

### III. Η συμβολή του Λ. Ζέρβα στην Επιστήμη της Χημείας. Ανάλυση επιστημονικών εργασιών.

Τό επιστημονικό έργο του Λ.Ζ. περιέχεται σε 100 περίπου πρωτότυπες δημοσιεύσεις, όπως δείχνει ο προηγούμενος κατάλογος. [Εκεί φαίνονται και τα ονόματα συνεργειτών και συνεργατών, τα όποια στην ανάλυση που ακολουθεί δεν σημειώνονται.] Οι έρευνες του αφορούν σε προβλήματα Οργανικής και Βιο-οργανικής Χημείας και ανήκουν στις περιοχές των σακχάρων, αμινοσακχάρων, αμινοξέων, πεπτιδίων, πρωτεολυτικών ενζύμων, πρωτεϊνών και οργανικών ενώσεων του φωσφορικού οξέος. Μ' αυτόν τον συνδυασμό της αγάπης του για σάκχαρα κι αμινοξέα συνέχισε την επιστημονική παράδοση του Emil Fischer, δάσκαλου του Max Bergmann.

Εξετάζοντας ενώσεις με βιολογική σημασία και τις χημικές μετατροπές τους με μεθόδους καθαρής Οργανικής Χημείας αναζητούσε πρότυπα (μηχανισμούς) που θα μπορούσαν να βοηθήσουν στις πολυπλοκότερες μελέτες του μεταβολισμού. Με τις εργασίες του σύνδεσε την κλασική Οργανική Χημεία του πρώτου τέταρτου του αιώνα με τη σύγχρονη Βιοχημεία. Αλλά η σύνθεση ενώσεων με βιολογική σημασία απαιτεί την ανάπτυξη νέας μεθοδολογίας Οργανικής Χημείας κι εκεί πέφτει το κύριο βάρος του επιστημονικού του έργου.

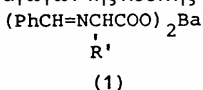
Ο Λ. Ζέρβας έζησε μια ηρωική εποχή της Χημείας συμμετέχοντας στους αγώνες της πρώτης γραμμής. Το έργο του έχει καταξιωθεί, όπως δείχνουν οι αναρίθμητες αναφορές άλλων ερευνητών σ' αυτό. Μνημονεύεται λεπτομερώς σε ειδικές εκδόσεις και πολλές εργασίες του περιλαμβάνονται επώνυμα σε διδακτικά συγγράμματα για προχωρημένους Φοιτητές. Ενώ ένα μέρος βρίσκεται, ανώνυμο πια γιατί έγινε κλασικό, σε όλες τις Οργανικές Χημείες.

Ασχολήθηκε πάντοτε με ουσιώδη και επίπονα προβλήματα και γι' αυτό μερικές φορές είδε πρωτότυπες εργασίες του, που τέλειωναν ή που βρισκόταν σ' εξέλιξη, να δημοσιεύονται από άλλα Εργαστήρια. Αυτό δείχνει πόσο επιστημονικά επίκαιρα ήσαν τα θέματα που τον απασχολούσαν.

Σημαντικό χαρακτηριστικό του έργου του είναι η συνέχεια. Αυτή τη συνέχεια θα επιχειρήσω να δείξω στην επόμενη ανάλυση ξετυλίγοντας μέσα από τις δημοσιεύσεις του το νήμα που τις συνδέει. [Η ανάλυση των εργασιών μπορεί να γίνει ή κατά χρονολογική σειρά ή σε ομάδες εργασιών με το ίδιο ή ανάλογο αντικείμενο. Ο πρώτος τρόπος δείχνει πιο ωραία την ανάπτυξη της Οργανικής Χημείας και συνακόλουθα τα νέα προβλήματα που παρουσιάζονται κάθε εποχή, νομίζω όμως πως θα κούραζε τον μη ειδικό αναγνώστη. Ακολουθήθηκε ο δεύτερος τρόπος με μικρές επεξηγηματικές παρεμβολές. Σάν ομάδες εργασιών δεν ορίσθηκαν οι μεγάλες περιοχές που παραπάνω ξεχωρίσαμε, αλλά καθορισμένες μικρότερες, π.χ. δεν υπάρχει ομάδα αμινοξέων αλλά ομάδα αργινίνης, ιστιδίνης, κυστίνης κλπ. Η σειρά πάλι των ομάδων καθορίστηκε από τον αύξοντα αριθμό της πρώτης εργασίας που περιλαμβάνεται σ' αυτήν. Οπωσδήποτε ο χωρισμός είναι σχηματικός γιατί π.χ. ενώ δεν υπάρχει ομάδα «γλουταμινικό οξύ» η Χημεία του μελετήθηκε πολύ και περιλαμβάνεται στην Ομάδα «προστασία του -COOH» αλλά και σ' άλλες ομάδες. Η σειρά των χημικών εξισώσεων κάθε εργασίας δεν ήταν δυνατόν να δοθεί χωρίς να πολλαπλασιασθεί η έκταση του κειμένου, έτσι περιορίστηκα σε μερικούς αυτοτελείς συντακτικούς ή στερεοχημικούς τύπους και σε ελάχιστες εξισώσεις.]

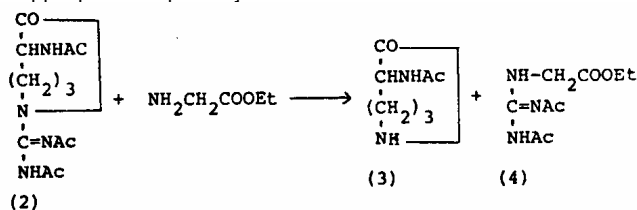
#### Ενώσεις αλδευδών με αμινοξέα (εργ. 1-3, 64, 66).

Στη διδακτορική του διατριβή (εργ. 1, 2), κατόρθωσε τη σύνθεση βάσεων Schiff από αρωματικές αλδεύδες και άλατα αμινοξέων σε υδατικά διαλύματα (1). Μερικές από αυτές τις ενώσεις φάνηκαν χρήσιμες στην απομόνωση αμινοξέων όπως η αργινίνη (εργ. 3) και πολύ αργότερα στη συνθετική παρασκευή N<sup>o</sup>-ακυλοπαραγώγων της λυσίνης (εργ. 66) ή παραγώγων της γλυκοζαμίνης (εργ. 15, 64).

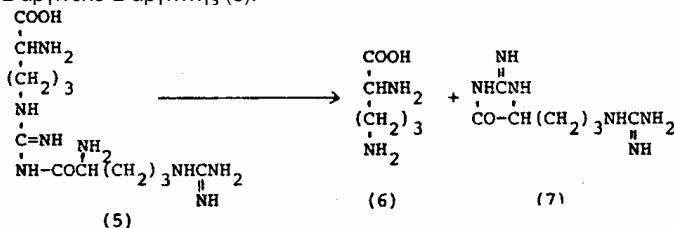


#### Έρευνες σε προβλήματα σχετικά με το αμινοξύ αργινίνη (εργ. 4, 5, 8, 10, 20, 37, 57, 58, 59, 62, 68, 74, 82, 93).

Η χημική συμπεριφορά του αμινοξέος αργινίνη που εκτός από την α-NH<sub>2</sub> διαθέτει και δ-γουανιδομάδα, δεν έπαψε ποτέ να τον απασχολεί. Έτσι στις εργ. 4, 5 διαπιστώθηκε ο σχηματισμός N-ακετυλοπιπεριδόνης (3), αιθυλεστέρα της διακετυλο-γλυκοκυαμίνης (4) ή -κρεατίνης με την επίδραση γλυκίνο- ή σαρκοσίνου - μεθυλεστέρα στην DL-τριακετυλανυδροαργινίνη (2) [Χρησιμοποιούνται οι καθιερωμένες από προτάσεις IUPAC και IUB συντημήσεις για αμινοξέα και διάφορες ομάδες όπως: Ac = CH<sub>3</sub>CO, Z = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>OCO, Bzl = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>, κ.λ.π. Επίσης: θ.δ. = θερμοκρασία δωματίου.]



Οι ιδιότητες της L-αργινυλο-L-αργινίνης που είχε συνθέσει ο Fischer δεν ταίριαζαν σε κανονικό διπεπτιδιο. Πραγματικά, στην εργ. 8 αποδείχθηκε πως πρόκειται για ρακεμικό α,δ-διγουανιδο-π-βαλεριανικό ανυδρίτη (7) που προκύπτει μαζί με 1-ορνιθίνη (6) πιθανώς από δυσανάλογη κατανομή N<sup>w</sup>-L-αργινυλο-L-αργινίνης (5).

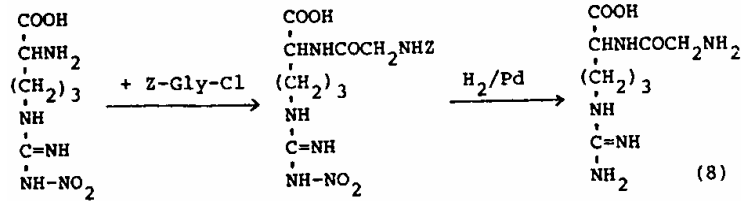


Υδρόλυση του ανυδρίτη και αποκαρβοξυλίωση του δι-γουανιδοβαλεριανικού οξέος μπορεί να εξηγήσει το σχηματισμό 1,4-τετραμεθυλενο-διγουανιδίνης (αρκαΐνης) που πιστοποιήθηκε σ' ένα εκχύλισμα οστρακοειδών (εργ. 20).

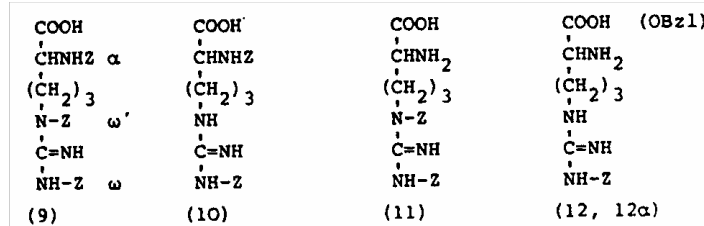
Ανυδρικά παράγωγα της L-αργινίνης αυτορακεμοποιούνται με την επίδραση της ελεύθερης γουανιδομάδας όταν αυτή δεν εξουδετερώνεται από κάποια άλλη όξινη ομάδα. Η μέτρηση της ταχύτητας ρακεμισμού χρησιμοποιήθηκε και σαν απόδειξη του α-πεπτιδικού δεσμού της αργινίνης στην πρωταμίνη κλουπεΐνη (εργ. 10, 11).

Όπως είναι γνωστό η καρβοβενζοξυ - μέθοδος για την προστασία της αμινομάδας (βλ. παρακάτω) έκανε εφικτή τη συνθετική παρασκευή οπτικώς ενεργών πεπτιδίων με όλα τα γνωστά αμινοξέα. Όμως η N<sup>o</sup>-καρβοβενζοξυ-αργινίνη που περιέχει την πολύ βασική γουανιδομάδα δεν έλυσε το πρόβλημα της σύνθεσης πεπτιδίων αργινίνης. Η ένταξη της αμινομάδας της αργινίνης στον πεπτιδικό δεσμό, π.χ. η σύνθεση γλυκυλο-L-αργινίνης (8) (εργ. 37) πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας N<sup>w</sup>-νιτροαργινίνη, ενώ η ένταξη του

καρβοξυλίου της κατορθώθηκε πολύ αργότερα.



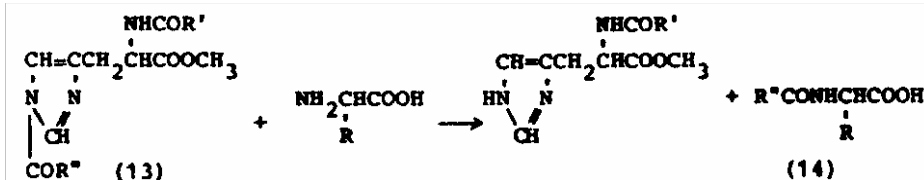
Σέ μια επόμενη σειρά εργασιών (57-59, 62, 68) που άρχισαν όταν βρισκόταν ως επισκέπτης επιστήμων στα ερευνητικά εργαστήρια του N.I.H. στην Bethesda Η.Π.Α., ασχολήθηκε πάλι με την καρβοβενζοξυλίωση της αργινίνης αλλ' αυτή τη φορά σε ισχυρώς αλκαλικό περιβάλλον. Έτσι απομονώθηκε η τρικαρβοβενζοξυ-αργινίνη (9) στην οποία οι βασικές ιδιότητες της γουανιδομάδας έχουν πλήρως καλυφθεί.



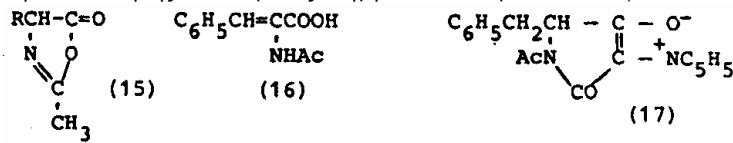
Η ένωση αυτή που επιτρέπει το σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού από το -COOH της αργινίνης μετατρέπεται εύκολα (επίδραση ενός ισοδ. αλκάλειος σε αλκοόλη) σε N<sup>α</sup>, N<sup>ω</sup> - δικαρβοβενζοξυ - (10). Εξάλλου επίδραση SOCl<sub>2</sub> ακολουθούμενη από υδρόλυση του σχηματιζόμενου N - καρβοξυανυδρίτη μετατρέπει την τρι-καρβοβενζοξυ- σε N<sup>ω</sup>, N<sup>ω</sup>-δικαρβοβενζοξυ (11) και την N<sup>α</sup>, N<sup>ω</sup>- (10) σε N<sup>ω</sup>-μονοκαρβοβενζοξυ-αργινίνη (12). Επιτέλους έγινε και η σύνθεση της πραγματικής L-αργινυλο-L-αργινίνης (παρβλ. εργ. 8) ύστερα από σύζευξη τρικαρβοβενζοξυ- με N<sup>ω</sup>-μονοκαρβοβενζοξυ-αργινο-βενζυλεστέρα (12α) και παραπέρα απομάκρυνση όλων των προστατευτικών ομάδων με καταλυτική υδρογόνωση. Η θέση των Z-ομάδων στην (9) προσδιορίστηκε με σειρά χημικών μετατροπών λαμβάνοντας υπόψη και την παρατήρηση ότι η ένωση αυτή με ακυλιωμένη την N<sup>ω</sup>-ομάδα δεν σχηματίζει θμελή δακτύλιο λακτάμης (αντίθετα με N<sup>α</sup>, N<sup>ω</sup>-διακυλο-παράγωγα). Μετά την εισαγωγή της τριτυλομεθόδου (βλ. παρακάτω) ήταν φυσικό να ασχοληθεί και με την μερική ή ολική τριτυλίωση των αμινομάδων της αργινίνης (εργ. 74, 82, 93). Η τριτυλίωση σε διάφορες αλκαλικές συνθήκες του αργινομεθυλεστέρα ή βενζυλεστέρα προς μονό-, δι-, τρι-, ή και τετραπαραγώγο παρουσιάζει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά στην εισαγωγή των ομάδων και στη σταδιακή απόσπασή τους.

### Έρευνες σε προβλήματα σχετικά με το αμινοξύ ιστιδίνη και ανυδρिटικά παράγωγα αμινοξέων (εργ. 6, 7, 9, 12, 19, 26).

Στους Bergmann και Ζέρβα ανήκει η πρώτη στη βιβλιογραφία διαπίστωση «ενεργού ακυλίου» που αφορούσε στη μετάθεσή του από το ιμιδαζολικό άζωτο της ιστιδίνης (13) στην ελεύθερη α-αμινομάδα ενός άλλου αμινοξέος (14) σε υδατικό διάλυμα και θ.δ. (εργ. 6). Η τόσο γνωστή σήμερα ιδιότης αυτή διαπιστώθηκε και σε άλλους ετεροκυκλικούς δακτυλίους, όπως σε οξυπαραγωγα πυριμιδίνης ή πιπεραζίνης (εργ. 12). Σ' αυτή την εργασία παρασκευάστηκε επίσης για πρώτη φορά διπεπτιδίο ακυλιωμένο στο άζωτο του πεπτιδικού δεσμού.



Μελετήθηκε η ρακεμίωση της N<sup>α</sup>-ακετυλο-L-ιστιδίνης και άλλων αμινοξέων με το σχηματισμό ετεροκυκλικού δακτυλίου αζλακτόνης (15) (εργ. 9) που επίσης χρησιμοποιήθηκε για παρασκευές N<sup>α</sup>-ακετυλο-ιστιδυλο- και άλλων πεπτιδίων (εργ. 7). (Κάτι που σήμερα έχει ξεχαστεί είναι ότι η προσεκτική απόσπαση της ακετυλομάδας οδήγησε σε ελεύθερα διπεπτιδία).



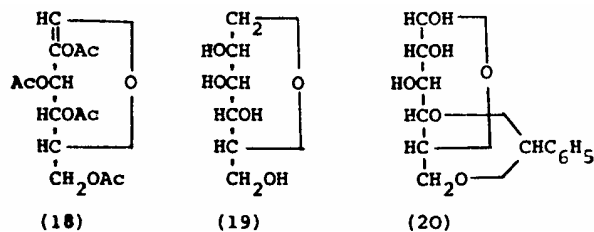
R= πλευρική αλυσίδα α-αμινοξέων

Η παρασκευή της L-λυσυλο-L-ιστιδίνης (εργ. 26) έγινε αργότερα με την καρβοβενζοξυ-μέθοδο (βλ. παρακάτω).

Η εργ. 19 περιλαμβάνει τη μετατροπή N-αλογοακυλοαμινοξέων σε δευδροαμινοξέα (16) ή άλλα ανυδρिटικά παράγωγα (17).

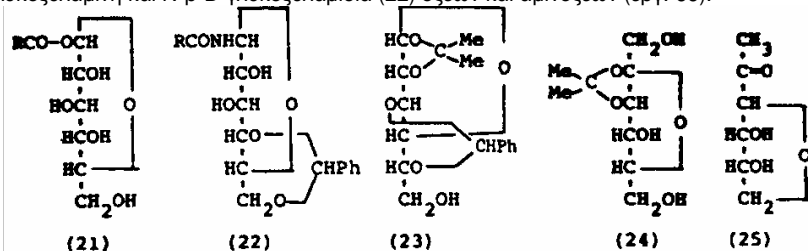
### Έρευνες σε προβλήματα σχετικά με ανυδρिटικά ή άλλα δραστικά παράγωγα των σακχάρων (εργ. 13, 16, 17, 18, 31, 32, 39, 48, 53, 66).

Οι εργασίες του στα σάκχαρα ήσαν πολλές φορές εργασίες ανεύρεσης δομής ή αναθεώρησης ευρημάτων άλλων ερευνητών με χρησιμοποίηση χημικών μεθόδων μετατροπής. Εξάλλου συνθετικά δραστικά παράγωγα των σακχάρων χρησίμευαν σαν γέφυρες μεταξύ υδατανθράκων φυσικής προέλευσης. Από ακετοβρωμογλυκόζη μέσω τετρακετυλο-οξυγλυκόλης (18) πέτυχε τη σύνθεση του φυσικού προϊόντος στυρακίτη (19). Συγχρόνως αποδείχτηκε η θέση 1,5 της γέφυρας οξυγόνου (εργ. 13). Αλλά και η σύνθεση του επιμερούς στον στυρακίτη πολυαλαίτη κατορθώθηκε από την ίδια πρώτη ύλη σε διαφορετικές συνθήκες (εργ. 53).



Με ανάλογες πρώτες ύλες πιστοποίησε σχηματισμό ανυδρικών παραγώγων γλυκόζης ή γαλακτόζης που αντιστοιχούν σε εσωτερική οξειδοαναγωγή και απόσπαση νερού (εργ. 16, 17). Η αναγνώριση όμως του στυρακίτη ως 1,5-ανυδρομαννιτόλης και όχι σορβιτόλης, όπως παραδέχονταν η τότε βιβλιογραφία έγινε αρκετά χρόνια αργότερα, μόλις ανέλαβε Καθηγητής στην Αθήνα (εργ. 48). Συγχρόνως αναπτύχθηκε και νέα μέθοδος μετατροπής αλδοζών σε κετόζες καθώς σειρά χημικών μετατροπών του στυρακίτη οδήγησε σε παράγωγο φρουκτόζης.

Η 4,6-Ο-βενζυλιδενό-α-D-γλυκοπυρανόζη (20) που παρασκευάστηκε σε καθαρή κρυσταλλική κατάσταση (εργ. 18) έχει ένα περίεργο «όξινο» γλυκοζιπικό υδροξύλιο και γι' αυτό αποτελεί ιδεώδη πρώτη ύλη για μια νέα γενική μέθοδο σύνθεσης 1-ακυλοπαραγώγων της γλυκόζης (21) όπου το ακύλιο μπορεί να είναι και μονάδα αμινοξέος (εργ. 39). Επίσης μετατρέπεται σε 4,6-Ο-βενζυλιδενό-D-γλυκοζυλαμίνη και Ν-β-D-γλυκοζυλαμίδα (22) οξέων και αμινοξέων (εργ. 66).



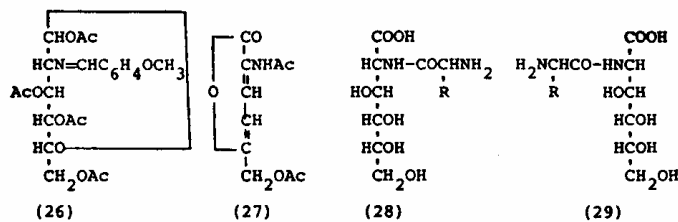
Η 1,2-ακετονο-3,5-βενζυλιδενό-D-γλυκοφουρανόζη (23) οδήγησε σε μια νέα καλύτερη συνθετική παρασκευή της γ-λακτόνης του D-γλυκουρονικού οξέος (εργ. 29). Παράγωγα φρουκτοφουρανόζης που ως γνωστόν αφθονούν στη φύση παρασκευάστηκαν για πρώτη φορά με ελεγχόμενη μέθοδο. Έγινε η σύνθεση π.χ. της 2,3-ακετονο-β-D-φρουκτοφουρανόζης (24) και D-ακυλοούποκατεστημένων παραγώγων της (εργ. 31).

Οι γλυκάλες αποτελούν ανυδρικά δραστικά παράγωγα των σακχάρων. Η δομή τους, σύνταξη, στερεοχημεία και οι αντιδράσεις μεταθέσεων είχαν απασχολήσει τον Fischer κ.ά. Στην εργ. 32 με σειρά χημικών μετατροπών και λεπτών παρατηρήσεων διαλευκάνθηκε η δομή της ισογλυκόζης (ανυδροφρουκτόζη) (25), ισολακτάλης και πρωτογλυκόζης.

### Έρευνες σε προβλήματα σχετικά με το αμινοσάκχαρο γλυκοζαμίνη (εργ. 14, 15, 21, 22, 36, 60, 64).

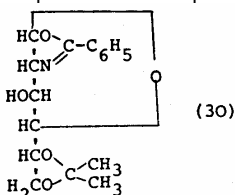
Ήταν φυσικό η αγάπη του στην έρευνα αμινοξέων και σακχάρων να τον οδηγήσει στη γλυκοζαμίνη, ένα αμινοσάκχαρο πολύ διαδεδομένο στη φύση, π.χ. σαν προσθετική ομάδα στις γλυκοπρωτεΐνες, σαν δομικό συστατικό πολυσακχαριτών, κ.ά. Μετά από υδρόλυση της χιτίνης απομόνωσε τον δισακχαρίτη χιτοβιόζη που έχει στερεοχημεία ανάλογη με της κελλοβιόζης (εργ. 14, 22). Η ακυλίωση της γλυκοζαμίνης στο άζωτο κατορθώθηκε εφαρμόζοντας σειρά αντιδράσεων στο τετρακετυλιωμένο παράγωγο της βάσης Schiff γλυκοζαμίνης με ανισαλδεύδη (26) (εργ. 15).

Μελέτες στο γλυκοζαμινικό οξύ έδειξαν ότι έχει μεγάλη τάση απόσπασης νερού (εργ. 21) π.χ. κατά την ακετυλίωσή του με οξ. ανυδρίτη - οξ. νάτριο αποσπώνται 2 μόρια νερού και σχηματίζεται ο ανυδρίτης (27) και από αυτόν σειρά νέων ή γνωστών παραγώγων.



Το επίμαχο πρόβλημα της στερεοχημείας στο δεύτερο άτομο άνθρακα της γλυκοζαμίνης λύθηκε με συνδυασμό χημικών και βιοχημικών μεθόδων. Γι' αυτό το σκοπό χρειαζόντουσαν διπεπτιδία L-αμινοξέων με D-γλυκοζαμινικό οξύ (28) και με το επιμερές του D-μαννοζαμινικό (29) και παραπέρα ενζυματική μελέτη της υδρόλυσής τους. Η σύνθεση έγινε εφαρμόζοντας την εν τω μεταξύ αναπτχθείσα καρβοβενζοξυ-μέθοδο (εργ. 24). Η διαπίστωση ότι το ένζυμο διπεπτιδάση που υδρολύει μόνον L-L πεπτιδικούς δεσμούς υδρολύει επίσης μόνον τα διπεπτιδία του D-μαννοζαμινικού (που έχει L-στερεοχημική διάταξη στον C<sub>2</sub> ως προς τον πεπτιδικό δεσμό) σήμαινε ότι το γλυκοζαμινικό, επομένως και η γλυκοζαμίνη, έχουν D-στερεοχημική διάταξη στο 2ο άτομο άνθρακα (εργ. 36).

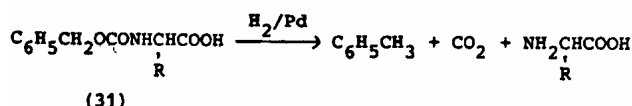
N-Ακυλιωμένα παράγωγα της γλυκοζαμίνης σχηματίζουν με όξινα αντιδραστήρια ετεροκυκλικούς δακτυλίους οξαζολίνης ή οξαζολόνης. Τέτοιο έτεροκυκλικό παράγωγο είναι π.χ. η 2-φαινυλο-4,5-[5,6-ισοπροτυλιδενό-D-γλυκοφουρανο]-Δ<sup>2</sup>-οξαζολίνη (30) στην οποία οι τρεις δακτύλιοι προσδιορίστηκαν διαφορετικά με επίδραση πρώτα διαφορετικής ισχύος HCl/CH<sub>3</sub>OH (0.0005 N ή 0.1 N), όπου συγχρόνως σχηματίστηκε μεθυλοφουρανοζίτης ή μεθυλοπυρανοζίτης αντίστοιχα και μετά με υδροχλωρικό οξύ (0.001 N). Η ένωση αυτή που μόνον το OH σε θέση 3 έχει ελεύθερο, έγινε κυριολεκτικά ανάρπαστη και χρησιμοποιήθηκε από πάρα πολλούς ερευνητές για την ένταξη της γλυκοζαμίνης σε πολύπλοκες ενώσεις (εργ. 60). Άλλα συνθετικά παράγωγα που παρασκευάστηκαν ήταν η N-διφαινυλοφωσφορμυλο- και N-ανισαλ-0-τετρακετυλο-D-γλυκοζαμίνη, τα 1-βρωμο-παραγώγα τους και β-γλυκοζαμινίτες, στα όποια μελετήθηκαν διάφορες μετατροπές και η απόσπαση των προστατευτικών ομάδων σε ήπιες συνθήκες (εργ. 64).



## Η Καρβοβενζοξυμέθοδος: Μια γενική μέθοδος πεπτιδικής σύνθεσης (Z-μέθοδος) (εργ. 23, 26, 28, 30, 43, 66)\*.

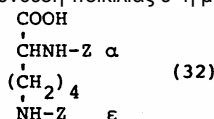
[\* Πολλές άλλες σχετικές εργασίες αναλύονται σε άλλη ομάδα όπως π.χ. στα «προβλήματα αργινίνης» κ.ά. επίσης όλες οι εργασίες «στα πρωτεολυτικά ένζυμα» περιλαμβάνουν πεπτιδικές συνθέσεις με την Z-μέθοδο.]

Στό 12<sup>ο</sup> Ευρωπαϊκό Συμπόσιο της Χημείας των Πεπτιδίων που έγινε στην Ανατολική Γερμανία (1972) έναν ολόκληρο τοίχο της αίθουσας συνεδριάσεων κάλυπτε η μεγέθυνση της πρώτης σελίδας της εργ. 23 με τίτλο: «Επί μιας Γενικής Μεθόδου Πεπτιδικής Συνθέσεως». Το πρόβλημα της σύνθεσης χημικώς και οπτικώς καθαρών πεπτιδίων με συνδυασμό όλων των φυσικών L-α-αμινοξέων [επίσης των αντιπόδων τους ή και άλλων αμινοξέων] είχε επιτέλους λυθεί, αφού για 50 χρόνια είχε απασχολήσει τον E. Fischer, τον Th. Curtius και τους μαθητές τους μεταξύ των οποίων και τον Max Bergmann. Η καρβοβενζοξυομάδα (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>OCO-) εισάγεται για την παροδική προστασία της α-NH<sub>2</sub> των αμινοξέων, τα N-καρβοβενζοξυαμινοξέα (31) μετατρέπονται σε ενεργά παράγωγα (χλωρίδια, αζίδια, ανυδρίτες) που κάνουν σύζευξη με την ελεύθερη α-NH<sub>2</sub> άλλων αμινοξέων και στο τέλος απομακρύνεται η ομάδα με καταλυτική υδρογάνωση σε συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας του Εργαστηρίου. Σημαντικό χαρακτηριστικό της μεθόδου είναι ότι δεν προκαλεί ρακεμώσεις.



Σήμερα, 50 χρόνια μετά τη δημοσίευση της εργασίας 23 διαπιστώνεται, πως η καρβοβενζοξυομάδα εξακολουθεί να είναι η πρώτη σε χρήση και σημασία N-προστατευτική ομάδα. Σ' αυτά συνέβαλαν κι άλλοι τρόποι απόσπασής της, όπως αναγωγή με νάτριο σε υγρή αμμωνία (du Vignaud), οξεολυτική διάσπαση με ισχυρά άνυδρα οξέα π.χ. HBr/AcOH (F. Berger), καθώς και οι νεώτερες μέθοδοι σύζευξης (μικτοί ανυδρίτες, καρβοδιιμίδια, ενεργοί εστέρες κ.ά.). Ύστερα από πρόταση του Th. Wieland (1960) στη συντομογραφική γραφή των πεπτιδίων η καρβοβενζοξυ-ομάδα παριστάνεται με το σύμβολο Z προς τιμήν του Ζέρβα.

Την πρώτη δημοσίευση ακολούθησαν άλλες, στην αρχή από τη Γερμανία και Αμερική μαζί με τον Bergmann και μετά από το Εργ. της Αθήνας, ώστε η μέθοδος να εφαρμοστεί και στα αμινοξέα με δραστική πλευρική αλυσίδα. Έτσι πέντε χρόνια αργότερα παρασκευάστηκαν συνθετικά λυσουλοδιπεπτιδία από την N<sup>6</sup>, N<sup>6</sup>-δικαρβοβενζοξυ-L-λυσίνη (32) (εργ. 26), επίσης παρασκευάστηκαν με κομψό τρόπο η N<sup>6</sup>-μονοκαρβοβενζοξυ-L-λυσίνη κι απ' αυτήν α-πεπτιδία της λυσίνης (εργ. 43). Αλλά χρειάστηκε να περάσουν άλλα 25 χρόνια ως τη σύνθεση και της N<sup>6</sup>-μονοκαρβοβενζοξυ-L-λυσίνης και μικτών α,ε- παραγώγων με συνδυασμό και άλλης N-προστατευτικής ομάδας (π.χ. της τριτυλο) που χρησιμοποιήθηκαν για σύνθεση ποικιλίας ε- ή μικτών α,ε-πεπτιδίων της λυσίνης (εργ. 66).



Με τη βοήθεια επίσης της Z-μεθόδου παρασκευάστηκε συνθετικά η ως τότε πανάκριβη L-γλουταμίνη και η ισομερής της ισογλουταμίνη. Το ίδιο και η ασπαργίνη και ισοασπαργίνη, από L-γλουταμινικό και L-ασπαργινικό οξύ αντίστοιχα (εργ. 28, 30).

Η Z-μέθοδος άνοιξε το δρόμο για τη σύνθεση βιολογικά δραστικών πεπτιδίων ακόμη και πρωτεϊνών.

Αλλά και μ' άλλο τρόπο εφαρμόστηκε η Z-μέθοδος συνδυασμένη με την αποικοδόμηση Curtius για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των αμινοξέων σε πρωτεϊνικό μόριο. Όμως οι τότε αναλυτικές μέθοδοι δεν επέτρεπαν την εξακρίβωση περισσότερων από τρία διαδοχικά αμινοξέα (εργ. 44).

### Εργασίες στα πρωτεολυτικά ένζυμα (εργ. 25-27, 33-36, 38, 41-43, 45, 46).

Με την Z-μέθοδο άνοιξε επίσης ο δρόμος για τη μελέτη του μηχανισμού δράσης και της εξειδίκευσης των πρωτεολυτικών ενζύμων. Η σύγκριση της δράσης πάνω σε συνθετικά, ως τότε άγνωστα πεπτιδία και παράλληλα σε φυσικές πρωτεΐνες οδήγησε στον καθορισμό της εξειδίκευσης των ενζύμων αυτών. Συγχρόνως η διαπίστωση πως συνθετικά πεπτιδία και φυσικές πρωτεΐνες συμπεριφέρονται όμοια στα πρωτεολυτικά ένζυμα, αποτέλεσε την πρώτη απόδειξη της πεπτιδικής θεωρίας του E. Fischer, που ως τότε γινόταν δεκτή με επιφυλάξεις.

Έτσι την εργ. 23 ακολουθεί σειρά εργασιών με τον πιο πάνω γενικό τίτλο. Απώτερος σκοπός τους ήταν η χρησιμοποίηση των πρωτεολυτικών ενζύμων (διπεπτιδάση, καρβοξυπολυπεπτιδάση, θρυψίνη, παπαΐνη κ.ά.) για αντιδραστήρια ανάλυση στην έρευνα της πρωτοταγούς δομής των πρωτεϊνών. Ο σκοπός αυτός χάρη και σε μεταγενέστερες εργασίες ιδίως του J. Fruton πραγματοποιήθηκε. Τα πρωτεολυτικά ένζυμα είναι από τότε ένα από τα κύρια εργαλεία στις μελέτες εξακρίβωσης δομής πεπτιδίων και πρωτεϊνών. Ενδεικτικά σημειώνουμε μερικά συμπεράσματα των εργασιών του Λ.Ζ. σε αυτή την περιοχή: Με τη μελέτη της ενζυματικής δράσης πάνω σε συνθετικά διπεπτιδία προλίνης και σαρκοσίνης αποδείχτηκε ποτέ είναι απαραίτητη η ύπαρξη Η στο άζωτο του πεπτιδικού δεσμού (-CO-NH-) για την εκδήλωση της δράσης των ενζύμων (εργ. 25, 38). Τα συμπεράσματα επιβεβαιώθηκαν με την ενζυματική αποικοδόμηση της ζελατίνης που περιέχει πάνω από 20% προλίνη και υδροξυπρολίνη (εργ. 27). Για το ένζυμο διπεπτιδάση εξακρίβώθηκε ότι χρειάζεται ελεύθερη την αρχική α-NH<sub>2</sub> και το τελικό α-COOH, επίσης απαιτεί Η στο Ν του πεπτιδικού δεσμού και δρα ταχύτερα σε πεπτιδικούς δεσμούς από L-α-αμινοξέα ή γλυκίνη (εργ. 33), ενώ στα L-D διπεπτιδία επιδρά πολύ πιο αργά, όπως και στα διπεπτιδία που δεν έχουν Η στους α-άνθρακες των δύο αμινοξέων (εργ. 41). Για τη δράση των πρωτεολυτικών ενζύμων διατυπώθηκε η θεωρία της προσέγγισης σε τρία σημεία του υποστρώματος (α-NH<sub>2</sub>, α-COOH, Η- του πεπτιδικού δεσμού), όπου όταν η στερεοχημική διάταξη και των δύο αμινοξέων είναι L δεν υπάρχει στερεοχημική παρεμπόδιση (εργ. 41).

Έγινε σύνθεση «ασυνήθιστων» ως τότε διπεπτιδίων από αμινοξέα με δραστικές πλευρικές αλυσίδες όπως λυσίνη και ιστιδίνη, λυσίνη και γλυκίνη ή ασπαργινικό οξύ (εργ. 26, 35, 42), β- ή α-διπεπτιδίων του ασπαργινικού, επίσης διπεπτιδίων με ασπαργινικό, γλουταμινικό, τυροσίνη (εργ. 34). Για διπεπτιδία γλυκοζαμινικού και μελέτη της επίδρασης πάνω σ' αυτά των πρωτεολυτικών ενζύμων βλ. πιο πάνω (σελ. 9). Με συνθετικά υποστρώματα ελέγχεται επίσης πιο εύκολα η καθαρότης των ενζύμων.

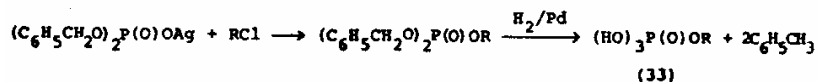
### Μέθοδοι για την παροδική προστασία του -COOH (εργ. 28, 74, 77, 81, 82, 84)

Η παροδική προστασία του α-COOH των αμινοξέων, που είναι ένα άλλο στάδιο της πεπτιδικής σύνθεσης, αποτελεί διαρκές αντικείμενο έρευνας για τους πεπτιδικούς Χημικούς. Η βενζυλομάδα (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>) που τόσο χρήσιμη στάθηκε στην προστασία της α-αμινομάδας, με τη μορφή της Z-, χρησιμοποιήθηκε επίσης για την εκλεκτική προστασία του α-COOH του γλουταμινικού και ασπαργινικού οξέος (εργ. 28). Στην ανάπτυξη της μεθοδολογίας της προστασίας του καρβοξυλίου ο Ζέρβας μελέτησε εστέρες με ομάδες συγγενείς άλλων N-προστατευτικών ομάδων, όπως εστέρες με τριτυλομάδα (-OC(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>, -OTrt) που σχηματίζουν εύκολα σαν παραπροϊόν κατά την τριτυλίωση της αμινομάδας των αμινοξέων. Είναι όμως τόσο ευπαθείς ώστε δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν (εργ. 74). Πολύ πιο χρήσιμοι αποδείχθηκαν οι εστέρες με την ομάδα διφαινυλομεθύλιο- που είχε προηγουμένως χρησιμοποιηθεί για προστασία της SH-ομάδας της κυστεΐνης. Οι διφαινυλομεθυλεστέρες (-OCH(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>, -ODpm) είναι σταθεροί στις ήπιες όξινες συνθήκες απόσπασης των ομάδων N-τριτυλο ή N-ο-νιτροφαινυλοσουλφενυλο, ενώ διασπώνται σε ισχυρότερες όξινες συνθήκες στις οποίες όμως οι προστατευτικές N-καρβοβενζοξυ ή O-βενζυλομάδες είναι σταθερές (εργ. 77, 81). Αντίθετα, οι φαινακυλεστέρες (-OCH<sub>2</sub>COPh, -OPac)

παρασκευάζονται επίσης εύκολα αλλ' είναι πολύ σταθεροί σε οξέα ενώ εύκολα διασπώνται με θειοφαινολικό νάτριο. Αμφότεροι (-ODpm και -OPac) διασπώνται με υδρογονόλυση, επίσης σχηματίζουν κρυσταλλικά άλατα (εργ. 81). Η διαφοροποίηση της χημικής συμπεριφοράς των δύο ομάδων κάνει πολύ χρήσιμους τους απλούς α ή γ ή τους μικτούς -ODpm και -OPac α,γ-εστέρες του γλουταμινικού οξέος (εργ. 82, 84).

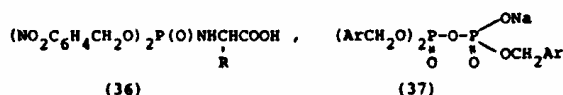
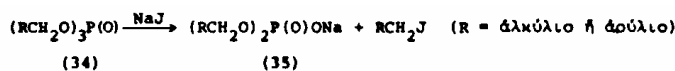
### Οργανικές ενώσεις του φωσφορικού οξέος (εργ. 47, 49-52, 55, 69).

Τα τελευταία χρόνια της δεκαετίας του 30 έγινε φανερή η σημασία φυσικών προϊόντων που περιέχουν φωσφορικό οξύ ενωμένο με OH- ή NH<sub>2</sub>-ομάδα, για τις αντιδράσεις του ζωντανού κυττάρου. Πρωτοπόρος και σ' αυτόν τον τομέα ο Ζέρβας εισήγαγε στη βιβλιογραφία τη βενζυλομέθοδο για την παρασκευή εστέρων του φωσφορικού οξέος με υδροξύλια αλκοολών ή σακχάρων (33).

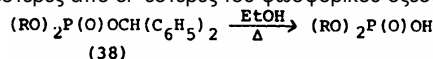


R = ρίζα αλκοόλης ή ακετυλιωμένου σακχάρου

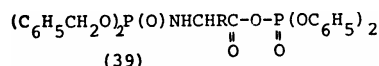
Η πρώτη ανακοίνωση που έγινε από το Παν/μιο Θεσσαλονίκης το 1939 (εργ. 47) άνοιξε το δρόμο για την ανάπτυξη ενός νέου τομέα στη συνθετική οργανική χημεία. Λίγο αργότερα (1940) στην Αθήνα μελετήθηκε η ενζυματική συμπεριφορά της β-1-φωσφορογλυκόζης που παρασκευάστηκε με τη βενζυλομέθοδο σε σύγκριση με τον εστέρα Cori, δηλ. την α-1-φωσφορογλυκόζη (παραπομπή 1 στην εργασία 49). Όμως ο πόλεμος και η κατοχή ανέκοψαν την παραπέρα ανάπτυξη της βενζυλομέθοδου στην Ελλάδα, ενώ άλλοι ερευνητές στην Αμερική (Wolfrom) και κυρίως στην Αγγλία (Lord Todd) μπόρεσαν να προχωρήσουν με επιτυχία ακολουθώντας τα ίδια χνάρια. Αξιόλογη εργασία στις φωσφορικές ενώσεις συνεχίστηκε από τον Λ.Ζ στην Αθήνα μετά από 10 περίπου χρόνια. Η παρασκευή διεστέρων του φωσφορικού (35) με απομάκρυνση ενός πρωτοταγούς αλκυλίου ή βενζυλίου από τριεστέρα (34) ύστερα από σύντομη θέρμανση με ιωδιούχο νάτριο αποτελεί μια γενική απλή μέθοδο που υπερτερεί από τις ως τότε γνωστές στη βιβλιογραφία.



Επί πλέον παρασκευάστηκαν χλωρίδια νέων φωσφορικών διεστέρων όπως το δι-π-νιτροβενζυλο και δι-ρ-ιωδοβενζυλο που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη σύνθεση μονό-, μικτών δι-, ή τριεστέρων (εργ. 51) Τα χλωρίδια αυτά κάνουν επίσης σύζευξη με εστέρες αμινοξέων ή πεπτιδίων, για να δώσουν ύστερα από σαπωνοποίηση και καταλυτική υδρογόνωση N-φωσφοροπαράγωγα αμινοξέων (36) και πεπτιδίων που ως γνωστόν είναι σταθερά στα αλκάλια, αλλά αποβάλλουν φωσφορικό οξύ ποσοτικά σε pH 4 και θ.δ. (εργ. 50). Ανάλογα συμβαίνουν και με τους εστέρες του πυροφωσφορικού οξέος, όπου μερική απομάκρυνση βενζυλομάδων (με ή χωρίς υποκατάστατες) με NaI οδηγεί στο σχηματισμό τριεστέρων (37) ή συμμετρικών διεστέρων του πυροφωσφορικού, πρώτες ύλες για την πυροφωσφορυλίωση υδροξυμενώσεων (εργ. 55). Η διφαινυλομεθυλομάς αποδείχθηκε επίσης κατάλληλη για την προστασία του φωσφορικού οξέος με μορφή εστέρα (38). Εκτός από την υδρογονόλυση απομακρύνεται και με σύντομο βρασμό σε αλκοόλη σχηματίζοντας διεστέρες από τρι- και μονοεστέρες από δι- εστέρες του φωσφορικού οξέος (εργ. 79).

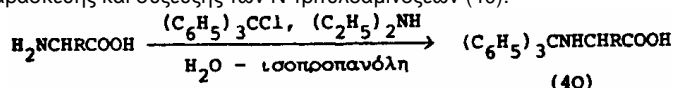


Παράγωγα του φωσφορικού οξέος χρησιμοποιήθηκαν όχι μόνο για N- ή O-προδική προστασία αλλά και ως μέθοδος ενεργοποίησης του καρβοξυλίου για σύζευξη. Έτσι οι μικτοί ανυδρίτες των N-διβενζυλοφωσφορυλο- (39) ή N-τριτυλο- αμινοξέων με διφαινυλοφωσφορικό οξύ χρησιμοποιούνται για σύζευξη με ελεύθερη αμινομάδα άλλου αμινοξέος ή πεπτιδίου, ενώ σ' αυτές τις περιπτώσεις μικτοί ανυδρίτες με μονοεστέρες του ανθρακικού οξέος δεν σχηματίζονται προφανώς λόγω στεροχημικής παρεμπόδισης (εργ. 69).



### Η N-τριτυλομέθοδος (εργ. 52, 54, 56, 63, 74, 77, 87).

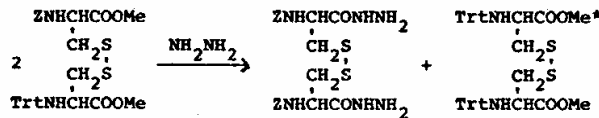
Η αναζήτηση N-προστατευτικών ομάδων που να μπορούν να απομακρυνθούν με ήπιες όξινες συνθήκες οδήγησε τον Ζέρβα στην ανάπτυξη γενικών μεθόδων παρασκευής και σύζευξης των N-τριτυλοαμινοξέων (40).



Τριάντα χρόνια πριν ήταν ήδη γνωστή από τον Helferich η παρασκευή της N-τριτυλο-γλυκίνης και -αλανίνης με σαπωνοποίηση των αντίστοιχων εστέρων, ενώ η στεροχημική παρεμπόδιση της ογκώδους τριτυλομάδας εμπόδιζε τη σαπωνοποίηση των εστέρων των άλλων αμινοξέων. Το πρόβλημα λύθηκε με δυο τρόπους: α) Με την απ' ευθείας τριτυλίωση των αμινοξέων διαλυμένων σε μίγμα νερού - ισοπροπανόλης - διαιθυλαμίνης και την προσθήκη τριτυλοχλωριδίου σε πολλές δόσεις (εργ. 54) και β) με την τριτυλίωση των βενζυλεστέρων των αμινοξέων και την απομάκρυνση της εστερομάδας με καταλυτική υδρογόνωση (εργ. 63). Η εισαγωγή νέων τρόπων απομόνωσης των τριτυλιωμένων παραγώγων όλων σχεδόν των γνωστών φυσικών αμινοξέων, λεπτομερής μελέτη μεθόδων για τη σύζευξή τους και τρόπων απόσπασης της τριτυλομάδας μετά την πεπτιδική σύνθεση πλούτισε τη βιβλιογραφία (εργ. 74, 77, 87, ως και τμήματα άλλων εργασιών) με μια μέθοδο πολύ πλατειάς εφαρμογής που έλυσε πολλά προβλήματα και που εξακολουθεί να εφαρμόζεται αποτελεσματικά (π.χ. μόνο με την τριτυλομέθοδο κατορθώθηκε η σύνθεση της πενικιλλίνης από τον Sheehan).

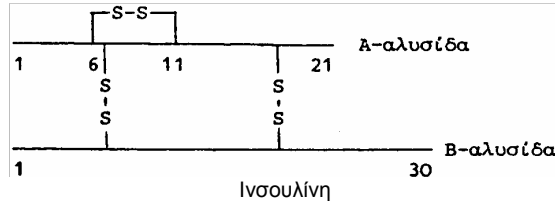
### Το πρόβλημα των αμινοξέων κυστεΐνης - κυστίνης και της σύνθεσης ασύμμετρων κυστινοπεπτιδίων (εργ. 61, 65, 70-73, 76, 80, 85-88, 91, 97-99).

Το πρόβλημα της σύνθεσης ασύμμετρων πεπτιδίων της κυστίνης, σαν αυτά που υπάρχουν στις πρωτεΐνες, ήταν γνωστό από μια ανεπιτυχή προσπάθεια του Fischer (1909). Πενήντα χρόνια αργότερα ο Ζέρβας με τον Greenstein και τους συνεργάτες του ασχολήθηκε πάλι με αυτά. Όπως έδειξε (εργ. 61), τα συνθετικά ανοικτά ασύμμετρα πεπτιδία της κυστίνης είναι πολύ ασταθή και σε συνθήκες κυρίως αλκαλικές παθαίνουν δισουλφιδική ανταλλαγή, έτσι ώστε από δύο μόρια ασύμμετρου να προκύψουν δύο μόρια συμμετρικών κυστινοπεπτιδίων π.χ.:



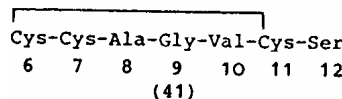
(\*) Η ογκώδης τριτυλομάδα εμποδίζει στερεοχημικά τον σχηματισμό υδραζιδίου

Από την άλλη όμως ήταν γνωστό, ότι φυσικά κυκλικά ασύμμετρα κυστινοπεπτιδία είναι αρκετά σταθερά όταν έχουν μια -S-S- γέφυρα όπως οι πεπτιδορμόνες οξυτοκίνη και βασοπρεσίνη, ή έχουν δακτύλιους με δυο -S-S- γέφυρες (ή και περισσότερες) όπως π.χ. η ινσουλίνη, όπου εκτός από ένα κυκλικό τμήμα τύπου οξυτοκίνης στην Α-αλυσίδα, υπάρχει και ένας δακτύλιος με δύο -S-S- γέφυρες μεταξύ των αλυσίδων Α και Β.

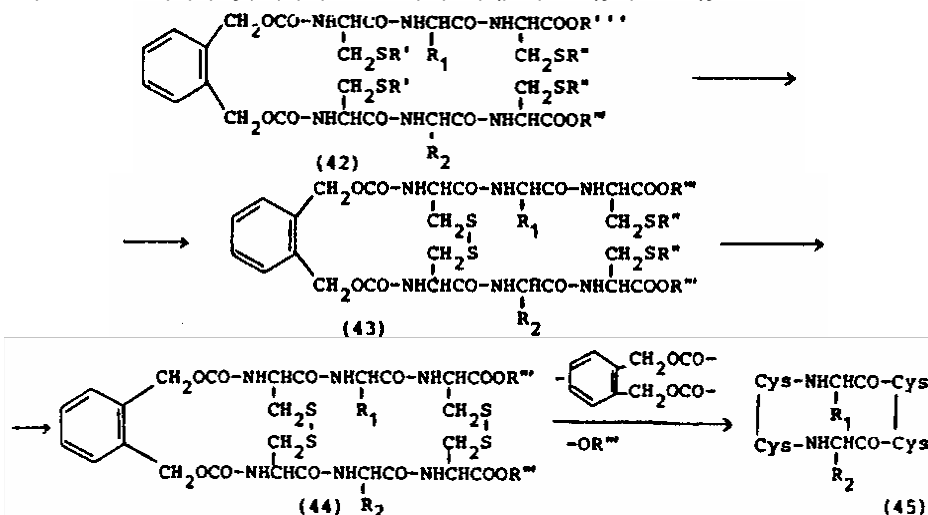


Η σύνθεση της ινσουλίνης (1963) από τις ομάδες του Π. Κατσόγιαννη (Η.Π.Α.), Η. Zahn (Γερμανία) και της Ακαδημίας της Σαγκάης έγινε με ένταξη πρώτα στις δυο ξεχωριστές αλυσίδες Α και Β των 6 μονάδων κυστεϊνών προστατευμένων με την S-βενζυλομάδα του Du Vigneaud και μετά απόσπαση των βενζυλομάδων και τυχαία συνοξείδωση των 6 SH-ομάδων που προκύψαν. Μαζί με άλλα δυνατά παραπροϊόντα (π.χ. διασταυρωμένες γέφυρες) σχηματίζεται προϊόν με τις σωστές 3 γέφυρες -S-S- της ινσουλίνης.

Στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Αθήνας από το 1959 (εργ. 65) και μετά, τέθηκαν δύο σκοποί για την ανάπτυξη μεθόδων που θα επιτρέπουν την προγραμματισμένη σύνθεση ασύμμετρων κυκλικών κυστινοπεπτιδίων με 2 ή περισσότερες -S-S- γέφυρες: α) Την ανεύρεση διαφόρων S- προστατευτικών ομάδων (R, R' κλπ.) που στο κατάλληλο στάδιο να μπορούν να απομακρυνθούν εκλεκτικά και με ήπιες συνθήκες. Έτσι όταν υπάρχουν μόνο δυο κυστεϊνές S-προστατευμένες με την ομάδα R στο πεπτιδίο, που δυνατόν να περιλαμβάνει και άλλες μονάδες κυστεϊνής διαφορετικά όμως προστατευμένες, μετά την εκλεκτική απόσπαση των ομάδων R και οξείδωση θα προκύψει μόνο μια -S-S- γέφυρα κυστίνης και σε καθορισμένη θέση και β) την ανεύρεση μεθόδου που θα επιτρέψει το σχηματισμό της πρώτης -S-S- γέφυρας μέσα σε δακτύλιο, ώστε να εξασφαλίζεται η ανάλογη σταθερότης των φυσικών πρωτεϊνών. Η πρόταση αυτή στη βιβλιογραφία χαρακτηρίστηκε ως πολύ ενδιαφέρουσα δυνατότης και βρήκε πρακτικές εφαρμογές από άλλους ερευνητές σε εργασίες διασταύρωσης (crosslinking) των Α και Β αλυσίδων της φυσικής ινσουλίνης. Αναλυτικότερα: Σε σειρά εργασιών που τα αποτελέσματά τους εφαρμόστηκαν και από πολλά άλλα ερευνητικά εργαστήρια σ' όλο τον κόσμο, ο Ζέρβας εισήγαγε νέες S-προστατευτικές ομάδες που μπορούν να αποσπαστούν εκλεκτικά και ανάπτυξε ήδη γνωστές μεθόδους ώστε να μπορούν να εφαρμοστούν στη σύνθεση πολύπλοκων πεπτιδικών αλυσίδων (με καλές αποδόσεις σε οπτικώς και χημικώς καθαρά προϊόντα). Τέτοιες ομάδες (R, R') είναι οι S-τριτυλο, S-διφαινυλομεθυλο, S-βενζυλο (ή και S-άκετυλο), S-καρβοβενζοξυ. Η S-τριτυλομάδα απομακρύνεται με όξινα αντιδραστήρια σε θ.δ. ή με την επίδραση αλάτων Ag<sup>+</sup> ή Hg<sup>2+</sup>, ή S-διφαινυλομεθυλο με τριφθοροξικό οξύ και φαινόλη με θέρμανση (εργ. 71) ενώ οι S-ακυλομάδες με αλκαλικές συνθήκες (εργ. 72). Οι συνθήκες των αντιστρεπτών ή μη αντιδράσεων παρασκευής και διάσπασης S-τριτυλο και S-διφαινυλομεθυλο ως και άλλων συγγενών παραγώγων κυστεϊνής ή κυστεϊνοπεπτιδίων αποτέλεσε αντικείμενο λεπτομερούς μελέτης (εργ. 86-88) όπου και εξηγήθηκαν αντικρουόμενα συμπεράσματα και παρατηρήσεις της βιβλιογραφίας. Συνδυασμός των παραπάνω S-προστατευτικών ομάδων χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία για να ξεπεραστούν οι μοναδικές δυσκολίες που παρουσίαζε η αποκατάσταση μιας γέφυρας -S-S- μεταξύ δύο ορισμένων μονάδων κυστεϊνής σε μόριο (41) που περιέχει 3 τέτοιες μονάδες στις θέσεις 6, 7, 11 της Α-αλυσίδας της ινσουλίνης. Ήταν η πρώτη φορά που στη βιβλιογραφία παρουσιαζόταν μια τέτοια σύνθεση (εργ. 76, 80). Η εργασία αυτή αποτέλεσε ορόσημο στη σύνθεση κυστινοπεπτιδίων και χρησιμοποιήθηκε αργότερα από την ομάδα της Ciba (1974) για μια σύνθεση ινσουλίνης με σχηματισμό των τριών γεφυρών -S-S- σε τρία διαφορετικά στάδια.

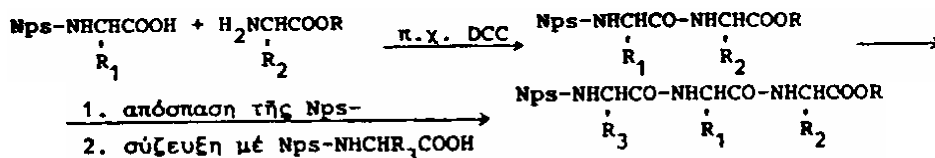


Η ανεύρεση μεθόδου για τη δεύτερη προϋπόθεση της προγραμματισμένης σύνθεσης κυκλικών ασύμμετρων κυστινοπεπτιδίων με δύο -S-S- γέφυρες αποδείχτηκε πολύ πιο δύσκολη. Τελικά ακολουθήθηκε το επόμενο σχήμα: χρησιμοποίηση μιας δισθενούς N-προστατευτικής ομάδας όπως είναι η διφθαλυλοξυκαρβονυλομάδα από την οποία μπορούν να αναπτυχθούν σε δυο ζυγούς δυο πεπτιδικές αλυσίδες (42) που φέρουν κατάλληλα S-προστατευμένες κυστεϊνές, ώστε να μπορεί να σχηματισθεί πρώτα η μία μόνο -S-S- γέφυρα που θα ανήκει ήδη σε δακτύλιο (43), μετά η δεύτερη (44) και στο τέλος να απομακρυνθεί η διφθαλυλοξυκαρβονυλομάδα αφήνοντας δακτύλιο με δυο -S-S- γέφυρες (45), μόριο ανάλογο με τμήμα φυσικής πρωτεϊνής.



## H N-o-Νιτροφαινυλοσουλφενυλομέθοδος (εργ. 75, 77, 78, 82, 83, 87).

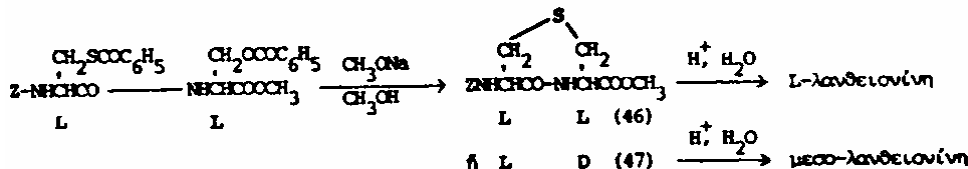
Συνεχίζοντας τις έρευνες για καινούργιες N-προστατευτικές ομάδες, ικανές να αποσπώνται σε ήπιες συνθήκες με οξέα, διαπίστωσε τη χρησιμότητα των τριτυλοσουλφένυλο ((C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>C-S-) και ο-νιτροφαινυλοσουλφένυλο (o-NO<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>S, Nps) ομάδων που δεν παρουσιάζουν τη στερεοχημική παρεμπόδιση της N-τριτυλομάδας (εργ. 75, 77). Η δεύτερη αποδείχθηκε εξαιρετικά χρήσιμη ομάδα. Κίτρινα Nps-παράγωγα όλων των αμινοξέων παρασκευάζονται εύκολα και κάνουν σύζευξη με άλλα αμινοξέα χωρίς ρακεμίωση. Η πεπτιδική αλυσίδα εύκολα αυξάνει από το N-τέλος χρησιμοποιώντας διαδοχικά N-Nps-αμινοξέα και όλες σχεδόν τις μεθόδους σύζευξης. Στο τέλος κάθε βαθμίδας της σύνθεσης η ομάδα αποσπάται με δύο ισοδύναμα HCl σε οργανικό διαλύτη, δηλ σε συνθήκες που δεν επηρεάζουν άλλες επίσης ευαίσθητες σε οξείωση ομάδες, όπως είναι οι N-t-βουτυλοξυ-καρβονυλο, N-τριτυλο, O-t-βουτυλεστερομάδα κ. ά. που έτσι μπορούν να χρησιμοποιηθούν συγχρόνως για προστασία πλευρικών ομάδων ή του τελικού καρβοξυλίου.



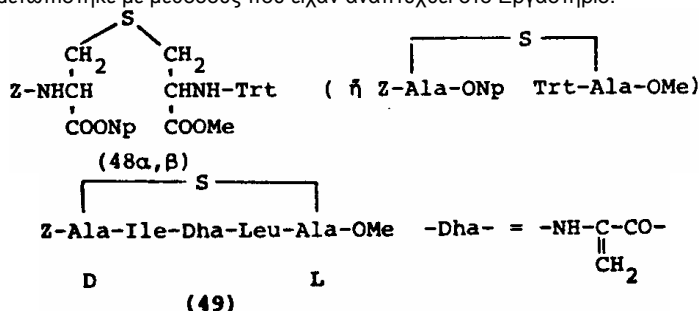
Ένας άλλος τρόπος απόσπασης της Nps- είναι με θειοφαινολικό νάτριο που συγχρόνως αποσπά και υπάρχοντες φαινακυλεστέρες (εργ. 78, 82, 87), ενώ μετάθεση N→S της Nps- ομάδας επίσης μπορεί να αποφευχθεί (εργ. 83). Η ομάδα Nps- χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία σε μεγάλη ποικιλία συνθέσεων που έγιναν στο εργαστήριο της Αθήνας και σε πολλά άλλα.

## Κυκλικά ασύμμετρα λανθειονυλοπεπτιδία (L- ή μέσο-) (εργ. 90, 91, 94-96, 100, 101).

Η χημική ιδιοφυΐα του Ζέρβα αποτυπωμένη στις εργασίες του πιστοποιείται από διάφορες σκοπίες όπως αντικείμενου έρευνας που πάντα ήταν επίκαιρο και σημαντικό, επίλυσης των προβλημάτων με πρωτότυπο και κομψό τρόπο, επισήμανσης και διαλεύκανσης των ανεπιθύμητων παράπλευρων αντιδράσεων που πολλές φορές οδήγησαν σε νέα γραμμή έρευνας. Έτσι στη διάρκεια των εργασιών για τη χρησιμοποίηση της βενζυλομάδας στην προστασία κυστεΐνης και σερίνης παρατηρήθηκε ο σχηματισμός κυκλικών μονομερών ή διμερών παραγώγων L- (46) και μέσο-λανθειονίνης (47) ενός αμινοξέος που έχει βρεθεί σε υδρολύματα πρωτεΐνων που κατεργάστηκαν με αλκάλι, αλλά και στη δομή αντιβιοτικών όπως είναι η νισίνη. Η εξακρίβωση του μηχανισμού σχηματισμού ο σχηματισμού της στερεοχημικής δομής ήταν ένα δυσκολώτατο εγχείρημα που κατορθώθηκε με επιτυχία (εργ. 90, 91).



Το ίδιο δύσκολο ήταν και η ανεύρεση μεθόδου για τη συνθετική παρασκευή τέτοιων κυκλικών παραγώγων L-λανθειονίνης και μέσο-λανθειονίνης. Με πρωτότυπη μέθοδο έγινε η σύνθεση ασύμμετρων ενώσεων (48α, β) όπου οι δύο α-αμινομάδες και τα δύο α-καρβοξύλια της L- ή μέσο-λανθειονίνης έχουν διαφοροποιηθεί με κάλυψη από διαφορετικές προστατευτικές ομάδες. Το παράγωγο της L-λανθειονίνης (48α) έδωσε παραπέρα με κυκλοποίηση τον δακτύλιο (46) ενώ της μέσο-λανθειονίνης (48β) τον (47). Επίσης χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση παραγώγων του πρώτου δακτυλίου της νισίνης. Έτσι από την ένωση 48β πραγματοποιήθηκε η σύνθεση για πρώτη φορά, σε πολλά στάδια του δακτυλίου (49). Η ύπαρξη του ακόρεστου αμινοξέος δεϋδροαλανίνη (Dha) ήταν μια πρόσθετη δυσκολία που αντιμετωπίστηκε με μεθόδους που είχαν αναπτυχθεί στο Εργαστήριο.



Ίσως η ανάπτυξη νέων συνθετικών μεθόδων και η εφαρμογή τους σε πολύπλοκες συνθέσεις προβάλλουν από αυτήν την ανάλυση σαν απλό και εύκολο εγχείρημα. Ωστόσο στις περισσότερες εργασίες αντιμετωπίστηκαν πολλές και σοβαρές δυσκολίες που προβλημάτισαν τον Ζέρβα και τους συνεργάτες του. Έτσι υφάνθηκε ένα κοινό πλέγμα εκτεταμένης και πολύπλευρης έρευνας που δεν ήταν δυνατόν να παρουσιαστεί στην πιο πάνω ανάλυση.

## Μονογραφίες\* (εργ. 40, 89)

Η εργασία 40 είναι μια εκτεταμένη μονογραφία (63 σελ.) με τίτλο «Λευκώματα» που καλύπτει όλη την ως τότε σχετική βιβλιογραφία. Η εργασία 89 με τον τίτλο «Επί τα ίχνη μιας επιστημονικής έρευνας» αποτελεί ένα είδος σύντομης επιστημονικής αυτοβιογραφίας κι όπως όλα τα κείμενά του είναι υπόδειγμα βαθειάς γνώσης και σκέψης εκφρασμένης με ακριβολογία και κομψότητα.

\* Άλλα πολλά κείμενά του, πρότυπα στο είδος τους, όπως εκθέσεις για το επιστημονικό έργο υποψηφίων, προσφωνήσεις επιστημόνων στην Ακαδημία και ανάπτυξη του έργου τους δεν καταγράφηκαν σ' αυτήν την ανάλυση.

[I. Βουρβίδου-Φωτάκη, Χημικά Χρονικά 46, 40-47 (Δεκέμβριος 1981)]