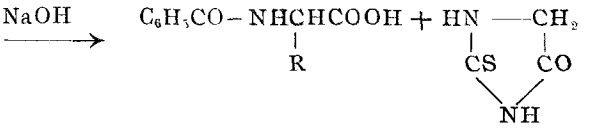
$$R_1 = CH_3, \quad R_2 = CH_2CH(CH_3)_2$$

Ἐπαναλαμβανομένης τῆς αὐτῆς σειρᾶς ἀντιδράσεων λαμβάνεται ἰσοβαλεριανικὴ ἀλδεΰδη ἐκ τῆς λευκίνης, ἀκεταλδεΰδη ἐκ τῆς ἀλανίνης καὶ βενζοϋλογλυκιναμίδιον. Ὡς καὶ ἡ ἀντίστοιχος ἀποικοδόμησις κατὰ Edman (I, Α΄β), ἡ μέθοδος αὕτη ἔχει πρακτικῶς ἐφαρμογὴν μόνον ἐπὶ μικροῦ ἀριθμοῦ διαδοχικῶν ἀμινοξέων.

β) Ἡ μέθοδος τῶν Schlack καὶ Kumpf (18) συνίσταται εἰς τὴν ἐπίδρασιν ὀξεικοῦ ἀνυδρίτου καὶ θειοκυανιούχου ἀμμωνίου ἐπὶ N-ἀκυλοπεπτιδίων, ὁπότε ἐκ τοῦ τελικοῦ ἀμινοξέος σχηματίζεται θειοϋδαντοΐνη, π. χ.



N - Βενζοϋλο - λευκυλο - γλυκίνη, 1 - Βενζοϋλο - λευκυλο - 2 - θειοϋδαντοίνη

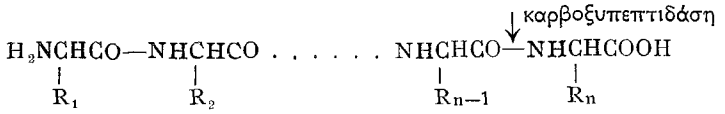


Βενζοϋλο - λευκίνη 2-Θειοϋδαντοίνη (ἐκ τοῦ C-τελικοῦ ἀμινοξέος)

$R = CH_2CH(CH_3)_2$

Ἐὰν ἡ ἀντίδρασις συνεχισθῆ λαμβάνεται καὶ ἡ ἀντίστοιχος θειοϋδαντοΐνη τῆς λευκίνης. Περαιτέρω συνέχισις τῆς ἀντιδράσεως, ὡς εἰς τριπεπτίδια κλπ., πρακτικῶς δὲν εἶναι ἐφικτή.

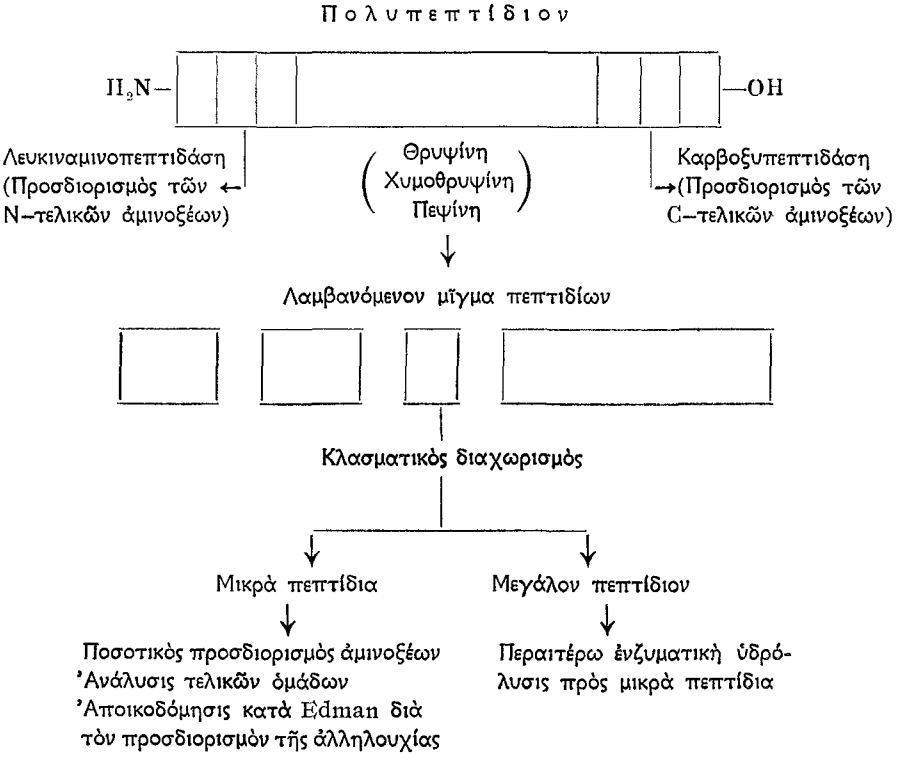
Β'. Ἐνζυματικαὶ μέθοδοι. Ἡ ἀποικοδόμησις διὰ καρβοξυπεπτιδάσης εἶναι ἡ πλέον ἐν χρήσει μέθοδος πρὸς προσδιορισμὸν τῶν C-τελικῶν ἀμινοξέων (19). Τὸ ἔνζυμον τοῦ παγκρέατος καρβοξυπεπτιδάση ἐπιδρῶν ἐπί τινος πεπτιδίου ἢ πρωτεΐνης, ὑδρολύει μόνον τὸν πεπτιδικὸν δεσμόν, εἰς τὸν ὁποῖον συμμετέχει ἡ ἀμινομὰς ἀμινοξέος φέροντος ἐλεύθερον καρβοξύλιον, ἤτοι ὑδρολύει τὸ C-τελικὸν ἀμινοξὺ τῆς πεπτιδικῆς ἁλύσου.



Ἡ ἐπίδρασις τοῦ φυράματος, ἤτοι ἡ διάσπασις τῆς πεπτιδικῆς ἁλύσου, συνεχίζεται μόλις παρουσιασθῆ τὸ νέον ἐλεύθερον καρβοξύλιον τοῦ προτελευταίου ἀμινοξέος κλπ. Ἐπίσης καὶ εἰς τὴν περίπτωσιν ταύτην ὑπάρχουν σημαντικαὶ διαφοραί, μεταξὺ τῶν ταχυτήτων ὑδρολύσεως τῶν διαφόρων ἀμινοξέων. Ἐκ τῆς σχετικῆς ταχύτητος ἐμφανίσεως ἐλευθέρων ἀμινοξέων, συμπεραίνεται περὶ τῆς ἀλληλουχίας αὐτῶν εἰς τὸ C-τελικὸν τμῆμα τῆς πεπτιδικῆς ἁλύσου. (Πρβλ. διάσπασις N-τελικῶν ἀμινοξέων διὰ λευκιναμινοπεπτιδάσης).

III. Χρησιμοποίησις ἐνζύμων διὰ τὸν προσδιορισμὸν τῆς ἀλληλουχίας *(sequence)* ***τῶν ἀμινοξέων.*** Ὡρισμένα πρωτεολυτικὰ φυράματα, ὡς αἱ διάφοροι ἐνδοπεπτιδάσαι (πρωτεάσαι), ἔχουν ὡς γνωστὸν τὴν εἰδικότητα, νὰ καταλύουν ὑπὸ ἠπίας συνθήκας τὴν ὑδρόλυσιν οὐχὶ τοῦ ἑκά-

στοτε ἀρχικοῦ ἢ τελικοῦ πεπτιδικοῦ δεσμοῦ μιᾶς ἁλύσου, ἀλλὰ μόνον ὡρισμένων μέσων πεπτιδικῶν δεσμῶν. Αἱ πρωτεάσαι ὡς ἐκ τούτου παίζουν σημαντικὸν ρόλον εἰς τὴν διευκρίνισιν τοῦ συντακτικοῦ τύπου πε-



Σχῆμα 2.

πτιδίων καὶ πρωτεϊνῶν. Εἰς τὴν περίπτωσιν ἐπίσης ταύτην ὑπάρχουν σημαντικαὶ διαφοραὶ εἰς τὰς ταχύτητας ὑδρολύσεως τῶν διαφόρων μέσων πεπτιδικῶν δεσμῶν, ἀναλόγως πρὸς τὴν φύσιν τῶν συνιστώντων τὸν πεπτιδικὸν δεσμὸν ἀμινοξέων. Μετὰ τὸν προσδιορισμὸν τῶν N- καὶ C- τελικῶν ἀμινοξέων των, ποσότης ἀνεπάφου πεπτιδίου ἢ πρωτεΐνης ὑποβάλλεται εἰς τὴν ἐπίδρασιν τῶν πρωτεασῶν (θρυψίνης, χυμοθρυψίνης καὶ πεψίνης), ὁπότε αἱ πεπτιδικαὶ ἅλυσοι ὑδρολύονται ἐκλεκτικῶς εἰς πεπτιδικὰ κλάσματα διαφόρου μεγέθους, καθοριζόμενα ὑπὸ τῆς φύσεως τῶν συνιστώντων ἀμινοξέων. Τὰ προκύπτοντα πεπτίδια διαχωρίζονται διά τινος μεθόδου καὶ προσδιορίζεται εἰς ἕκαστον ἐξ αὐτῶν ἡ ἀλληλουχία τῶν ἀμινοξέων, ὡς ἐξετέθη ἀνωτέρω (χημικῶς ἢ ἐνζυματικῶς). Ἐνίοτε μικρὰ

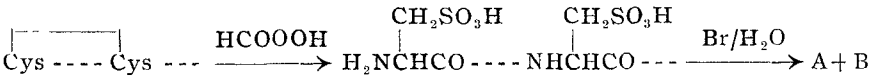
κλάσματα ἐκ τινος πολυπεπτιδίου λαμβάνονται καὶ διὰ μερικῆς ὑδρολύσεως δι' ὀξέων.

Τὸ σχῆμα 2 παριστᾶ τρόπον χρησιμοποιήσεως τῶν πρωτεασῶν θρυψίνης, χυμοθρυψίνης καὶ πεψίνης καὶ τῶν πεπτιδασῶν καρβοξυπεπτιδάσης καὶ λευκιναμινοπεπτιδάσης εἰς τὴν διευκρίνισιν τοῦ τύπου τῶν πολυπεπτιδίων (20).

Προσδιορισμὸς τοῦ συντακτικοῦ τύπου τῆς ὀξυτοκίνης ὑπὸ τοῦ du Vigneaud.

Ἀπὸ μακροῦ ὑπῆρχον μερικαὶ ἐνδείξεις εἰς τὴν βιβλιογραφίαν, ὅτι αἱ ὁρμόναι τῆς ὑποφύσεως εἶναι πολυπεπτιδικῆς φύσεως, ὄχι πολὺ μεγάλου μοριακοῦ βάρους καὶ ὅτι περιέχουν κατὰ πᾶσαν πιθανότητα θεῖον. Ἡ ἀνάλυσις τῶν ἀμινοξέων, ὡς ἐξετέθη εἰς τὸ προηγούμενον κεφάλαιον, ἔδειξεν ὅτι πράγματι ἡ ὀξυτοκίνη εἶναι πολυπεπτίδιον, ἡ δὲ προσδιορισθεῖσα τιμὴ τοῦ μοριακοῦ βάρους συνεφώνει μὲ τὸν τύπον μονομεροῦς ἀποτελουμένου ἐκ τῶν 8 ἀμινοξέων πεπτιδικῶς ἡνωμένων μεταξύ των, ἤτοι ἑνὸς ὀκταπεπτιδίου φέροντος τρία μόρια ἀμμωνίας ὑπὸ μορφὴν ἀμιδίων.

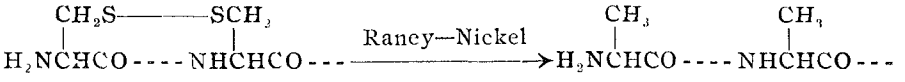
Μετὰ τὴν ἀπομόνωσιν καθαροῦ προϊόντος ἐπηκολούθησαν ἔρευναι πρὸς προσδιορισμὸν τῆς ἀλληλουχίας τῶν ἀμινοξέων δι' ἐφαρμογῆς τινῶν ἐκ τῶν περιγραφεισῶν συγχρόνων μεθόδων, αἱ ὁποῖαι ἐνίοτε ἔπρεπε νὰ προσαρμοσθοῦν εἰς τὰς πολὺ μικρὰς ποσότητας διαθεσίμου ὑλικοῦ. Εἰς τὸ στάδιον τοῦτο τῆς ἐρεύνης τῆς συντάξεως τοῦ μορίου, ἀποφασιστικῆς σημασίας ἦτο τὸ εὕρημα, ὅτι τὸ μόριον τῆς ὀξυτοκίνης μετὰ τὴν ὀξειδωτικὴν ἐπίδρασιν ὑπερμυρμηκικοῦ ὀξέος διασπᾶται διὰ βρωμιούχου ὕδατος εἰς δύο κλάσματα (21, 22). Κατ' ἀρχὰς τῇ ἐπιδράσει τοῦ ὑπερμυρμηκικοῦ ὀξέος ὀξειδοῦται τὸ εἰς τὴν ἄλυσον ἐντεταγμένον ἀμινοξὺ κυστίνη (23) διασπωμένης τῆς γεφύρας θείου πρὸς δύο ρίζας κυστεϊνικοῦ ὀξέος, ἐνῶ τὸ μόριον ἐξακολουθεῖ νὰ παραμένῃ ἑνιαῖον. Τοῦτο εἶναι



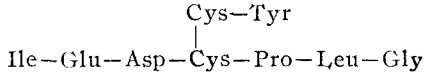
A = (κυστεϊνικόν, Tyr)
B = (Ile, Glu, Asp, κυστεϊνικόν, Pro, Leu, Gly)

ἔνδειξις, ὅτι ἡ γέφυρα -S - S- τῆς κυστίνης ἀνήκει εἰς δακτύλιον (ἐν ἐναντίᾳ περιπτώσει θὰ ἐλαμβάνοντο δύο κλάσματα περιέχοντα ἕκαστον τὸ ἥμισυ τοῦ μορίου τῆς κυστίνης). Ἐν συνεχείᾳ τὸ πεπτίδιον τὸ φέρον τὰς δύο ρίζας τοῦ κυστεϊνικοῦ ὀξέος, τῇ ἐπιδράσει βρωμιούχου ὕδατος διασπᾶται εἰς δύο πεπτιδικὰ κλάσματα, ἓν διπεπτίδιον Α περιέχον κυστεϊνικὸν ὀξὺ καὶ διβρωμοτυροσίνην καὶ ἓν ἑπταπεπτίδιον Β περιέχον κυστεϊνικὸν ὀξὺ καὶ τὰ ὑπόλοιπα 6 ἀμινοξέα.

Περαιτέρω μελέται προσδιορισμοῦ τῆς ἀλληλουχίας τῶν ἀμινοξέων (22, 24, 25, 26), περιέλαβον προσδιορισμὸν τῶν τελικῶν N- καὶ C-ἀμινοξέων α) τῶν δύο ὡς ἄνω πεπτιδικῶν κλασμάτων A καὶ B, β) τῆς ἀποθειωμένης ὀξυτοκίνης, ἤτοι ἑνώσεως εἰς τὴν ὁποίαν τὸ μόριον τῆς κυστίνης δι'ἀναγωγῆς μὲ καταλύτην Raney-Nickel μετετράπη εἰς δύο μόρια ἀλανίνης



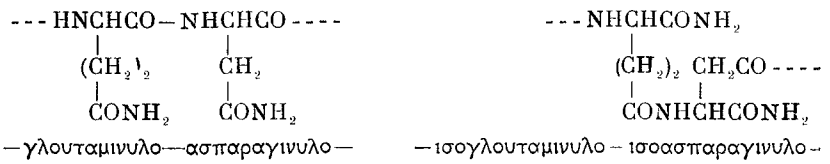
καὶ γ) τῶν προϊόντων τῆς μερικῆς ὑδρολύσεως δι' ὀξέων. Δι' ἐφαρμογῆς τῆς δινιτροφαινυλομεθόδου τοῦ Sanger ἀπεδείχθη, ὅτι εἰς τὸ μόριον τῆς ὀξυτοκίνης μία ἀμινομὰς καὶ συγκεκριμμένως ἡ μία ἀμινομὰς τῆς κυστίνης εἶναι ἐλευθέρα. Περαιτέρω ἀποικοδόμησις τῶν κλασμάτων κατὰ Edman, διὰ τὸν προσδιορισμὸν τῆς διαδοχικῆς σειρᾶς τῶν ἀμινοξέων, εἶχεν ὡς ἀποτέλεσμα τὴν διατύπωσιν τοῦ κάτωθι σχήματος συντάξεως:



Διὰ συλλογισμῶν τοὺς ὁποίους παραλείπομεν ἐνταῦθα ἀπεδείχθη ἐμμέσως καὶ ἡ σύνδεσις Tyr - Ile. Οὕτω κατέστη φανερόν, ὅτι τὸ μόριον τῆς ὀξυτοκίνης ἀποτελεῖται ἀπὸ ἕνα δισουλφιδικὸν δακτύλιον περιλαμβάνοντα τὰ ἀμινοξέα κυστίνην, τυροσίνην, ἰσολευκίνην, γλουταμινικόν, ἀσπαραγινικὸν καὶ τὸ τριτεπτίδιον προλυλο - λευκυλο - γλυκίνην ὡς πλευρικὴν ἅλυσον ἡνωμένην πεπτιδικῶς εἰς τὸ ἓν καρβοξύλιον τῆς κυστίνης διὰ τῆς ἀμινομάδος τῆς προλίνης.

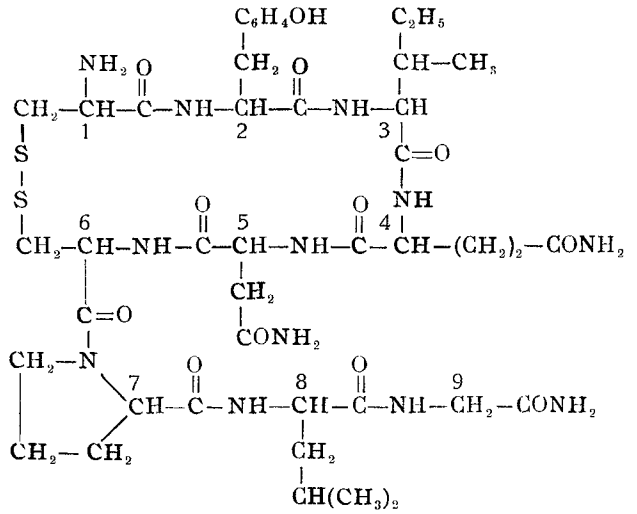
Ἀφ' ἑτέρου εἶχε διαπιστωθῆ, ὅτι ἡ ὀξυτοκίνη δὲν προσβάλλεται, δηλαδὴ οὔτε ἀδρανοποιεῖται, οὔτε διασπᾶται, ὑπὸ τοῦ ἐνζύμου καρβοξυπεπτιδάση (26) πρᾶγμα τὸ ὁποῖον εἶναι ἔνδειξις μὴ ὑπάρξεως ἐλευθέρου καρβοξυλίου εἰς τὸ ἄκρον τοῦ μορίου. Μόνον μετὰ κατεργασίαν μὲ N ὑδροχλωρικὸν ὀξὺ εἰς 90°—100° C ἐπὶ μίαν ὥραν ἐλευθεροῦται 1 mole ἀμμωνίας (27)· ἐν συνεχείᾳ καὶ δι' ἐφαρμογῆς τῆς μεθόδου σχηματισμοῦ θειοϋδαντοΐνης (18) ἐπὶ τοῦ οὕτως μεταβεβλημένου μορίου, εὑρέθη ὅτι τὸ C-τελικὸν ἀμινοξὺ εἶναι γλυκίνη (26). Δεδομένου ὅτι ἀνευρέθησαν καὶ τρία μόρια ἀμμωνίας δι' ἕκαστον μόριον ὀξυτοκίνης, μετὰ πλήρη ὑδρόλυσιν αὐτῆς, κατέστη φανερόν, ὅτι τὸ καρβοξύλιον τῆς C-τελικῆς γλυκίνης εἶναι δεσμευμένον ὑπὸ μορφὴν ἀμιδίου. Λογικὸν ἦτο τὰ δύο ὑπολειπόμενα μόρια ἀμμωνίας νὰ θεωρηθοῦν καλύπτοντα ἀνὰ ἓν καρβοξύλιον τοῦ γλουταμινικοῦ καὶ ἀσπαραγινικοῦ ὀξέος, ἐφ' ὅσον ἄλ-

λως τε ἡ τιμὴ τοῦ ἰσοηλεκτρικοῦ σημείου (7.7), ὡς αὕτη προσδιωρίσθη δι' ἠλεκτροφορήσεως ἐπὶ χάρτου, ὡς καὶ τοῦ P_K (10.2, ἀντιστοιχοῦσα εἰς φαινολικὸν - OH) ἦσαν ἐν συμφωνίᾳ πρὸς τὴν ὕπαρξιν μιᾶς μόνον ἐλευθέρας ἀμινομάδος καὶ μιᾶς φαινολικῆς ὑδροξυλομάδος (25,28). Τέλος ἔγινεν ἡ ὑπόθεσις, ἡ ὁποία ἐπίσης μόνον εἰς τὴν λογικὴν ἐστηρίζετο καὶ εἰς οὐδὲν πειραματικὸν δεδομένον, ὅτι εἰς τὸ μόριον τῆς ὀξυτοκίνης περιέχονται τὰ ἀμίδια γλουταμίνη καὶ ἀσπαραγίνη καὶ ὄχι τὰ ἰσομερῆ των ἰσογλουταμίνη καὶ ἰσοασπαραγίνη.

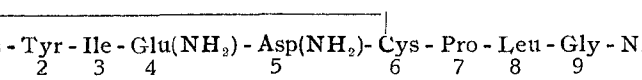


Ἐπίσης βάσει ἐνδείξεων ἐκ τῆς συμπεριφορᾶς τῶν πρωτεολυτικῶν ἐνζύμων, ὅλα τὰ περιεχόμενα ἀμινοξέα ἐθεωρήθησαν ὡς ἔχοντα τὴν L - στερεοχημικὴν διάταξιν.

Οὕτω τελικῶς ἐπροτάθη ὁ κάτωθι τύπος διὰ τὴν ὀξυτοκίνην (26) :



Συντακτικὸς τύπος τῆς ὀξυτοκίνης μετ' ἀριθμήσεως τῶν συνιστώντων τὸ μόριον ἀμινοξέων.



Τύπος τῆς ὀξυτοκίνης διὰ χρησιμοποιήσεως τῶν συμβόλων τῶν ἀμινοξέων, ὡς ἐκτίθενται εἰς τὴν σελ. 9.

Εἶναι ἐνδιαφέρον, ὅτι ὁ Tuppy συγχρόνως καὶ ἀνεξαρτήτως τοῦ du Vigneaud ἐπρότεινεν τὸν αὐτὸν συντακτικὸν τύπον διὰ τὴν ὀξυτοκίνην(29).

Ἡ ἀνεύρεσις συντάξεως καὶ στερεοχημικῆς διατάξεως ἑνὸς φυσικοῦ προϊόντος ἐπὶ τῇ βάσει ἀναλυτικῶν μεθόδων καὶ μεθόδων ἀποικοδομήσεως δὲν δύναται νὰ θεωρηθῇ ὡς ἀναμφισβητήτως ἀσφαλής, ἐφ'ὅσον δὲν πραγματοποιηθῇ καὶ ἡ συνθετικὴ αὐτοῦ παρασκευὴ ὡς ἐπιστέγασμα τῶν ὅλων ἐπιστημονικῶν προσπαθειῶν. Τὸ αὐτὸ συνέβη καὶ εἰς τὴν προκειμένην περίπτωσιν. Πρὸς τοῦτο ἐχρησιμοποιήθησαν εἰδικαὶ συνθετικαὶ μέθοδοι, αἱ ὁποῖαι εἶχον προηγουμένως διαμορφωθῇ εἰς διάφορα Ἐργαστήρια.

Τὸ πρόβλημα συνθέσεως πεπτιδίων.

Τὸ πρόβλημα συνθέσεως πεπτιδίων συνίσταται, εἰς γενικὰς γραμμάς, εἰς τὴν ὕπαρξιν καταλλήλων μεθόδων διὰ τὰ ἑξῆς στάδια τῆς συνθέσεως:

I. Παροδικὴ προστασία τῆς α-ἀμινομάδος τῶν ἀμινοξέων.
II. Παροδικὴ προστασία τοῦ α-καρβοξυλίου τῶν ἀμινοξέων.
III. Παροδικὴ προστασία δραστικῶν ὁμάδων εὑρισκομένων εἰς τὰς πλευρικὰς ἁλύσους τῶν ἀμινοξέων καὶ
IV. Σύζευξις.

Εἰς τὰ χημικὰ ταῦτα στάδια, θὰ ἔπρεπε νὰ προστεθοῦν καὶ αἱ νεώτεραι μέθοδοι ἀπομονώσεως καὶ καθαρισμοῦ τῶν ἐλευθέρων πεπτιδίων. Λεπτομερὴς ἀνάπτυξις τῶν μεθόδων I—IV εὑρίσκεται εἰς εἰδικὰ συγγράμματα καὶ μονογραφίας (βλ. Γενικὴν Βιβλιογραφίαν), εὐρεῖα δὲ περίληψις αὐτῶν ἀναφέρεται εἰς πρόσφατον δημοσίευμα ἐκ τοῦ Ἐργαστηρίου Ὀργανικῆς Χημείας (119).

Κατωτέρω ἀναγράφονται αἱ σπουδαιότεραι ἐκ τῶν μεθόδων, αἱ χρησιμοποιηθεῖσαι τόσον εἰς τὴν ἀρχικὴν σύνθεσιν, ὡς καὶ εἰς τὰς μεταγενεστέρας συνθέσεις τῆς ὀξυτοκίνης, αἱ ὁποῖαι ἠκολούθησαν τὴν γενικὴν πορείαν τῆς ἀρχικῆς ταύτης συνθέσεως.

I. Παροδικὴ προστασία τῆς α-ἀμινομάδος.

α) ***Καρβοβενζοξικὴ μέθοδος.*** Τῷ 1932 οἱ Bergmann καὶ Zέρβας ἐδημοσίευσαν τὴν ἐργασίαν των «Ἐπὶ μιᾶς γενικῆς μεθόδου πεπτιδικῆς συνθέσεως» (30). Διὰ τὴν μέθοδον ταύτην ἔλαβον καὶ Γερμανικὸν δίπλωμα εὑρεσιτεχνίας (31). Ἡ Ἱστορία τῆς Πεπτιδικῆς Χημείας ἐδικαίωσε πλήρως τὸν τίτλον τῆς δημοσιεύσεως. Τριάκοντα πέντε σχεδὸν ἔτη ἀπὸ τῆς εἰσαγωγῆς της «ἡ Καρβοβενζοξικὴ μέθοδος ἐξακολουθεῖ νὰ παραμένῃ καὶ ἀσφαλῶς θὰ παραμείνῃ ἀκόμη ἐπ' ἀρκετόν, ὡς ἡ κυρία μέθοδος προστασίας τῆς α-ἀμινομάδος τῶν ἀμινοξέων κατὰ τὴν πεπτιδικὴν σύνθεσιν» (32).

Ἡ καρβοβενζοξικὴ μέθοδος, ἰδίως ἀφοῦ ἐπεξετάθη ἐπὶ ὅλων σχεδὸν τῶν φυσικῶν α-ἀμινοξέων καὶ προσηρμόσθη εἰς τὰς ἰδιορρυθμίας ὡρισμένων ἐξ αὐτῶν, ὡς τῆς λυσίνης (33), ἀργινίνης (34), κυστεΐνης-κυστίνης (30, 31, 35), κατέστησε δυνατὴν τὴν σύνθεσιν πεπτιδίων ἐξ ὅλων τῶν γνωστῶν ἀμινοξέων. Αὕτη ἀπετέλεσε τὴν βάσιν διὰ τὴν ἀλματώδη αὔξησιν τοῦ ἀριθμοῦ τῶν συνθετικῶς παρασκευασθέντων πεπτιδίων καὶ ἡ συμβολή της ὑπῆρξε καὶ ἐξακολουθεῖ νὰ εἶναι ἀποφασιστικὴ εἰς τὴν ἐξέλιξιν τῆς Χημείας πεπτιδίων καὶ πρωτεϊνῶν. Εἶναι χαρακτηριστικόν, ὅτι π.χ. ἐξ 91 ἐργασιῶν ἐπὶ πεπτιδίων δημοσιευθεισῶν ὑπὸ διαφόρων ἐρευνητῶν εἰς ἔγκυρα περιοδικὰ κατὰ τὰ ἔτη 1960 - 62 προκύπτει, ὅτι τὰ 90% τῶν πεπτιδίων παρεσκευάσθησαν ἐπὶ τῇ βάσει τῆς καρβοβενζοξικῆς μεθόδου (36).

Ὡς γνωστόν, ἡ καρβοβενζοξικὴ μέθοδος συνίσταται εἰς τὴν παροδικὴν προστασίαν τῆς α-ἀμινομάδος ἑνὸς ἀμινοξέος διὰ τῆς ρίζης τοῦ βενζυλοξυκαρβονικοῦ ὀξέος. Μετὰ τὴν σύζευξιν τοῦ N-καρβοβενζοξυαμινοξέος τούτου μὲ ἕτερον ἀμινοξὺ ἢ πεπτίδιον, ἡ N-καρβοβενζοξυομὰς δύναται ν' ἀπομακρυνθῇ ἠπίως διὰ καταλυτικῆς ὑδρογονώσεως (30, 31) ἢ δι' ἐπιδράσεως ὑδροβρωμίου ἐντὸς ὀξεικοῦ ὀξέος (37) ἢ διὰ τριφθοριοξεικοῦ ὀξέος (38) ἢ δι' ἐπιδράσεως νατρίου ἐντὸς ὑγρᾶς ἀμμωνίας (35). Οἱ τελευταῖοι οὗτοι τρόποι ἀπομακρύνσεως τῆς καρβοβενζοξυομάδος ἔχουν ἰδιαιτέραν σημασίαν προκειμένου περὶ πεπτιδίων κυστεΐνης καὶ κυστίνης, εἰς τὰ ὁποῖα λόγῳ τῆς ὑπάρξεως εἰς τὸ μόριον θείου, καταλυτικὴ ὑδρογόνωσις καθίσταται ἀνέφικτος.

$$C_6H_5CH_2OCOCl + H_2NCH(R)COOH \rightarrow C_6H_5CH_2OCO\text{–}NHCH(R)COOH \longrightarrow$$

$$\xrightarrow{H_2NCH(R')COOR''} C_6H_5CH_2OCO\text{—}NHCH(R)CO\text{—}NHCH(R')COOR'' \xrightarrow{OH^-}$$

$$\longrightarrow C_6H_5CH_2OCO\text{—}NHCH(R)CO\text{—}NHCH(R')COOH$$

$$\downarrow H_2/Pd \qquad\qquad \downarrow HBr/AcOH$$

$$C_6H_5CH_3,\ CO_2,\ H_2NCH(R)CO\text{—}NHCH(R')COOH \qquad C_6H_5CH_2Br,\ CO_2,\ H_2NCH(R)CO\text{–}NHCH(R')COOH$$

Ἡ εἰσαγωγὴ τῆς καρβοβενζοξικῆς μεθόδου εἰς τὴν Χημείαν ἀπετέλεσεν τὴν ἀφετηρίαν διὰ τὴν ἐξακρίβωσιν ὑπὸ τῶν Bergmann καὶ Zέρβα (39-50) καὶ ἐν συνεχείᾳ ὑπὸ ἄλλων ἐρευνητῶν (51) τῆς εἰδικεύσεως τῶν πρωτεολυτικῶν ἐνζύμων. Τοῦτο ἦτο πολὺ σημαντικόν, διότι τοιουτοτρόπως τὰ ἔνζυμα ταῦτα ἐχαρακτηρίσθησαν ὡς «εἰδικὰ ἀντιδραστήρια» καὶ χρησιμοποιοῦνται ἔκτοτε διὰ τὴν ἐξακρίβωσιν τῆς πρωτοταγοῦς συντάξεως τῶν πρωτεϊνῶν. Ἐπὶ πλέον ἡ καρβοβενζοξικὴ μέθοδος κατέστησε

δυνατὴν τὴν σύνθεσιν πλέον πολυπλόκων πεπτιδίων ἀπαντώντων εἰς τὴν φύσιν, τὰ ὁποῖα κέκτηνται εἰδικὴν βιολογικὴν δρᾶσιν, π.χ. τῆς ὁρμόνης κορτικοτροπίνης (ACTH), ἑνὸς τριακονταεννεαπεπτιδίου, ὑπὸ τοῦ Schwyzer (52), τῆς βραδυκινίνης ὑπὸ τοῦ Boissonnas (53), τῆς πολυμιξίνης ὑπὸ τοῦ Vogler (54), τέλος τῆς πρὸ ὀλίγων μηνῶν ἀναγγελθείσης παρασκευῆς ὑπὸ τοῦ Κατσόγιαννη (55), ὡς καὶ ὑπὸ τοῦ Zahn (56) οὐσίας, ἡ ὁποία παρουσιάζει τὰς βιολογικὰς ἰδιότητας τῆς ἰνσουλίνης.

β) p - ***Τολουολοσουλφομέθοδος.*** Αὕτη συνίσταται εἰς τὴν παροδικὴν προστασίαν τῆς α-ἀμινομάδος διὰ τῆς p-τολουολοσουλφο- ἢ τοζυλομάδος.

$$CH_3C_6H_4SO_2Cl + NH_2CH(R)COOH \rightarrow CH_3C_6H_4SONH_2-CH(R)COOH$$

Ἡ εἰσαγωγὴ τῆς τοζυλομάδος εἰς τὴν πεπτιδικὴν Χημείαν ὑπὸ τοῦ Schönheimer (1926) ἐβασίσθη εἰς τὸ γεγονός, ὅτι αὕτη δύναται ν' ἀποσπασθῇ τῇ ἐπιδράσει μίγματος φωσφονιοϊωδίου καὶ ὑδροϊωδίου ἐν θερμῷ (57). Ὁ du Vigneaud διεπίστωσεν ἀργότερον (58), ὅτι διασπᾶται καὶ διὰ νατρίου ἐντὸς ὑγρᾶς ἀμμωνίας.

$$CH_3C_6H_4SO_2NH\underset{\substack{|\\ R}}{C}HCO- \xrightarrow{HJ/PH_4J} HJ,\ H_2N\underset{\substack{|\\ R}}{C}HCO-,\ CH_3C_6H_4SH$$

$$\downarrow Na/NH_3$$

$$H_2N\underset{\substack{|\\ R}}{C}HCO-,\ CH_3C_6H_4SO_2H,\ Na^+,\ (CH_3C_6H_4SH)$$

Ἡ μέθοδος αὕτη δὲν εἶχεν εὐρεῖαν χρησιμοποίησιν, ἀλλ' ἐβοήθησεν εἰς ἓν στάδιον καὶ εἰδικῶς εἰς τὸ στάδιον εἰσαγωγῆς τῆς γλουταμίνης καὶ τῆς ἰσολευκίνης, κατὰ τὴν πρώτην σύνθεσιν τῆς ὀξυτοκίνης.

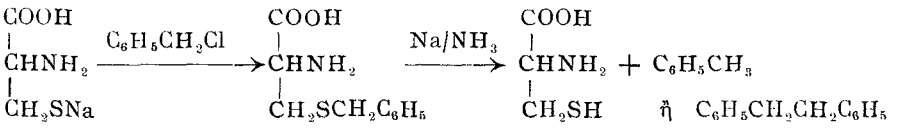
II. Παροδικὴ προστασία τῆς α-καρβοξυλικῆς ὁμάδος.

Αὕτη ἐπιτελεῖται συνήθως δι' ἐστεροποιήσεως τοῦ καρβοξυλίου καὶ ἐν συνεχείᾳ σαπωνοποιήσεως τοῦ ἐστέρος. Εἰς τὴν προκειμένην περίπτωσιν τῆς ὀξυτοκίνης, λόγῳ τῆς παρουσίας τοῦ C-τελικοῦ ἀμινοξέος (γλυκίνης) ὑπὸ μορφὴν ἀμιδίου, ἡ προστασία αὕτη ἐπιτελεῖται καὶ διὰ μετατροπῆς τοῦ ἐστέρος τοῦ C-τελικοῦ ἀμινοξέος εἰς τὸ ἀντίστοιχον ἀμίδιον.

$$\text{------}COOCH_3-\left\langle\begin{array}{l}\xrightarrow{OH}\ \text{-----}COOH\\ \xrightarrow{NH_3}\ \text{-----}CONH_2\end{array}\right.$$

III. Παροδική προστασία πλευρικῶν ἁλύσων.

Εἰς τὴν προκειμένην περίπτωσιν τῆς ὀξυτοκίνης, τὰ εἰς αὐτὴν ἐνυπάρχοντα ἀμινοξέα γλουταμινικὸν καὶ ἀσπαραγινικόν, εὑρίσκονται ὑπὸ μορφὴν τῶν ἀντιστοίχων β- καὶ γ- ἀμιδίων, γλουταμίνης καὶ ἀσπαραγίνης καὶ τοιουτοτρόπως δὲν προκύπτει ζήτημα παροδικῆς προστασίας τῆς δραστικῆς πλευρικῆς ὁμάδος (καρβοξυλίου) τῶν ἀμινοξέων τούτων. Ἐφ' ὅσον ὅμως, ὡς θὰ ἀναπτύξωμεν κατωτέρω, εἰς τὴν σύνθεσιν τῆς ὀξυτοκίνης ἐμπλέκεται κατ' ἀρχὰς οὐχὶ κυστίνη, ἀλλὰ τὸ προϊὸν ἀναγωγῆς αὐτῆς, τὸ ἀμινοξὺ κυστεΐνη, προκύπτει ἡ ἀνάγκη παροδικῆς προστασίας τῆς σουλφυδρυλικῆς ὁμάδος τῆς κυστεΐνης. Αὕτη ἐπετελέσθη τὸ πρῶτον ἐπὶ τῇ βάσει πειραμάτων τοῦ du Vigneaud διὰ S-βενζυλιώσεως (35, 59, 60, 61). Μετὰ τὴν εἰσαγωγὴν τῆς κυστεΐνης εἰς τὴν πεπτιδικὴν ἅλυσον ὑπὸ μορφὴν S-βενζυλοπαραγώγου ἀφαιρεῖται ἡ S-βενζυλομὰς δι' ἰσχυρῶν ἀναγωγικῶν μέσων, εἰς τὴν περίπτωσιν αὐτὴν δι' ἐπιδράσεως μεταλλικοῦ νατρίου ἐντὸς ὑγρᾶς ἀμμωνίας.



Ἡ μέθοδος αὕτη τοῦ du Vigneaud κατέστησε δυνατὴν τὴν ἐφαρμογὴν τῆς καρβοβενζοξυ - μεθόδου τῶν Bergmann – Ζέρβα καὶ ἐπὶ πεπτιδίων τῆς κυστεΐνης - κυστίνης. Πρῶτον παράδειγμα τοιαύτης συνθέσεως ἦτο ἡ σύνθεσις τοῦ γλουταθείου ὑπὸ τοῦ du Vigneaud τῷ 1935 (61).

IV. Μέθοδοι πεπτιδικῆς συζεύξεως.

Ὡς γνωστόν, διὰ τὴν σύζευξιν ἑνὸς N-προστατευμένου ἀμινοξέος A μὲ ἕτερον ἀμινοξὺ B ἀπαιτεῖται ἐνεργοποίησις τοῦ καρβοξυλίου τοῦ A. Μέχρι τοῦ 1950 δύο μόνον μέθοδοι ὑπῆρχον καὶ συγκεκριμμένως ἡ τῶν χλωριδίων τῶν N- προστατευμένων ἀμινοξέων καὶ ἡ τῶν ἀζιδίων αὐτῶν. Ἀμφότεραι ἐχρησιμοποιήθησαν ὑπὸ τῶν Bergmann – Ζέρβα (30, 31) καὶ τῆς σχολῆς των πρὸς παρασκευὴν πολλῶν πεπτιδίων, τὰ ὁποῖα ἀπετέλεσαν κυρίως συνθετικὰ φυραματικὰ ὑποστρώματα. Ἐξ αὐτῶν ἡ πρώτη μέθοδος τῶν χλωριδίων ἔχει σχεδὸν ἐγκαταλειφθῆ λόγῳ τῆς ἀσταθείας αὐτῶν καὶ τῆς τάσεως πρὸς σχηματισμὸν ἀνεπιθυμήτων παραπροϊόντων. Ἡ *μέθοδος τῶν ἀζιδίων*, εἰσαχθεῖσα ὑπὸ τοῦ Curtius τῷ 1902 (62), ἐπέζησε καὶ χρησιμοποιεῖται ἀκόμη ἐκτεταμένως κυρίως λόγῳ τοῦ γεγονότος, ὅτι δὲν προκαλεῖ ρακεμιώσεις κατὰ τὴν σύζευξιν πεπτιδίων (63).

$$R\text{-}NHCH(R_1)CO\ NHCH(R_2)CO\text{-}NHNH_2 \xrightarrow{HONO} R\text{-}NHCH(R_1)CO\text{-}NHCH(R_2)CON_3$$

$$\xrightarrow{H_2NCH(R_3)COOR'} R\text{-}NHCH(R_1)CO\text{-}NHCH(R_2)CO\text{-}NHCH(R_3)COOR'$$

Κατὰ τὰ ἔτη 1950 - 1952 συνετελέσθη μεγάλη πρόοδος εἰς τὰς μεθόδους συζεύξεως διὰ τῆς εἰσαγωγῆς ταυτοχρόνως ἀπὸ πολλὰ ἐρευνητικὰ ἐργαστήρια, τῆς μεθόδου τῶν διαφόρων τύπων μικτῶν ἀνυδριτῶν. Πολὺ χρήσιμοι ἀπεδείχθησαν κυρίως α) οἱ μικτοὶ ἀνυδρῖται τῶν N - ἀκυλιωμένων ἀμινοξέων μετὰ ἡμιεστέρων τοῦ ἀνθρακικοῦ ὀξέος (64 - 66).

$$R-NHCH(R_1)CO \atop R_2OCO \!\!>\!O + H_2NCH(R_3)COOR' \longrightarrow$$

$$\longrightarrow R-NHCH(R_1)CO-NHCH(R_3)CHCOOR' + R_2OH + CO_2$$

β) Οἱ μικτοὶ ἀνυδρῖται τῶν N - ἀκυλιωμένων ἀμινοξέων μετὰ παραγώγων, κυρίως ἐστέρων, τοῦ φωσφορικοῦ ἢ τοῦ φωσφορώδους ὀξέος π.χ. μετὰ διαιθυλοφωσφορώδους ὀξέος (67).

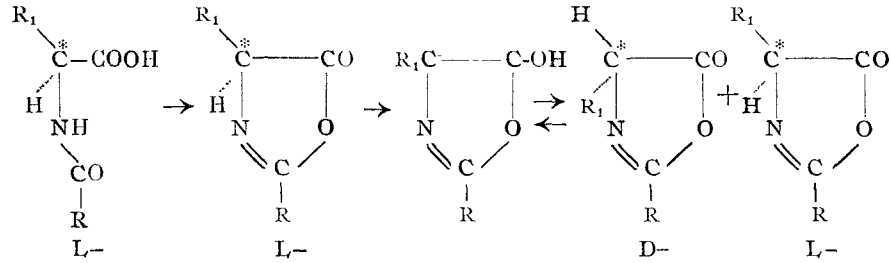
$$R-NHCH(R_1)COOH + (C_2H_5O)_2P-O-P(OC_2H_5)_2 \longrightarrow$$

$$\longrightarrow R-NHCH(R_1)COOP<\begin{matrix}OC_2H_5\\OC_2H_5\end{matrix} + \begin{matrix}C_2H_5O\\C_2H_5O\end{matrix}>P-OH$$

$$R-NHCH(R_1)COOP<\begin{matrix}OC_2H_5\\OC_2H_5\end{matrix} + H_2NCH(R_2)CHCOOR' \longrightarrow$$

$$\longrightarrow R-NHCH(R_1)CO-NHCH(R_2)COOR' + \begin{matrix}C_2H_5O\\C_2H_5O\end{matrix}>P-OH$$

Βασικὸν μειονέκτημα τῶν μεθόδων τούτων εἶναι ἡ ἐμφάνισις ρακεμιώσεως, μικρᾶς ἢ μεγάλης ἐκτάσεως, κατὰ τὰς συζεύξεις πεπτιδίων μετ' ἀμινοξέων. Ἡ ρακεμίωσις γενικῶς ὀφείλεται εἰς τὸν σχηματισμὸν ἀζλακτονῶν, αἱ ὁποῖαι εὐκόλως, λόγῳ ταυτομεριώσεως, ὑφίστανται ρακεμίωσιν.



Γενικῶς σήμερον πρὸς ἀποφυγὴν ρακεμιώσεων ἡ αὔξησις τῆς πεπτιδικῆς ἁλύσου γίνεται ἢ διὰ τῆς μεθόδου τῶν ἀζιδίων, ἢ κατὰ στάδια (step by step) ἐκ τοῦ C-τελικοῦ ἀμινοξέος διὰ τῆς προσθήκης διαδοχικῶς ἑνὸς N-προστατευμένου ἀμινοξέος:

$$R{-}NHCH(R_2)COOX + H_2NCH(R_1)COOR' \rightarrow R\text{-}NHCH(R_2)CO\text{-}NHCH(R_1)COOR'$$

$$\xrightarrow[\text{τῆς R-}]{\text{Ἀπόσπασις}} H_2NCH(R_2)CO\ NHCH(R_1)COOR' \xrightarrow{R\text{-}NHCH(R_3)COOX}$$

$$\longrightarrow R\text{-}NHCH(R_3)CO\text{-}NHCH(R_2)CO\text{-}NHCH(R_1)COOR'$$

R=Κατάλληλος N-προστατευτικὴ ὁμὰς X=ἐνεργοποιημένον παράγωγον τοῦ καρβοξυλίου

Διὰ καταλλήλου ἐκλογῆς τῆς N-προστατευτικῆς ὁμάδος, ἀποφεύγεται ὁ κίνδυνος ρακεμιώσεως. Ἔχει διαπιστωθῆ, ὅτι N-προστατευτικαὶ ὁμάδες, αἱ ὁποῖαι δὲν προσφέρονται εἰς τὸν σχηματισμὸν ἀζλακτονῶν, ὡς εἶναι ἡ καρβοβενζόξυ-, ἡ τριτύλο-, ἡ N-t-βουτυλοξυκαρβονύλο- κλπ. προστατεύουν τὸ N-ὑποκατεστημένον ἀμινοξὺ ἐκ ρακεμιώσεως.

Κατὰ τὴν ὡς ἄνω step by step σύνθεσιν πολυπεπτιδίων ἔχει μεγάλην σημασίαν α) ἡ ἐξασφάλισις καλῆς ἀποδόσεως, διότι ἐφ' ὅσον τὰ στάδια τῆς συνθέσεως αὐξάνουν, ἡ ὁλικὴ ἀπόδοσις εἶναι πολὺ μικροτέρα τῆς ἀποδόσεως ἑκάστης βαθμίδος. β) Ἡ εὔκολος ἀπομάκρυνσις τῶν δευτερευόντων προϊόντων τῆς ἀντιδράσεως, εἰς ἕκαστον στάδιον.

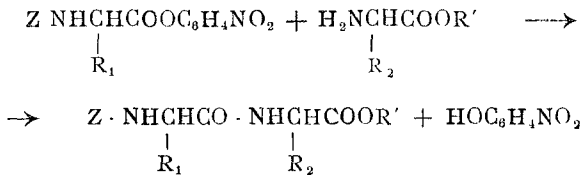
Ἡ μέθοδος συζεύξεως διὰ δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμιδίου εἰσαχθεῖσα τῷ 1955 ὑπὸ τοῦ Sheehan (68) χρησιμοποιεῖται εὐρύτατα λόγῳ τῆς ἁπλῆς ἐφαρμογῆς της. Διὰ τῆς ἐφαρμογῆς τῆς step by step μεθόδου αὐξήσεως τῆς πεπτιδικῆς ἁλύσου, ἀποφεύγονται αἱ ρακεμιώσεις. Πολλάκις ὅμως τὸ ποσὸν τῶν παραπροϊόντων εἶναι σημαντικόν, ἢ ἡ ἀπομάκρυνσις αὐτῶν δυσχερής.

$$R\text{-}NHCH(R_1)COOH + H_2NCH(R_2)COOR' \xrightarrow{C_6H_{11}N=C=NC_6H_{11}}$$

$$\longrightarrow R\text{-}NH(R_1)CO\text{-}NHCH(R_2)COOR' + C_6H_{11}NHCONHC_6H_{11}$$

Ἄλλη μέθοδος εὐρέως χρησιμοποιουμένη κατὰ τὰ τελευταῖα ἔτη εἶναι ἡ τῶν ἐνεργῶν ἐστέρων (69, 70, 71). Ἡ ἔννοια τῶν ἐνεργῶν ἐστέρων ὡς C-ἐνεργοποιημένων παραγώγων τῶν ἀμινοξέων, καταλλήλων πρὸς σύζευξιν, εἰσήχθη ὑπὸ τοῦ Schwyzer (56). Εἰς τὸν Bodanszky (71) ὀφείλεται ἡ εἰσαγωγὴ εἰς τὴν πεπτιδικὴν Χημείαν τῶν p-νιτροφαινυλεστέρων, οἱ ὁποῖοι χρησιμοποιοῦνται εὐρύτατα εἰς τὰς συνθέσεις μεγάλων πεπτιδικῶν μορίων. Οἱ p-νιτροφαινυλεστέρες τῶν N-καρβοβενζοξυαμινοξέων εἶναι κρυσταλλικαὶ καὶ σταθεραὶ οὐσίαι εὐκόλως παρασκευαζόμεναι (72)· ἡ σύζευξις αὐτῶν περαιτέρω χωρεῖ συνήθως μὲ

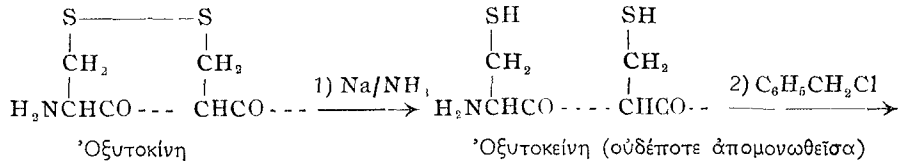
πολὺ καλὰς ἀποδόσεις. Πρὸς ἀποφυγὴν ρακεμιώσεων ἡ μέθοδος ἐφαρμόζεται μόνον εἰς σχήματα συνθέσεως step by step.

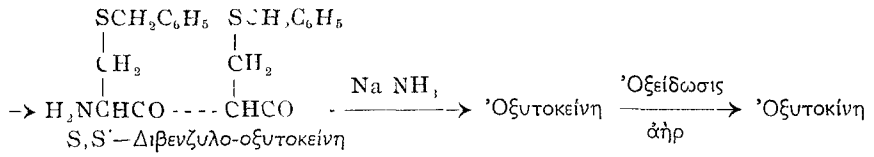


Ἡ πρώτη σύνθεσις τῆς ὀξυτοκίνης.

Ἡ πρώτη σύνθεσις τῆς ὀξυτοκίνης ἐπραγματοποιήθη ὑπὸ τοῦ du Vigneaud καὶ τῶν συνεργατῶν του C. Ressler, J. Swan, C. Roberts καὶ Π. Κατσόγιαννη τῷ 1953 (73).

Τὸ σχέδιον τῆς πορείας συνθέσεως κατεστρώθη ἐπὶ τῇ βάσει τοῦ προταθέντος συντακτικοῦ τύπου τῆς ὀξυτοκίνης, ἐστηρίχθη δὲ εἰς ὡρισμένα πειραματικὰ δεδομένα ἐπὶ τῆς ἀναγωγῆς, βενζυλιώσεως, ἀποσπάσεως τῶν S-βενζυλομάδων καὶ ἐπανοξειδώσεως τοῦ μορίου τῆς ὀξυτοκίνης. Οὕτω παλαιότερα πειράματα, κατὰ τὸ 1935, τῶν du Vigneaud καὶ Sealock (74) εἶχον δείξει, ὅτι δι' ἀναγωγῆς τῆς ὀξυτοκίνης προκύπτει *προϊόν, τὸ ὁποῖον κέκτηται ἀκόμη βιολογικὴν δραστικότητα* παραμένουσαν καὶ μετ' ἐπανοξείδωσιν διαλύματος αὐτοῦ δι' ἀερισμοῦ. Πειράματα ἐκτελεσθέντα 15 ἔτη ἀργότερον, μετὰ τοῦ Gordon (75) ἔδειξαν, ὅτι ἀναγωγὴ τῆς ὀξυτοκίνης μὲ νάτριον εἰς ὑγρὰν ἀμμωνίαν καὶ



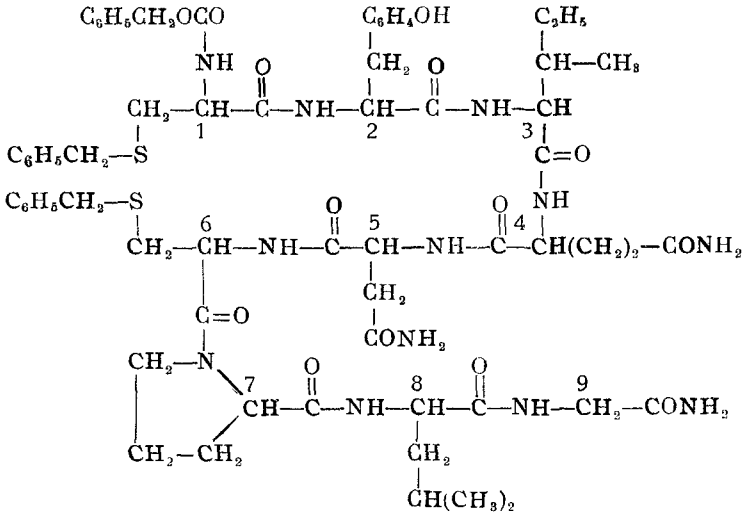


'Εκάστη παῦλα περιστᾶ ἐν ἀμινοξὺ ἐντὸς τοῦ μορίου τῆς ὀξυτοκίνης.

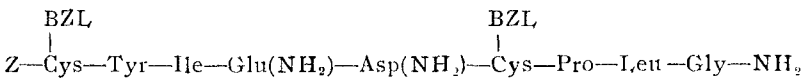
προσθήκη ἐν συνεχείᾳ βενζυλοχλωριδίου ἔδωσε προϊόν, τὸ ὁποῖον ὡς

ἀπεδείχθη ἐκ τῆς ἀναλύσεως τῶν ἀμινοξέων, περιεῖχεν δύο μόρια S-βενζυλοκυστεΐνης καὶ ἦτο βιολογικῶς ἀδρανές. Τὸ S,S'-διβενζυλοπαράγωγον τοῦτο ὑπεβλήθη εἰς ἀναγωγὴν δι' ἐπιδράσεως νατρίου εἰς ὑγρὰν ἀμμωνίαν καὶ ἐν συνεχείᾳ εἰς ὀξείδωσιν δι' ἀερισμοῦ, ὁπότε ἐλήφθη προϊὸν βιολογικῶς δραστικόν. Τὸ προϊὸν τοῦτο διὰ συγκρίσεως τῶν φυσικῶν, χημικῶν καὶ βιολογικῶν του ἰδιοτήτων ἦτο ὅμοιον μὲ τὴν ἀρχικὴν οὐσίαν, ἦτο δηλ. ὀξυτοκίνη.

Διὰ τῆς ἀνωτέρω σειρᾶς πειραμάτων καὶ γνωστοῦ ὄντος, ὅτι καὶ ἡ καρβοβενζοξικὴ ὁμὰς ἀνάγεται διὰ νατρίου ἐντὸς ὑγρᾶς ἀμμωνίας (35) τὸ πρόβλημα ἀνήχθη εἰς τὴν παρασκευὴν τοῦ ἐννεαπεπτιδίου (P) φέροντος προστατευτικὰς N- καὶ S-ὁμάδας.

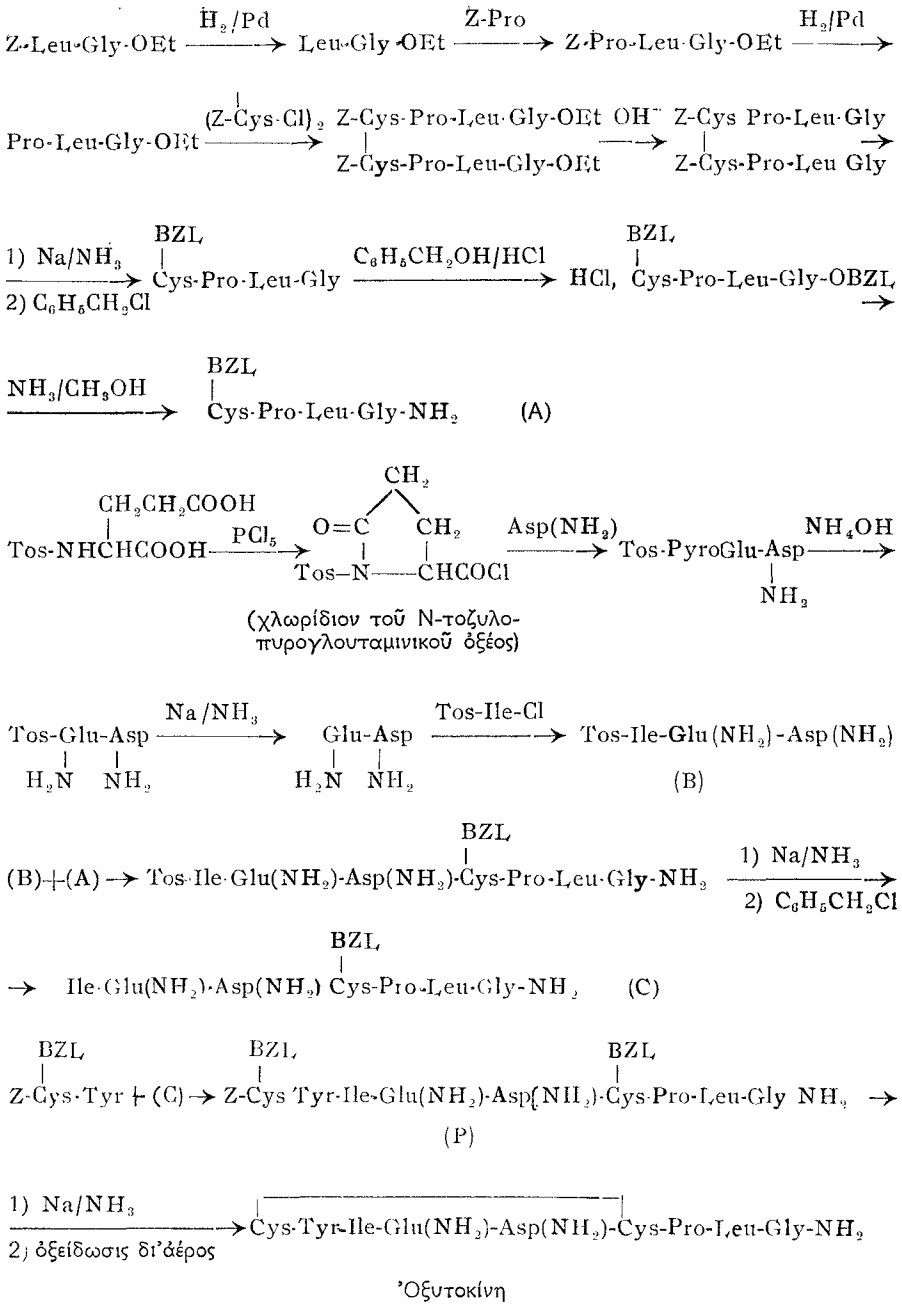


Συντακτικὸς τύπος τῆς N-Καρβοβενζοξυ-S,S'-διβενζυλο-οξυτοκεΐνης (P) μετ' ἀριθμήσεως τῶν συνιστώντων τὸ μόριον ἀμινοξέων.



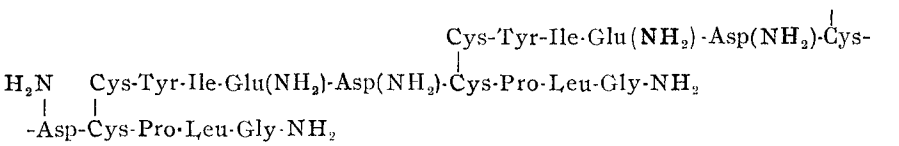
(P)

Ἡ σύνθεσις τοῦ ἐννεαπεπτιδίου (P) ἐπραγματοποιήθη συμφώνως πρὸς τὸ παρατιθέμενον σχῆμα 3. Αἱ συζεύξεις κατὰ τὰ διάφορα στάδια ἐγένοντο, ὅπου δὲν σημειοῦται ἐπὶ τοῦ σχήματος, διὰ τῆς μεθόδου τῶν μικτῶν ἀνυδριτῶν.

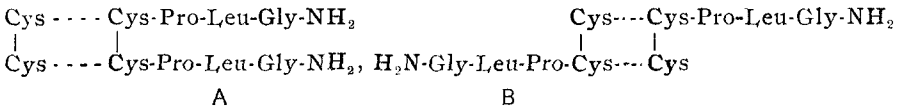


Σχῆμα 3. 'Η πρώτη σύνθεσις τῆς ὀξυτοκίνης [du Vigneaud κ.ἄ. (73)]

Ἐκ τοῦ ἐννεαπεπτιδίου ἀπεσπάσθησαν αἱ προστατευτικαὶ ὁμάδες δι' ἀναγωγῆς μὲ νάτριον εἰς ὑγρὰν ἀμμωνίαν. Μετὰ ἐξάτμισιν τῆς ἀμμωνίας καὶ διαβιβάσεως ἀέρος (ἀερισμοῦ) διὰ διαλύματος $1^0/_{00}$ εἰς pH 6,5 ἐλήφθη τὸ προϊὸν ὀξειδώσεως, τὸ ὁποῖον ἀπεμονώθη εἰς καθαρὰν κατάστασιν μόνον μετὰ καθαρισμὸν διὰ κατανομῆς κατ' ἀντιρροήν. Ἡ ὀξείδωσις πραγματοποιεῖται εἰς μεγάλην ἀραίωσιν καὶ εἰς ἐλαφρῶς ὄξινον pH, ὥστε ὁ σχηματισμὸς -S-S- γεφύρας νὰ λάβῃ χώραν κατὰ τὸ δυνατὸν ἐνδομοριακῶς. Ἐν τούτοις δὲν ἀποκλείεται καὶ ὁ σχηματισμὸς εἰς μικροτέραν κλίμακα πολυμερῶν διὰ γεφυρῶν -S-S- μεταξὺ διαφόρων μορίων, ἢ ὁ



σχηματισμὸς διμεροῦς διὰ σχηματισμοῦ δύο γεφυρῶν -S-S- μεταξὺ δύο μορίων κλπ. Τὸ διμερὲς προϊὸν δύναται θεωρητικῶς νὰ ὑπάρξῃ ὑπὸ δύο μορφάς, ἤτοι τὴν παράλληλον A, ἢ τὴν ἀντιπαράλληλον B, ἢ καὶ τὰς δύο ταυτοχρόνως.



Συστηματικαὶ μελέται τοῦ σχηματισμοῦ διμερῶν κλπ. ἐξ ἁπλουστέρων τινῶν κυστεϊνοπεπτιδίων ἔχουν γίνει ὑπὸ τοῦ Greenstein καὶ τῶν συνεργατῶν του (76). Πάντα ταῦτα ἀποτελοῦν ἐξήγησιν διὰ τὸ γεγονός, ὅτι μόνον χάρις εἰς τὸν καθαρισμὸν τοῦ συνθετικοῦ προϊόντος διὰ νεωτέρων φυσικῶν μεθόδων, ὡς π.χ. διὰ κατανομῆς κατ' ἀντιρροήν, λαμβάνεται συνήθως ἡ ὀξυτοκίνη εἰς χημικῶς καθαρὰν κατάστασιν.

Ἡ συνθετικῶς παρασκευασθεῖσα ὀξυτοκίνη ἔδειξε τὰς αὐτὰς φυσικὰς καὶ χημικὰς ἰδιότητας, μὲ τὴν φυσικῆς προελεύσεως ὀξυτοκίνην, ἤτοι τὴν αὐτὴν ποσοτικὴν σύστασιν ἀμινοξέων, στροφικὴν ἱκανότητα, συντελεστὴν κατανομῆς εἰς διάφορα συστήματα, ἠλεκτροφορητικὴν εὐκινησίαν εἰς διάφορα pH, φάσμα ἀπορροφήσεως εἰς τὸ ὑπέρυθρον καὶ ὑπεριῶδες, διάγραμμα ἐκλούσεως μετὰ χρωματογραφίαν ἐπὶ ρητίνης, κρυσταλλικὸν ἄλας μετὰ φλαβιανικοῦ ὀξέος, διάσπασιν μὲ βρωμιοῦχον ὕδωρ, μοριακὸν βάρος. Τέλος αἱ δοκιμαὶ τῆς βιολογικῆς δραστικότητος ἔδωσαν τιμὰς παραπλησίας τῶν τιμῶν τοῦ φυσικοῦ προϊόντος, ὡς πρὸς τὴν κατασταλτικὴν ἐπίδρασιν ἐπὶ τῆς πιέσεως τοῦ αἵματος τῶν πτηνῶν (77), τὴν ἐπίδρασιν ἐπὶ τῆς συστολῆς τῆς μήτρας in vitro (78) καὶ τῆς ἐκθλίψεως τοῦ γάλακτος(79).

Ἡ ἀκριβὴς τιμὴ τῶν μονάδων εἶναι βεβαίως ἐξαιρετικῶς δύσκολον νὰ

προσδιορισθῇ λόγῳ τῆς φύσεως τῆς βιολογικῆς δραστικότητος. Αἱ βιολογικαὶ δράσεις μετροῦνται συγκριτικῶς ὡς πρὸς τὸ πρότυπον τῆς 'Αμερικανικῆς Φαρμακοποιΐας [U.S.P. Posterior Pituitary Reference Standard (80)]. Αἱ τελευταίως προσδιορισθεῖσαι τιμαί, διὰ συνθετικὸν προϊὸν ἐξαιρετικῶς καθαρόν, ἔχουν ὡς ἐμφαίνεται εἰς τὸν πίνακα 1 (81).

Πίναξ 1. Τιμαὶ βιολογικῶν δράσεων συνθετικῆς ὀξυτοκίνης εἰς διεθνεῖς μονάδας/mg.

Κατασταλτικὴ ἐπίδρασις ἐπὶ τῆς πιέσεως τῶν πτηνῶν	'Ωκυτόκιος ἐπίδρασις	'Επίδρασις ἐπὶ τῆς ἐκθλίψεως τοῦ γάλακτος
507 ± 15	486 ± 5	410 ± 16

Σύνθεσις τῆς ὀξυτοκίνης ὑπὸ ἄλλων ἐρευνητῶν.

Μετὰ τὴν πρώτην ὑπὸ τοῦ du Vigneaud καὶ τῶν συνεργατῶν του πραγματοποιηθεῖσαν σύνθεσιν, μερικὰ ἄλλα 'Εργαστήρια ἠσχολήθησαν μὲ τὸ αὐτὸ πρόβλημα, κυρίως πρὸς τὸν σκοπὸν καλυτερεύσεως τῆς ἀποδόσεως λόγῳ τῆς σημασίας τῆς ὀξυτοκίνης ὡς φαρμακευτικοῦ ἰδιοσκευάσματος.

Οὕτω ἡ κατὰ τὸ ἔτος 1955 πραγματοποιηθεῖσα σύνθεσις τοῦ Boissonnas καὶ τῶν συνεργατῶν του (82) ἔχει ὡς βάσιν τὴν χρησιμοποίησιν τῶν αὐτῶν N- καὶ S- προστατευτικῶν ὁμάδων (καρβοβενζόξυ- καὶ βένζυλο-) καὶ ἄγει πρὸς τὴν αὐτὴν προβαθμίδα τῆς ὀξυτοκίνης, ἤτοι τὸ ἐννεαπεπτίδιον (P) τῆς σελ. 30. Διὰ τὰς συζεύξεις, ἐχρησιμοποιήθησαν ἐκτὸς τῶν ἀζιδίων κυρίως οἱ μικτοὶ ἀνυδρῖται μετὰ αἰθυλικοῦ μονοεστέρος τοῦ ἀνθρακικοῦ ὀξέος (65). 'Η σύνθεσις τοῦ Boissonnas ἀπετέλεσε τὴν βάσιν βιομηχανικῆς παρασκευῆς τῆς ὀξυτοκίνης, ὑπὸ τῆς Φαρμακευτικῆς 'Εταιρίας Sandoz, ἡ ὁποία φέρεται εἰς τὴν κυκλοφορίαν ὑπὸ τὸν ἐμπορικὸν ὄνομα Syntocinon.

Κατ'ἄλλην συνθετικὴν παρασκευὴν [Rudinger, 1956 (83)], ἡ ὁποία ἐπίσης ἐχρησιμοποιήθη διὰ βιομηχανικὴν παρασκευὴν τῆς ὀξυτοκίνης, ὡς προβαθμὶς παρεσκευάσθη ἀντὶ τοῦ N-καρβοβενζοξυ- τὸ ἀντίστοιχον N-τοζυλο-εννεαπεπτίδιον. 'Η ἀπομάκρυνσις τῆς N-προστατευτικῆς ὁμάδος ἐπετελέσθη ἐπίσης δι' ἐπιδράσεως μεταλλικοῦ νατρίου ἐντὸς ἀμμωνίας (σελ. 25). Τὸ προστατευμένον ἐννεαπεπτίδιον (P) παρεσκευάσθη ἀργότερον (1959) καὶ ὑπὸ τοῦ Beyermann (84) διὰ χρησιμοποιήσεως ὡς μέσου συζεύξεως κυρίως τοῦ δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμιδίου.

Τέλος ἡ μέθοδος συνθέσεως Velluz (85) στηρίζεται εἰς τὴν χρησιμοποίησιν τῆς τριτυλομάδος διὰ τὴν προστασίαν τόσον τῆς ἀμινομάδος, ὅσον καὶ τῶν σουλφυδρυλομάδων. Εἰς τὸ τελικὸν στάδιον, τὸ ὁποῖον δὲν περιγράφεται σαφῶς, ὅλαι αἱ προστατευτικαὶ ὁμάδες ἀπεμακρύνθησαν διὰ πυκνοῦ ὑδροχλωρικοῦ ὀξέος. 'Επηκολούθησεν ὀξείδωσις δι' ἀερισμοῦ κατὰ du

Vigneaud.Τελικῶς ἡ βιολογικὴ δρᾶσις ἐδοκιμάσθη ἐντὸς τοῦ διαλύματος, ἄνευ ἀπομονώσεως τῆς ὀξυτοκίνης, ἡ δὲ ἀνευρεθεῖσα βιολογικὴ δρᾶσις δὲν ἐκφράζεται εἰς μονάδας (πρβλ. σελ. 33). Ἐκ τῶν ἀνωτέρω προκύπτει, ὅτι ἐλλείπουν σοβαρὰ στοιχεῖα διὰ τὴν ἀξιολόγησιν τῆς συνθέσεως ταύτης.

Νέα σύνθεσις τῆς ὀξυτοκίνης εἰς τὸ ἐργαστήριον τοῦ du Vigneaud.

Ὀλίγα ἔτη μετὰ τὴν πρώτην ὑπ' αὐτοῦ πραγματοποιηθεῖσαν σύνθεσιν τῆς ὀξυτοκίνης, ὁ du Vigneaud ἐν συνεργασίᾳ αὐτὴν τὴν φορὰν μετὰ τοῦ Bodanszky (86) ἐπραγματοποίησε καὶ νέαν σύνθεσιν χρησιμοποιήσας πρὸς τοῦτο τὴν ἐν τῷ μεταξὺ ἀποκτηθεῖσαν πεῖραν πρὸς ἀποφυγὴν ρακεμιώσεων. Πρὸς τὸν σκοπὸν αὐτόν, ἡ νέα σύνθεσις ἔγινε «step by step» ὡς μέσον δὲ συζεύξεως ἐχρησιμοποιήθη ἀποκλειστικῶς ἡ μέθοδος τῶν νιτροφαινυλεστέρων, (σελ. 28), ἡ ὁποία ὀλίγον προηγουμένως εἶχεν εἰσαχθῆ εἰς τὴν βιβλιογραφίαν ὑπὸ τοῦ Bodanszky (71). Ἡ σύνθεσις αὕτη ἤγαγε εἰς τὸν σχηματισμὸν τοῦ αὐτοῦ προστατευμένου N-καρβοβενζοξυεννεαπεπτιδίου [(P) σελ. 30], τὸ ὁποῖον λόγῳ ἀκριβῶς τῆς πορείας τῆς συνθέσεως παρεῖχεν πᾶσαν δυνατὴν ἐγγύησιν, ὅτι ἦτο στερεοχημικῶς ὁμοιογενὲς δηλ. L, L, L,L,L,L,L, στερεοϊσομερές. Ἀλλὰ καὶ πάλιν ἡ ἀπόσπασις τῶν προστατευτικῶν ὁμάδων δὲν ἠδύνατο νὰ ἐπιτελεσθῆ ἄλλως παρὰ διὰ τῆς ἐπιδράσεως νατρίου ἐντὸς ὑγρᾶς ἀμμωνίας, πρᾶγμα τὸ ὁποῖον ἔχει μεταξὺ ἄλλων καὶ ὡς συνέπειαν νὰ μὴ δύναται νὰ ἀπομονωθῆ ἡ ἐνδιάμεσος ἕνωσις ὀξυτοκεΐνη οὔτε ὑπὸ μορφὴν παραγώγου.

Σύνθεσις «ἀναλόγων» τῆς ὀξυτοκίνης.

Ἡ σύνθεσις τῆς ὀξυτοκίνης, ὑπῆρξεν ἡ ἀπαρχὴ πρὸς τὴν παρασκευὴν «ἀναλόγων ἐνώσεων» πρὸς τὸν σκοπὸν τῆς μελέτης τῶν σχέσεων τῆς συντάξεως πρὸς τὴν βιολογικὴν δρᾶσιν.

Γενικῶς ὡς «ἀνάλογα» νοοῦνται ἑνώσεις, εἰς τὰς ὁποίας, ἐν σχέσει πρὸς τὴν φυσικὴν ὁρμόνην, ἔχουν ἐπέλθει προκαθορισθεῖσαι μεταβολαὶ τοῦ μορίου, π.χ. ἀντικατάστασις ἑνὸς ἢ περισσοτέρων ἀμινοξέων δι'ἄλλων, ἐναλλαγὴ ἀλληλουχίας ἀμινοξέων, αὔξησις ἢ ἐλάττωσις τοῦ ἀριθμοῦ αὐτῶν κλπ. «Ἀνάλογον» τῆς ὀξυτοκίνης φυσικῆς προελεύσεως δύναται νὰ θεωρηθῆ καὶ ἡ ἑτέρα ὁρμόνη τοῦ ὀπισθίου λοβοῦ τῆς ὑποφύσεως, ἡ βασοπρεσσίνη (87), εἰς τὴν ὁποίαν ἡ εἰς θέσιν 3 τοῦ μορίου τῆς ὀξυτοκίνης ἰσολευκίνη ἔχει ἀντικατασταθῆ ὑπὸ φαινυλαλανίνης, ἡ δὲ εἰς θέσιν 8 λευκίνη ὑπὸ ἀργινίνης ἢ λυσίνης.

Διὰ τῆς παρασκευῆς τῶν «ἀναλόγων» ἐπιχειρεῖται νὰ διερευνηθῆ ποῖαι δραστικαὶ ὁμάδες ἢ ποῖα ἀμινοξέα καὶ εἰς ποίαν θέσιν τοῦ μορίου εἶναι ἀπαραίτητα διὰ τὴν βιολογικὴν δρᾶσιν καὶ συνεπῶς ποία εἶναι ἡ σχέσις τῆς βιολογικῆς δραστικότητος πρὸς τὴν τοποχημείαν τοῦ μορίου.

Ἐκ τῆς μεγάλης ποικιλίας τῶν δυνατῶν «ἀναλόγων» 35 εἶχον παρασκευασθῆ μέχρι τοῦ Δεκεμβρίου τοῦ 1962 (88). Ὁ ἀριθμὸς τούτων συνεχῶς αὐξάνει. Εἰς τὸν πίνακα 2 ἀναγράφονται μερικὰ τῶν παρασκευασθέντων «ἀναλόγων».

Πίναξ 2.— Μερικὰ «ἀνάλογα» τῆς ὀξυτοκίνης

Τύπος * καὶ ὀνομασία	Βιβλιογραφία
Cys -Tyr - Ile - Glu(NH_2)- Asp(NH_2) - Cys - Pro - Leu - Gly -NH_2 Ὀξυτοκίνη	(73)
Cys - Tyr - Phe - Glu(NH_2) - Asp(NH_2) - Cys - Pro - Arg - Gly - NH_2 Ἀργινυλο-βασοπρεσσίνη	(87)
Cys - Ser - Ile - Glu(NH_2) - Asp(NH_2)- Cys - Pro - Leu - Gly -NH_2 2-Σερυλο-οξυτοκίνη	(89)
S—Cys CH_2 - CH_2 - CO - Tyr - Ile - Glu(NH_2) - Asp(NH_2) - Cys - Pro - Leu - Gly - NH_2 1-β-Θειολοπροπιονυλο-οξυτοκίνη (Deamino-oxytocin)	(90)
Cys - Tyr - Ile - Glu(NH_2)- Asp(NH_2) - Cys - NH_2 Δισουλφιδικὸς δακτύλιος τῆς ὀξυτοκίνης	(92)
Gly - Cys - Tyr - Ile - Glu(NH_2) - Asp(NH_2)-Cys - Pro - Leu - Gly - NH_2 Γλυκυλο-οξυτοκίνη	(91,94)
Cys - Tyr - Tyr - Ile - Glu(NH_2) - Asp(NH_2) - Cys - Pro - Leu - Gly - NH_2 2-Τυροσυλο-τυροσυλο-οξυτοκίνη	(95)
S—Cys CH_2-CH_2-CH-CO-Tyr-Ile-Glu(NH_2)-Asp(NH_2)-Cys-Pro-Leu-Gly-NH_2 NH_2 1-Ὁμοκυστεϊνυλο-οξυτοκίνη	(96)
Cys - D - Tyr - Ile - Glu(NH_2) - Asp(NH_2 - Cys - Pro - Leu - Gly - NH_2 2-D-Τυροσυλο-οξυτοκίνη	(97)
Cys - Tyr - Ile - Glu - Asp(NH_2) - Cys - Pro - Leu - Gly - NH_2 4-Γλουταμυλο-οξυτοκίνη	(98)
CH_2—Cys CH_2-CH_2-CO-Tyr-Ile-Glu(NH_2)-Asp(NH_2)-Cys-Pro-Leu-Gly-NH_2 1-Βουτυρυλο-οξυτοκίνη **	(99)

* Διὰ τὴν συμβολικὴν παράστασιν τῶν ἀμινοξέων βλ. σελ. 9. Εἰς τοὺς ἀνωτέρω τύπους ἐχρησιμοποιήθησαν καὶ μικτὰ σύμβολα ἐκ συντακτικῶν τύπων καὶ γραμμάτων.

** «Ἀνάλογον» εἰς τὸ ὁποῖον τὸ –S–, εἰς θέσιν 1, τῆς 1-β-θειολοπροπιονυλο-οξυτοκίνης ἔχει ἀντικατασταθῆ διὰ τῆς ἰσοστερικῆς αὐτοῦ ὁμάδος $–CH_2–$.

Ἡ συνθετικὴ παρασκευὴ ὅλων τῶν «ἀναλόγων» χωρεῖ διὰ χρησιμοποιήσεως τῆς καρβοβενζοξυ- (σπανιώτερον τῆς τοζυλομάδος) ὡς Ν-προστατευτικῆς ὁμάδος καὶ τῆς βενζυλομάδος ὡς S- προστατευτικῆς ὁμάδος. Ὅλαι αἱ συνθέσεις ἄγουν πάντοτε εἰς Ν-καρβοβενζοξυ- (ἢ Ν-τοζυλο) - S,S'-διβενζυλο-πολυπεπτίδια ἐκ τῶν ὁποίων αἱ προστατευτικαὶ ὁμάδες ἀπομακρύνονται διὰ νατρίου ἐντὸς ὑγρᾶς ἀμμωνίας, ἀκολουθοῦν δηλαδὴ τὴν γενικὴν πορείαν τῶν ὡς ἄνω περιγραφεισῶν συνθέσεων τῆς ὀξυτοκίνης. Ἐν τούτοις, κατὰ τὴν ἀπόσπασιν τῶν Ν- καὶ S- προστατευτικῶν ὁμάδων διὰ νατρίου εἰς ὑγρὰν ἀμμωνίαν, ἔχουν παρατηρηθῆ ἀνεπιθύμητοι παράπλευροι ἀντιδράσεις, ὡς διάσπασις πεπτιδικῶν δεσμῶν, π.χ. Lys-Pro (100, 101) καὶ Tyr-Pro (101) ἢ ἀπομεθυλίωσις τῆς μεθειονίνης (102).

Κατὰ τὴν παρασκευὴν τοῦ «ἀναλόγου» 4 - γλουταμυλο - οξυτοκίνης [du Vigneaud - Φωτάκη (98)] ἐχρησιμοποιήθη ὡς Ν-προστατευτικὴ ὁμὰς εἰς τὴν περίπτωσιν τοῦ γλουταμινικοῦ ὀξέος ἡ ο-νιτροφαινυλοσουλφενυλομὰς (NPS-), ἡ ὁποία ἀποτελεῖ τὴν βάσιν μιᾶς νέας γενικῆς μεθόδου συνθέσεως πεπτιδίων (πρβλ. κατωτέρω) ἐκπονηθείσης εἰς τὸν ἐργαστήριον Ὀργανικῆς Χημείας [Ζέρβας, Μποροβᾶς, Γαζῆς, Χαμαλίδης (103, 104)].

Γενικὸν συμπέρασμα τῶν μέχρι τοῦδε συνθέσεων ὀξυτοκίνης καὶ «ἀναλόγων».

Ἡ πρωτοποριακὴ ἐργασία τοῦ du Vigneaud καὶ τῶν συνεργατῶν του, ἀπετέλεσε κατὰ τοῦτο ἕνα μεγάλον ἐπιστημονικὸν ἆθλον, διότι διὰ χρησιμοποιήσεως γνωστῶν ἀλλὰ καὶ ἰδίων μεθόδων κατέστησε προσιτὴν ὄχι μόνον τὴν ὀξυτοκίνην, ἀλλὰ καὶ ἤνοιξε τὴν ὁδὸν διὰ τὴν μελέτην τῶν σχέσεων βιολογικῆς δράσεως καὶ συντάξεως.

Σὺν τῇ παρόδῳ ὅμως τοῦ χρόνου καὶ λόγῳ τῆς ἀνάγκης διευρύνσεως τοῦ ἀντικειμένου ἐρεύνης (παρασκευῆς δηλαδὴ περισσοτέρων καὶ χημικῶς πολυπλοκωτέρων «ἀναλόγων»), προκύπτει ἡ ἀδήριτος ἀνάγκη ἔτι περαιτέρω τελειοποιήσεως τῶν μεθόδων συνθέσεως. Ἡ τελειοποίησις αὕτη θὰ εἶχεν ἀνταν ἀκλασιν ὄχι μόνον ἐπὶ τῆς Χημείας τῆς ὀξυτοκίνης καὶ τῶν «ἀναλόγων» της ἀλλὰ καὶ ἄμεσον ἐπιρροὴν εἰς τὴν ἐπίλυσιν ἑνὸς ἔτι εὐρυτέρου καὶ σημαντικωτέρου προβλήματος, τοῦ προβλήματος τῶν πρωτεϊνῶν, αἱ ὁποῖαι περιέχουν θεῖον.

Ἡ ἀνεύρεσις τῆς συντάξεως καὶ ἡ σύνθεσις τῆς ὀξυτοκίνης καὶ βασοπρεσσίνης ὑπῆρξε καὶ κατὰ τοῦτο σημαντικὸς σταθμὸς εἰς τὴν πρόοδον τῆς νεωτέρας χημείας τῶν πρωτεϊνῶν, διότι ἀκριβῶς αἱ ἴδιαι μέθοδοι αἱ χρησιμοποιηθεῖσαι διὰ τὰς συνθέσεις ταύτας ἐχρησιμοποιήθησαν πρὸς τὸν πλέον φιλόδοξον σκοπὸν συνθέσεως καὶ αὐτῆς τῆς ἰνσουλίνης (55, 56). Εἰς τὴν κατεύθυνσιν ὅμως αὐτὴν ἡ Χημεία θέτει μερικὰ ἐμπόδια, ὡς φυσικὸν μεθοδολογικῆς φύσεως, τὰ ὁποῖα πρέπει νὰ ὑπερνικηθοῦν.

'Από τινων ἐτῶν καταβάλλονται μεγάλαι προσπάθειαι εἰς τὸ 'Εργαστήριον 'Οργανικῆς Χημείας τοῦ Πανεπιστημίου 'Αθηνῶν καὶ ἀλλαχοῦ, διὰ τὴν ἀνανέωσιν καὶ τελειοποίησιν τῶν μεθόδων συνθέσεως τῶν πεπτιδίων. 'Η παροῦσα διατριβὴ ἀποτελεῖ ἀκριβῶς τὴν πρώτην ἐφαρμογὴν εἰς εὐρεῖαν κλίμακα τοιούτων νέων μεθόδων καὶ τὸν πρῶτον εἰς εὐρεῖαν κλίμακα ἔλεγχον τῆς ἀποδοτικότητός των ἐπὶ ἑνὸς προϊόντος ὡς ἡ ὀξυτοκίνη, τὸ ὁποῖον εὑρίσκεται ἀκόμη εἰς τὸ προσκήνιον τῆς ἐρεύνης.

Νεώτεραι μέθοδοι συνθέσεως πεπτιδίων.

Διὰ τὴν ἀντιμετώπισιν ὑπὸ τὸ ὡς ἄνω πρῖσμα τῆς συνθέσεως τῆς ὀξυτοκίνης, «ἀναλόγων» αὐτῆς,ὡς καὶ πρωτεϊνῶν ἀκόμη ἐπὶ τῇ βάσει νέων μεθοδολογικῶν προϋποθέσεων, ἀναφέρονται κατωτέρω αἱ ὑπ' ἐμοῦ πέραν τῶν κλασσικῶν (βλ. σελ. 23) χρησιμοποιηθεῖσαι μέθοδοι, μερικαὶ ἐκ τῶν ὁποίων ἐξεπονήθησαν εἰς τὸ 'Εργαστήριον 'Οργανικῆς Χημείας. 'Η κατάταξις τῶν μεθόδων τούτων ἀκολουθεῖ τὸ εἰς τὴν σελίδα 23 δοθὲν σχῆμα.

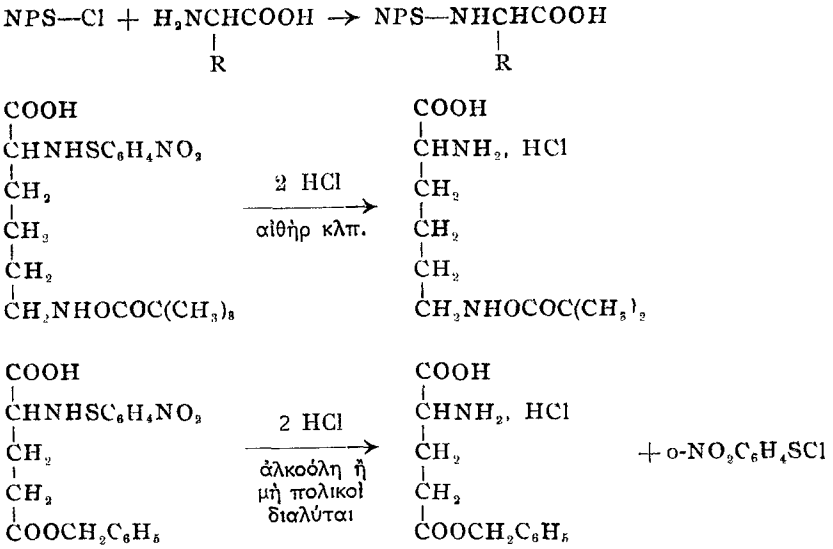
'Ως N-προστατευτικὴ ὁμὰς (I, σελ. 23) εἰσήχθη ἐσχάτως εἰς τὴν βιβλιογραφίαν καὶ ἐχρησιμοποιήθη εἰς πολλὰς περιπτώσεις ἡ t-βουτυλοξυκαρβονυλικὴ ὁμὰς [Anderson, Schwyzer (105)], ἡ ὁποία δύναται ν' ἀποσπασθῇ εὐκόλως τῇ ἐπιδράσει περισσείας 2 N ὑδροχλωρίου ἐντὸς ἀδρανῶν διαλυτικῶν μέσων ἐπὶ 30 λεπτὰ περίπου, ἢ τῇ ἐπιδράσει ἀνύδρου φθοριοξεικοῦ ὀξέος.

$$BOC—NHCH(R)CO\text{----} \xrightarrow{H^+} H_2NCH(R)CO\text{----}$$

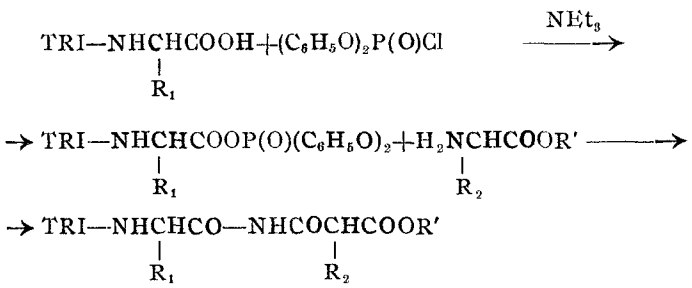
'Ακόμη εὐπαθεστέρα ἀλλὰ πλέον εὔχρηστος ἀπεδείχθη ἡ ο-νιτροφαινυλοσουλφενυλομάς, (NPS-) [Zέρβας κ.ἄ. (103, 104)], ἡ ὁποία δύναται ν' ἀπομακρυνθῇ μὲ δύο ἰσοδύναμα ὑδροχλωρίου ἐντὸς ἀδρανῶν διαλυτικῶν μέσων ἢ καὶ δ' ἀραιοῦ ὀξεικοῦ ὀξέος, ἐντὸς 2-3 λεπτῶν. 'Αξιοσημείωτον εἶναι τὸ γεγονός, ὅτι εἰς ἑνώσεις περιλαμβανούσας N-καρβοβενζοξυ, N-τριτυλο- ἀκόμη καὶ N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο- ὡς καὶ O-βενζυλο- ὁμάδας, τῇ ἐπιδράσει δύο ἰσοδυνάμων ὑδροχλωρίου εἰς ἀδρανὲς διαλυτικὸν μέσον, ἀποσπᾶται ἐκλεκτικῶς μόνον ἡ NPS-ὁμάς.

Τὸ γεγονὸς τοῦτο ἐνέχει ἰδιαιτέραν σημασίαν διότι κατὰ τὸν τρόπον αὐτὸν δύναται νὰ ἐπιμηκυνθῇ ἡ πεπτιδικὴ ἅλυσος τῇ βοηθείᾳ τῆς NPS - μεθόδου ὑπὸ ταὐτόχρονον προστασίαν πλευρικῶν δραστικῶν ὁμάδων μὲ καθιερωμένας προστατευτικὰς ὁμάδας, ὡς βένζυλο-, καρβοβενζόξυ-, τριτύλο-, t-βουτυλοξυκαρβονύλο-, αἱ ὁποῖαι δύνανται τελικῶς εὐκόλως ν' ἀπομακρυνθοῦν ἐπὶ τῇ βάσει γνωστῶν μεθόδων. Οὕτω, ἡ ὡς ἄνω NPS-

μέθοδος συμβάλλει ἐμμέσως εἰς τὸ πρόβλημα τῆς παροδικῆς προστασίας πλευρικῶν δραστικῶν ἁλύσων, (III, σελ. 26).



Εἰς τὰ πλέον δραστικὰ καὶ ἀποτελεσματικὰ μέσα συζεύξεως προσετέθη ἐσχάτως καὶ νέον, οἱ μικτοὶ ἀνυδρῖται μετὰ διφαινυλοφωσφορικοῦ ὀξέος [Κοσμᾶτος, Φωτάκη, Ζέρβας (106)].



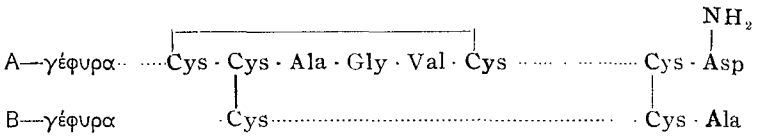
Οἱ μικτοὶ οὗτοι ἀνυδρῖται εὑρέθησαν δραστικοὶ ἀκόμη καὶ εἰς περιπτώσεις N- παραγώγων ἀμινοξέων (π. χ. τριτυλοπαραγώγων), τὰ ὁποῖα λόγῳ στερεοχημικῆς παρεμποδίσεως δὲν προσφέρονται εἰς συζεύξεις τῇ βοηθείᾳ ἄλλων μικτῶν ἀνυδριτῶν.

Τέλος, ὅπερ σπουδαιότερον, εἰσήχθησαν εἰς τὴν βιβλιογραφίαν καὶ ἀποτελεσματικαὶ μέθοδοι προστασίας τῆς πλευρικῆς ἁλύσου τῆς κυστεΐνης [Ζέρβας, Φωτάκη, (107, 111, 112, 113)], πρᾶγμα τὸ ὁποῖον ἔθεσεν ἐπὶ νέων

βάσεων τὸ ὅλον πρόβλημα τῆς ὀξυτοκίνης, τῶν «ἀναλόγων» της, ἀκόμη καὶ πρωτεϊνῶν ἐφ' ὅσον αὗται περιέχουν θεῖον. Αἱ μέθοδοι αὗται ἐξεπονήθησαν εἰδικῶς διὰ τὴν ἀντιμετώπισιν βασικοῦ προβλήματος τῆς Χημείας τῶν πρωτεϊνῶν, τῆς συνθέσεως δηλαδὴ ἀσυμμέτρων πεπτιδίων τῆς κυστίνης. Ὡς ἐκ τούτου ἐθεωρήθη χρήσιμον, ὅπως ἡ ἑπομένη παράγραφος ἀφιερωθῇ εἰς τὸ πρόβλημα τοῦτο.

Τὸ πρόβλημα τῆς συνθέσεως ἀσυμμέτρων πεπτιδίων τῆς κυστίνης.

Ὡς γνωστόν, μὴ συμμετρικὰ πεπτίδια καὶ γενικώτερον μὴ συμμετρικὰ παράγωγα τῆς κυστίνης ἀποτελοῦντα ἀνοικτὴν ἄλυσον δὲν εἶναι σταθερά, ἀλλὰ μετασχηματίζονται πολὺ εὐκόλως καὶ αὐτομάτως, ταχύτερον ὑπὸ τὴν ἐπίδρασιν καταλυτῶν π.χ. ἀλκαλίων ἢ ὀξέων, πρὸς συμμετρικὰ τοιαῦτα [Sanger, Zέρβας κ.ἄ. (108, 109)]. Ἡ ἀνεύρεσις εἰς τὴν φύσιν καὶ ἡ ὕπαρξις μὴ συμμετρικῶν πεπτιδίων τῆς κυστίνης ὡς π. χ. εἰς τὴν περίπτωσιν τῆς ὀξυτοκίνης καὶ βασοπρεσσίνης, ὀφείλεται κατὰ Zέρβαν-Φωτάκη (111) προφανῶς εἰς τὸ γεγονός, ὅτι αἱ ἑνώσεις αὗται ἔχουν κυκλικὴν σύνταξιν καὶ ὅτι ἡ μοναδικὴ κυστινο-S-S-γέφυρα ἀποτελεῖ «κρίκον» τοῦ δακτυλίου. Ἡ κυκλικὴ αὕτη σύνταξις, μὴ ἐπιτρέπουσα ὡς ἐκ τῆς φύσεώς της ἐλευθέραν περιστροφὴν τοῦ μορίου περὶ τὸν ἄξονα συνδέσεως δύο κρίκων τοῦ δακτυλίου, παρεμποδίζει τὸν μετασχηματισμὸν καὶ προσδίδει εἰς τὸ μόριον σταθερότητα. Τὸ αὐτὸ συμβαίνει προκειμένου περὶ θειούχων πρωτεϊνῶν, ὡς εἶναι π. χ. ἡ ἰνσουλίνη εἰς τὴν ὁποίαν περισσότεραι τῆς μιᾶς γεφύρας, συγκρατοῦν



τὰς πεπτιδικὰς ἁλύσους καὶ ἀναγκάζουν ταύτας ν' ἀποτελέσουν μέλη ἑνὸς πολυμελοῦς δακτυλίου.

Εἶναι ἀξιοσημείωτον, ὅτι αἱ ὁρμόναι ὀξυτοκίνη καὶ βασοπρεσσίνη, ἀποτελοῦνται ἀπὸ ἕνα 20μελῆ δισουλφιδικὸν δακτύλιον. Ἀνάλογος 20μελὴς δισουλφιδικὸς δακτύλιος περιέχεται μεταξὺ ἄλλων καὶ εἰς τὸ μόριον τῆς ἰνσουλίνης (110).

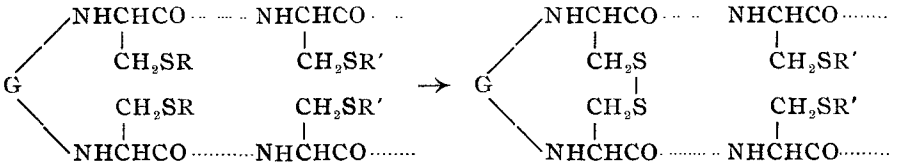
Ἡ σύνθεσις τῆς ὀξυτοκίνης, ἐπετελέσθη εἰς χρόνον κατὰ τὸν ὁποῖον ἡ ἀστάθεια τῶν ἀσυμμέτρων πεπτιδίων τῆς κυστίνης δὲν εἶχε καταστῆ ἀκόμη γνωστή, ἐπετεύχθη δὲ διὰ τὸν ἑξῆς λόγον: ἡ πορεία τῆς συνθέσεως ἤρχισεν ὄχι μὲ τὴν παρασκευὴν μὴ συμμετρικῶν παραγώγων τῆς κυστίνης, ὁπότε ἡ προσπάθεια θὰ ἐτερματίζετο ἀμέσως καὶ ἀνεπιτυχῶς, ἀλλὰ μὲ σύνθεσιν

ένὸς ἀνοικτοῦ ἐννεαπεπτιδίου περιέχοντος εἰς καταλλήλους θέσεις κυστεΐνην ἀντὶ κυστίνης. Ὀξείδωσις τῶν δύο πλευρικῶν σουλφυδρυλομάδων πρὸς δισουλφιδικὸν παράγωγον, ἀπεκατέστησε τὴν -S-S- γέφυραν, ὁπότε πλέον ἐσχηματίσθη δακτύλιος, σταθεροποιητὴς τῆς συντάξεως.Ἐν τούτοις αἱ κλασσικαὶ μέθοδοι,αἱ ὁποῖαι ἐχρησιμοποιήθησαν ὑπὸ τοῦ du Vigneaud ἐπαρκοῦν μὲν κατ' ἀρχὴν διὰ τὴν παρασκευὴν ὀξυτοκίνης οὐχὶ ὅμως καὶ ἀσυμμέτρων πεπτιδίων μὲ δύο π.χ. -S-S- γεφύρας ἢ μὲ μίαν γέφυραν -S-S- ἀλλὰ περιλαμβάνουσαν εἰς τὸ μόριον αὐτῆς καὶ μίαν ρίζαν κυστεΐνης μὲ ἐλεύθερον -SH. Τοῦτο εἶναι συνέπεια τοῦ γεγονότος, ὅτι ἡ S - βενζυλομὰς δύναται ν' ἀπομακρυνθῇ μόνον δι' ἰσχυρῶν ἀναγωγικῶν μέσων π.χ. διὰ νατρίου ἐντὸς ὑγρᾶς ἀμμωνίας, ὁπότε ὅμως θὰ ὑφίστατο ταυτοχρόνως ἀναγωγὴν προϋπάρχουσα -S-S- γέφυρα. Ἀφ' ἑτέρου χρησιμοποιοῦντες ὡς μέσον S-προστασίας μόνον τὴν βενζυλομάδα δὲν θὰ ἠδυνάμεθα ν' ἀποκαταστήσωμεν, ἐκλεκτικῶς, -S-S- γέφυραν εἰς μόριον περιέχον τρεῖς ἢ περισσοτέρας -SH ὁμάδας.

Διὰ τὴν λύσιν τοῦ γενικωτέρου τούτου προβλήματος κατεστρώθη εἰς τὸ Ἐργαστήριον Ὀργανικῆς Χημείας καὶ ἤρχισεν ἀπό τινος ἐκτελούμενον, τὸ κατωτέρω ἐκτιθέμενον πρόγραμμα εἰδικῶν ἐρευνῶν. Δύο εἶναι αἱ προϋθέσεις διὰ τὴν ἐπιτυχῆ λύσιν τοῦ προβλήματος (111) :

α) ὕπαρξις διαφόρων S- προστατευτικῶν ὁμάδων καὶ ἀντιστοίχων παραγώγων τῆς κυστεΐνης πρὸς τὸν σκοπὸν ἐντάξεως αὐτῶν εἰς πεπτιδικὰς ἁλύσους. Αἱ S- προστατευτικαὶ ὁμάδες πρέπει βεβαίως νὰ εἶναι τοιαῦται, ὥστε νὰ δύνανται ν' ἀπομακρύνωνται ἐκλεκτικῶς καὶ ὑπὸ συνθήκας, αἱ ὁποῖαι δὲν προσβάλλουν τοὺς πεπτιδικοὺς δεσμοὺς καὶ τυχὸν ἐντὸς τοῦ μορίου προϋπαρχούσας -S-S- γεφύρας καί

β) προσωρινὴ προστασία διὰ τῆς αὐτῆς πολυσθενοῦς N-προστατευτικῆς ὁμάδος G τῶν ἐλευθέρων τελικῶν ἀμινομάδων δύο διαφόρων ἀνοικτῶν πεπτιδικῶν ἁλύσων, περιεχουσῶν S-ὑποκατεστημένας ρίζας κυστεΐνης.



Περαιτέρω, διὰ ἐκλεκτικῆς ἀπομακρύνσεως δύο S-προστατευτικῶν ὁμάδων (μιᾶς ἐξ ἑκάστης ἁλύσου) καὶ διὰ ὀξειδώσεως τῶν ἐλευθέρων -SH ὁμάδων, σχηματίζεται μία -S-S- γέφυρα ἐντεταγμένη ἐντὸς πολυμελοῦς δακτυλίου καὶ τοιουτοτρόπως μὴ δίδουσα λαβὴν εἰς μετασχηματισμόν. Διὰ ἐπανα-

λήψεως τῆς ἐκλεκτικῆς ἀποσπάσεως δύο ἄλλων S-προστατευτικῶν ὁμάδων (π.χ. εἰς τὸ ἀνωτέρω σχῆμα τῶν R') καὶ ὀξειδώσεως δύναται νὰ σχηματισθῇ καὶ δευτέρα γέφυρα -S-S-. Αἱ δύο -S-S- γέφυραι προστατεύονται ἀμοιβαίως ἐπειδὴ εὑρίσκονται ἐντεταγμέναι ἐντὸς δακτυλίου. Ὡς ἐκ τούτου ἡ προστατευτικὴ ὁμὰς G δὲν χρειάζεται πλέον καὶ θὰ πρέπῃ ν' ἀπομακρυνθῇ ὑπὸ συνθήκας, αἱ ὁποῖαι δὲν προσβάλλουν τοὺς πεπτιδικοὺς δεσμοὺς καὶ τὰς -S-S- γεφύρας.

Εἰς τὸ Ἐργαστήριον Ὀργανικῆς Χημείας τοῦ Πανεπιστημίου Ἀθηνῶν, αἱ δύο ὡς ἄνω προϋποθέσεις ἔχουν ἀντιμετωπισθῇ ὡς κάτωθι :

α) Νέαι S-προστατευτικαὶ ὁμάδες εἰσήχθησαν ὑφ' ἡμῶν (107, 111, 112, 113) εἰς τὴν βιβλιογραφίαν, ὡς εἶναι ἡ διφαινυλομέθυλο- (DPM) καὶ

Πίναξ 3. Ἀπομάκρυνσις S - προστατευτικῶν ὁμάδων

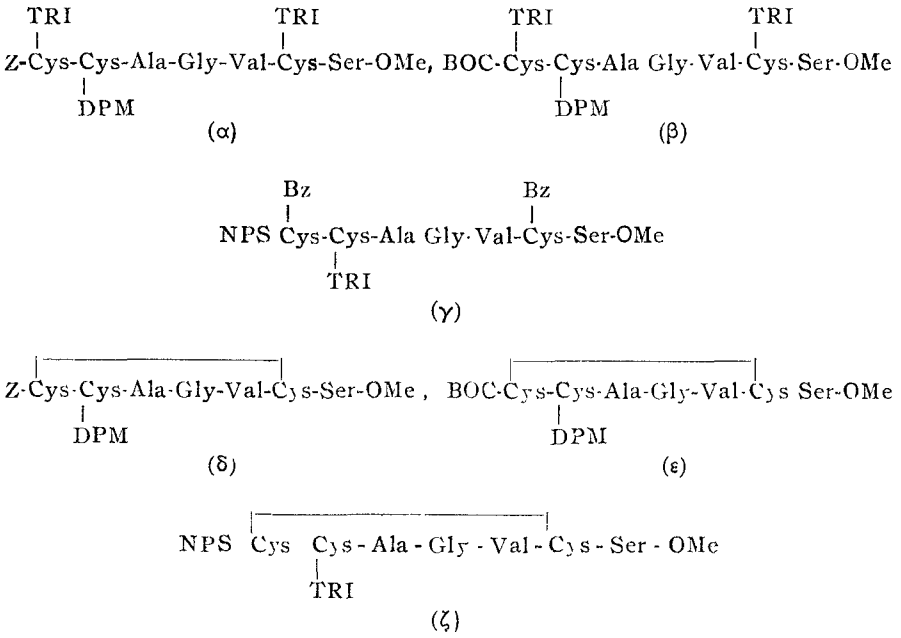
Ὁμάδες	Ἀντιδραστήρια	% Διάσπασις
1. S--Τριτύλο-	α. $AgNO_3$—Πυριδίνη	100, εἰς 20° ἐπὶ 1 λεπτ.
	β. N HBr εἰς ὀξεικὸν ὀξὺ	95, εἰς 10° ἐπὶ 3 λεπτ.
	0,2 N HBr εἰς ὀξεικὸν ὀξὺ	75, εἰς 10° ἐπὶ 5 λεπτ.
	γ. Τριφθοριοξεικὸν ὀξὺ	95, εἰς 70° ἐπὶ 30 λεπτ.
2. S-Διφαινυλο-	α. Τριφθοριοξεικὸν ὀξὺ	98, εἰς 70° ἐπὶ 15 λεπτ.
μέθυλο-	β. 2 N HBr εἰς ὀξεικὸν ὀξὺ	5–10, εἰς 20° ἐπὶ 20 λεπτ.
	γ. Na/NH_3	100
3. S–Βενζοΰλο-	α. 1 ἰσοδ. 0,1 N CH_3ONa εἰς CH_3OH	98, εἰς 20° ἐπὶ 5 λεπτ.
	β. 2 N HBr εἰς ὀξεικὸν ὀξὺ	5–7, εἰς 20° ἐπὶ 30 λεπτ.
	γ. 2 N ἀμμωνία	95, εἰς 20° ἐπὶ 30 λεπτ.
	δ. Τριφθοριοξεικὸν ὀξὺ	2–3, εἰς 20° ἐπὶ 30 λεπτ.
	ε. NH_2NH_2	
4. S–Καρβο-	α. 1 ἰσοδ. 0,1 N CH_3ONa	90, εἰς 20° ἐπὶ 30 λεπτ.
βενζόξυ-	εἰς CH_3OH	
	β. 2 N HBr εἰς ὀξεικὸν ὀξὺ	12–14, εἰς 20° ἐπὶ 20 λεπτ.
	γ. Τριφθοριοξεικὸν ὀξὺ	85–88, εἰς 70° ἐπὶ 30 λεπτ.

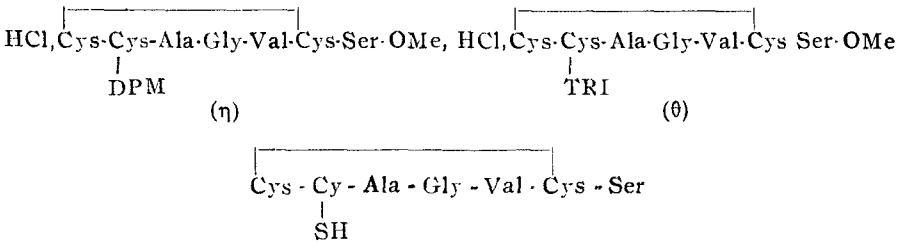
αἱ S-ἀκυλομάδες, S-βενζοΰλο- καὶ S-ἀκέτυλο-. Ἄλλαι, ἤδη γνωσταὶ μέθοδοι S-προστασίας, ἐτελειοποιήθησαν καὶ τοιουτοτρόπως ἀπέβησαν χρήσιμοι διὰ πρακτικὰς ἐφαρμογάς· οὕτω μία κατάλληλος ὁμὰς εἶναι καὶ ἡ S-τριτυλομὰς (114) διὰ τὴν ὁποίαν ἀνεύρομεν ἁπλουστέρους τρόπους εἰσαγωγῆς της εἰς SH-ὁμάδας καί, ὅπερ σπουδαιότερον, ποσοτικὸν τρόπον ἠπίας ἐκλεκτικῆς της ἀπομακρύνσεως. Ἐπὶ πλέον ἐπετύχομεν διὰ πρώτην φορὰν τὴν παρασκευὴν εἰδικῶν παραγώγων τῆς S-τριτυλο-L-κυστεΐνης

χρησίμων εἰς τὴν πεπτικὴν σύνθεσιν, π.χ. N-Z καὶ N-For (107, 111). Ἑτέρα τοιαύτη ὁμὰς εἶναι καὶ ἡ S-καρβοβενζοξυομὰς (115) διὰ τὴν ὁποίαν ἀντιθέτως πρὸς τὴν βιβλιογραφίαν διεπιστώσαμεν, ὅτι δύναται νὰ χρησιμοποιηθῇ ἐν συνδυασμῷ μετὰ τῆς N-καρβοβενζοξυομάδος εἰς πεπτιδικὰς συνθέσεις καὶ ν' ἀπομακρυνθῇ εἰς τὸ τελικὸν στάδιον δι' ἠπίας μεθόδου. Τὰ ἡμέτερα εὑρήματα ὅσον ἀφορᾶ εἰς τὰς ἰδιότητας τῆς S-καρβοβενζοξυομάδος ἐπεβεβαιώθησαν, μετὰ τὰς δημοσιεύσεις μας (111 - 113), καὶ ὑπὸ ἄλλων ἐρευνητῶν (116).

Εἰς τὸν πίνακα 3 ἐμφαίνονται συνοπτικῶς αἱ ὑφ' ἡμῶν ἐρευνηθεῖσαι συνθῆκαι ἀπομακρύνσεως τῶν ὡς ἀνωτέρω S-προστατευτικῶν ὁμάδων.

Διὰ συνδυασμοῦ τῆς S-TRI μετὰ τῆς S-DPM ὁμάδος ὡς καὶ τῆς S-TRI μετὰ τῶν S-ἀκυλομάδων, παρεσκευάσαμεν (112, 113, 117, 118), τὰ κάτωθι N- καὶ S-προστατευμένα ἑπταπεπτίδια (α), (β), (γ), ἀντιστοιχοῦντα εἰς τὴν σειρὰν 6-12 τῶν ἀμινοξέων τῆς A-ἀλύσου τῆς ἰνσουλίνης προβάτου. Δι'ἀπομακρύνσεως δύο ἐκ τῶν τριῶν S-προστατευτικῶν ὁμάδων καὶ ὀξειδώσεως τῶν -SH ὁμάδων παρεσκευάσθησαν ἐν συνεχείᾳ τὰ πεπτίδια (δ), (ε), (ζ) καὶ ἐκ τούτων τὰ (η) καὶ (θ) μὲ ἐλευθέραν ἀμινομάδα. Ἀπόσπασις καὶ τῆς ἑτέρας S-προστατευτικῆς ὁμάδος ἄγει εἰς τὸν σχηματισμὸν συνθετικῆς παρασκευῆς διὰ πρώτην φορὰν πεπτιδίου φέροντος μίαν γέφυραν -S-S- καὶ μίαν ἐλευθέραν -SH ὁμάδα.





Εἰς τὸν τελευταῖον τύπον ἡ κυστεΐνη μὲ ἐλευθέραν σουλφυδρυλικὴν ὁμάδα παρίσταται διὰ τοῦ συμβόλου : Cy
SH

Οὕτω, ἡ πρώτη ὡς ἄνω προϋπόθεσις, (α, σελ. 40) διὰ τὴν παρασκευὴν ἀσυμμέτρων πεπτιδίων τῆς κυστίνης, δύναται νὰ θεωρηθῇ ὡς ἐκπληρωθεῖσα.

Ἡ ἀντιμετώπισις τῆς δευτέρας ὡς ἄνω προϋποθέσεως, (βλ. σελ. 40), εὑρίσκεται ἐν πλήρει ἐξελίξει καὶ ἔχει ἤδη νὰ παρουσιάσῃ τὰς πρώτας ἐπιτυχίας, ὡς ἀποδεικνύεται ἐκ προσφάτου διατριβῆς ἐπὶ διδακτορίᾳ ἐκπονηθείσης εἰς τὸ Ἐργαστήριον Ὀργανικῆς Χημείας (120).

Ἡ νέα σύνθεσις τῆς ὀξυτοκίνης.

Τὸ πρωτότυπον μέρος τῆς παρούσης διατριβῆς ἀποτελεῖται κυρίως ἀπὸ μίαν νέαν σύνθεσιν ὀξυτοκίνης καὶ μάλιστα ὑπὸ ἀπομόνωσιν διὰ πρώτην φορὰν τῆς προβαθμίδος αὐτῆς, τῆς ὀξυτοκεΐνης, ὑπὸ μορφὴν N-προστατευμένων παραγώγων της. Πρὸς τὸν σκοπὸν αὐτὸν ἐχρησιμοποιήθησαν διὰ τὴν N-προστασίαν τῶν ἀμινομάδων, ἐκτὸς τῆς καρβοβενζοξικῆς μεθόδου καὶ αἱ νεώτεραι ὡς ἡ t-βουτυλοξυκαρβονυλο- καὶ ἡ NPS-μέθοδος (βλ. σελ. 37). Ἀφ' ἑτέρου ὡς S-προστατευτικαὶ ὁμάδες ἐχρησιμοποιήθησαν αἱ S-βενζοϋλο- καὶ S-καρβοβενζοξυ- ὁμάδες (βλ. σελ. 41).

Ἡ ἀνάγκη μιᾶς νέας συνθέσεως τῆς ὀξυτοκίνης, ἡ ὁποία δὲν ἀπετέλει ἁπλοῦν ἐγχείρημα, προκύπτει μεταξὺ ἄλλων καὶ ἐκ τῶν κάτωθι συλλογισμῶν :

1) Ἡ χρησιμοποίησις νέων S-προστατευτικῶν ὁμάδων ἐνέχει μεγάλον ἐνδιαφέρον διὰ τὴν πεπτιδοχημείαν, διότι πρακτικῶς ὅλαι αἱ μέχρι τοῦδε συνθέσεις ἐχρησιμοποίησαν τὴν S-βενζυλοκυστεΐνην τοῦ du Vigneaud. Παράπλευροι ἀντιδράσεις, ἐπαναλαμβανόμεναι εἰς ὅλα τὰ σχήματα καὶ εἰς τὰς ἀντιστοίχους βαθμίδας συνθέσεως, θὰ ἠδύναντο ν' ἀποφευχθοῦν δι' ἄλλων S-προστατευτικῶν ὁμάδων.

2) Ἡ ἀπομάκρυνσις τῶν νέων S-προστατευτικῶν ὁμάδων ἐκ τοῦ τελικοῦ ἐννεαπεπτιδίου, προβαθμίδος τῆς ὀξυτοκίνης, θὰ ἠδύνατο νὰ πραγματο-

ποιηθῇ ὑπὸ τὰς ἠπίας συνθήκας τῆς μεθανολύσεως χωρὶς νὰ θιγῇ ἡ N-προστατευτικὴ ὁμάς. Οὕτω θὰ παρεσκευάζετο διὰ πρώτην φορὰν N-προστατευμένον παράγωγον τῆς ὀξυτοκεΐνης, ἤτοι τῆς ἀνηγμένης μορφῆς τῆς ὀξυτοκίνης.

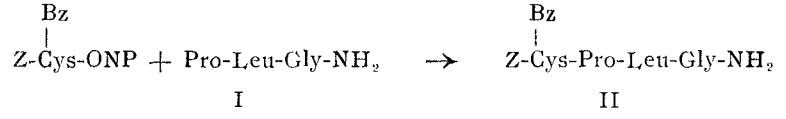
3) Ὑπῆρχεν βάσιμος ἐλπὶς στηριζομένη καὶ εἰς βιβλιογραφικὰς ἐνδείξεις (90), ὅτι ὀξείδωσις N-ὑποκατεστημένης ὀξυτοκεΐνης θὰ καταλήγῃ πιθανῶς εἰς καθαρώτερον προϊόν, θ' ἀπεκλείοντο δηλαδὴ περισσότερον αἱ παραπλεύρως χωροῦσαι ἀντιδράσεις πολυμερισμοῦ, σχηματισμοῦ διμεροῦς παραλλήλου ἢ ἀντιπαραλλήλου συνδέσεως, κλπ. (πρβλ. σελ. 32). Ἀφ' ἑτέρου N-προστατευμένον παράγωγον τῆς ὀξυτοκίνης θὰ παρεσκευάζετο διὰ πρώτην φοράν.

4) Ὁ νέος τρόπος συνθέσεως θὰ ἠδύνατο ἐν συνεχείᾳ νὰ ἐφαρμοσθῇ καὶ εἰς περιπτώσεις παρασκευῆς «ἀναλόγων», κατὰ τὰς ὁποίας ἡ ἐπίδρασις νατρίου ἐντὸς ὑγρᾶς ἀμμωνίας δημιουργεῖ ἐπιπλοκὰς καὶ γίνεται ἀπαγορευτική. Εἰς τὸ Ἐργαστήριον τοῦ Καθηγητοῦ du Vigneaud ἀντιμετωπίσαμεν ἤδη τοιαύτην περίπτωσιν εἰς δοκιμὴν παρασκευῆς δύο νέων «ἀναλόγων» (93).

5) Ὁπωσδήποτε ἡ κατὰ τὰ ἀνωτέρω ἐπιτυχὴς σύνθεσις ἑνὸς πολυπλόκου μορίου φυσικοῦ προϊόντος, ὡς ἡ ὀξυτοκίνη, θὰ ἦτο μία καλὴ ἀπόδειξις τῆς ἀξίας τῶν νέων μεθόδων καὶ πρὸ παντὸς θὰ ἐξησφάλιζεν τὴν ἀναγκαίαν πεῖραν πρὸς ἐφαρμογὴν τῶν νέων μεθόδων εἰς ἔτι πολυπλοκωτέρας συνθέσεις.

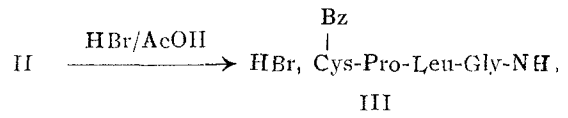
Καὶ ἤδη εἰσέρχομαι εἰς τὴν περιγραφὴν τῶν ἐπιτυχῶν νέων συνθέσεων ὀξυτοκίνης καὶ ὀξυτοκεΐνης.

Ὡς ἀρχικὴ οὐσία ἐχρησιμοποιήθη τὸ γνωστὸν τριπεπτίδιον L-προλυλο-L-λευκυλο-γλυκιναμίδιον I (121), τὸ ὁποῖον συνεζεύχθη μὲ τὸν νιτροφαινυλεστέρα τῆς S-βενζοϋλο-N-καρβοβενζοξυ-L-κυστεΐνης ὑπὸ σχηματισμὸν εἰς καλὴν ἀπόδοσιν τοῦ τετραπεπτιδίου S-βενζοϋλο-N-καρβοβενζοξυ-L-κυστεϊνυλο-L-προλυλο-L-λευκυλο-γλυκιναμιδίου (II), εἰς κρυσταλλικὴν κατάστασιν.



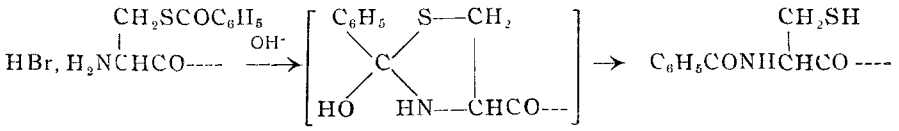
Ἀντιθέτως σύζευξις τοῦ (I) μετὰ S-βενζοϋλο-L-κυστεΐνης διὰ τῆς μεθόδου τῶν μικτῶν ἀνυδριτῶν ἢ τοῦ δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμιδίου δὲν ἀπέφερε καλὰς ἀποδόσεις. Ἐν συνεχείᾳ ἀπεμακρύνθη ἡ N-προστατευτικὴ ὁμὰς τοῦ τετραπεπτιδίου (II), ἤτοι ἡ N-καρβοβενζοξυομάς, δι' ἐπιδράσεως ὑδροβρωμίου ἐντὸς ὀξεικοῦ ὀξέος, ἐφ' ὅσον διὰ προηγουμένων πειραμάτων (111 - 113) εἶχε διαπιστωθῇ ἡ σταθερότης τῆς S-βενζοϋλομάδος ἔναντι τοῦ ἀντι-

δραστηρίου τούτου. Τὸ οὕτω παρασκευασθὲν ὑδροβρωμικὸν ἅλας τοῦ τετραπεπτιδίου (III)

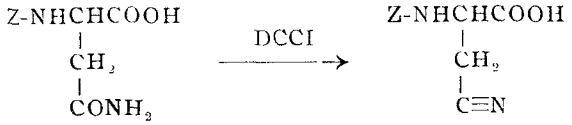


δὲν μετετράπη, διὰ χρησιμοποιήσεως ἰονανταλλακτικῶν βασικῶν ρητινῶν, εἰς τὸ ἐλεύθερον πεπτίδιον διὰ τὸν λόγον, ὅτι ὑπῆρχεν εἰς τὴν περίπτωσιν αὐτὴν κίνδυνος S→N ἀκυλομεταναστεύσεως, ὡς τοῦτο ἔχει προηγουμένως ὑφ' ἡμῶν παρατηρηθῆ (113, 117) εἰς ἀναλόγους περιπτώσεις. Ὡς ἐκ τούτου πρὸς ἐπιμήκυνσιν τῆς ἁλύσου ἐχρησιμοποιήθη, ὡς κατωτέρω ἀναφέρεται, ἀπ' εὐθείας τὸ ὑδροβρωμικὸν ἅλας (III).

Περαιτέρω ἐπιμήκυνσις τῆς ἁλύσου διὰ τῆς εἰσαγωγῆς τῆς N-καρβοβενζοξυ-L-ασπαραγίνης ἀπετέλεσε τὸ ἀντικείμενον ἐκτεταμένου πειραματισμοῦ καὶ ἐπετεύχθη εἰς ἱκανοποιητικὴν κλίμακα κατόπιν μακρᾶς ἐρεύνης. Τὸ γεγονὸς τοῦτο ἀποτελεῖ μίαν νέαν ἀπόδειξιν διὰ τὰς δυσχερείας ποὺ ἀντιμετωπίζει ἡ συνθετικὴ πεπτιδοχημεία ἀκόμη καὶ κατὰ τὴν χρησιμοποίησιν γνωστῶν μεθόδων. Αἱ δυσχέρειαι αὗται, εἰς τὴν προκειμένην περίπτωσιν, ὀφείλονται ἀφ' ἑνὸς μὲν εἰς τὴν δυνατότητα ἔστω καὶ μερικῆς S→N ἀκυλομεταναστεύσεως κατὰ τὴν σύζευξιν,

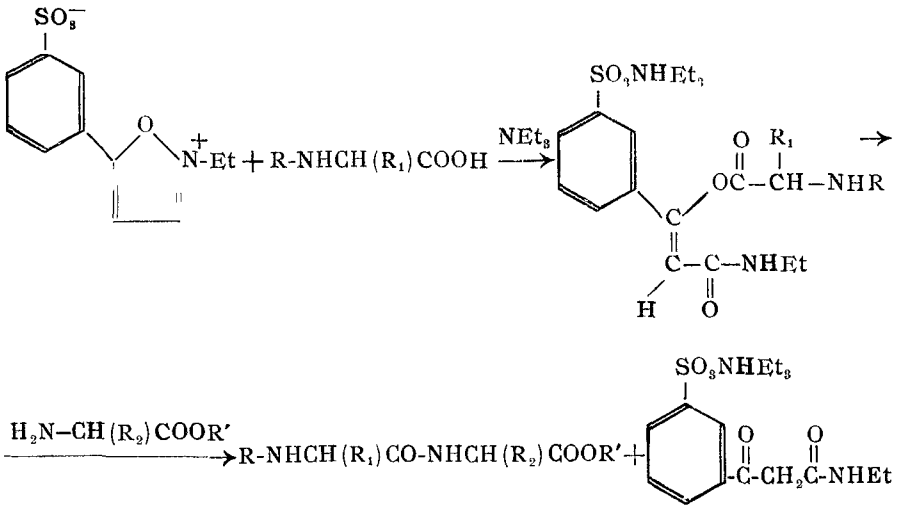


ἀφ' ἑτέρου δὲ εἰς τὴν ἐπανειλημμένως εἰς τὴν βιβλιογραφίαν ἀναφερομένην μετατροπὴν τῆς καρβοβενζοξυασπαραγίνης εἰς β-κυανοαλανινοπαράγωγον ὑπὸ τὴν ἐπίδρασιν ἀντιδραστηρίων συζεύξεως, ὡς εἶναι τὸ δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμίδιον καὶ ὡρισμένοι μικτοὶ ἀνυδρῖται (122).



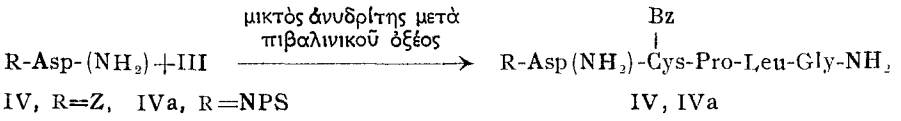
Αἱ δυσχέρειαι αὗται γίνονται καταφανεῖς ἀπὸ τὰς παρατηρήσεις μας, ὅτι χρησιμοποίησις ὡς μέσου συζεύξεως τῆς καρβοβενζοξυ-L-ασπαραγίνης μετὰ τοῦ τετραπεπτιδίου (III) διὰ δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμιδίου, νιτροφαινυλεστέρων, μικτῶν ἀνυδριτῶν μετὰ διφαινυλοφωσφορικοῦ ὀξέος ὡς

καὶ μετὰ ἰσοβουτυλο- ἢ αἰθυλο-ἀνθρακικοῦ ὀξέος, ἀκόμη καὶ χρησιμοποίησις τοῦ εἰς τὴν βιβλιογραφίαν ἀναφερομένου (123) ὡς πολὺ δραστικοῦ καὶ εἰδικοῦ διὰ σύζευξιν καρβοβενζοξυασπαραγίνης ἀντιδραστηρίου



Woodward, παρὰ τὰς ἐπιπόνους καὶ μακρᾶς διαρκείας προσπαθείας μας δὲν ἀπέφερον ἐπιτυχὲς ἀποτέλεσμα.

Τέλος, σύζευξις καὶ μάλιστα εἰς ἱκανοποιητικὴν ἀπόδοσιν ἐπετεύχθη διὰ μετατροπῆς τῆς N-καρβοβενζοξυ-L-ασπαραγίνης εἰς τὸν μετὰ πιβαλινικοῦ (τριμεθυλοξεικοῦ) ὀξέος μικτὸν ἀνυδρίτην (124) καὶ ἐπίδρασιν αὐτοῦ ἐπὶ τοῦ (III) συνοδευομένην ὑπὸ στάγδην προσθήκης διαλύματος τριαιθυλαμίνης, ὑπὸ ἰσχυρὰν ψῦξιν καὶ ἀνάδευσιν. Ἐπὶ τῇ βάσει τῆς κτηθείσης ἤδη πείρας μας (112, 113) ἡ ἐκ τῶν ὑστέρων προσθήκη τριαιθυλαμίνης εἰς τὴν περίπτωσιν ταύτην ἐγένετο ἐπὶ τῷ σκοπῷ παρεμποδίσεως ἐμφανίσεως ἀλκαλικῆς ἀντιδράσεως, ἤτοι παρεμποδίσεως S→N μεταναστεύσεως τῆς ἀκυλομάδος. Μετὰ τὸν ὡς ἄνω μακρὸν πειραματισμόν, ἤδη ἡ σύζευξις εἰς τὸ στάδιον αὐτὸ τῆς συνθέσεως ἀποτελεῖ πλέον ἁπλοῦν ἐγχείρημα. Τὸ κατὰ τὸν τρόπον αὐτὸν προκῦπτον πενταπεπτίδιον (IV) εἶναι ἐπίσης κρυσταλλική, χημικῶς καθαρὰ οὐσία.



IV, R=Z, IVa, R=NPS IV, IVa

Ὡς γνωστόν, ὁσάκις ἡ πορεία μιᾶς συνθέσεως χωρεῖ πρὸς ἀποκατάστασιν ἐπὶ μᾶλλον καὶ μᾶλλον μεγαλυτέρου μορίου, ἐπιβάλλεται ὁ ἔλεγχος

τῆς ἀκριβείας τῆς συνθετικῆς πορείας καὶ συνεπῶς τῆς ἀξίας τῆς μεθόδου. Οὕτω διὰ μετεστεροποιήσεως (ἀλκοολύσεως) τοῦ πενταπεπτιδίου (IV) καὶ ὀξειδώσεως τοῦ προκύπτοντος προϊόντος ἐλήφθη ἐννεαπεπτίδιον κυστίνης (V) περιέχον ὅλα τὰ σημειούμενα ἀμινοξέα.

$$\text{IV} \xrightarrow{CH_3ONa/CH_3OH} Z\text{-}Asp(NH_2)\text{-}Cys\text{-}Pro\text{-}Leu\text{-}Gly\text{-}NH_2 \xrightarrow{J_2} \longrightarrow$$

$$\longrightarrow \begin{matrix} Z\text{-}Asp(NH_2)\text{-}Cys\text{-}Pro\text{-}Leu\text{-}Gly\text{-}NH_2 \\ | \\ Z\text{-}Asp(NH_2)\text{-}Cys\text{-}Pro\text{-}Leu\text{-}Gly\text{-}NH_2 \end{matrix}$$

V

Ἐὰν εἶχε λάβει χώραν S→N μετανάστευσις εἰς τὸ τετραπεπτίδιον (IIIα), τὸ πενταπεπτίδιον θὰ ἦτο S-πεπτίδιον, τὸ δὲ προκῦπτον προϊὸν τῆς μεθανολύσεως δὲν θὰ περιεῖχεν ἀσπαραγίνην ὡς ἐμφαίνεται κατωτέρω :

$$\begin{matrix} Bz \\ | \\ Cys\text{-}Pro\text{-}Leu\text{-}Gly\text{-}NH_2 \end{matrix} \xrightarrow[\text{μετανάστευσις}]{S \rightarrow N} Bz\text{-}Cys\text{-}Pro\text{-}Leu\text{-}Gly\text{-}NH_2 \xrightarrow{Z\text{-}Asp(NH_2)} \longrightarrow$$

IIIα

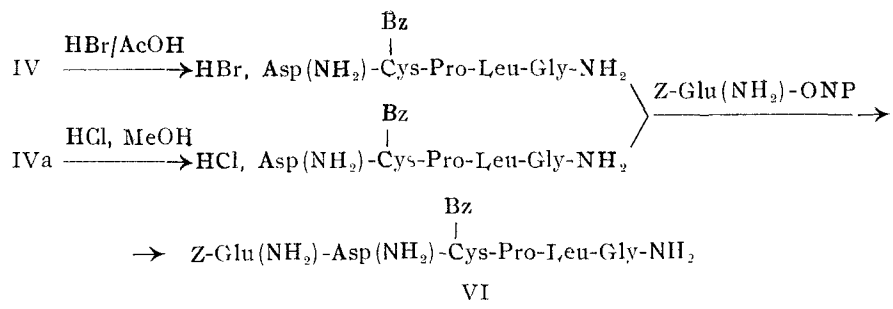
$$\begin{matrix} Z\text{-}Asp(NH_2) \\ | \\ Bz\text{-}Cys\text{-}Pro\text{-}Leu\text{-}Gly\text{-}NH_2 \end{matrix} \xrightarrow{CH_3ONa/CH_3OH} Bz\text{-}Cys\text{-}Pro\text{-}Leu\text{-}Gly\text{-}NH_2 \xrightarrow{J_2} \longrightarrow$$

(S—πεπτίδιον) (πεπτίδιον ἄνευ ἀσπαραγίνης)

$$\longrightarrow \begin{matrix} Bz\text{-}Cys\text{-}Pro\text{-}Leu\ \ Gly\text{-}NH_2 \\ | \\ Bz\text{-}Cys\text{-}Pro\text{-}Leu\text{-}Gly\text{-}NH_2 \end{matrix}$$

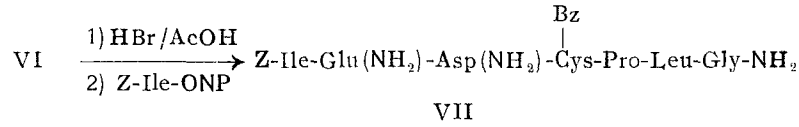
Ἀφ' ἑτέρου, τὸ αὐτὸ πενταπεπτίδιον, παρεσκευάσθη καὶ ὑπὸ μορφὴν N-NPS-παραγώγου (IVα) κατὰ τὴν νέαν μέθοδον τοῦ Ἐργαστηρίου Ὀργανικῆς Χημείας, δι' ἐπιδράσεως τοῦ μετὰ πιβαλινικοῦ ὀξέος μικτοῦ ἀνυδρίτου τῆς N-νιτροφαινυλοσουλφενυλοασπαραγίνης μετὰ τοῦ τετραπεπτιδίου (III). Καὶ τὸ NPS-πενταπεπτίδιον (IVα) ἐλήφθη τελικῶς εἰς χημικῶς καθαρὰν κατάστασιν.

Ἡ ὀρθὴ πορεία τῆς διεξαγωγῆς τῆς συνθέσεως μέχρι τοῦ σταδίου αὐτοῦ ὡς καὶ τῆς ἑπομένης βαθμίδος, ἀπεδείχθη ἐπίσης καὶ κατὰ τὸ ἑπόμενον στάδιον, ἤτοι κατὰ τὸ στάδιον τῆς συνθέσεως τοῦ N-προστατευμένου ἑξαπεπτιδίου (VI). Διὰ συζεύξεως N-καρβοβενζοξυ-L-γλουταμίνης ὑπὸ μορφὴν p-νιτροφαινυλεστέρος τόσον μετὰ τοῦ ὑδροβρωμικοῦ πενταπεπτιδίου τοῦ ληφθέντος ἐκ τοῦ (IV), ὡς καὶ μετὰ τοῦ ὑδροχλωρικοῦ πενταπεπτιδίου τοῦ ληφθέντος ἐκ τοῦ NPS-πενταπεπτιδίου (IVα), ἐλήφθη τὸ αὐτὸ N-καρβοβενζοξυ-εξαπεπτίδιον (VI) εἰς καλὴν ἀπόδοσιν καὶ εἰς χημικῶς καθαρὰν κατάστασιν.



VI

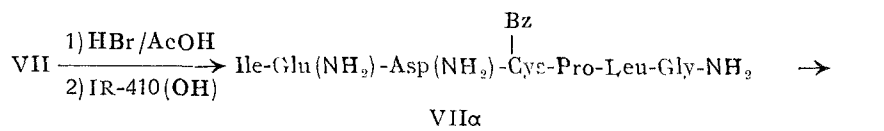
Κατ' ἀνάλογον τρόπον εἰς τὸ οὕτω ληφθὲν ἑξαπεπτίδιον, μετ' ἀπόσπασιν τῆς καρβοβενζοξυομάδος, προσετέθη διὰ συζεύξεως ἰσολευκίνη καὶ ἐλήφθη κρυσταλλικὸν N-καρβοβενζοξυ-L-ισολευκυλο-L-γλουταμινυλο-L-ασπαραγινυλο-S-βενζοϋλο-L-κυστεϊνυλο-L-προλυλο-L-λευκυλο-γλυκιναμίδιον (VII).



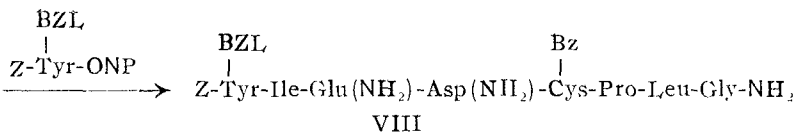
VII

Μετὰ τὴν κατὰ τὰ γνωστὰ ἀπόσπασιν τῆς N-προστατευτικῆς ὁμάδος ἐπεχειρήθη, πρὸς ἔλεγχον καὶ πάλιν τῆς πορείας τῆς συνθέσεως ἡ ἀπομόνωσις τοῦ ἐλευθέρου ἑπταπεπτιδίου, πρᾶγμα τὸ ὁποῖον ἐπετεύχθη τῇ βοηθείᾳ ἀνιονανταλλακτικῆς στήλης ἐξ Amberlite IR-410 (OH). Ἡ μεγάλη ἀπόστασις τῆς S-βενζοϋλομάδος ἀπὸ τῆς ἐλευθέρας ἀμινομάδος καθιστᾶ τὴν S→N μετανάστευσιν *πρακτικῶς* ἀδύνατον διότι ὡς γνωστόν, O→N ἢ S→N μεταναστεύσεις ἀκυλομάδων χωροῦν μέσῳ παροδικοῦ σχηματισμοῦ ὀλιγομελῶν ἑτεροκυκλικῶν δακτυλίων (βλ. σελ. 45) πρᾶγμα διὰ τὸ ὁποῖον, εἰς τὴν προκειμένην περίπτωσιν, ἐλλείπουν αἱ προϋποθέσεις.

Τὸ οὕτω παρασκευασθὲν ἐλεύθερον κρυσταλλικὸν ἑπταπεπτίδιον (VIIα) καί, ἐπὶ τὸ ἁπλούστερον, τὸ ὑδροβρωμικὸν αὐτοῦ ἅλας συνεζεύχθη μὲ N-καρβοβενζοξυ-O-βενζυλο-L-τυροσίνην ὑπὸ τὴν μορφὴν νιτροφαινυλεστέρος, ἐλήφθη δὲ ἐπίσης καθαρὸν καὶ εἰς καλὴν ἀπόδοσιν τὸ ὀκταπεπτίδιον N-καρβοβενζοξυ-O-βενζυλο-L-τυροσυλο-L-ισολευκυλο-L-γλουταμινυλο-L-ασπαραγινυλο-S-βενζοϋλο-L-κυστεϊνυλο-L-προλυλο-L-λευκυλο-γλυκιναμίδιον (VIII).

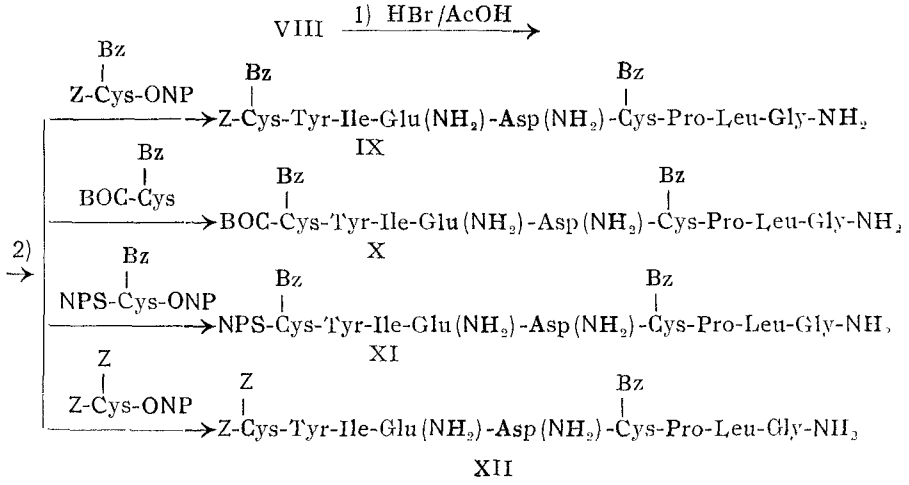


VIIα



VIII

Τὸ οὕτω ληφθὲν N,O,S-προστατευμένον ὀκταπεπτίδιον μετὰ τὴν ἐκλεκτικὴν ἀπομάκρυνσιν τῶν N- καὶ O-προστατευτικῶν ὁμάδων, δι'ἐπιδράσεως ὑδροβρωμίου ἐντὸς ὀξεικοῦ ὀξέος, ἀπετέλεσεν τὴν ἀρχικὴν οὐσίαν διὰ τὴν παρασκευὴν τῶν N-καρβοβενζοξυ-, N-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-, καὶ N-νιτροφαινυλοσουλφενυλο- παραγώγων τῶν S-ακυλο- προστατευμένων ἐννεαπεπτιδίων (IX-XII), δηλαδὴ ὀξυτοκεΐνης ὑπὸ μορφὴν N- καὶ S-ὑποκατεστημένων παραγώγων αὐτῆς.



XII

Ἐφ' ὅσον ἐπλησιάζομεν πρὸς τὸ τέλος τῆς ἐπιπόνου αὐτῆς συνθετικῆς πορείας, ἐθεωρήθη χρήσιμον νὰ ἔχωμεν ὑπὸ μορφὴν διαφόρων N-παραγώγων τὸ S-προστατευμένον ἐννεαπεπτίδιον καὶ τοῦτο διὰ νὰ αὐξάνουν αἱ πιθανότητες παραλαβῆς τῶν ἑπομένων βαθμίδων εἰς χημικῶς καθαρὰν κατάστασιν.

Ἡ ἀμέσως ἑπομένη βαθμὶς ἦτο ἡ ἀπομάκρυνσις τῶν S-προστατευτικῶν ὁμάδων, πρᾶγμα τὸ ὁποῖον ἐπετεύχθη ὑπὸ ἐξαιρετικῶς ἠπίας συνθήκας, ἤτοι ἀφ'ἑνὸς μὲν διὰ μετεστεροποιήσεως, ὡς καὶ ἔτι χαρακτηριστικώτερον δι' ἐπιδράσεως ὑδραζίνης. Τὸ τελευταῖον τοῦτο, ἀποτελεῖ νέαν μέθοδον ἀποσπάσεως S-ἀκυλομάδων. Ἡ ὑδραζίνη ἀπομακρύνει πολὺ εὐκόλως τὴν S-βενζοϋλομάδα ὑπὸ μορφὴν βενζυδραζιδίου διότι, ὡς γνωστόν, οἱ θειοεστέρες κατὰ ἕνα τρόπον ἀνήκουν εἰς τὴν κατηγορίαν τῶν ἐνεργῶν ἐστέρων (69, 70).

$$\text{IX}\ \left.\begin{matrix}\text{Μεθανόλυσις}\\ H_2NNH_2\end{matrix}\right\rangle \rightarrow \underset{\text{XIII}}{\text{Z-Cys Tyr Ile-Glu}(NH_2)\ \text{Asp}(NH_2)\ \text{Cys-Pro-Leu Gly-}NH_2}$$

$$\text{XII} \xrightarrow{CH_3ONa/CH_3OH\ (\text{Μεθανόλυσις})} \text{XIII}$$

$$\text{X} \xrightarrow{CH_3ONa/CH_3OH} \underset{\text{XIV}}{\text{BOC-Cys-Tyr-Ile-Glu}(NH_2)\text{-Asp}(NH_2)\text{-Cys-Pro-Leu-Gly}\ NH_2}$$

$$\text{XI} \xrightarrow{CH_3ONa/CH_3OH} \underset{\text{XV}}{\text{NPS Cys-Tyr-Ile-Glu}(NH_2)\text{-Asp}(NH_2)\text{-Cys Pro Leu Gly}\ NH_2}$$

Πρὸς ἔλεγχον τῆς ἀκριβοῦς πορείας τῆς συνθέσεως μέχρι τοῦ ἀποφασιστικοῦ τούτου σταδίου, προέβημεν εἰς S-βενζυλίωσιν τῆς καρβοβενζοξυ-οξυτοκεΐνης μὲ βενζυλοχλωρίδιον, παρουσίᾳ τριαιθυλαμίνης καὶ ἐλάβομεν εἰς καλὴν ἀπόδοσιν χημικῶς καθαρὰν N-καρβοβενζοξυ-S-S'-διβενζυλοοξυτοκεΐνην.

$$\text{XIII} + C_6H_5CH_2Cl \rightarrow \text{Z-}\overset{\overset{\text{BZL}}{|}}{\text{Cys}}\text{-Tyr-Ile-Glu}(NH_2)\text{-Asp}(NH_2)\text{-}\overset{\overset{\text{BZL}}{|}}{\text{Cys}}\text{-Pro-Leu-Gly-}NH_2$$

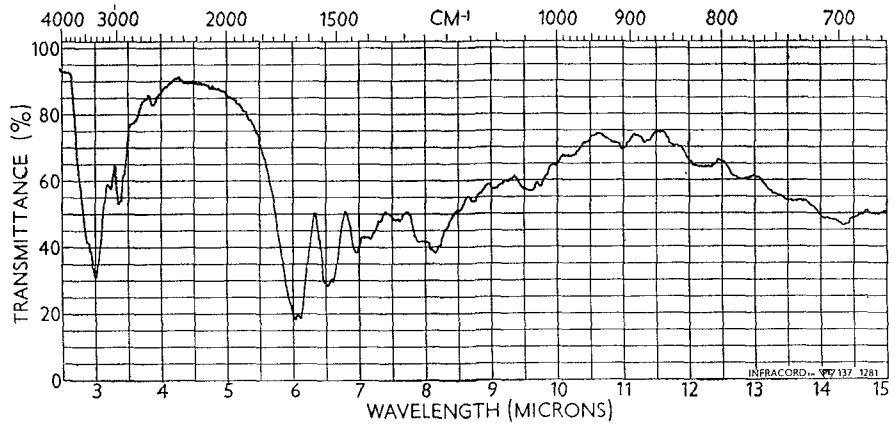
[(P), βλ. σελ. 30]

Τὰ ὡς ἄνω ληφθέντα διάφορα N-παράγωγα τῆς ὀξυτοκεΐνης (XIII-XV) ἀποτελοῦν κρυσταλλικὰς οὐσίας χρωματογραφικῶς καὶ ὀπτικῶς ὁμοιογενεῖς, αἱ ὁποῖαι δίδουν καὶ χαρακτηριστικὸν φάσμα ἀπορροφήσεως τῶν -SH ὁμάδων (βλ. σχ. 4 καὶ 5) εἰς τὴν ὑπέρυθρον περιοχὴν (125).

Ἀκριβῶς ἡ δυνατότης καὶ ἡ εὐχέρεια παρασκευῆς τῶν ὀξυτοκεϊνῶν τούτων μὲ ἐλευθέραν-SH ὁμάδα, ἀποτελεῖ τὴν καλυτέραν ἀπόδειξιν τῆς ἀξίας τῶν νέων μεθόδων. Δὲν εἶναι πλέον ἀνάγκη τὰ ἀνάλογα προϊόντα νὰ ὑποβάλλωνται εἰς τὴν ἐπίδρασιν νατρίου εἰς ἀμμωνίαν, πρᾶγμα τὸ ὁποῖον ἐκτὸς ἄλλων κινδύνων, ἔχει ὡς ἀποτέλεσμα τὴν συλλήβδην ἀπομάκρυνσιν N καὶ S-προστατευτικῶν ὁμάδων.

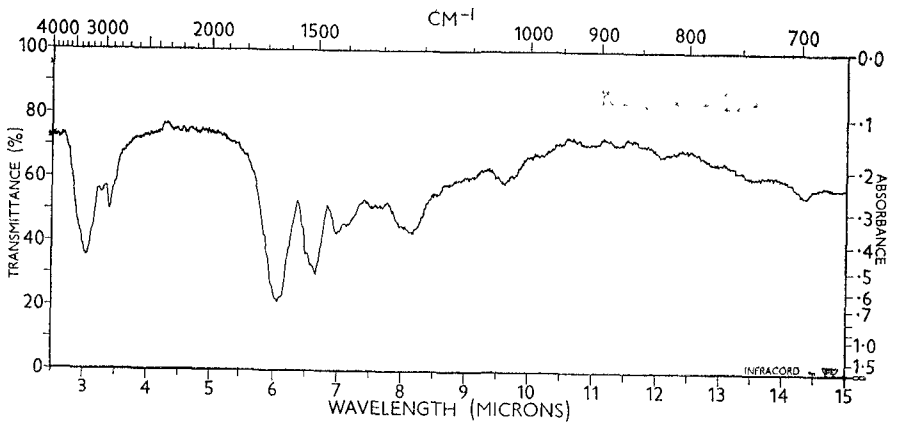
Διὰ τὰ περαιτέρω τελικὰ ἡμῶν πειράματα ἐπελέξαμεν τὴν N-καρβοβενζοξυ-οξυτοκεΐνην (XIII), ἡ ὁποία προσεφέρετο καλύτερον πρὸς τὸν σκοπὸν αὐτόν, καθότι εἴχομεν εἰς τὴν διάθεσίν μας μεγαλυτέραν ποσότητα ἐκ τοῦ προϊόντος τούτου. Ὅταν λέγωμεν μεγαλυτέραν ποσότητα ἐννοοῦμεν βεβαίως κλάσματα τοῦ γραμμαρίου. Ἕκαστον πείραμα εἰς τὰς τελευταίας βαθμίδας, διεξήγετο μὲ 200 - 300 mg. οὐσίας.

Τὰ διαδοχικὰ στάδια τῆς ἐκτεθείσης συνθέσεως μέχρι τοῦ ὀκταπεπτι-



Σχῆμα 4.

Φάσμα ἀπορροφήσεως εἰς τὸ ὑπέρυθρον τῆς N-καρβοβενζοξυ-οξυτοκεΐνης (XIII). Διακρίνεται ἡ χαρακτηριστικὴ ἀπορρόφησις τῆς -SH ὁμάδος εἰς 3,9 μ (2550 cm^{-1}).



Σχῆμα 5.

Φάσμα ἀπορροφήσεως εἰς τὸ ὑπέρυθρον τῆς N-καρβοβενζοξυ-οξυτοκίνης (XVI).

ΑΝΑΤΥΠΩΣΙΣ

δικοῦ μορίου τῆς ὀξυτοκίνης καὶ ἄνευ ἀπομονώσεως αὐτῆς, ἀνέρχονται εἰς 18. Ὑπὸ τὴν προϋπόθεσιν, ὅτι δι' ἕκαστον στάδιον ἔχομεν μίαν μέσην ἀπόδοσιν 75%, ἡ ὁποία εἶναι μία πολὺ καλὴ ἀπόδοσις, ἡ τελικὴ ἀπόδοσις θὰ εἶναι :

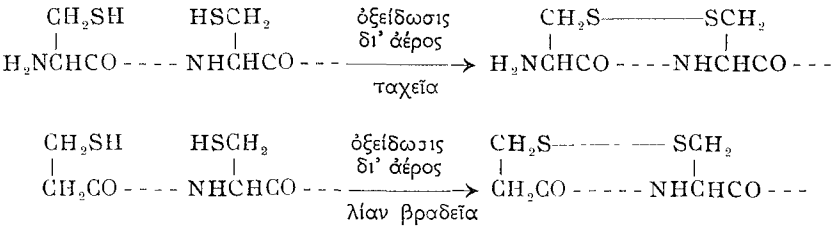
$$0.75^{18} = 0{,}0056\,, \quad \text{ἤτοι } 0{,}56\%$$

Ἐὰν εἰς τὰ διαδοχικὰ στάδια προσθέσωμεν καὶ τὰ στάδια παρασκευῆς τῶν χρησιμοποιηθέντων παραγώγων ἑνὸς ἑκάστου τῶν ἀμινοξέων, π.χ. 3 στάδια διὰ τὴν παρασκευὴν τοῦ νιτροφαινυλεστέρος τῆς N-καρβοβενζοξυ-S-βενζοϋλο-κυστεΐνης κ. ο. κ., τότε ὁ ὁλικὸς ἀριθμὸς αὐτῶν ὑπερβαίνει τὰ 30. Εἶναι καταφανές, ὅτι συνεκτιμωμένων καὶ τῶν ἐνδιαμέσων τούτων σταδίων ἡ τελικὴ ἀπόδοσις ὑποβιβάζεται εἰς περίπου 0,02% διὰ 30 στάδια. Ἐντεῦθεν καταφαίνεται ἡ δυσκολία παρασκευῆς σημαντικῆς ποσότητος τελικοῦ προϊόντος ἀκόμη καὶ ἀφοῦ διὰ τῶν προκαταρκτικῶν δοκιμῶν, ὑπερενικήθησαν τὰ προβλήματα παρασκευῆς ὡρισμένων βαθμίδων. Ἡ παρασκευὴ τῶν ἐννεαπεπτιδίων (IX-XII) ἐγένετο εἰς ἐπανειλημμένα πειράματα, ὥστε νὰ μὴ διακινδυνεύεται ὁ κόπος πολλῶν μηνῶν κατὰ τὴν διεξαγωγὴν ἑνὸς καὶ μόνον πειράματος ἰδίως εἰς τὰ τελευταῖα στάδια.

Ἡ παρασκευὴ τῆς ὀξυτοκίνης ἐκ τῆς N-καρβοβενζοξυ-οξυτοκεΐνης (XIII) ἐπετελέσθη κατὰ δύο τρόπους, α) καὶ β), ὡς κατωτέρω :

α) Ἡ N-καρβοβενζοξυ-οξυτοκεΐνη μετετράπη κατὰ πρῶτον δι' ὀξειδώσεως εἰς N-καρβοβενζοξυ-οξυτοκίνην. Εἶναι ἡ πρώτη φορὰ κατὰ τὴν ὁποίαν N-προστατευμένη-οξυτοκεΐνη ὑποβάλλεται εἰς ὀξείδωσιν.

Ὡς ἤδη ἐλέχθη, (σελ. 31), κατὰ τὸ τελικὸν στάδιον τῆς συνθέσεως τῆς ὀξυτοκίνης κατὰ du Vigneaud καὶ μετὰ τὴν ἀφαίρεσιν τῶν N- καὶ S-προστατευτικῶν ὁμάδων, ἡ ὑπὸ μορφὴν διαλύματος καὶ οὐδέποτε ἀπομονωθεῖσα ὀξυτοκεΐνη, ὀξειδοῦται εἰς pH περίπου 6.5 διὰ διαβιβάσεως ἀέρος. Ἡ πορεία τῆς ἀντιδράσεως ἐλέγχεται διὰ τῆς προϊούσης ἐλαττώσεως τῶν



ἐλευθέρων -SH ὁμάδων, αἱ ὁποῖαι ὡς γνωστὸν ἀνιχνεύονται διὰ νιτροπρωσσικοῦ νατρίου. Ἡ οὕτω διεξαγομένη ὀξείδωσις περατοῦται εἰς διάστημα ὀλίγων ὡρῶν. Ἀντιθέτως, κατὰ τὴν παρασκευὴν ὡρισμένων «ἀναλόγων» παρετηρήθη, ὅτι ἔλλειψις α-ἀμινομάδος προστατεύει τρόπον τινὰ τὸ μόριον

ἔναντι ὀξειδώσεως.Οὕτω ἡ ὀξείδωσις δι'ἀερισμοῦ διαλύματος τῆς ἀνηγμένης μορφῆς (-SH μορφῆς) τῆς β-θειολοπροπιονυλο-οξυτοκίνης [du Vigneaud καὶ Hope (90)] δὲν περατοῦται οὔτε μετὰ διαβίβασιν ἀέρος ἐπὶ 5 ἡμέρας. 'Αφ'ἑτέρου, ὡς διεπιστώσαμεν (111), κρυσταλλικὰ N-ὑποκατεστημένα κυστεϊνυλοπεπτίδια π. χ. τὸ κατωτέρω ἀναγραφόμενον N-καρβοβενζοξυ-L-φαινυλαλανυλο-L-κυστεϊνυλο-γλυκινοαιθυλεστήρ, δεικνύουν ἀντιδράσεις -SH ὁμάδος ὡς καὶ σταθερὰν εἰδικὴν στροφικὴν ἱκανότητα, ἀκόμη καὶ μετὰ παραμονὴν αὐτῶν ἐπὶ πολλοὺς μῆνας εἰς συνήθη θερμοκρασίαν.

$$\text{Z-Phe-Cys-Gly-OEt} \xrightarrow[\text{βραδύτατα}]{\text{ἀήρ}} \begin{matrix}\text{Z-Phe-Cys-Gly-OEt}\\ |\\ \text{Z-Phe-Cys-Gly-OEt}\end{matrix}$$

'Εκ τῶν ἀνωτέρω προκύπτει, ὅτι ἔπρεπε νὰ χρησιμοποιηθοῦν νέοι τρόποι ταχυτέρας ὀξειδώσεως πεπτιδίων τῆς κυστεΐνης, ἐστερημένων ἐλευθέρας α-ἀμινομάδος. Ἡ ταχυτέρα διεξαγωγὴ τῆς ὀξειδώσεως, ἐκτὸς τῆς ἐλαττώσεως τοῦ χρόνου παρασκευῆς τοῦ προϊόντος, ἔχει εἰς τὴν περίπτωσιν τῆς ὀξυτοκίνης καὶ τῶν «ἀναλόγων» αὐτῆς καὶ ἄλλην ἰδιαιτέραν σημασίαν. Δὲν ἀποκλείεται νὰ ὑπάρχῃ διαφορὰ εἰς τὴν ταχύτητα ὀξειδώσεως τῶν δύο -SH ὁμάδων τοῦ μορίου, λόγῳ τῆς γειτονίας αὐτῶν μὲ διαφόρους ἀπ' ἀλλήλων ὁμάδας. 'Εὰν πράγματι ὑπάρχῃ τοιαύτη διαφορά, ὡς εἶναι τοῦτο πιθανόν, τότε θὰ παρέχεται εὐκαιρία ὀξειδώσεως τῆς ταχύτερον ὀξειδουμένης -SH ὁμάδος ἑνὸς μορίου μετὰ τῆς ἀντιστοίχου της ἄλλου μορίου, ὑπὸ σχηματισμὸν -S-S- γεφύρας διμεροῦς προϊόντος φέροντος ἀκόμη δύο -SH ὁμά-

$$\begin{matrix}\text{Cys-Tyr-Ile-Glu}(NH_2)\text{-Asp}(NH_2)\text{-Cys-Pro-Leu-Gly-}NH_2\\ |\\ \text{Cys-Tyr-Ile-Glu}(NH_2)\text{-Asp}(NH_2)\text{-Cys-Pro-Leu-Gly-}NH_2\end{matrix}$$

δας.Αὗται δύνανται, εἴτε νὰ ὀξειδωθοῦν ἐν συνεχείᾳ ἐνδομοριακῶς ὑπὸ σχηματισμὸν νέας -S-S- γεφύρας, ὁπότε θὰ προκύπτῃ κυκλικὸν διμερές, εἴτε διαμοριακῶς μὲ -SH ὁμάδας ἄλλων μορίων ὑπὸ σχηματισμὸν πολυμερῶν (βλ. σελ. 32).

Κατ' ἀρχήν, ταχεῖα ὀξείδωσις δύναται νὰ ἐπιτευχθῇ διὰ ἰσχυροτέρων ὀξειδωτικῶν μέσων ὡς σιδηρικυανιούχου καλίου (90) ἢ δι' ἐπιδράσεως διαλύματος ἰωδίου κλπ. Τὴν τελευταίαν ταύτην μέθοδον ἐχρησιμοποιήσαμεν καὶ ἡμεῖς ἐπανειλημμένως εἰς διαφόρους συνθέσεις κυστινοπεπτιδίων (111 - 113). Εἰς τὴν περίπτωσιν ὅμως τῆς ὀξυτοκίνης, ἡ ὁποία περιέχει καὶ τυροσίνην, δὲν εἶναι δυνατὸν νὰ χρησιμοποιηθῇ, διότι ὡς γνωστὸν τὸ ἰώδιον ἀντιδρᾷ μετὰ τοῦ ἀμινοξέος τούτου ὑπὸ σχηματισμὸν ἰωδοπαραγώγων (126). Διὰ τοὺς ὡς ἄνω λόγους ἐπροτιμήσαμεν νὰ χρησιμοποιήσωμεν ἕν νέον ἀντιδραστήριον ὀξειδώσεως, τὸ συμμετρικὸν διϊωδοαιθάνιον, τὸ ὁποῖον εἰσήχθη

ἐσχάτως εἰς τὴν βιβλιογραφίαν ὑπὸ τοῦ Weygand (127)

$$2R\text{-}S^- + J\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}J \longrightarrow R\text{-}S\text{-}S\text{-}R + 2J^-$$

καὶ ἐχρησιμοποιήθη ὑπ' αὐτοῦ διὰ τὴν ὀξείδωσιν τῆς κατὰ τὴν μέθοδον τοῦ du Vigneaud ἐν διαλύματι παρασκευασθείσης ὀξυτοκεΐνης. Τὸ ἀντιδραστήριον Weygand εἶχεν ἤδη χρησιμοποιηθῆ ἐπανειλημμένως εἰς τὸ 'Εργαστήριον 'Οργανικῆς Χημείας διὰ τὴν ὀξείδωσιν ὡρισμένων κυστεϊνοπαραγώγων πρὸς σχηματισμὸν ἑνὸς τμήματος τῆς Α-ἀλύσου τῆς ἰνσουλίνης (117, 118, βλ. σελ. 42). Οὕτω δι' ἐπιδράσεως διϊωδοαιθανίου ἐπὶ λίαν ἀραιοῦ (πρὸς ἀποφυγὴν σχηματισμοῦ πολυμερῶν) διαλύματος N-καρβοβενζοξυ-οξυτοκεΐνης, ἐλήφθη διὰ πρώτην φορὰν N-καρβοβενζοξυ-οξυτοκίνη ὑπὸ μικροκρυσταλλικὴν μορφὴν καὶ εἰς καλὴν ἀπόδοσιν.

$$\underset{\text{N-καρβοβενζοξυ-οξυτοκεΐνη}}{\text{XIII}} \xrightarrow{JCH_2CH_2J} \underset{\text{XVI, N-καρβοβενζοξυ-οξυτοκίνη}}{\text{Z-Cys-Tyr-Ile-Glu(NH}_2\text{)-Asp(NH}_2\text{)-Cys-Pro-Leu-Gly-NH}_2}$$

Δι' ἐπιδράσεως ἐπὶ τοῦ προϊόντος τούτου (XVI) ὑδροβρωμίου ἐντὸς

$$\text{XVI} \xrightarrow{\text{HBr/AcOH}} \text{HBr, ὀξυτοκίνη}$$

ὀξεικοῦ ὀξέος, προέκυψεν βιολογικῶς δραστικὴ ὀξυτοκίνη, ἡ ὁποία, εἰς χημικῶς καθαρὰν κατάστασιν, ἀπεμονώθη ὡς ἑξῆς: Τὸ ὑδροβρωμικὸν ἅλας ὁμοῦ μετὰ μικρᾶς ποσότητος ἀμμωνίας διελύθη ἐντὸς τῆς κάτω φάσεως μίγματος διαλυτικῶν (βλ. κατωτέρω) καὶ ἐν συνεχείᾳ ὑπεβλήθη εἰς κατανομὴν κατ' ἀντιρροὴν εἰς τὸ αὐτὸ σύστημα, εἰς αὐτόματον συσκευὴν Craig-Post (9) ἀποτελουμένην ἐκ 200 στοιχείων (σωλήνων), ἕκαστον τῶν ὁποίων ἔχει χωρητικότητα 10 ml. ἐξ ἑκάστης φάσεως. Οἱ σωλῆνες τῆς συσκευῆς εἶναι ἠριθμημένοι ἀπὸ 0 - 199. Ἡ πολύτιμος αὕτη συσκευή, ἐδωρήθη εἰς τὸ 'Εργαστήριον 'Οργανικῆς Χημείας τῷ 1960 ὑπὸ τῶν 'Εθνικῶν 'Ινστιτούτων Ὑγείας τῶν Ἡνωμένων Πολιτειῶν τῆς 'Αμερικῆς (N.I.H.) ἐγκατεστάθη δὲ εἰς τὸ 'Εργαστήριον ὑπὸ αὐτοῦ τούτου τοῦ κατασκευαστοῦ της κ. Post. Ὡς σύστημα διαλυτικῶν ἐπελέγη τὸ ἑξῆς: 1-βουτανόλη, 1-προπανόλη,ὕδωρ περιέχον 0,5% ὀξεικὸν ὀξὺ καὶ 0,1% πυριδίνην (6 : 1 : 8 V/V). Τὸ σύστημα τοῦτο τυγχάνει λίαν ἱκανοποιητικὸν διὰ τὸν καθαρισμὸν ὀξυτοκίνης καὶ ὁ συντελεστὴς κατανομῆς K τῆς ὀξυτοκίνης εἰς αὐτό, ἦτο γνωστὸς (128).

Ὡς γνωστόν, μετὰ τὴν ἐκτέλεσιν n μεταφορῶν, ὁ ἀριθμὸς τοῦ σωλῆνος N τῆς συσκευῆς, εἰς τὸν ὁποῖον θὰ εὑρίσκεται ἡ μεγίστη συγκέντρωσις τῆς οὐσίας, ἐξαρτᾶται ἐκ τοῦ συντελεστοῦ κατανομῆς αὐτῆς K. Ὑπενθυμίζεται

ὅτι, ὁ συντελεστὴς K παριστᾷ τὸν λόγον τῆς συγκεντρώσεως τῆς οὐσίας εἰς τὴν ἄνω φάσιν πρὸς τὴν συγκέντρωσιν εἰς τὴν κάτω φάσιν συστήματος μὴ μιγνυομένων ὑγρῶν, μετὰ τὴν ἀποκατάστασιν τῆς ἰσορροπίας. Ὁ K συνδέεται μὲ τοὺς n καὶ N διὰ τῆς σχέσεως (9) :

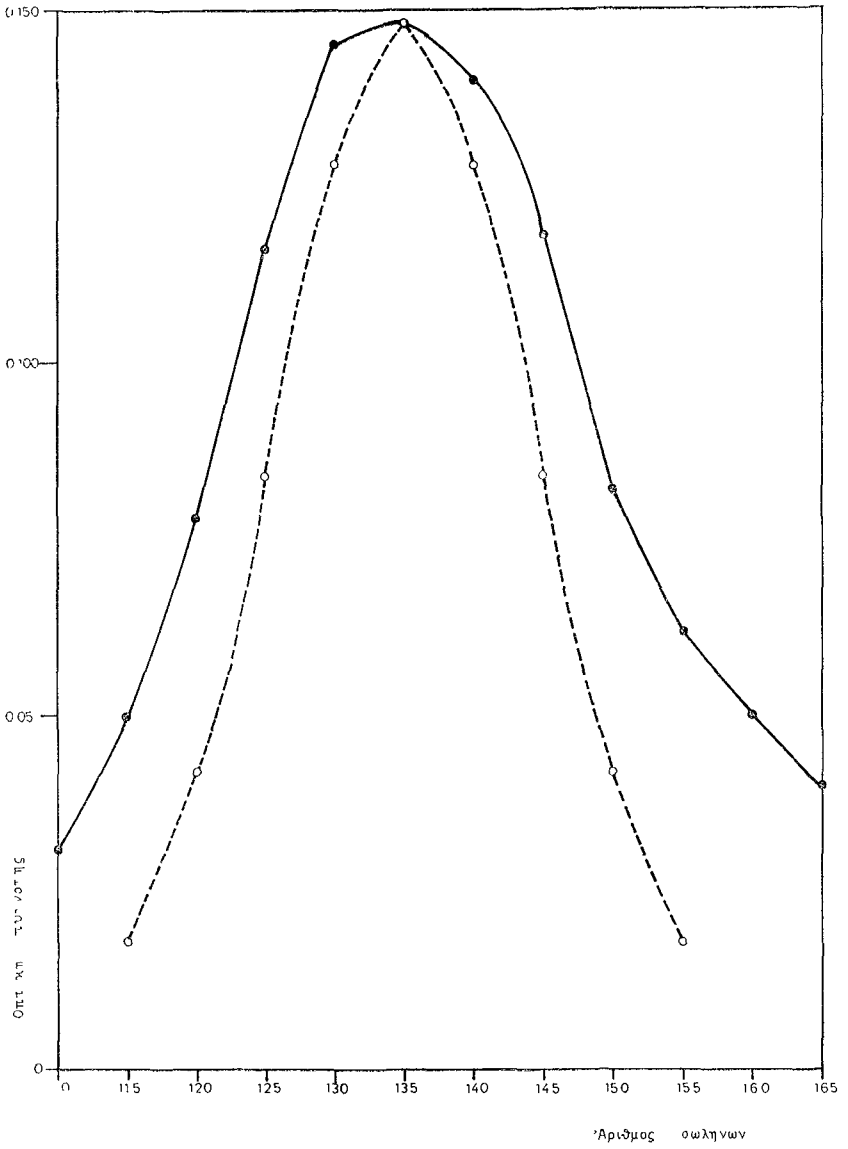
$$K = \frac{N}{(n-N)}$$

Τοιουτοτρόπως γνωστοῦ ὄντος τοῦ K, ὡς καὶ τοῦ n, ὑπολογίζεται ὁ N, ἤτοι προβλέπεται εἰς ποῖον περίπου σωλῆνα τῆς συσκευῆς θὰ εὑρίσκεται ἡ μεγίστη συγκέντρωσις τῆς οὐσίας μετὰ τὴν ἐκτέλεσιν τῶν μεταφορῶν. Ἡ ὕπαρξις μεγίστου εἰς τὴν καμπύλην κατανομῆς ἀντιστοιχοῦντος πρὸς τὴν γνωστὴν τιμὴν τοῦ συντελεστοῦ K,θὰ ἦτο μία ἀπόδειξις διὰ τὸν ἐμπλουτισμὸν ὡρισμένων κλασμάτων εἰς ὀξυτοκίνην καὶ διὰ τὴν ἐπιτυχίαν τῆς ἀπομονώσεως αὐτῆς.Ἐκτὸς τοῦ συντελεστοῦ κατανομῆς, ὡς δείκτης τοῦ ἐμπλουτισμοῦ εἰς ὀξυτοκίνην θὰ ἠδύνατο νὰ χρησιμοποιηθῇ ἡ βιολογικὴ δραστικότης, πρᾶγμα τὸ ὁποῖον ἦτο δι' ἡμᾶς ἀδύνατον.

Κατὰ τὴν πρακτικὴν ἐφαρμογὴν τοῦ καθαρισμοῦ διὰ κατανομῆς κατ' ἀντιρροὴν καὶ μετὰ τὴν ἐκτέλεσιν 100, 200 καὶ 400 μεταφορῶν, ἐλήφθησαν δείγματα 0,2 ml. ἐκ τῆς κάτω φάσεως ἑκάστου 5ου σωλῆνος τῆς συσκευῆς καὶ προσδιωρίσθη ἡ καμπύλη κατανομῆς χρωματομετρικῶς κατὰ τὴν μέθοδον Folin-Lowry (129). Τὸ κατωτέρω σχῆμα 6, παριστᾷ τὴν εὑρεθεῖσαν κατανομὴν μετὰ 400 μεταφοράς. Ἐκ τοῦ μεγίστου τῆς καμπύλης κατανομῆς, ὑπολογίζεται ὁ συντελεστὴς K ἴσος περίπου πρὸς 0,5. Ἡ τιμὴ αὕτη συμπίπτει, ἐντὸς τῶν ὁρίων τοῦ σφάλματος, μὲ τὴν γνωστὴν τιμὴν (περίπου 0,45) τοῦ K εἰς τὸ χρησιμοποιηθὲν σύστημα διαλυτικῶν (128).Ἐξ ἄλλου λαμβάνοντες ὡς βάσιν τὴν εὑρεθεῖσαν τιμὴν τοῦ K καὶ τὰς συντεταγμένας τοῦ μεγίστου ὑπολογίζομεν τὴν θεωρητικὴν κατανομὴν τῆς οὐσίας ἐντὸς τῆς συσκευῆς. Ἐκ τοῦ σχήματος 6 ἐμφαίνεται, ὅτι ἡ θεωρητικὴ καμπύλη πλησιάζει ἱκανοποιητικῶς πρὸς τὴν πειραματικῶς προσδιορισθεῖσαν καμπύλην κατανομῆς.

Μετὰ τὴν ἐκτέλεσιν 400 μεταφορῶν τὸ περιεχόμενον τῶν σωλήνων 115 - 155 συνελέγη καὶ διὰ συμπυκνώσεως εἰς ὑψηλὸν κενόν, περίπου 0,1-0,5 Torr, ἀπεμακρύνθησαν τὰ ὀργανικὰ διαλυτικὰ εἰς θερμοκρασίαν μὴ ὑπερβαίνουσαν τοὺς 15^0 μέχρι 18^0. Ὁ ὑποδοχεὺς καὶ αἱ παγίδες ἐψύχοντο εἰς περίπου -40^0 μέχρι -50^0. Τὸ ἀπομεῖναν ὑδατικὸν διάλυμα τῆς ὀξυτοκίνης, ὑπεβλήθη εἰς λυοφιλοποίησιν (freezing drying, lyophilization). Τοιουτοτρόπως ἐλήφθη ὀγκώδης ἐλαφρὰ οὐσία, ἡ ὁποία διὰ σειρᾶς δοκιμῶν ἀπεδείχθη ὅτι ἀπετελεῖτο ἀπὸ καθαρὰν ὀξυτοκίνην.

Πρὸς σύγκρισιν ἐχρησιμοποιήθη ποσότης 1,8 mg.συνθετικῶς παρασκευασθείσης καθαρᾶς ὀξυτοκίνης, τὴν ὁποίαν ἔθεσεν εἰς τὴν διάθεσίν μας ὁ

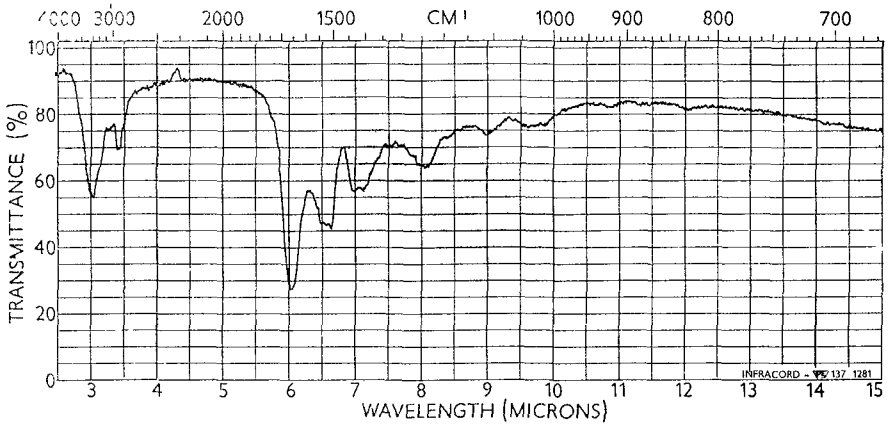


Σχῆμα 6.

Καμπύλαι κατανομῆς παρασκευασθείσης ὀξυτοκίνης μετὰ τὴν ἐκτέλεσιν 400 μεταφορῶν εἰς συσκευὴν Craig–Post. (—— πειραματικὴ καμπύλη, θεωρητικὴ καμπύλη, βλ. Πειραμ. μέρος)

Καθηγητὴς κ. du Vigneaud καὶ τῆς ὁποίας ἡ βιολογικὴ δραστικότης ἦτο 500 I.U./mg ὡς πρὸς τὴν κατασταλτικὴν ἐπίδρασιν ἐπὶ τῆς πιέσεως τοῦ αἵματος τῶν πτηνῶν.

Στοιχειακὴ ἀνάλυσις, ὀπτικὴ στροφικὴ ἱκανότης, φάσμα ἀπορροφήσεως εἰς τὸ ὑπέρυθρον (σχ. 7), τοῦ ἡμετέρου παρασκευάσματος ὀξυτοκίνης, ἀντε-



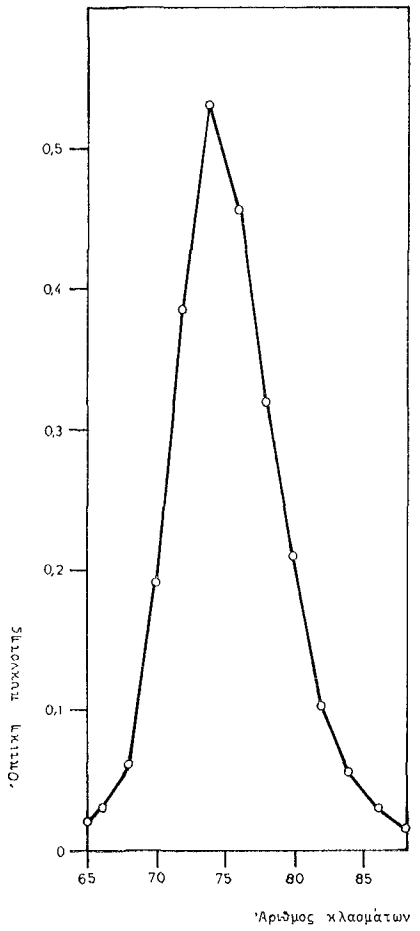
Σχῆμα 7.

Φάσμα ἀπορροφήσεως εἰς τὸ ὑπέρυθρον τῆς ὀξυτοκίνης. Διακρίνονται τρεῖς κύριαι περιοχαὶ ἀπορροφήσεως εἰς 3.10 μ, 6.05 μ καὶ 6.58 μ (73).

πεκρίνοντο πλήρως εἰς τὰ δεδομένα τῆς βιβλιογραφίας. Ἐπίσης τὸ ἡμέτερον παρασκεύασμα ὡς καὶ τὸ παρασκεύασμα du Vigneaud ἔδωσαν τὰ αὐτὰ ἀποτελέσματα κατὰ τὴν χρωματογραφίαν ἐπὶ λεπτῆς στιβάδος καὶ τὴν ἠλεκτροφόρησιν ἐπὶ χάρτου εἰς τρία διάφορα pH, ὡς καὶ τὴν αὐτὴν εἰκόνα κατὰ τὴν ὑδρόλυσίν των καὶ χρωματογραφίαν τοῦ ὑδρολύματος. Λεπτομέρειαι τῶν ἀναλυτικῶν τούτων προσδιορισμῶν δίδονται εἰς τὸ πειραματικὸν μέρος.

Τέλος ἡ ὑφ' ἡμῶν συνθετικῶς παρασκευασθεῖσα ὀξυτοκίνη ὑπεβλήθη εἰς ἔλεγχον τῆς βιολογικῆς της δραστικότητος, ὁ ὁποῖος ἐξετελέσθη εἰς τὸ Ἐργαστήριον τοῦ Καθηγητοῦ κ. du Vigneaud (Department of Biochemistry, Cornell University, Medical College, New York). Ἡ βιολογικὴ δραστικότης ὡς πρὸς τὴν κατασταλτικὴν ἐπίδρασιν ἐπὶ τῆς πιέσεως τοῦ αἵματος τῶν πτηνῶν ἀνευρέθη ἴση πρὸς 380 I.U./mg. Ἡ βιολογικὴ δραστικότης αὕτη ἀνταποκρίνεται εἰς λυοφιλοποιημένον ὑλικόν, ὡς τοῦτο ἐλήφθη μετὰ τὴν λυοφιλοποίησιν. Ἐὰν ληφθοῦν ὑπ' ὄψιν τὰ ἀναλυτικὰ δεδομένα (πρβλ. πειραμ. μέρος) καὶ ἡ ἀπώλεια βάρους ὑπὸ τὴν ἐπίδρασιν ὑψηλοῦ κενοῦ εἰς 100°C, ἡ τιμὴ αὕτη πρέπει ν' αὐξηθῇ κατὰ 15% περίπου, ἤτοι καθί-

σταται ἴση πρὸς 440 I.U./mg. Ἡ τιμὴ αὕτη δέον νὰ θεωρηθῇ ὡς ἐξαιρετικῶς ἱκανοποιητικὴ δεδομένου μάλιστα, ὅτι ὁ βιολογικὸς ἔλεγχος δὲν ἦτο δυνατὸν νὰ ἐκτελεσθῇ ἀμέσως μετὰ τὴν σύνθεσιν, ἀλλὰ διεξήγετο πολλὰς ἑβδομάδας μετὰ τὴν ἀποπεράτωσιν τῆς συνθέσεως. Ἐνταῦθα πρέπει νὰ ληφθῇ



Σχῆμα 8.

Καμπύλη κατανομῆς ὀξυτοκίνης ἐντὸς τῶν κλασμάτων ἐκλούσεως, μετὰ τὸν καθαρισμὸν αὐτῆς διὰ χρωματογραφίας κατανομῆς ἐπὶ Sephadex (βλ. Πειραμ. μέρος).

ὑπ' ὄψιν, ὅτι ἡ ὑπὸ τοῦ Ἐργαστηρίου τοῦ du Vigneaud δοθεῖσα μεγίστη τιμὴ τῶν 500 I.U./mg. δὲν ἐπαναλαμβάνεται εὐκόλως, ἀλλ' ἀνευρίσκεται μόνον εἰς προϊόντα ὑποβληθέντα εἰς ἐξαντλητικὸν καθαρισμὸν καί, ὅπερ

σπουδαιότερον, ἐφ' ὅσον ὁ βιολογικὸς ἔλεγχος ἐκτελεῖται εὐθὺς ἀμέσως μετὰ τὴν ἀπομόνωσιν τῆς οὐσίας. Ἤδη εἰς τὸ αὐτὸ ἐργαστήριον τοῦ du Vigneaud ἔχει παρατηρηθῆ, ὅτι παρασκευάσματα ὀξυτοκίνης κατὰ τὴν παραμονήν των ἐπὶ ἑβδομάδας, ἔστω καὶ εἰς χαμηλὰς θερμοκρασίας, ὑφίστανται μείωσιν τῆς βιολογικῆς των δραστικότητος (130). Ὁ Boissonnas (ἑταιρία Sandoz) δίδει μεγίστην τιμὴν 450 I.U./mg. (131), ὁ δὲ Rudinger 380 I.U./mg. (132). Ὁ αὐτὸς ἐρευνητὴς Rudinger παρετήρησεν ἐπίσης ὑποβιβασμὸν τῆς βιολογικῆς δραστικότητος τῆς ὀξυτοκίνης, ἀκόμη καὶ μέχρι τοῦ ἡμίσεος, μετὰ παραμονὴν αὐτῆς ἐν στερεᾷ καταστάσει, ἐπὶ 2 - 3 μῆνας καὶ εἰς θερμοκρασίας κατωτέρας τοῦ μηδενὸς (132). Ἡ ἐξήγησις τοῦ φαινομένου τούτου ἀποτελεῖ εἰσέτι ἀντικείμενον ἐρεύνης.

Ἐν συνεχείᾳ, κατεβάλομεν προσπαθείας περαιτέρω καθαρισμοῦ τῆς ὡς ἄνω ληφθείσης πρακτικῶς χημικῶς καθαρᾶς ὀξυτοκίνης, διὰ χρωματογραφίας κατανομῆς ἐπὶ Sephadex (133).Εἰς πρόσφατον ἄρθρον μου (134) ἀναφέρεται ἡ θεωρία καὶ περιγράφεται ἐπακριβῶς ἡ πρακτικὴ διεξαγωγὴ τῆς νέας ταύτης μεθόδου. Ἐχρησιμοποιήσαμεν μικρὰν ποσότητα τοῦ αὐτοῦ ὡς ἄνω συνθετικοῦ προϊόντος, τὸ ὁποῖον εἶχε σταλῆ πρὸς βιολογικὸν ἔλεγχον, ἀφοῦ ὅμως προηγουμένως εἶχε παραμείνῃ ἐπὶ 5 μῆνας εἰς περίπου -10°C. Ἐκ 14 mg. τοιαύτης ὀξυτοκίνης ἐπανεκτήθησαν μετὰ τὴν χρωματογράφησιν διὰ στήλης ἐκ Sephadex (διαστάσεων 1,1×112 cm.) καὶ ἐκ τῶν κλασμάτων 67-84 (βλ. σχῆμα 8) 9,5 mg. οὐσίας. Ἡ βιολογικὴ δραστικότης τῆς οὐσίας ταύτης ἐλεγχθεῖσα ἐκ νέου, αὐτὴν τὴν φορὰν εἰς τὸ Ἐργαστήριον τοῦ Dr. Rudinger (Ἐργαστήρια τῆς Τσεχικῆς Ἀκαδημίας τῶν Ἐπιστημῶν), εὑρέθη πρακτικῶς ἀμετάβλητος.

β) Κατὰ τὸν τρόπον τοῦτον ἡ N-καρβοβενζοξυ-οξυτοκεΐνη XIII ὑπέστη ἀποκαρβοβενζοξυλίωσιν τῇ ἐπιδράσει ὑδροβρωμίου ἐντὸς ὀξεικοῦ ὀξέος. Ἡ προκύπτουσα ἄμορφος ὑδροβρωμικὴ ὀξυτοκεΐνη διελύθη εἰς ὕδωρ περιέχον ὀλίγην ἀμμωνίαν καὶ ὑπεβλήθη εἰς ὀξείδωσιν δι' ἀερισμοῦ εἰς pH 6,8. Τὸ ὀξειδωθὲν διάλυμα συνεπυκνώθη εἰς περίπου 50 ml. καὶ ὑπεβλήθη εἰς καθαρισμὸν διὰ κατανομῆς κατ' ἀντιρροὴν ὡς εἰς τὴν περίπτωσιν (α). Ἡ κατὰ τὴν δευτέραν ταύτην μέθοδον ληφθεῖσα ὀξυτοκίνη δεικνύει τὰς αὐτὰς χημικὰς καὶ φυσικὰς ἰδιότητας καὶ ἀνάλογον βιολογικὴν δραστικότητα, μὲ τὸ κατὰ τὴν μέθοδον (α) παρασκευασθὲν προϊόν.

Ἐξ ὅλων τῶν ἀνωτέρω προκύπτει, ὅτι ἡ ὑφ' ἡμῶν διὰ τῶν νέων μεθόδων συνθετικῶς παρασκευασθεῖσα ὀξυτοκίνη ἀνταποκρίνεται πράγματι εἰς χημικῶς καθαρὸν καὶ βιολογικῶς δραστικὸν προϊόν.

Β΄ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΝ ΜΕΡΟΣ

Ἡ μέτρησις τῶν σημείων τήξεως ἐγένετο ἐντὸς τριχοειδῶν σωλήνων καὶ εἰς συσκευὴν Büchi. Τ'ἀναφερόμενα σημεῖα τήξεως τῶν πεπτιδίων εἶναι σημεῖα ἀποσυνθέσεως καὶ δὲν εἶναι διορθωμένα.

Ἐχρησιμοποιήθησαν τὰ κάτωθι συστήματα διαλυτικῶν διὰ χρωματογραφίαν ἐπὶ λεπτῆς στιβάδος Kieselgel G, Merck (135) :

1. 1-Βουτανόλη, ὀξεικὸν ὀξύ, ὕδωρ (100 : 10 : 30, V/V) (136).
2. 1-Βουτανόλη, ὀξεικὸν ὀξύ, ὕδωρ, πυριδίνη (30:6:24:20, V/V (137).
3. 1-Προπανόλη, ἀμμωνία 33% (67 : 33, V/V) (135).
4. 1-Προπανόλη, ὕδωρ (64 : 36, V/V) (135).

Τὰ παρασκευασθέντα πεπτίδια ὑπεβλήθησαν εἰς ἀνάλυσιν ἀμινοξέων κατόπιν ὑδρολύσεως 1 - 2 mg. ἐξ αὐτῶν, διὰ βρασμοῦ ἐντὸς 0,5 - 1 ml. 6 N ὑδροχλωρικοῦ ὀξέος ἐπὶ 8 - 10 ὥρας. Ἡ πιστοποίησις τῶν συνιστώντων ἀμινοξέων ἐγένετο διὰ χρωματογραφίας ἐπὶ λεπτῆς στιβάδος κατὰ δύο διαστάσεις (135) εἰς τὰ συστήματα διαλυτικῶν ὑπ' ἀριθ. 3 καὶ 4 καὶ ἐν συγκρίσει πρὸς μῖγμα ἰσομοριακῶν ποσοτήτων τῶν αὐτῶν ἀμινοξέων.

Τὸ χρησιμοποιηθὲν ὀξεικὸν ὀξὺ εἶχε καταστῆ ἄνυδρον διὰ κατεργασίας καὶ ἀποστάξεως ὑπεράνω τριοξεικοῦ βορίου. Ἐχρησιμοποιήθη ἐπίσης ἄνυδρον διμεθυλοφορμαμίδιον καὶ αἰθὴρ ἐλεύθερος ὑπεροξειδίων.

Αἱ στροφικαὶ ἱκανότητες ἐμετρήθησαν εἰς πολωσίμετρον Zeiss, Kreispolarimeter 0,01.

Αἱ οὐσίαι πρὸ τῆς ἀναλύσεως ἐξηράνθησαν εἰς ὑψηλὸν κενὸν ὑπεράνω P_2O_5.

Γενικὸς τρόπος ἀποκαρβοβενζοξυλιώσεως τῶν πεπτιδίων II, IV καὶ VI—VIII πρὸς παρασκευὴν τῶν ἀντιστοίχων ὑδροβρωμικῶν ἁλάτων καὶ ἐξουδετέρωσις αὐτῶν κατὰ τὴν σύζευξιν.

Τὸ N-καρβοβενζοξυπεπτίδιον (0,01 mole) διαλύεται ἐντὸς ἀνύδρου ὀξεικοῦ ὀξέος. Προστίθεται τόσον ὑδροβρώμιον εἰς ὀξεικὸν ὀξύ, οὕτως ὥστε τελικῶς ὁ ὄγκος νὰ εἶναι 35 ml., ἐκτὸς ἐὰν ἄλλως πως σημειοῦται, ἡ δὲ συγκέντρωσις τοῦ ὑδροβρωμίου ἐντὸς τοῦ ὀξεικοῦ ὀξέος νὰ εἶναι 2,5 N. Μετὰ παραμονὴν ἐπὶ 30 - 35 λεπτὰ εἰς συνήθη θερμοκρασίαν τὸ διάλυμα

ἀποχύνεται ἐντὸς τῆς πενταπλασίας ποσότητος ξηροῦ αἰθέρος. Τὸ ὑδροβρωμικὸν ἅλας ἀποβάλλεται ὡς ἄμορφος κόνις καὶ καθαρίζεται δι' ἐπανειλημμένων ἀποχύσεων τοῦ ὑπερκειμένου αἰθέρος. Μετὰ παραμονὴν ἐπὶ ἡμίσειαν ὥραν εἰς τὸ ψυγεῖον τὸ ὑδροβρωμικὸν ἅλας διηθεῖται συντόμως καὶ προσεκτικῶς, ὥστε νὰ μὴν ὑπάρχουν ἀπώλειαι καὶ τοποθετεῖται ἐντὸς ξηραντῆρος κενοῦ ὑπεράνω P_2O_5 καὶ KOH. Μετὰ τὴν ξήρανσιν, τὸ ὑγροσκοπικὸν ὑδροβρωμικὸν ἅλας ζυγίζεται μετ' ἀκριβείας. Ἡ καθαρότης τοῦ παρασκευάσματος ἐλέγχεται διὰ χρωματογραφίας ἐπὶ λεπτῆς στιβάδος εἰς τὸ σύστημα ὑπ' ἀριθ. 1. Τὰ ὑδροβρωμικὰ ταῦτα ἅλατα εἶναι εὐδιάλυτα εἰς ὕδωρ. Ταῦτα συγκρατοῦν συνήθως ὑδροβρώμιον περισσότερον τοῦ θεωρητικοῦ καὶ δίδουν ὄξινον ἀντίδρασιν εἰς χάρτην Congo. Ὡς ἐκ τούτου, κατὰ τὴν περαιτέρω σύζευξίν των προστίθεται ἐκτὸς τῆς θεωρητικῆς ποσότητος τριαιθυλαμίνης καὶ ἡ ἀναγκαία ποσότης πρὸς ἐξουδετέρωσιν τῆς περισσείας τοῦ ὑδροβρωμίου. Ἡ περίσσεια τοῦ ὑδροβρωμίου ὑπολογίζεται ὡς ἑξῆς : Ὑπὸ τὴν προϋπόθεσιν, ὅτι ἡ ἀντίδρασις τῆς ἀποκαρβοβενζοξυλιώσεως λαμβάνει χώραν εἰς θεωρητικὴν ἀπόδοσιν, ἡ διαφορὰ βάρους τοῦ λαμβανομένου ὑδροβρωμικοῦ ἅλατος ἀπὸ τῆς θεωρητικῆς ἀποδόσεως θεωρεῖται ὀφειλομένη εἰς συγκρατούμενον ἐπὶ πλέον ὑδροβρώμιον. Κατὰ τὴν διάρκειαν τῶν συζεύξεων διεπιστώθη, ὅτι μετὰ τὴν προσθήκην τριαιθυλαμίνης βάσει τῶν ἀνωτέρω ὑπολογισμῶν, τὸ μῖγμα τῆς ἀντιδράσεως ἐδείκνυεν pH 7 - 8.

N - Καρβοβενζοξυ - S - βενζοϋλο - L- κυστεϊνυλο - L - προλυλο - L - λευκυλο - γλυκιναμίδιον (II).

Εἰς ψυχρὸν διάλυμα 3,2 g. (0,011 mole) L-προλυλο-L-λευκυλο-γλυκιναμιδίου (82, 83) ἐντὸς 8 ml. ἀνύδρου διμεθυλοφορμαμιδίου, προσετέθησαν 5,5 g. N-καρβοβενζοξυ-S-βενζοϋλο-L-κυστεϊνο-p-νιτροφαινυλεστέρος (118). Μετὰ παραμονὴν τοῦ διαλύματος ἐπὶ 4 ἡμέρας εἰς συνήθη θερμοκρασίαν προσετέθη ψυχρὸν ὕδωρ καὶ ὀξεικὸς αἰθυλεστήρ. Τὸ μῖγμα μετεφέρθη εἰς διαχωριστικὴν χοάνην καὶ ἡ στιβὰς τοῦ ὀξεικοῦ αἰθυλεστέρος ἐπλύθη διὰ ψυχροῦ 1 N ὑδροχλωρικοῦ ὀξέος καὶ ἐν συνεχείᾳ δι'ὕδατος μέχρις ἀρνητικῆς ἀντιδράσεως εἰς χάρτην Congo. Μετὰ σύντομον ξήρανσιν ὑπεράνω θειϊκοῦ νατρίου, τὸ διάλυμα συνεπυκνώθη μέχρι ξηροῦ. Τὸ ὑπόλειμμα παρελήφθη εἰς 6 ml. διμεθυλοφορμαμιδίου καὶ τὸ προϊὸν τῆς συζεύξεως ἀπεβλήθη ὑπὸ κρυσταλλικὴν μορφήν, τῇ προσθήκῃ αἰθέρος (400 ml.). Ἐλήφθησαν 5,8 g. (82%) Σ. Τ. 160 - 161°. Δι' ἀνακρυσταλλώσεως ἀπὸ 70% μεθανόλην τὸ σημεῖον τήξεως δὲν μετεβλήθη. $[\alpha]_D^{22} = -73{,}2^0$ (c 2,5, διμεθυλοφορμαμίδιον).

Ἀνάλυσις. Διὰ $C_{31}H_{39}N_5O_7S$:

Ὑπολ. C 59,50 H 6,28 N 11,19 S 5,12

Εὑρεθ. C 59,73 H 6,23 N 11,12 S 5,20

Ν-Καρβοβενζοξυ-L-ασπαραγινυλο-S-βενζοϋλο-L-κυστεϊνυλο-L-προλυλο-L-λευκυλο-γλυκιναμίδιον (IV).

Καρβοβενζοξυ-ασπαραγίνη (2,65 g., 0,01 mole) διελύθη ἐντὸς 30 ml. χλωροφορμίου, τῇ προσθήκῃ 0,8 ml. πυριδίνης καὶ 1,4 ml. Ν-αἰθυλοπιπεριδίνης, δι' ἐλαφρᾶς θερμάνσεως ἐπὶ ἀτμολούτρου. Τὸ διάλυμα ἐψύχθη ἀποτόμως εἰς -10° καὶ μετὰ πάροδον 10 λεπτῶν προσετέθη 1,2 ml. χλωριδίου τοῦ πιβαλινικοῦ ὀξέος (124). Ὁ ἀνυδρίτης παρέμεινεν ἐπὶ 3 λεπτὰ εἰς 5° - 10° καὶ προσετέθη ὑπὸ ἀνάδευσιν εἰς διάλυμα 0,01 mole ὑδροβρωμικοῦ ἅλατος III (παρασκευασθέντος κατὰ τὴν περιγραφεῖσαν γενικὴν μέθοδον) ἐντὸς 30 ml. χλωροφορμίου εἰς -10°. Εἰς τὸ διάλυμα τοῦτο μόλις προηγουμένως εἶχε προστεθῆ 1,4 ml. τριαιθυλαμίνη. Ἡ φιάλη μὲ τὸν ἀνυδρίτην ἐξεπλύθη μὲ 20ml. χλωροφορμίου. Εἰς τὸ μῖγμα προσετέθη ἐν συνεχείᾳ στάγδην ἡ ὑπολογισθεῖσα ποσότης τριαιθυλαμίνης πρὸς ἐξουδετέρωσιν τῆς περισσείας τοῦ ὑδροβρωμίου. Ἡ ἀνάδευσις ἐσυνεχίσθη εἰς συνήθη θερμοκρασίαν καὶ μετ' ὀλίγον τὸ μῖγμα μετεβλήθη εἰς ζελατινώδη μᾶζαν. Μετὰ παραμονὴν ἐπὶ 16 ὥρας εἰς συνήθη θερμοκρασίαν συνεπυκνώθη μέχρι ξηροῦ. Μετεφέρθη ἐντὸς ἰγδίου καὶ ἀνεμίχθη μετὰ ψυχροῦ Ν ὑδροχλωρικοῦ ὀξέος. Διηθήθη καὶ ἡ ἔκπλυσις ἐπανελήφθη κατὰ τὸν αὐτὸν τρόπον μὲ ψυχρὸν Ν ὑδροχλωρικὸν ὀξύ, μὲ ψυχρὸν ὕδωρ καὶ δύο φορὰς μὲ ψυχρὸν διάλυμα 5% ὀξίνου ἀνθρακικοῦ καλίου καὶ ὕδωρ ἐναλλάξ. Τὸ ὑπόλοιπον μετὰ ξήρανσιν εἰς ξηραντῆρα κενοῦ ὑπεράνω P_2O_5 ἀνεκρυσταλλώθη διὰ διαλύσεως εἰς 200 - 250 ml. μεθανόλης ἐν θερμῷ, διηθήσεως καὶ προσθήκης ἴσης ποσότητος ὕδατος. Διὰ παραμονῆς εἰς συνήθη θερμοκρασίαν καὶ ἐμβολιασμοῦ ἀπεβλήθη ἡ οὐσία, ὡς βελονοειδῆ πρίσματα. Ἐλήφθησαν 4,5 g. (61 %), Σ. Τ. 214 - 215°, $[\alpha]_D^{19} = -71,5°$, (c 2,5, διμεθυλοφορμαμίδιον).

Ἀνάλυσις. Διὰ $C_{35}H_{45}N_7O_9S$:

Ὑπολ.	C 56,82	H 6,13	N 13,25	S 4,33
Εὑρεθ.	C 56,97	H 6,33	N 13,09	S 4,19

ο-Νιτροφαινυλοσουλφενυλο-L-ασπαραγινυλο-S-βενζοϋλο-L-κυστεϊνυλο-L-προλυλο-L λευκυλο-γλυκινσμίδιον (IVa).

ο-Νιτροφαινυλοσουλφενυλο-L-ασπαραγίνη (0,285 g., 0,001 mole) (103) μετετράπη εἰς μικτὸν ἀνυδρίτην μετὰ πιβαλινικοῦ ὀξέος καὶ συνεζεύχθη μὲ ὑδροβρωμικὸν τετραπεπτίδιον (III) ἀκριβῶς ὡς περιεγράφη εἰς τὴν παρασκευὴν τοῦ καρβοβενζοξυπαραγώγου (IV). Μετὰ παραμονὴν ἐπὶ 18 ὥρας εἰς συνήθη θερμοκρασίαν ἀπεμακρύνθη τὸ χλωροφόρμιον ἐν κενῷ καὶ τὸ ὑπόλειμμα παρελήφθη δι' ὀξεικοῦ αἰθυλεστέρος. Μετὰ διήθησιν, ἡ οὐσία ἐπλύθη δι' ὕδατος καὶ διὰ διαλύματος ὀξίνου ἀνθρακικοῦ καλίου. Πρὸς καθαρι-

σμὸν ἡ οὐσία διελύθη εἰς διμεθυλοφορμαμίδιον καὶ κατεβυθίσθη δι' αἰθέρος. Σ. Τ. 208 - 210°, $[\alpha]_D^{19} = -126^0$ (c 1, διμεθυλοφορμαμίδιον).

'Ανάλυσις. Διὰ $C_{33}H_{42}N_8O_9S_2$:

'Υπολ. N 14,76 S 8,45
Εὑρεθ. N 14,95 S 8,29

Δις-(καρβοβενζοξυ-L-ασπαραγινυλο)-L-κυστινυλο-δις-(L-προλυλο-L-λευκυλο-γλυκιναμίδιον) (V).

Εἰς αἰώρημα 0,185 g. καρβοβενζοξυ - πενταπεπτιδίου (IV) ἐντὸς 1,1 ml. διμεθυλοφορμαμιδίου καὶ 1,5 ml. ἀπολύτου μεθανόλης, διεβιβάσθη ὑπὸ μαγνητικὴν ἀνάδευσιν ξηρὸν ρεῦμα ὑδρογόνου ἐπὶ 5 λεπτά. 'Υπὸ συνεχῆ διαβίβασιν ὑδρογόνου καὶ ἀνάδευσιν, προσετέθησαν 0,51 ml. προσφάτου διαλύματος 0,5 N μεθοξυλικοῦ νατρίου καὶ 1 ml. μεθανόλης. Μετὰ παρέλευσιν 22 λεπτῶν ἀπὸ τῆς προσθήκης τοῦ ἀλκάλεος τὸ διάλυμα ὠξυνίσθη τῇ προσθήκῃ 0,4 ml. ὀξεικοῦ ὀξέος καὶ ἐτιτλοδοτήθη διὰ N/10 διαλύματος ἰωδίου· κατηναλώθησαν 2,45 ml. διαλύματος ἰωδίου, ἤτοι 98 % τοῦ θεωρητικοῦ. Τὸ προϊὸν τῆς ὀξειδώσεως (ἐννεαπεπτίδιον V) ἀπεβλήθη μετὰ τὴν ἀπομάκρυνσιν τῆς μεθανόλης ἐν κενῷ, ἐκχύλισιν διὰ χλωροφορμίου καὶ ἐξουδετέρωσιν διὰ πυκνοῦ διαλύματος ὀξίνου ἀνθρακικοῦ καλίου. 'Ελήφθησαν 0,098 g. (61 %) Σ. Τ. 191 - 192° μετὰ συρρίκνωσιν εἰς 164°. Μετ' ἀνακρυστάλλωσιν ἀπὸ 2 ml. αἰθανόλης, τὸ σ. τήξεως δὲν μετεβλήθη. $[\alpha]_D^{19} = -129^0$ (c 1, διμεθυλοφορμαμίδιον). 'Υδρόλυσις τῆς οὐσίας καὶ χρωματογραφία κατὰ τὰς δύο διαστάσεις, ὡς περιγράφεται εἰς τὴν σελ. 61, ἔδειξε τ'ἀμινοξέα : ἀσπαραγίνην, κυστίνην, προλίνην, λευκίνην καὶ γλυκίνην εἰς τὰς ἀναμενομένας ἀναλογίας.

'Ανάλυσις : Διὰ $C_{56}H_{80}N_{14}O_{16}S_2$:

'Υπολ. C 52,97 H 6,35 N 15,44 S 5,05
Εὑρεθ. C 52,76 H 6,62 N 15,30 S 4,86

N-Καρβοβενζοξυ-L-γλουταμινυλο-L-ασπαραγινυλο-S- βενζοϋλο- L- κυστεϊνυλο·L-προλυλο-L-λευκυλο-γλυκιναμίδιον (VI)

α) Καρβοβενζοξυ-πενταπεπτίδιον (IV, 5,18 g., 0,007 mole) μετετράπη εἰς ὑδροβρωμικὸν ἅλας κατὰ τὴν περιγραφεῖσαν γενικὴν μέθοδον. Τὸ τοιουτοτρόπως ληφθὲν ὑδροβρωμικὸν ἅλας διελύθη εἰς 10ml. διμεθυλοφορμαμιδίου. Εἰς τὸ ψυχθὲν διάλυμα προσετέθη p-νιτροφαινυλεστὴρ τῆς καρβοβενζοξυγλουταμίνης (2,96 g., ἤτοι 5 % περίσσεια) (86) καὶ μετὰ ταῦτα ἡ ὑπολογισθεῖσα ποσότης τριαιθυλαμίνης, στάγδην. Μετὰ παραμονὴν ἐπὶ 18 ὥρας εἰς συνήθη θερμοκρασίαν, τὸ μῖγμα ἀνεμίχθη καλῶς ἐντὸς

ἰγδίου μὲ 100 ml. ὀξεικοῦ αἰθυλεστέρος, διηθήθη καὶ ἐπλύθη μὲ ὀξεικὸν αἰθυλεστέρα. Μετὰ ξήρανσιν εἰς ξηραντῆρα κενοῦ, τὸ ὑπόλειμμα κατηργάσθη διὰ ψυχροῦ ὕδατος ἐντὸς ἰγδίου καὶ μετὰ διήθησιν, δι' ἀλκοόλης καὶ δι' αἰθέρος. Πρὸς καθαρισμὸν ἡ οὐσία διελύθη ἐντὸς 60ml. διμεθυλοφορμαμιδίου ἐν θερμῷ, διηθήθη καὶ κατεβυθίσθη τῇ προσθήκῃ τριπλασίας περίπου ποσότητος αἰθέρος. Ἐλήφθησαν 5,2 g. (85%), Σ.Τ. 214-216°, $[\alpha]_D^{19}=-66.2^0$ (c 2,5 διμεθυλοφορμαμίδιον).

Ἀνάλυσις. Διὰ $C_{40}H_{53}N_9O_{11}S$:

Ὑπολ.	C 55,35	H 6,15	N 14,52	S 3,69
Εὑρεθ.	C 55,22	H 6,28	N 14,24	S 3,54

β) Εἰς αἰώρημα ο-νιτροφαινυλοσουλφενυλο-πενταπεπτιδίου (IVα, 0,415 g.) ἐντὸς 10 ml. ἀπολύτου μεθανόλης προσετέθη 1 ml. 2 N ὑδροχλωρίου εἰς μεθανόλην. Πρὸς διάλυσιν τὸ μῖγμα ἀνεταράχθη ἐπὶ 15 λεπτὰ εἰς συνήθη θερμοκρασίαν καὶ κατόπιν διηθήθη ἐντὸς ξηροῦ αἰθέρος. Ὁ αἰθὴρ ἀπεχύθη καὶ τὸ ἀπομεῖναν ὑδροχλωρικὸν ἅλας, πρὸς καθαρισμόν, διελύθη ἐντὸς ὀλίγης μεθανόλης καὶ κατεβυθίσθη δι' αἰθέρος. Ἐλήφθησαν 0,280 g. (80 %) ἅλατος μὴ ὑγροσκοπικοῦ, οὐδετέρου εἰς χάρτην Congo, Σ. Τ. 138-145°. Διὰ χρωματογραφίας ἐπὶ λεπτῆς στιβάδος εἰς τὸ σύστημα ὑπ' ἀρ. 1, ἔδειξε μίαν κηλίδα μὲ Rf 0,38.

Τὸ ὡς ἄνω ὑδροχλωρικὸν ἅλας συνεζεύχθη μὲ καρβοβενζοξυ-L-γλουταμινο-p-νιτροφαινυλεστέρα ἀκριβῶς ὡς τὸ ὑδροβρωμικὸν ἅλας εἰς τὸ α). Ἀπόδοσις 85%, Σ. Τ. 214°, $[\alpha]_D=-67.0^0$ (c 2, διμεθυλοφορμαμίδιον).

N-Καρβοβενζοξυ-L-ισολευκυλο-L-γλουταμινυλο-L-ασπαραγινυλο-S-βενζοϋλο-L-κυστεϊνυλο-L-προλυλο-L-λευκυλο-γλυκιναμίδιον (VII).

Καρβοβενζοξυ-εξαπεπτίδιον (VI, 5,2 g., 0.006 mole) μετετράπη εἰς ὑδροβρωμικὸν ἅλας κατὰ τὴν γενικὴν μέθοδον. Τὸ ληφθὲν ὑδροβρωμικὸν ἅλας διελύθη εἰς 14 ml. διμεθυλοφορμαμιδίου. Εἰς τὸ διάλυμα προσετέθη καρβοβενζοξυ-L-ισολευκινο- p -νιτροφαινυλεστὴρ (2,45 g., 5 % περίσσεια) (86) καὶ μετὰ ψῦξιν, ἡ ὑπολογισθεῖσα ποσότης τριαιθυλαμίνης στάγδην. Τὸ μῖγμα, μετὰ παραμονὴν ἐπὶ 18 ὥρας εἰς συνήθη θερμοκρασίαν, κατηργάσθη ἐντὸς ἰγδίου δι' ὀξεικοῦ αἰθυλεστέρος καὶ μετὰ ξήρανσιν, διαδοχικῶς δι' ὕδατος, ἀλκοόλης καὶ αἰθέρος. Τὸ ὑπόλειμμα διελύθη εἰς 40 ml. διμεθυλοφορμαμιδίου καὶ κατεβυθίσθη δι' αἰθέρος. Ἐλήφθησαν 4,5 g. (77%), Σ. Τ. 222-223°, $[\alpha]_D^{18}=-52,9^0$ (c 1, διμεθυλοφορμαμίδιον).

Ἀνάλυσις. Διὰ $C_{46}H_{64}N_{10}O_{12}S$:

Ὑπολ.	C 56,31	H 6,57	N 14,27	S 3,26
Εὑρεθ.	C 56,14	H 6,98	N 14,44	S 3,22

N-Καρβοβενζοξυ-O-βενζυλο-L-τυροσυλο-L-ισολευκυλο-L-γλουταμινυλο-L-ασπαραγινυλο-S-βενζοϋλο-L-κυστεϊνυλο-L-προλυλο-L-λευκυλο-γλυκιναμίδιον (VIII).

α) Καρβοβενζοξυ-επταπεπτίδιον (VII, 3,9 g., 0,004 mole) μετετράπη εἰς ὑδροβρωμικὸν ἅλας τῇ ἐπιδράσει 20 ml. ὑδροβρωμίου ἐντὸς ὀξεικοῦ ὀξέος, κατὰ τὴν γενικὴν μέθοδον. Τὸ οὕτω ληφθὲν ὑδροβρωμικὸν ἅλας διελύθη εἰς 14 ml. διμεθυλοφορμαμιδίου, εἰς τὸ διάλυμα προσετέθη N-καρβοβενζοξυ-O-βενζυλο-L-τυροσινο-p-νιτροφαινυλεστὴρ (2,21 g., ἤτοι 5% περίσσεια) (86) καὶ μετὰ ψῦξιν, ἡ ὑπολογισθεῖσα ποσότης τριαιθυλαμίνης στάγδην. Τὸ στερεοποιηθὲν μῖγμα κατηργάσθη μετὰ 18 ὥρας ἐντὸς ἰγδίου δι' ὀξεικοῦ αἰθυλεστέρος καὶ μετὰ ξήρανσιν, δι' ἀλκοόλης καὶ δι' αἰθέρος. Τελικῶς, τὸ ὑπόλειμμα διελύθη ἐντὸς 35 ml. θερμοῦ διμεθυλοφορμαμιδίου καὶ κατεβυθίσθη δι' αἰθέρος. Ἐλήφθησαν 4,1 g. (83%), Σ. Τ. 225 - 228°, $[\alpha]_D^{17} = -44,6^0$ (c 1, διμεθυλοφορμαμίδιον).

Ἀνάλυσις. Διὰ $C_{62}H_{79}N_{11}O_{14}S$, H_2O :

Ὑπολ.	C 59,45	H 6,51	N 12,30	S 2,56
Εὑρεθ.	C 59,67	H 6,74	N 12,40	S 2,49

β) Ὑδροβρωμικὸν ἅλας (0.001 mole) τοῦ ἑπταπεπτιδίου παρασκευασθὲν ὡς εἰς τὸ α) διελύθη ἐντὸς 10 ml. μεθανόλης καὶ διεβιβάσθη διὰ στήλης Amberlite IR-400(ὑπὸ τὴν OH μορφήν).Ἡ στήλη ἐπλύθη μὲ ὀλίγην μεθανόλην καὶ τὰ συνηνωμένα μεθανολικὰ κλάσματα συνεπυκνώθησαν ἐν κενῷ. Τὸ κρυσταλλικὸν ὑπόλειμμα ἀνεκρυσταλλώθη ἀπὸ θερμὸν ὕδωρ. Ἐλήφθησαν 0,150 g. κρυσταλλικοῦ ἐλευθέρου ἑπταπεπτιδίου (VIIα), Σ. Τ. 192—195°, $[\alpha]_D^{15} = -54,5^0$ (c 1, διμεθυλοφορμαμίδιον). Διὰ χρωματογραφίας ἐπὶ λεπτῆς στιβάδος εἰς τὸ σύστημα ὑπ' ἀρ. 1, ἔδειξε μίαν κηλίδα μὲ Rf 0,35.

Ἐκ τοῦ διηθήματος διὰ συμπυκνώσεως καὶ προσθήκης ἀκετόνης ἐλήφθησαν ἕτερα 0,260 g. κρυσταλλικῆς οὐσίας τοῦ αὐτοῦ σ. τήξεως καὶ μὲ τὸ αὐτὸ Rf , $[\alpha]_D^{15} = -54.1^0$ (c 1, διμεθυλοφορμαμίδιον).

Διὰ συζεύξεως τοῦ ὡς ἄνω ἐλευθέρου ἑπταπεπτιδίου (VIIσ) μετὰ N-καρβοβενζοξυ-O-βενζυλο-L-τυροσινο-p-νιτροφαινυλεστέρος, ἐλήφθη προϊὸν Σ. Τ. 224-228°, $[\alpha]_D^{15} = -45.3^0$ (c 1, διμεθυλοφορμαμίδιον).

N-Καρβοβενζοξυ-S-βενζοϋλο-L-κυστεϊνυλο-L-τυροσυλο-L-ισολευκυλο-L-γλουταμινυλο-L-ασπαραγινυλο-S-βενζοϋλο-L-κυστεϊνυλο-L-προλυλο-L-λευκυλο-γλυκιναμίδιον (IX).

Καρβοβενζοξυ-οκταπεπτίδιον (VIII, 1,23 g., 0,001 mole) ἀπεκαρβοβενζοξυλιώθη τῇ προσθήκῃ 8 ml. 2,5 N ὑδροβρωμίου ἐντὸς ὀξεικοῦ ὀξέος καὶ παραμονῆς εἰς συνήθη θερμοκρασίαν ἐπὶ 45 λεπτά. Ἡ ὑπόλοιπος κατεργα-

σία ἐγένετο ὡς περιεγράφη εἰς τὴν γενικὴν μέθοδον. Τὸ οὕτω ληφθὲν ὑδροβρωμικὸν ἅλας διελύθη εἰς 3,5 ml.διμεθυλοφορμαμιδίου, προσετέθησαν 0,5 g. N-καρβοβενζοξυ-S-βενζοϋλο-L-κυστεϊνο-p-νιτροφαινυλεστέρος (118) καὶ ἡ ὑπολογισθεῖσα ποσότης τριαιθυλαμίνης, στάγδην. Τὸ στερεοποιηθὲν μῖγμα μετὰ παραμονὴν ἐπὶ 36 ὥρας εἰς συνήθη θερμοκρασίαν κατηργάσθη ἐντὸς ἰγδίου δι' ὀξεικοῦ αἰθυλεστέρος καὶ μετὰ ξήρανσιν, δι' ἀλκοόλης καὶ δι' αἰθέρος. Τελικῶς ἡ οὐσία διελύθη εἰς 8 ml. διμεθυλοφορμαμιδίου ἐν θερμῷ, διηθήθη καὶ κατεβυθίσθη δι'αἰθέρος.'Ελήφθησαν 1,1 g. (83%), Σ.Τ. 227-229° $[\alpha]_D^{23} = -64,5^0$ (c 1, διμεθυλοφορμαμίδιον).

'Ανάλυσις. Διὰ $C_{65}H_{82}N_{12}O_{16}S_2$:

Ὑπολ.	C 57,76	H 6,11	N 12,43
Εὑρεθ.	C 57,92	H 6,40	N 12,14

Δις-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-L-κυστίνη.

L-Κυστίνη (10,5 g.) διελύθη ὑπὸ ψῦξιν εἰς 435 ml. διοξάνης τῇ προσθήκῃ 175 ml. 0,5 N NaOH. Προσετέθησαν 25 ml. t-βουτυλοξυκαρβονυλο-αζιδίου (105) ὑπὸ μαγνητικὴν ἀνάδευσιν. Ἡ ἀνάδευσις ἐσυνεχίσθη ἐπὶ 48 ὥρας εἰς συνήθη θερμοκρασίαν. Κατὰ τὴν διάρκειαν τῶν πρώτων ὡρῶν προσετίθεντο ἑκάστην ὥραν 10 ml. N NaOH (ἐν ὅλῳ 90 ml). Μετὰ τὴν ἀπομάκρυνσιν ὀλίγης ἀποβληθείσης κυστίνης διὰ διηθήσεως, τὸ διήθημα συνεπυκνώθη ἐν κενῷ εἰς 40° πρὸς ἀπομάκρυνσιν τῆς διοξάνης, ἐξεχυλίσθη δι' ὀξεικοῦ αἰθυλεστέρος καὶ ἡ ὑδατικὴ στιβὰς ὠξυνίσθη διὰ ψυχροῦ N θειϊκοῦ ὀξέος. Ἡ ἀποβληθεῖσα οὐσία διηθήθη μετὰ παραμονὴν εἰς τὸ ψυγεῖον. 'Ελήφθησαν 13 g. ὑπὸ μορφὴν μικρῶν πρισμάτων. Σ. Τ. 141-142°. Μετ' ἀνακρυστάλλωσιν ἀπὸ ὀξεικὸν αἰθυλεστέρα-πετρελαϊκὸν αἰθέρα τὸ σ. τήξεως ἀνῆλθεν εἰς 145 - 146°, $[\alpha]_D^{19} = -138^0$ (c 2,5, μεθανόλη).

'Ανάλυσις. Διὰ $C_{16}H_{28}N_2O_8S_2$.

Ὑπολ.	C 43,62	H 6,40	N 6,36	S 14,55
Εὑρεθ.	C 43,80	H 6,61	N 6,29	S 14,70

N-t-Βουτυλοξυκαρβονυλο-S-βενζοϋλο-L-κυστεΐνη.

Δις-βουτυλοξυκαρβονυλο-L-κυστίνη (2,2 g.) διελύθη εἰς 100 ml. ὑγρᾶς ἀμμωνίας τοποθετημένης ἐντὸς τριλαίμου σφαιρικῆς φιάλης, ἡ ὁποία ἐψύχετο διὰ ξηροῦ πάγου – ἀκετόνης καὶ ἔφερε πλευρικὸν σωλῆνα νατρασβέστου. Προσετέθησαν 0,8 g. μεταλλικοῦ νατρίου εἰς μικρὰς δόσεις. Μετὰ τὴν παραμονὴν τοῦ κυανοῦ χρώματος ἐπὶ 5 λεπτὰ περίπου, τὸ διάλυμα ἀπεχρωματίσθη τῇ προσθήκῃ σταγόνων ὀξεικοῦ ὀξέος. Ἡ ἀμμωνία ἀπεμακρύνθη

δι' ἐξατμίσεως καὶ εἰς τὸ τέλος ὑπὸ κενόν. Τὸ στερεὸν ὑπόλειμμα διελύθη εἰς 60 ml. ψυχροῦ N θειϊκοῦ ὀξέος καὶ ἐξεχυλίσθη δύο φορὰς δι'αἰθέρος. Ἐκ τοῦ αἰθερικοῦ διαλύματος παρελήφθη ἡ t-βουτυλοξυκαρβονυλο-κυστεΐνη διὰ ταχείας ἐκχυλίσεως μὲ διάλυμα 10 % ψυχροῦ ὀξίνου ἀνθρακικοῦ καλίου, ἐπὶ τρεῖς φοράς. Μετὰ τὴν προσθήκην 3 ml. βενζοϋλοχλωριδίου, τὸ μῖγμα ἀνεταράχθη ἐπὶ 15 λεπτὰ κατ' ἀρχὰς ὑπὸ ψῦξιν καὶ ἐν συνεχείᾳ εἰς θερμοκρασίαν δωματίου. Δι' ὀξυνίσεως τοῦ μίγματος διὰ θειϊκοῦ ὀξέος ἀπεβλήθη στερεὰ οὐσία. Πρὸς καθαρισμόν, ἡ οὐσία μετὰ τὴν διήθησιν κατηργάσθη διὰ ζέοντος ὕδατος, τὸ ὁποῖον ἀπεμακρύνθη δι'ἀποχύσεως ἐπὶ τρεῖς φοράς. Ἐλήφθησαν 1,1 g., Σ. Τ. 105 - 112°. Πρὸς ἀνακρυστάλλωσιν ἡ οὐσία διελύθη εἰς 5 ml. μεθανόλης ἐν θερμῷ καὶ κατεβυθίσθη τῇ προσθήκῃ 50 ml. ζέοντος ὕδατος. Ἀνεκτήθησαν 0,9 g., Σ.Τ. 110 - 112°, $[\alpha]_D^{30} = -52,5^0$ (c 2, διμεθυλοφορμαμίδιον).

Ἀνάλυσις. Διὰ $C_{15}H_{19}NO_5S$:

Ὑπολ.	C 55,36	H 5,88	N 4,30
Εὑρεθ.	C 55,25	H 5,76	N 4,20

Μετατροπὴ εἰς ἅλας δικυκλοεξυλαμίνης. Ἡ ἀνωτέρω οὐσία λαμβάνεται εὐκολώτερον εἰς καθαρὰν κατάστασιν διὰ μετατροπῆς εἰς ἅλας δικυκλοεξυλαμίνης. Οὕτω διὰ διαλύσεως 1,3 g. μερικῶς καθαρισθείσης οὐσίας ἐντὸς 10 ml. ὀξεικοῦ αἰθυλεστέρος καὶ προσθήκης 1,2 ml. δικυκλοεξυλαμίνης ἐλήφθησαν 1,7 g. κρυσταλλικοῦ ἅλατος, Σ.Τ. 147°. Μετ' ἀνακρυστάλλωσιν ἀπὸ ὀξεικὸν αἰθυλεστέρα, Σ.Τ. 151 - 153°, $[\alpha]_D^{23} = +18^0$ (c 1, διμεθυλοφορμαμίδιον).

Ἀνάλυσις. Διὰ $C_{27}H_{42}N_2O_5S$:

Ὑπολ.	C 63,99	H 8,35	N 5,54	S 6,28
Εὑρεθ.	C 63,78	H 8,48	N 5,25	S 5,96

N-t-Βουτυλοξυκαρβονυλο-S-βενζοϋλο-L-κυστεϊνυλο-L-τυροσυλο L-ισολευκυλο-L-γλουταμινυλο-L-ασπαραγινυλο-S-βενζοϋλο-L-κυστεϊνυλο-L-προλυλο-L-λευκυλο-γλυκιναμίδιον (X).

N-t-Βουτυλοξυκαρβονυλο-S-βενζοϋλο-L-κυστεΐνη, ὡς ἅλας μετὰ δικυκλοεξυλαμίνης (0,280 g., 0,55 mmole), μετετράπη εἰς ἐλεύθερον ὀξὺ διὰ κατεργασίας μετὰ N θειϊκοῦ ὀξέος ἐντὸς αἰθέρος καὶ συμπυκνώσεως μέχρι ξηροῦ. Εἰς ψυχρὸν διάλυμα τοῦ ὑπολείμματος ἐντὸς 2,5 ml. διμεθυλοφορμαμιδίου προσετέθη τὸ ἥμισυ τῆς ὑπολογισθείσης ποσότητος τριαιθυλαμίνης καὶ ἐν συνεχείᾳ 0,5 mmole ὑδροβρωμικοῦ ὀκταπεπτιδίου, παρασκευασθέντος ὡς περιεγράφη εἰς τὸ IX, ὡς καὶ ἡ ὑπόλοιπος τριαιθυλαμίνη. Μετὰ προσθήκην 0,110 g. DCCI τὸ μῖγμα ἀνεταράχθη ἐπὶ 5 ὥρας εἰς 4° καὶ ἐν συνεχείᾳ

ἀφέθη εἰς συνήθη θερμοκρασίαν. Ἡ ἀποβληθεῖσα δικυκλοεξυλουρία διηθήθη μετὰ 48 ὥρας καὶ εἰς τὸ διήθημα προσετέθη ὕδωρ ὑπὸ ψῦξιν. Ἀπεβλήθη στερεὰ οὐσία, ἡ ὁποία μετὰ διήθησιν καὶ ξήρανσιν διελύθη εἰς 3 ml. διμεθυλοφορμαμιδίου, διηθήθη καὶ κατεβυθίσθη μὲ αἰθέρα. Μετὰ διήθησιν κατηργάσθη μὲ 2 ml. μεθανόλης ἐν θερμῷ. Ἐλήφθησαν 0,160 g. (25 %), Σ. Τ. 217 - 220°, $[\alpha]_D^{23} = -55{,}2^0$ (c 1, διμεθυλοφορμαμίδιον).

Ἀνάλυσις. Διὰ $C_{62}H_{84}N_{12}O_{16}S_2$

Ὑπολ.	C 56,51	H 6,42	N 12,75	S 4,86
Εὑρεθ.	C 56,24	H 6,52	N 12,74	S 4,76

N-ο-Νιτροφαινυλοσουλφενυλο-S-βενζοϋλο-L-κυστεϊνυλο-L-τυροσυλο-L-ισολευκυλο-L-γλουταμινυλο-L-ασπαραγινυλο-S-βενζοϋλο-L-κυστεϊνυλο-L-προλυλο-L-λευκυλο-γλυκιναμίδιον (XI).

Ἐντὸς διαλύματος ὑδροβρωμικοῦ ὀκταπεπτιδίου (0,5 mmole) εἰς 2 ml. διμεθυλοφορμαμιδίου προσετέθησαν μετὰ ψῦξιν, 0,265 g. (5 % περίσσεια) N-ο-νιτροφαινυλοσουλφενυλο-S-κυστεῖνο-p-νιτροφαινυλεστέρος (104). Εἰς τὸ ψυχρὸν διάλυμα προσετέθη ἀμέσως ἡ ἀπαιτουμένη ποσότης τριαιθυλαμίνης, στάγδην. Μετὰ παραμονὴν ἐπὶ 70 ὥρας εἰς συνήθη θερμοκρασίαν, τὸ στερεοποιηθὲν μῖγμα ἠραιώθη δι' ὀξεικοῦ αἰθυλεστέρος καὶ κατηργάσθη ὡς τὸ ἐννεαπεπτίδιον (IX). Ἐλήφθησαν 0,405 g. (60 %) οὐσίας, ἡ ὁποία ἀνεκρυσταλλώθη διὰ διαλύσεως ἐντὸς 2 ml. διμεθυλοφορμαμιδίου ἐν θερμῷ καὶ προσθήκης 10 ml. αἰθανόλης. Σ. Τ. 226 - 229°, $[\alpha]_D^{23} = -56{,}6^0$ (c 1, διμεθυλοφορμαμίδιον).

Ἀνάλυσις. Διὰ $C_{63}H_{79}N_{13}O_{16}S_3$:

Ὑπολ.	C 55,20	H 5,81	N 13,28	S 7,01
Εὑρεθ.	C 55,23	H 6,05	N 13,53	S 6,97

N-Καρβοβενζοξυ-S-καρβοβενζοξυ-L-κυστεϊνυλο-L-τυροσυλο-L-ισολευκυλο-L-γλουταμινυλο-L-ασπαραγινυλο-S-βενζοϋλο-L-κυστεϊνυλο-L-προλυλο-L-λευκυλο-γλυκιναμίδιον (XII).

Ἐντὸς διαλύματος ὑδροβρωμικοῦ ὀκταπεπτιδίου (0,5 mmole) εἰς 2 ml. διμεθυλοφορμαμιδίου προσετέθησαν μετὰ ψῦξιν 0,280 g. (10 % περίσσεια) N,S-δικαρβοβενζοξυ-L-κυστεῖνο-p-νιτροφαινυλεστέρος (113) καὶ μετὰ ταῦτα ἡ ὑπολογισθεῖσα ποσότης τριαιθυλαμίνης στάγδην. Μετὰ παραμονὴν ἐπὶ 18 ὥρας εἰς συνήθη θερμοκρασίαν, τὸ στερεοποιηθὲν μῖγμα ἠραιώθη δι' ὀξεικοῦ αἰθυλεστέρος καὶ κατηργάσθη ὡς τὸ ἐννεαπεπτίδιον (IX). Τὸ ὑπόλειμμα διελύθη εἰς 5 ml. διμεθυλοφορμαμιδίου, διηθήθη καὶ κατεβυθίσθη δι' αἰθέρος. Ἐλήφθησαν 0,44 g. (64 %), Σ. Τ. 224 - 226°. Πρὸς καθα-

ρισμὸν ἡ οὐσία κατηργάσθη διὰ 5ml. μεθανόλης ἐν θερμῷ· $[\alpha]_D^{23} = -60,6^0$ (c 1, διμεθυλοφορμαμίδιον), σ. τήξεως τὸ αὐτό.

'Ανάλυσις. Διὰ $C_{66}H_{84}N_{12}O_{17}S_2$:

Ὑπολ.	C 57,37	H 6,12	N 12,11	S 4,64
Εὑρεθ.	C 57,05	H 6,08	N 12,24	S 4,69

N-Καρβοβε ζοξυ-L-κυστεϊνυλο-L-τυροσυλ-L-ισολευκυλο-L-γλουταμινυλο-L-ασπαραγινυλο-L-κυστεϊνυλο-L-προλυλο-L-λευκυλο-γλυκιναμίδιον(N-καρβοβενζοξυ-οξυτοκεΐνη) (XIII).

Α'. Διὰ μεθανολύσεως.

α) Εἰς αἰώρημα καρβοβενζοξυ-εννεαπεπτιδίου (IX, 0,4 g., 0,3 mmole) ἐντὸς 4 ml. διμεθυλοφορμαμιδίου ὑπὸ μαγνητικὴν ἀνάδευσιν καὶ μετὰ δισβίβασιν ξηροῦ ρεύματος ὑδρογόνου ἐπὶ 10 λεπτά, προσετέθησαν 1,8 ml. 0,5 N μεθοξυλικοῦ νατρίου καὶ 2 ml. ἀπολύτου μεθανόλης. Μετὰ παραμονὴν τοῦ διαλύματος ἐπὶ 15 λεπτά, ὑπὸ συνεχῆ διαβίβασιν ὑδρογόνου, προσετέθησαν 0,75 ml. ὀξεικοῦ ὀξέος, 0,5 ml. μεθανόλης καὶ 100 ml. ψυχροῦ ὕδατος ἐλευθέρου ἀέρος. Τὸ μῖγμα ἐψύχθη ἐπὶ 30 λεπτὰ ἀπουσίᾳ ἀέρος καὶ ἐφυγοκεντρήθη. Τὸ ἴζημα ἐπλύθη δύο φορὰς δι' ὕδατος, παρελήφθη μὲ μεθανόλην καὶ συνεπυκνώθη τρεῖς φορὰς εἰς τὸ κενὸν πρὸς ἀπομάκρυνσιν τοῦ ὕδατος. Ἐν συνεχείᾳ κατηργάσθη ἐντὸς 10 ml. μεθανόλης ἐν θερμῷ, ἐψύχθη, ἐφυγοκεντρήθη καὶ ἐπλύθη μίαν φορὰν διὰ μεθανόλης. Μετὰ ξήρανσιν εἰς 0,1 Torr ἐλήφθησαν 0,3 g. (88%), Σ.Τ. 234 - 235^0, $[\alpha]_D^{25} = -46,4^0$ (c 1, διμεθυλοφορμαμίδιον).

'Ανάλυσις. Διὰ $C_{51}H_{74}N_{12}H_{44}S_2$:

Ὑπολ.	C 53,57	H 6,52	N 14,70	S 5,60
Εὑρεθ.	C 53,71	H 6,43	N 14,79	S 5,48

β) Διὰ μεθανολύσεως 0,1 g. N, S-προστατευμένου-εννεαπεπτιδίου (XII) ὑπὸ τὰς αὐτὰς συνθήκας ἀλλ' ἐπὶ 30 λεπτὰ, ἐλήφθησαν 0,05 g. καρβοβενζοξυ-οξυτοκεΐνης (XIII), Σ.Τ. 232-233^0, $[\alpha]_D = -45,6^0$ (c 1, διμεθυλοφορμαμίδιον).

Β'. Δι' ὑδραζινολύσεως.

Εἰς αἰώρημα N, S-προστατευμένου ἐννεαπεπτιδίου (IX, 0,135 g., 0,1 mmole) ἐντὸς 1,5 ml. διμεθυλοφορμαμιδίου διεβιβάσθη ὑδρογόνον ἐπὶ 7 λεπτά, προσετέθησαν σταγόνες ἀνύδρου ὑδραζίνης (περίπου 5 ἰσοδύναμα) καὶ ἡ φιάλη ἐπωματίσθη ὑπὸ ἀτμόσφαιραν ὑδρογόνου. Μετὰ παραμονὴν ἐπὶ 20 ὥρας εἰς συνήθη θερμοκρασίαν, τὸ διάλυμα ἀπεχύθη ἐπὶ ψυχροῦ ὕδατος ἐλευθέρου ἀέρος καὶ ὠξυνίσθη δι' ὀξεικοῦ ὀξέος. Τὸ μῖγμα μετὰ ψῦξιν

ἐφυγοκεντρήθη, ἐπλύθη δύο φορὰς διὰ ψυχροῦ ὕδατος καὶ ἐξηράνθη. Ἡ οὐσία κατηργάσθη μὲ 2 ml. μεθανόλης ἐν θερμῷ, ἐψύχθη καὶ ἐφυγοκεντρήθη. Ἐλήφθησαν 0,085 g. (75%), Σ. Τ. 230 - 232°, $[\alpha]_D = -46.5^0$ (c 1, διμεθυλοφορμαμίδιον).

Μετατροπὴ τῆς N-καρβοβενζοξυ-οξυτοκεΐνης εἰς N - καρβοβενζοξυ - S,S'-διβενζυλο - εννεαπεπτίδιον (P).

Καρβοβενζοξυ-οξυτοκεΐνη (XIII, 0,06 g.) μετετράπη εἰς S, S' – διβενζυλοπαράγωγον διὰ βενζυλιώσεως ἐντὸς 1 ml.διμεθυλοφορμαμιδίου τῇ προσθήκῃ τριαιθυλαμίνης καὶ 0,4 ml. προσφάτως ἀποσταχθέντος διβενζυλοχλωριδίου, εἰς δύο δόσεις ἐντὸς 5 λεπτῶν. Μετ' ἀνάδευσιν ἐπὶ 40 λεπτὰ προσετέθη ὕδωρ καὶ τὸ προϊὸν ἀπεχωρίσθη διὰ ψύξεως καὶ φυγοκεντρήσεως. Τὸ ἵζημα ἐπλύθη δι' ὕδατος καὶ ἀκετόνης καὶ μετὰ ξήρανσιν, κατηργάσθη ἐν θερμῷ μὲ τετραϋδροφουράνιον 95%. Ἐλήφθησαν 0,05 g., Σ. Τ. 235 - 236° $[\alpha]_D^{19} = -52,5^0$ (c 1, διμεθυλοφορμαμίδιον). Βιβλιογρ. : Σ. Τ. 224 - 225° (73), 241° (82), 237 - 239° (84), 243 - 245° (86α), 245 - 248° (86β), $[\alpha]_D^{24} = -46^0$ (c 0,6, DMF) (84), $[\alpha]_D^{22} = -43^0$ (c 2, DMF) (86), $[\alpha]_D^{20} = -50,5^0$ (c 1, DMF) (86β).

Ἀνάλυσις. Διὰ $C_{65}H_{86}N_{12}O_{14}S_2$:

Ὑπολ.	C 58,98	H 6,55	N 12,70
Εὑρεθ.	C 59,08	H 6,36	N 12,34

t-Βουτυλοξυκαρβονυλο-οξυτοκεΐνη (XIV).

Τὸ N,S-προστατευμένον ἐννεαπεπτίδιον (X, 0,26 g.) ὑπέστη μεθανόλυσιν ὡς τὸ ἀντίστοιχον N-καρβοβενζοξυ-εννεαπεπτίδιον (βλ. XIII). Μετὰ τὴν προσθήκην ὕδατος, ἀπεμακρύνθη ἡ μεθανόλη ὑπὸ κενὸν καὶ μετὰ ἐκχύλισιν δι' ὀξεικοῦ αἰθυλεστέρος ἡ οὐσία ἀπεβλήθη τῇ προσθήκῃ θειϊκοῦ νατρίου. Ἐλήφθησαν 0,1 g. (40 %), Σ. Τ. 224 - 227°.

Ἀνάλυσις. Διὰ $C_{48}H_{76}N_{12}O_{14}S_2$:

Ὑπολ.	C 51,96	H 6,90	N 15,15
Εὑρεθ.	C 51,81	H 6,61	N 15,33

o-Νιτροφαινυλοσουλφενυλο-οξυτοκεΐνη (XV).

Τὸ N, S-προστατευμένον ἐννεαπεπτίδιον (XI, 0,274 g., 0,2 mmole) ὑπεβλήθη εἰς μεθανόλυσιν ἀκριβῶς ὅπως τὸ ἀντίστοιχον καρβοβενζοξυ-εννεα-

πεπτίδιον (βλ.παρασκ.XIII). Τὸ διάλυμα μετὰ τὴν μεθανόλυσιν διηθήθη ἐντὸς ψυχροῦ ὕδατος ἐλευθέρου ἀέρος καὶ τὸ μῖγμα μετὰ ψῦξιν, ἐφυγοκεντρήθη. Μετὰ πλύσιμον δι' ὕδατος κατηργάσθη μὲ 10 ml. μεθανόλης ἐν θερμῷ, ἐψύχθη, ἐφυγοκεντρήθη καὶ ἐπλύθη δύο φορὰς διὰ μεθανόλης. Ἐλήφθησαν 0,150 g. (65 %), Σ. Τ. 213 - 214° μετὰ συρρίκνωσιν εἰς 205°.

Ἀνάλυσις. Διὰ $C_{49}H_{71}N_{13}O_{14}S_3$:

Ὑπολ.	C 50,63	H 6,15	N 15,66	S 8,27
Εὑρεθ.	C 50,58	H 5,98	N 15,33	S 7,74

N-Καρβοβενζοξυ-οξυτοκίνη (XVI).

Ἐντὸς τριλαίμου σφαιρικῆς φιάλης 500 ml. ἐτοποθετήθησαν 100 ml. ἀπολύτου μεθανόλης καὶ 20 ml. διμεθυλοφορμαμιδίου. Ὑπὸ συνεχῆ διαβίβασιν ὑδρογόνου προσετέθησαν στάγδην εἰς διάστημα μιᾶς ὥρας 40 ml. διαλύματος καρβοβενζοξυ-οξυτοκεΐνης (XIII, 0,572 g., 0,5 mmole) ἐντὸς διμεθυλοφορμαμιδίου, συγχρόνως μετὰ 40 ml. δισλύματος προσφάτως ἀνακρυσταλλωθέντος διϊωδοαιθανίου (127), (0,162 g., 15 % περίσσεια) ἐντὸς μεθανόλης. Τὸ διάλυμα συνεπυκνώθη πρὸς ἀπομάκρυνσιν τῆς μεθανόλης εἰς 20 - 25° καὶ τῇ προσθήκῃ ὀξεικοῦ αἰθυλεστέρος ἀπεβλήθη ἡ οὐσία, ἡ ὁποία παρελήφθη μετὰ φυγοκέντρησιν καὶ πλύσιμον δι' ὀξεικοῦ αἰθυλεστέρος. Ἐλήφθησαν 0,340 g. (60 %). Πρὸς καθαρισμὸν ἡ οὐσία διελύθη εἰς 1 ml. διμεθυλοφορμαμιδίου καὶ κατεβυθίσθη διὰ 10 ml. ὀξεικοῦ αἰθυλεστέρος. Μετὰ φυγοκέντρησιν καὶ ξήρανσιν ἐλήφθη ἴζημα, τὸ ὁποῖον κατηργάσθη ἐν θερμῷ μὲ 5 ml. ὀξεικοῦ αἰθυλεστέρος. Ἐλήφθησαν 0,310 g. (55 %), Σ. Τ. ἀσαφὲς 220-227°, μετὰ συρρίκνωσιν εἰς 165°. Τὸ προϊὸν τοῦτο ἐχρησιμοποιήθη περαιτέρω διὰ τὴν παρασκευὴν τῆς ὀξυτοκίνης. $[\alpha]_D^{20} = -76,8°$ (c 0,5 διμεθυλοφορμαμίδιον).

Διὰ μικροανάλυσιν μία ποσότης διελύθη εἰς διμεθυλοφορμαμίδιον, κατεβυθίσθη δι' ὕδατος καὶ μετὰ φυγοκέντρησιν, πλύσιμον δι' ἀκετόνης καὶ ὀξεικοῦ αἰθυλεστέρος, διελύθη ἐκ νέου εἰς διμεθυλοφορμαμίδιον καὶ κατεβυθίσθη δι' ἀκετόνης. Ἀνεκτήθη κατὰ 70 %, Σ. Τ. 225 - 226° μετὰ συρρίκνωσιν εἰς 175°, $[\alpha]_D^{30} = -78°$ (c 0,5 διμεθυλοφορμαμίδιον).

Ἀνάλυσις. Διὰ $C_{51}H_{72}N_{12}O_{14}S_2$:

Ὑπολ.	C 53,67	H 6,36	N 14,71	S 5,61
Εὑρεθ.	C 53,32	H 6,76	N 14,61	S 5,57

Ὀξυτοκίνη.

α) N-Καρβοβενζοξυ-οξυτοκίνη (0,266 g.) καλῶς κονιοποιημένη, διελύθη εἰς 2 ml. 2,5 N προσφάτου καὶ ἐλευθέρου βρωμίου, διαλύματος ὑδροβρω-

μίου ἐντὸς ὀξεικοῦ ὀξέος. Μετὰ παραμονὴν ἐπὶ 40 λεπτὰ εἰς συνήθη θερμοκρασίαν, τὸ διάλυμα προσετέθη εἰς ψυχρὸν ξηρὸν αἰθέρα. Ὁ αἰθὴρ ἀπεχύθη 4 φορὰς καὶ τὸ ἴζημα, μετὰ ξήρανσιν εἰς ξηραντῆρα κενοῦ ὑπεράνω P_2O_5 καὶ KOH, διελύθη εἰς 50 ml. τῆς κάτω φάσεως μίγματος διαλυτικῶν, εἰς τὸ ὁποῖον εἶχον προστεθῆ ὀλίγαι σταγόνες 2 N ἀμμωνίας. Τὸ χρησιμοποιηθὲν διφασικὸν μῖγμα διαλυτικῶν (128) περιεῖχεν 1 - βουτανόλην, 1-προπανόλην καὶ ὕδωρ περιέχον 0,5 $^0/_0$ ὀξεικὸν ὀξὺ καὶ 0,1 $^0/_0$ πυριδίνην (6:1:8 V/V). Τὸ διάλυμα τοῦ παρασκευάσματος (50 ml. ὡς ἀνωτέρω καὶ ἕτερα 50 ml. πρὸς ἔκπλυσιν τῆς φιάλης) ἐτοποθετήθη εἰς τοὺς 10 πρώτους σωλῆνας ἐκ τῶν 200, συσκευῆς κατανομῆς κατ' ἀντιρροὴν Craig-Post διὰ τῆς ὁποίας ἐγένοντο 400 μεταφοραί. Μετὰ 100, 200 καὶ 400 μεταφορὰς ἐλήφθησαν διὰ σύριγγος τοῦ ἑνὸς ml. δείγματα 0,2 ml. ἐκ τῆς κάτω φάσεως ἑκάστου πέμπτου σωλῆνος τῆς συσκευῆς. Μετ' ἀνάπτυξιν χρώματος κατὰ τὴν μέθοδον Folin - Lowry (129) ἐμετρήθη ἡ ὀπτικὴ πυκνότης εἰς 700 mμ εἰς χρωματόμετρον Coleman καὶ ἡ καμπύλη κατανομῆς (βλ. σχ. 6) ἐσχεδιάσθη μὲ τεταγμένας τὴν ἀναγνωσθεῖσαν ὀπτικὴν πυκνότητα τοῦ δείγματος καὶ τετμημένας τὸν ἀριθμὸν τοῦ σωλῆνος τῆς συσκευῆς.

Τὰ σημεῖα τῆς θεωρητικῆς καμπύλης ὑπελογίσθησαν (9) ἐκ τοῦ τύπου : $\psi = Ae^{\frac{-x^2}{B}}$, ὅπου $B = 2nK/(K+1)^2$, A ἡ ὀπτικὴ πυκνότης τοῦ μεγίστου ἴση πρὸς 0,148, ἐὰν ὡς μέγιστον ληφθῆ ὁ σωλὴν ὑπ' ἀρ. 135, x ἡ διαφορὰ τοῦ ἀριθμοῦ τοῦ σωλῆνος τοῦ ὁποίου ἡ περιεκτικότης ὑπολογίζεται ἀπὸ τοῦ ἀριθμοῦ τοῦ σωλῆνος τοῦ μεγίστου, π.χ. 5, 10, 15 κλπ., n ὁ ἀριθμὸς μεταφορῶν ἴσος πρὸς 400 καὶ K ὁ συντελεστὴς κατανομῆς τῆς ὀξυτοκίνης ὑπολογιζόμενος (βλ. σελ. 55) ἐκ τῆς σχέσεως : $\frac{135}{400 - 135} = 0,5$.

Μετὰ τὴν ἐκτέλεσιν τῶν 400 μεταφορῶν τὸ περιεχόμενον τῶν σωλήνων 120 - 155 συνεκεντρώθη διὰ σύρριγγος καὶ τὸ προϊὸν συνεπυκνώθη πρὸς ἐκδίωξιν τῶν ὀργανικῶν διαλυτικῶν εἰς συσκευὴν ταχείας ἀποστάξεως (flash-evaporator) καὶ εἰς ὑψηλὸν κενὸν 0,1-0,5 Torr. Ἡ ἐξωτερικὴ θερμοκρασία τοῦ πρὸς συμπύκνωσιν ὑγροῦ δὲν ὑπερέβη τοὺς 15 - 18^0 C, ἐνῷ ὁ ὑποδοχεὺς καὶ δύο παγῖδες πρὸ τῆς ἀντλίας, ἐψύχοντο διὰ μίγματος ξηροῦ πάγου - ἀκετόνης. Προσετέθη ὕδωρ 2 - 3 φορὰς καὶ συνεπυκνώθη ἐκ νέου. Ἐκ τοῦ ἀπομείναντος ὑδατικοῦ διαλύματος, τὸ ὕδωρ ἀπεμακρύνθη διὰ λυοφιλοποιήσεως. Τοιουτοτρόπως ἐλήφθησαν 65 mg. ὀξυτοκίνης ὑπὸ μορφὴν λευκοῦ, ἐλαφροτάτου καὶ ὡς ἐκ τούτου ὀγκώδους ὑλικοῦ. Πρὸς πιστοποίησιν τῆς ταυτότητος τῆς ὀξυτοκίνης ἐγένετο, ἐκτὸς τοῦ βιολογικοῦ ἐλέγχου (βλ. θεωρητικὸν μέρος), ἔλεγχος διὰ τῶν κάτωθι μεθόδων :

Χρωματογραφία ἐπὶ λεπτῆς στιβάδος (βλ. εἰσαγωγὴν πειραματικοῦ) καὶ ἐμφάνισις διὰ νινυδρίνης, παραλλήλως πρὸς δεῖγμα καθαρᾶς ὀξυτο-

κίνης du Vigneaud (βλ. θεωρητικὸν) ἔδειξεν τὰ αὐτὰ Rf, ἤτοι :

α) Εἰς τὸ σύστημα ὑπ' ἀρ. 1 ἔδειξε μίαν κηλίδα κιτρίνην, Rf 0,25.

β) Εἰς τὴν ἄνω φάσιν τοῦ συστήματος 1-βουτανόλη, ὀξεικὸν ὀξύ, ὕδωρ (4:1:5) ἔδειξεν ὁμοίως μίαν κηλίδα, Rf 0,51, ἐνῶ χρωματογραφία ἐπὶ χάρτου Whatman No 4 εἰς τὸ αὐτὸ σύστημα ἔδειξε μίαν κηλίδα, Rf 0,18.

Ἠλεκτροφόρησις ἐπὶ χάρτου Schleicher & Schüll 2043-B, ἐπίσης ἐν συγκρίσει καὶ εἰς μῖγμα μετὰ δείγματος ὀξυτοκίνης du Vigneaud, ἔδειξε μίαν λωρίδα πρὸς τὴν κάθοδον μετὰ ἐμφάνισιν δι' ἀντιδραστηρίου βρωμοφαινόλης - $HgCl_2$ (138). Ἡ ἠλεκτροφόρησις ἐγένετο ὑπὸ τὰς κάτωθι συνθήκας :

α) Εἰς ρυθμιστικὸν διάλυμα ὀξεικοῦ ὀξέος-πυριδίνης pH 5,6, 80 V ἐπὶ 16 ὥρας.

β) Εἰς ρυθμιστικὸν διάλυμα ὀξεικοῦ ὀξέος-πυριδίνης pH 4, 300 V ἐπὶ 4 ὥρας καὶ 45 λεπτά.

γ) Εἰς ρυθμιστικὸν διάλυμα γλυκίνης pH 9,25, 300 V, ἐπὶ 2 ὥρας.

Ἀνάλυσις ἀμινοξέων. Αὕτη ἐγένετο μετὰ ὑδρόλυσιν δι' ὀξέος καὶ χρωματογραφίαν κατὰ δύο διαστάσεις, ὡς περιγράφεται εἰς τὴν εἰσαγωγὴν τοῦ πειραματικοῦ. Τὸ αὐτὸ ἀποτύπωμα (fingerprint) ὡς πρὸς τὴν θέσιν, χρῶμα καὶ ἔντασιν τῶν κηλίδων τῶν ἀμινοξέων ἐλήφθη καὶ δι' ὑδρολύσεως ὀξυτοκίνης du Vigneaud, ὡς καὶ μίγματος ἰσομοριακῶν ποσοτήτων τῶν συνιστώντων ἀμινοξέων.

Εἰδικὴ στροφικὴ ἱκανότης. Αὕτη εὑρέθη ἴση πρὸς $[\alpha]_D^{24} = -24{,}0^0$ (c 0,5 εἰς N ὀξεικὸν ὀξύ). Βιβλιογρ. : $[\alpha]_D^{22,5} = -23{,}1^0$ (c 0,51, N ὀξ. ὀξύ) (139).

Στοιχειακὴ ἀνάλυσις. Πρὸς μικροανάλυσιν, ζυγισθεῖσα ποσότης ὀξυτοκίνης ἐξηράνθη εἰς $90-105^0$ εἰς 0,1 Torr μέχρι σταθεροῦ βάρους. Ἀπώλεια βάρους 6 %.

Ἀνάλυσις. Διὰ $C_{43}H_{66}N_{12}O_{12}S_2$, CH_3COOH, H_2O:

Ὑπολ.	C 49,80	H 6,68	N 15,48
Εὑρεθ.	C 50,03	H 6,73	N 15,44

Χρωματογραφία κατανομῆς ἐπὶ Sephadex.

Ἐχρησιμοποιήθη στήλη[1] διαστάσεων 1,1×112 cm καὶ Sephadex G-25. Διὰ τὴν ἑτοιμασίαν τῆς στήλης ὡς καὶ διὰ τὴν χρωματογραφίαν τῆς ὀξυτοκίνης ἠκολουθήθησαν αἱ ὁδηγίαι τῆς βιβλιογραφίας (133). Ἡ στήλη

[1] Ἡ στήλη αὕτη ὡς καὶ ἕτεραι, μεγαλυτέρων διαστάσεων, κατεσκευάσθησαν εἰς τὸ ὑαλουργεῖον τοῦ Κέντρου Πυρηνικῶν Ἐρευνῶν «Δημόκριτος».

ἐπλύθη διὰ τῆς κάτω φάσεως καὶ ἐν συνεχείᾳ διὰ τῆς ἄνω φάσεως τοῦ συστήματος 1-βουτανόλη, βενζόλιον, πυριδίνη, 0,1 %, ὀξεικὸν ὀξὺ (6 : 2 : 1:9 V/V). Ὀξυτοκίνη (14 mg). ἀπομονωθεῖσα μετὰ κατανομὴν κατ' ἀντιρροὴν ὡς ἀνωτέρω, διελύθη εἰς 1 ml. ἄνω φάσεως καὶ ἐτοποθετήθη ἐπὶ τῆς στήλης· ἡ ἔκλουσις ἐγένετο ἐπίσης διὰ τῆς ἄνω φάσεως (133). Συνελέγησαν 137 κλάσματα, 1,5 ml. ἕκαστον, δι'αὐτομάτου μηχανικοῦ συλλέκτου κλασμάτων. Ἡ περιεκτικότης εἰς ἕκαστον δεύτερον κλᾶσμα προσδιωρίσθη ὁμοίως διὰ τῆς μεθόδου Folin-Lowry. Ἐκ τῶν προσδιορισμῶν τούτων προέκυψεν μία μόνον καὶ συμμετρικὴ καμπύλη (βλ. σχ. 8), ἐκ τῆς ὁποίας ὑπελογίσθη (134) τὸ Rf τῆς ὀξυτοκίνης ἴσον πρὸς 0,27. [Βιβλιογρ. (133) : Rf 0,24, διὰ τὸ αὐτὸ σύστημα διαλυτικῶν καὶ στήλην μὲ παραπλησίας διαστάσεις]. Ἐκ τῶν κλασμάτων 65 - 85 ἀνεκτήθησαν 9,5mg. ὀξυτοκίνης. Τ' ἀποτελέσματα χρωματογραφίας ἐπὶ λεπτῆς στιβάδος, ἠλεκτροφορήσεως ἐπὶ χάρτου καὶ ἀναλύσεως ἀμινοξέων, ὡς καὶ ὁ βιολογικὸς ἔλεγχος (βλ. θεωρητικὸν) ἔδειξαν ὅτι τὸ προϊὸν δὲν μετεβλήθη.

β) N-Καρβοβενζοξυ - οξυτοκεΐνη (0,154 mg.) κονιοποιημένη, διελύθη εἰς 2ml. 2,5 N προσφάτου καὶ ἐλευθέρου βρωμίου, ὑδροβρωμίου ἐντὸς ὀξεικοῦ ὀξέος. Μετὰ 30 λεπτὰ προσετέθη ψυχρός, ξηρὸς αἰθὴρ (100 ml.). Ὁ αἰθὴρ ἀπεχύθη ἐπανειλημμένως καὶ τὸ ὑδροβρωμικὸν ἅλας μετὰ ξήρανσιν ὑπὸ κενὸν διελύθη εἰς 150 ml. ὕδατος ἐλευθέρου ἀέρος, εἰς τὸ ὁποῖον προσετέθησαν ὀλίγαι σταγόνες 2 N ἀμμωνίας. Τὸ pH ἐρυθμίσθη εἰς 6,9 δι' ὀξεικοῦ ὀξέος καὶ διὰ τοῦ διαλύματος διεβιβάσθη ρεῦμα ἀέρος μέσῳ πλυντρίδων θειϊκοῦ ὀξέος, 25 % NaOH καὶ ὕδατος. Ἡ ὀξείδωσις ἐσυνεχίσθη ἐπὶ 5 ὥρας. Μετὰ μετατροπὴν τοῦ pH εἰς 4 δι' ὀξεικοῦ ὀξέος, τὸ μῖγμα συνεπυκνώθη καὶ ὑπεβλήθη εἰς κατανομὴν κατ' ἀντιρροὴν ὡς εἰς τὸ (α). Ἐκ τῆς κυρίας καμπύλης ἐλήφθησαν μετὰ τὴν ἐκτέλεσιν 388 μεταφορῶν καὶ ἐκ τῶν σωλήνων 110 - 150, 30 mg. ὀξυτοκίνης. Τὸ παρασκεύασμα τοῦτο δεικνύει τὴν αὐτὴν συμπεριφορὰν ὡς τὸ (α) εἰς χρωματογραφίαν ἐπὶ λεπτῆς στιβάδος, ἠλεκτροφόρησιν ἐπὶ χάρτου, ἀνάλυσιν ἀμινοξέων, ὡς καὶ ἀνάλογον βιολογικὴν δραστικότητα.

ΓΕΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

J. P. Greenstein καὶ M. Winitz, Chemistry of the Amino Acids, Vol. 1 - 3, John Wiley & Sons, Inc., New York, London (1961).

M. Bergmann καὶ L. Zervas, Eiweisstoffe εἰς Hanbuch der Pflanzenanalyse, Prof. Klein, Bd. II, 299 (1933).

P. Karrer, Lehrbuch der Organischen Chemie, 13η ἔκδοσις (1959).

L. F. Fieser καὶ M. Fieser, Topics in Organic Chemistry, Rheinhold Publishing Corp., New York (1963).

J. S. Fruton καὶ S. Simmonds, General Biochemistry, John Wiley & Sons, Inc., New York (1958).

V. du Vigneaud, A Trail of Research in Sulfur Chemistry and Metabolism and related fields, Cornell University Press, Ithaca, N.Y. (1952).

V. du Vigneaud, Experiences in the Polypeptide Field : Insulin to Oxytocin, Annals of the New York Academy of Sciences, **88**, 537 (1960).

R. Caldeyro-Barcia and H. Heller, eds., «Oxytocin», Pergamon Press, New York (1961).

Γ. Ἰωακείμογλου, Φαρμακολογία καὶ Συνταγολογία, Ἀθῆναι (1954).

Π. Γ. Κατσόγιαννη, Ὁρμόναι τοῦ ὀπισθίου λοβοῦ τῆς ὑποφύσεως, Χημικὰ Χρονικά, **23 A**, 242 (1958).

Advances in Protein Chemistry, Vol. 1 - 18, Academic Press Inc., N.Y.

The Proteins, Vol. I, II, eds., H. Neurath and K. Bailey, Academic Press Inc., New York, N.Y.

Annual Reports on the Progress of Chemistry, The Chemical Society, London.

J. S. Fruton, The Synthesis of Peptides, εἰς Advances in Protein Chemistry, Vol. V, 1 (1949).

M. Goodman καὶ G. W. Kenner, The Synthesis of Peptides εἰς Advances in Protein Chemistry, Vol. XII, 465 (1957).

Th. Wieland et al , Methoden zur Herstellung und Umwandlung von Aminosäuren und Derivaten, εἰς Houben-Weyl : Methoden der organischen Chemie, Bd. XI/2, 271, G. Thieme Verlag, Stuttgart (1959).

E. Bricas, Acquisitions récentes dans le domaine de la synthèse des peptides, Bulletin de la Société Chimique de France, σελ. 2001 (1961).

R. A. Boissonnas, St. Guttmann, B. Berde καὶ H. Konzett, Relationships between the Chemical Structures and the Biological Properties of the Posterior Pituitary Hormones and their Synthetic Analogues, Experientia, **17**, 377 (1961).

R. Schwyzer, Recent Synthetic Developments in the Field of Polypeptide Hormones, εἰς Protides of the Biological Fluids, σελ. 27, Elsevier Publ. Corp., Amsterdam (1961).

R. Schwyzer, Structure-activity Relationship among physiologically Active Polypeptides, Proceedings of the First International Pharmacological Meeting, Vol. 7, 203, Pergamon Press (1963).

H. N. Rydon, Peptide Synthesis, The Royal Institute of Chemistry, Lecture series No. 5, London, (1962).

J. Meienhofer, Synthesen biologisch wirksamer Peptide, Chimia, **16**, 385 (1962).

K. Hofmann καὶ P. G. Katsoyannis, Synthesis and Function of Peptides of Biological Interest, εἰς The Proteins, Vol. I, 53 (1963).

M. Brenner, Peptide, Zeitschrift für naturwissenschaftlich-medizinische Grundlagenforschung, Vol. 1, 169 (1963).

J. Rudinger, Organic Chemistry in Peptide Synthesis, Pure and applied Chemistry, Vol. 7, 335 (1963).

R. C. Sheppard, Amino-Acids and Peptides, εἰς Annual Reports of the Chemical Society, Vol. 60, 448 (1963).

ΕΙΔΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. G. Oliver καὶ E. A. Schäfer, J. Physiol. (London), **18**, 277 (1895).
2. W. H. Howell, J. Exptl. Med., **3**, 245 (1898).
3. H. H. Dale, J. Physiol. (London), **34**, 163 (1906).
4. L. Ott καὶ J. C. Scott, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **8**, 48 (1910).
5. D. N. Paton καὶ A. Watson, J. Physiol. (London), **44**, 413 (1912).
6. R. von den Velden, Klin. Wochschr., **50**, 2083 (1913).
7. O. Kamm, T. B. Aldrich, I. W. Grote, L. W. Rowe καὶ E. P. Bugbee, J. Am. Chem. Soc., **50**, 573 (1928).
8. A. H. Livermore καὶ V. du Vigneaud, J. Biol. Chem., **180**, 365 (1949).
9. L. C. Craig, J. Biol. Chem., **155**, 519 (1944)· L. C. Craig καὶ D. Craig, εἰς A. Weissberger «Technique of Organic Chemistry», Vol. III, σελ. 171, Interscience Publ. New York, 1950· L. C. Craig καὶ O. Post, Anal. Chem., **21**, 500 (1949).
10. S. Moore καὶ W. H. Stein, J. Biol. Chem. **178**, 53 (1949)· D. H. Spackman, W. H. Stein καὶ S. Moore, Anal. Chem., **30**, 1190 (1958).
11. J. G. Pierce καὶ V. du Vigneaud, J. Biol. Chem., **182**, 359 (1950).
12. J. G. Pierce, S. Gordon καὶ V. du Vigneaud, J. Biol. Chem., **199**, 929 (1952).
13. J. G. Pierce καὶ V. du Vigneaud, J. Biol. Chem., **186**, 77 (1950).
14. F. Sanger, Biochem. J., **39**, 507 (1945)· F. Sanger καὶ H.Tuppy, ibid., **49**, 463 (1951).
15. P. Edman, Acta Chem. Scand., **4**, 277, 283 (1950).
16. R. L. Hill καὶ E. L. Smith, J. Biol. Chem., **228**, 577 (1957).
17. M. Bergmann καὶ L. Zervas, J. Biol. Chem., **113**, 341 (1936).
18. P. Schlack καὶ W. Kumpf, Z. Physiol. Chem., **154**, 125 (1926)· S. G. Waley καὶ J. Watson, J. Chem. Soc., 2394 (1951).
19. H. Fraenkel - Conrat, J. I. Harris καὶ A. L. Levy, Methods Biochem. Analy., **2**, 359 (1955).
20. H. Zuber, Chimia, **14**, 405 (1960).
21. J. Muller, J. G Pierce καὶ V. du Vigneaud, J. Biol. Chem., **204**, 857 (1953).
22. C. Ressler, S. Trippett καὶ V du Vigneaud, J. Biol. Chem. **204**, 861 (1953).
23. J. M. Muller, J. G. Pierce, H. Davoll καὶ V. du Vigneaud, J. Biol. Chem., **191**, 309 (1951).
24. H. Davoll, R. A. Turner, J. G. Pierce καὶ V. du Vigneaud, J. Biol. Chem., **193**, 363 (1951).
25. H. G. Kunkel, S. P. Taylor, Jr. καὶ V. du Vigneaud, J. Biol. Chem., **200**, 559 (1953).
26. V. du Vigneaud, C. Ressler καὶ S. Trippett, J. Biol. Chem., **205**, 949 (1954).
27. S. P. Taylor, Jr. καὶ V du Vigneaud, ἀδημοσίευτα ἀποτελέσματα.
28. S. P. Taylor, Jr., V. du Vigneaud καὶ H. G. Kunkel, J. Biol. Chem., **205**, 45 (1953).
29. H. Tuppy, Biochim. et Biophys. Acta **11**, 449 (1954)· H. Tuppy καὶ H. Michl, Monatsh., **84**, 1011 (1953)

30. M. Bergmann καὶ L. Zervas, Ber., **65**, 1192 (1932).
31. M. Bergmann καὶ L. Zervas, German Patent 556,798 (1932).
32. M. Goodman καὶ G. W. Kenner, Advan. Protein Chem., Vol. **12**, Academic Press Inc. New York, N. Y. (1957), σελ. 468.
33. K. Hoffmann, E. Stutz, G. Spuhler, H. Yazima καὶ E.T. Schwarz, J. Am. Chem. Soc., **82**, 3727 (1960)· B. Bezas καὶ L. Zervas, J. Am. Chem. Soc., **83**, 719 (1961)· R. Schwyzer καὶ W. Rittel, Helv. Chim. Acta, **44**, 159 (1961).
34. L. Zervas, T. Otani, M. Winitz καὶ J. Greenstein, J. Am. Chem. Soc., **81**, 2878 (1959)· L. Zervas, M. Winitz καὶ J. P. Greenstein, J. Am. Chem. Soc., **83**, 3300 (1961)· C. Gross, M. P. de Garilhe, A. Costopanagiotis καὶ R. Schwyzer, Helv. Chim. Acta, **44**, 2042 (1961).
35. R. H. Sifferd καὶ V. du Vigneaud, J. Biol. Chem., **108**, 753 (1935).
36. H. N. Rydon, Peptide Synthesis, The Royal Institute of Chemistry, London, σελ. 24, (1962).
37. D. Ben-Ishai καὶ A. Berger, J. Org. Chem., **17**, 1564 (1952)· D. Ben-Ishai, ibid., **19**, 62 (1954).
38. F. Weygand καὶ W. Steglich, Z. Naturforsch., **14b**, 4726 (1959).
39. M. Bergmann, L. Zervas, H. Schleich καὶ F. Leinert, Z. Physiol. Chem. Hoppe-Seyler's, **212**, 72 (1932).
40. M. Bergmann, L. Zervas καὶ H. Schleich, Ber., **65**, 1747 (1932).
41. M. Bergmann καὶ L. Zervas, Z. Physiol. Chem. Hoppe-Seyler's, **224**, 11 (1934).
42. M. Bergmann, L. Zervas, L. Salzmann καὶ H. Schleich, Z. Physiol. Chem. Hoppe-Seyler's, **224**, 17 (1934).
43. M. Bergmann, L. Zervas, H. Rinke καὶ H. Schleich, Z. Physiol. Chem. Hoppe-Seyler's, **224**, 26 (1934).
44. M. Bergmann, L. Zervas, H. Rinke καὶ H. Schleich, Z. Physiol. Chem. Hoppe-Seyler's, **224**, 33 (1934).
45. M. Bergmann, L. Zervas καὶ H. Schleich, Z. Physiol. Chem. Hoppe-Seyler's, **224**, 52 (1934).
46. M. Bergmann, L. Zervas, J. S. Fruton, F. Schneider καὶ H. Schleich, J. Biol. Chem., **109**, 325 (1935).
47. M. Bergmann, L. Zervas καὶ J. S. Fruton, J. Biol. Chem., **111**, 224 (1935).
48. M. Bergmann, L. Zervas καὶ W. F. Ross, J. Biol. Chem., **111**, 244 (1935).
49. M. Bergmann καὶ L. Zervas, J. Biol. Chem., **114**, 711 (1936).
50. M. Bergmann, L. Zervas καὶ J. S. Fruton, J. Biol. Chem., **115**, 111 (1936).
51. J. S. Fruton καὶ S. Simmonds εἰς General Biochemistry, σελ. 684, John Wiley & Sons, Inc. New York, 1958.
52. R. Schwyzer καὶ P. Sieber, Nature **199**, 172 (1963)· «Pertides : Proceedings of the Sixth European Peptide Symposium, Athens 1963», ed. L. Zervas, Pergamon Press, Oxford 1964, ὑπὸ ἐκτύπωσιν.
53. R. A. Boissonnas, S. Guttmann καὶ P. - A. Jaquenoud, Helv. Chim. Acta **43**, 1349 (1960).
54. K. Vogler, R. O. Studer, P. Lanz, W. Lergier καὶ E. Bohni, Experientia **20**, 365 (1964).
55. P. G. Katsoyannis, A. Tometsko καὶ K. Fukuda, J. Am. Chem. Soc., **85**, 2863 (1963) ; Chem. Eng. News, **41**, 45 (1963).

56. J. Meienhofer, E. Schnabel, H. Bremer, O. Brinkhoff, R. Zabel, W. Sroka, H. Klostermeyer, D. Bradenburg, T. Okuda και H. Zahn, Z. Naturforsch., **18**b, 1120 (1963).
57. R. Schoenheimer, Z. Physiol. Chem., **154**, 203 (1962).
58. V. du Vigneaud και O. K. Behrens, J. Biol. Chem., **117**, 27 (1937).
59. V. du Vigneaud, L. F. Audrieth και H. S. Loring, J. Biol. Chem., **87**, xx(1930)· J. Am. Chem. Soc., **52**, 4500 (1930).
60. H. S. Loring και V. du Vigneaud, J. Biol. Chem., **111**, 385 (1935).
61. V. du Vigneaud και G. L. Miller, J. Biol. Chem., **116**, 469 (1936).
62. Th. Curtius, Ber., **35**, 3226 (1902).
63. M. B. North και G. T. Young, Chem. & Ind., 1957 (1955)· N. A. Smart, G. T. Young και M. W. Williams, J. Chem. Soc., 3902 (1960).
64. Th. Wieland και R. Sehring, Ann. Chem., **569**, 122 (1950)· Th. Wieland και H. Bernhard, Ann., **572**, 190 (1951).
65. R. A. Boissonnas, Helv. Chim. Acta, **34**, 874 (1951).
66. J. R. Vaughan, Jr., J. Am. Chem. Soc., **73**, 3547 (1951)· J. R. Vaughan και R. L. Osato, J. Am. Chem. Soc., **73**, 5553 (1951).
67. G. W. Anderson, J. Blodinger και A. D. Welcher, J. Am. Chem. Soc., **74**, 5309 (1952).
68. J. C. Sheehan και G. P. Hess, J. Am. Chem. Soc., **77**, 1067 (1955).
69. Th. Wieland, W. Schäfer και E. Bokelmann, Ann. Chem., **573**. 99 (1951).
70. R. Schwyzer, B. Iselin και M. Feurer, Chimia, **8**, 264 (1954)· Helv. Chim. Acta, **38**, 69 (1955).
71. M. Bodanszky, Nature, **175**, 685 (1955).
72. D. F. Elliot και D. W. Russel, Biochem. J., **66**, 49P (1957).
73. V. du Vigneaud, C. Ressler, J. M. Swan, C. W. Roberts, P. G. Katsoyannis και S. Gordon, J. Am. Chem. Soc., **75**, 4879 (1953)· V. du Vigneaud, C. Ressler, J. M. Swan, C. W. Roberts και P. G. Katsoyannis, J. Am. Chem. Soc., **76**, 3115 (1954).
74. R. R. Sealock και V. du Vigneaud, J. Pharmacol. Exptl. Therap., **54**, 433 (1935).
75. S. Gordon και V. du Vigneaud, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **84**, 723 (1953).
76. N. Izumiya και J. P. Greenstein, Arch. Biochem. Biophys., **52**, 203 (1954)· R. Wade, M. Winitz και J. P. Greenstein, J. Am. Chem. Soc., **78**, 373 (1956).
77. J. M. Coon, Arch. Intern. Pharmacodynamie, **62**, 79 (1939)· R. A. Munsick, W. H. Sawyer και H. B. van Dyke, Endocrinology, **66**, 860 (1960).
78. J. H. Burn, D. J. Finney, L. G. Goodurin, Biological Standardization ,Oxford Univ. Press, New York, σελ. 180 (1950)· P. Holton, Brit. J. Pharmacol., **3**, 328 (1948)· R. A. Munsick, Endocrinology, **66**, 451 (1960).
79. K. Nickerson, R. W. Bonsnes, R. G. Douglas, P. Condliffe και V. du Vigneaud, Am. J. Obstet. Gynecol., **67**, 1028 (1954)· B. A. Cross και G. W. Harris, J. Endocrinol., **8**, 148 (1952)· H. B. van Dyke, K. Adamsons, Jr. και S. L. Engel, Recent Progr. Hormone Res., **11**, 1 (1955).
80. «The Pharmacopeia of the United States of America» rev. 14, σελ. 475, Mack Printing Co., Easton, Pa., (1950).
81. W. Y. Chan και V. du Vigneaud, Endocrinology, **71**, 977 (1962).
82. R. A. Boissonnas, S. Guttmann, P. - A. Jaquenoud και J. P. Waller, Helv. Chim. Acta, **38**, 1491 (1955).

83. J. Rudinger, J. Honzl καὶ M. Zaoral, Coll. Czech. Chem. Comm., **21**, 202 (1956).
84. C. H. Beyerman, J. S. Bontekoe καὶ A. C. Koch, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas, **78**, 935 (1959).
85. L. Velluz, G. Amiard, J. Bartos, B. Goffinet καὶ R. Heymès, Bull. Soc. Chim. France, 1464 (1956).
86. a) M. Bodanszky καὶ V. du Vigneaud, J. Am. Chem. Soc., **81**, 2504 (1959)· b) ibid., **81**, 5688 (1959).
87. V. du Vigneaud, M. F. Bartlett καὶ A. Jöhl, J. Am. Chem. Soc., **79**, 5572 (1957)· V. du Vigneaud, D. T. Gish, P. G. Katsoyannis καὶ G. P. Hess. ibid., **80**, 3355 (1958).
88. J. Meienhofer, Chimia, **16**, 388 (1962).
89. S. Guttmann καὶ R. A. Boissonnas, Helv. Chim. Acta, **43**, 200 (1960).
90. V. du Vigneaud, G. Winestock, V. V. S. Murti, D. B. Hope καὶ R. D. Kimbrough Jr., J. Biol. Chem., **235**, PC 64 (1960)· D. B. Hope, V. V. S. Marti καὶ V. du Vigneaud, ibid., **237**, 1563 (1962).
91. V. du Vigneaud, P. S. Fitt, M. Bodanszky καὶ M. O'Connell, Proc. Soc. Exper. Biol. Med., **104**, 653 (1960).
92. C. Ressler, Proc. Soc. Exper. Biol. Med. **92**, 725 (1956)· B. Iselin καὶ M. Feurer, βλ. R. Schwyzer, Chimia, **12**, 53 (1958).
93. V. du Vigneaud, I. Photaki καὶ B. Ferrier, ἀδημοσίευτα ἀποτελέσματα.
94. K. Jost, J. Rudinger καὶ F. Sorm, Coll. Czech. Chem. Comm., **26**, 2496 (1961).
95. S. Guttmann, P.-A. Jaquenoud καὶ R. A. Boissonnas, Naturwiss. **44**, 632 (1957).
96. D. Jarvis, M. Bodanszky καὶ V. du Vigneaud, J. Am. Chem. Soc., **83**, 4780 (1961).
97. S. Drabarek καὶ V. du Vigneaud «Peptides : Proceedings of the Sixth European Peptide Symposium Athens 1963», ed. L. Zervas, Pergamon Press, Oxford 1964 ὑπὸ ἐκτύπωσιν.
98. I. Photaki καὶ V. du Vigneaud, «Peptides: Procceedings of the Sixth European Peptide Symposium, Athens 1963», ed.L. Zervas, Pergamon Press, Oxford 1964, ὑπὸ ἐκτύπωσιν· J. Am. Chem. Soc., January (1965).
99. J. Rudinger καὶ K. Jost, Experientia **20**, 570 (1964).
100. K. Hofmann καὶ H. Hazima, J. Am. Chem Soc., **83**, 2289 (1961).
101. S. Guttmann, «Peptides : Proceedings of the Fifth European Peptide Symposium» ed. G. T. Young, Pergamon Press, Oxford 1963, σελ 41.
102. S. Guttmann καὶ R. A. Boissonnas, Helv. Chim. Acta, **42**, 1257 (1959)· J. A. Stekol, J. Biol. Chem , **140**, 827 (1941)· C.A.Dekker, S.P.Taylor καὶ J.S.Fruton, J. Biol. Chem., **180**, 155 (1949)· M Brenner καὶ R. W. Pfister, Helv. Chim. Acta, **34**, 2085 (1951).
103. L. Zervas, D. Borovas καὶ E. Gazis, J. Am. Chem. Soc., **85**, 3660 (1963).
104. L Zervas καὶ Ch. Hamalidis, J. Am. Chem. Soc., January (1965).
105 F. C. McKay καὶ N. F. Albertson, J. Am. Chem. Soc., **79**, 4686 (1957)· G. W. Anderson καὶ A. C. McGregor, ibid., **79**, 6180 (1957)· R. Schwyzer, P. Sieber καὶ H. Kappeler, Helv. Chim. Acta, **42**, 2622 (1959)· L. A. Carpino, J. Am. Chem. Soc., **79**, 98 (1957)· **81**, 955 (1959)· **82**, 2725 (1960).
106. A. Cosmatos, I. Photaki καὶ L. Zervas, Ber., **94**, 2644 (1961).
107. L. Zervas καὶ I. Photaki, Chimia, **14**, 375 (1960).

108. F. Sanger, Nature, **171**, 1025 (1953) · A. P. Ryle καὶ F. Sanger. Biochem. J., **60**, 535 (1955) · R. E. Benesch καὶ R. Benesch, J. Am. Chem. Soc., **80**, 1666 (1958).
109. L. Zervas, L. Benoiton, E. Weiss, M. Winitz καὶ J. P. Greenstein, J. Am. Chem Soc., **81**, 1729 (1959).
110. H. Brown, F. Sanger καὶ R. Kitai, Biochem. J., **60**, 556 (1955).
111. L. Zervas καὶ I. Photaki, J. Am. Chem. Soc., **84**, 3887 (1962).
112. L. Zervas, I. Photaki, A. Cosmatos καὶ N. Ghelis, «Peptides : Proceedings of the Fifth European Symposium» ed. G. T. Young, Pergamon Press, Oxford 1963, σελ. 27.
113. L. Zervas, I. Photaki καὶ N. Ghelis, J. Am. Chem. Soc., **85**, 1937 (1963).
114. G. Amiard, R. Heymès καὶ L. Velluz, Bull. Soc. Chim. France, 698 (1956).
115. A. Berger, J. Noguchi καὶ E. Katchalski, J. Am. Chem. Soc., **78**, 4483 (1956)
116. M. Sokolovsky, M. Wilchek καὶ A. Patchornik, J. Am. Chem. Soc., **86**, 1202 (1964).
117. A. Cosmatos, I. Photaki καὶ L. Zervas, «Peptides : Proceedings of the 6th European Peptide Symposium, Athens 1963», ed. L. Zervas, Pergamon Press, Oxford 1964, ὑπὸ ἐκτύπωσιν.
118. L. Zervas, I. Photaki, A. Cosmatos, D. Borovas, J. Am. Chem. Soc., προσεχῶς.
119. X. Χαμαλίδης, διδακτορικὴ διατριβή, Ἀθῆναι 1964.
120. Κ. Γιοβανίδης, διδακτορικὴ διατριβή, Ἀθῆναι 1964.
121. R. A. Boissonnas, St. Guttmann, P. - A. Jaquenoud καὶ J. - P. Waller, Helv. Chim. Acta, **38**, 1491 (1955) · M. Zaoral καὶ J. Rudinger, Coll. Czech. Chem. Comm., **20**, 1183 (1955).
122. C. Ressler, J. Am. Chem. Soc., **78**, 5956 (1956) · D. T. Gish, P. G. Katsoyannis, G. P. Hess καὶ R. J. Stedman, J. Am. Chem. Soc., **78**, 5954 (1956).
123. R. B. Woodward, R. A. Olofson καὶ A. Mayer, J. Am. Chem. Soc., **83**, 1010 (1961).
124. M. Zaoral, Coll. Czech. Chem. Comm., **27**, 1273 (1962).
125. Χ. Μάντζος, διδακτορικὴ διατριβή, Ἀθῆναι, 1962.
126. A. Oswald, Z. physiol. Chem., **70**, 310 (1910) · C. R. Harington καὶ R. V. Pitt-Rivers, Biochem. J., **39**, 157 (1945).
127. F. Weygand καὶ G. Zumach, Z. Naturforschg., **17**b, 807 (1962).
128. D. Jarvis, ἀδημοσίευτα ἀποτελέσματα ἐκ τοῦ Ἐργαστηρίου τοῦ Καθηγητοῦ V. du Vigneaud.
129. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr καὶ R. J. Randall, J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).
130. C. Ressler, Science, **128**, 1281 (1958) · V. du Vigneaud, προφορικὴ ἀνακοίνωσις.
131. R. A. Boissonnas, St. Guttmann, B. Berde καὶ H. Konzett, Experientia, **17**, 377 (1961).
132. J. Rudinger, προφορικὴ ἀνακοίνωσις.
133. D. Yamashiro, Nature, **201**, 76 (1964).
134. Ι. Φωτάκη, Χημικὰ Χρονικά, τεῦχος Ἰανουαρίου 1965.
135. M. Brenner καὶ A. Niederwieser, Experientia **16**, 378 (1960).
136. R. Schwyzer καὶ H. Kappeler, Helv. Chim. Acta, **44**, 1991 (1961).
137. S. Waley καὶ J. Watson, Biochem. J., **55**, 328 (1953).
138. E. L. Durrum, J. Am. Chem. Soc., **72**, 2943 (1950).
139. C. Ressler καὶ V. du Vigneaud, J. Am. Chem. Soc., **79**, 4511 (1957).

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
Συμβολικὴ γραφὴ τῶν πεπτιδίων	9
Α' ΘΕΩΡΗΤΙΚΟΝ ΜΕΡΟΣ	
Εἰσαγωγὴ	11
Ἀπομόνωσις ὁρμονῶν τοῦ ὀπισθίου λοβοῦ τῆς ὑποφύσεως	12
Ἀπομόνωσις τῆς ὀξυτοκίνης καὶ βασοπρεσσίνης εἰς καθαρὰν κατάστασιν	13
Ἐξεύρεσις τῆς συντάξεως καὶ εἰδικώτερον τῆς ἀλληλουχίας τῶν ἀμινοξέων εἰς πεπτιδικὴν ἅλυσον. (Ι. Μέθοδοι ἐξευρέσεως τῶν Ν-τελικῶν ἀμινοξέων. ΙΙ. Μέθοδοι ἐξευρέσεως τῶν C-τελικῶν ἀμινοξέων. ΙΙΙ. Χρησιμοποίησις ἐνζύμων διὰ τὸν προσδιορισμὸν τῆς ἀλληλουχίας τῶν ἀμινοξέων)	14
Προσδιορισμὸς τοῦ συντακτικοῦ τύπου τῆς ὀξυτοκίνης ὑπὸ τοῦ du Vigneaud	20
Τὸ πρόβλημα συνθέσεως πεπτιδίων (Ι. Παροδικὴ προστασία τῆς α-ἀμινομάδος. ΙΙ. Παροδικὴ προστασία τῆς α-καρβοξυλικῆς ὁμάδος. ΙΙΙ. Παροδικὴ προστασία πλευρικῶν ἁλύσων. IV. Μέθοδοι πεπτιδικῆς συζεύσεως)	23
Ἡ πρώτη σύνθεσις τῆς ὀξυτοκίνης	29
Σύνθεσις ὀξυτοκίνης ὑπὸ ἄλλων ἐρευνητῶν	33
Νέα σύνθεσις τῆς ὀξυτοκίνης εἰς τὸ ἐργαστήριον τοῦ du Vigneaud	34
Σύνθεσις «ἀναλόγων» τῆς ὀξυτοκίνης	34
Γενικὸν συμπέρασμα τῶν μέχρι τοῦδε συνθέσεων ὀξυτοκίνης καὶ «ἀναλόγων»	36
Νεώτεραι μέθοδοι συνθέσεως πεπτιδίων	37
Τὸ πρόβλημα τῆς συνθέσεως ἀσυμμέτρων πεπτιδίων τῆς κυστίνης	39
Ἡ νέα σύνθεσις τῆς ὀξυτοκίνης	43
Β' ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΝ ΜΕΡΟΣ	
Γενικὸς τρόπος ἀποκαρβοβενζοξυλιώσεως τῶν πεπτιδίων πρὸς παρασκευὴν τῶν ἀντιστοίχων ὑδροβρωμικῶν ἁλάτων καὶ ἐξουδετέρωσις αὐτῶν κατὰ τὴν σύζευξιν	61

Σελ.

Καρβοβενζοξυ-τετραπεπτίδιον (II) 62
Καρβοβενζοξυ-πενταπεπτίδιον (IV) 63
ο-Νιτροφαινυλοσουλφενυλο-πενταπεπτίδιον (IVα) 63
Καρβοβενζοξυ-εννεαπεπτίδιον (V) (προιὸν μεθανολύσεως καὶ ὀξειδώσεως τοῦ καρβοβενζοξυ-πενταπεπτιδίου IV) 64
Καρβοβενζοξυ-εξαπεπτίδιον (VI) 64
Καρβοβενζοξυ-επταπεπτίδιον (VII) 65
Καρβοβενζοξυ-οκταπεπτίδιον (VIII) 66
Καρβοβενζοξυ-εννεαπεπτίδιον (IX) 66
Δις-t-βουτυλοξυκαρβονυλο-L-κυστίνη 67
N-t-Βουτυλοξυκαρβονυλο-S-βενζοϋλο-L-κυστείνη 67
» » ἄλας δικυκλοεξυλαμίνης 68
t-Βουτυλοξυκαρβονυλο-εννεαπεπτίδιον (X) 68
ο-Νιτροφαινυλοσουλφενυλο-εννεαπεπτίδιον (XI) 69
N,S_1-δικαρβοβενζοξυ-εννεαπεπτίδιον (XII) 69
Καρβοβενζοξυ-οξυτοκείνη (XIII) 70
Μετατροπὴ τῆς XIII εἰς S,S'-διβενζυλοπαράγωγον (P) 71
t-Βουτυλοξυκαρβονυλο-οξυτοκείνη (XIV) 71
ο-Νιτροφαινυλοσουλφενυλο-οξυτοκείνη (XV) 71
Καρβοβενζοξυ-οξυτοκίνη (XVI) 72
'Οξυτοκίνη : Παρασκευὴ α) 72
» Πιστοποίησις τῆς ταυτότητος (χρωματογραψία ἐπὶ λεπτῆς στιβάδος, ἠλεκτροφόρησις ἐπὶ χάρτου, ἀνάλυσις ἀμινοξέων, χρωματογραφία κατανομῆς ἐπὶ Sephadex) 73
Παρασκευὴ β) 75
Γενικὴ Βιβλιογραφία 77
Εἰδικὴ Βιβλιογραφία 79

Τυπογραφικὸν Ἐργαστήριον
ΣΤΕΦΑΝΟΥ ΤΖΑΝΝΕΤΗ
Χαριλάου Τρικούπη ἀρ. 13