



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»

ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ « ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ »

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Σύνθεση και Χαρακτηρισμός Πολυλειτουργικών Συμπολυμερών
Πολυαιθυλενοξειδίου, Πολυιστιδίνης και Πολυτυροσίνης. Φαινόμε-
να συσσωμάτωσης σε υδατικά μέσα.**

ΛΙΑΡΟΥ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ-ΕΛΕΝΗ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ

ΜΑΪΟΣ 2016

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Σύνθεση και Χαρακτηρισμός Πολυλειτουργικών Συμπολυμερών Πολυαιθυλενοξειδίου, Πολυσιτιδίνης και Πολυτυροσίνης. Φαινόμενα συσσωμάτωσης σε υδατικά μέσα.

ΛΙΑΡΟΥ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ-ΕΛΕΝΗ

A.M.: 141006

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

ΙΑΤΡΟΥ ΕΡΜΟΛΑΟΣ, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ :

Ιατρού Ερμόλαος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Πιτσικάλης Μαρίνος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Σακελλαρίου Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

24/06/2016

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η σύνθεση μιας σειράς pH-αποκρινόμενων αμφίφι-λων πολυμερικών συστημάτων και η μελέτη τους ως πολυλειτουργικά συστήματα με πιθανότη-τα μελλοντικής εφαρμογής τους ως συστήματα μεταφοράς αντικαρκινικών φαρμάκων. Για πρώτη φορά, έγινε σύνθεση του N-καρβοξυανυδρίτη (NCA) της τυροσίνης, με προστατευτική ομάδα υδροξυλίου του φαινολικού δακτυλίου, την τερτ-βουτυλ-ομάδα (Tyr(t-Bu)-OH). Στη συ-νέχεια παρασκευάστηκαν γραμμικά όμο-, συν- και τριπολυπεπτίδια με καλά καθορισμένα μο-ριακά χαρακτηριστικά. Ο πολυμερισμός των N-καρβόξυανυδριτών α-αμινοξέων πραγματοποιή-θηκε μέσω πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου. Ως απαρχητής των δισυσταδικών συν- και τρι-πολυπεπτιδίων χρησιμοποιήθηκε ο μακροαπαρχητής αμινοτελικό-πολυαιθυλενοξειδίο (PEO-NH₂), ενώ για τη σύνθεση του ομοπολυμερούς χρησιμοποιήθηκε η δευτεροταγής αμίνη διμεθυ-λαμίνη. Για τη σύνθεση των μονομερών N-καρβοξυανυδριτών των α-αμινοξέων αλλά και για τους καθαρισμούς των διαλυτών, χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές υψηλού κενού, απαλλάσσοντας το σύστημά μας από οποιάδήποτε πρόσμιξη (υγρασία, οξυγόνο) που θα οδηγούσε σε μη ελεγχόμε-νο πολυμερισμό. Τα πολυμερή που συντέθηκαν είναι αμφίφιλα υβριδικά δισυσταδικά τριπολυ-μερή τύπου PEO-*b*-Poly(His-*co*-Tyr χ), όπου His = Ιστιδίνη και Tyr = Τυροσίνη, με διαφορετι-κούς λόγους His/Tyr (χ= 10, 20 και 30% Tyr ως προς τα mole της συστάδας), το ομοπολυμερές πολυτυροσίνης και το δισυσταδικό συμπολυμερές πολυ(αιθυλενοξειδίο-*b*-τυροσίνη) PEO-*b*-PTyr. Στη συνέχεια μελετήθηκε ο τρόπος επίδρασης των υδρόφοβων μονομερικών μονάδων της τυροσίνης στη δευτεροταγή δομή των πολυμερών καθώς και η αυτοοργάνωσή τους, με τη χρήση κυκλικού διχρωισμού και φασματοσκοπία FT-IR.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Πολυμερή

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: πολυλειτουργικά, αμφίφιλα πολυπεπτίδια, αυτοοργάνωση, δευτεροταγής δομή, σύνθεση NCAs

ABSTRACT

The current survey investigates the synthesis of a series of three pH-responsive amphiphilic block terpolymers, their role as multifunctional polypeptide systems and their future potential as drug delivery systems. For that reason, well-defined homo- and copolypeptides with controllable molecular characteristics, were synthesized through Ring Opening Polymerization of N-carboxyanhydrides of two α -amino acids (NCAs). For the synthesis of the well-defined homopolymer of polytyrosine, the initiator that was used was the secondary amine, dimethylamine. Moreover, for the synthesis of the co- and terpolymers, the initiator was the aminofunctionalized PEO-NH₂. Furthermore, herein, the synthesis of the Tyr(t-Bu)-OH NCA is presented for the first time since, only the benzyl protecting group was used for this synthesis, previously. High vacuum techniques were used for the purification of reagents, solvents and for the synthesis of NCAs and polymers. In this way, the high purity of monomers along with the high vacuum techniques resulted to the synthesis of well-defined amphiphilic hybrid polymers of PTyr, PEO-*b*-PTyr, and PEO-*b*-P(His-co-Tyr *x*), where *x* represents the molar percentage of tyrosine. The results revealed that, the presence of tyrosine residues affected the secondary structure of the polypeptide chain, promoting the beta sheet conformation and gave the potential of a supersecondary structure as motif.

SUBJECT AREA: Polymers

KEYWORDS: multifunctional, polypeptides, self-assembly, secondary structure, NCAs

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Ερμόλαο Ιατρού, καθηγητή του Πανεπιστημίου Αθηνών, για τη συνεργασία και την πολύτιμη συμβολή του στην ολοκλήρωσή της.

Επίσης, τους καθηγητές κ. Πιτσικάλη Μαρίνο και κ. Σακελλαρίου Γιώργο, για τις πολύτιμες συμβουλές τους όσο καιρό βρισκόμουν στο εργαστήριο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους μου από το Εργαστήριο Βιομηχανικής Χημείας για την άριστη συνεργασία μας.

Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	19
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	19
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	21
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	21
2.1 Πρωτοταγής δομή και πεπτιδικός δεσμός.....	21
2.2 ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΗΣ ΔΟΜΗ	23
2.2.1 Η α-έλικα.....	24
2.2.2 Η β-πτυχωτή επιφάνεια ή β-φύλλο.....	25
2.2.3 Η β-στροφή.....	25
2.3 Άλλοι τύποι δευτεροταγών δομών	26
2.4 Πεπτιδική Σύνθεση.....	28
2.4.1 Σύνθεση πεπτιδίων με μικρό μοριακό βάρος και καθορισμένη αλληλουχία αμινοξέων	28
2.4.2 Σύνθεση σε διάλυμα.....	29
2.4.3 Σύνθεση σε στερεή φάση (μέθοδος Merrifield).....	29
2.4.4 Σύνθεση πεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους.....	31
2.5 Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (ROP) των N- καρβοξυανυδριτών α-αμινοξέων (NCAs)	32
2.5.1 Κανονικός Μηχανισμός Πολυμερισμού (NAM)	32
2.5.2 Κινητική Μελέτη Του Πολυμερισμού	34
2.5.3 Πολυμερισμός N-καρβοξυανυδριτών α-αμινοξέων από ισχυρές βάσεις.....	36
(Μηχανισμός του Blout)	36
2.5.4 Μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς (A.M.M).....	38

2.6 Χρήση υψηλού κενού για τη σύνθεση πολυπεπτιδίων	39
2.7 Σύνθεση N-καρβοξυανυδριτών α-αμινοξέων (NCAs).....	42
2.8 Προστατευτικές Ομάδες.....	44
2.8.1 Προστασία α-αμινομάδας	44
2.8.2 Προστασία του καρβοξυλίου	47
2.8.3 Προστασία του Ιμιδαζολικού Δακτυλίου της Ιστιδίνης	48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	49
3.1 Αποκρίσιμα πολυμερή -πολυπεπίδια.....	49
3.1.1 pH – Ευαισθητα Πολυμερή.....	50
3.1.2 Πολυβάσεις	51
3.1.3 Σχεδιασμός για την Επίτευξη Κρίσιμου pH.....	52
3.2 Μικκυλιακές δομές.....	53
3.3 Πολυμεροσώματα.....	54
3.3.1 Πολυμεροσώματα δομή και ιδιότητες.....	56
3.3.2 Πολυμεροσώματα κινητική σχηματισμού.....	58
3.3.3 Μέθοδοι παρασκευής πολυμεροσωμάτων	60
3.3.4 Ιδιότητες και εφαρμογές πολυμεροσωμάτων	62
3.3.5 Χημεία επιφανείας πολυμεροσωμάτων.....	63
3.3.6 Εφαρμογές πολυμεροσωμάτων	64
3.4 Συμπεράσματα.....	65
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	66
ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ	66
4.1 Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών	66
4.2 Φασματοσκοπία υπερύθρου Infra Red (IR)	67
4.3 Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός(NMR)	69
4.4 Κυκλικός διχρωϊσμός πολυπεπτιδίων	72

4.5 Σκέδαση Φωτός (Light Scattering)	75
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	79
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	79
5.1 Τεχνική υψηλού κενού (HVT)	79
5.2 Καθαρισμός διαλυτών.	82
5.3 Σύνθεση του N-Καρβοξυανυδρίτη της BOC-προστατευμένης-t-Bu-τυροσίνης (Tyr(t-Bu)-NCA).....	83
5.3.1 Σύνθεση N ^{im} -Trt-(L)-His-NCA	86
5.3.2 Σύνθεση N ^{im} -Trt-(L)-His*HCl NCA.....	86
5.3.3 Σύνθεση του Nim-trityl-His NCA.....	88
5.4 Σύνθεση του ομοπολυμερούς της Tyr (PTyr) με Mn=6k g*mol ⁻¹	89
5.4.1 Αποπροστασία του ομοπολυμερούς PTyr.....	91
5.5 Σύνθεση υβριδικών γραμμικών κατά συστάδες συμπολυμερών	93
5.5.1 Σύνθεση του γραμμικού, τυχαίου, δισυσταδικού συμπολυμερούς πολυαιθυλενοξειδίου- <i>block</i> -πολυτυροσίνης (PEO- <i>b</i> -PTyr)	93
5.5.2 Σύνθεση πολυ(αιθυλενοξειδίου)- <i>block</i> -πολυ(L-Ιστιδίνη-co-Τυροσίνη),.....	96
PEO- <i>b</i> -P(L-His-co-Tyr)	96
5.6 Μοριακός χαρακτηρισμός μονομερών και πολυμερών	99
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6	100
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	100
6.1 Σύνθεση N-Καρβοξυανυδριτών α-αμινοξέων.....	100
6.1.1 Σύνθεση του Tyr(t-Bu)-NCA	100
6.1.2 Σύνθεση του N ^{im} -trityl-(L)-His-NCA*HCl.....	103
6.2 Σύνθεση ομοπολυμερούς πολυτυροσίνης (PTyr).....	107
6.3 Αμφίφιλο Δισυσταδικό Συμπολυμερές PEO- <i>b</i> -PTyr.....	109
6.4 Αμφίφιλα Δισυσταδικά Τριπολυμερή του τύπου PEO- <i>b</i> -P(His-co-Tyr).....	110
6.5 Κυκλικός Διχρωισμός (CD) και δευτεροταγής δομή των δισυσταδικών τριπολυμερών..	112

6.5.1 pH-εξάρτηση του PEO- <i>b</i> -PTyr	113
6.5.2 Θερμοκρασιακή- και pH-εξάρτηση της δευτεροταγούς δομής του PEO- <i>b</i> -P(70%His-co-30%Tyr).	115
6.5.3 Θερμοκρασιακή- και pH-εξάρτηση της δευτεροταγούς δομής του PEO- <i>b</i> -P(80%His-co-20%Tyr).	117
6.5.4 Θερμοκρασιακή- και pH-εξάρτηση της δευτεροταγούς δομής του PEO- <i>b</i> -P(90%His-co-10%Tyr).	120
6.5.5 Διαμοριακές δυνάμεις μεταξύ των πλευρικών ομάδων.	123
6.6 Ο ρόλος της πλευρικής ομάδας της τυροσίνης.	127
6.7 Ο ρόλος του πολυαιθυλενοξειδίου στη δευτεροταγή δομή.....	128
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	129
ΑΝΑΦΟΡΕΣ	131

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση της συσκευής ανακρυσταλλώσεων των μονομερών NCAs με την χρήση τεχνικών υψηλού κενού.	40
Εικόνα 2: Γενικό σχήμα συμπεριφοράς των pH-αποκρινόμενων πολυμερών που λειτουργούν ως οχήματα αντικαρκινικών φαρμάκων και εισάγονται στο κύτταρο μέσω ενδοκύτωσης.	51
Εικόνα 3: Διάφορες μορφές μικυλλιακών δομών πολυσυσταδικών συμπολυμερών σε διάλυμα.	54
Εικόνα 4: Μεμβρανική διαμόρφωση των πολυμεροσωμάτων που σχηματίζονται με diblock (AB), triblock (ABA,BAB,ABC), multiblock copolymers και mikto-arm copolymers. ⁵⁷	58
Εικόνα 5: Διαγράμματα φάσης συμπολυμερών/νερού. ⁵⁷	59
Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση της κατανομής μεγέθους των πολυμεροσωμάτων ανάλογα με τη μεθολογία που εφαρμόστηκε για την παρασκευή τους. ⁵⁷	62
Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση των αποκρινόμενων πολυμεροσωμάτων με τις ιδιότητές τους. ⁵⁷	64
Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση ενός λέιζερ σκέδασης φωτός.	78
Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση της γραμμής υψηλού κενού.....	80
Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση της αντλίας διαχύσεως υδραργύρου.....	81
Εικόνα 11: Απόσταξη-Καθαρισμός θειονυλοχλωριδίου (SOCl ₂) στη γραμμή υψηλού κενού....	84
Εικόνα 12: Συσκευή που στήθηκε για τη σύνθεση του Tyr(t-Bu)-NCA	85
Εικόνα 13: Συσκευή αντίδρασης πολυμερισμού.....	94
Εικόνα 14: Πιθανή διαμοριακή σύνδεση μεταξύ τυροσίνης-ιστιδίνης α) με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ του -OH της τυροσίνης και του καρβονυλίου της ιστιδίνης και β) με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ πλευρικών ομάδων	127
Εικόνα 15 : Ο ‘προστατευτικός’ ρόλος του PEO στην κύρια αλυσίδα.....	128

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1: Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού από δύο αμινοξέα.	21
Σχήμα 2: Η κατεύθυνση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας	22
Σχήμα 3: Γωνίες στροφής της πεπτιδικής αλυσίδας	22
Σχήμα 4: Δομές συντονισμού του πεπτιδικού δεσμού	23
Σχήμα 5 : Σχηματική αναπαράσταση της στροφής της α-έλικας στο χώρο (a), των δεσμών υδρογόνου (b) και των θέσεων των ατόμων της κύρια αλυσίδας και των πλευρικών ομάδων (c).	24
Σχήμα 6: Απεικόνιση της πτύχωσης μιας β-πτυχωτής επιφάνειας με την ύπαρξη δεσμών υδρογόνου	25
Σχήμα 7: Σχηματική απεικόνιση β-στροφής	26
Σχήμα 8: Πεπτιδική σύνθεση στερεάς φάσης κατά Merrifield.	30
Σχήμα 9: Πολυμερισμός των N-καρβοξυανυδριτών α-αμινοξέων (NCA)	32
Σχήμα 10: Στάδιο έναρξης πολυμερισμού NCA με πυρηνόφιλο απαρχητή	33
Σχήμα 11: Στάδιο διάδοσης πολυμερισμού NCA με πυρηνόφιλο απαρχητή.	33
Σχήμα 12: Διάγραμμα του λογάριθμου A_0/A_t συναρτήσει του χρόνου για 4 διαφορετικές αναλογίες ανυδρίτη/απαρχητή, $[A_0]=0.152$	35
Σχήμα 13: α) Προσβολή στον C5, β) προσβολή στον C2.....	36
Σχήμα 14: Πιθανές πορείες κατά τον πολυμερισμό NCA με ισχυρές βάσεις.....	37
Σχήμα 15: Μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς (A.M.M).	39
Σχήμα 16: Οι παράπλευρες αντιδράσεις από νερό και υδροχλωρίο.	40
Σχήμα 17: Σύνθεση N-καρβόξυ ανυδριτών με τη μέθοδο Leuchs.....	42
Σχήμα 18 : α) Σχηματισμός N-Καρβοξυανυδρίτη με την μέθοδο “Fuchs- Farthing” μέσω του N-χλωροφόρμυλο αμινοξέος, β) απόδειξη αυτού με την προσθήκη ανιλίνης	43
Σχήμα 19: Προστατευτική Z-ομάδα.....	45
Σχήμα 20: Μηχανισμός αποπροστασίας από οξέα.	46
Σχήμα 21: Δομή της προστατευτικής Bros-ομάδας.	46
Σχήμα 22: Η προστατευτική ομάδα Fmoc.	46
Σχήμα 23: Η τρίτυλο-ομάδα.....	47
Σχήμα 24: Σύνθεση του προστατευμένου μονομερούς L-ιστιδίνης.....	48

Σχήμα 25: Χημική δομή του δισυσταδικού συμπολυμερούς PEG-PHIS. Ο αστερίσκος (*) υποδεικνύει το ασύζευκτο ζεύγος ηλεκτρονίων που είναι διαθέσιμο για την πρωτονίωση/αποπρωτονίωση σε pH γύρω από το pKa.	52
Σχήμα 26: Φάσμα κυκλικού διχρωισμού της πολυπεπτιδικής αλυσίδας σε διαμόρφωση α-έλικας (κόκκινη καμπύλη), β-φύλλου (πράσινη καμπύλη), δομή τυχαίου σπειράματος (μπλε καμπύλη) και στροφής (πορτοκαλί καμπύλη).	72
Σχήμα 27: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού σύνθεσης του Tyr(t-Bu)-NCA.....	86
Σχήμα 28: Αναπαράσταση της συσκευής για τη σύνθεση του N ^{im} -trityl-His-NCA.....	87
Σχήμα 29: Μηχανισμός ROP για ομοπολυμερισμό με απαρχητή τη διμεθυλαμίνη.	89
Σχήμα 30: Μηχανισμός σύνθεσης του ομοπολυμερούς PTyr μέσω ROP.	91
Σχήμα 31: Μηχανισμός της αντίδρασης απομάκρυνσης της t-Butyl ομάδας με χρήση TFA. ¹⁰² ..	92
Σχήμα 32: Αντίδραση ROP προς σχηματισμό του συμπολυμερούς PEO- <i>b</i> -PTyr.....	96
Σχήμα 33: Συνθετική πορεία των δισυσταδικών τριπολυμερών PEO- <i>b</i> -P(His-co-Tyr).....	97
Σχήμα 34: Φάσματα FT-IR που αποδυνάμυνουν την πρόοδο της αντίδρασης σχηματισμού του Tyr(t-Bu)-NCA όπου : i. Η BOC-Tyr(t-Bu)-OH , ii. 30 min μετά την έναρξη της αντίδρασης, iii. Σχηματισμός του τελικού προϊόντος.	101
Σχήμα 35: Φάσμα ¹ H NMR του Tyr(t-Bu)-NCA.....	102
Σχήμα 36: Φάσματα FTIR για την περιγραφή της πορείας της σύνθεσης του N-καρβοξυ ανυδρίτη L-ιστιδίνης.	104
Σχήμα 37: Φάσμα ¹ H-NMR της N ^{im} -trityl-(L)-His-NCA*HCl σε d-CDCl ₃	105
Σχήμα 38: Φάσμα ¹ H-NMR της N ^{im} -trityl-(L)-His-NCA σε d-CDCl ₃	106
Σχήμα 39: Φάσματα FT-IR για την περιγραφή της πορείας της σύνθεσης του ομοπολυμερούς της τυροσίνης.....	108
Σχήμα 40: Φάσμα ¹ H-NMR του ομοπολυμερούς της PTyr.	108
Σχήμα 41: Φάσμα ¹ H-NMR του δισυσταδικού συμπολυμερούς PEO- <i>b</i> -PTyr σε δευτεριωμένο TFA.	109
Σχήμα 42: Φάσμα ¹ H-NMR του προστατευμένου δισυσταδικού τριπολυμερούς PEO- <i>b</i> -P(70%His-co-30%Tyr) σε δευτεριωμένο TFA.	110
Σχήμα 43: Φάσμα ¹ H-NMR του αποπροστατευμένου δισυσταδικού τριπολυμερούς PEO- <i>b</i> -P(70%His-co-30%Tyr) σε δευτεριωμένο TFA.	111
Σχήμα 44: Φάσμα CD του δισυσταδικού συμπολυμερούς PEO- <i>b</i> -PTyr σε διαφορετικές τιμές pH.	113

Σχήμα 45: Φάσματα CD του δυσυσταδικού τριπολυμερούς PEO- <i>b</i> -P(70%His-co-30%Tyr) σε pH 3,5,6,10 για διαφορετικές θερμοκρασίες.....	115
Σχήμα 46: Πιθανή διαμοριακή σύνδεση μεταξύ τυροσίνης-ιστιδίνης με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ του -OH της τυροσίνης και α) του αμινοτελικού άκρου της ιστιδίνης και β) του καρβονυλίου της ιστιδίνης.	116
Σχήμα 47: Φάσματα CD του δυσυσταδικού τριπολυμερούς PEO- <i>b</i> -P(70%His-co-30%Tyr) για διαφορετικές τιμές pH.....	117
Σχήμα 48: Φάσμα CD για το PEO- <i>b</i> -P(80%His-co-20%Tyr) για διαφορετικές τιμές pH.	117
Σχήμα 49: Φάσμα CD θερμοκρασιακής εξάρτησης του PEO- <i>b</i> -P(80%His-co-20%Tyr) για pH 12.....	118
Σχήμα 50: Φάσματα CD του δυσυσταδικού τριπολυμερούς PEO- <i>b</i> -P(90%His-co-10%Tyr) για διαφορετικές τιμές pH.....	121
Σχήμα 51: Φάσματα CD του δυσυσταδικού τριπολυμερούς PEO- <i>b</i> -P(70%His-co-30%Tyr) (κόκκινο) σε σύγκριση με το PEO- <i>b</i> -P(90%His-co-10%Tyr) (μπλε) σε pH 3,5,7,9 για διαφορετικές θερμοκρασίες.....	122
Σχήμα 52 : Φάσματα CD του διαλύματος που περιέχει τα πολυμερή PEO-PHis και PEO-PTyr αναμεμειγμένα σε DMSO, για α) διαφορετικές θερμοκρασίες και β) pH	123
Σχήμα 53 : Φάσματα CD του διαλύματος που περιέχει τα πολυμερή PEO-PHis και PTyr αναμεμειγμένα σε DMSO.	125

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Σχετικές συχνότητες αμινοξέων σε δευτεροταγής δομές.	27
Πίνακας 2: Απορροφήσεις διάφορων χαρακτηριστικών ομάδων με τις αντίστοιχες εντάσεις.	68
Πίνακας 3: Αποτελέσματα ανάλυσης δευτεροταγούς δομής για το PEO- <i>b</i> -Ptyr συναρτήσει του pH.....	113
Πίνακας 4: Αποτελέσματα ανάλυσης δευτεροταγούς δομής για το PEO- <i>b</i> -Ptyr συναρτήσει της θερμοκρασίας για το pH 12.....	114
Πίνακας 5: Αποτελέσματα του αλγορίθμου BeStSel για τη δευτεροταγή δομή του PEO- <i>b</i> -P(80%His-co-20%Tyr) για διάφορες τιμές pH, στους 25°C.....	118
Πίνακας 6: Αποτελέσματα του αλγορίθμου BeStSel για τη δευτεροταγή δομή του PEO- <i>b</i> -P(80%His-co-20%Tyr) για διάφορες θερμοκρασίες, σε pH 12.	119
Πίνακας 7 : Αποτελέσματα του αλγορίθμου BeStSel για τη δευτεροταγή δομή των πολυμερών PEO-PHis και PEO-PTyr σε DMSO και σε pH ~7 για διαφορετικές θερμοκρασίες.	124
Πίνακας 8 : Αποτελέσματα του αλγορίθμου BeStSel για τη δευτεροταγή δομή των πολυμερών PEO-PHis και PEO-PTyr σε DMSO και σε T=25 °C για διαφορετικές τιμές pH	125
Πίνακας 9: Αποτελέσματα του αλγορίθμου BeStSel για τη δευτεροταγή δομή των πολυμερών PEO-PHis και PTyr αναμεμιγμένων σε DMSO και σε pH ~7 και διαφορετικές θερμοκρασίες.	125
Πίνακας 10 : Αποτελέσματα του αλγορίθμου BeStSel για τη δευτεροταγή δομή των πολυμερών PEO-PHis και PTyr αναμεμιγμένων σε DMSO, σε διαφορετικές τιμές pH.	126

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Στόχος Εργασίας – Πρωτοτυπία

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο της Βιομηχανικής Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά τη χρονική περίοδο 2014-2016, υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Ερμόλαου Ιατρού.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν ο σχεδιασμός, η σύνθεση και η μελέτη δισυσταδικών πολυλειτουργικών και pH-αποκρίσιμων τριπολυμερών, τα οποία συνδυάζουν μια στατιστική συστάδα και μια συστάδα ομοπολυμερούς. Το χαρακτηριστικό γνώρισμα μιας στατιστικής συστάδας είναι ότι συνδυάζει τις φυσικοχημικές ιδιότητες των μονομερών που την αποτελούν-συνθέτουν. Μελετήθηκε η υιοθέτηση δευτεροταγούς δομής για κάθε ένα από τα πολυμερή που συντέθηκαν καθώς επίσης, ο ρόλος της συμμετοχής της τυροσίνης στην υδρόφοβη συστάδα, αναφορικά με τα φαινόμενα συσσωμάτωσης και τη δευτεροταγή δομή της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Η πρωτοτυπία της παρούσας εργασίας αφορά την πιθανότητα υιοθέτησης υπερδευτεροταγούς δομής της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, σύμφωνα με αλγοριθμικές προσεγγίσεις.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τελευταία χρόνια, έχει υπάρξει μεγάλο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη βιοαποκρίσιμων, πολυλειτουργικών πολυπεπτιδικών συστημάτων, τα οποία έχουν προοπτικές εφαρμογής ως μεταφορείς φαρμάκων. Η μελέτη αυτών των συστημάτων βασίζεται στην πληθώρα των χημικών και φυσικών ιδιοτήτων τους που τα καθιστούν, κυρίως, αποκρίσιμα σε φυσιολογικά περιβάλλοντα. Παρά την εξελιξιμότητα όλων των αποκρίσιμων συστημάτων και υλικών, τα πολυπεπτίδια κυριαρχούν στο ενδιαφέρον πολλών εργαστηρίων καθώς, αποτελούν τα πλέον βιοαποκρίσιμα και βιοαποικοδομήσιμα συστήματα, ικανά να δρουν και ως βιομιμητές.

Από συνθετικής απόψεως, η υπεροχή των πολυπεπτιδικών συστημάτων έγκειται στην πληθώρα μονομερών που τα συνθέτουν και αυτά δεν είναι άλλα από τα αμινοξέα τα παράγωγά τους, τα οποία εκτός από φιλικά προς τον ανθρώπινο οργανισμό, επιδέχονται χημική τροποποίηση και η δευτεροταγής δομή την οποία υιοθετούν προάγει συγκεκριμένες βιοχημικές λειτουργίες. Αξιοσημείωτο παράδειγμα αποτελεί, μεταξύ άλλων, ο ρόλος του β-φύλλου στο Alzheimer's και στην αμυλοείδωση, ο οποίος μπορεί να ελεγχθεί με πολυπεπτιδικά συστήματα.

Η επιτυχής σύνθεση πολυπεπτιδίων που μπορεί να προσεγγίσει επαρκέστερα τις ιδιότητες φυσικών πρωτεϊνών απαιτεί τη δυνατότητα ελέγχου της ακολουθίας των αμινοξέων καθώς επίσης και το ίδιο το μήκος αλυσίδων. Για το λόγο αυτό, παρά τα πολυάριθμα πλεονεκτήματα αυτής της συνθετικής στρατηγικής, υπήρξαν και εξακολουθούν να υπάρχουν δυσκολίες στη σύνθεση αυτών των συστημάτων, όσον αφορά την εργαστηριακή προσέγγισή τους. Μερικές από αυτές, είναι οι αντιδράσεις τερματισμού και μεταφοράς αλυσίδας κατά την διάρκεια του πολυμερισμού με αποτέλεσμα να μην είναι πάντα δυνατός ο έλεγχος του μοριακού βάρους και της κατανομής των πολυμερών που παράγονται. Επίσης, τα μονομερή είναι ανυδρίτες και είναι ευαίσθητοι στην υγρασία του αέρα και οι συνθήκες παρασκευής, καθαρισμού, φύλαξης και πολυμερισμού μέχρι τώρα με χρήση αδρανούς ατμόσφαιρας δεν επέτρεπαν τον πλήρη αποκλεισμό της υγρασίας.

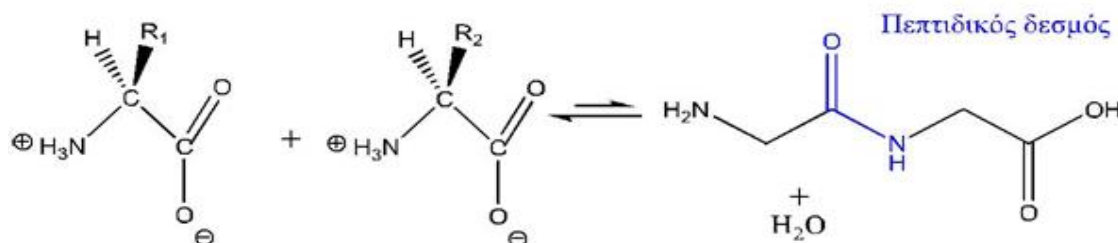
Συμπερασματικά, τα πολυπεπτιδικά συστήματα διαθέτουν πληθώρα πλεονεκτημάτων και αποτελούν ελπιδοφόρα προσέγγιση για τις βιολογικές εφαρμογές, ωστόσο η περαιτέρω μελέτη τους είναι επιτακτική ανάγκη καθώς οι βιολογικές οδοί που καλούνται να διασχίσουν είναι αναρίθμητες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Πρωτοταγής δομή και πεπτιδικός δεσμός

Στις πρωτεΐνες ¹, η α-καρβοξυλομάδα ενός αμινοξέως ενώνεται με την α-αμινομάδα ενός άλλου αμινοξέως με έναν πεπτιδικό δεσμό, με ταυτόχρονη αποβολή ενός μορίου νερού. Η ισορροπία της αντίδρασης βρίσκεται προς την υδρόλυση παρά στη σύνθεση. Ο πεπτιδικός δεσμός είναι επίπεδος και έχει εν μέρει χαρακτήρα διπλού δεσμού ο οποίος εμποδίζει την περιστροφή γύρω από τον εαυτό του, καθιστώντας τον κινητικά σταθερό. Πιο συγκεκριμένα η απόσταση C-N στον πεπτιδικό δεσμό είναι 1,32 Å δηλαδή μεταξύ των τιμών 1,49 Å που είναι το μήκος ενός απλού δεσμού και 1,27 Å που είναι το μήκος ενός διπλού δεσμού. Επίσης σημαντικό είναι το γεγονός ότι ο πεπτιδικός δεσμός δεν έχει φορτίο, συνεπώς τα πολυμερή που περιεχούν τέτοιου είδους δεσμούς μπορούν να δημιουργούν σφαιρικές δομές χωρίς ενδιάμεσα κενά.

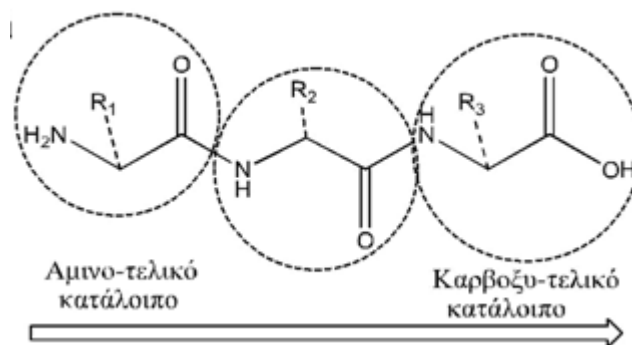


Σχήμα

Σχήμα 1: Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού από δύο αμινοξέα.

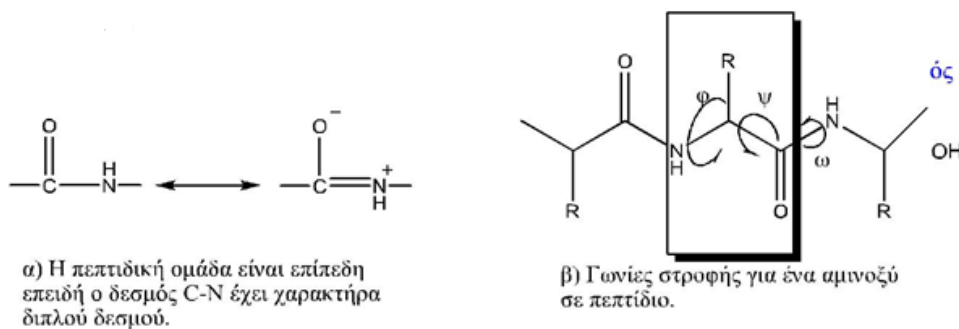
Πολλά αμινοξέα ενώνονται με πεπτιδικούς δεσμούς για να δημιουργήσουν μια πολυπεπτιδική αλυσίδα (σχ. 1). Μια ομάδα αμινοξέως λέγεται κατάλοιπο στην αλυσίδα, επιπλέον κάθε αλυσίδα έχει κατεύθυνση καθώς τα δομικά της στοιχεία έχουν διαφορετικά άκρα. Από χημικής πλευράς δεν υπάρχει διαχωρισμός μεταξύ πρωτεϊνών και πολυπεπτιδίων. Ονοματολογικά, αλυ-

σίδες με λιγότερα από δεκαπέντε αμινοξέα λέγονται πεπτίδια, έως πενήντα ονομάζονται πολυπεπτίδια ενώ μεγαλύτερες ονομάζονται πρωτεΐνες.



Σχήμα 2: Η κατεύθυνση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας

Το 1951, οι Pauling και Corey απέδειξαν με κρυσταλλογραφία ακτίνων X αμινοξέων, αμιδίων τους και απλών πεπτιδίων ότι ο δεσμός C-N είναι βραχύτερος από τον απλό δεσμό. Η απεντόπιση λόγω συντονισμού προσδίδει μερικό χαρακτήρα διπλού δεσμού. Η διαμόρφωση της πεπτιδικής αλυσίδας χαρακτηρίζεται από τρεις γωνίες στροφής (σχ.3), την ϕ $\{C(=O)-N-C^{\alpha}-C(=O)\}$, την ψ $\{N-C^{\alpha}-C(=O)-N\}$ και την ω $\{C^{\alpha}-C(=O)-N-C-\}$

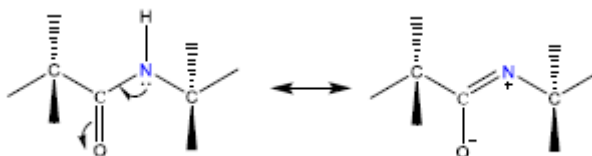


Σχήμα 3: Γωνίες στροφής της πεπτιδικής αλυσίδας

Η ελεύθερη περιστροφή γύρω από τον C-N αμιδικό δεσμό περιορίζεται δραστικά με ένα φράγμα περιστροφής $\sim 105 \text{ kJ mol}^{-1}$. Αντίθετα οι δεσμοί μεταξύ ενός ατόμου α-άνθρακα και του αζώτου και του άνθρακα του καρβονυλίου είναι καθαρά απλοί. Επομένως υπάρχει μεγάλη ελευθερία περιστροφής γύρω από αυτούς τους δεσμούς και προς τις δυο πλευρές της άκαμπτης πε-

πτιδικής ομάδας. Οι διαμορφώσεις που λαμβάνονται είναι η trans ($\omega=180^0$) και η cis ($\omega=0^0$). Η τελευταία είναι ενεργειακά προτιμότερη κατά 8kJ mol^{-1} και συναντάται στα περισσότερα πεπτίδια που δεν περιέχουν προλίνη.

Σε αντίθεση με τον πεπτιδικό δεσμό, οι δεσμοί οι οποίοι ενώνουν τις καρβονυλικές ομάδες με το άτομο του α-άνθρακα και τις αμινικές ομάδες με το άτομο του α-άνθρακα είναι απλοί δεσμοί, που σημαίνει ότι οι πρωτεΐνες μπορούν να περιστρέφονται αποκτώντας διάφορους προσανατολισμούς στο χώρο και να αναδιπλώνονται με πολλούς τρόπους. Η γωνία περιστροφής γύρω από το δεσμό N-αC ονομάζεται ϕ και η γωνία περιστροφής γύρω από το δεσμό του α C-CO ονομάζεται ψ . Οι γωνίες αυτές καθορίζουν την κατεύθυνση που θα έχει η πολυπεπτιδική αλυσίδα.



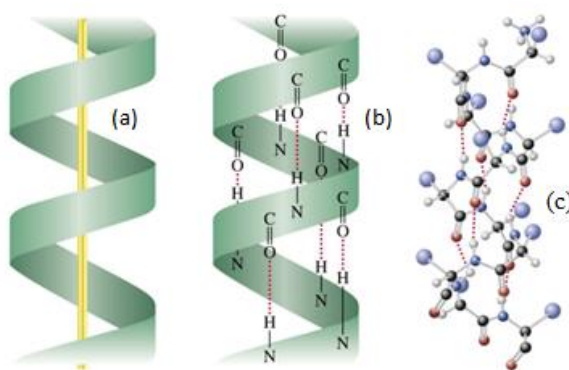
Σχήμα 4: Δομές συντονισμού του πεπτιδικού δεσμού

2.2 ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΗΣ ΔΟΜΗ

Οι πρωτεΐνες έχουν την ικανότητα να αναδιπλώνονται σε καλά καθορισμένες δομές. Η τελική διαμόρφωση που θα προτιμηθεί καθορίζεται από τις γωνίες περιστροφής ψ και ϕ και από άλλους παράγοντες σταθεροποίησης, όπως οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και οι δεσμοί υδρογόνου². Η έλλειψη ευελιξίας της αλυσίδας και οι περιορισμοί σχετικά με τις γωνίες περιστροφής περιορίζουν αρκετά τον αριθμό των δομών που μπορεί να επιτύχει η ξεδιπλωμένη μορφή της πρωτεΐνης κατά την αναδίπλωσή της. Το 1951 οι Linus Pauling και Robert Corey ανακάλυψαν με τη χρήση ακτίνων χ δύο περιοδικές δομές που τις ονόμασαν α-έλικα και β-πτυχωτή επιφάνεια. Στη συνέχεια προσδιορίστηκαν και άλλες δομές χωρίς όμως να παρουσιάζουν περιοδικότητα όπως η β-στροφή και η Ω-θηλιά, οι οποίες επηρεάζουν την τελική τρισδιάστατη δομή της αλυσίδας.

2.2.1 Η α -έλικα

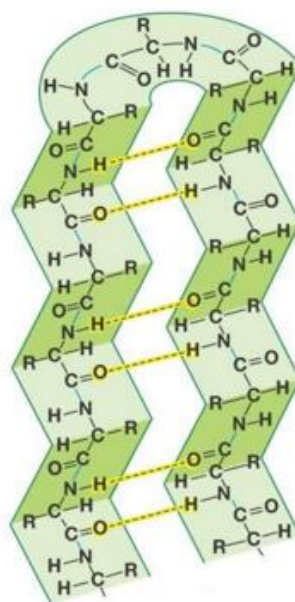
Η α -έλικα έχει δομή ράβδου. Η σφιχτά ελιγμένη πολυπεπτιδική κύρια αλυσίδα σχηματίζει το εσωτερικό μέρος της ράβδου, ενώ οι πλευρικές αλυσίδες εκτείνονται προς το εξωτερικό σε μία ελικοειδή διαμόρφωση. Η α -έλικα σταθεροποιείται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των ομάδων NH και CO της κύριας αλυσίδας. Η ομάδα CO είναι ενωμένη με δεσμό υδρογόνου με την ομάδα NH του αμινοξέος που βρίσκεται 4 μονάδες μπροστά από αυτή στη γραμμική αλληλουχία. Επομένως, όλες οι ομάδες CO και NH της κύριας αλυσίδας συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου. Κάθε κατάλοιπο απέχει από το προηγούμενο 0,15 nm (1,5 Å) κατά μήκος του άξονα της έλικας και έχει περιστραφεί σε σχέση με αυτό κατά 100° , δίνοντας έτσι 3,6 αμινοξέα ανά στροφή της έλικας. Επομένως, αμινοξέα που απέχουν τρεις ή τέσσερις θέσεις στη γραμμική αλληλουχία βρίσκονται πολύ κοντά σε μία α -έλικα. Αντιθέτως, αμινοξέα που απέχουν δύο θέσεις στη γραμμική αλληλουχία βρίσκονται απέναντι στην έλικα και επομένως δεν είναι δυνατόν να συναντηθούν. Η φορά στροφής της έλικας μπορεί να είναι είτε δεξιόστροφη είτε προς αριστερόστροφη. Οι α -έλικες στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες είναι δεξιόστροφες, γιατί η αριστερόστροφη ευνοείται λιγότερο ενεργειακά. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός, ότι δύο ή και περισσότερες α -έλικες μπορούν να περιελιχθούν σχηματίζοντας συσπειρωμένα σπειράματα, δημιουργώντας μια πιο σταθερή δομή με μηχανικό ρόλο.



Σχήμα 5 : Σχηματική αναπαράσταση της στροφής της α -έλικας στο χώρο (a), των δεσμών υδρογόνου (b) και των θέσεων των ατόμων της κύρια αλυσίδας και των πλευρικών ομάδων (c).

2.2.2 Η β -πτυχωτή επιφάνεια ή β -φύλλο

Η β -πτυχωτή επιφάνεια διαφέρει από την α -έλικα γιατί είναι μία επίπεδη δομή και όχι ράβδος. Μία πολυπεπτιδική αλυσίδα στη β -πτυχωτή επιφάνεια είναι σχεδόν τελείως ανοικτή και όχι σφιχτά περιελιγμένη όπως στην α -έλικα (σχ. 1.12). Η απόσταση μεταξύ γειτονικών αμινοξέων είναι 3,5 Å σε αντίθεση με το 1,5 Å της α -έλικας. Μία άλλη διαφορά είναι ότι οι β -πτυχωτές επιφάνειες σταθεροποιούνται από δεσμούς υδρογόνου μεταξύ NH και CO σε διαφορετικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες, ενώ στην α -έλικα πρόκειται για ομάδες της ίδιας αλυσίδας. Γειτονικές αλυσίδες σε μία β -πτυχωτή επιφάνεια μπορούν να έχουν την ίδια κατεύθυνση (παράλληλες β -πτυχωτές επιφάνειες) ή αντίθετη (αντιπαράλληλες β -πτυχωτές επιφάνειες).

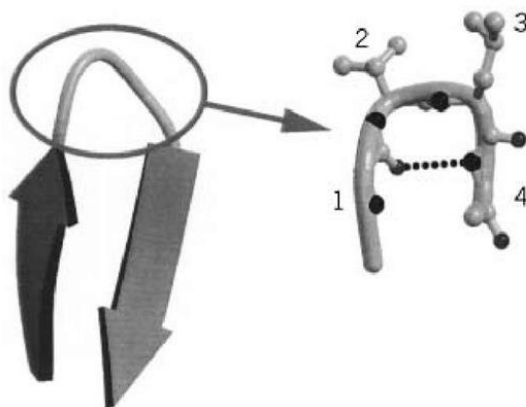


Σχήμα 6: Απεικόνιση της πτύχωσης μιας β -πτυχωτής επιφάνειας με την ύπαρξη δεσμών υδρογόνου

2.2.3 Η β -στροφή

Πέραν των δύο βασικότερων κατηγοριών της δευτεροταγούς δομής, η πολυπεπτιδική αλυσίδα μπορεί να αλλάζει κατεύθυνση λόγω ενός δομικού στοιχείου που ονομάζεται β -στροφή.

Η ουσία αυτής της στροφής φουρκέτας είναι ότι η ομάδα CO της θέσης n ενός πολυπεπτιδίου ενώνεται με δεσμό υδρογόνου με την ομάδα NH της θέσης $(n+3)$. Με τον τρόπο αυτό μία πολυπεπτιδική αλυσίδα μπορεί να αλλάξει ξαφνικά την κατεύθυνσή της. Οι β -στροφές συχνά συνδέουν αντιπαράλληλες β -πτυχωτές επιφάνειες, για το λόγο αυτό πήραν και αυτό το όνομα. Είναι ακόμα γνωστές ως στροφές αναστροφής ή κάμψεις φουρκέτας.



Σχήμα 7: Σχηματική απεικόνιση β -στροφής

2.3 Άλλοι τύποι δευτεροταγών δομών

Ορισμένοι σχηματισμοί ενός πλήθους δευτεροταγών δομών χαρακτηρίζονται ως "υπερ-δευτεροταγείς δομές", όπως οι β -ribbons, ω -loops, Greek-keys, helix-loop-helix και άλλοι. Η γενική τους αρχιτεκτονική καθορίζεται από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολυπεπτιδικών αλυσίδων, με αξιοσημείωτες τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ α -ελίκων και β -φύλλων. Για παράδειγμα, οι έλικες "πακετάρονται" με τα β -φύλλα, με τους άξονές τους σχεδόν παράλληλους σε αυτά, καθώς με αυτό τον τρόπο η επιφάνειά τους ταιριάζει με αυτά ³.

Περίληπτικά, η πρωτοταγής δομή είναι η αλληλουχία αμινοξέων και η θέση των δισουλφιδικών δεσμών, δηλαδή των διασυνδέσεων που προκύπτουν από την οξείδωση της κυστεΐνης (αμινοξύ που περιέχει την ομάδα HS-) μεταξύ διαφορετικών αλυσίδων ή απομακρυσμένων περιοχών στην ίδια αλυσίδα. Μπορούμε να πούμε ότι η πρωτοταγής δομή αποτελεί την πλήρη περιγραφή των ομοιοπολικών συνδέσεων σε μία πρωτεΐνη. Η δευτεροταγής δομή εξετάζει τη χωροδιάταξη των αμινοξέων που βρίσκονται το ένα δίπλα στο άλλο στην αλληλουχία (π.χ. α -έλικα, β -φύλλο). Η τριτοταγής δομή αναφέρεται στη στερεοδιάταξη αμινοξέων απομακρυσμένων με-

ταξύ τους στη γραμμική αλληλουχία και ο διαχωρισμός της από αυτή της δευτεροταγούς δομής είναι σχετικός. Τέλος, οι πρωτεΐνες που περιέχουν στο μόριό τους περισσότερες από μία πολυπεπτιδικές αλυσίδες (υπομονάδες) έχουν ακόμη ένα επίπεδο δομής. Η τεταρτοταγής δομή αναφέρεται στη χωροδιάταξη αυτών των υπομονάδων και στα είδη των επαφών τους.

Πίνακας 1: Σχετικές συχνότητες αμινοξέων σε δευτεροταγής δομές.

Ονομασία	Σύντμηση	α -έλικα	β -πτυχωτή επιφάνεια	β -στροφή
Αλανίνη	Ala	1,29	0,90	0,78
Κυστεΐνη	Cys	1,11	0,74	0,80
Λευκίνη	Leu	1,30	1,02	0,59
Μεθειονίνη	Met	1,47	0,97	0,39
Γλουταμικό οξύ	Glu	1,44	0,75	1,00
Γλουταμίνη	Gln	1,27	0,80	0,97
Ιστιδίνη	His	1,22	1,08	0,69
Λυσίνη	Lys	1,23	0,77	0,96
Βαλίνη	Val	0,91	1,49	0,47
Ισολευκίνη	Ile	0,97	1,45	0,51
Φαινυλαλανίνη	Phe	1,07	1,32	0,58
Τυροσίνη	Tyr	0,72	1,25	1,05
Θρυπτοφάνη	Trp	0,99	1,14	0,75
Θρεονίνη	Thr	0,82	1,21	1,03

Γλυκίνη	Gly	0,56	0,92	1,64
Σερίνη	Ser	0,82	0,95	1,33
Ασπαρτικό οξύ	Asp	1,04	0,72	1,41
Ασπαραγίνη	Asn	0,90	0,76	1,28
Προλίνη	Pro	0,52	0,64	1,91
Αργινίνη	Arg	0,96	0,99	0,88

2.4 Πεπτιδική Σύνθεση

2.4.1 Σύνθεση πεπτιδίων με μικρό μοριακό βάρος και καθορισμένη αλληλουχία αμινοξέων

Η σύνθεση των πεπτιδίων συγκεκριμένης αλληλουχίας είναι ουσιαστική καθώς βρίσκει πάρα πολλές εφαρμογές, με σημαντικότερες αυτές στον τομέα των βιοεφαρμογών. Τα συνθετικά πολυμερή μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντιγόνα με σκοπό να ενεργοποιήσουν τη διαδικασία παραγωγής συγκεκριμένων αντισωμάτων ή και ως φάρμακα. Επίσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν με σκοπό να απομονωθούν υποδοχείς πολλών ορμονών και άλλων σηματοδοτικών μορίων.

Τέτοιου είδους συνθέσεις επιτυγχάνονται με τους εξής τρόπους :

- Σύνθεση σε διάλυμα
- Σύνθεση σε στερεή φάση (μέθοδος κατά Merrifield)
- Τεχνική ανασυνδυασμένου DNA

2.4.2 Σύνθεση σε διάλυμα

Οι πρωτεΐνες είναι πολυμερή τα οποία δημιουργούνται δεσμεύοντας την α-καρβοξυλική ομάδα ενός αμινοξέος στην α-αμινική ομάδα ενός άλλου αμινοξέος σχηματίζοντας πεπτιδικό δεσμό με ταυτόχρονη αποβολή ενός μορίου νερού⁴. Η σύνθεση ενός πεπτιδικού δεσμού απαιτεί ενέργεια καθώς η ισορροπία της αντίδρασης τείνει προς την υδρόλυση του δεσμού. Η τεχνική αυτή είναι απαιτητική ακόμα και για τη σύνθεση ενός διπεπτιδίου και εφαρμόζεται στη σύνθεση πεπτιδίων κυρίως μικρού μοριακού βάρους, διότι σε μεγάλα μοριακά βάρη μειώνεται η διαλυτότητα του πεπτιδίου, με αποτέλεσμα η αποπροστασία να μην επιτυγχάνεται ποσοτικά.

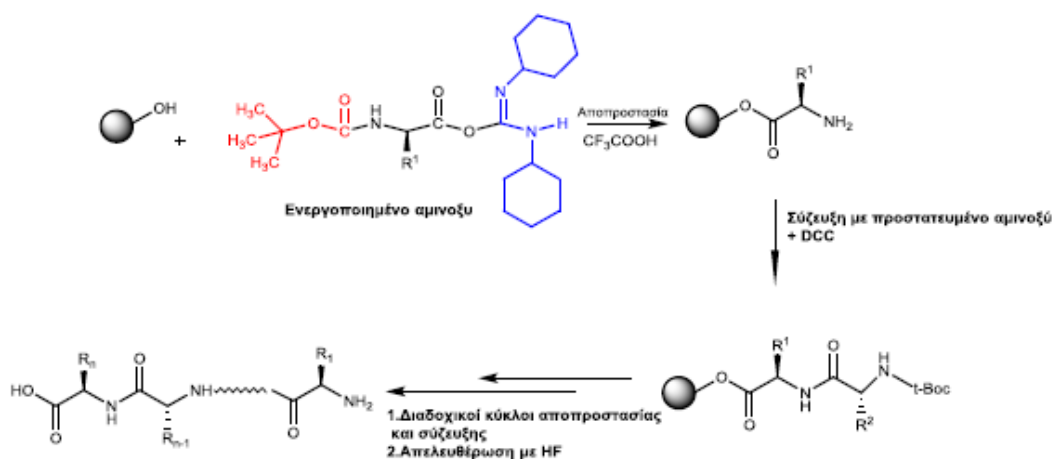
Τα βήματα που απαιτούνται για τη δημιουργία κάθε δεσμού είναι :

- Προστασία του N^a της αμινομάδας του ενός αμινοξέος και αντίστοιχα προστασία του C^a της καρβοξυλικής ομάδας του άλλου αμινοξέος αλλά και της πλευρικής ομάδας όπου αυτό κρίνεται αναγκαίο, με τις κατάλληλες ομάδες κάθε φορά
- Αποπροστασία του ενός άκρου εκλεκτικά χωρίς να απομακρυνθεί η προστασία της πλευρικής ομάδας
- Όταν η σύνθεση έχει ολοκληρωθεί τότε πραγματοποιείται και η πλήρης αποπροστασία όλων των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων

2.4.3 Σύνθεση σε στερεή φάση (μέθοδος Merrifield)

Η σύνθεση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας πραγματοποιείται επάνω σε ένα αδιάλυτο υπόστρωμα, συνήθως χρησιμοποιείται ένα πολυστυρένιο, με μια δραστική ομάδα, περίπου ανα εκατό αρωματικούς δακτυλίους. Η τεχνική αυτή αναπτύχθηκε το 1963 από τον Merrifield και αποτελεί μία πολύ αποτελεσματική μέθοδο σύνθεσης πολυπεπτιδίων αφού το προϊόν είναι συνεχώς προσκολλημένο στο υπόστρωμα και μπορεί να ξεπλυθεί χωρίς να απαιτείται να καθαριστούν τα ενδιάμεσα προϊόντα, ενώ ταυτόχρονα τα παραπροϊόντα απομακρύνονται πολύ πιο εύκολα. Ο

Merrifield λίγα χρόνια μετά βραβεύτηκε με το βραβείο Nobel για την τεχνική αυτή καθώς είναι η μοναδική μέχρι σήμερα που επιτρέπει τη σύνθεση πεπτιδίων με συγκεκριμένη αλληλουχία. Κατά την τεχνική αυτή, συνήθως γίνεται η ενεργοποίηση του καρβοξυλίου με κάποιο αντιδραστήριο σύζευξης, όπως το δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμίδιο (DCC) ενώ η προστασία της αμινομάδας γίνεται με την *tert*-βουτυλοξυκαρβονυλική ομάδα (*tert*-Boc).



Σχήμα 8: Πεπτιδική σύνθεση στερεάς φάσης κατά Merrifield.

Η πορεία της σύνθεσης περιλαμβάνει τα εξής στάδια :

- Ενεργοποίηση του καρβοξυ-τελικού άκρου του αμινοξέος
- Αποπροστασία του αμινο-τελικού άκρου
- Σύνθεση του επόμενου αμινοξέος
- Όλο το πεπτίδιο απελευθερώνεται από τη ρητίνη

Τα ενδιάμεσα στάδια επαναλαμβάνονται συνέχεια μετά από κάθε προσθήκη αμινοξέος. Τα

μειονεκτήματα της μεθόδου σχετίζονται κυρίως με τα πολλαπλά στάδια αποπροστασιών και σύζευξων αλλά και την ετερογένεια των λαμβανόμενων προϊόντων, αφού η απόδοση δεν φθάνει το 100%. Επιπλέον καθαρισμοί απαιτούνται για τη λήψη του καθαρού προϊόντος ώστε να απομονωθεί από παραπροϊόντα μικρότερου μοριακού βάρους.^{5,6,7}

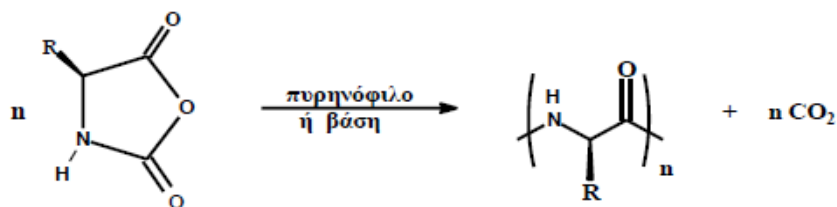
2.4.4 Σύνθεση πεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους

Τα συνθετικά πολυμερικά πεπτίδια δεν αποτελούν νέα υλικά, καθώς πολλά ομοπολυπεπτίδια είναι ήδη διαθέσιμα εδώ και δεκαετίες, βρίσκοντας όμως μόνο περιορισμένες εφαρμογές ως δομικά υλικά. Παρ' όλα αυτά, οι νέες μέθοδοι οι οποίες εφαρμόζονται για τη σύνθεση πολυπεπτιδίων δίνουν τη δυνατότητα σύνθεσης πολυμερών με ελεγχόμενα μοριακά βάρη, μικρές κατανομές μοριακών βαρών και πολύ καλύτερες ιδιότητες σε σχέση με τα παλαιότερα ομοπολυπεπτίδια. Παρακάτω συνοψίζονται οι πρόσφατες εξελίξεις στη σύνθεση των ομο- και συμπολυμερών που πραγματοποιούνται με "ελεγχόμενους" πολυμερισμούς επιτρέποντας την προετοιμασία υλικών με άριστες ιδιότητες για τις εφαρμογές τους στην επιστήμη υλικών ή ως μεταφορείς φαρμάκων. Η επιτυχής σύνθεση πολυπεπτιδίων που μπορεί να μιμείται επαρκώς τις ιδιότητες φυσικών πρωτεϊνών απαιτεί τη δυνατότητα να ελεγχθεί η ακολουθία και σύνθεση των καταλοίπων αμινοξέος κατά μήκος της αλυσίδας. Είναι σημαντικό τα υλικά να καθορίζονται καλά με στενές κατανομές έτσι ώστε μπορούν να αυτοοργανώνονται σε ακριβώς καθορισμένες μικροδομές, παρόμοιες με εκείνες που βρίσκονται στις πρωτεΐνες. Η δευτεροταγής δομή των πολυπεπτιδίων τους δίνει την δυνατότητα αναδίπλωσης και αυτοοργάνωσης στο χώρο.

Η συμβατική μέθοδος σύνθεσης πεπτιδίων στερεής φάσης δε μπορεί εύκολα να χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους (>100 κατάλοιπα) εξαιτίας των πολλαπλών σταδίων αποπροστασίας και σύζευξης. Η καλύτερη μέθοδος για τη σύνθεση καλά χαρακτηρισμένων πολυμερών μεγάλου μοριακού βάρους είναι ο πολυμερισμός N-καρβοξυανυδριτών α-αμινοξέων (NCAs) μέσω πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου (ROP). Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τον πολυμερισμό μιας μεγάλης ομάδας NCAs (>200) και τη σύνθεση πολυμερών περίπλοκης αρχιτεκτονικής με τις επιθυμητές ιδιότητες. Όλα τα πολυπεπτίδια και συμπολυμερή πολυπεπτιδίων που αναφέρονται στην παρούσα εργασία προετοιμάστηκαν μέσω του πολυμερισμού των αντίστοιχων NCAs.

2.5 Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (ROP) των N- καρβοξυανυδριτών α-αμινοξέων (NCAs)

Από το 1940 και μετά, ο πολυμερισμός των NCAs είναι η πιο διάσημη τεχνική για τη σύνθεση πολυπεπτιδίων. Μέχρι τις αρχές του 1980 έγιναν πολλές μελέτες σχετικά με το μηχανισμό πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των NCAs, όμως καμία από αυτές δεν κατάφερε να δώσει μια σαφή εξήγηση για το ποιός είναι πραγματικά ο μηχανισμός που ακολουθείται. Οι περισσότεροι επιστήμονες συμφωνούν ότι ο πολυμερισμός των καρβοξυανυδριτών από βασικούς απαρχητές (π.χ. αμίνες) περιλαμβάνει τρεις διαφορετικούς μηχανισμούς. Στην περίπτωση που ο απαρχητής του πολυμερισμού είναι μια πρωτοταγής αμίνη, η οποία είναι περισσότερο πυρηνόφιλη παρά βασική τότε ευνοείται ο κανονικός μηχανισμός πολυμερισμού, ενώ όταν υπερισχύει η βασική φύση του απαρχητή, όπως συμβαίνει στις τριτοταγείς αμίνες, τότε ευνοείται ο μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς. Σε πολλά συστήματα πολυμερισμού συνυπάρχουν και οι δύο μηχανισμοί, όπως στην περίπτωση των δευτεροταγών αμινών. Γενικά καθοριστικό ρόλο για το ποιος από τους δύο μηχανισμούς επικρατεί κάθε φορά, παίζει ο λόγος πυρηνοφιλικότητας/βασικότητας του απαρχητή.^{8,9,10}

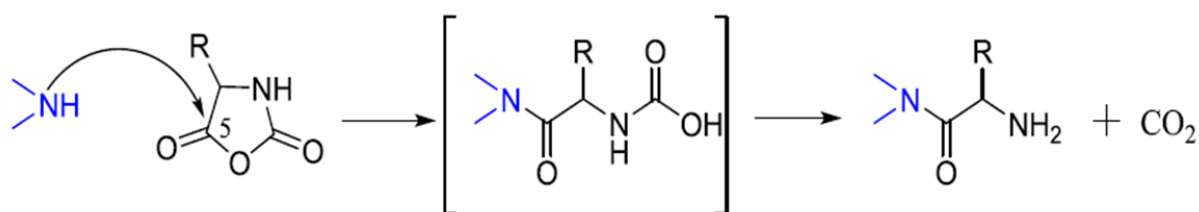


Σχήμα 9: Πολυμερισμός των N-καρβοξυανυδριτών α-αμινοξέων (NCA)

2.5.1 Κανονικός Μηχανισμός Πολυμερισμού (NAM)

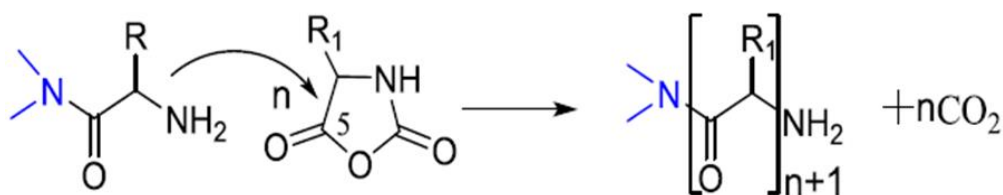
Ο μηχανισμός αυτός παρατηρείται κατά τον πολυμερισμό NCAs με πυρηνόφιλους απαρχητές οι οποίοι διαθέτουν ένα τουλάχιστον άτομο υδροδόνου, όπως πρωτοταγείς και δευτεροτα-

γείς αμίνες, αλκοόλες και νερό. Με βάση το μηχανισμό αυτό πραγματοποιείται πυρηνόφιλη διάνοιξη δακτυλίου του NCA και η πολυμερική αλυσίδα αυξάνεται γραμμικά καθώς η συγκέντρωση του μονομερούς μειώνεται, εφόσον δεν υπάρχουν παράπλευρες αντιδράσεις τερματισμού. Το στάδιο της έναρξης του πολυμερισμού βασίζεται στην πυρηνόφιλη προσβολή της αμίνης, που φέρει ένα τουλάχιστον άτομο υδρογόνου, στον C5 του καρβονυλίου του NCA. Το α-σταθές καρβαμιδικό οξύ που αρχικά παράγεται, αποκαρβοξυλιώνεται για να δώσει μια ελεύθερη αμινομάδα μέσω της οποίας θα συνεχιστεί ο πολυμερισμός, ενώ ταυτόχρονα απελευθερώνεται διοξείδιο του άνθρακα.



Σχήμα 10: Στάδιο έναρξης πολυμερισμού NCA με πυρηνόφιλο απαρχητή.

Κατά το στάδιο διάδοσης η ελεύθερη αμινομάδα που αναγεννάται συνεχώς προσβάλλει τον 5-CO μέχρι να καταναλωθεί όλο το μονομερές.



Σχήμα 11: Στάδιο διάδοσης πολυμερισμού NCA με πυρηνόφιλο απαρχητή.

Ο παραπάνω μηχανισμός ισχύει τόσο για τους N-μη υποκατεστημένους NCAs όσο και για τους N-υποκατεστημένους NCAs. Δύο ανεξάρτητες επιστημονικές ομάδες απέδειξαν τον παραπάνω μηχανισμό. Η ομάδα του Peggion και αυτή του Goodman, επιβεβαίωσαν την ύπαρξη του μορίου του απαρχητή στο τελικό άκρο της πολυμερικής αλυσίδας. Το ποσοστό συμμετοχής

του απαρχηγή στο άκρο της αλυσίδας ποικίλει, από 100% για πρωτοταγείς αμίνες έως και 10% για δευτεροταγείς αμίνες, όπως η δι-ισοπροπυλαμίνη, η οποία κυρίως ακολουθεί τον άλλον μηχανισμό, αυτόν του ενεργοποιημένου μονομερούς. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην αυξημένη βασικότητα αλλά και τη μεγαλύτερη στερεοχημική παρεμπόδιση της δι-ισοπροπυλαμίνης σε σχέση με την κανονική, γραμμική n-εξυλαμίνη.

Εκτός από την παραπάνω επιθυμητή πορεία, πολλές φορές λαμβάνουν χώρα παράπλευρες αντιδράσεις οι οποίες εμποδίζουν τη σύνθεση πολυμερών μεγάλων μοριακών βαρών και μειώνουν το ζωντανό χαρακτήρα του πολυμερισμού. Παράγοντες οι οποίοι μπορούν να επηρεάσουν το χαρακτήρα και την πορεία του πολυμερισμού (ROP) είναι η ισορροπία καρβαμιδικό οξύ-CO₂, ο διαλύτης, η ύπαρξη νερού και άλλων προσμίξεων.^{11,12}

2.5.2 Κινητική Μελέτη Του Πολυμερισμού

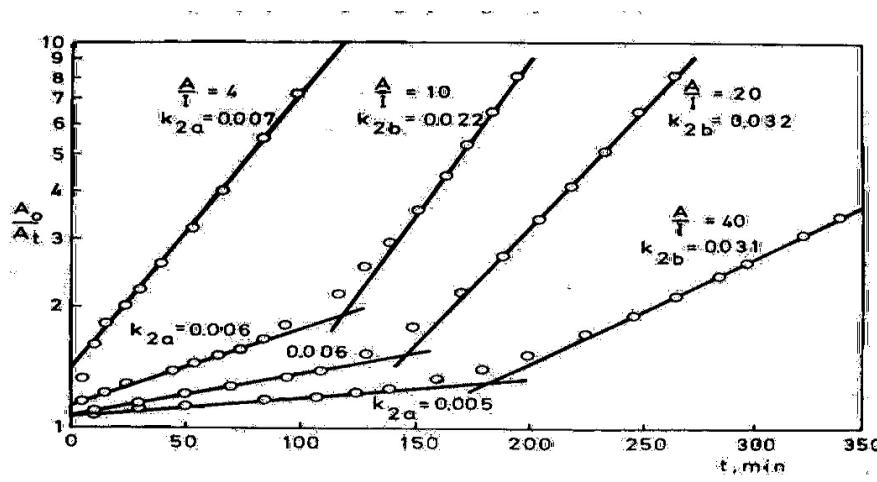
Εάν το στάδιο της έναρξης δεν είναι αργό σε σχέση με το στάδιο της διάδοσης και δεν υπάρχουν αντιδράσεις τερματισμού κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού, τότε οι πολυμερικές αλυσίδες αυξάνονται με ομοιόμορφο ρυθμό και η κατανομή μοριακών βαρών είναι στενή με βάση την κατανομή Poisson.

Σύμφωνα με τους Doty και Lundberg¹³, κατά τον πολυμερισμό του NCA-γ-βένζυλ-L-γλουταμικό σε 1,4 διοξάνιο στους 25°C παρατηρούνται δύο διαφορετικά στάδια. Χρησιμοποιώντας n-εξυλαμίνη ως απαρχηγή για τον πολυμερισμό, παρατηρείται το εξής φαινόμενο: όταν ο πολυμερισμός είναι ακόμα σε αρχικό στάδιο (με βαθμό πολυμερισμού περίπου 8) προχωρά σχετικά αργά με μια σταθερά ταχύτητας $5-7 \times 10^{-8} \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$. Καθώς όμως συνεχίζεται ο πολυμερισμός και όλο και περισσότερες μονομερικές μονάδες προστίθενται στην αναπτυσσόμενη πολυμερική αλυσίδα, παρατηρείται μια επιτάχυνση και η σταθερά ταχύτητας γίνεται περίπου $3 \times 10^{-2} \text{ mol}^{-1} \text{ L sec}^{-1}$. Η επιτάχυνση αυτή συνδέεται με την ικανότητα της πολυμερικής αλυσίδας να υιοθετεί στον χώρο δομή α-έλικας καθώς αναπτύσσεται. Συνεπώς παρατηρείται κινητική δυο σταδίων με το δεύτερο στάδιο του πολυμερισμού να είναι πολύ πιο γρήγορο.

Με περαιτέρω μελέτες που έκανε η επιστημονική ομάδα των Doty και Lundberg το 1957 αποδείχθηκε ότι όταν ο N-καρβοξυανυδρίτης δεν έχει υψηλό βαθμό καθαρότητας, τότε παρατηρείται κινητική πρώτης τάξης κατά τον πολυμερισμό. Πραγματοποίησαν πολυμερισμούς με διαφορετικό βαθμό καθαρότητας του NCA κάθε φορά, και παρατήτησαν ότι όταν το μονομερές δεν ήταν πολύ καθαρό και περιείχε υδροχλώριο (HCL), αφού δεν είχαν γίνει οι απαραίτητοι καθαρι-

σμοί, τότε ο πολυμερισμός ακολουθούσε μια κινητική ψευδο-πρώτης τάξης. Αντίθετα, όταν το μονομερές ήταν υψηλής καθαρότητας, κάτι που επιτυγχάνεται μετά από μια σειρά από ανακρυσταλλώσεις, τότε ακολουθείται κινητική δύο σταδίων.

Οι Doty και Lundberg¹⁴ συνέχισαν τις έρευνες τους σχετικά με την κινητική του πολυμερισμού των NCA από πρωτοταγείς αμίνες. Πραγματοποίησαν τέσσερις πολυμερισμούς του γ -Bzl-L-Glu-NCA σε διοξάνιο στους 35 °C με διαφορετική αναλογία ανυδρίτη/απαρχητή ως προς τα mole κάθε φορά: 4, 10, 20 και 40 αντίστοιχα.



Σχήμα 12: Διάγραμμα του λογάριθμου A_0/A_t συναρτήσει του χρόνου για 4 διαφορετικές αναλογίες ανυδρίτη/απαρχητή, $[A_0]=0.152$.

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα όταν $A/I=4$ ο πολυμερισμός πραγματοποιείται με μια σταθερά ταχύτητας και εμφανίζει μια ψευδο-κινητική πρώτης τάξης, ενώ οι υπόλοιποι πολυμερισμοί εμφανίζουν δύο σταθερές ταχύτητας. Οι πολυμερισμοί εμφανίζουν δυο σταθερές ταχύτητας με τη δεύτερη να είναι πολύ μεγαλύτερη από την πρώτη. Η δεύτερη τιμή σταθερά ταχύτητας αποτελεί ένδειξη της μεγάλης καθαρότητας του ανυδρίτη. Ένα ακόμα συμπέρασμα το οποίο εξάγεται από το διάγραμμα είναι ότι όσο ο λόγος A/I αυξάνεται τόσο πιο γρήγορα καταναλώνεται το μονομερές. Φαίνεται να υπάρχει άμεση εξάρτηση της κινητικής που ακολουθεί ο πολυμερισμός και του λόγου A/I , ενώ το δεύτερο στάδιο διάδοσης εξαφανίζεται μόνο στην περίπτωση που ο λόγος A/I είναι πολύ μικρός ή σε περίπτωση που το μονομερές δεν έχει καθαριστεί αρκετά.^{15,16}

Παρατηρείται ότι η απότομη αλλαγή στην ταχύτητα διάδοσης συμβαίνει όταν ο βαθμός πολυμερισμού είναι από 7 έως 12. Η εξήγηση που δόθηκε για αυτό το φαινόμενο είναι πως όταν

η πολυμερική αλυσίδα φθάσει σε ένα συγκεκριμένο μήκος και μπορεί να υιοθετήσει πρωτοταγή δομή α-έλικας, τότε παρατηρείται δραματική αύξηση της ταχύτητας διάδοσης, προφανώς γιατί το ενεργό κέντρο της αλυσίδας με αυτή τη διάταξη μπορεί να προσβάλει πιο εύκολα το μονομερές.

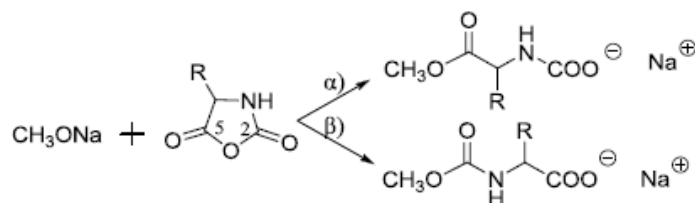
Η κινητική του πολυμερισμού φαίνεται να επηρεάζεται και από την παρουσία HCL, καθώς όπως παρατηρείται στο παρακάτω διάγραμμα η παρουσία 0.23 mole % υδροχλωρικού άλατος εμποδίζουν την εμφάνιση του δεύτερου σταδίου διάδοσης και επηρεάζουν καταλυτικά το λόγο A/I.

Επίσης, σύμφωνα με την επιστημονική ομάδα του Breitenbach και του Allinger, η κινητική επηρεάζεται από το μέσο στο οποίο πραγματοποιείται ο πολυμερισμός. Για παράδειγμα όταν ο διαλύτης του πολυμερισμού είναι χαμηλής ή μέτριας πολικότητας, όπως συμβαίνει με το 1,4 διοξάνιο και το βενζόλιο, τότε οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της αμινικού άκρου της αναπτυσσόμενης πολυμερικής αλυσίδας και του κρβονυλίου του ανυδρίτη ενισχύονται, σε αντίθεση με διαλύτες πολικούς όπως το DMF, που εξαιτίας του οξυγόνου που διαθέτει ανταγωνίζεται τον ανυδρίτη.

2.5.3 Πολυμερισμός N-καρβοξυανυδριτών α-αμινοξέων από ισχυρές βάσεις

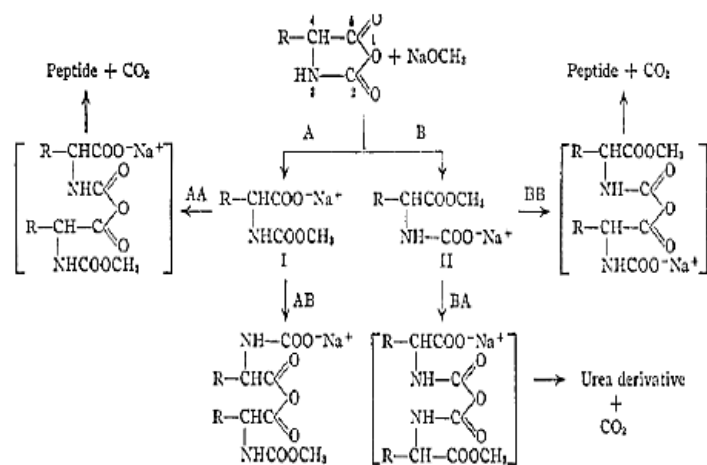
(Μηχανισμός του Blout)

Το 1958 οι Idelson και Blout¹⁸ μελέτησαν τον πολυμερισμό των NCAs μέσω ισχυρών βάσεων, χρησιμοποιώντας μεθοξείδιο του νατρίου. Κατά το στάδιο της έναρξης, το μεθοξείδιο του νατρίου προσβάλει πυρηνόφιλα είτε τον C5 είτε τον C2 του καρβοξυανυδρίτη προκαλώντας διάνοιξη δακτυλίου και το σχηματισμό είτε καρβαμιδικού (α) είτε καρβοξάμινο (β) ανιόντος τα οποία με τη σειρά τους συνεχίζουν τον πολυμερισμό.



Σχήμα 13: α) Προσβολή στον C5, β) προσβολή στον C2

Εάν κατά το στάδιο της διάδοσης το ζωντανό άκρο της πολυμερικής αλυσίδας προσβάλει συνεχώς την ίδια καρβονυλική ομάδα του NCA, είτε πάντα τον C5 είτε τον C2, τότε σχηματίζεται ένα ασταθές ενδιάμεσο καρβαμικού-καρβόξυλο μικτού ανυδρίτη το οποίο αποβάλλει διοξείδια του άνθρακα ώστε να σχηματιστούν οι επιθυμητοί πεπτιδικοί δεσμοί. Στην περίπτωση όμως που ένας NCA προσβληθεί μέσω του B τρόπου από μια αλυσίδα που έχει αναπτυχθεί μέσω του A τρόπου, τότε θα σχηματιστεί ένα συνηθισμένο ανιόν καρβόξυλου ανυδρίτη το οποίο όμως σε αυτές τις συνθήκες δεν αποκαρβοξυλιώνεται. Παρόμοια, εάν ένα μονομερές προσβληθεί μέσω του A τρόπου από μια αναπτυσσόμενη B-αλυσίδα τότε θα σχηματιστεί το μετά νατρίου άλας του καρβαμικού οξέος το οποίο αποκαρβοξυλιώνεται, δίνοντας ένα παράγωγο ουρίας και διοξείδιο του άνθρακα. Στο παρακάτω σχήμα απεικονίζονται οι τέσσερις πιθανανές πορείες. Οι πορείες AB και BA έχουν ως αποτέλεσμα την καταστροφή της α-έλικας της πολυμερικής αλυσίδας και για αυτό θεωρούνται ως αντιδράσεις τερματισμού.



Σχήμα 14: Πιθανές πορείες κατά τον πολυμερισμό NCA με ισχυρές βάσεις

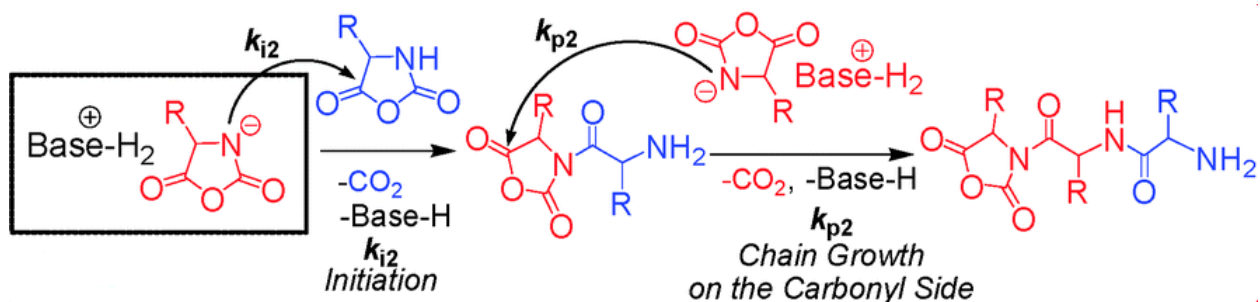
Στην περίπτωση, λοιπόν, που χρησιμοποιείται ισχυρή βάση ως απαρχητής του πολυμερισμού, το αντισταθμιστικό ιόν εξασφαλίζει τη σταθερότητα του καρβαμικού ανιόντος. Κάτω από αυτές τις συνθήκες οι καρβαμιδικές ομάδες δεν αποκαρβοξυλιώνονται συστηματικά αλλά διατηρούνται μέχρι μια ορισμένη συγκέντρωση που σχετίζεται με την βασικότητα του μίγματος. Στην

περίπτωση του πολυμερισμού με πρωτοταγείς αμίνες, η συγκέντρωση του καρβαμιδίου θα είναι μικρή λόγω έλλειψης σταθεροποίησης από αντισταθμιστικό ιόν.^{18,19}

Όσον αφορά την κινητική που ακολουθεί ο πολυμερισμός, από το παρακάτω διάγραμμα είναι προφανές ότι ο ρυθμός με τον οποίο καταναλώνεται το μονομερές είναι ταχύτατος όταν ο απαρχητής είναι μια ισχυρή βάση σε σχέση με μια πρωτοταγή αμίνη.

2.5.4 Μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς (A.M.M)

Ο μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς προτάθηκε αρχικά από τους Ballard και Bamford^{20,21,22} και αναφέρεται στην περίπτωση που ο απαρχητής του συστήματος είναι μια τριτοταγής αμίνη ή μια ισχυρή βάση. Ο μηχανισμός αυτός αφορά μόνο τους μη υποκατεστημένους NCA, καθώς το πρώτο στάδιο του μηχανισμού περιλαμβάνει την αποπρωτονίωση του δεσμού N-H του NCA από τον απαρχητή-βάση προς σχηματισμό του ανιόντος NCA(-). Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει την πυρηνόφιλη προσβολή του ανιόντος NCA στον C5 ενός δεύτερου NCA προκαλώντας διάνοιξη δακτυλίου και σχηματίζοντας ένα διμερές, το καρβαμιδικό ανιόν, το οποίο πρωτονιώνεται από κάποιο άλλο μόριο NCA ώστε να σχηματιστεί καρβαμιδικό οξύ και παράλληλα να αναγεννηθεί ο καταλύτης NCA(-). Το ασταθές καρβαμιδικό οξύ, αμέσως μετά το σχηματισμό του, αποκαρβοξυλιώνεται δημιουργώντας ενεργές αμινομάδες στην άκρη της αλυσίδας. Σ' αυτό το είδος μηχανισμού ο απαρχητή που δρα ως καταλύτης εξαιτίας της βασικότητας του που υπερτερεί της πυρηνόφιλης φύσης του, χρησιμοποιείται για τον ιοντισμό του μονομερούς, το οποίο εξαιτίας της πυρηνόφιλης φύσης του προκαλεί διάνοιξη δακτυλίου και είναι υπεύθυνο για τη διάδοση του πολυμερισμού. Συνεπώς η πολυμερική αλυσίδα είναι αυτοεκκινούμενη.^{23,24,25,26,27}



Σχήμα 15: Μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς (A.M.M).

2.6 Χρήση υψηλού κενού για τη σύνθεση πολυπεπτιδίων

Ο στόχος των ερευνητικών ομάδων που ασχολούνταν με τη σύνθεση πεπτιδίων ήταν να βρουν ένα καλό σύστημα πολυμερισμού το οποίο θα τους οδηγούσε στη σύνθεση καλά καθορισμένων κατά συστάδων πολυμερών ή και εκείνων με πιο περίπλοκη αρχιτεκτονική.

Το 2004 η επιστημονική ομάδα των Iatrou, Hadjichristidis, Aliferis ²⁸ ανέφερε το πρώτο 'ζωντανό' σύστημα πολυμερισμού μέσω πρωτοταγών αμινών, με σκοπό να ακολουθείται αποκλειστικά ο κανονικός μηχανισμός πολυμερισμού εξαιτίας της μεγάλης πυρηνοφιλικότητας των απαρχητών, με τη χρήση τεχνικών υψηλού κενού High Vacuum Technique (HVT). Η χρήση υψηλού κενού είναι απαραίτητη για τον καθαρισμό όλων των αντιδραστηρίων (διαλυτών, μονομερών, απαρχητών) αλλά και κατά την αντίδραση πολυμερισμού, κάτω από αυτές τις συνθήκες επιτυγχάνεται η λήψη προϊόντων υψηλού βαθμού καθαρότητας. Αυτό σημαίνει ότι το ποσοστό των παράπλευρων και ανεπιθύμητων αντιδράσεων τερματισμού περιορίζεται σημαντικά σε σχέση με άλλες τεχνικές και υπάρχει η δυνατότητα σύνθεσης πολυμερών με καθορισμένων χαρακτηριστικών. Η χρήση υψηλού κενού έχει στόχο την πλήρη απομάκρυνση των μορίων νερού και άλλων προσμίξεων καθώς οι καρβοξυανυδρίτες είναι αρκετά ευαίσθητα μόρια.^{29,30,31}

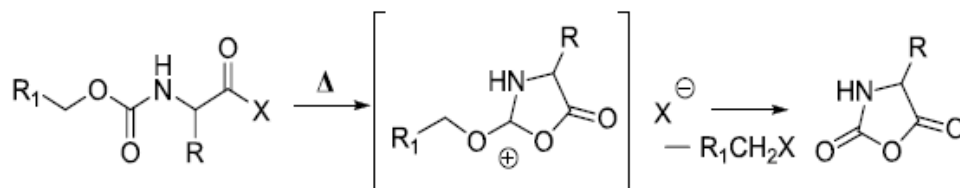
Τα τελευταία χρόνια στο εργαστήριο μας, μέσω της τεχνικής αυτής, η οποία δίνει στον πολυμερισμό έναν ζωντανό χαρακτήρα, έχουν συντεθεί καλά καθορισμένα ομοπολυμερή και κατά συστάδες συμπολυπεπτίδια μέσω διαδοχικής προσθήκης μονομερών, με μεγάλη ομοιογένεια και υψηλή απόδοση ^{32,33}. Η τεχνική αυτή έχει οδηγήσει στη σύνθεση όχι μόνο συμπολυπεπτιδίων αλλά ακόμη και αστεροειδών και υβριδικών πολυμερών με ενδιαφέρουσες ιδιότητες αλλά και πολυμερών με περίπλοκες μακρομοριακές αρχιτεκτονικές στενές κατανομές μοριακών βαρών.³⁴

Όλες οι παραπάνω συνθέσεις έδωσαν πολυμερή με ελεγχόμενα μοριακά χαρακτηριστικά καθώς η τεχνική υψηλού κενού περιορίζει κατά πολύ τις ανεπιθύμητες αντιδράσεις μεταφοράς. Ο πολυμερισμός των NCA α- αμινοξέων με πρωτοταγείς αλειφατικές αμίνες με την τεχνική αυτή, προσεγγίζει το ζωντανό χαρακτήρα του ανιοντικού πολυμερισμού. Ο χαρακτηρισμός ζωντανός πολυμερισμός εξασφαλίζει πολυμερή με ομοιογένεια και στενή κατανομή μοριακών βαρών ($I < 1,1$). Για να χαρακτηριστεί όμως ζωντανός ένας πολυμερισμός θα πρέπει να πληρεί συγκεκριμένες προϋποθέσεις ^{35,36} :

- Πλήρης πολυμερισμός του μονομερούς.
- Γραμμικότητα του μοριακού βάρους M_n με την απόδοση του πολυμερισμού, αυτό προϋποθέτει να μη συμβαίνουν παράπλευρες αντιδράσεις στο διάλυμα πολυμερισμού.
- Στοιχειομετρικός έλεγχος του μοριακού βάρους.
- Μικρή κατανομή μοριακών βαρών, θα πρέπει η ταχύτητα έναρξης να είναι πολύ μεγαλύτερη από την ταχύτητα διάδοσης του πολυμερισμού.
- Σύνθεση κατά συστάδων συμπολυμερών με διαδοχική προσθήκη μονομερών.

2.7 Σύνθεση N-καρβοξυανυδριτών α-αμινοξέων (NCAs)

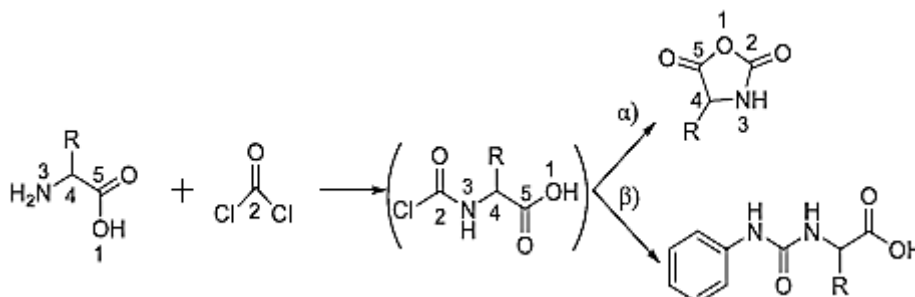
Η πιο εύκολη και γρήγορη τεχνική για τη σύνθεση πεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους, χωρίς όμως απαραίτητα να διαθέτουν συγκεκριμένη αλληλουχία, είναι ο πολυμερισμός μέσω διάνοιξης δακτυλίου των NCA. Οι N-καρβόξυ ανυδρίτες των α-αμινοξέων περιγράφηκαν για πρώτη φορά από τον Leuchs ^{7,8} το 1906. Η μέθοδος του, με κάποιες βελτιώσεις, χρησιμοποιείται ακόμα και σήμερα για τη σύνθεση ορισμένων NCA. Όσον αφορά τη θερμοκρασία στην οποία θα πρέπει να γίνεται η αντίδραση ο Leuchs παρατήρησε ότι στους 70-90 °C προχωρά η αντίδραση κυκλοποίησης των προστατευμένων N-αλκόξυ-καρβόνυλο αμινο-αλογονιδίων, όμως εξαιτίας της ευαισθησίας του NCA μπορεί να συμβεί η αποσύνθεσή τους και η διάνοιξη του δακτυλίου τους αμέσως μετά τη σύνθεσή τους. Η πιο βελτιωμένη έκδοση της μεθόδου Leuchs περιλαμβάνει ως μέσο αλογόνωσης της καρβοξυλομάδας τον βρωμιούχο φώσφορο, PBr₃, καθώς το Br – θεωρείται καλή αποχωρούσα ομάδα και ως προστασία της αμινομάδας την ομάδα Z, η οποία σχηματίζεται μέσω της αντίδρασης του αμινοξέος με το N-βενζυλόξυ-καρβόνυλο χλωρίδιο.



Σχήμα 17: Σύνθεση N-καρβόξυ ανυδριτών με τη μέθοδο Leuchs.

Το 1922 εφαρμόστηκε για πρώτη φορά η σύνθεση των NCA μέσω φωσγενίου από τον Fuchs ³⁷ και στη συνέχεια τροποποιήθηκε από τους Farthing ^{38,39,40} Coleman ⁴¹ και Levy ⁴² με σκοπό να μπορεί να εφαρμοστεί για τη σύνθεση πολλών διαφορετικών N-καρβοξυανυδριτών. Πρόκειται για μια αντίδραση φωσγενείωσης η οποία πραγματοποιείται σε ένα στάδιο και έχει επικρατήσει με την ονομασία «μέθοδος Fuchs-Farthing». Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης θα πρέπει να λάβουμε υπόψην προσεκτικά τη θερμοκρασία, το διαλύτη αλλά και το χρόνο αντίδρασης, καθώς υπάρχει μεγάλος κίνδυνος να συμβούν παράπλευρες αντιδράσεις οι οποίες θα οδηγήσουν στην διάνοιξη δακτυλίου του ήδη σχηματισμένου N-καρβοξυανυδρίτη. Κατά τη διαδι-

κασία αυτή, το αμινοξύ αντιδρά με το φωσγένειο, σχηματίζοντας γρήγορα το ασταθές ενδιάμεσο του N-χλωροφόρμυλο αμινοξέος, το οποίο συνήθως δεν απομονώνεται και κατευθείαν μετατρέπεται σε N-καρβοξυ-ανυδρίτη, ενώ ταυτόχρονα εκλύεται υδροχλώριο, HCL. ^{43,44}



Σχήμα 18 : α) Σχηματισμός N-Καρβοξυανυδρίτη με την μέθοδο “Fuchs- Farthing” μέσω του N-χλωροφόρμυλο αμινοξέος, β) απόδειξη αυτού με την προσθήκη ανιλίνης

Ως μέσα αντίδρασης χρησιμοποιούνται διαλύτες οι οποίοι είναι αδρανείς ως προς το φωσγένειο, ώστε να μειώνονται οι παράπλευρες αντιδράσεις. Γενικά χρησιμοποιείται το τετραϋδοφουράνιο και το 1,4-διοξάνιο, οι οποίοι όμως οδηγούν σε παράπλευρες αντιδράσεις όταν παραμείνουν για αρκετό χρονικό διάστημα παρουσία HCL. Έτσι συνήθως χρησιμοποιούνται λιγότερο πολικοί διαλύτες, όπως για παράδειγμα ο οξικός αιθυλεστέρας, οι οποίοι όμως αυξάνουν αρκετά το χρόνο αντίδρασης. Θα πρέπει επίσης να ληφθεί υπόψη το γεγονός ότι το HCL παρουσιάζει μικρή διαλυτότητα σε αλογονομένους υδρογονάνθρακες και γι’ αυτό πολλές φορές χρησιμοποιείται μείγμα τετραϋδροφουρανίου/διχλωρομεθανίου (THF/CH₂Cl₂).

Η αντίδραση σύνθεσης του N-καρβοξυ-ανυδρίτη απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή και οι αποδόσεις των αντιδράσεων αυτών δεν είναι πολύ μεγάλες. Κύρια αιτία αποτελεί το γεγονός ότι το παραγόμενο HCL επικάθεται στην αμινομάδα ορισμένων αμινοξέων, με συνέπεια να εμποδίζεται το κλείσιμο του δακτυλίου. Επίσης στην περίπτωση που η συγκέντρωση του HCL είναι μεγάλη, υπάρχει περίπτωση να προκαλέσει τη διάνοιξη δακτυλίου ενός ήδη σχηματισμένου μορίου NCA. Με σκοπό να μειωθεί το φαινόμενο σχηματισμού άλατος χρησιμοποιείται μια βάση, συνήθως τρι-αιθυλαμίνη (Et₃N), ώστε να δεσμευθεί το εκλυόμενο HCL σχηματίζοντας το αντίστοιχο υδροχλωρικό άλας. Στην περίπτωση που δεν εμποδιστεί η δημιουργία άλατος, αυτό μπορεί να αντιδράσει με το αντιδραστήριο κυκλοποίησης και να σχηματιστεί N-καρβαμώυλο χλωρίδιο το οποίο βρίσκεται σε ισορροπία με το α-ισοκυανάτο χλωρίδιο, κάτι που πρέπει επιμελώς να αποφευχθεί, αφού το τελευταίο μπορεί να γίνει μέχρι και το κύριο προϊόν της αντίδρασης. Ένα

ακόμα πρόβλημα που δημιουργείται κατά τον πολυμερισμό εξαιτίας της παρουσίας των προσμίξεων, είναι πως λόγω της ηλεκτρονιοφιλικότητας τους, αντιδρούν με τον απαρχητή του πολυμερισμού με αποτέλεσμα να χάνεται ο ζωντανός του χαρακτήρας. Η παρουσία ιχνών υγρασίας (μόρια νερού), βοηθά καθώς αυτή αντιδρά με τις όξινες προσμίξεις οι οποίες συνυπάρχουν μαζί με τον ανυδρίτη. Η διαφορά μεταξύ των προσμίξεων και του καθαρού ανυδρίτη είναι η κρυσταλλική μορφή του τελευταίου κάτι που το κάνει να ξεχωρίζει και δίνει τη δυνατότητα απομόνωσής του, γι' αυτό και μετά το τέλος της αντίδρασης σύνθεσής του, ακολουθούν δυο ή τρεις ανακρυσταλλώσεις με κατάλληλα συστήματα διαλύτη- μη διαλύτη.^{45,46,47}

2.8 Προστατευτικές Ομάδες

2.8.1 Προστασία α-αμινομάδας

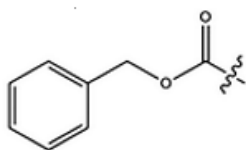
Η παραλαβή του επιθυμητού πεπτιδίου, αλλά και η ικανοποιητική απόδοση της πεπτιδικής σύνθεσης, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την προστασία της α-αμινομάδας. Η αναγκαιότητα της κατάλληλης προστατευτικής ομάδας φαίνεται ιδιαίτερα στη σύνθεση σε στερεή φάση, όπου είναι δύσκολος ο διαχωρισμός του επιθυμητού πεπτιδίου από τα πεπτιδικής φύσεως παραπροϊόντα. Σημαντικός παράγοντας για την επιλογή της προστατευτικής ομάδας, αποτελεί η σταθερότητά της. Με αυτόν τον τρόπο, αποφεύγεται ο σχηματισμός διμερών ή ολιγομερών του εκάστοτε προς σύζευξη αμινοξέος, με αποτέλεσμα τη σύζευξη ολιγομερών στην πεπτιδική αλυσίδα. Επιπρόσθετα, η εύκολη απομάκρυνση της προστατευτικής ομάδας κρίνεται εξίσου ουσιώδης για την περαιτέρω ανάπτυξη της πεπτιδικής αλυσίδας. Η προστασία πρέπει να είναι παροδική και η αποπροστασία εύκολη και εκλεκτική, ενώ οι συνθήκες αποπροστασίας δεν πρέπει να επηρεάζουν την καρβοξυ-προστατευτική ομάδα και τις υπόλοιπες πλάγιες προστατευτικές ομάδες.

Πλήθος προστατευτικών ομάδων έχει προταθεί στη βιβλιογραφία, χωρίς ωστόσο να προσφέρουν αποτελεσματική προστασία. Αξιοσημείωτη υπήρξε η ανακάλυψη της βενζυλοξυ-καρβονυλομάδας από τους Bergman και Ζέρβα το 1932, όπου και έδωσε το έναυσμα για την περαιτέρω προσπάθεια εύρεσης της κατάλληλης προστατευτικής ομάδας ανάλογα με το αμινοξύ που πρόκειται να προστατευτεί. Οι ομάδες, που βρίσκουν σήμερα εφαρμογή στην πεπτιδική σύνθεση, ανήκουν στην τάξη των καρβαμιδικών εστέρων τύπου ουρεθάνης. Η επιλογή αυτή έγινε με βάση την παρατήρηση ότι ελαχιστοποιούν την ρακεμίσωση του α-άνθρακα που συντελείται

στο στάδιο της ενεργοποίησης της καρβοξυλομάδας πριν τη σύζευξη. Στη συνέχεια αναφέρουμε, εν συντομία, τις προστατευτικές ομάδες της α-αμινομάδας, οι οποίες κατατάσσονται σε τέσσερις βασικές κατηγορίες: τύπου ουρεθάνης, άκυκλο-τύπου, άκυκλο-τύπου και παραγώγων θείου.

Βενζυλοξυκαρβονυλομάδα ή Καρβοβενζοξυ-ομάδα (Cbz- ή Z-ομάδα)

Η απομάκρυνση της Z-ομάδας μπορεί να γίνει με καταλυτική υδρογόνωση. Εν τούτοις, η χρήση της καταλυτικής υδρογόνωσης αποκλείεται στην περίπτωση που το πεπτίδιο περιέχει Cys ή κυστίνη, αφού το θείο δηλητηριάζει τον καταλύτη. Άλλες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την απομάκρυνση της Z-ομάδας είναι η επίδραση Na σε υγρή αμμωνία, HBr σε οξικό οξύ, τριφθοροξικού με βρασμό και TFMSA/TFA. Τα πλεονεκτήματα της ομάδας, όπως η ελάχιστη ρακεμίσωση, ο μη επηρεασμός του πεπτιδικού δεσμού από τις συνθήκες απομάκρυνσης και η κρυσταλλική μορφή των Z-προστατευμένων αμινοξέων, την καθιστούν αρκετά διαδεδομένη.

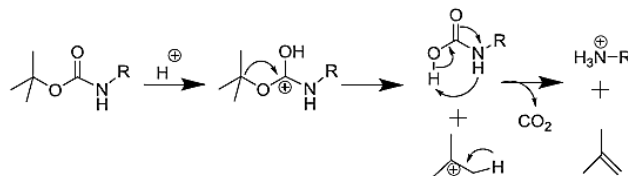


Σχήμα 19: Προστατευτική Z-ομάδα

Τριτοταγής βουτυλοξυκαρβονυλομάδα (Boc-ομάδα)

Η Boc-ομάδα είναι ευαίσθητη σε όξινο περιβάλλον, γεγονός που εκμεταλλευόμαστε για την εκλεκτική απομάκρυνσή της, κατά την πεπτιδική σύνθεση. Η απομάκρυνσή της συνεπώς πραγματοποιείται με τριφθοροξικό οξύ (TFA) ή με HCl σε οργανικούς διαλύτες (π.χ. αιθέρα, οξικό αιθυλεστέρα, διοξάνη, οξικό οξύ). Επιπλέον, η Boc-ομάδα απομακρύνεται παρουσία 98% μυρμηκικού οξέος σε θερμοκρασία δωματίου, Me3SiH (τριμεθυλο-ιωδο-σιλάνιου) σε χλωροφόρμιο ή ακετονιτρίλιο και BF₃Et₂O σε χλωροφόρμιο. Οι ήπιες συνθήκες απομάκρυνσής της και η συμβατότητά της με όλα τα αντιδραστήρια σύζευξης, την κατατάσσουν στις κύριες προστα-

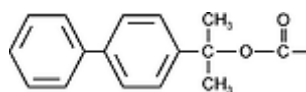
τευτικές ομάδες. Επιπρόσθετα, η Boc-ομάδα είναι συμβατή με άλλες προστατευτικές ομάδες λόγω της εκλεκτικής της απομάκρυνσης. Τέλος, η σύνθεση και μικρό το κόστος των Boc-αμινοξέων έχουν καταστήσει την BOC- προστασία αρκετά διαδεδομένη στον τομέα σύνθεσης πολυπεπτιδίων.



Σχήμα 20: Μηχανισμός αποπροστασίας από οξέα.

2-(π-Διφαινύλο)-2-προπυλοξυκαρβονυλομάδα (Broc-ομάδα)

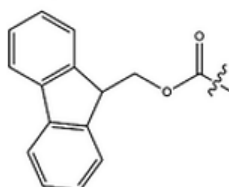
Η Broc-ομάδα εμφανίζει μεγάλη ευαισθησία έναντι των οξέων, χαρακτηριστικό που επιτρέπει την χρήση της όπου απαιτείται εκλεκτική αποπροστασία. Για την απομάκρυνσή της απαιτούνται πολύ ήπιες συνθήκες, όπως 0,5% χλωρο-οξικό οξύ σε διχλωρομεθάνιο, αφήνοντας ανέπαφες άλλες ομάδες ευαίσθητες στα οξέα (Boc- ή Z-ομάδα).



Σχήμα 21: Δομή της προστατευτικής Broc-ομάδας.

9-φλουορενυλομεθοξυκαρβονύλιο (Fmoc)

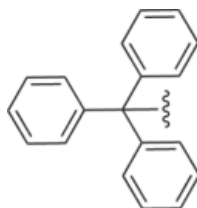
Αποτελεί ομάδα μεγάλης πρακτικής σημασίας καθώς είναι η μοναδική από της προστασίες τύπου ουρεθάνης που είναι ευαίσθητη σε βασικές συνθήκες. Συνήθως η αποπροστασία γίνεται με πιπεριδίνη 20% σε DMF για ορισμένα δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου.



Σχήμα 22: Η προστατευτική ομάδα Fmoc.

Προστατευτικές Ομάδες Αλκυλο-τύπου

Η σημαντικότερη αλκυλο-προστατευτική ομάδα είναι η τριφαινυλομεθυλομάδα ή τριτυλομάδα (Ttt). Η προστατευτική αυτή ομάδα εμφανίζει εξαιρετική ευαισθησία στα οξέα, τόσο που με απλή θέρμανση σε αραιό διάλυμα (~5%) οξικού οξέος είναι δυνατή η απομάκρυνσή της. Αντίθετα αξιοσημείωτη είναι η σταθερότητά της έναντι των αλκαλίων και της υδραζίνης.



Σχήμα 23: Η τρίτυλο-ομάδα

2.8.2 Προστασία του καρβοξυλίου

Η καρβοξυλομάδα των μονομερών πρέπει να προστατεύεται κατάλληλα προς αποφυγή δημιουργίας παραπροϊόντων από την προσβολή του καρβονυλίου από διάφορα πυρηνόφιλα αντιδραστήρια, συμπεριλαμβανομένων και των ελεύθερων αμινομάδων. Η καρβοξυπροστατευτική ομάδα η οποία θα επιλεγεί θα πρέπει να χαρακτηρίζεται από υψηλή σταθερότητα καθ' όλην τη διάρκεια της σύνθεσης. Ο πιο απλός και συνηθισμένος τρόπος προστασίας του C-τελικού καρβοξυλίου είναι η εστεροποίησή του. Οι συχνότερα χρησιμοποιούμενοι εστέρες είναι:

- i) οι τριτοταγείς βουτυλεστέρες (-OBut), οι οποίοι απομακρύνονται με ήπιες όξινες συνθήκες HCl/ THF σε οργανικό διαλύτη.
- ii) οι μεθυλεστέρες (-OMe) και αιθυλεστέρες (-OEt), οι οποίοι απομακρύνονται με αλκαλική υδρόλυση
- iii) οι βενζυλεστέρες, (-OBzl), οι οποίοι απομακρύνονται με καταλυτική υδρογόνωση ή επίδραση νατρίου σε υγρή NH₃.

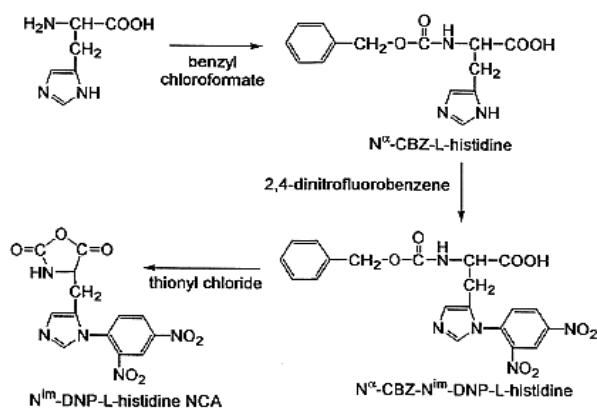
Άλλη δυνατότητα προστασίας του καρβοξυλίου είναι η μετατροπή του σε αμίδιο και υδραζίδιο.

2.8.3 Προστασία του Ιμιδαζολικού Δακτυλίου της Ιστιδίνης

Η Nim-ακυλίωση και η ρακεμίσωση είναι τα σημαντικότερα προβλήματα που συναντάμε κατά τη συμμετοχή της His στην πεπτιδική σύνθεση. Αν και τις περισσότερες φορές τα παραπροϊόντα της αντίδρασης μπορούν εύκολα να διαχωριστούν κατά τον καθαρισμό του πεπτιδίου, η προστασία του δακτυλίου είναι απαραίτητη, ειδικότερα αν λάβουμε υπ' όψιν το γεγονός ότι τα παραγόμενα με αυτό τον τρόπο ακυλιμιδαζόλια είναι ακυλιωτικές ενώσεις και έχουν τη δυνατότητα να αντιδράσουν με τις πλευρικές ομάδες των αμινοξέων. Οι κυριότερες ομάδες που χρησιμοποιούνται για την προστασία της His (Ιστιδίνης) είναι:

- α) Τοζυλομάδα (Tos). Είναι συμβατή με τη Boc/Bzl μεθοδολογία.
- β) 2,4-Δινιτροφαινυλομάδα (Dnp). Χρησιμοποιείται στη Boc/Bzl μεθοδολογία σύνθεσης.
- γ) Βενζυλοξυμεθυλομάδα (Bom). Και αυτή, επίσης, συνδυάζεται με Na Boc-προστασία
- δ) Τριτυλομάδα (Trt) και τα παράγωγά της. Η αποπροστασία της Trt-His πραγματοποιείται συνήθως με τη χρήση πυκνού διαλύματος TFA (~95%).
- ε) Τριτοταγής βουτυλοξυμεθυλομάδα (Bom). Βρίσκει εφαρμογή στην Fmoc/But μεθοδολογία.

Όσον αφορά στη σύνθεση του N-καρβοξυ-ανυδρίτη της ιστιδίνης, στη βιβλιογραφία αναφέρονται κυρίως δυο μέθοδοι σύνθεσης. Σύμφωνα με την πρώτη μέθοδο, ως αντιδραστήριο κυκλοποίησης χρησιμοποιείται πενταχλωριούχος φώσφορος (PCl_5) και ως διαλύτης 1,4-διοξάνιο. Στη δεύτερη μέθοδο, χρησιμοποιείται θειόνυλο χλωρίδιο (SOCl_2) για τη δημιουργία του δακτυλίου.



Σχήμα 24: Σύνθεση του προστατευμένου μονομερούς L-ιστιδίνης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1 Αποκρίσιμα πολυμερή -πολυπεπτίδια

Τα τελευταία χρόνια η επιστήμη πολυμερών έχει στραφεί σε υλικά τα οποία μπορούν και αποκρίνονται σε εξωτερικά ερεθίσματα (μεταξύ των οποίων είναι το pH, η θερμοκρασία και η ιονική ισχύς) και να δημιουργούν πολυμοριακά συσσωματώματα, όπως σφαιρικά και κυλινδρικά μικκύλια, κοίλες σφαίρες (vesicles), σύμπλοκα πολυηλεκτρολυτών και «σχιζοφρενικά» μικκύλια. Το ενδιαφέρον για αυτά τα πολυμερή έχει αυξηθεί εκθετικά λόγω των δυνητικών εφαρμογών στη βιομηχανία των χρωμάτων, των καλλυντικών, τον καθαρισμό του νερού, αλλά κυρίως στο πεδίο της βιοϊατρικής.

Ως αποκρίσιμα σε εξωτερικά ερεθίσματα πολυμερή ορίζονται τα πολυμερή που υφίστανται σχετικά μεγάλες και άμεσες φυσικές ή χημικές μεταβολές αποκρινόμενα σε μικρές εξωτερικές αλλαγές στις συνθήκες περιβάλλοντος^{48,49,50}. Σε αυτά τα πολυμερή έχουν δοθεί ονομασίες όπως αποκρίσιμα, έξυπνα και περιβαλλοντικά ευαίσθητα πολυμερή. Αυτά τα συστήματα αναγνωρίζουν ένα ερέθισμα ως σήμα, κρίνουν το μέγεθος του σήματος και μεταβάλουν τη διαμόρφωση της αλυσίδας με άμεση απόκριση. Υπάρχουν πολλά διαφορετικά ερεθίσματα που ρυθμίζουν την απόκριση των πολυμερών και μπορούν να ταξινομηθούν είτε ως χημικά είτε ως φυσικά⁵¹. Τα χημικά ερεθίσματα, όπως, το pH, η ιονική ισχύς και οι ιοντικοί και χημικοί παράγοντες, αλλάζουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων ή μεταξύ των αλυσίδων και του διαλύτη σε μοριακό επίπεδο. Τα φυσικά ερεθίσματα, όπως η θερμοκρασία, το ηλεκτρικό ή μαγνητικό πεδίο και η μηχανική τάση, επηρεάζουν τους θερμοδυναμικούς παράγοντες (ενθαλπία και εντροπία) και μεταβάλουν τις μοριακές αλληλεπιδράσεις. Αυτές οι αποκρίσεις των πολυμερικών συστημάτων είναι πολύ χρήσιμες σε βιολογικές εφαρμογές, όπως στη μεταφορά φαρμάκων, στη βιοτεχνολογία και στη χρωματογραφία. Ορισμένα πολυμερικά συστήματα συνδυάζουν απόκριση σε δυο ή περισσότερα ερεθίσματα, για παράδειγμα είναι θερμο-ευαίσθητα αλλά και αποκρίσιμα σε μεταβολές του pH. Από την άλλη μεριά υπάρχουν εργασίες που αναφέρουν την ταυτόχρονη επιβολή δύο ερεθισμάτων για να υπάρξει απόκριση από το πολυμερές, το οποίο ονομάζεται διπλοαποκρινόμενο. Μια καινούργια κατηγορία εξωτερικού ερεθίσματος θεωρείται το βιοχημικό ερέθισμα, το οποίο περιλαμβάνει απόκριση σε αντιγόνα, ένζυμα υποκαταστάτες και

βιοχημικούς παράγοντες. Τα αποκρίσιμα πολυμερή μπορούν να αυτό-οργανωθούν σε διαλύματα σε δυο κύριες δομές: ^{52,53}

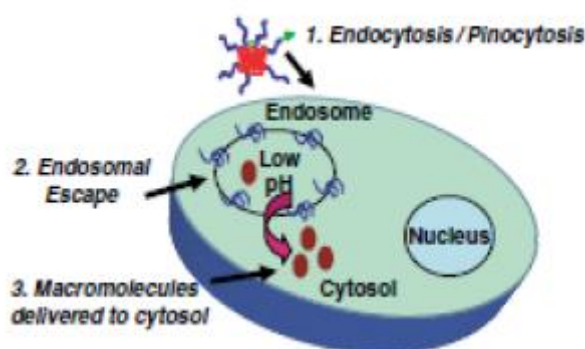
(α) Μικκύλια: τα μικκύλια σχηματίζονται από τη συσσωμάτωση αμφίφιλων πολυμερών όταν βρεθούν σε έναν εκλεκτό διαλύτη, για παράδειγμα νερό. Τα αποκρίσιμα μικκύλια μπορούν να δημιουργηθούν με δύο τρόπους. Πρώτον με αλλαγή της ισορροπίας υδρόφιλου-υδρόφοβου, η οποία μπορεί να γίνει με ένα εξωτερικό ερέθισμα. Δεύτερον μπορεί τόσο η λυόφιλη όσο και η λυόφοβη συστάδα του πολυμερούς να είναι αποκρίσιμες σε ερεθίσματα, οπότε προκύπτουν μικκύλια είτε με αποκρίσιμη κορώνα, είτε με αποκρίσιμο πυρήνα.

(β) Υδατοπήκτωμα: Τα υδατοπηκτώματα δημιουργούνται από ένα τρισδιάστατο δίκτυο πολυμερικών αλυσίδων, στο οποίο κάποια τμήματα είναι διαλυμένα από μόρια νερού και αλλά είναι φυσικά ή χημικά συνδεδεμένα μεταξύ τους. Από αυτήν τη δομή προκύπτει η ενδιαφέρουσα ιδιότητα της διόγκωσης αλλά όχι διάλυσης σε υδατικό περιβάλλον. Οι διαστάσεις ενός αποκρίσιμου υδατοπηκτώματος μπορούν να αλλάξουν δραματικά από μια μεταβολή στην υδροφιλικότητα ή την υδροφοβικότητα στη μοριακή δομή των αλυσίδων.

3.1.1 pH – Ευαισθησία Πολυμερή

Τα πολυμερή που εμφανίζουν ευαισθησία στο pH αποτελούνται από μονομερή που μπορούν να ιονιστούν, δηλαδή να δώσουν ή να λάβουν πρωτόνια σε απόκριση με τη μεταβολή του pH. Καθώς το pH αλλάζει, ο βαθμός ιονισμού του πολυμερούς αλλάζει δραματικά γύρω από μια συγκεκριμένη τιμή pH, που ονομάζεται pKa η οποία δίδεται από τον αρνητικό λογάριθμο της σταθεράς ισορροπίας ασθενούς οξέος Ka ($pKa = -\log Ka$). Αυτή η γρήγορη αλλαγή στο συνολικό φορτίο της αλυσίδας προκαλεί μεταβολή του υδροδυναμικού όγκου των πολυμερικών αλυσίδων. Η μετάβαση από συρρικνωμένη σε εκτεταμένη διαμόρφωση ερμηνεύεται από την οσμωτική πίεση που προκαλούν τα αντισταθμιστικά ιόντα των φορτίων των αλυσίδων. Υπάρχουν δύο είδη πολυηλεκτρολυτών αποκρινόμενων στο pH : ασθενή πολυοξέα και ασθενείς πολυβάσεις. Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα ασθενούς πολυοξέος είναι το πολυακρυλικό οξύ, το οποίο είναι ουδέτερο σε χαμηλό pH, ενώ ιονίζεται σε υψηλό pH. Από την άλλη μεριά πολυβάσεις, όπως η 4-βινυλοπυριδίνη είναι πρωτονιωμένη σε χαμηλό pH και ουδέτερη σε υψηλό pH. Συνεπώς η κα-

τάλληλη επιλογή μεταξύ πολυοξέων και πολυβάσεων πρέπει να γίνει για κάθε διαφορετική εφαρμογή. Τα υδρόφοβα τροποποιημένα pH-ευαίσθητα πολυμερή έχουν μια ευαίσθητη ισορροπία μεταξύ ηλεκτροστατικών απώσεων και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Όταν οι ηλεκτροστατικές απωστικές δυνάμεις εξαφανίζονται, τότε υπερσχύουν οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, με αποτέλεσμα να προκαλείται συσσωμάτωση των πολυμερικών αλυσίδων σε υδατικό περιβάλλον.^{54,55}

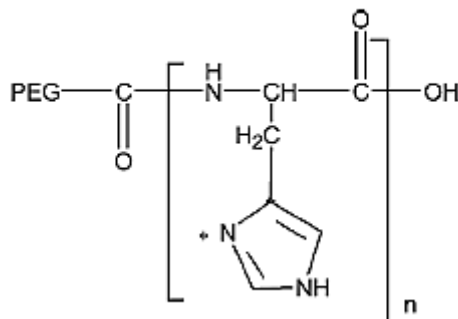


Εικόνα 2: Γενικό σχήμα συμπεριφοράς των pH-αποκρινόμενων πολυμερών που λειτουργούν ως οχήματα αντικαρκινικών φαρμάκων και εισάγονται στο κύτταρο μέσω ενδοκύτωσης.

3.1.2 Πολυβάσεις

Τα poly(2-dimethyl aminoethyl methacrylate) (PDMAEMA) και poly(L-histidine) είναι παραδείγματα pH-αποκρίσιμων πολυβάσεων. Η αμινο-ομάδα είναι ουδέτερη σε αλκαλικό περιβάλλον, ενώ φορτίζεται θετικά (προσλαμβάνοντας ένα πρωτόνιο) σε όξινο περιβάλλον. Οι μεγαλύτερες υδρόφοβες ομάδες του PDMAEMA το καθιστούν συνολικά πιο υδρόφοβο και προκαλούν ισχυρότερες υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις σε υψηλό pH. Τόσο το PDMAEMA, όσο και η PHis μετατρέπονται σε υδρόφοβα σε $\text{pH} > 8$ λόγω της αποπρωτονίωσης των αμινο-ομάδων τους.

Στο ομοπολυμερές της L-ιστιδίνης παρατηρείται έντονα η μεταβολή αυτή σε pH~6,5 που είναι το pKa του αζώτου του ιμιδαζολικού δακτυλίου της πλευρικής της ομάδας.



Σχήμα 25: Χημική δομή του δυσυσταδικού συμπολυμερούς PEG-PHIS. Ο αστερίσκος (*) υποδεικνύει το ασύζευκτο ζεύγος ηλεκτρονίων που είναι διαθέσιμο για την πρωτονίωση/αποπρωτονίωση σε pH γύρω από το pKa.

3.1.3 Σχεδιασμός για την Επίτευξη Κρίσιμου pH

Η ρύθμιση του κατάλληλου κρίσιμου pH (pH*), στο οποίο παρατηρούνται αντιστρεπτές μεταβολές στη διαμόρφωση των αλυσίδων, είναι ένας σημαντικός παράγοντας στις εφαρμογές των pH-αποκρίσιμων πολυμερών. Η περιοχή pH, στην οποία παρατηρείται μια αντιστρεπτή μεταβολή της φάσης μπορεί να ρυθμιστεί με δύο τρόπους είτε επιλέγοντας πολυοξέα και πολυβάσεις, των οποίων τα pKa συμπίπτουν με εκείνη την περιοχή pH, είτε με ενσωμάτωση ενός υδρόφοβου τμήματος στην πολυμερική αλυσίδα του πολυοξέος ή της πολυβάσης με αποτέλεσμα το pKa να συμπίπτει με το pH*. Η δεύτερη περίπτωση έχει μελετηθεί συστηματικά αλλάζοντας το ποσοστό του υδρόφοβου τμήματος στην πολυμερική αλυσίδα. Σε αυτήν την εργασία υδρόφοβα τμήματα πολυλευκίνης ενσωματώθηκαν στον πυρήνα των μικκυλίων σε διαφορετικά ποσοστά κάθε φορά και μελετήθηκε κατά πόσο επηρεάζεται το pH* του τελικού συστήματος.⁵³

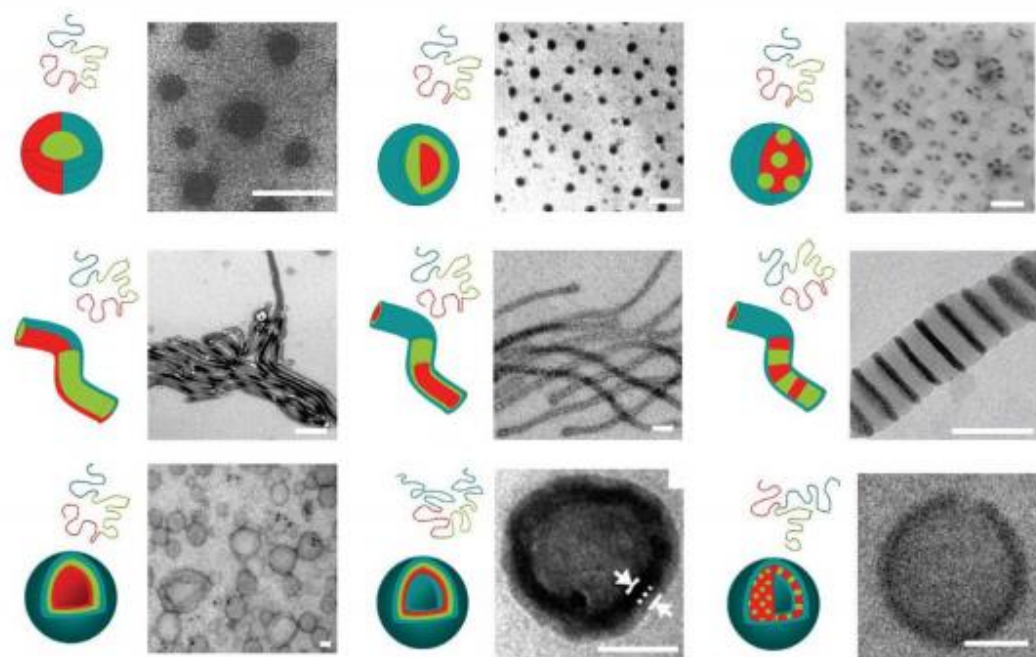
3.2 Μικκυλιακές δομές

Μια παγκόσμια πρόκληση για την καταπολέμηση και τη θεραπεία σοβαρών ασθενειών είναι η νανοϊατρική. Τα νανοφάρμακα (στοχευμένα φάρμακα ή φάρμακα-οχήματα) αποτελούν ανταγωνιστικό προϊόν των κλασσικών φαρμάκων. Μερικές μορφές που χρησιμοποιούνται ως «οχήματα» των φαρμάκων είναι οι μικκυλιακές δομές πολυμερών, κυστίδια αλλά και δενδριμερή και μελετώνται οι εφαρμογές τους στο παρόν και το μέλλον. Τα νανოსωματίδια αυτά δεν παρουσιάζουν μεγάλη κυτταροτοξικότητα, είναι βιοσυμβατά και βιοαποικοδομήσιμα, χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο για την καταπολέμηση του καρκίνου απελευθερώνοντας κατευθείαν τα αντικαρκινικά φάρμακα στους καρκινικούς όγκους με έξυπνη τεχνολογία, η οποία περιορίζει σημαντικά τις επώδυνες παρενέργειες της χημειοθεραπείας και δεν πλήττει σε μεγάλο ποσοστό υγιείς ιστούς και κύτταρα.

Στην περίπτωση που οι «νανοφορείς» είναι μικκύλια, τα υδρόφοβα αντικαρκινικά φάρμακα εγκλωβίζονται στον πυρήνα και τα σωματίδια αυτά που είναι συνήθως μικρότερα από 200nm λειτουργούν ως οχήματα. Οι νανοφορείς είναι ευαίσθητοι στην οξύτητα, την αλκαλότητα και τη θερμοκρασία, και η δομή τους μεταβάλλεται ανάλογα με τις συνθήκες αυτές. Στόχος είναι η σύνθεση τέτοιων συστημάτων τα οποία να μεταφέρουν το εγκλωβισμένο φάρμακο. Επίσης η δομή τους να είναι σταθερή σε pH=7,4 των φυσιολογικών ανθρώπινων κυττάρων ενώ σε μικρότερες τιμές pH (από pH<6,5) που χαρακτηρίζουν τους ιστούς των καρκινικών όγκων να αλλάζει η αυτοοργάνωση του συστήματος και κατά συνέπεια να απελευθερώνεται το εγκλωβισμένο φορτίο τους. Συνεπώς οι επωφελείς ιδιότητες των πολυμερικών μικκυλίων συσχετίζονται με την ελεγχόμενη αποδέσμευση του φορτίου τους και τη δυνατότητα κυτταρικής στόχευσης. Επιπλέον γίνεται εφικτή η «διαλυτοποίηση» των υδρόφοβων φαρμάκων που έχουν μικρή διαλυτότητα.

Τα μικκύλια για να θεωρηθούν πετυχημένοι φορείς φαρμάκων θα πρέπει να έχουν κάποια συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, όπως δυναμική και κινητική σταθερότητα, συγκεκριμένη μορφολογία και μέγεθος, βιοσυμβατότητα, ικανότητα δέσμευσης φαρμάκου, αλλά και αποδέσμευσης του με ελεγχόμενο τρόπο, ικανοποιητικό χρόνο κυκλοφορίας στο αίμα και εισαγωγής στο κύτταρο με μηχανισμό ενδοκύττωσης. Όλες οι παραπάνω ιδιότητες καθορίζονται σε ένα μεγάλο βαθμό από την αρχιτεκτονική των κατά συστάδων συμπολυμερών. Έχει αποδειχθεί ότι η σταθερότητα των μικκυλίων που προέρχονται από αμφίφιλα συμπολυμερή σχετίζεται άμεσα με το μήκος της υδρόφοβης συστάδας και συγκεκριμένα όσο αυξάνεται το μοριακό της βάρος ευνοείται η θερμοδυναμική σταθερότητα του συστήματος και μειώνεται η κρίσιμη συγκέντρωση συσσωμάτωσης (CAC).

Γενικά η μικκυλιακή σταθερότητα εξαρτάται από πολλές παραμέτρους. Για να θεωρηθεί ένα μικκυλιακό σύστημα σταθερό, θα πρέπει να χαρακτηρίζεται από μικρή μικκυλιακή συγκέντρωση (cmc), μεγάλη αναλογία υδρόφοβης/υδρόφιλης συστάδας και μεγάλη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (T_g).⁵⁶



Εικόνα 3: Διάφορες μορφές μικυλλιακών δομών πολυσυσταδικών συμπολυμερών σε διάλυμα.

3.3 Πολυμεροσώματα

Εισαγωγή

Η χημική και φυσική μετατροπή των μορίων και μακρομορίων όπως πρωτεΐνες, νουκλεϊνικά οξέα, υδατάνθρακες, λιπίδια, κλπ είναι το κεντρικό δόγμα της ζωής. Όλοι οι μετασχηματισμοί χρειάζεται να πραγματοποιούνται σε πολύ καλά οργανωμένα διαμερίσματα. Η βιολογική διαμερισματοποίηση επιτυγχάνεται αξιοποιώντας τον σχηματισμό μεμβρανών με πάχος από λίγα νανόμετρα και οι οποίες εσωκλείουν υδατικό περιβάλλον σε δομές των οποίων το μέγεθος κυ-

μαίνεται από μερικές δεκάδες νανόμετρα έως και μέτρα. Αυτές οι μεμβράνες προκύπτουν από την αυτό-συναρμολόγηση των αμφίφιλων μορίων γνωστών ως φωσφολιπίδια. Τα αμφίφιλα μόρια παρουσιάζουν διττή φύση που περιλαμβάνει τόσο υδρόφιλα τμήματα όσο και υδρόφοβα τμήματα. Με την παρουσία του νερού τα υδρόφοβα τμήματα τείνουν να ελαχιστοποιήσουν την επαφή τους με το νερό, ελκόμενα μεταξύ τους, ενώ τα υδρόφιλα προτιμούν αντιθέτως να έρχονται σε επαφή με το νερό και απωθούνται μεταξύ τους. Το μεμβρανικό συγκρότημα είναι ξεκάθαρα το τέλειο δομικό στοιχείο για την παραγωγή απομονωμένων υδατικών διαμερισμάτων. Πράγματι, η παρούσα δισδιάστατη δομή αυξάνει σημαντικά την αποτελεσματικότητα και δίνει την δυνατότητα για μη αναστρέψιμο διαχωρισμό φορτίου και παροδική αποθήκευση της ενέργειας με την μορφή χημικού δυναμικού. Αυτός ο αρθρωτός σχεδιασμός έχει υπάρξει ένα κρίσιμο εξελικτικό βήμα ώστε να δημιουργηθεί μια τάξη εντός του κυττάρου και για να μπορέσει να υπάρξει έλεγχος σε ένα τέτοιο πολύπλοκο σύστημα-μηχανισμό.

Οι πρόσφατες εξελίξεις στον κλάδο των ελεγχόμενων τεχνικών πολυμερισμού επιτρέπουν τον σχεδιασμό μιας νέας κατηγορίας αμφίφιλων μεμβρανών από συμπολυμερή κατά συστάδες (block copolymers). Τα συμπολυμερή κατά συστάδες είναι μακρομόρια τα οποία περιλαμβάνουν δύο ή περισσότερους τύπους πολυμερών όπως έχει προαναφερθεί λεπτομερώς σε προηγούμενη ενότητα. Ο συνδυασμός από διαφορετικά είδη πολυμερών έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση νέων ιδιοτήτων που ορίζονται από τα μόρια που έχουν σχεδιαστεί. Ως συνέπεια της μακρομοριακής τους φύσης, έχουν την ικανότητα να αυτό-συναρμολογούνται σε περιπεπλεγμένες μεμβράνες παρέχοντας την τελική δομή τους που εμφανίζει βελτιωμένες μηχανικές ιδιότητες αλλά και σταθερότητα συγκρινόμενες με τις συμβατικές φωσφολιπιδικές μεμβράνες. Η απλούστερη δομή που μπορούν να σχηματίσουν οι μεμβράνες αυτές είναι ένα σφαιρικό κέλυφος γνωστό και ως κυστίδιο ή «πολυμερόσωμα», «polymerosome». Τα πολυμεροσώματα σχηματίζονται με μεγέθη που κυμαίνονται από 10nm έως 10μm με σχετικά υψηλό έλεγχο στην κατανομή μεγέθους⁵⁷

Η ευελιξία που παρουσιάζουν τα πολυμεροσώματα έχει προσελκύσει την προσοχή αρκετών επιστημόνων που μελετούν τους καινοτόμους αυτούς σχηματισμούς με σκόπο τις εφαρμογές τους σε διάφορους κλάδους. Συγκεκριμένα στο κλάδο της φαρμακευτικής τα πολυμεροσώματα μας δίνουν τη δυνατότητα να ενσωματώσουμε εντός αυτών μεγάλο εύρος από φαρμακομόρια και βιομόρια και παρέχουν τη δυνατότητα αναλόγως τον σχεδιασμό των πολυμεροσωμάτων να καθορίσουμε το πότε και πώς θα γίνει η αποδέσμευση του περιεχομένου αυτών. Όλα αυτά τα πλεονεκτήματα που εμφανίζουν τα πολυμεροσώματα θα αναλυθούν λεπτομερώς σε ενότητα που ακολουθεί.⁵⁸

3.3.1 Πολυμεροσώματα δομή και ιδιότητες

Αυτοσυναρμολόγηση των πολυμερικών κυστιδίων

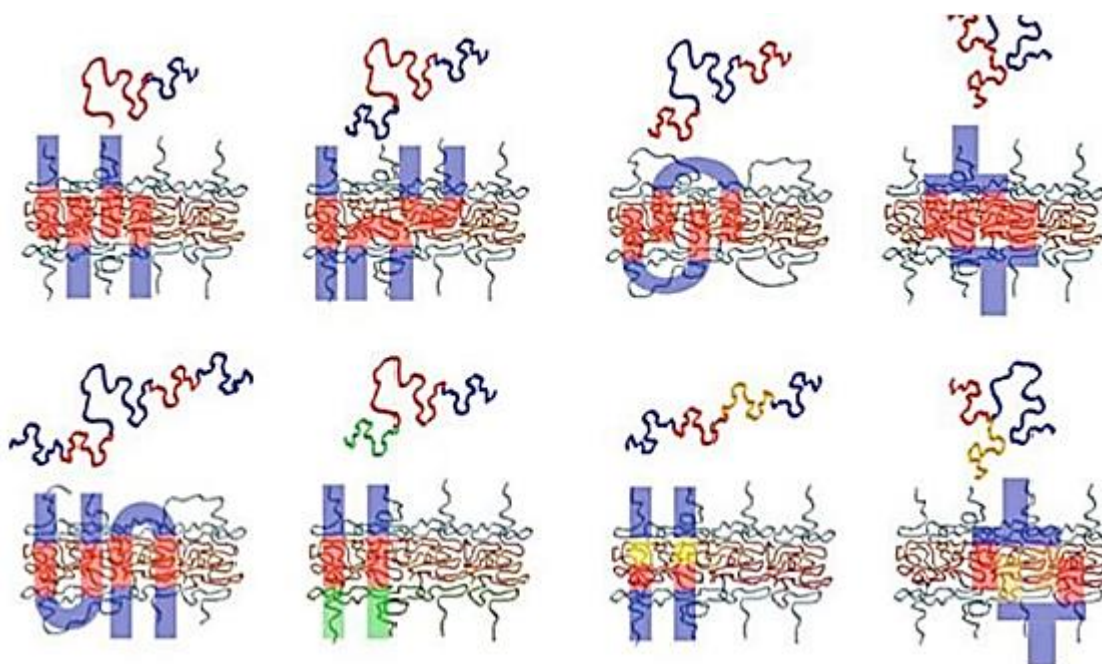
Οι αρχές που διέπουν την αυτό-συναρμολόγηση των φυσικής προέλευσης αμφίφιλων γενικεύονται σε απλά γεωμετρικά και ενεργητικά επιχειρήματα⁵⁹. Σε διαλύματα συγκεντρώσεων πάνω από μια κρίσιμη μυκκιλιακή συγκέντρωση CMC- όπου το CMC μειώνεται εκθετικά με το μοριακό βάρος των αμφιφίλων-τα αμφίφιλα αυτό-συναρμολογούνται προς σχηματισμό «υπέρ» μοριακών βαρών-συσσωματώματα. Η γεωμετρία των συσσωματωμάτων αυτών υπαγορεύεται από την αναλογία υδρόφοβων -υδρόφιλων τμημάτων του αμφίφιλου μορίου. Αυτή η ιδέα περιγράφεται από τον παράγοντα πακεταρίσματος “packing parameter” $p = v / alc$, στον οποίο τύπο το v είναι ο όγκος του πυκνά πακεταρισμένου υδρόφοβου τμήματος, lc είναι το μήκος της αλυσίδας της υδρόφοβης συστάδας (block) στη διεπιφάνεια και το a είναι η αποτελεσματική περιοχή διατομής της υδρόφιλης ομάδας. Αυτή η παράμετρος μπορεί να χρησιμοποιηθεί προκειμένου να προβλεφθεί η μορφολογία των σχηματιζόμενων συσσωματωμάτων των αμφιφίλων. Η μορφολογία που παρουσιάζεται μπορεί να είναι σφαιρική με ($p < 1/3$) ή κυλινδρική με ($1/3 < p < 1/2$) ή και να έχει τη μορφή κυστιδίου ή και διπλοστοιβάδας όπου ο παράγοντας πακεταρίσματος παίρνει την τιμή ($1/2 < p < 1$).

Είναι αυτή η γενικότητα η οποία έχει διευκολύνει να κατανοήσουμε την αυτό-συναρμολόγηση με σκοπό να προχωρήσουμε πέρα από τα φωσφολιπίδια και τα επιφανειοδραστικά με χαμηλά μοριακά βάρη σε αμφίφιλα υψηλού μοριακού βάρους όπως τα αμφίφιλα συμπολυμερή κατά συστάδες, τα πολυπεπτίδια και τα δενδριμερή^{60,61}. Τα συμπολυμερή κατά συστάδες (block copolymers) μπορεί να σχεδιαστούν με τον ίδιο αμφίφιλο χαρακτήρα όπως τα φωσφολιπίδια αλλά αποτελούνται από πολυμερικές αλυσίδες οι οποίες συνδέονται ομοιοπολικά ως σειρές από δύο ή περισσότερες συστάδες (blocks). Στη μαζική πολυμερική φάση χωρίς οργανικό διαλύτη, τα συμπολυμερή κατά συστάδες είναι γνωστό ότι λαμβάνουν μεγάλο εύρος μορφολογιών, συμπεριλαμβανομένου των φυλλωδωτών φάσεων («lamellar phases»). Η ενυδάτωση αυτών των ξηρών φυλλωδωτών (lamellae) με υδατικό διάλυμα έχει ως αποτέλεσμα μια σταθερή διασπορά αμφιφίλων συμπολυμερών κατά συστάδες που συσσωματώνονται.

Όπως προαναφέρθηκε, το p αποτελεί τον παράγοντα πακεταρίσματος “packing parameter” και κατ’ αναλογία με το p για τα συμπολυμερή αναφέρεται το f , το οποίο f αντικατο-

πρίζει και την ικανότητα των πολυμερών να σχηματίζουν πολυμεροσώματα. Μεταβάλλοντας τον παράγοντα πακεταρίσματος στο υδρόφιλο μέρος των συστάδων, η μορφολογία του σχηματιζόμενου εκ νέου συσσωματώματος σε υδατικό διάλυμα μετατρέπεται και σχηματίζει σφαιρικά κυστίδια (spherical vesicles), ($f > 50\%$), ελικοειδή-σαν “σκουλήκια” μικκύλια “wormlike micelles” ($40\% < f < 50\%$)⁶² ή και μονοστρωματικά πολυμερικά κυστίδια (unilamellar polymer vesicles) με ($25\% < f < 40\%$) που αναφέρονται και ως «πολυμεροσώματα»⁵⁸. Αρχικές εργασίες με συμπολυμερή που έχουν τιμές f τέτοιες ώστε συστηματικά να αποδίδουν πολυμεροσώματα με μέσα - αριθμητικά μοριακά βάρη (MWs) που κυμαίνονται από 2.000 έως ~ 20.000 Da έχουν δείξει με τη μέθοδο της κρυογενικής μικροσκοπίας μετάδοσης ηλεκτρονίων, (cryogenic transmission electron microscopy) (cryo-TEM), ότι ο πυρήνας της μεμβράνης (d) αυξάνεται με την αύξηση του μοριακού βάρους από $d \sim 8$ σε 21 nm⁶³.

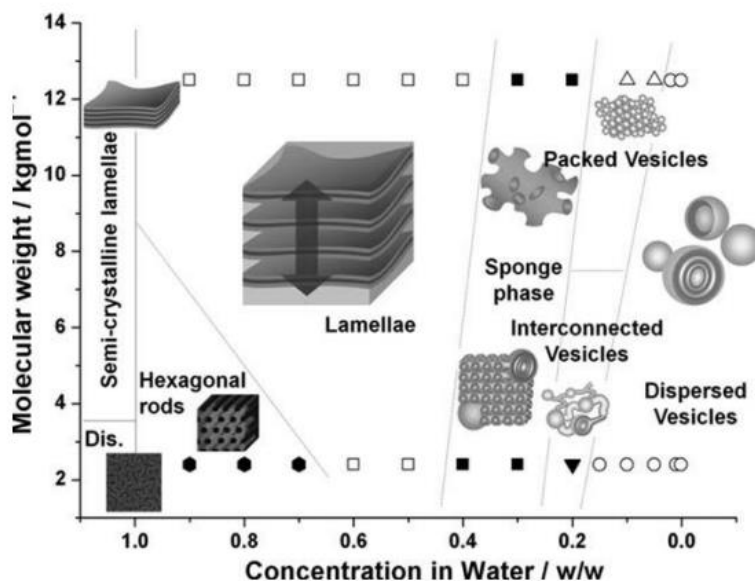
Τα πολυμεροσώματα που παράγονται από AB δι-συστάδες συμπολυμερών (diblock copolymers) εμφανίζουν αλληλοσυνδεδεμένη μεμβράνη. Η ισχυρή εμπλοκή εντός του υδρόφοβου στρώματος μπορεί να θεωρηθεί ως φυσική διασταυρούμενη σύνδεση που ενισχύει τις μηχανικές ιδιότητες των συσσωματωμάτων αυτών συγκρινόμενων με αυτές των συμβατικών λιπосωμάτων⁶⁶. Τα τρισυσταδικά συμπολυμερή (triblock copolymers) BAB είναι σχετικά με τα δι-συσταδικά συμπολυμερή αφού υπάρχει μόνο μια μοριακή διαμόρφωση που οδηγεί στο σχηματισμό μεμβράνης: τα υδρόφοβα άκρα της αλυσίδας συναρμολογούνται σε μεμβράνη και η υδρόφιλη συστάδα (block) σχηματίζει έναν βρόγχο σχήματος U⁶⁷. Η μεμβρανική διαμόρφωση μπορεί να εξελιχθεί ακόμα περισσότερο χρησιμοποιώντας πολυσυσταδική αρχιτεκτονική (multiblocks) που περιλαμβάνουν διαφορετικά πολυμερή που υποβάλλονται σε διαχωρισμό φάσεων μετά την συναρμολόγηση. Όταν η αναλογία υδρόφοβου προς υδρόφιλου τμήματος είναι τέτοια που να ευνοεί το σχηματισμό μεμβράνης^{68,69} ABC συμπολυμερή συναρμολογούνται σε ασύμμετρες μεμβράνες οι οποίες σχηματίζουν πολυμεροσώματα των οποίων η χημεία της εσωτερικής και εξωτερικής επιφάνειας είναι διαφορετική μεταξύ τους ούτως ώστε να ελαχιστοποιείται η επιφανειακή τάση και να ενισχύεται η καμπυλότητα των κυστιδίων.⁵⁷



Εικόνα 4: Μεμβρανική διαμόρφωση των πολυμεροσωμάτων που σχηματίζονται με diblock (AB), triblock (ABA,BAB,ABC), multiblock copolymers και mikto-arm copolymers. ⁵⁷

3.3.2 Πολυμεροσώματα κινητική σχηματισμού

Τα πολυμεροσώματα σχηματίζοντας συμπολυμερή κατά συστάδες(block copolymers), όπως όλα τα αμφίφιλα, συναρθροίζονται σε λυοτροπικές φάσεις με υγρή κρυσταλλική κατάσταση όπως αντίστροφες εξαγωνικές δομές, ελασματοειδείς-φυλλιδωτές (lamellae), εξαγωνικές διάτρητες μεμβράνες, σπογγώδεις φάσεις κλπ ⁷⁰. Λεπτομερής αναπαράσταση γίνεται με την εικόνα που ακολουθεί, όπου η σχηματιζόμενη μορφολογία παριστάνεται γραφικά ως συνάρτηση του μοριακού βάρους και της συγκέντρωσης στο νερό. Το μέγεθος των αμφιφίλων επηρεάζει σημαντικά και το σχηματισμό λυοτροπικών φάσεων αλλά και τον σχηματισμό διεσπαρμένων κυστιδίων. Η εξέλιξη από το στερεό σε λυοτροπικό υγρό δείχνει ότι τα χαμηλού μοριακού βάρους συμπολυμερή συναρμολογούνται αρχικά σε ανεστραμμένη εξαγωνική δομή και μετα σε ελασματοειδή-φυλλοειδή (lamellae), ενώ τα υψηλού μοριακού βάρους συμπολυμερή διαλύονται απ' ευθείας σε ελασματοειδή-φυλλοειδή φάση(lamellar phase).



Εικόνα 5: Διαγράμματα φάσης συμπολυμερών/νερού.⁵⁷

Η μετάβαση από την φυλλοειδή (lamellae) σε σπογγώδη φάση δεν επηρεάζεται από το μοριακό βάρος των αμφίφιλων. Σε αντίθεση με το προηγούμενο, η μετάβαση από τη σπογγώδη φάση σε κυστίδια είναι ποιοτικά διαφορετική και εξαρτάται από το μέγεθος των αμφίφιλων συμπολυμερών κατά συστάδες. Μικρότερα συμπολυμερή σχηματίζουν διεσπαρμένα κυστίδια σε υψηλές συγκεντρώσεις, ενώ υψηλού μοριακού βάρους συμπολυμερή αρχικά σχηματίζουν κυστοειδείς συστάδες με μορφή γέλης (vesicular gel clusters), τα οποία τελικά διασπώνται σε διεσπαρμένα κυστίδια. Το μοριακό βάρος των αμφίφιλων επηρεάζει επίσης τη φύση των σχηματιζομένων κυστιδίων, μεγάλα αμφίφιλα σχηματίζουν αποκλειστικά μονοστοιβαδικά κυστίδια και τα μικρότερα συμπολυμερή σχηματίζουν πολυστοιβαδικά κυστίδια.⁵⁷

Το μοριακό βάρος των συμπολυμερών δεν επηρεάζει μόνο τη μετάβαση φάσεων αλλά και την κινητική από φάση σε φάση. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως, από τα πιο ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά των συγκροτημάτων των συμπολυμερών κατά συστάδες είναι η μη-εργοδική φύση τους (no-ergodic)⁷¹. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι δεν υπάρχει καμία ανταλλαγή μεταξύ των μικκυλίων/κυστιδίων με το διάλυμα, υποδυκνείοντας μια κρίσιμη συγκέντρωση συσσώματωσης κοντά στο μηδέν⁷². Αυτή είναι μια επιθυμητή ιδιότητα για τα πολυμεροσώματα και σε αυτή οφείλεται η μεγάλη διάρκεια ζωής που παρατηρείται σε αυτά.

Τα πολυμεροσώματα που σχηματίζονται από συμπολυμερή κατά συστάδες διογκώνονται σε επαφή με το νερό με δύο ποιοτικώς διαφορετικά καθεστώτα. Αρχικά, το νερό και το συμπολυμερές διαχέονται το ένα μέσα στο άλλο ακολουθώντας ένα καθεστώς υπό-διαχυσης ως αποτέλεσμα του μοριακού επιπέδου διατάξης των αμφίφιλων. Μετά από ένα κρίσιμο χρονικό διάστημα, το οποίο μεταβάλλεται εκθετικά με το μοριακό βάρος του πολυμερούς, οι αμφίφιλες μεμβράνες αποκτούν την μορφολογία ισορροπίας τους και συνεπώς η ανάπτυξη αρχίζει να ακολουθεί μια χαρακτηριστική διάχυση κατά Fickian. Τέτοιου είδους περίπλοκες κινητικές εξηγούν τον λόγο για τον οποίο τα πολυμεροσώματα άργησαν να μελετηθούν σε σχέση με τα συμπολυμερή μικύλλια.

3.3.3 Μέθοδοι παρασκευής πολυμεροσωμάτων

A) Μέθοδος χωρίς διαλύτη

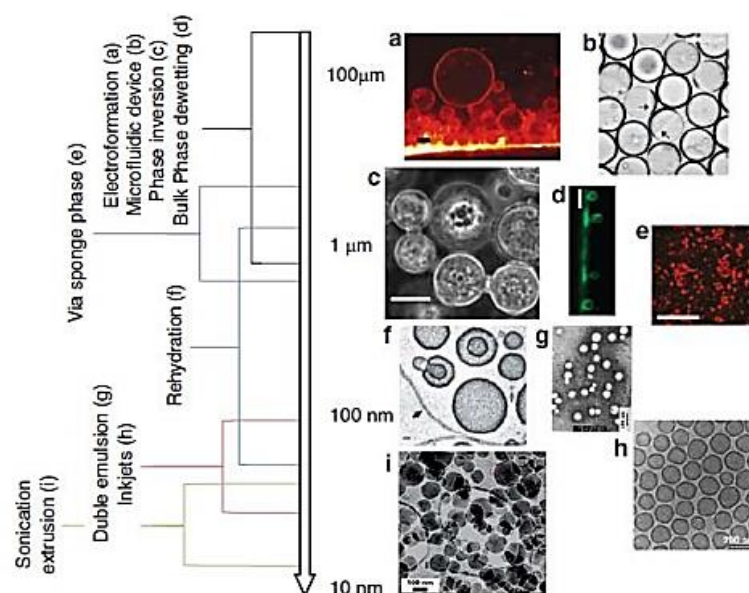
Κατά την ενυδάτωση του συμπολυμερούς η κινητήρια δύναμη για το σχηματισμό πολυμεροσωμάτων είναι μια κλίση-βαθμίδωση της συγκέντρωσης μεταξύ του συμπολυμερούς, το οποίο διαχέεται στο νερό, και του νερού το οποίο διαχέεται στο συμπολυμερές. Κατά την απλή ενυδάτωση η κλίση της συγκέντρωσης μειώνεται εκθετικά με τον χρόνο. Καθώς η βαθμίδωση της συγκέντρωσης μεταβάλλεται, οι φυλλοειδείς δομές (lamellar structures) δεν έχουν επαρκή χρόνο για να αποσυνδεθούν πλήρως. Προκειμένου να διασφαλιστεί η αμοιβαία διάχυση και να διατηρηθεί η κλίση της συγκέντρωσης σταθερή, χρειάζεται μια εξωτερική πηγή ενέργειας που πρέπει να εφαρμοστεί. Η πιο συνηθισμένη μέθοδος για τον σχηματισμό πολυμεροσωμάτων είναι η ενυδάτωση υμενίου (film hydration). Η μέθοδος αυτή παράγει πολυμερικά εναιωρήματα με μεγάλη κατανομή μεγέθους αλλά και μεγάλες ποσότητες από άλλες μετασταθείς φάσεις.^{66,73}

B) Μέθοδος με οργανικό διαλύτη

Μια άλλη μέθοδος σχηματισμού πολυμεροσωμάτων βασίζεται σε οργανικούς διαλύτες κάνει χρήση του «νερού σε έλαιο σε νερό» (water-in-oil-in-water) (W/O/W) έχοντας δηλαδή σαν πρότυπο τα διπλά γαλακτώματα⁷⁴. Αυτή η μέθοδος επιτρέπει το σχηματισμό πολυμεροσωμάτων

με ασύμμετρη μεμβράνη όπου τα εσωτερικά και εξωτερικά φύλλα-επιφάνειες έχουν διαφορετική σύνθεση. Αυτό επιτυγχάνεται σταθεροποιώντας ένα «νερό σε έλαιο» γαλάκτωμα χρησιμοποιώντας το συμπολυμερές για το εσωτερικό φύλλο και παράγοντας κυστίδια διαπερνώντας τα υδατικά σταγονίδια μέσω μια δεύτερης διεπιφάνειας ελαίου σε νερό που περιέχει το συμπολυμερές για να σχηματιστεί το εξωτερικό φύλλο της μεμβράνης. Η συνένωση των πολυμεροσωμάτων τελικά λαμβάνεται με ελεγχόμενη αφαίρεση του νερού της οργανικής φάσης χρησιμοποιώντας διαπίδυση μέσω των μεμβρανών (“dialysis”). Το μόνο μειονέκτημα της μεθόδου με οργανικό διαλύτη είναι ότι τα υπολείμματα οργανικού διαλύτη μπορεί να επιφέρουν βιολογική τοξικότητα, περιορίζοντας την εφαρμογή και χρήση των πολυμεροσωμάτων που έχουν σχηματιστεί χρησιμοποιώντας τη συγκεκριμένη μέθοδο παρασκευής⁷⁵.

Το μέγεθος των πολυμεροσωμάτων είναι κρίσιμο για τον σχεδιασμό των συστημάτων μεταφοράς φαρμακομορίων. Το μέγεθος καθορίζει την τύχη των σωματιδίων τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. *In vivo* το μέγεθος είναι αυτό που καθορίζει τους χρόνους κυκλοφορίας των σωματιδίων, την ικανότητά τους να φτάνουν συγκεκριμένους στόχους, την πιθανότητα εξαγγείωσης, τις ιδιότητες ροής τους και την τελική αποσύνθεση ή κάθαρση τους. Όσον αφορά τα πολυμεροσώματα δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο ποιοί παράγοντες ελέγχουν το μέγεθός τους επίσης όλες οι μέθοδοι που αναλύθηκαν παραπάνω είχαν ως αποτέλεσμα πολυμεροσώματα με μεγέθη που κυμαίνονταν από μερικές δεκάδες έως και χιλιάδες nm. Συγκεκριμένα όσον αφορά το σχηματισμό πολυμεροσωμάτων, παρατηρήθηκε ότι καθώς η αναλογία υφρόφοβου/υδρόφιλου τμήματος του συμπολυμερούς πλησιάζει την περιοχή μικκυλίου (δηλαδή το συμπολυμερές είναι κυρίως υδρόφιλο) η μέση διάμετρος κυστιδίου μειώνεται από τρεις τάξεις μεγέθους. Αυτό απλά αποδίδεται στις αποδοχές που αφορούν την καμπυλότητα, ξεκάθαρα είναι εμφανές ότι όσο πιο υδρόφιλο συνολικά είναι το συμπολυμερές οι καμπυλώδεις δομές εμφανίζονται πιο σταθεροποιούμενες. Αντιθέτως, με την χρήση των επιχειρημάτων που αφορούν την ανάπτυξη κρυστάλλων, μπορούμε να δείξουμε ότι οι διαστάσεις των πολυμεροσωμάτων είναι αντιστρόφως ανάλογες της συγκέντρωσης, έτσι υπό συνθήκες ανάμειξης όπου η συγκέντρωση διατηρείται υψηλή τα κυστίδια εμφανίζονται να έχουν διαμετρο της τάξης των nm, ενώ σε ήπιες συνθήκες ανάμειξης η διάμετρος των κυστιδίων είναι της τάξης των μm. Πειραματικά, το μέγεθος των πολυμεροσωμάτων καθορίζεται αυστηρά από την μεθοδολογία που έχει χρησιμοποιηθεί.



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση της κατανομής μεγέθους των πολυμεροσωμάτων ανάλογα με τη μεθοδολογία που εφαρμόστηκε για την παρασκευή τους.⁵⁷

3.3.4 Ιδιότητες και εφαρμογές πολυμεροσωμάτων

Αποκρινόμενα πολυμεροσώματα

Ένα από τα πλεονεκτήματα των πολυμεροσωμάτων είναι ότι οι ιδιότητες των πολυμερικών διαλυμάτων ελέγχονται καθοριστικά από την χημεία της πλευρικής ομάδας τους. Η ίδια πολυμερική αλυσίδα είναι δυνατό να αποτελείται από διαλυτά και αδιάλυτα μέρη και η ισορροπία αυτών υπαγορεύει τη συνολική διαλυτότητα. Επομένως, η διαλυτότητα του πολυμερούς μπορεί να μεταβληθεί από εξωτερικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία, το pH, η ιονική ισχύς κλπ. Η αποκρισιμότητα των πολυμερών έχει αξιοποιηθεί σε μεγάλο βαθμό στην μηχανική πολυμερών και έχουν επινοηθεί αρκετές συσκευές οι οποίες βασίζονται στην πολυμερική διαλυτότητα⁷⁹. Όταν πρόκειται για πολυμεροσώματα αυτές οι ιδιότητες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την δημιουργία δομών ικανών να διαλύονται κάτω από συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες.

Μια καλή προσέγγιση είναι η σύζευξη υδρόφιλων πολυμερών με υδρολύσιμα πολυμερή^{80, 81, 82}. Σε επαφή με το νερό, αυτά τα πολυμερή αποικοδομούνται, οδηγώντας σε μη ανα-

στρέψιμη αποσυναρμολόγηση των πολυμεροσωμάτων και επομένως, την απελευθέρωση του περιεχομένου τους. Η ικανότητα της αποικοδόμησης μετά από το πέρας ενός συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος ή μετά από κάποιο εξωτερικό ερέθισμα φαίνεται να είναι κρίσιμης σημασίας για τον σχεδιασμό νέων φορέων. Αναστρέψιμη αποσυναρμολόγηση μπορεί να επιτευχθεί με συνδυασμό υδρόφιλων πολυμερών με πολυμερή τα οποία παρουσιάζουν διαλυτότητα ισχυρά εξαρτώμενη από το pH, την θερμοκρασία και το υπεριώδες φως UV. Η περιπτώσεις αποκρινόμενων στο pH πολυμεροσωμάτων είναι πολλές, όπως για παράδειγμα, τα βασιζόμενα σε poly(L-glutamic acid)- poly(L-lysine)⁸³, τα οποία μπορούν να οργανώνονται αναστρέψιμα σε ασθενώς όξινα ή βασικά υδατικά διαλύματα. Τέλος παρόμοια μετάβαση μπορεί να επαχθεί με χρήση ευαίσθητων στο UV ομάδων, όπως poly(ethylene oxide)-poly(methylphenylsilane) (PEO-PMPS) και azobenzenecontaining poly(methacrylate)-poly(acrylic acid) (PAA-PAzoMA)⁸⁴.

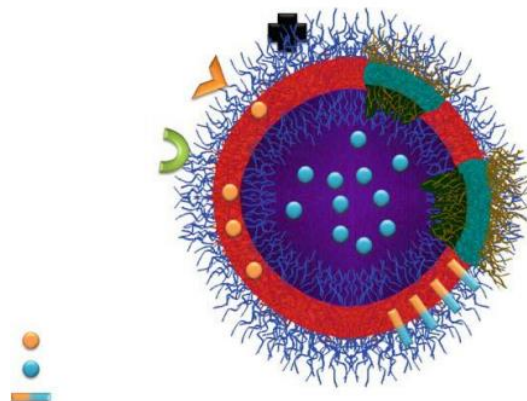
3.3.5 Χημεία επιφανείας πολυμεροσωμάτων

Η πολυμεροσωμική μεμβράνη είναι το αποτέλεσμα της αυτοοργάνωσης των αμφίφιλων κατά συστάδες συμπολυμερών στο νερό. Όπως προαναφέρθηκε, οι υδρόφιλες συστάδες (blocks) συγκεντρώνονται σε πυκνές διευθετήσεις τύπου βούρτσας (brush configuration), όπου ανάλογα με την φύση του πολυμερούς, μπορούν να μεταβάλλουν τα επιφανειακά χαρακτηριστικά του πολυμεροσώματος και την αλληλεπίδραση του με το περιβάλλον. Ως παράδειγμα αναφέρονται συμπολυμερή κατά συστάδες που περιέχουν PEO και τα οποία οργανώνονται σε πολυμεροσώματα με υψηλά ενυδατωμένα και ουδέτερη πολυμερική διευθέτηση βούρτσα η οποία έχει πολύ μικρή αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες⁸⁶. Αυτή η διευθέτηση επιτρέπει στα PEO- πολυμεροσώματα να παραμένουν ανεπηρέαστα από βιολογικά υγρά. Η ικανότητα να “κρύβονται” από το ανοσοποιητικό σύστημα έχει χρησιμοποιηθεί για να ενισχύσει το χρόνο ζωής της κυκλοφορίας των λιποσωμάτων και άλλων νανοσωματιδίων. Το πολυαιθυλενοξειδίο και άλλα μη κυτταροτοξικά πολυμερή είναι επιθυμητά για εφαρμογές περιλαμβάνοντας την εκτεταμένη σε χρονικό διάστημα επαφή με τα βιολογικά υγρά.

Επιπρόσθετα, οι επιφάνειες των πολυμεροσωμάτων είναι δυνατόν να εμπλουτισθούν με δραστικές ομάδες όπως πρωτεΐνες, αντισώματα, υδατάνθρακες κλπ. Μία από τις απλούστερες μεθόδους για να «εμπλουτισθούν» τα πολυμεροσώματα είναι με την εισαγωγή του συμπλέγματος της βιοτίνης. Η σύνδεση των ομάδων βιοτίνης με τις υδρόφιλες συστάδες συμπολυμερούς χρησιμοποιείται για να επισυνάψει τις ομάδες αβιδίνης σε προ-σχηματισμένα πολυμεροσώματα.

Χρησιμοποιώντας μια παρόμοια προσέγγιση, πολυμεροσώματα συζευγμένα με αντι-ICAM-1 αντισώματα δοκιμάστηκαν για την θεραπεία ενδοθηλιακών κυττάρων που υφίστανται φλεγμονή.

88



Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση των αποκρινόμενων πολυμεροσωμάτων με τις ιδιότητές τους. ⁵⁷

3.3.6 Εφαρμογές πολυμεροσωμάτων

Μερικές σημαντικές εφαρμογές των πολυμεροσωμάτων έχουν εφαρμογή από την απεικόνιση των ιστών *in vivo* χρησιμοποιώντας εκπομπή εγγύς υπερύθρου⁸⁹ μέχρι και τον εγκλωβισμό πρωτεϊνών, DNA και αντικαρκινικών φαρμάκων, με σκοπό την μεταφορά και απελευθέρωση των τελευταίων. Επιπλέον, τα πολυμεροσώματα προσφέρουν τη δυνατότητα να ενσωματωθούν σε αυτά εξίσου και υδρόφοβες και υδρόφιλες δραστικές ουσίες (π.χ DOX και DOX-HCl), καθιστώντας εφικτή την παραγωγή στοχευμένων νανομεταφορέων για «συνδυαστική μεταφορά φαρμάκων» (“combined drug delivery”), κυρίως σε σχέση με την έρευνα για την αντιμετώπιση του καρκίνου.

Τόσο τα υδρόφιλα αντικαρκινικά φαρμακομόρια (DOX) όσο και τα υδρόφοβα (paclitaxel) έχουν εγκλωβιστεί αυθόρμητα εντός των PEO-PLA και PEO-PCL πολυμεροσωμάτων, όπως αναφέρεται από τους Discher research group ⁹⁰. Αυτά τα πολυμεροσώματα δεν έχουν μόνο την ικανότητα να απελευθερώσουν τα φαρμακομόρια στον ανθρώπινο καρκινικό όγκο του

μαστού που είχε εμφυτευτεί σε ποντίκια, αλλά παρατηρήθηκε εξίσου και καθυστέρηση στην ανάπτυξη και μείωση του όγκου.

3.4 Συμπεράσματα

Τα πολυμεροσώματα είναι ικανά να εγκλωβίσουν υδρόφιλα, υδρόφοβα και αμφίφιλα μόρια και η μακρομοριακή φύση τους τα καθιστά πιο ισχυρά και πιο σταθερά σε συνδυασμό με την ικανότητα «ανταπόκρισης» των πολυμερών. Οι ιδιότητές τους αυτές, καθιστούν τα πολυμεροσώματα μια από τις πιο αξιόλογες και σημαντικές υπερμοριακές δομές με πιθανές εφαρμογές στην μεταφορά και απελευθέρωση φαρμάκων, στην γονιδιακή θεραπεία και στη νανοτεχνολογία.

Το 1995 εμφανίστηκε η πρώτη αναφορά για τα πολυμερικά κυστίδια ⁹¹ και από τότε μέχρι και σήμερα είναι αναρίθμητες οι δημοσιεύσεις που έχουν παρουσιαστεί και οι διαφορετικές προσεγγίσεις που έχουν γίνει. Συμπερασματικά και με βάση τα παραπάνω, τα πολυμεροσώματα μπορούν να θεωρηθούν ως κομβικό σημείο για τη νανοτεχνολογία καθώς μπορούν να σχεδιαστούν και να χρησιμοποιηθούν σε πληθώρα βιολογικών εφαρμογών με δυνατότητα συνδυασμού πολλών βιοαποκρίσιμων και πολυλειτουργικών πολυμερών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ

4.1 Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC, Size Exclusion Chromatography) είναι μια από τις πιο εύκολες, γρήγορες και αξιόπιστες μεθόδους προσδιορισμού κατανομής μοριακών βαρών για την ανάλυση των μακρομορίων. Απαιτείται μικρή ποσότητα δείγματος της τάξεως του 1-2 mg, καθώς επίσης να είναι το δείγμα πλήρως διαλυτό στο διαλύτη που χρησιμοποιείται. Το δείγμα εφόσον διαλυθεί καλά μεταφέρεται από το διαλύτη μέσα σε στήλες οι οποίες είναι πακεταρισμένες με πορώδες υλικό που έχει μεγάλο εύρος πόρων (από 50 έως 10^5 nm). Το πορώδες υλικό μπορεί να αποτελείται είτε από ανόργανα υλικά (silica gel, πορώδες γυαλί), είτε να είναι οργανικής φύσεως (πολυστυρένιο δικτυωμένο με διβινυλοβενζόλιο).

Ο διαχωρισμός των μακρομορίων γίνεται μόνο με βάση τον υδροδυναμικό τους όγκο, και ιδανικά δεν πρέπει να υπάρχει καμία αλληλεπίδραση ανάμεσα στο πορώδες υλικό και τα μακρομόρια, καθώς ο χαρακτηρισμός δεν θα είναι αξιόπιστος και θα προκύψουν σφάλματα. Τα μακρομόρια με το μεγαλύτερο υδροδυναμικό όγκο εκλούνται πρώτα, ενώ αυτά με το μικρότερο υδροδυναμικό όγκο εισέρχονται σε περισσότερους πόρους και η έκλουση τους καθυστερεί πιο πολύ. Η ανίχνευση των εκλούμενων μορίων πραγματοποιείται με κατάλληλο ανιχνευτή που βρίσκεται στην έξοδο των στηλών. Οι πιο συνηθισμένοι ανιχνευτές βασίζονται σε διαφορές στο δείκτη διάθλασης (π.χ. διαφορικό διαθλασίμετρο) ή σε μεταβολές στην απορρόφηση του διαλύματος σε μήκη κύματος στην περιοχή του υπεριώδους (π.χ. φασματοφωτόμετρο UV-Vis).⁹²

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών είναι έμμεση τεχνική προσδιορισμού του μοριακού βάρους και της κατανομής μοριακών βαρών, εφόσον απαιτείται βαθμονόμηση η οποία επιτυγχάνεται μετρώντας το χρόνο έκλουσης πρότυπων δειγμάτων (π.χ. συνήθως πολυστυρενίου). Η απευθείας αντιστοίχιση του μοριακού βάρους με τον όγκο έκλουσης μπορεί να γίνει μόνο στη περίπτωση που τα πολυμερή που χρησιμοποιήθηκαν για βαθμονόμηση και τα άγνωστα δείγματα είναι ομοειδή πολυμερή. Αντίθετα για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους πολυ-

μερών διαφορετικής χημικής σύστασης ή αρχιτεκτονικής από αυτή των πολυμερών με τα οποία έγινε η βαθμονόμηση, απαιτείται η χρήση μιας παγκόσμιας καμπύλης αναφοράς της μορφής $\log([\eta]M)=f(V_e)$, όπου $[\eta]$ είναι το εσωτερικό ιξώδες του πολυμερούς με μοριακό βάρος M και όγκο έκλυσης V_e . Στην περίπτωση πολύπλοκων αρχιτεκτονικών η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τη παρακολούθηση της πορείας αντιδράσεων που σχετίζονται με τη σύνθεση (κινητική μελέτη και αντιδράσεις σύζευξης).^{93,94,95}

4.2 Φασματοσκοπία υπερύθρου Infra Red (IR)

Όταν οργανική ένωση προσβληθεί από μία δέσμη ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, απορροφά ενέργεια σε συγκεκριμένα μήκη κύματος, αλλά αφήνει να διέλθει ενέργεια σε διαφορετικά μήκη κύματος. Αν ακτινοβολήσουμε ένα δείγμα με ενέργεια πολλών διαφορετικών μηκών κύματος και εντοπίσουμε ποια απορροφώνται και ποια διέρχονται, μπορούμε να προσδιορίσουμε το φάσμα απορρόφησης της ένωσης. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται σε ένα γράφημα που καταγράφει το μήκος σε σχέση με την διερχόμενη ακτινοβολία.

Η πρόσθετη ενέργεια που αποκτά ένα μόριο, όταν απορροφά ακτινοβολία, πρέπει να κατανεμηθεί με κάποιο τρόπο σε ολόκληρο το άτομο. Για παράδειγμα, η απορρόφηση ακτινοβολίας μπορεί να αυξήσει την κινητική ενέργεια του μορίου, αναγκάζοντας τους δεσμούς να αποκτούν μεγαλύτερο μήκος ή να κάμπτονται περισσότερο. Εναλλακτικά, η απορρόφηση ακτινοβολίας μπορεί να αναγκάσει κάποιο ηλεκτρόνιο να μεταπηδήσει από ένα τροχιακό χαμηλής ενέργειας σε ένα τροχιακό υψηλότερης ενέργειας. Διαφορετικές συχνότητες ακτινοβολίας επιδρούν στα μόρια με διαφορετικούς τρόπους. Υπάρχουν πολλά είδη φασματοσκοπίας, ανάλογα με την περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος που χρησιμοποιείται.

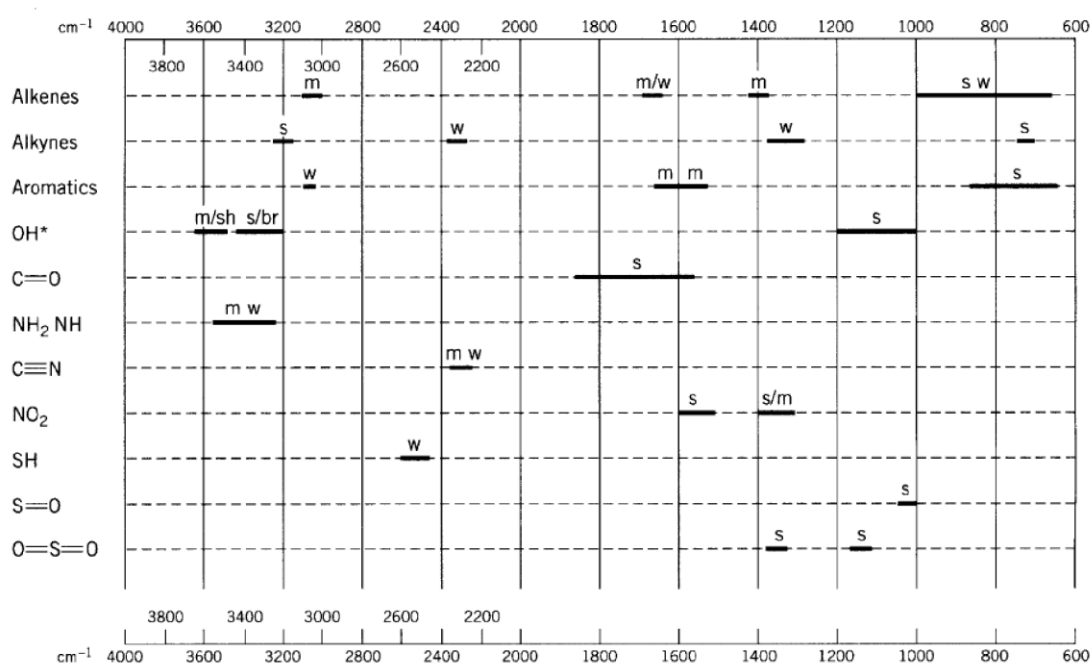
Η περιοχή υπερύθρου (IR) του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος καλύπτει την περιοχή αμέσως μετά το ορατό ($7,8 \cdot 10^{-5} \text{ cm}$), μέχρι τα 10^{-2} cm περίπου, αλλά μόνο η ενδιάμεση περιοχή, από τα $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}$ ως τα $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ cm}$, χρησιμοποιείται από τους οργανικούς χημικούς. Τα μήκη κύματος εντός της περιοχής IR δίνονται συνήθως σε μικρότερα ($1 \mu\text{m} = 10^{-4} \text{ cm}$), ενώ οι συχνότητες εκφράζονται σε κυματάρια (ν) μάλλον παρά σε Hertz. Ο κυματάριας, που εκφράζεται σε μονάδες αντιστρόφων εκατοστώμετρων (cm^{-1}), είναι απλώς το αντίστροφο του μήκους κύματος. Έτσι η χρήσιμη περιοχή του IR είναι από τα 4000 cm^{-1} ως τα 400 cm^{-1} . Χρησιμοποιώντας την

εξίσωση $E=(.20 \cdot 10^{-2} \text{kJ/mol})/\lambda$, μπορούμε να υπολογίζουμε τα επίπεδα ενέργειας της ακτινοβολίας IR.

Όλα τα μόρια διαθέτουν κάποια συγκεκριμένη ποσότητα ενέργειας, κατανομημένη σε όλη την δομή τους, που προκαλεί στους δεσμούς δονήσεις (επιμηκύνσεις) και κάμψεις. Ταυτόχρονα, εξαιτίας της, τα άτομα πάλλονται και περιστρέφονται, ενώ παρατηρούνται και διάφορες άλλες μοριακές δονήσεις. Μερικές επιτρεπτές μορφές δονήσεων και κάμψεων είναι οι παρακάτω: η συμμετρική δόνηση τάσης, η αντισυμμετρική δόνηση τάσης, η ομοεπίπεδη κάμψη και η κάμψη εκτός πεδίου.

Όταν το μόριο δέχεται ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, απορροφάται ενέργεια, όταν η ενέργεια της ακτινοβολίας είναι ίδια με την ενεργειακή διαφορά μεταξύ δύο δονητικών συχνοτήτων. Όταν ένα μόριο απορροφά ακτινοβολία IR, η μοριακή δόνηση που έχει συχνότητα ίση με εκείνη της ακτινοβολίας αυξάνει το πλάτος της. Εφόσον κάθε συχνότητα που απορροφάται από ένα μόριο αντιστοιχεί σε μία προκαθορισμένη μοριακή κίνηση, μπορούμε να διαπιστώσουμε τις κινήσεις του μορίου, μελετώντας το φάσμα του IR (Πίνακας 2). Από την ερμηνεία αυτών των κινήσεων μπορούμε να συμπεράνουμε τι είδους δεσμοί (λειτουργικές ομάδες) υπάρχουν στο μόριο.

Πίνακας 2: Απορροφήσεις διάφορων χαρακτηριστικών ομάδων με τις αντίστοιχες εντάσεις.⁹⁶



- Η υπέρυθη περιοχή από τις 4.000 cm^{-1} ως τα 400 cm^{-1} είναι δυνατό να χωριστεί σε τέσσερα τμήματα:
- Η περιοχή από 4.000 cm^{-1} έως 2500 cm^{-1} αντιστοιχεί σε απορροφήσεις που προκαλούνται από δονήσεις επιμηκύνσεις(τάσεις) των απλών δεσμών N-H, C-H, και O-H . Οι δεσμοί N-H και O-H απορροφούν στην περιοχή 3300-3600 cm^{-1} , ενώ ο δεσμός C-H απορροφά γύρω στα 3000 cm^{-1}
- Στην περιοχή 2500-2000 cm^{-1} λαμβάνει χώρα η δόνηση επιμήκυνσης(τάσης) του τριπλού δεσμού. Εδώ απορροφούν τα νιτρίλια και τα αλκύνια.
- Στην περιοχή από 2000-1500 cm^{-1} απορροφούν όλοι οι διπλοί δεσμοί. Οι καρβονυλικές ομάδες απορροφούν γενικά στην περιοχή μεταξύ 1680 και 1750 cm^{-1} , ενώ η επιμήκυνση του δεσμού των αλκενίων συμβαίνει συνήθως σε μια περιορισμένη περιοχή μεταξύ 1640 και 1680 cm^{-1} .
- Η περιοχή κάτω από τα 1500 cm^{-1} είναι περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος. Εδώ εμφανίζονται πολλές απορροφήσεις που οφείλονται σε μια ποικιλία δεσμών C-C, C-O, C-N, C-X.

4.3 Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός(NMR)

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR)^[84,85] είναι η χρησιμότερη φασματοσκοπική τεχνική μέθοδος που έχουν στη διάθεσή τους οι χημικοί. Είναι η πρώτη μέθοδος προσδιορισμού της δομής των μορίων, προς την οποία στρέφονται για την άντληση πληροφοριών, γιατί παρέχει ένα “χάρτη” του όλου ανθρακικού σκελετού με τα άτομα υδρογόνου σε ένα μόριο. Στο χώρο των πολυμερών αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο, γιατί με τη βοήθειά της προσδιορίζουμε τη στερεοχημική απεικόνιση (τακτικότητα) του πολυμερούς καθώς και τη γεωμετρική ισομέρεια, τη δομή και τη σύσταση των συμπολυμερών, ενώ επίσης πραγματοποιείται η μελέτη της δυναμικής των μακρομορίων σε διάλυμα και σε στερεά κατάσταση.

Το φαινόμενο του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού εκδηλώνουν όλοι οι πυρήνες με περιττό αριθμό πρωτονίων και όλοι οι πυρήνες με περιττό αριθμό νετρονίων. Μόνο οι πυρήνες με άρτιο αριθμό νετρονίων και πρωτονίων δεν προξενούν μαγνητικά φαινόμενα ($I=0$). Έτσι, οι

πυρήνες πολλών ατόμων (^1H , ^{13}C) συμπεριφέρονται σαν να περιστρέφονται γύρω από κάποιον άξονα (πυρηνικό spin, $I = 1/2$). Δεδομένου ότι είναι θετικά φορτισμένοι, οι περιστρεφόμενοι πυρήνες λειτουργούν ως μικροσκοπικοί μαγνήτες και κατά συνέπεια αλληλεπιδρούν με ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο H_0 . Τα πυρηνικά spin των μαγνητικών πυρήνων προσανατολίζονται, απουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, κατά τυχαίο τρόπο. Όταν, όμως, ένα δείγμα που περιέχει αυτούς τους πυρήνες τοποθετηθεί ανάμεσα στους πόλους ενός ισχυρού μαγνήτη, οι πυρήνες αποκτούν συγκεκριμένους προσανατολισμούς. Ο πυρήνας μπορεί να διαταχθεί έτσι ώστε το δικό του εξαιρετικά μικρό μαγνητικό πεδίο να είναι είτε παράλληλο (ενεργειακή κατάσταση με κβαντικό μαγνητικό αριθμό spin, $m_I = 1/2$) είτε αντιπαράλληλο (ενεργειακή κατάσταση με $m_I = -1/2$) προς το εξωτερικό πεδίο. Οι δύο προσανατολισμοί δεν έχουν την ίδια ενέργεια και συνεπώς δεν είναι εξίσου πιθανοί. Ο παράλληλος προσανατολισμός είναι χαμηλότερης ενέργειας, ευνοώντας σχετικά αυτή την κατάσταση του spin έναντι του αντιπαράλληλου προσανατολισμού.

Αν οι προσανατολισμένοι πυρήνες ακτινοβοληθούν τώρα με κατάλληλης συχνότητας ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, λαμβάνει χώρα απορρόφηση ενέργειας και μεταβάλλονται οι πληθυσμοί πυρήνων στις δύο καταστάσεις (αναστροφή spin). Όταν πραγματοποιηθεί αυτή η αναστροφή, λέγεται ότι οι πυρήνες έχουν συντονιστεί με την εφαρμοζόμενη ακτινοβολία. Η ακριβής συχνότητα που απαιτείται για το συντονισμό εξαρτάται από την ισχύ του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου και από το είδος του πυρήνα.

Όλοι οι πυρήνες στα μόρια περιβάλλονται από ηλεκτρόνια. Όταν ασκηθεί ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο σε κάποιο μόριο, τα ηλεκτρόνια δημιουργούν τα δικά τους μικροσκοπικά τοπικά μαγνητικά πεδία. Αυτά τα τοπικά μαγνητικά πεδία δρουν αντίθετα προς το εφαρμοζόμενο πεδίο, έτσι ώστε το πραγματικό πεδίο στον πυρήνα να είναι λίγο μικρότερο από το εξωτερικό.

$$H_{\text{πραγματικό}} = H_{\text{εφαρμοζόμενο}} - H_{\text{τοπικό}}$$

Περιγράφοντας αυτό το φαινόμενο, μπορούμε να πούμε ότι οι πυρήνες προστατεύονται από την πλήρη επίδραση του εφαρμοζόμενου πεδίου, λόγω των ηλεκτρονίων που τους περιβάλλουν. Επειδή κάθε συγκεκριμένος πυρήνας ενός μορίου βρίσκεται σε κάπως διαφορετικό ηλεκτρονιακό περιβάλλον, προστατεύεται και σε κάπως διαφορετική έκταση, με αποτέλεσμα το πραγματικό εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο να μην είναι ίδιο για κάθε πυρήνα και έτσι να απορροφούν διαφορετικής συχνότητας (ενέργειας) ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία.

Συνέπεια των παραπάνω είναι ότι οι πυρήνες σε διαφορετικά χημικά περιβάλλοντα δίνουν διαφορετική γραμμή συντονισμού. Για να εκφραστούν με ενιαίο τρόπο οι μεταβολές των γραμμών συντονισμού, στους διάφορους πυρήνες, χρησιμοποιούνται πρότυπες ουσίες αναφοράς

και εισάγεται η έννοια της χημικής μετατόπισης. Ως ουσία αναφοράς χρησιμοποιείται συνήθως το τετραμεθυλοσιλάνιο [TMS, (CH₃)₄Si], που έχει δώδεκα ισοδύναμα (άρα δίνει μία κορυφή απορρόφησης) και ισχυρά προασπισμένα πρωτόνια.

Η χημική μετατόπιση ορίζεται από τις σχέσεις:

$$\delta = (H_\alpha - H_\delta) / H_\alpha \times 10^6 \text{ ppm}$$

$$\delta = (\nu_\alpha - \nu_\delta) / \nu_\alpha \times 10^6 \text{ ppm}$$

όπου H_α και H_δ τα πεδία συντονισμού των πυρήνων της ουσίας αναφοράς και του δείγματος αντίστοιχα, ενώ ν_α και ν_δ οι συχνότητες συντονισμού της ουσίας αναφοράς και του δείγματος αντίστοιχα. Όπως ορίζεται το δ στις παραπάνω σχέσεις, είναι αδιάστατο και ανεξάρτητο του H_ϵ -φαρμοζόμενο. Από τις ίδιες εξισώσεις φαίνεται ότι όσο πιο θωρακισμένος είναι ένας πυρήνας τόσο ο συντονισμός θα επιτυγχάνεται σε υψηλά εφαρμοζόμενα μαγνητικά πεδία, όταν σαρώνεται το μαγνητικό πεδίο, αλλά σε χαμηλότερη συχνότητα, όταν μεταβάλλεται η ραδιοσυχνότητα.

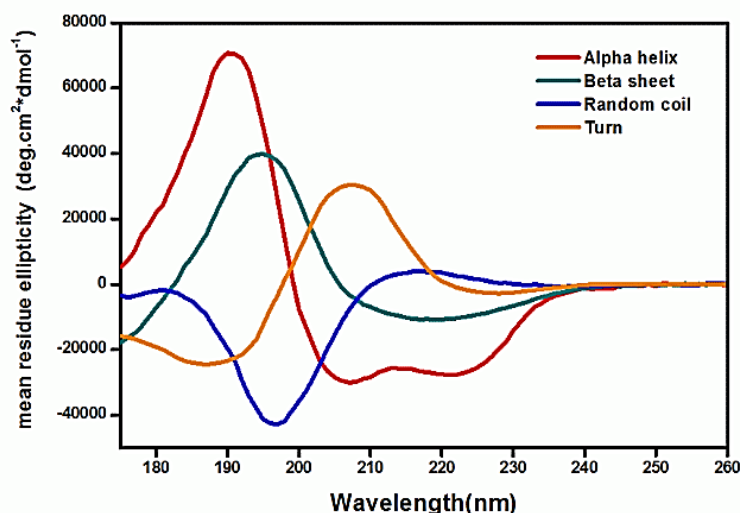
Από τα παραπάνω διαπιστώνουμε ότι κάθε διαφορετικός πυρήνας (π.χ. ¹H) θα σχηματίζει μία απλή κορυφή. Συχνό φαινόμενο αποτελεί, ωστόσο, η απορρόφηση ενός πυρήνα να διασπάται σε πολλαπλές κορυφές. Το φαινόμενο των πολλαπλών απορροφήσεων αποκαλείται σχάση spin – spin και προκαλείται από την αλληλεπίδραση ή σύζευξη των πυρηνικών spin γειτονικών πυρήνων. Εκτός από την ηλεκτρονιακή προστασία, το μαγνητικό πεδίο που υφίσταται ένας πυρήνας επηρεάζεται επίσης από τους γειτονικούς μαγνητικούς πυρήνες. Σύμφωνα με ένα γενικό κανόνα, που αποκαλείται κανόνας $n+1$, πυρήνες με n ισοδύναμους γειτονικούς πυρήνες εμφανίζουν $n+1$ κορυφές στο φάσμα του NMR. Οι σχετικές εντάσεις των κορυφών είναι οι συντελεστές των όρων του αναπτύγματος $(1+x)^n$. Έτσι για παράδειγμα, ένας πυρήνας που διαχωρίζεται από δύο άλλους γειτονικούς θα δίνει μια τριπλή κορυφή με εντάσεις κορυφών 1:2:1. Η απόσταση μεταξύ των επιμέρους κορυφών σε μία πολλαπλή κορυφή ονομάζεται σταθερά σύζευξης και συμβολίζεται J . Η σταθερά σύζευξης είναι ίδια και για τους δύο πυρήνες, τα spin των οποίων συζεύγνυνται και δεν εξαρτάται από την ισχύ πεδίου του φασματοφωτομέτρου. Τέλος, στη φασματοσκοπία ¹H–NMR και όχι στη ¹³C–NMR (λόγω του πυρηνικού φαινομένου Overhauser, Nuclear Overhauser Effect, NOE) το εμβαδόν που περικλείει κάθε κορυφή είναι ανάλογο προς τον αριθμό των πρωτονίων που προκαλούν την κορυφή. Ολοκληρώνοντας το εμβαδόν κάθε κορυφής είναι δυνατό να μετρήσουμε το σχετικό αριθμό των κάθε είδους πρωτονίων σε ένα μόριο. Με τον τρόπο αυτό εξάγονται ποσοτικά συμπεράσματα συγκρίνοντας το εμβαδόν χαρακτηριστι-

κών κορυφών πρωτονίων ενός μορίου (π.χ. αν μία δραστική ομάδα έχει αντιδράσει με όλες τις μακρομοριακές αλυσίδες).

4.4 Κυκλικός διχρωϊσμός πολυπεπτιδίων

Η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού παρέχει δομικές πληροφορίες. Είναι εξαιρετικά ευαίσθητη σε αλλαγές διαμόρφωσης της πολυμερικής αλυσίδας στο χώρο, και απαιτούνται σχετικά μικρές ποσότητες διαλυμένης ουσίας. Οι κύριες εφαρμογές της φασματοσκοπίας του κυκλικού διχρωϊσμού στη μελέτη των βιομορίων είναι: α) Η προσδιορισμός της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών αλλά και πως η αλλαγή του pH επιδρά στη διαμόρφωση που λαμβάνουν οι πολυμερικές αλυσίδες, β) η καταγραφή της μετουσίωσης των πρωτεϊνών ή των νουκλεϊκών οξέων που προκαλείται από αλλαγές θερμοκρασίας ή με την προσθήκη χημικών αποδιατακτικών όρων.

Στη διαμόρφωση τυχαίου σπειράματος (άτακτη μορφή) το φάσμα απορρόφησης ενός πολυπεπτιδίου είναι βασικά αυτό ενός N-υποκατεστημένου αμιδίου. Υπάρχει ένα μέγιστο απορρόφησης στα 190nm περίπου που αντιστοιχεί στη χαμηλότερης ενέργειας μετάπτωση π σε π^* και υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις που υποδεικνύουν ότι μέσα σ' αυτή την ταινία απορρόφησης υποκρύπτεται και μια n σε π^* μετάπτωση κοντά στα 220nm.⁹⁷



Σχήμα 26: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού της πολυπεπτιδικής αλυσίδας σε διαμόρφωση α-έλικας (κόκκινη καμπύλη), β-φύλλου (πράσινη καμπύλη), δομή τυχαίου σπειράματος (μπλε καμπύλη) και στροφής (πορτοκαλί καμπύλη).

Καθώς η φασματοσκοπία του κυκλικού διχρωισμού είναι απαραίτητη για τον προσδιορισμό της δευτεροταγούς δομής πρωτεϊνών και πολυπεπτιδίων, για την ανάλυση των φασμάτων που προκύπτουν από τη χρήση του, έχουν αναπτυχθεί πολλοί, αξιόπιστοι, ευρέως χρησιμοποιούμενοι αλγόριθμοι. Αν και η χρήση αυτών των αλγορίθμων έχει διευκολύνει τους ερευνητές στην αποτίμηση των φασμάτων και την πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής, σε μικρό χρόνο και με μεγάλη ακρίβεια, τα μειονεκτήματά τους είναι εμφανή στις περιπτώσεις πολύπλοκων διαμορφώσεων. Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά τα διάφορα μοτίβα, τις υποκατηγορίες των πλούσιων σε β-φύλλο πρωτεϊνών όπως η δομή φουρκέτας, τις υπερδευτεροταγείς δομές όπως η γωνία τυροσίνης, τις διάφορες υποκατηγορίες που εμπίπτουν στην α-έλικα όπως η 3_{10} -έλικα και η π-έλικα, οι υπάρχοντες αλγόριθμοι δεν είναι επαρκείς να προσδιορίσουν ποσοτικά τις διαμορφώσεις. Όλοι οι αλγόριθμοι, παρά τις διαφορές τους, βασίζονται σε ένα κοινό, σε γενικές γραμμές, τύπο ο οποίος αποτελεί γραμμικό συνδυασμό των δομικών στοιχείων της δομής που προβάλλει ένα φάσμα συν τη συνεισφορά του θορύβου και τη συνεισφορά των χρωμοφόρων και πρόσθετων ομάδων :

$$\theta_{\lambda} = \sum \epsilon_i S_{\lambda i} + \theta_{\text{όρυβος}}$$

Με θ_{λ} τον κυκλικό διχρωισμό συναρτήσει του μήκους κύματος, ϵ_i το τμήμα κάθε δομής i και $S_{\lambda i}$ την ελλειπτικότητα που παρουσιάζει σε κάθε μήκος κύματος η δομή του εκάστοτε τμήματος. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιούνται μερικοί από τους πολλούς αλγορίθμους και τα χαρακτηριστικά τους παρατίθενται παρακάτω.

- Ridge Regression Algorithm (CONTIN): Το CONTIN εισήχθη από τους Provencher & Glockner το 1982 και προβλέπει το φάσμα άγνωστων πρωτεϊνικών δομών και πολυπεπτιδίων, συγκρίνοντάς το με φάσματα γνωστών πρωτεϊνών που βρίσκονται σε μια ευρεία βάση δεδομένων. Η συγκεκριμένη μέθοδος παρέχει καλές προσεγγίσεις α-ελίκων και β-φύλλων και παρέχει τη δυνατότητα επιλογής εύρους μήκους κύματος για κάθε φάσμα. Επιπρόσθετα, ένα σημαντικό για τους χρήστες πλεονέκτημά του, είναι ο ελάχιστος χρόνος που απαιτείται για να ληφθούν τα αποτελέσματα (< 1 λεπτό).
- Self Consistent Method (SELCON): Το SELCON αναπτύχθηκε το 1993 από τους Sreerama & Woody. Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στον αλγόριθμο SVD (Singular Value Decomposition) ο οποίος βασίζεται σε παραγοντοποιήσεις και

συσχετίζει τα φάσματα γνωστών πρωτεϊνών, με αυτά των αγνώστων. Το σημαντικό πλεονέκτημά του SELCON και του SVD, για την παρούσα εργασία, είναι η ακρίβειά τους σε εκτιμήσεις α-έλικας. Στον αντίποδα, το βασικότερο μειονέκτημα αυτών αποτελεί η ανακριβής αποτίμηση φασμάτων που αντιστοιχούν σε β-φύλλο και στροφή, σε περίπτωση που τα φάσματα δεν έχουν ληφθεί, τουλάχιστον, μέχρι τα 184 nm. Επιπρόσθετα, ένα ακόμη μειονέκτημα της μεθόδου, αλλά και ο λόγος που δεν χρησιμοποιήθηκε για την αποτίμηση όλων των φασμάτων της παρούσας εργασίας, είναι η λανθασμένη πρόβλεψη της δομής των πολυπεπτιδίων, σε αντίθεση με αυτή των πρωτεϊνών. Το SELCON διαθέτει τρεις εκδόσεις (SELCON1, SELCON2 και SELCON3) από τις οποίες, η πλέον αξιόπιστη είναι η SELCON3 η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί μέσω του ηλεκτρονικού προγράμματος DichroWeb.

- K2D και CDNN: Τα K2D και CDNN ανήκουν στην κατηγορία Neutral Networks. Η λειτουργία τους είναι απλή και βασίζεται σε συναρτήσεις συσχέτισης του φάσματος CD (input) και της δευτεροταγούς δομής (output). Όσον αφορά το K2D, παρέχει καλά αποτελέσματα για τις ευρείες κατηγορίες του β-φύλλου, της α-έλικας και του τυχαίου σπειράματος και μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιηθεί με σχετική εγκυρότητα για πολυπεπτίδια. Ωστόσο, δεν προτιμάται στην παρούσα εργασία, καθώς τα αποτελέσματα που παρέχει προκύπτουν στρογγυλοποιημένα και δεν υπάρχει ποικιλία δομών. Το CDNN δεν παρέχει καθόλου αξιόπιστα αποτελέσματα για τα πολυπεπτίδια και για αυτό το λόγο δε χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα στην εργασία.
- BeStSel (β-Structure Selection): Η συγκεκριμένη μέθοδος η οποία εισήχθη από τους Micsonai *et al.* το 2015, αποτελεί ένα συνδυασμό αλγορίθμων και παρέχει πληροφορίες όχι μόνο για τις βασικές κατηγορίες δευτεροταγούς δομής, αλλά και για τον τύπο της δομής όπως, παράλληλο ή αντιπαράλληλο β-φύλλο με δεξιόστροφους, αριστερόστροφους ή χαλαρούς κλώνους. Επίσης, περιλαμβάνει το χαρακτηρισμό της στροφής, ενώ το τυχαίο σπείραμα και διάφορες υποκατηγορίες των κύριων δομών κατατάσσονται στην κατηγορία “Others”. Επιπροσθέτως, δίνει πληροφορίες για την τοπολογία και την αρχιτεκτονική των πολυπεπτιδίων και πρωτεϊνών, χρησιμοποιώντας ως βάση δεδομένων το δίκτυο PDB (Protein Data Bank) και το CATH (Class Architecture Topology Homologous superfamily).

4.5 Σκέδαση Φωτός (Light Scattering)

Για τον προσδιορισμό των διαστάσεων ενός πολυμερούς σε διάλυμα χρησιμοποιείται η δυναμική σκέδαση φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS).^{98,99}

Σε ένα διάλυμα πολυμερούς τα μόριά του βρίσκονται σε διαρκή τυχαία κίνηση που προκαλείται από τη θερμική ενέργεια που μεταβιβάζεται σε αυτά μέσω συγκρούσεων με τα μόρια του διαλύτη (κίνηση Brown). Εξαιτίας των συγκρούσεων τα μόρια του πολυμερούς εκτελούν μεταφορική, αλλά και περιστροφική κίνηση. Η πιθανότητα $P(X,t)$ να βρεθεί ένα μόριο στη θέση X στη χρονική στιγμή t , αν υποθεθεί ότι βρισκόταν στην αρχή των αξόνων τη χρονική στιγμή $t=0$ δίνεται από τη σχέση:

$$\partial P(X,t)/\partial t = D_t \partial^2 P(X,t)/\partial X^2, \quad (1)$$

όπου D_t είναι ο συντελεστής διάχυσης μεταφορικής κίνησης του μορίου. Αντίστοιχα αν ένα μόριο κυλινδρικού σχήματος υπόκειται σε κίνηση Brown η πιθανότητα να βρεθεί στις σφαιρικές συντεταγμένες θ, φ στο χρόνο t είναι $P(\theta\varphi/\theta_0\varphi_0, t)$ με θ_0, φ_0 τις συντεταγμένες σε $t=0$ και δίνεται από τη σχέση:

$$\partial P/\partial t = (\Omega/\sin^2 \theta)[(\partial \sin \theta/\partial \theta)^2 + (\partial^2/\partial \varphi^2)]P, \quad (2)$$

με Ω το συντελεστή διάχυσης περιστροφικής κίνησης. Από τις Σχέσεις 1 και 2 φαίνεται ότι οι συντελεστές διάχυσης των μακρομορίων συνδέονται άμεσα με την κίνησή τους. Αφού τα κινούμενα μόρια σκεδάζουν φως με τρόπο που συνδέεται ποσοτικά με την κίνησή τους, είναι δυνατόν, χρησιμοποιώντας πειράματα σκέδασης φωτός, να προσδιοριστούν οι συντελεστές διάχυσης των μορίων. Οι συντελεστές αυτοί συνδέονται άμεσα με χαρακτηριστικές ιδιότητες των μορίων, όπως το μοριακό βάρος, το σχήμα και το μέγεθός τους καθώς και με αλληλεπιδράσεις πολυμερούς - διαλύτη.

Όταν μονοχρωματική ακτινοβολία στο ορατό φάσμα προσπίπτει σε ένα διαυγές υγρό το φως σκεδάζεται, λόγω διακυμάνσεων πυκνότητας. Στην περίπτωση διαλυμάτων η σκέδαση φωτός οφείλεται κυρίως σε διακυμάνσεις συγκέντρωσης. Οι διακυμάνσεις αυτές συνδέονται με την κίνηση Brown. Αν δεν υπάρχει αλλαγή συχνότητας της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σε σχέση με αυτή της προσπίπτουσας, η σκέδαση ονομάζεται ελαστική. Αν οι διακυμάνσεις (πυκνότητας και συγκέντρωσης) δεν αλλάζουν πολύ με το χρόνο ή εάν η ένταση σκεδάσεως μετράται για μία χρονική περίοδο που είναι μεγάλη σε σχέση με το χρόνο μεταβολής των διακυμάνσεων, δεν παρατηρείται αλλαγή στη συχνότητα του σκεδαζόμενου φωτός. Ωστόσο, οι διακυμάνσεις σε δια-

λύματα εξαρτώνται από το χρόνο εξαιτίας της κίνησης Brown. Έτσι η συχνότητα του σκεδαζόμενου φωτός θα έχει ένα φάσμα χαρακτηριστικό της χρονικής εξάρτησης των διακυμάνσεων και της κίνησης των μακρομορίων (φαινόμενο Doppler). Επειδή η διαφορά συχνότητας μεταξύ προσπίπτουσας και σκεδαζόμενης ακτινοβολίας είναι μικρή, το είδος αυτό της σκέδασης καλείται ημιελαστική σκέδαση φωτός.

Τα σκεδάζοντα μακρομόρια σε ένα διάλυμα κινούνται με παρόμοιες ταχύτητες, αλλά σε τυχαίες κατευθύνσεις. Εξαιτίας της ομοιότητας στην κίνησή τους το σκεδαζόμενο φως από τα μόρια αυτά λέγεται ότι έχει συσχέτιση στο χρόνο.

Η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης αποτελεί πραγματική ποσότητα και μπορεί να μετρηθεί με κατάλληλες διατάξεις.

Στην απλή περίπτωση ενός συνόλου από σφαιρικά μη αλληλεπιδρώντα μεταξύ τους ομοειδή σωματίδια που κινούνται μέσα σε ένα υγρό (διάλυμα) η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης γράφεται:

$$g(T) = A_0 + A \exp(-\Gamma T), \quad (3)$$

όπου $\Gamma = D_t q^2$ η σταθερά παρακμής της συνάρτησης και $q = (4\pi n/\lambda) \sin(\theta/2)$ το άνυσμα σκέδασης, όπου n ο δείκτης διάθλασης του μέσου, λ το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και θ η γωνία παρατήρησης. Αφού το Γ μπορεί να προσδιοριστεί με κατάλληλη ανάλυση των πειραματικών δεδομένων και εφόσον είναι γνωστές οι παράμετροι που υπεισέρχονται στην τιμή του q μπορεί να υπολογιστεί ο D_t . Η αντίστοιχη συνάρτηση του φάσματος ισχύος γράφεται:

$$I(\omega) = (2D_t q^2) / [\omega^2 + (2D_t q^2)^2], \quad (4)$$

Με τη βοήθεια του D_t μπορούν να προσδιοριστούν κάποιες μοριακές ιδιότητες του πολυμερούς, αλλά και θερμοδυναμικές ιδιότητες του διαλύματος. Γενικά ο D_t εξαρτάται από τη συγκέντρωση, όταν υπάρχουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων:

$$D_t = D_{t,0} (1 + k_D c + \dots), \quad (5)$$

όπου $D_{t,0}$ ο συντελεστής διάχυσης σε άπειρη αραιώση και k_D σταθερά που περιέχει θερμοδυναμικές και υδροδυναμικές παραμέτρους του συστήματος που μελετάται. Η k_D εξαρτάται από το πολυμερές και το διαλύτη που χρησιμοποιούμε, όπως και τη θερμοκρασία. Συγκεκριμένα:

$$k_D = 2A_2M - k_f - (N_A V_2/M) = 2A_2M - k_f - u_2, \quad (6)$$

όπου A_2 ο δεύτερος συντελεστής virial, M το μοριακό βάρος, N_A η σταθερά του Avogadro, V_2 ο όγκος του μορίου του πολυμερούς, u_2 ο ειδικός γραμμομοριακός όγκος του πολυμερούς και kf ο συντελεστής αναλογίας στη σχέση που δίνει την εξάρτηση του μοριακού συντελεστή τριβής f του πολυμερούς από τη συγκέντρωση, $f=f_0(1+kfc)$ στο συγκεκριμένο διαλύτη. Γενικά ο D_i δίνεται από τη σχέση Stokes- Einstein:

$$D_i = kT/f, \quad (7)$$

με k τη σταθερά Boltzmann και T την απόλυτη θερμοκρασία. Για σφαιρικά μη αλληλεπιδρώντα σωματίδια:

$$f = 3\pi\eta d, \quad (8)$$

όπου η το ιξώδες του ρευστού σε θερμοκρασία T και d η διάμετρος του σωματιδίου. Έτσι για την πιο απλή περίπτωση είναι δυνατόν με τη δυναμική σκέδαση φωτός να εξαχθεί το μέγεθος των σωματιδίων - μορίων στο διάλυμα.

Για μη σφαιρικά σωματίδια, το d από τη Σχέση 7 γίνεται μία μέση τιμή. Στη γενική περίπτωση:

$$f = 6\pi\eta F(r^2)^{1/2}, \quad (9)$$

όπου η $F(r^2)^{1/2}$ αποτελεί έναν παράγοντα δομής και $(r^2)^{1/2}$ είναι η τετραγωνική ρίζα του τετραγώνου της μέσης από άκρο σε άκρο απόστασης για το μόριο που εξετάζεται. Για τις περισσότερες εφαρμογές είναι αρκετό να υπολογιστεί μία υδροδυναμική ακτίνα $R_h(=d/2)$ ισοδύναμης σφαίρας από τη σχέση:

$$R_h = kT/6\pi\eta D_{t,0}. \quad (10)$$

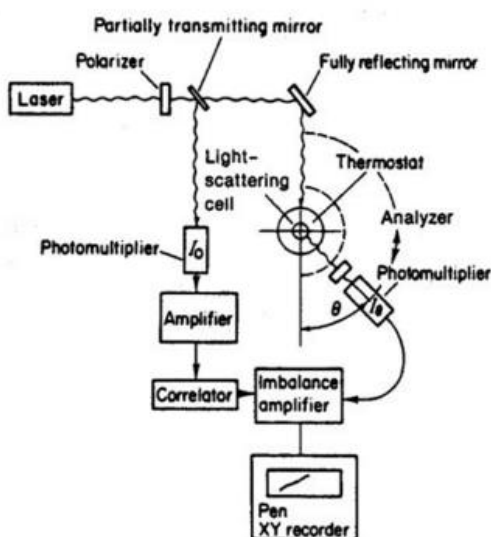
Η R_h αποτελεί ένα μέτρο του υδροδυναμικού όγκου του πολυμερούς στο διάλυμα, όπως αυτός καθορίζεται από τις αλληλεπιδράσεις πολυμερούς - διαλύτη, θερμοκρασίας και τα παρόμοια.

Για ομόλογα πολυμερή ο συντελεστής διάχυσης συνδέεται με το μοριακό βάρος μέσω της σχέσης:

$$D_{t,0} = KM^{-b} \quad (11)$$

που είναι ανάλογη της σχέσης Mark-Houwink-Sakurada για το εσωτερικό ιξώδες. Οι σταθερές K , b έχουν συγκεκριμένες τιμές για δεδομένο σύστημα πολυμερούς - διαλύτη - θερμοκρασίας. Για εύκαμπτα μακρομόρια σε θ διαλύτες $b=0,5$, ενώ για καλούς διαλύτες $b=0,55 - 0,58$.

Όλα τα πολυμερή που εξετάζονται αποτελούνται συνήθως από μόρια με μία κατανομή μοριακών βαρών με αποτέλεσμα οι μετρούμενες συναρτήσεις συσχετισμού να αποτελούν άθροισμα εκθετικών όρων. Επομένως, αν τα δεδομένα αναλυθούν με κάποια μαθηματική διαδικασία, μπορούν να αποκτηθούν πληροφορίες για την κατανομή μεγέθους των σωματιδίων στο διάλυμα. Πολλές μαθηματικές διαδικασίες έχουν αναπτυχθεί για την αντιμετώπιση του προβλήματος της πολυδιασποράς. Οι δύο πιο διαδεδομένες μέθοδοι ανάλυσης συναρτήσεων συσχέτισης είναι αυτή των αθροισμάτων (cumulants method) και οι τεχνικές κανονικοποίησης (regularization methods) με χαρακτηριστικό αντιπρόσωπο το πρόγραμμα CONTIN.



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση ενός λέιζερ σκέδασης φωτός.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

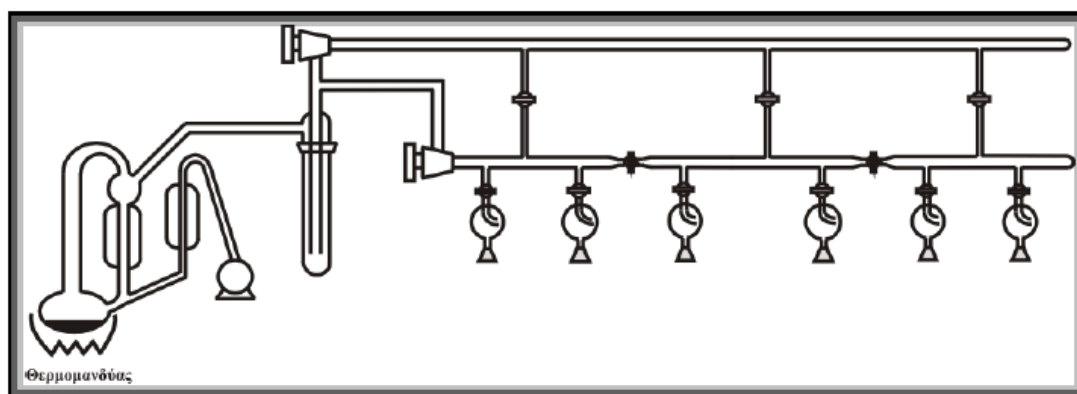
5.1 Τεχνική υψηλού κενού (HVT)

Η σύνθεση των πολυμερών, που αποτελούν το αντικείμενο στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε με συνδυασμό τεχνικών υψηλού κενού και πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των NCAs. Ο συνδυασμός αυτός αποτελεί ιδανική μέθοδο για τη σύνθεση μακρομορίων με καλά καθορισμένα μοριακά χαρακτηριστικά. Για να επιτευχθούν τα επιθυμητά αποτελέσματα όμως, απαιτούνται αυστηρά καθορισμένες συνθήκες. Για το λόγο αυτό, ειδικά σχεδιασμένες συσκευές πολυμερισμού και κατάλληλες τεχνικές υψηλού κενού χρησιμοποιούνται για να απομακρυνθούν από το περιβάλλον των αντιδράσεων όλες εκείνες οι ανεπιθύμητες προσμείξεις που μπορούν να οδηγήσουν σε παράπλευρες αντιδράσεις. Αρχικά, με την επίτευξη υψηλού κενού στον αντιδραστήρα πολυμερισμού απομακρύνεται ο ατμοσφαιρικός αέρας που περιέχει πλήθος ανεπιθύμητων προσμείξεων, όπως οξυγόνο, διοξείδιο του άνθρακα, υγρασία, οι οποίες μπορούν να αντιδράσουν με τους χρησιμοποιούμενους απαρχητές και τις αναπτυσσόμενες αλυσίδες. Στη συνέχεια, με κατάλληλες τεχνικές καθαρισμού αντιδραστηρίων και διαλυτών επιτυγχάνεται η απομάκρυνση από το σύστημα ανεπιθύμητων ουσιών, όπως αλκοόλες, αμίνες και οξέα, δραστικές προσμείξεις περιεχόμενες στα αντιδραστήρια που διατίθενται στο εμπόριο.

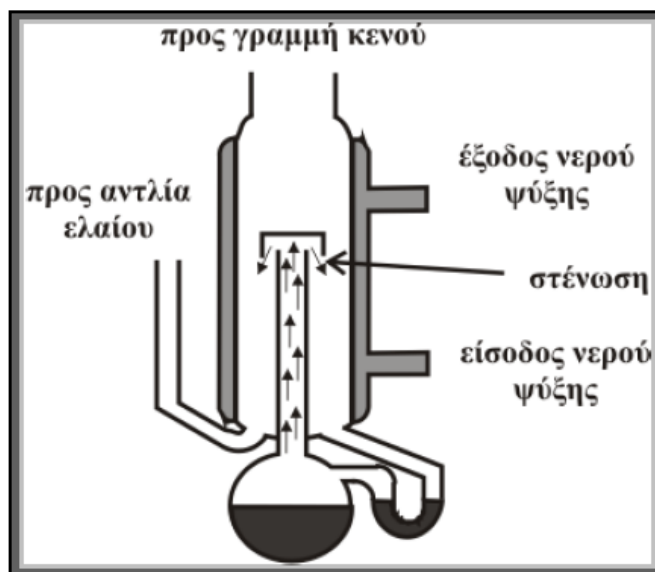
Όλες οι διαδικασίες καθαρισμού των αντιδραστηρίων, διαλυτών, απαρχητών και των πολυμερών έγιναν με τη βοήθεια της γραμμής υψηλού κενού, σχηματική αναπαράσταση της οποίας φαίνεται στην **εικόνα 9**. Η γραμμή υψηλού κενού αποτελείται από γυάλινους σωλήνες (Pyrex), στρόφιγγες Teflon υψηλού κενού (Rotaflon HP 10 mm, 10^{-8} mm Hg), μία αντλία ελαίου και μία αντλία διαχύσεως υδραργύρου. Η αντλία ελαίου δημιουργεί κενό της τάξης των 10^{-2} – 10^{-3} mm Hg. Το προκαταρκτικό αυτό κενό είναι απαραίτητο για να αποστάξει ο υδράργυρος, που βρίσκεται στην αντλία διαχύσεως (**εικόνα 10**), σε σχετικά χαμηλή θερμοκρασία. Καθώς τα μόρια του υδραργύρου κινούνται ανοδικά, διέρχονται από τη στένωση, η οποία προκαλεί αύξη-

ση της ταχύτητάς τους με ταυτόχρονη ελάττωση της πίεσής τους, σύμφωνα με την αρχή του Bernoulli.

Σύμφωνα με την αρχή του Bernoulli, όταν ένα ασυμπίεστο ρευστό ρέει κατά μήκος ενός σωλήνα ροής που δεν έχει σταθερή διατομή, η παροχή (ρυθμός ροής) του δεν πρέπει να αλλάζει. Όταν ένα στοιχείο του ασυμπίεστου ρευστού επιταχύνεται, θα πρέπει να κινείται από μία περιοχή υψηλής πίεσης προς μία άλλη χαμηλής πίεσης, ώστε να υπάρχει συνισταμένη δύναμη που να το επιταχύνει προς τα εμπρός. Όταν η διατομή του σωλήνα ροής μεταβάλλεται, θα πρέπει να αλλάζει και η πίεση ακόμα και αν δεν υπάρχει διαφορά στο ύψος. Έτσι, κατά τη δίοδο των μορίων του υδραργύρου μέσα από τη στένωση προκαλείται αύξηση της ταχύτητάς τους και λόγω της μείωσης της πίεσης που αυτό προκαλεί, δημιουργείται διαφορά πίεσης (υποπίεση) στα άκρα της στήλης. Κατά την επαφή του με τα τοιχώματα του ψυκτήρα, ο υδράργυρος συμπυκνώνεται και επιστρέφει στη φιάλη, όπου και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Έτσι επιτυγχάνεται το τελικό κενό που είναι της τάξης των 10^{-6} mm Hg, ίσο με την τάση ατμών του υδραργύρου.



Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση της γραμμής υψηλού κενού.



Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση της αντλίας διαχύσεως υδραργύρου.

Οι αντλίες ελαίου και διαχύσεως προστατεύονται από πτητικά συστατικά με παγίδες υγρού αζώτου. Με τις στρόφιγγες, το κενό εφαρμόζεται στα επιθυμητά τμήματα της γραμμής, ενώ τα υπόλοιπα τμήματα μένουν απομονωμένα. Η γραμμή κενού περιλαμβάνει πολλές εξόδους με εσμυρίσματα, μέσω των οποίων συνδέονται οι διάφορες συσκευές και γίνεται η εισαγωγή και η απόσταξη των αντιδραστηρίων (διαλύτες, μονομερή). Πριν χρησιμοποιηθεί η γραμμή κενού για απαέρωση, πρέπει να τεθεί σε λειτουργία η αντλία ελαίου, να προσαρμοστεί σ' αυτήν η κενή συσκευή πολυμερισμού και να ανιχνευθεί τυχόν ύπαρξη μικροοπών με τη βοήθεια του πηνίου Tesla. Μόνο όταν εξασφαλιστεί απόλυτη στεγανότητα η γραμμή είναι έτοιμη για τη διεξαγωγή της διαδικασίας απομάκρυνσης του ατμοσφαιρικού αέρα από οποιοδήποτε προς πολυμερισμό σύστημα. Οι αποστάξεις υπό υψηλό κενό γίνονται εύκολα, θερμαίνοντας ελαφρά το προς απόσταξη υγρό και ψύχοντας τον υποδοχέα με υγρό άζωτο ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) ή λουτρό ισοπροπανόλης – ξηρού πάγου ($-78\text{ }^{\circ}\text{C}$). Ο χειρισμός της γραμμής κενού και οι απαραίτητες προφυλάξεις αναφέρονται εκτενώς στη βιβλιογραφία.¹⁰⁰

5.2 Καθαρισμός διαλυτών.

Διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF).

Το DMF (σ.ζ. = 153 °C) αποτελεί τον διαλύτη του πολυμερισμού των NCAs και, επιπρόσθετα, έχει χρησιμοποιηθεί για την αραίωση του απαρχητή. Το DMF υπόκειται τόσο σε θερμική αλλά και φωτοχημική αποικοδόμηση. Κατά την θερμική παράγεται διμεθυλαμίνη (DMA) αλλά και μονοξείδιο του άνθρακα (CO). Επίσης υδρολύεται αργά παρουσία νερού, παράγοντας διμεθυλαμίνη και φορμικό οξύ¹⁰¹, συστατικά που του αποδίδουν και την χαρακτηριστική οσμή του. Αραίωση μονομερών NCAs σε αυτό κρίνεται ως μη φρόνιμη καθώς οδηγεί σε πολυμερισμό με εκκίνηση από την διμεθυλαμίνη όπως θα αποδειχθεί και παρακάτω. Το DMF φυλάσσεται υπο αδρανή ατμόσφαιρα στο glove box σε φιαλίδια των 100ml, και μεταγγίζεται σε φιάλη με στρόφιγγα, η οποία προηγουμένως έχει ξηρανθεί στη γραμμή υψηλού κενού και περιέχει P₂O₅. Αφήνεται να αντιδράσει για μισή ώρα, απαερώνεται και αποστάζεται σε διπλανή φιάλη κλασματικά. Χρησιμοποιούνται τα μεσαία κλάσματα πάντα για κάθε απόσταξη της διαδικασίας. Το DMF που προκύπτει φυλάσσεται στην γραμμή κενού και προστατευμένο από το φώς. Επίσης πρέπει να καταναλωθεί το συντομότερο δυνατόν από την ημέρα καθαρισμού του.

Οξικός αιθυλεστέρας (EtAc).

Ο οξικός αιθυλεστέρας (σ.ζ= 77 °C) χρησιμοποιείται ως διαλύτης τόσο για την σύνθεση των μονομερών (Tyr(tBu)-NCA) όσο και για τις ανακρυσταλλώσεις τους. Ο διαλύτης αφήνεται να αντιδράσει υπό ανάδευση σε φιάλη 2 L με πεντοξείδιο του φωσφόρου (P₂O₅) για μια μέρα. Στη συνέχεια, η φιάλη τοποθετείται στη γραμμή κενού, απαερώνεται και εν συνεχεία αποστάζονται τα μεσαία κλάσματα σε διπλανή φιάλη 2 L με στρόφιγγα όπου απαερώνεται άλλη μια φορά.

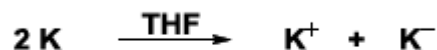
Εξάνιο.

Το εξάνιο (σ.ζ. = 69 °C) αποτελεί τον μη διαλύτη στο σύστημα ανακρυσταλλώσεων διαλύτη-μη διαλύτη για τον καθαρισμό των N-Καρβοξυανυδριτών. Ο καθαρισμός του περιλαμβάνει κατερ-

γασία με μεταλλικό νάτριο για μια ημέρα σε φιάλη των 2L, απαέρωση και απόσταξη στη γραμμή του υψηλού κενού σε γειτονική φιάλη που επίσης περιέχει νάτριο.

Τετραϋδροφουράνιο (THF).

Το τετραϋδροφουράνιο (σ.ζ= 66°C) αφήνεται για μια μέρα να αντιδράσει παρουσία μεταλλικού νατρίου, απαερώνεται και μεταφέρεται σε νέα σφαιρική φιάλη 1000 ml που περιέχει κράμα μεταλλικού καλίου-νατρίου (alloy) σε αναλογία 3:1, όπου και αφήνεται υπό ανάδευση. Η εμφάνιση κυανού χρώματος μετά από λίγες ώρες, αποτελεί ένδειξη της καθαρότητας του THF. Όπως είναι γνωστό, το αρνητικό ιόν καλίου επιδιαλυτώνεται στο THF και σχηματίζει διάλυμα με χαρακτηριστικό μπλε χρώμα. Έχει προταθεί ότι το χρώμα αυτό, προέρχεται από σύμπλοκα του καθαρού διαλύτη με αρνητικά ιόντα των μετάλλων, κυρίως του καλίου, λόγω μεταφοράς ηλεκτρονίων μέσω του THF (επιδιαλυτωμένα ηλεκτρόνια) σύμφωνα με την αντίδραση :



Βενζόλιο

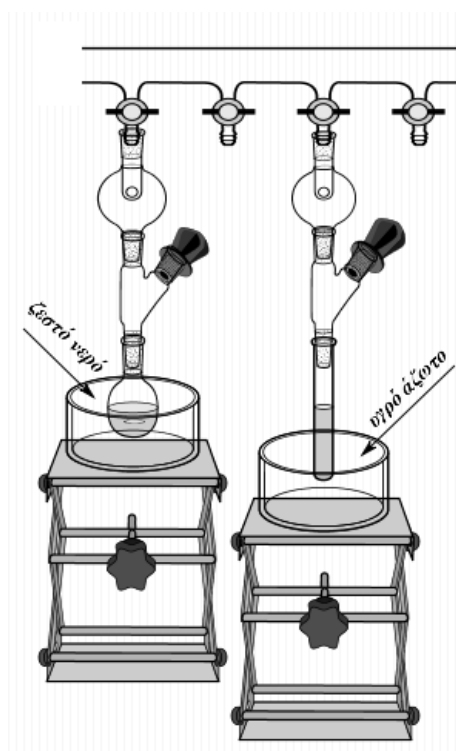
Το βενζόλιο (σ.ζ.= 80 °C) αφήνεται υπό ανάδευση για μια μέρα σε σφαιρική φιάλη που περιέχει λεπτότατα διαμερισμένο CaH_2 , για την απομάκρυνση ιχνών νερού και υγρασίας. Στη συνέχεια η φιάλη τοποθετείται στη γραμμή κενού, το διάλυμα απαερώνεται και αποστάζεται σε φιάλη που περιέχει n-BuLi όπου και αφήνεται υπό ανάδευση για μία μέρα ώστε να αντιδράσουν και τα τελευταία ίχνη προσμίξεων με αυτό.

5.3 Σύνθεση του N-Καρβοξυανυδρίτη της BOC-προστατευμένης-t-Bu-τυροσίνης (Tyr(t-Bu)-NCA).

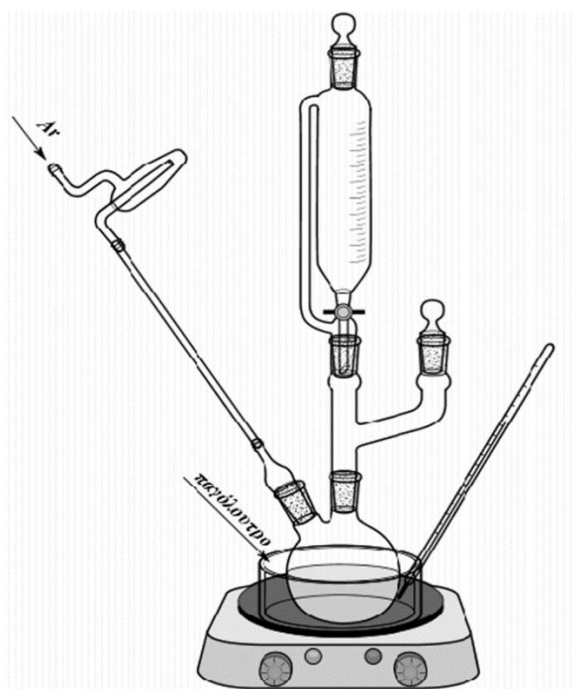
Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη, υπό ροή Αργού, προστίθενται 3g (8.9 mmol) BOC-Tyr(t-Bu)-OH και ξηραίνονται για όλο το βράδυ (overnight) στη γραμμή υψηλού κενού. Την επόμενη μέρα, αποστάζονται ~15 mL καθαρού THF (από διάλυμα NaK-THF) στο μονομερές και παρατηρείται ότι το στερεό της BOC-Tyr(t-Bu)-OH είναι πλήρως διαλυτό στο THF. Μετά την ολοκλήρωση της απόσταξης, η φιάλη τοποθετείται σε παγόλουτρο και υπό ανάδευση στον απαγωγό,

ώστε η χαμηλή θερμοκρασία να παρεμποδίσει τις παράπλευρες αντιδράσεις και συγκεκριμένα, την αποπραστασία του υδροξυλίου, που βρίσκεται στο δακτύλιο της τυροσίνης, από τις t-Butyl ομάδες. Στο ένα στόμιο της φιάλης προσαρμόζεται ψυκτήρας και χοάνη με στρόγιγγα, ενώ στο άλλο συνεχής ροή αργού και έλεγχός της μέσω bubbler.

Σε φιάλη των 50 ml αποστάζονται στη γραμμή υψηλού κενού, 15 ml THF από NaK-THF. Τα 15ml THF μεταγγίζονται στη χοάνη, η οποία έχει ξηρανθεί σε φούρνο των 150°C. Έπειτα, στη χοάνη προστίθενται, στάγδην και σε διάρκεια 5 min, 0.843 mL (11.6 mmol) καθαρού θειονυλογλωριδίου (SOCl_2) το οποίο λαμβάνεται ύστερα από απόσταξη εμπορικού θειονυλογλωριδίου (εικόνα 11). Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 0°C για 1 ώρα όπου το διάλυμα είναι διαυγές και άχρωμο. Για τις επόμενες 3 ώρες, η θερμοκρασία είναι στους 25°C και τελικά λαμβάνεται διαυγές κίτρινο διάλυμα. Κατα τη διάρκεια της αντίδρασης γίνεται λήψη φασμάτων IR, έτσι ώστε να παρακολουθείται η προοδός της. Ένδειξη για το τέλος της αντίδρασης αποτελεί η μείωση της κορυφής στα 1710 cm^{-1} , η οποία οφείλεται στην καρβοξυλική ομάδα του αρχικού αντιδρώντος.



Εικόνα 11: Απόσταξη-Καθαρισμός θειονυλογλωριδίου (SOCl_2) στη γραμμή υψηλού κενού.

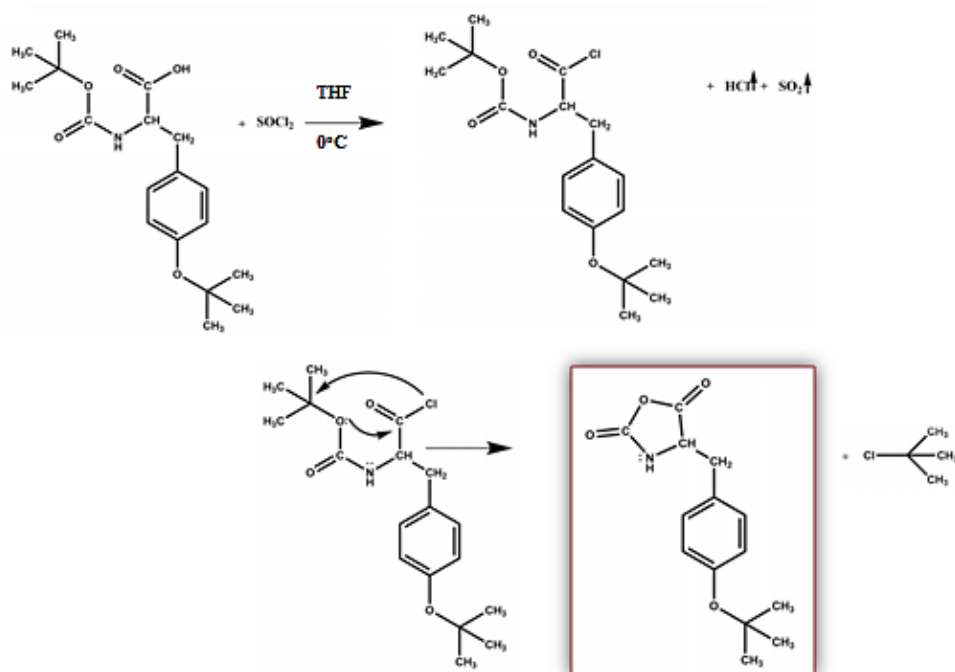


Εικόνα 12: Συσκευή που στήθηκε για τη σύνθεση του Tyr(t-Bu)-NCA

Στη συνέχεια, η καταβύθιση του προϊόντος γίνεται με 700 mL εξανίου στο οποίο, αφενός το προϊόν μας καταβυθίζεται και αφετέρου, βοηθάει στον καθαρισμό του, λαμβάνοντας τελικά, κίτρινο στερεό. Η συμπύκνωση δεν ακολουθείται στους ανυδρίτες διότι τα μόριά τους πλησιάζουν πολύ και αντιδρούν μεταξύ τους. Το κίτρινο στερεό που προέκυψε διαλύεται σε 40 mL οξικό αιθυλεστέρα, όπου τα υδροχλωρικά άλατα καθιζάνουν και το επιθυμητό προϊόν βρίσκεται σε υποκίτρινο διάλυμα. Το ίζημα του άλατος συγκρατείται στο φίλτρο της συσκευής.

Το διάλυμα οξικού αιθυλεστέρα-προϊόντος διηθείται σε ογκομετρική φιάλη στην οποία υπάρχει ήδη εξάνιο στο οποίο καθιζάνει το επιθυμητό προϊόν του NCA. Στη συνέχεια, το λευκό ίζημα του NCA λαμβάνεται ύστερα από διήθηση με εξάνιο σε ηθμό Buchner, ξηραίνεται overnight στη γραμμή υψηλού κενού και φυλάσσεται στο glovebox. Τελικώς, ζυγίστηκαν 1.85 g (7mmol).

Απόδοση κατά mol αντίδρασης σύνθεσης του Tyr(t-Bu)-NCA. : 79%



Σχήμα 27: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού σύνθεσης του Tyr(t-Bu)-NCA.

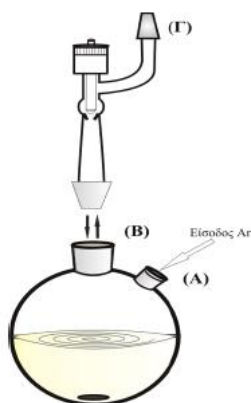
5.3.1 Σύνθεση N^{im}-Trt-(L)-His-NCA

Η σύνθεση για το μονομερές N^{im}-trityl-(L)-His-NCA πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο παραλαμβάνεται το υδροχλωρικό άλας του N^{im}-trityl-(L)-His-NCA και στη συνέχεια απομακρύνοντας το HCl παραλαμβάνεται το καθαρό μονομερές N^{im}-trityl-(L)-His-NCA.

5.3.2 Σύνθεση N^{im}-Trt-(L)-His*HCl NCA

1. Σε δόλιμη φιάλη 2L, η οποία έχει αφεθεί προς ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού, προστίθεται Boc-His(trt)-OH (20g=40.2mmol). Η φιάλη προσαρμόζεται στη γραμμή κενού και το στερεό αφήνεται προς ξήρανση για μια μέρα. 2. Την επόμενη μέρα αποστάζονται ~150 ml καθαρού THF, και στο τέλος της απόσταξης λαμβάνει χώρα απαέρωση. 3. Η φιάλη απομακρύ-

νεται από τη γραμμή, αφήνεται να ξεπαγώσει και τοποθετείται υπό ανάδευση μέσα σε υδρόλουτρο, με το νερό να είναι ελαφρώς ζεστό, ώστε να διαλυτοποιηθεί το στερεό (το διάλυμα είναι ελαφρώς θολό και υποκίτρινο). **4.** Εν συνεχεία η φιάλη μεταφέρεται στον απαγωγό και προετοιμάζεται η διάταξη για την αντίδραση. Ακολουθεί τοποθέτηση της φιάλης σε παγόλουτρο, ώστε να επιβραδυνθούν πιθανές παράπλευρες αντιδράσεις, και από την είσοδο (A) τοποθετείται εσμύρισμα που είναι συνδεδεμένο με παροχή αργού. Προστίθεται στάγδην το θειόνυλο χλωρίδιο SOCl_2 ($3.25 \text{ mL} = 44.2 \text{ mmol}$) υπό ροή αργού, το οποίο είναι ήδη διαλυμένο σε καθαρό THF ($\sim 20 \text{ mL}$). Η προσθήκη ολοκληρώνεται μέσα σε περίπου είκοσι (20) λεπτά. Όταν η προσθήκη ολοκληρωθεί, το διάλυμα έχει αποκτήσει ένα ανοιχτό πορτοκαλί χρώμα και το ιξώδες αυξηθεί σταδιακά μα αισθητά. Η αντίδραση παρακολουθείται μέσω IR, και ανά τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνονται δείγματα και παρακολουθείται η προόδου της αντίδρασης. Ένδειξη για το τέλος της αντίδρασης αποτελεί η μείωση της κορυφής στα 1710 cm^{-1} (IR), η οποία οφείλεται στην καρβοξυλική ομάδα του αρχικού αντιδρόντος. Η αντίδραση διήρκεσε δύομιση ώρες. Στο τέλος αυξάνεται η ροή του αργού.



Σχήμα 28: Αναπαράσταση της συσκευής για τη σύνθεση του N^{im} -trityl-His-NCA.

5. Προστίθεται διαιθυλεθέρας $\sim 2 \text{ L}$ (~ 9 φορές τον όγκο του THF) για την καταβύθιση του N^{im} -trt-(L)-His*HCl NCA ως κύριο προϊόν, ενώ παράλληλα καταβυθίζονται και άλλες προσμίξεις οι οποίες ήταν διαλυτές στο THF, όπως το ενδιάμεσο χλωρίδιο και το αρχικό αμινοξύ. **6.** Το διάλυμα φιλτράρεται από Buchner (με γυάλινο φίλτρο 3) ενώ παράλληλα πάνω από το διάλυμα το οποίο φιλτράρεται αλλά και από το στερεό εφαρμόζεται ήπια ροή αργού ώστε να δημιουργηθεί ένα ασφαλές περιβάλλον για τον NCA. Το στερεό που μένει στο φίλτρο είναι ελαφρώς υποκίτρινο και συλλέγεται σε μια σφαιρική φιάλη των 500 mL . Η φιάλη εφαρμόζεται στη γραμμή του

κενού μέσω κατάλληλου εσφυρίσματος και αφήνεται προς ξήρανση για μια ημέρα. **7.** Ζυγίζεται το στερεό μετά την ξήρανση (17.2 g).

Ακολουθεί το στάδιο του καθαρισμού του N-καρβοξυανυδρίτη, ένα από τα πιο σημαντικά στάδια για την παραλαβή καθαρού μονομερούς. Ο καθαρισμός περιλαμβάνει ανακρυστάλλωσεις από σύστημα οξικού αιθυλεστέρα n-εξανίου. **8.** Αποστάζονται ~300 ml EtAc, το διάλυμα είναι ένα πυκνό λευκό γαλάκτωμα. Αφήνεται υπό ανάδευση για περίπου μία ώρα μέσα σε υδρόλουτρο στους ~40 °C. Ο οξικός αιθυλεστέρας είναι καλός διαλύτης για το αρχικό αμινοξύ, το ενδιάμεσο χλωρίδιο αλλά και το ελεύθερο μονομερές, ενώ αποτελεί κακό διαλύτη για το άλας της N^{im}-trt-(L)-His. Εν συνεχεία το διάλυμα ψύχεται σε παγόλουτρο στους 0 °C, ώστε να καταβυθιστεί ποσοτικά το στερεό trt-His NCA*HCl. **9.** Το διάλυμα διηθείται μέσω Buchner (με γυάλινο φίλτρο τύπου 3) και έτσι παραλαμβάνεται ως μοναδικό προϊόν το N^{im}-trt-(L)-His*HCl-NCA. Το στερεό έχει υφή πούδρας και λευκό χρώμα. Η διήθηση πρέπει να γίνεται σχετικά γρήγορα και με προσοχή, ενώ παράλληλα εφαρμόζεται ήπια ροή αργού ή αζώτου για να εμποδιστεί η επαφή του τελικού προϊόντος με τον ατμοσφαιρικό αέρα και την υγρασία. **10.** Το στερεό συλλέγεται και μεταφέρεται σε νέα φιάλη και ξηραίνεται στη γραμμή κενού όλο το βράδυ. Ζυγίστηκαν 12.5g (28mmol).

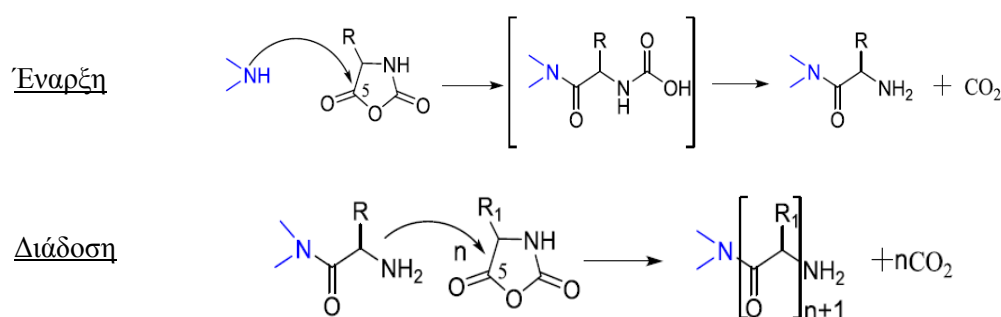
5.3.3 Σύνθεση του Nim-trityl-His NCA

Ακολουθεί το δεύτερο στάδιο σύνθεσης του N-καρβοξυανυδρίτη (L)-ιστιδίνης, το οποίο απαιτεί εξαιρετική προσοχή καθώς υπάρχει ο κίνδυνος έναρξης πολυμερισμού. **11.** Την επόμενη μέρα αποστάζονται 200 ml EtAc, δεν διαλύεται τίποτα αλλά προκύπτει ένα λευκό γαλάκτωμα, απομακρύνεται η φιάλη από τη γραμμή και το διάλυμα αφήνεται για περίπου μια ώρα υπό ανάδευση. **12.** Εν συνεχεία η φιάλη γεμίζεται με αργό και τοποθετείται μέσα σε παγόλουτρο στους 0 °C. **13.** Σε αυτό το βήμα προστίθεται ισομοριακή ποσότητα απεσταγμένης τριαιθυλαμίνης (Et₃N) (3.5ml=28mmol) η οποία έχει διαλυθεί σε 50 ml καθαρού διαλύτη EtAc , ώστε να δεσμευθεί ποσοτικά το HCl. Η προσθήκη γίνεται στους 0°C, για να μη συμβεί έναρξη του πολυμερισμού, στάγδην σε χρονικό διάστημα δέκα λεπτά και υπό έντονη ανάδευση, ώστε να μη δημιουργηθεί τοπική περίσσεια τριαιθυλαμίνης. Μετά το τέλος της αντίδρασης δημιουργείται το στερεό άλας της τριαιθυλαμίνης ενώ το διάλυμα διαυγάζει καθώς σχηματίζεται ο N^{im}-trityl-His-NCA που είναι διαλυτός στον οξικό αιθυλεστέρα. **14.** Το διάλυμα διηθείται προς εκδίωξη του άλατος ενώ παράλληλα το διήθημα πέφτει σε καθαρό εξάνιο 1,5 L για να κρυσταλλωθεί και να δημιουργη-

θεί N^{im} -trityl-His NCA. **15**. Το διάλυμα που προκύπτει επαναδιηθείται και συλλέγεται το καθαρό στερεό. **16**. Το στάδιο αυτό επαναλαμβάνεται ακόμα μια φορά με σύστημα διαλύτη/μη διαλύτη EtAc/Hexane σε αναλογία 1:5 ώστε να προκύψει ένα άσπρο στερεό. **17**. Το στερεό συλλέγεται σε μικρή σφαιρική φιάλη και αφήνεται προς ξήρανση στη γραμμή κενού για ένα βράδυ. **18**. Την επόμενη μέρα το στερεό ζυγίζεται και φυλάσσεται στο glove box (11.05g=27mmol). **απόδοση 67%.**

5.4 Σύνθεση του ομοπολυμερούς της Tyr (PTyr) με $M_n=6k \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε ο πολυμερισμός διάνοιξης του δακτυλίου (ROP) του καρβοξυανυδρίτη της τυροσίνης, με προστασία του υδροξυλίου της πλευρικής ομάδας από την t-Bu ομάδα. Ως απαρχητής του πολυμερισμού χρησιμοποιήθηκε η διμεθυλαμίνη καθώς ευνοεί την προσβολή του C5 του N-καρβοξυανυδρίτη όπου και ακολουθείται ο κανονικός μηχανισμός πολυμερισμού και ο πολυμερισμός μπορεί να χαρακτηριστεί ως ‘ζωντανός’. Στην αντίθετη περίπτωση, αν ο απαρχητής δράσει ως βάση τότε ακολουθείται ο μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς και ο πολυμερισμός χάνει τον ελεγχόμενο χαρακτήρα του.

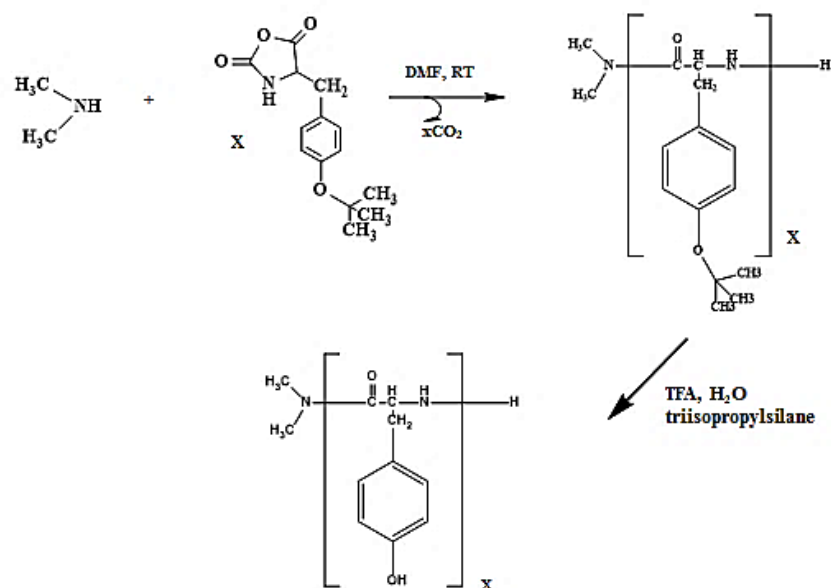


Σχήμα 29: Μηχανισμός ROP για ομοπολυμερισμό με απαρχητή τη διμεθυλαμίνη.

Η συσκευή πολυμερισμού απεερώνεται και ξηραίνεται στη γραμμή κενού. Έπειτα η συσκευή μεταφέρεται από το υψηλό κενό σε αδρανή ατμόσφαιρα (στο glove box), αρχικά στον προθάλαμο όπου γίνονται τρεις κύκλοι αργού-κενού. Η διαδικασία είναι αναγκαία ώστε να μην εισέλθει στον κύριο θάλαμο υγρασία ή αέρας από το εξωτερικό περιβάλλον. Στη συνέχεια, ζυγίζονται 0.317g (1.2 mmol) Tyr(t-Bu)-NCA ώστε να προκύψει ομοπολυμερές της τυροσίνης με 6k

$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ μοριακό βάρος και μεταφέρονται στη συσκευή του πολυμερισμού. Η συσκευή μεταφέρεται ξανά στη γραμμή κενού όπου και ξηραίνεται για μισή ώρα. Ύστερα από το glovebox, η συσκευή του πολυμερισμού περιέχει Ar το οποίο πρέπει να απομακρυνθεί διότι, με την ταυτόχρονη ύπαρξη CO_2 που προκύπτει από τη διάνοιξη του δακτυλίου, επιβραδύνουν τον πολυμερισμό. Ως διαλύτης για τον ROP του $\text{Tyr}(\text{t-Bu})\text{-NCA}$ χρησιμοποιείται το διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) από το οποίο αποστάζονται περίπου 20 mL, ώστε να καταλήξουμε, σε διάλυμα περιεκτικότητας τουλάχιστον 10% w/v. Το DMF αποστάζεται κλασματικά, αποστάζοντας τα πρώτα mL στην παγίδα, αμέσως μετά γίνεται πολύ καλή απαέρωση και η συσκευή απομακρύνεται από τη γραμμή κενού. Ξεπαγώνουμε τη φιάλη με τη βοήθεια υδρόλουτρου και μόλις υγροποιηθεί ο διαλύτης αφήνουμε το διάλυμα υπό ανάδευση, ώστε να διαλυθεί πολύ καλά το μονομερές και να ομογενοποιηθεί το διάλυμα. Σπάμε το γυάλινο υμένα της αμπούλας που περιέχει 0.044 mmol (4mL) DMA και το περιεχόμενο αποχύνεται γρήγορα και ποσοτικά στη φιάλη πολυμερισμού ώστε να αντιδράσουν ταυτόχρονα όλα τα μόρια του απαρχητή με το μονομερές. Ο πολυμερισμός είναι ετερογενής και καθόλη τη διάρκεια εκλύεται διοξείδιο του άνθρακα από το διάλυμα, ένδειξη εκτέλεσης του πολυμερισμού. Κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού, ανεβάζουμε τη συσκευή πολυμερισμού στη γραμμή κενού αρκετές φορές ανοίγοντας τη στρόφιγγα, με σκοπό να εκτονωθεί και να απομακρυνθεί το αέριο διοξείδιο του άνθρακα που έχει παραχθεί ώστε η ισορροπία να μετατοπίζεται προς την κατεύθυνση παραγωγής του πολυπεπτιδίου. Το διάλυμα αναδεύεται συνεχώς μέχρι να καταναλωθεί πλήρως το μονομερές και η πορεία του πολυμερισμού παρακολουθείται μέσω FT-IR. Όταν ο πολυμερισμός ολοκληρωθεί το διάλυμα είναι υποκίτρινο. Επιπρόσθετα, ύστερα από δοκιμές κταβύθισης σε διαιθυλαιθέρα, πετρελαϊκό αιθέρα, εξάνιο και μεθανόλη, διαπιστώνεται πως το διάλυμα της αντίδρασης δεν καταβυθίζεται σε κάποιο επιθυμητό διαλύτη και, τελικώς, το DMF απομακρύνεται στη γραμμή κενού.

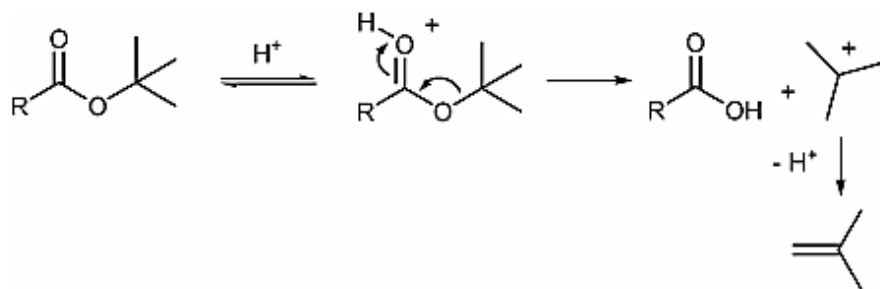
Μετά το πέρας της αντίδρασης, επιβεβαιώνεται τόσο ποιοτικά (FT-IR), όσο και ποσοτικά (NMR) πως ο πολυμερισμός έχει ολοκληρωθεί και το προστατευμένο προϊόν φυλάσσεται στους -20°C . Αξίζει να σημειωθεί πως το ομοπολυμερές δεν είναι εφικτό να χαρακτηριστεί μέσω GPC διότι δημιουργούνται συσσωματώματα τα οποία καθιστούν το ομοπολυμερές αδιάλυτο στους διαλύτες των GPC.



Σχήμα 30: Μηχανισμός σύνθεσης του ομοπολυμερούς PTyr μέσω ROP.

5.4.1 Αποπροστασία του ομοπολυμερούς PTyr.

Για την αποπροστασία του ομοπολυμερούς χρησιμοποιείται 95% κατά mol τριφθοροοξικό οξύ (TFA) το οποίο απομακρύνει τις t-Butyl ομάδες και στο οποίο διαλύεται το ομοπολυμερές. Στη συνέχεια προστίθεται 2.5% κατά mol τριισοπροπυλοσιλάνιο (TIS) το οποίο λειτουργεί ως scavenger και δεσμεύει τις απομακρυσμένες προστατευτικές ομάδες ώστε να μην επανενωθούν με ομάδες του μακρομορίου και οδηγήσουν σε παραπροϊόντα. Τέλος, προστίθεται H_2O σε ίση αναλογία με το TIS. Η αντίδραση διαρκεί 2h, χρόνος που επαρκεί για την επίτευξη πλήρους αποπροστασίας. Με την προσθήκη του TFA το διάλυμα χρωματίζεται κίτρινο ενώ, με την προσθήκη TIS, το χρώμα εξασθενεί σε υποκίτρινο και προκύπτει, σταδιακά άχρωμο και διαυγές. Τέλος, το αποπροστατευμένο ομοπολυμερές καταβυθίζεται σε παγωμένο διαιθυλαιθέρα, αφήνεται σε ανάδευση overnight, ώστε να απομακρυνθούν τα παραπροϊόντα και συλλέγεται την επόμενη μέρα ύστερα από τρεις καταβυθίσεις και σύντομη ξήρανση στη γραμμή κενού.



Σχήμα 31: Μηχανισμός της αντίδρασης απομάκρυνσης της t-Butyl ομάδας με χρήση TFA.¹⁰²

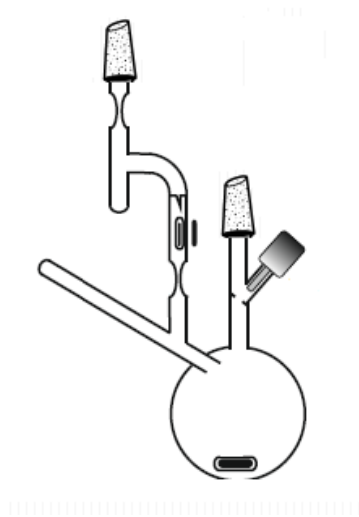
Την επόμενη μέρα, το στερεό διαλύεται σε περίπου ~5 ml νερό (δισ-απεσταγμένο και υπερκάθαρο) από milliQ και αφήνεται υπό ανάδευση μέχρι να διαλυθεί και να είναι διαυγές. Μετά την πλήρη διαλυτοποίηση του στερεού, το διάλυμα εξουδετερώνεται με προσθήκη ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3) έως ότου το pH γίνει ουδέτερο. Το διάλυμα μεταφέρεται σε μεμβράνη (MWCO = 3.500 g/mol) για να καθαριστεί με διαπίδυση (dialysis). Με τον τρόπο αυτό το διάλυμα καθαρίζεται από ενώσεις με μοριακό βάρος < από 3.500 g/mol. Το 2L ποτήρι ζέσεως στο οποίο πραγματοποιείται η διαπίδυση περιέχει νερό milliQ και NaOH, τόσο ώστε το pH του διαλύματος να φτάσει σε pH~9. Το νερό του milliQ αντικαθίσταται σε καθημερινή βάση για 6 ημέρες. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, το pH του διαλύματος διαπίδυσης μειώνεται λόγω της απομάκρυνσης του εναπομείναντος TFA και για αυτό το λόγο η προσθήκη NaOH είναι συνεχής, μέχρι τη σταθεροποίηση του pH στο 8. Με τη σταθεροποίηση του pH, τελειώνει η διαδικασία της διαπίδυσης και το ποτήρι ζέσεως που περιέχει εμβαπτισμένη τη μεμβράνη, πληρώνεται μόνο με νερό milliQ, για μία μέρα. Τέλος, το διάλυμα του ομοπολυμερούς συλλέγεται σε φιάλη και υφίσταται λυοφιλίωση (freeze drying) με σκοπό την απομάκρυνση του νερού. Με το πέρας της λυοφιλίωσης και εφόσον το στερεό έχει ξηρανθεί, αομακρύνεται από τη γραμμή κενού, ζυγίζεται και φυλάσσεται. Ζυγίστηκαν 0.053g λευκού στερεού.

5.5 Σύνθεση υβριδικών γραμμικών κατά συστάδες συμπολυμερών

5.5.1 Σύνθεση του γραμμικού, τυχαίου, διυσταδικού συμπολυμερούς πολυαιθυλενοξειδίου-*block*-πολυτυροσίνης (PEO-*b*-PTyr)

Για τη σύνθεση του πολυμερούς PEO-*b*-PTyr χρησιμοποιήθηκε ως μακροαπαρχητής το PEO-NH₂ (πολυαιθυλενοξείδιο με αμινομάδα), με $M_n=10\text{ k g}\cdot\text{mol}^{-1}$ και ως μονομερές, ο Tyr(t-Bu)-NCA για την επίτευξη $M_n=3.5\text{ k g}\cdot\text{mol}^{-1}$ πολυτυροσίνης (PTyr). Κατόπιν στοιχειομετρικών υπολογισμών, ζυγίστηκαν 0.2g PEO-NH₂ ($2\cdot 10^{-5}$ mol) και 0.145g (0.55 mmol) Tyr(t-Bu)-NCA.

Αρχικά, κατασκευάστηκε η συσκευή της παρακάτω εικόνας (**Εικόνα 13**), μέσα στην οποία πραγματοποιήθηκε η αντίδραση πολυμερισμού. Η συσκευή τοποθετείται στη γραμμή κενού και απαερώνεται για αρκετή ώρα, ενώ πριν χρησιμοποιηθεί ξηραίνεται (μέσω flame drying) τρεις φορές. Εισάγεται η υπολογισμένη ποσότητα PEO-NH₂ στη σφαιρική φιάλη ενώ πριν την προσθήκη έχουμε σπάσει το κενό με ροή αργού. Η συσκευή μεταφέρεται ξανά στη γραμμή υψηλού κενού όπου και αφήνεται προς ξήρανση όλο το βράδυ. Την επόμενη μέρα αποστάζεται μικρή ποσότητα βενζολίου στη φιάλη του απαρχητή, στάδιο εξαιρετικά σημαντικό για την αποφυγή παράπλευρων αντιδράσεων και την εξασφάλιση ελέγχου του πολυμερισμού. Το πολυαιθυλενοξείδιο είναι αρκετά υγροσκοπικό και με τη χρήση βενζολίου δημιουργείται αζεοτροπικό μίγμα με το H₂O-υγρασία του PEO-NH₂, με σκοπό να συναποσταχθούν και να καθαριστεί ο μακροαπαρχητής. Η απόσταξη του βενζολίου σταματά όταν διαλυτοποιηθεί πλήρως όλη η ποσότητα του μακροαπαρχητή. Στη συνέχεια, η φιάλη απομακρύνεται από τη γραμμή κενού και ξεπαγώνεται με τη βοήθεια υδρόλουτρου. Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση για τουλάχιστον 1- 2 ώρες.



Εικόνα 13: Συσκευή αντίδρασης πολυμερισμού

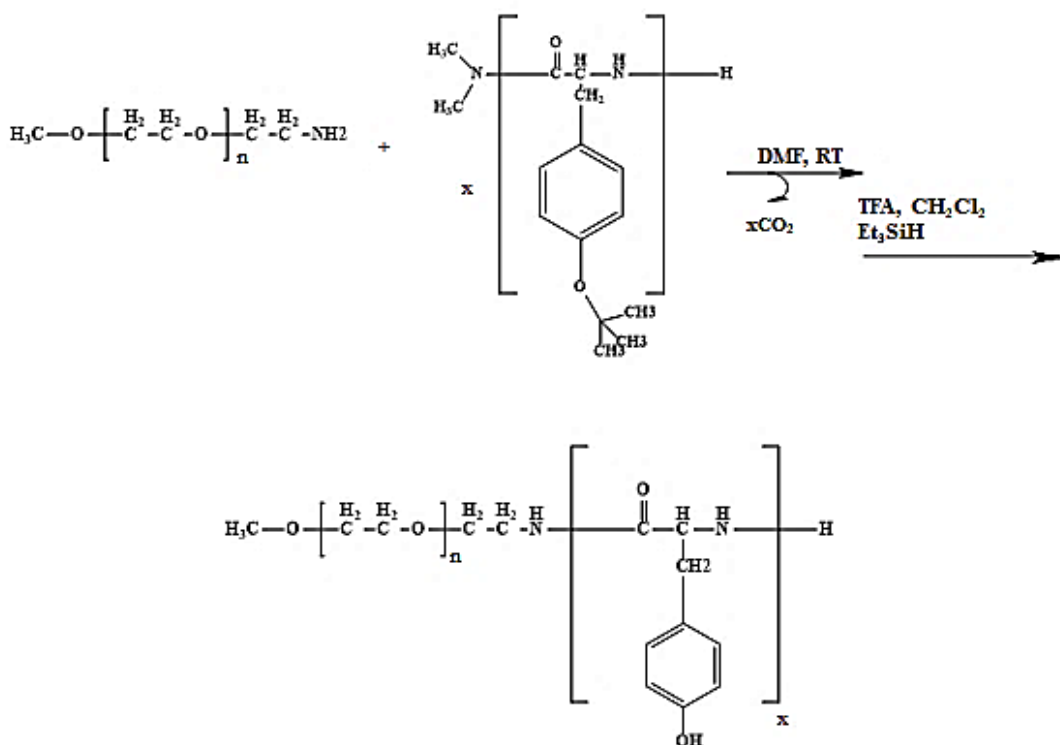
Ο μακροαπαρχητής αφήνεται όλο το βράδυ προς ξήρανση στη γραμμή κενού. Την επόμενη μέρα αποστάζονται 30 ml υψηλής καθαρότητας διμεθυλοφορμαμιδίου (DMF). Η απόσταξη του DMF γίνεται κλασματικά συμπυκνώνοντας μόνο τα μεσαία κλάσματα στον αντιδραστήρα, ώστε να προκύψει διάλυμα με συγκέντρωση περίπου 10% w/v. Απομακρύνουμε τη συσκευή από τη γραμμή κενού και με τη βοήθεια υδρόλουτρου υγροποιείται ο διαλύτης, το διάλυμα αναδεύεται για λίγη ώρα μέχρι να προκύψει ένα ομογενές διάλυμα και ο μακροαπαρχητής να έχει διαλυθεί πλήρως χωρίς να υπάρχουν υπολείμματα στα τοιχώματα του αντιδραστήρα. Στη συνέχεια, ακολουθεί απαέρωση και ξήρανση του τμήματος της συσκευής στο οποίο θα βρεθεί το στερεό του μονομερούς Tyr(t-Bu)-NCA. Πραγματοποιούνται τουλάχιστον 3 flame drying και η συσκευή αφήνεται για λίγα λεπτά ώστε να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα η συσκευή μεταφέρεται στο glove box και προστίθεται η επιθυμητή ποσότητα μονομερούς. Έπειτα, προσαρμόζεται και πάλι στη γραμμή κενού προς εκδίωξη του αργού. Η ποσότητα του μονομερούς διαλύεται πλήρως μετά από απόσταξη ~5ml διαλύτη υπερκάθολου DMF και η συσκευή απομακρύνεται από τη γραμμή κενού μέσω του constriction που έχει δημιουργηθεί με υαλουργία. Αφού διαλυθεί πλήρως το μονομερές σπάμε το break-seal της αμπούλας και τα δύο διαλύματα έρχονται σε επαφή ώστε να ξεκινήσει ο πολυμερισμός. Το διάλυμα αναδεύεται συνεχώς και με μέτρια ένταση. Ο πολυμερισμός είναι ετερογενής, όπως και στην περίπτωση του ομοπολυμερούς και ένδειξη αυτού αποτελεί η έκλυση CO₂ (φουσαλίδων). Η πορεία του πολυμερισμού παρακολουθείται μέσω FT-IR με δείγματα τα οποία λαβάνονται ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη

διάρκεια του πολυμερισμού με χρήση σύριγγας, παροχής αργού και μέτριας θέρμανσης. Ο πολυμερισμός ολοκληρώθηκε στις έξι μέρες. Στη συνέχεια, το διάλυμα πολυμερισμού αποχύνεται σε παγωμένο διαιθυλεθέρα και με χρήση Buchner συλλέγεται το ίζημα που κατακρατήθηκε στο φίλτρο. Το στερεό συλλέγεται σε μια σφαιρική φιάλη και αφήνεται στη γραμμή υψηλού κενού όλο το βράδυ προς ξήρανση.

Αποπροστασία του PEO-*b*-PTyr

Για την αποπροστασία του συμπολυμερούς προστίθενται αρχικά, 10mL διχλωρομεθάνιο (DCM) στο οποίο είναι διαλυτό το πολυμερές και βοηθάει στην 'ξεδίπλωση' της συστάδας που περιέχει το πολυαιθυλενοξειδίο. Όταν το πολυμερές έχει διαλυθεί πλήρως και βρίσκεται σε ανάδευση, προστίθεται 1mL τριαίθυλοσιλάνιο (Et_3SiH) το οποίο δεν είναι στερεοχημικά παρεμποδισμένο και κάθε ένα μόριό του 'κόβει' ένα μόριο t-Bu. Αμέσως μετά προστίθενται 15mL TFA το οποίο απομακρύνει τις ομάδες t-Bu και παρατηρείται πως το διάλυμα αποκτά υποκίτρινο χρώμα. Η αντίδραση της αποπροστασίας διαρκεί συνολικά 2h, ενώ 45min μετά την προσθήκη του TFA προστίθεται και πάλι μικρή ποσότητα Et_3SiH (~0.5-1mL) ώστε να δεσμεύσει τις απομακρυσμένες t-Bu και να παρεμποδίσει την επανένωσή τους στο πολυμερές.

Τέλος, η φιάλη με το αποπροστατευμένο πολυμερές προσαρμόζεται στη γραμμή κενού για απομάκρυνση των διαλυτών με freeze-drying. Μετά την απομάκρυνσή τους, στο πολυμερές, το οποίο είναι λασπώδες, προστίθεται διαιθυλαιθέρας ο οποίος αποχύνεται (2 φορές) και συμπαρασύρει τις απομακρυσμένες t-Bu ομάδες. Προστίθεται milliQ νερό, με ανάδευση, για διάλυση του πολυμερούς. Στη συνέχεια ακολουθεί ο καθαρισμός του πολυμερούς με την τεχνική της διαπίδυσης (dialysis) η οποία διαρκεί, όπως και στο ομοπολυμερές, 7 μέρες με προσαρμογή του pH στο 8-9 καθημερινά. Μετά το πέρας της διαδικασίας, το πολυμερές συλλέγεται και φυλάσσεται. Ζυγίστηκαν 0.127g πολυμερούς.

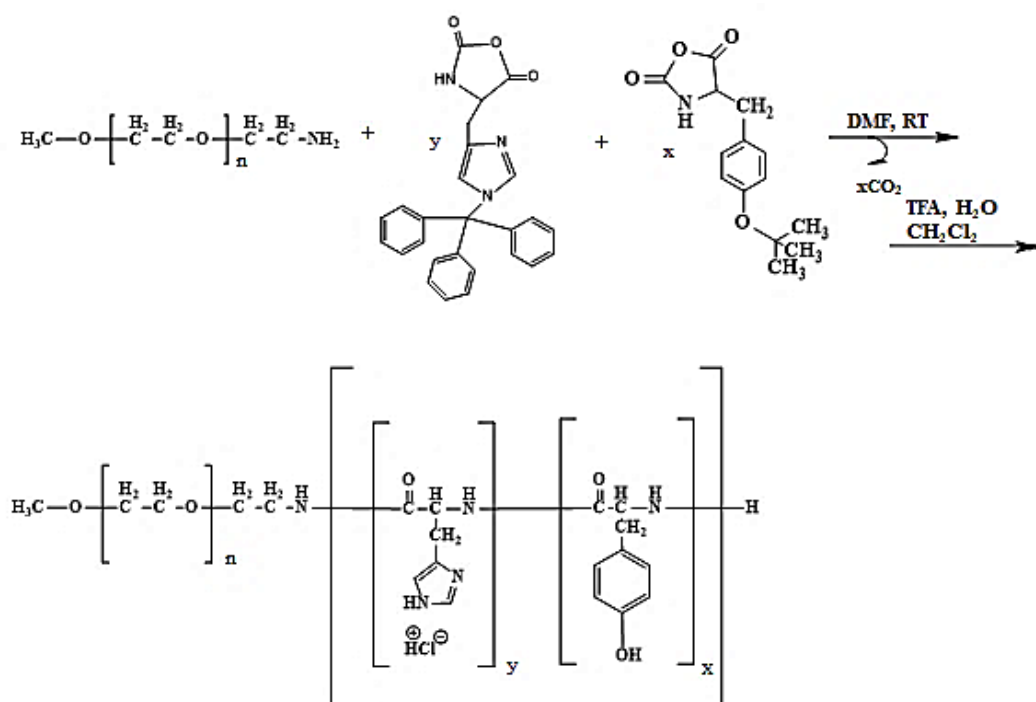


Σχήμα 32: Αντίδραση ROP προς σχηματισμό του συμπολυμερούς PEO-*b*-PTyr

5.5.2 Σύνθεση πολυ(αιθυλενοξειδίου)-*block*-πολυ(L-Ιστιδίνη-co-Τυροσίνη),

PEO-*b*-P(L-His-co-Tyr)

Μετά τη σύνθεση του δισυσταδικού συμπολυμερούς PEO-*b*-PTyr, παρασκευάστηκε μία σειρά από δισυσταδικά τριπολυμερή τύπου PEO-*b*-P(His-co-Tyr). Η διαδικασία πολυμερισμού που ακολουθήθηκε είναι ακριβώς η ίδια με παραπάνω, ο βαθμός πολυμερισμού για όλα τα πολυμερή που παράχθηκαν έμενε ο ίδιος κάθε φορά και ίσος με 36 για την ιστιδίνη. Συνεπώς σε κάθε πολυμερισμό το μόνο που άλλαζε ήταν ο λόγος των moles His/Tyr ο οποίος ποικίλει σε 90/10, 80/20 και 70/30 αντίστοιχα για τα δισυσταδικά τριπολυμερή που συντέθηκαν. Το μοριακό βάρος της συστάδας του πολυαιθυλενοξειδίου παρέμεινε ίδιο για τα πολυμερή με $M_n=5k$ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Η συνθετική πορεία για τη σύνθεση αυτού του τύπου πολυμερών φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 33: Συνθετική πορεία των δισυσταδικών τριπολυμερών PEO-*b*-P(His-co-Tyr).

Για τη σειρά του κάθε ενός από τα δισυσταδικά συμπολυμερή ακολουθήθηκαν, εν συντομία, τα παρακάτω βήματα :

I. Αναλογία 70-30% mole His-Tyr

Μονομερές	Μοριακό Βάρος Mn [g*mol ⁻¹]	Ποσότητα [g]	Ποσότητα [mmol]
<i>PEO</i>	5000	0.250	0.05
<i>His-NCA</i>	5000	0.533	1.26
<i>Tyr-NCA</i>	5000	0.144	0.55

II. Αναλογία 80-20% mole His-Tyr

Μονομερές	Μοριακό Βάρος Mn [g*mol ⁻¹]	Ποσότητα [g]	Ποσότητα [mmol]
<i>PEO</i>	5000	0.400	0.08
<i>His-NCA</i>	5000	0.980	2.32
<i>Tyr-NCA</i>	5000	0.153	0.58

III. Αναλογία 90-10% mole His-Tyr

Μονομερές	Μοριακό Βάρος Mn [g* mol^{-1}]	Ποσότητα [g]	Ποσότητα [mmol]
<i>PEO</i>	5000	0.400	0.08
<i>His-NCA</i>	5000	1.104	2.61
<i>Tyr-NCA</i>	5000	0.076	0.29

- i. Ξήρανση του PEO-NH₂ στη γραμμή υψηλού κενού.
- ii. Καθαρισμός του PEO-NH₂ με βενζόλιο.
- iii. Προθήκη των μονομερών και του διαλύτη (DMF).
- iv. Έναρξη του πολυμερισμού.
- v. Καταβύθιση του πολυμερούς.
- vi. Αποπροστασία του πολυμερούς.
- vii. Διαπίδυση (Dialysis).
- viii. Λυοφιλίωση (Freeze Drying).

Όπως περιγράφηκαν παραπάνω.

5.6 Μοριακός χαρακτηρισμός μονομερών και πολυμερών

Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR).

Οι μετρήσεις της φασματοσκοπίας ^1H -NMR έγιναν σε διαλύτη δευτεριωμένο τριφθοροξικό οξύ και δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε συσκευή Varian Unity Plus 300/54.

Φασματοσκοπία υπερύθρου (IR).

Οι μετρήσεις έγιναν σε μηχανήμα Perkin-Elmer Spectrum 100 FT-IR, με την τεχνική διαπερατότητας μέσω διασποράς σε KBr και σε εύρος $450\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$. Τα δισκία προήλθαν κατά την κονιορτοποίηση 0.2g KBr με 1mg της προς εξέταση ουσίας, με εφαρμογή πίεσης μερικών τόνων ανά cm^2 .

Κυκλικός Διχρωϊσμός (CD).

Οι μετρήσεις για τη δευτεροταγή δομή των πολυμερών έγιναν στο μοντέλο JASCO J-815. Τα δείγματα, με συγκέντρωση $5 \cdot 10^{-5}\text{ g/mL}$ σε διαλύτη υπερκάθαρο H_2O milliQ, υποβλήθηκαν σε αλλαγές του pH, με εύρος τιμών 3-12 και σε αλλαγές θερμοκρασίας από 10°C έως 60°C .

Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών (SEC)

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC) έγινε με τη χρησιμοποίηση αντλίας Waters 510 και ενός διαφορικού διαθλασιμέτρου Waters 410 ως ανιχνευτή. Χρησιμοποιήθηκαν τρεις στήλες τύπου μ -Styragel, με πορώδες υλικό (δικτυωμένο πολυστυρένιο) με μέγεθος πόρων από 10^2 ως $10^6\text{ \AA}$. Ωστόσο, καμία μέτρηση δε μπόρεσε να θεωρηθεί αξιόπιστη, εξαιτίας των συσσωματωμάτων που δημιουργήθηκαν σε όλα τα δείγματα και κατέστησαν αδύνατη τη λήψη φασμάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

6.1 Σύνθεση N-Καρβοξυανυδριτών α-αμινοξέων

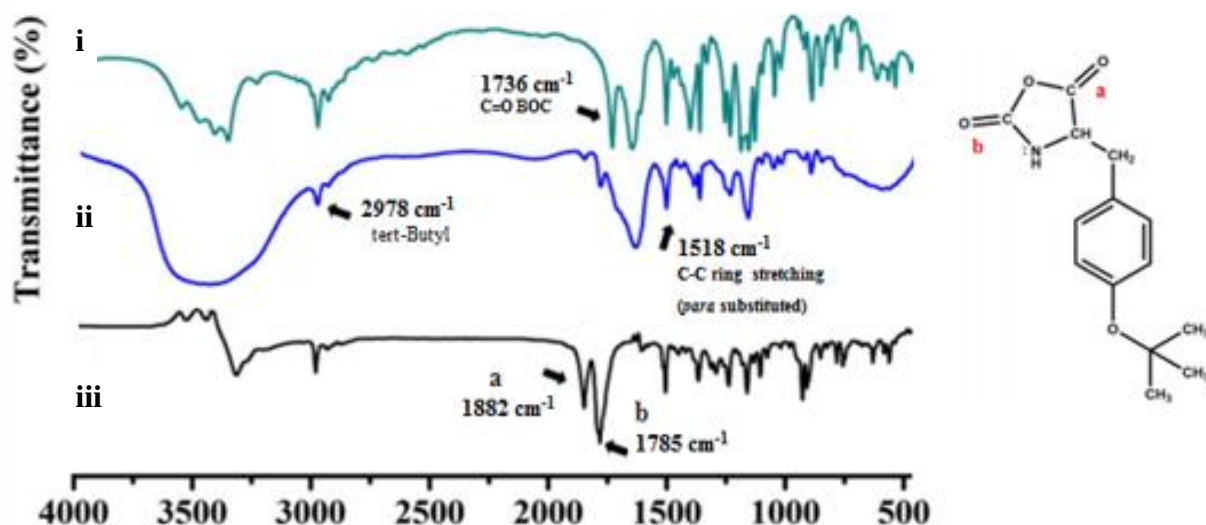
6.1.1 Σύνθεση του Tyr(t-Bu)-NCA

Η σύνθεση του N-καρβοξυανυδρίτη της BOC-Tyr(t-Bu)-OH το κυρίως θέμα σύνθεσης της παρούσας εργασίας. Ο μοριακός χαρακτηρισμός του Tyr(t-Bu)-NCA έδειξε πως η σύστασή του ήταν σε πλήρη συμφωνία με τους στοιχειομετρικούς υπολογισμούς.

Έως τώρα, ως προστατευτική ομάδα για τη σύνθεση του NCA της τυροσίνης είχε χρησιμοποιηθεί η Benzyl ομάδα. Η απομάκρυνσή της απαιτεί τη χρήση HBr / οξικού οξέως, συνθήκες αρκετά όξινες οι οποίες επηρεάζουν οποιαδήποτε άλλη προστατευτική ομάδα απομακρύνεται, επίσης, με όξινες συνθήκες. Συμπερασματικά, δεν ευνοείται η εκλεκτική αποπροστασία και ταυτόχρονα περιορίζεται η σύνθεση συμπολυμερών, με διαφορετικής φύσεως προστατευτικές ομάδες των μονομερών τους. Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιείται η *tert*-Butyl ομάδα, η οποία απομακρύνεται με ήπιες συνθήκες παρουσία TFA, επιτρέποντας εκλεκτική αποπροστασία. Αξίζει να σημειωθεί πως, παρά το γεγονός ότι κατά το σχηματισμό του Tyr(t-Bu)-NCA παράγεται HCl προερχόμενο από το SOCl₂, δεν επηρεάζει τις *tert*-Butyl ομάδες. Επίσης, άλλες προστατευτικές ομάδες οι οποίες υπάρχουν σε άλλες συστάδες, δεν επηρεάζονται από τις ήπιες συνθήκες και το TFA, το οποίο εκλεκτικά και ποσοτικά απομακρύνει τις *tert*-Butyl του υδροξυλίου της τυροσίνης.

Η πορεία της αντίδρασης και ο σχηματισμός του NCA παρακολουθήθηκαν με φάσματα FT-IR και ¹H NMR κατά τη διάρκεια και στο τέλος της αντίδρασης, αντίστοιχα.

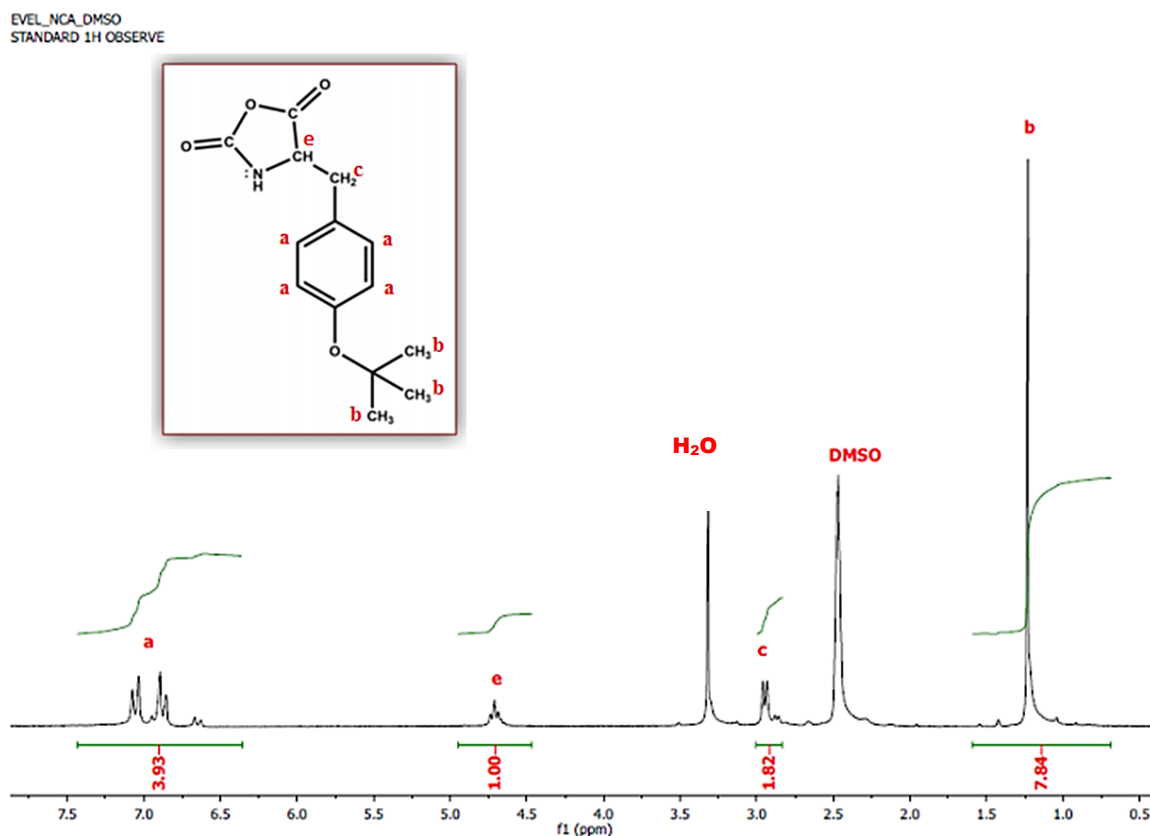
FT-IR spectroscopy



Σχήμα 34: Φάσματα FT-IR που αποδυνκνύουν την πρόοδο της αντίδρασης σχηματισμού του Tyr(t-Bu)-NCA όπου : i. Η BOC-Tyr(t-Bu)-OH , ii. 30 min μετά την έναρξη της αντίδρασης, iii. Σχηματισμός του τελικού προϊόντος.

Παρατηρείται πως στο **i.** υπάρχει η κορυφή του C=O της BOC προστατευτικής ομάδας στα 1736 cm^{-1} και έντονες οι κορυφές στην περιοχή των $600\text{--}700\text{ cm}^{-1}$ οι οποίες αντιστοιχούν στις αρωματικές προστατευτικές. Αντίθετα,, στο **ii.** η κορυφή στα 1736 cm^{-1} μειώνεται, ένδειξη πως 'κλείνει' ο δακτύλιος προς σχηματισμό του NCA και οι BOC ομάδες αποχωρούν. Στο φάσμα **iii.** είναι εμφανής ο σχηματισμός των χαρακτηριστικών κορυφών του NCA στα 1785 και 1882 cm^{-1} . Η κορυφή που εμφανίζεται σε κάθε φάσμα στα 2978 cm^{-1} αντιστοιχεί στις *tert*-Butyl ομάδες του υδροξυλίου του δακτυλίου της τυροσίνης ενώ στα 3414 cm^{-1} όπου δεν είναι πάντα εμφανής, αντιστοιχεί η κορυφή του υδροξυλίου του δακτυλίου. Τέλος, μετά την ξήρανση του προϊόντος η υγρασία που εμφανίζεται μετά τα 3000 cm^{-1} υποχωρεί αισθητά.

^1H NMR spectroscopy



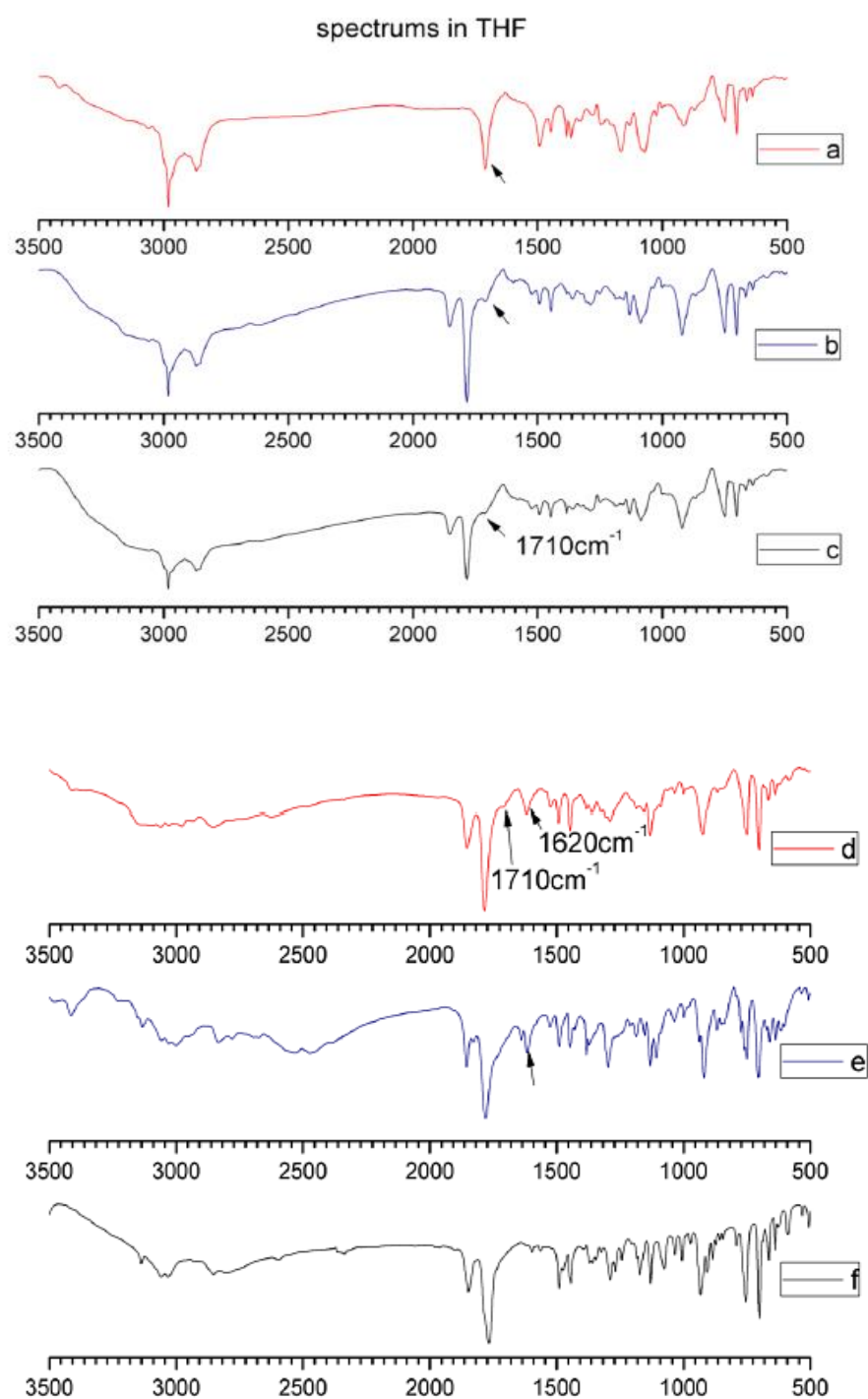
Σχήμα 35: Φάσμα ^1H NMR του Tyr(t-Bu)-NCA

Το φάσμα ^1H NMR του Tyr(t-Bu)-NCA αποτελεί το πλέον αξιόπιστο μέσο επαλήθευσης του επιτυχούς σχηματισμού του προϊόντος, η αποτίμηση του οποίου έγινε με επιτυχία καθώς δεν υπήρχαν μη αναμενόμενες κορυφές. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το δευτεριωμένο DMSO. Συγκεκριμένα οι κορυφές αντιστοιχούν : 1.2-1.3 ppm (9H *tert*-butyl), 2.4 ppm (DMSO), 2.9 ppm (2H βενζυλικά CH_2), 3.4 ppm H_2O DMSO, 4.6-4.75 ppm (1H N-CH), 6.7-7.3 (4H αρωματικά του δακτυλίου).

6.1.2 Σύνθεση του N^{trt}-trityl-(L)-His-NCA*HCl

Κατά τη σύνθεση του Trt-HIS-NCA, παράγεται HCl το οποίο είναι ένα ισχυρό οξύ σε απρωτικούς οργανικούς διαλύτες. Το παραγόμενο HCl δημιουργεί πρόβλημα καθώς επικάθεται στο αποπροστατευμένο π-άζωτο του ιμιδαζολικού δακτυλίου και δημιουργείται το αντίστοιχο άλας του N-καρβοξυανυδρίτη. Ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα κατά τη σύνθεση του N-καρβοξυανυδρίτη ιστιδίνης ήταν η μετατροπή του άλατος του N-καρβοξυανυδρίτη ιστιδίνης σε N-καρβοξυανυδρίτη ιστιδίνης η οποία θα φέρει μόνο την τρίτυλο προστατευτική ομάδα, χωρίς να υπάρχει HCl στο άλλα π-άτομο του αζώτου του ιμιδαζολικού δακτυλίου. Αρχικά για την απομάκρυνση του HCl προστέθηκε όξινο ανθρακικό νάτριο (NaHCO_3), το οποίο οδήγησε σε απευθείας πολυμερισμό του μονομερούς. Η αντίδραση του όξινου ανθρακικού νατρίου με το υδροχλώριο οδήγησε στην παραγωγή άλατος χλωριούχου νατρίου αλλά και σε ασταθές ανθρακικό οξύ , το οποίο αμέσως μετά το σχηματισμό του διασπάται σε νερό και διοξείδιο του άνθρακα. Το νερό αποτελεί απαρχητή για το μονομερές και για αυτό λίγα λεπτά μετά την προσθήκη του όξινου ανθρακικού νατρίου άρχισε ο πολυμερισμός και η έντονη έκλυση διοξειδίου του άνθρακα. Η δεύτερη προσπάθεια για την απομάκρυνση του HCl πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη δισοπροπυλαιθυλαμίνης, η οποία προσπάθεια οδήγησε, ξανά, σε πρόωρο πολυμερισμό του μονομερούς καθώς δεν προστέθηκε ισομοριακή ποσότητα και κάποια μόρια δισοπροπυλαιθέρα έδρασαν ως απαρχητής για το N-καρβοξυανυδρίτη. Με προσθήκη ισομοριακής ποσότητας τριαιθυλαμίνης επιτύγχάνεται η ποσοτική απομάκρυνση του HCl χωρίς την έναρξη πολυμερισμού, παρατήρηση που επιβεβαιώνει την παραμονή της προστατευτικής ομάδας στο α-άζωτο του ιμιδαζολικού δακτυλίου. Ο χαρακτηρισμός του μονομερούς πραγματοποιήθηκε με φάσματα υδρογόνου NMR αλλά και φασμάτων IR τα οποία απέδειξαν την υψηλή καθαρότητα του μονομερούς.

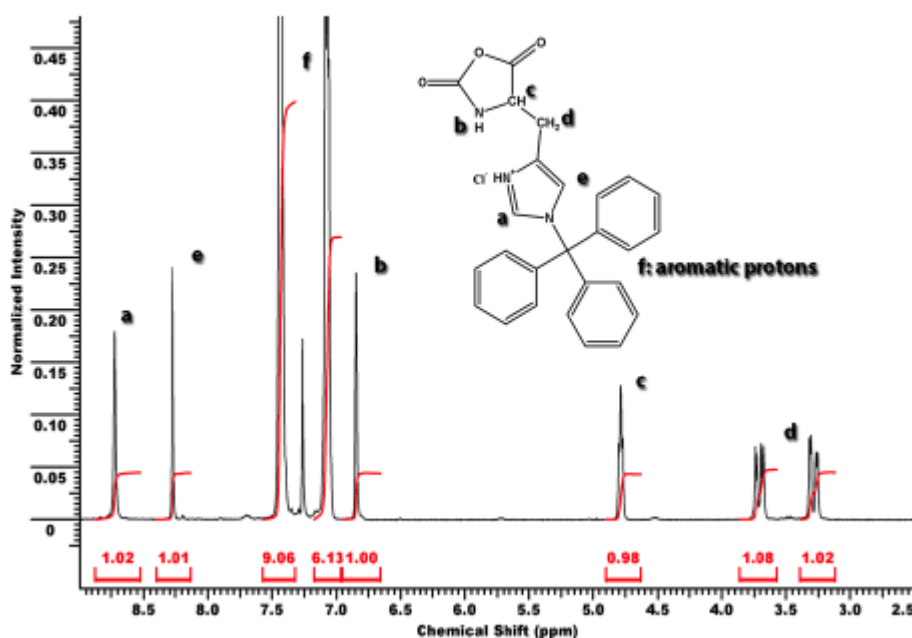
FT-IR spectroscopy



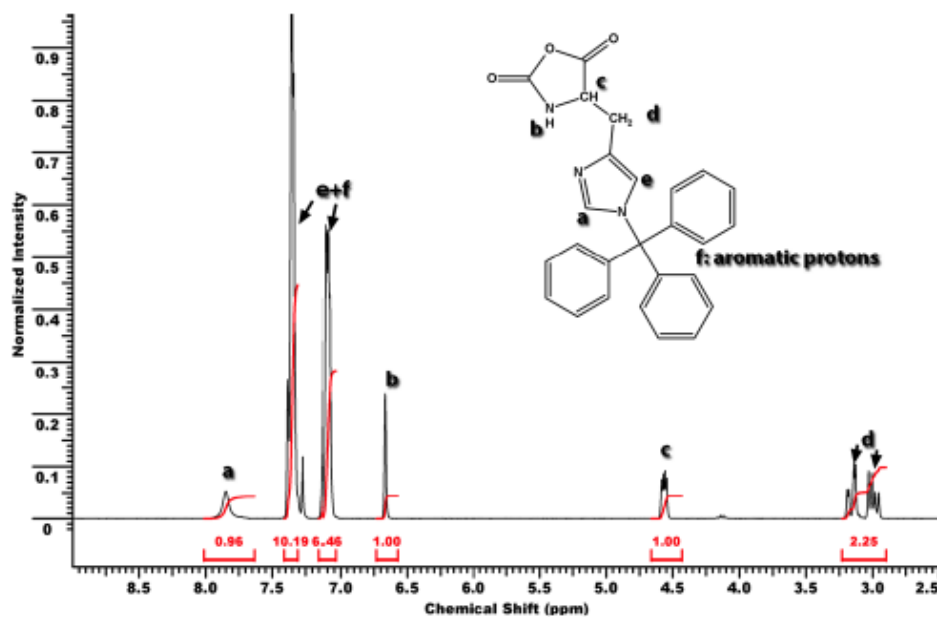
Σχήμα 36: Φάσματα FTIR για την περιγραφή της πορείας της σύνθεσης του N-καρβοξυ ανυδρίτη L-ιστιδίνης.

a) Φάσμα FTIR της Na-Boc-N^{im}-trityl-L-histidine(αρχικό αντιδρών) με χαρακτηριστική κορυφή στα 1710 cm⁻¹, η οποία οφείλεται σε έκταση δόνησης του καρβονυλίου. **b)** Μετά την προσθήκη SOCl₂ προς το σχηματισμό του NCA, παρατηρείται ότι αρχίζουν να σχηματίζονται οι χαρακτηριστικές κορυφές στα 1780 και 1850 cm⁻¹ του NCA ενώ αρχίζει να υποχωρεί η κορυφή στα 1710 cm⁻¹ που αντιστοιχεί στο αρχικό αμινοξύ. **c)** Μετά από δύο ώρες υπάρχει ακόμα κορυφή στα 1710 cm⁻¹. **d)** Φάσμα FTIR από το άλας του NCA μετά από καταβύθιση σε Et₂O, με χαρακτηριστική κορυφή στα 1620 cm⁻¹ η οποία οφείλεται σε έκταση δόνησης του δεσμού –N-H με το HCl στον ιμιδαζολικό δακτύλιο. **e)** Το καθαρό άλας του NCA μετά από ανακρυσταλλώσεις με EtAc. Παρατηρείται ότι στα 1710 cm⁻¹ δεν υπάρχει τίποτα και έχουμε απαλλαγεί εντελώς από το αρχικό αμινοξύ της ιστιδίνης. **f)** Τελικό καθαρό προϊόν trityl-His NCA απαλλαγμένο από HCl έτοιμο για πολυμερισμό.

¹H NMR spectroscopy



Σχήμα 37: Φάσμα ¹H-NMR της N^{im}-trityl-(L)-His-NCA*HCl σε d-CDCl₃.



Σχήμα 38: Φάσμα ^1H -NMR της N^{im} -trityl-(L)-His-NCA σε d-CDCl_3 .

Με προσεκτική παρατήρηση και σύγκριση των δύο φασμάτων παρατηρείται η μετατόπιση των δύο κορυφών *a* και *e* οι οποίες οφείλονται στα H του ιμιδαζολικού δακτυλίου όταν απομακρύνεται το HCl .

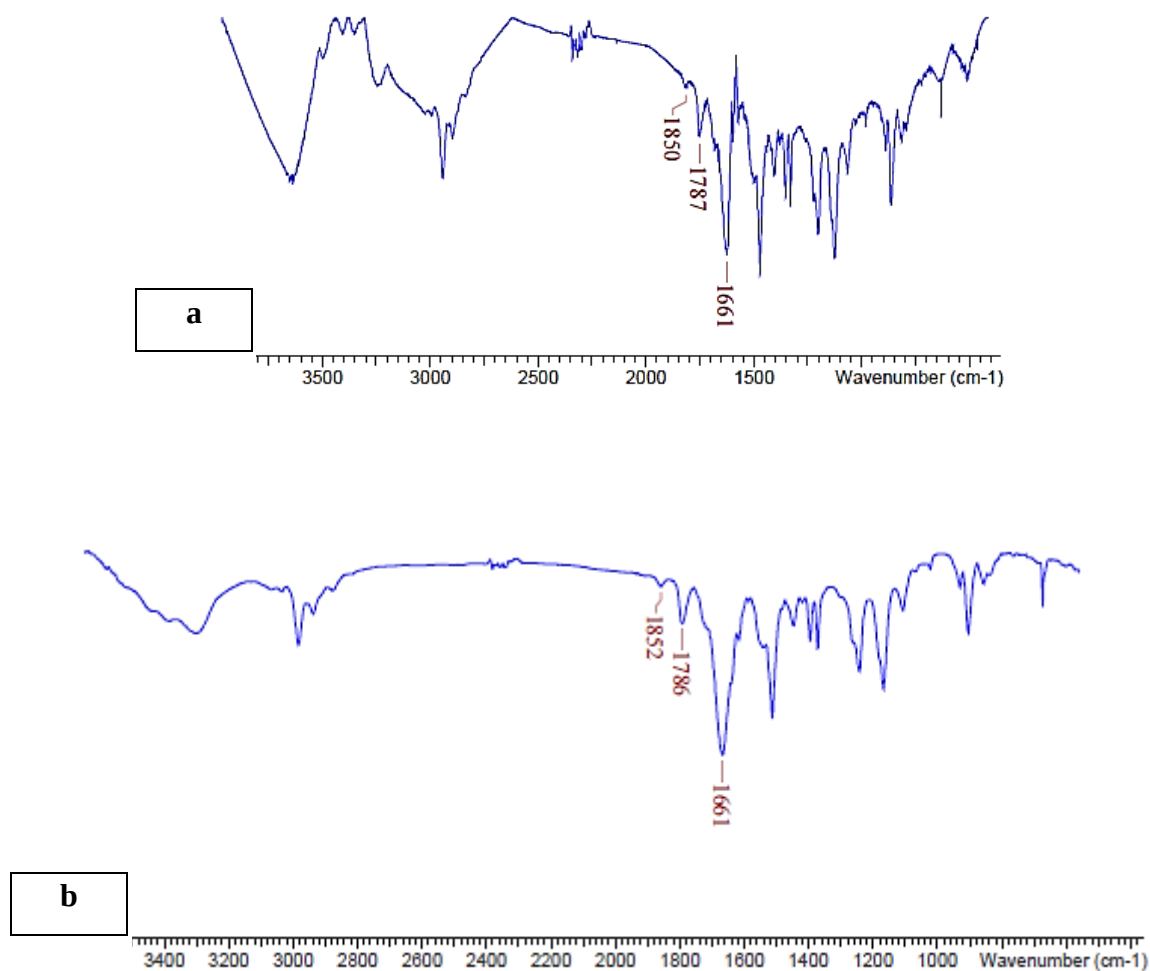
Η αποτίμηση των φασμάτων NMR έγινε με επιτυχία χωρίς την εμφάνιση άγνωστων κορυφών, 2.80-3.20 ppm (2H, $-\text{CH}_2\text{-Imidazole-Trt}$), 4.40-4.60 ppm (1H, $\text{N-CH}(\text{CH}_2\text{-Imidazole-Trt})\text{-C=O}$ of NCA ring), 6.75-7.50 ppm (16H, 15 της τρίτυλο ομάδας and 1 N-CH=C του ιμιδαζολικού δακτυλίου), 7.60-7.85 ppm (1H, N-CH=N του ιμιδαζολικού δακτυλίου).

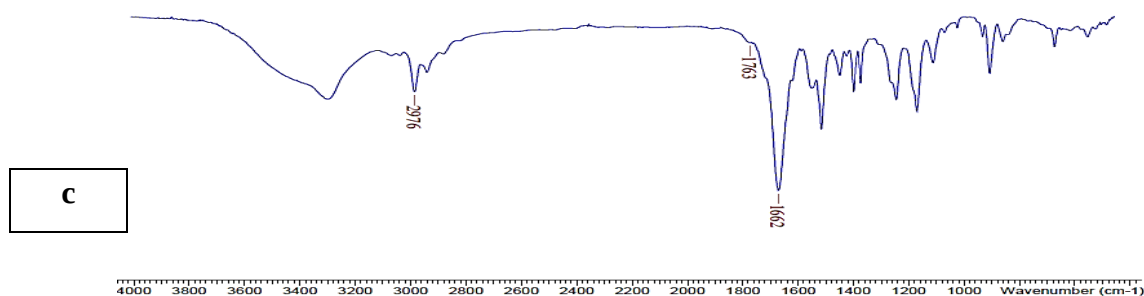
6.2 Σύνθεση ομοπολυμερούς πολυτυροσίνης (PTyr)

Όπως αναφέρθηκε, για τη σύνθεση του ομοπολυμερούς της πολυτυροσίνης χρησιμοποιήθηκε ως απαρχητής η διμεθυλαμίνη η οποία, σε θερμοκρασία 25°C και υπό πίεση 1 atm βρίσκεται σε αέρια φάση. Γι'αυτό το λόγο, όταν έρθει σε επαφή με το μονομερές πρέπει να είναι εξασφαλισμένη η ένωσή της με αυτό και επομένως, αφήνεται να αντιδράσει 2h.

Κατά τη διάρκεια και στο τέλος του πολυμερισμού λαμβάνονται φάσματα FT-IR και ^1H NMR.

FT-IR spectroscopy

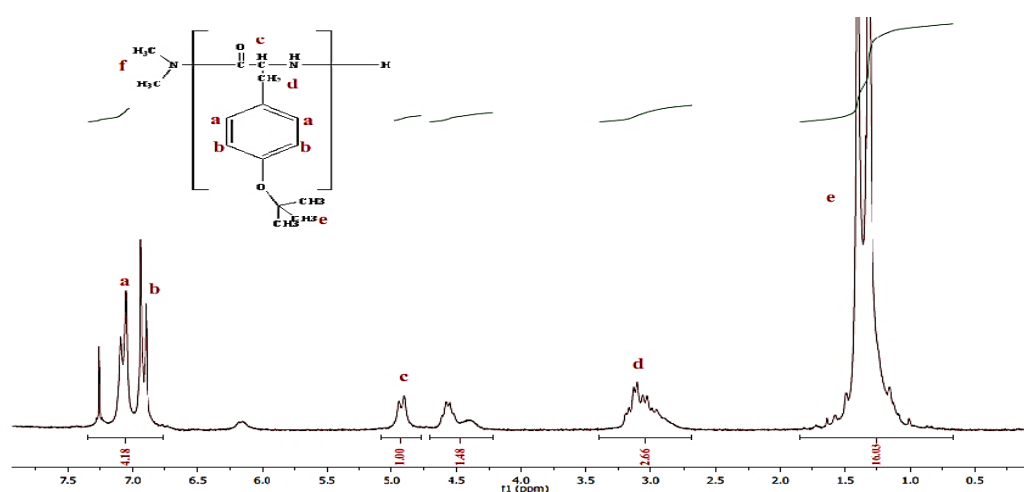




Σχήμα 39: Φάσματα FT-IR για την περιγραφή της πορείας της σύνθεσης του ομοπολυμερούς της τυροσίνης.

a) Φάσμα FT-IR που δείχνει την πρόοδο της αντίδρασης στις πρώτες 2h του πολυμερισμού. Παρατηρείται πως η εκκίνηση είναι γρήγορη καθώς οι χαρακτηριστικές για τον ανυδρίτη κορυφές στα 1850 (καρβονύλιο του C5) και 1787 (καρβονύλιο του C3, δίπλα στο άζωτο του ανυδρίτη) cm^{-1} έχουν μειωθεί αισθητά ενώ η χαρακτηριστική κορυφή δόνησης του αμιδικού δεσμού του ομοπολυμερούς (δόνηση του αζώτου της μιας μονομερικής μονάδας που συνδέεται με το καρβονύλιο της επόμενης) στα 1661 cm^{-1} είναι εμφανέστατη. **b)** Μετά το πέρας των 24 h όπου η κορυφή στα 1661 cm^{-1} έχει αυξητική πορεία σε σχέση με τις κορυφές του NCA. **c)** Μετά τις 48 h η κορυφή δόνησης του αμιδικού δεσμού κυριαρχεί σε σχέση με τις κορυφές που αφορούν στον NCA, οι οποίες έχουν εκλείψει εντελώς, ένδειξη ολοκλήρωσης του πολυμερισμού.

^1H NMR spectroscopy

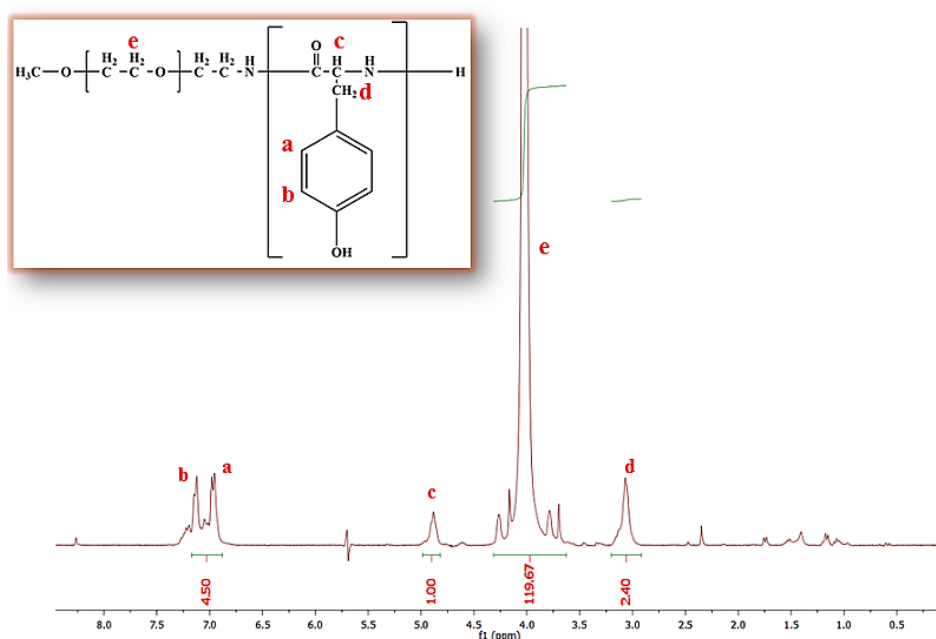


Σχήμα 40: Φάσμα ^1H -NMR του ομοπολυμερούς της PTyr.

6.3 Αμφίφιλο Δισυσταδικό Συμπολυμερές PEO-*b*-PTyr

^1H NMR spectroscopy

Το φάσμα ^1H NMR του PEO-*b*-PTyr συνάδει με τους στοιχειομετρικούς υπολογισμούς για τη σύνθεση του συμπολυμερούς.



Σχήμα 41: Φάσμα ^1H -NMR του δισυσταδικού συμπολυμερούς PEO-*b*-PTyr σε δευτεριωμένο TFA.

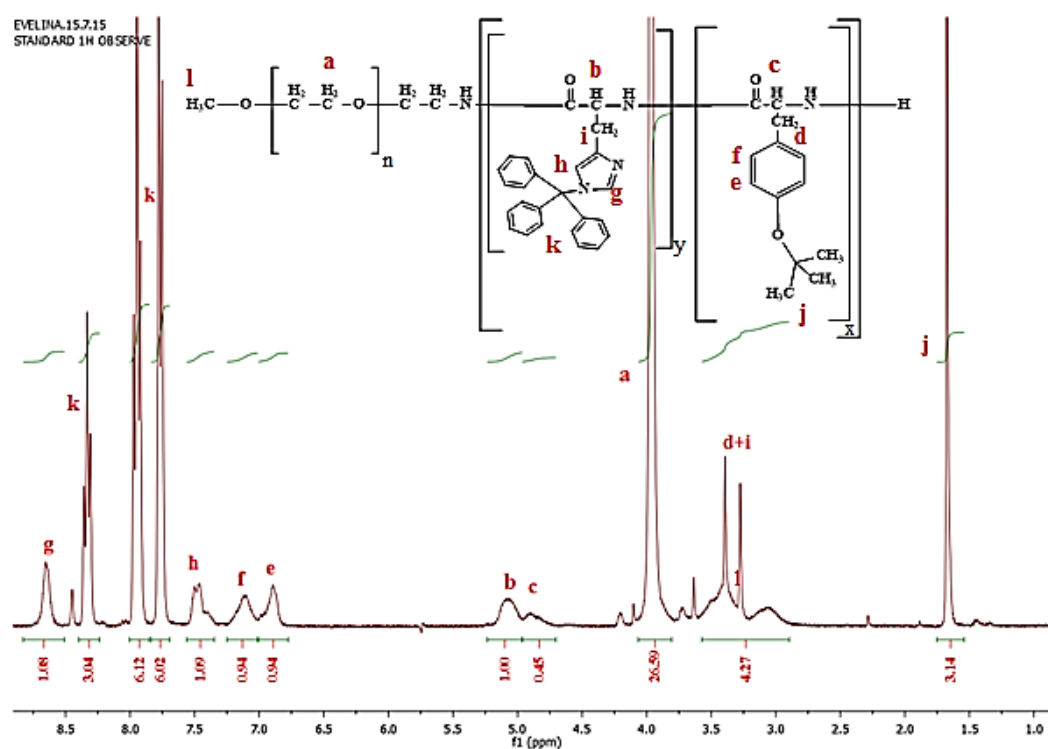
Η αποτίμηση των φασμάτων NMR έγινε με επιτυχία χωρίς την εμφάνιση άγνωστων κορυφών με μετατόπιση ~ 0.7 ppm προς τις μεγαλύτερες τιμές της κλίμακας των ppm λόγω του διαλύτη (D TFA) με : 3.20 ppm (**d**) (2H, -CH₂-benzene ring), 3.7-4.3 ppm (**e**) (2H, (PEO / υγρασία), 4.8 ppm (**c**) (1H, -CH-CH₂-benzene ring), 6.9 ppm (**a**) (2H, benzene ring), 7.3 ppm (**b**) (2H, benzene ring)

Λόγω της μη διαλυτότητας του συμπολυμερούς σε διαλύτες των GPC, δεν ήταν εφικτός ο χαρακτηρισμός του μέσω χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών.

6.4 Αμφίφιλα Δυσσταδικά Τριπολυμερή του τύπου PEO-*b*-P(His-co-Tyr)

Η σύνθεση και αποπροστασία της σειράς των τριπολυμερών έγινε με τις ίδιες πορείες για κάθε ένα από τα τρία τριπολυμερή, μεταβάλλοντας κάθε φορά, μόνο τις ποσότητες των μονομερών για το σχηματισμό των επιθυμητών κατά mol αναλογιών.

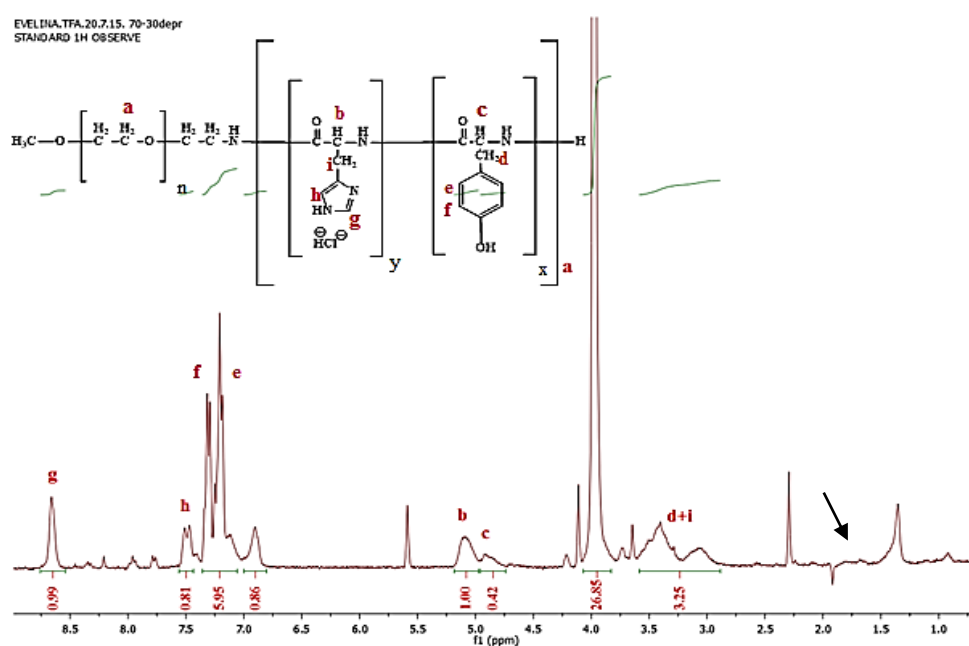
¹H NMR spectroscopy



Σχήμα 42: Φάσμα ¹H-NMR του προστατευμένου δυσσταδικού τριπολυμερούς PEO-*b*-P(70%His-co-30%Tyr) σε δευτεριωμένο TFA.

Η αποτίμηση του φάσματος σε διαλύτη D TFA και με μετατόπιση 0.2 ppm προς τις μεγαλύτερες τιμές της κλίμακας των ppm λόγω του διαλύτη, συνάδει με τους στοιχειομετρικούς υπολογισμούς. Η τυροσίνη αποτελεί, στο συγκεκριμένο φάσμα, το 30% κατά mol της συστάδας ενώ η ιστιδίνη το 70% κατά mol. Οι *tert*-Butyl προστατευτικές ομάδες του –OH της τυροσίνης εμφανίζονται με την οξεία κορυφή στα 1.6 ppm (**j**), μετατοπισμένες κατά 0.2 ppm. Οι trityl προστατευτικές ομάδες του αζώτου του ιμιδαζολικού δακτυλίου της ιστιδίνης εμφανίζονται από το 7.7 έως τα 8.3 ppm (**k**). Από την αναλογία των ολοκληρώσεων προκύπτει πως, οι μονομερικές μονάδες της τυροσίνης αποτελούν, κατά προσέγγιση, το 1/3 του συνόλου των μονομερικών ομάδων της ιστιδίνης και συμφωνούν με τους στοιχειομετρικούς υπολογισμούς. Από την ολοκλήρωση των κορυφών προκύπτει πως τα ποσοστά κατά mol για το PEO είναι 81.7%, για την PHis είναι 12.4% και για την PTyr είναι 5.8%. Για τη δεύτερη συστάδα, η ιστιδίνη αποτελεί το 68.3% ενώ η τυροσίνη το 31.7%.

Για τα άλλα δύο τριπολυμερή που συντέθηκαν, οι υπολογισμοί ήταν επίσης, σύμφωνοι με τη στοιχειομετρία.



Σχήμα 43: Φάσμα ^1H -NMR του αποπροστατευμένου δυσυσταδικού τριπολυμερούς PEO-*b*-P(70%His-co-30%Tyr) σε δευτεριωμένο TFA.

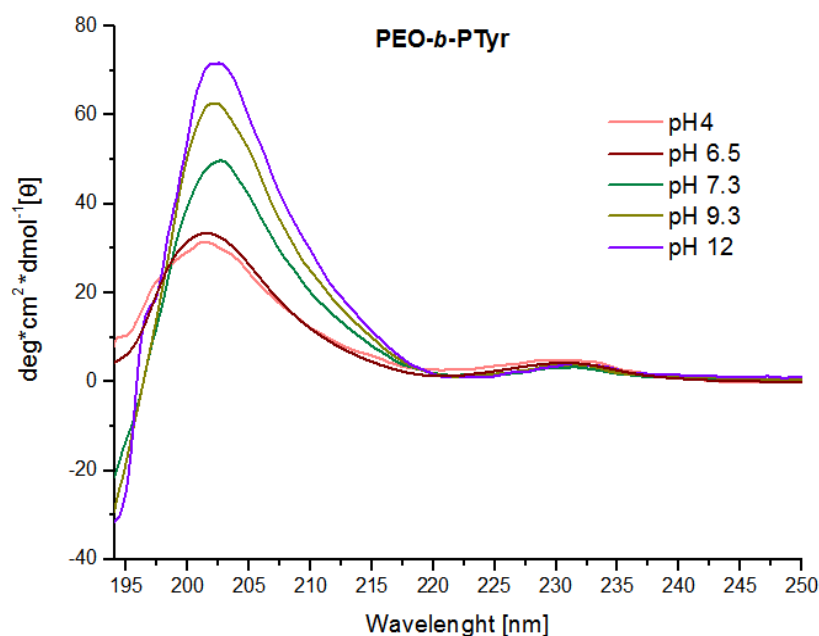
Στο φάσμα του αποπροστατευμένου τριπολυμερούς δεν υπάρχουν οι κορυφές στα 7.7 έως τα 8.3 ppm των trityl προστατευτικών ομάδων του αζώτου του ιμιδαζολικού δακτυλίου της ιστιδίνης. Επίσης, δεν εμφανίζεται και στα 1.6 ppm η κορυφή των *tert*-Butyl προστατευτικών ομάδων του –OH της τυροσίνης. Ωστόσο, όσον αφορά τη δεύτερη, παρατηρείται στα 1.4 ppm μία κορυφή η οποία, πιθανώς, αντιστοιχεί είτε στις ‘κομμένες’ *tert*-Butyl ομάδες που δεν απομακρύνθηκαν είτε, στη δημιουργία *tert*-Butyl-TFA το οποίο απομακρύνεται μετά από διπίδωση.

6.5 Κυκλικός Διχρωισμός (CD) και δευτεροταγής δομή των δισυσταδικών τριπολυμερών.

Για την εύρεση της δευτεροταγούς δομής των πολυπεπτιδικών αλυσίδων έγιναν μετρήσεις κυκλικού διχρωισμού. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων ήταν εντυπωσιακά καθώς υπερέβαιναν τα αναμενόμενα, κατά την υπάρχουσα βιβλιογραφία, δεδομένα.

Τα πολυμερή είχαν σαφή pH-εξάρτηση που επηρέασε τη δευτεροταγή δομή της πολυπεπτιδικής αλυσίδας αλλά και ανεπαίσθητη θερμοκρασιακή εξάρτηση. Επίσης, μελετάται η επιρροή που ασκεί η τυροσίνη σε κάθε περίπτωση, με βάσει το ποσοστό κατά mol που συμμετέχει. Σύμφωνα με τον Lu¹⁰³ και τον Hemmingsen¹⁰⁴, πέραν των συμβατικών διαμορφώσεων των δευτεροταγών δομών, συμμετέχουν κι άλλα μοτίβα, τα ονομαζόμενα Greek Keys (Ελληνικά κλειδιά), τα οποία προκύπτουν από, κυρίως, β-διαμορφώσεις. Τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού της σειράς των πολυπεπτιδίων παρατίθενται παρακάτω.

6.5.1 pH-εξάρτηση του PEO-*b*-PTyr



Σχήμα 44: Φάσμα CD του δισυσταδικού συμπολυμερούς PEO-*b*-PTyr σε διαφορετικές τιμές pH.

Παρατίθεται μόνο η εξάρτηση της δευτεροταγούς δομής του πολυμερούς από το pH καθώς, η εξάρτησή της από τη θερμοκρασία δεν είναι αισθητή. Παρακάτω παρατίθεται ο πίνακας με τα αποτελέσματα της δευτεροταγούς δομής, τα οποία προκύπτουν από τους αλγορίθμους CONTIN, SELCON3 και K2D των S.W. Provencher και J. Glöckner.¹⁰⁵

Πίνακας 3: Αποτελέσματα ανάλυσης δευτεροταγούς δομής για το PEO-*b*-PTyr συναρτήσει του pH

pH	Strand 1 %	Strand 2 %	Helix 1 %	Helix 2 %	Turn %	Unordered %
4	34	41	-	-	62	-
6	7	84	-	-	7	2
7	44	48	-	-	8	-
9	74	21	-	-	4	-
12	94	4	-	-	-	2

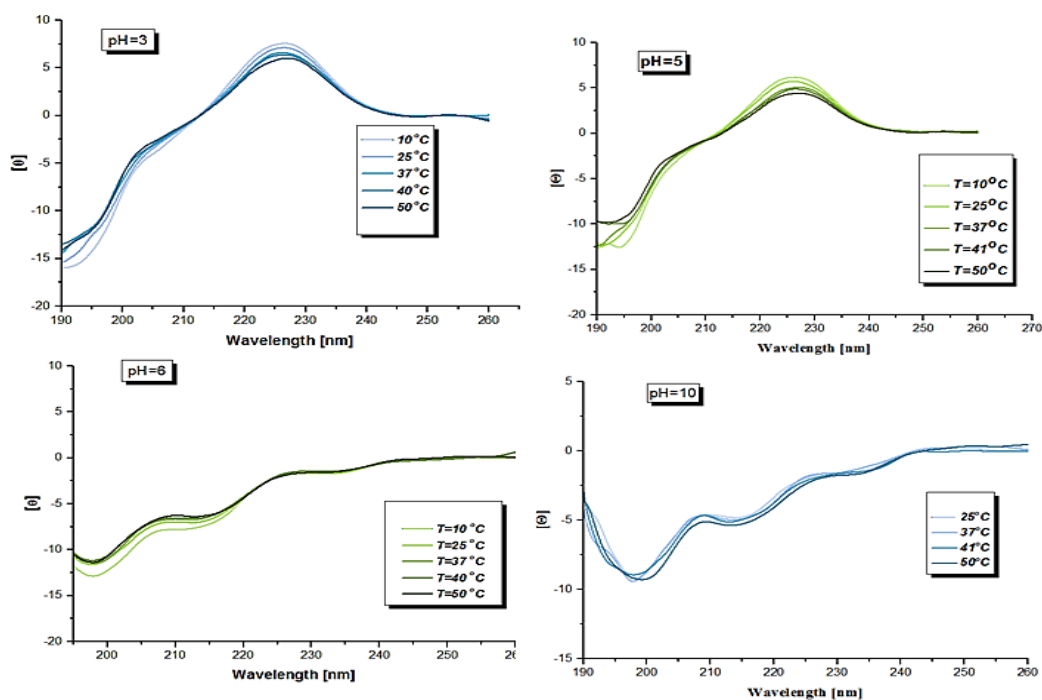
Πίνακας 4: Αποτελέσματα ανάλυσης δευτεροταγούς δομής για το PEO-*b*-Ptyr συναρτήσει της θερμοκρασίας για το pH 12.

T °C	Strand 1%	Strand 2%	Helix 1%	Helix 2%
10	94	-	2.5	3.5
50	80	20	-	-

Παρατηρείται πως με την αύξηση του pH, η πολυπεπτιδική αλυσίδα υιοθετεί β-φύλλο και συγκεκριμένα ευνοείται η διαμόρφωση β-strand 1 δηλαδή, ο σχηματισμός μη-ανεστραμμένων, τακτικών β-κλώνων, ένδειξη αύξησης της υδροφοβικότητας μιας αλυσίδας. Σε χαμηλότερα pH, ευνοείται, όχι μόνο το β-φύλλο αλλά και η β-στροφή. Η β-στροφή αποτελεί τη δομή μιας στροφής αναστροφής μιας αλυσίδας όπου η ομάδα C=O του αμινοξικού κατάλοιπου *i* της πολυπεπτιδικής αλυσίδας δεσμεύεται με δεσμό-H στην ομάδα NH του καταλοίπου *i*+3 και σταθεροποιεί τη στροφή. Η εμφάνιση της β-στροφής, προκύπτει όταν η διαμόρφωση που έχει υιοθετηθεί από την αλυσίδα έχει τακτικότητα, όπως φαίνεται στα αποτελέσματα. Αξιοσημείωτα είναι τα αποτελέσματα για το pH 6 όπου, αντίθετα με τις άλλες τιμές pH, εδώ, ευνοείται η διαμόρφωση β-strand 2 δηλαδή, οι κλώνοι είναι ανεστραμμένοι. Σε κάθε περίπτωση, απουσιάζει η διαμόρφωση α-έλικας, η οποία εμφανίζεται, ωστόσο, σε αμεληταίο βαθμό, σε pH 6.

Όσον αφορά τη θερμοκρασιακή εξάρτηση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, σε μικρές θερμοκρασίες (10°C) εμφανίζεται η διαμόρφωση της α-έλικας, ενώ δεν υπάρχουν κλώνοι με διαμόρφωση β-strand 2. Με αύξηση της θερμοκρασίας, ωστόσο, προκύπτει εξ'ολοκλήρου διαμόρφωση β-φύλλου, με υπεροχή των μη-ανεστραμμένων, τακτικών β-κλώνων (β-strand 1), γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα πως αυξάνεται η υδροφοβικότητα. Επομένως, με μια γενική προσέγγιση, καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως ευνοείται το β-φύλλο και συγκεκριμένα, οι κλώνοι που το διαμορφώνουν είναι τακτικοί και μη-ανεστραμμένοι (regular strands). Επίσης, η διαμόρφωση που κυριαρχεί αφορά στο αντιπαράλληλο β-φύλλο, πιθανώς με δεξιόστροφη φορά.¹⁰⁶

6.5.2 Θερμοκρασιακή- και pH-εξάρτηση της δευτεροταγούς δομής του PEO-*b*-P(70%His-co-30%Tyr).



Σχήμα 45: Φάσματα CD του δισυσταδικού τριπολυμερούς PEO-*b*-P(70%His-co-30%Tyr) σε pH 3,5,6,10 για διαφορετικές θερμοκρασίες.

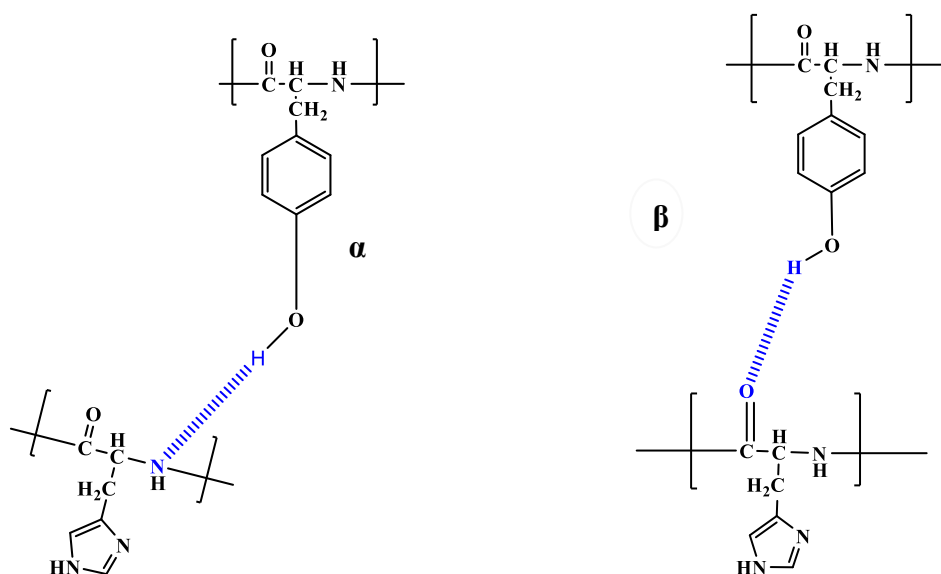
Από τα φάσματα του CD για διαφορετικά pH και διαφορετικές θερμοκρασίες παρατηρείται πως υπάρχει pH-εξάρτηση της δευτεροταγούς δομής του πολυμερούς. Από προηγούμενη μελέτη της ομάδας των πολυπεπτιδίων του εργαστηρίου, έχει αποδειχθεί πως η πολυμερική αλυσίδα της ιστιδίνης, σε pH μικρότερα του 5, υιοθετεί διαμόρφωση τυχαίου σπειράματος, ενώ όσο το pH αυξάνεται η διαμόρφωση της αλυσίδας αλλάζει και λαμβάνει δευτεροταγή δομή β-φύλλου. Από φάσματα που παρατίθενται παραπάνω και από ανάλυση της δευτεροταγούς δομής μέσω αλγορίθμων, προκύπτει πως σε όξινα pH (pH 3, pH 4, pH 5), η αλυσίδα υιοθετεί δομή κυρίως τυχαίου σπειράματος (random coil) με την ταυτόχρονη παρουσία μικρού ποσοστού β-φύλλου και β-στροφής. Σε φυσιολογικές τιμές pH (pH 6 και pH 7) υπάρχει αμεληταία αύξηση του ποσοστού της α-έλικας ενώ, το ποσοστό σε β-φύλλο, είναι παρόμοιο με

αυτό του τυχαίου σπειράματος. Επίσης, εμφανίζεται παράλληλο β-φύλλο, ενώ σε προηγούμενες περιπτώσεις το ποσοστό της συγκεκριμένης διαμόρφωσης ήταν μηδενικό.

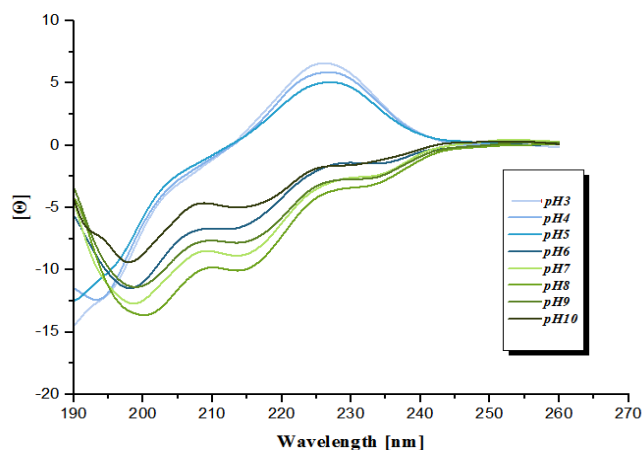
Σε αλκαλικό pH (pH 9 και pH 10) υπάρχει έντονη αύξηση του ποσοστού της α-έλικας, η οποία συνυπάρχει με το β-φύλλο σε ίδια, περίπου, αναλογία ενώ παραμένει η διαμόρφωση του τυχαίου σπειράματος αν και μειωμένη.

Συμπερασματικά, παρατηρείται πως σε χαμηλές τιμές pH κυριαρχεί η διαμόρφωση του τυχαίου σπειράματος ενώ με την αύξηση του pH αυξάνεται το ποσοστό του β-φύλλου και σε αλκαλικά pH υιοθετείται, σημαντικά, η διαμόρφωση της α-έλικας.

Από τους αλγορίθμους οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν, προκύπτει πως, όταν η αλυσίδα υιοθετεί αξιοσημείωτο ποσοστό β-φύλλου, συνυπάρχουν οι δομές β-σάντουιτς (β-sandwich) και β-στροφής, γεγονός που αφενός απαιτεί περαιτέρω μελέτη και αφετέρου, διακαιολογείται από την πλευρική ομάδα της τυροσίνης η οποία διαθέτει υδροξυλομάδα στο βενζολικό της δακτύλιο, η οποία μπορεί να ενωθεί, με δεσμούς υδρογόνου, με το καρβονύλιο ή και την αμινομάδα της ιστιδίνης.



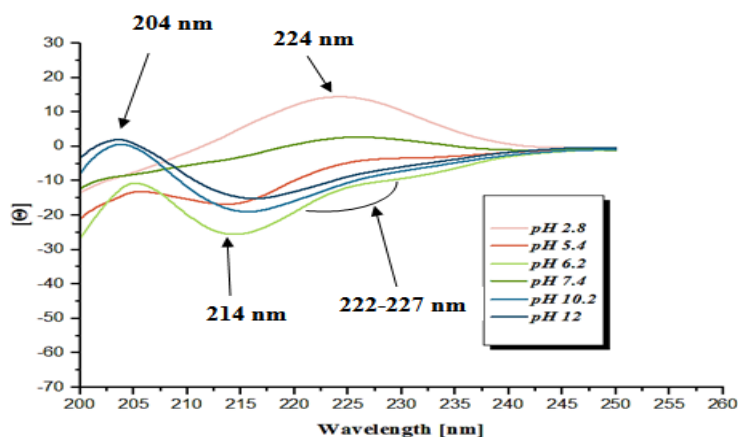
Σχήμα 46: Πιθανή διαμοριακή σύνδεση μεταξύ τυροσίνης-ιστιδίνης με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ του -OH της τυροσίνης και α) του αμινοτελικού άκρου της ιστιδίνης και β) του καρβονυλίου της ιστιδίνης.



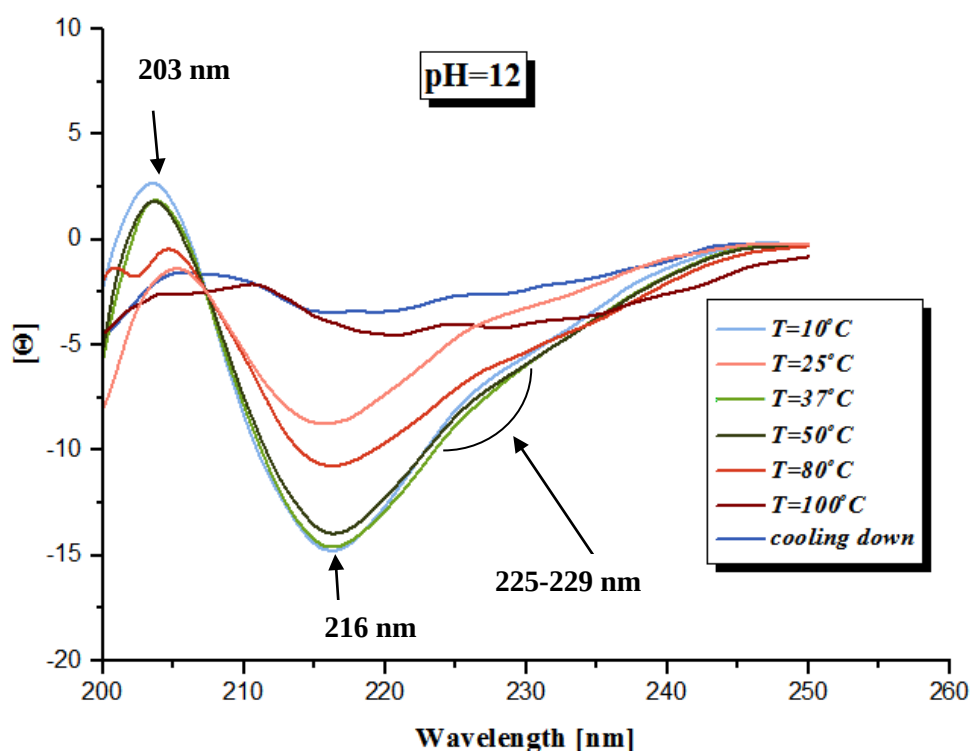
Σχήμα 47: Φάσματα CD του δυσυσταδικού τριπολυμερούς PEO-*b*-P(70%His-co-30%Tyr) για διαφορετικές τιμές pH.

Από το φάσμα μπορεί, επίσης, να διεξαχθεί το συμπέρασμα πως, η διαμόρφωση αλλάζει απότομα από το pH 5 στο pH 6, μεταβατική κατάσταση κατά την οποία γίνεται σαφής η εναλλαγή από το τυχαίο σπείραμα σε β-φύλλο. Αυτή η μετάβαση οφείλεται στην προσέγγιση του pI ισοηλεκτρικού σημείου της τυροσίνης, κατά το οποίο, το αμινοξύ είναι ουδέτερο¹⁰⁷ και παρατηρείται πως με την αλλαγή από pH ~5 σε >6 όπου το π άζωτο της ιστιδίνης είναι αποπρωτονιωμένο, υιοθετείται α-έλικα.

6.5.3 Θερμοκρασιακή- και pH-εξάρτηση της δευτεροταγούς δομής του PEO-*b*-P(80%His-co-20%Tyr).



Σχήμα 48: Φάσμα CD για το PEO-*b*-P(80%His-co-20%Tyr) για διαφορετικές τιμές pH.



Σχήμα 49: Φάσμα CD θερμοκρασιακής εξάρτησης του PEO-*b*-P(80%His-co-20%Tyr) για pH 12.

Για την ανάλυση της δευτεροταγούς δομής, χρησιμοποιήθηκαν οι αλγόριθμοι που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Εξαιτίας του μεγάλου θορύβου του φάσματος, το φάσμα περικόπτεται στα 200 nm, μέχρι τα οποία θεωρείται αξιόπιστο. Παρακάτω παρατίθενται οι πίνακες με τα αποτελέσματα του συνδυασμού αλγορίθμων.

Πίνακας 5: Αποτελέσματα του αλγορίθμου BeStSel για τη δευτεροταγή δομή του PEO-*b*-P(80%His-co-20%Tyr) για διάφορες τιμές pH, στους 25°C.

pH	Helix1 %	Helix2 %	Anti 1%	Anti 2%	Anti 3%	Parallel %	Turn %	Others %
2.8	-	-	-	-	47	-	23	30
5.4	-	-	-	-	35	-	10	55
6.2	36	-	-	-	36	-	-	28
7.4	-	-	-	-	33	-	7	60
10	-	10	-	-	35	36	-	19
12	4	-	-	-	36	45	-	16

Πίνακας 6: Αποτελέσματα του αλγορίθμου BeStSel για τη δευτεροταγή δομή του PEO-*b*-P(80%His-co-20%Tyr) για διάφορες θερμοκρασίες, σε pH 12.

T°C	Helix1 %	Helix2 %	Anti 1%	Anti2%	Anti3%	Parallel %	Turn%	Others %
10	-		-	-	40	50	-	~10
25			5	-	38	27		30
37	-	2	5	-	40	40	-	17
50	-	4	4	-	40	40	-	12
80	-	10	7	-	10	40	-	33
100	-	12	-	-	3	20	10	55
100→25	-	3	-	-	30	10	13	45

Helix 1: Τακτική (Regular) α-έλικα

Helix 2: Παραμορφωμένη (distorted) α-έλικα

Anti 1: Αριστερόστροφο αντιπαράλληλο β-φύλλο

Anti 2: Ελαφρώς δεξιόστροφο αντιπαράλληλο β-φύλλο

Anti 3: Δεξιόστροφο αντιπαράλληλο β-φύλλο

Parallel: Παράλληλο β-φύλλο

Turn: Στροφή

Others: π-έλικα, β-bridge, loop κ.α

Σε αρκετά όξινο pH (2,8) υιοθετείται η δομή του δεξιόστροφου αντιπαράλληλου β-φύλλου και της στροφής, με πιθανή παρουσία κι άλλων μοτίβων. Το αποτέλεσμα αυτό προκύπτει διότι σε χαμηλό pH, το π-άζωτο της ιστιδίνης είναι πρωτονιωμένο και ευνοείται η διαμόρφωση της στροφής. Το β-φύλλο προέρχεται κυρίως από την τυροσίνη, η οποία βρίσκεται σε ουδέτερη κατάσταση, με πρωτονιωμένο το υδροξύλιο του βενζολικού δακτυλίου της. Σε pH 6.2, κοντά στην pKa του π-αζώτου του ιμιδαζολικού δακτυλίου της ιστιδίνης, υιοθετείται και η διαμόρφωση της α-έλικας σε ίση αναλογία με το β-φύλλο και με πιθανή παρουσία άλλων μοτίβων. Η μεταβατική αυτή κατάσταση, οφείλεται στην προτονίωση του ιμιδαζολικού της ιστιδίνης, η οποία γίνεται σε εύρος τιμών pH 5-7. Σε pH 7.4, η διαμόρφωση της α-έλικας παύει πλέον να εμφανίζεται και κυριαρχούν, όπως προηγουμένως, το β-φύλλο και η στροφή. Ωστόσο, σε ένα μεγάλο βαθμό, υπάρχουν και άλλα μοτίβα ή δομές, οι οποίες δε μπορούν να προβλεφθούν από το φάσμα με ακρίβεια. Σε αλκαλικό pH, συγκεκριμένα σε pH ~10, όπου η τυροσίνη αποπρωτο-

νιώνεται, εμφανίζεται και η διαμόρφωση της α-έλικας η οποία, ωστόσο, παρουσιάζεται πλέον παραμορφωμένη (distorted). Αξιοσημείωτη είναι και η εμφάνιση του παράλληλου β-φύλλου, η οποία παρουσιάζεται και στα υπόλοιπα τριπολυμερή. Το παράλληλο β-φύλλο αποτελεί ένδειξη της αποσταθεροποίησης της διαμόρφωσης του β-φύλλου, η οποία λαμβάνει χώρα σε αλκαλικές τιμές pH.

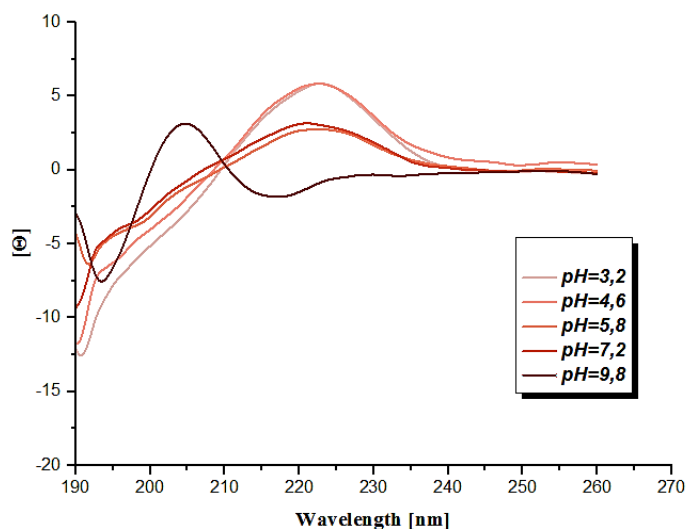
Επομένως, σε όξινα pH, υιοθετείται κυρίως β-φύλλο αλλά και μικρό ποσοστό β-στροφής. Σε pH 6.2, υπάρχει ίση αναλογία β-φύλλου και α-έλικας. Σε αλκαλικές τιμές pH, κυριαρχεί το αντιπαράλληλο β-φύλλο, ωστόσο παρουσιάζεται και η διαμόρφωση του παράλληλου β-φύλλου.

Αξιοσημείωτη είναι η αναφορά της Pastor¹⁰⁸, όταν στο φάσμα υπάρχει μέγιστη θετική κορυφή περί τα 200 nm και ελάχιστη αρνητική στα 217 nm, υπάρχει hairpin (βρόγχος φουρκέτας) το οποίο συνδέει 2 αντιπαράλληλους β-κλώνους. Σύμφωνα με τον Mahalakshmi¹⁰⁹, η τυροσίνη διαμορφώνει φουρκέτες εξαιτίας των ισχυρών T-shaped αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πλευρικών ομάδων της.

Όσον αφορά τη μεταβολή της θερμοκρασίας, η θερμοκρασιακή εξάρτηση μόνο στο συγκεκριμένο τριπολυμερές είναι αξιοσημείωτη. Σε υψηλές θερμοκρασίες (80 και 100 °C), το ποσοστό της α-έλικας είναι παραπλήσιο του αντιπαράλληλου β-φύλλου, ενώ κυριαρχεί το παράλληλο β-φύλλο σε συνδυασμό με αξιοσημείωτη αποδιοργάνωση της αλυσίδας, επιβεβαιώνοντας τη μετουσίωση του πολυπεπτιδίου. Η απευθείας ψύξη του πολυπεπτιδίου από τους 100°C στους 25 °C, αποδεικνύει τη μη αναστρέψιμη μετουσίωση (αποδιοργάνωση).

6.5.4 Θερμοκρασιακή- και pH-εξάρτηση της δευτεροταγούς δομής του PEO-*b*-P(90%His-co-10%Tyr).

Για το δυσσταδικό τριπολυμερές με 10% κατά mol μονομερούς τυροσίνης, παρατίθενται παρακάτω τα φάσματα CD τόσο για τη μελέτη θερμοκρασιακής εξάρτησης όσο και pH εξάρτησης της δευτεροταγούς δομής της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Επίσης, μελετάται η συμμετοχή της τυροσίνης στην υιοθέτηση δευτεροταγούς δομής, ιδιαίτερα σε σχέση με το ποσοστό των mol της που συμμετέχουν στη συστάδα.

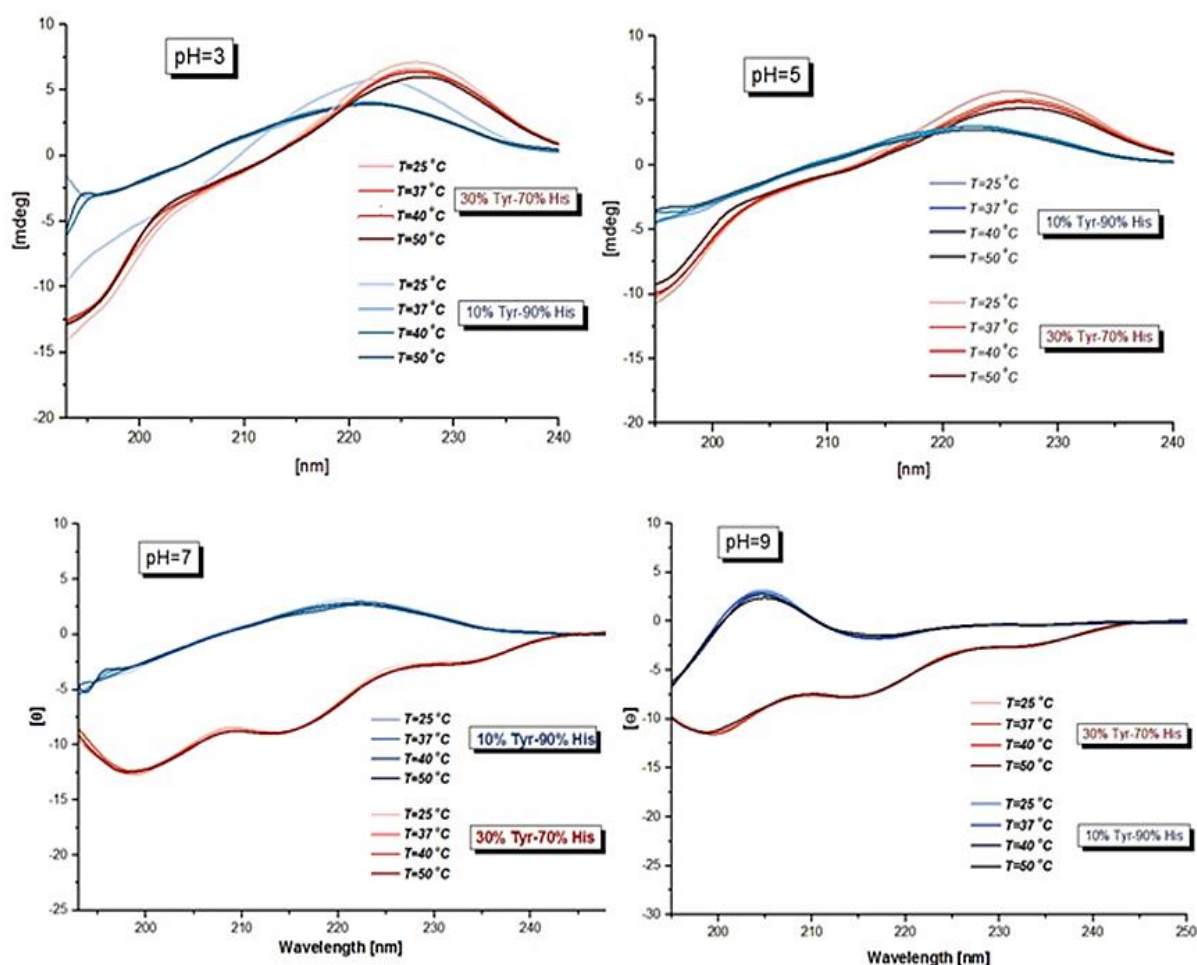


Σχήμα 50: Φάσματα CD του δυσσταδικού τριπολυμερούς PEO-*b*-P(90%His-co-10%Tyr) για διαφορετικές τιμές pH.

Από το φάσμα παρατηρείται ότι για μικρές τιμές pH (pH 3,2 – pH 4,6) η διαμόρφωση που υιοθετείται είναι κυρίως αυτή του τυχαίου σπειράματος, δείχνοντας πως σε αρκετά όξινα pH είτε η αλυσίδα είναι αποδιατεταγμένη είτε υιοθετούνται άλλες μορφές δευτεροταγούς δομής μη καθορισμένες από τους υπάρχοντες αλγορίθμους. Με την αύξηση του pH σε τιμές 5,8 και 7,2 η διαμόρφωση αλλάζει και πλέον υιοθετείται εκτός από το τυχαίο σπείραμα, β-φύλλο και β-στροφή σε ίση αναλογία, μαζί με α-έλικα. Όταν οι τιμές pH γίνουν αλκαλικές, όπου υπάρχει αποπροτονίωση των αμινοξέων, επικρατεί το β-φύλλο, το ποσοστό της α-έλικας γίνεται μηδενικό και το τυχαίο σπείραμα συμμετέχει λιγότερο. Κατά ένα μεγάλο ποσοστό, προκύπτει πως υιοθετούνται άλλες μορφές δευτεροταγούς δομής ή τυχαίο σπείραμα.

Συμπερασματικά, σε όξινες τιμές pH, επικρατεί το τυχαίο σπείραμα, χωρίς η αλυσίδα να λαμβάνει συγκεκριμένη διαμόρφωση. Με την αύξηση του pH και προσεγγίζοντας τις ουδέτερες τιμές, υπάρχει β-φύλλο, β-στροφή και μικρό ποσοστό α-έλικας, συνυπάρχοντα με μικρό ποσοστό τυχαίου σπειράματος. Όταν οι τιμές pH είναι πλέον αλκαλικές, επικρατεί το β-φύλλο με πιθανότητα συμμετοχής και άλλων μοτίβων.

Όσον αφορά τις μεταβολές της θερμοκρασίας, δεν παρατηρείται κάποια αξιοσημείωτη μεταβολή στη δευτεροταγή δομή της αλυσίδας.



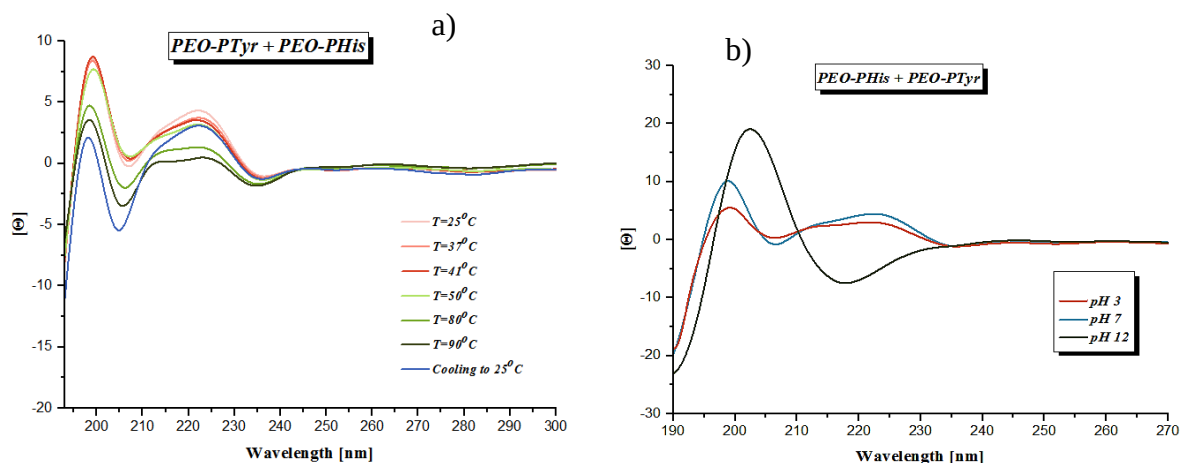
Σχήμα 51: Φάσματα CD του δισυσταδικού τριπολυμερούς PEO-*b*-P(70%His-co-30%Tyr) (κόκκινο) σε σύγκριση με το PEO-*b*-P(90%His-co-10%Tyr) (μπλε) σε pH 3,5,7,9 για διαφορετικές θερμοκρασίες.

Το διάγραμμα που παρατίθεται παραπάνω περιλαμβάνει σύγκριση των φασμάτων CD των δύο πολυμερών που συντέθηκαν και διαφέρουν στα mol τυροσίνης που συμμετέχουν στη δεύτερη συστάδα. Από τα διαγράμματα είναι φανερό πως οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες των δύο συμπολυμερών διαφέρουν σημαντικά στη δευτεροταγή τους δομή, παρατηρώντας πως στο πολυμερές όπου τα ποσοστά της τυροσίνης είναι μεγαλύτερο (30% κατά mol τυροσίνη), η διαμόρφωση εμπεριέχει σε μεγαλύτερο, αλλά και αξιοσημείωτο ποσοστό, α-έλικα. Επομένως, με μείωση του ποσοστού συμμετοχής της τυροσίνης, ευνοείται το β-φύλλο όπως συμπεραίνει και ο Lu μέσω μετρήσεων WAXD.¹⁰³

6.5.5 Διαμοριακές δυνάμεις μεταξύ των πλευρικών ομάδων.

Σύμφωνα με τη μετρήσεις κυκλικού διχρωισμού, το ομοπολυμερές της τυροσίνης (PTyr) και το δυσσταδικό PEO-PTyr, υιοθετούν κυρίως δευτεροταγή δομή β-φύλλου με συμμετοχή τυχαίου σπειράματος. Όσον αφορά την πολυιστιδίνη, το ομοπολυμερές αυτής, PHis, υιοθετεί δομή τυχαίου σπειράματος σε χαμηλές τιμές pH και β-φύλλου σε υψηλότερες. Το δυσσταδικό PEO-PHis υιοθετεί παρόμοια διαμόρφωση με το ομοπολυμερές, δηλαδή τυχαίο σπείραμα και β-φύλλο.

Αξιοσημείωτη, λοιπόν, είναι η υιοθέτηση α-έλικας εφόσον τα 2 αμινοξέα που συμμετέχουν, ευνοούν το β-φύλλο και το τυχαίο σπείραμα. Για την επιβεβαίωση της υπόθεσης πως η δευτεροταγής δομή της α-έλικας προκύπτει από τη δημιουργία δεσμών υδρογόνου μεταξύ των πλευρικών ομάδων των δύο συμμετεχόντων αμινοξέων, αναμείχθηκαν α) PEO-PHis και PEO-PTyr σε αναλογία 70-30 επί τοις εκατό κατά mol, αντίστοιχα και β) PEO-PHis και PTyr σε αναλογία, επίσης, 70-30 επί τοις εκατό κατά mol, αντίστοιχα. Ο κύριος στόχος αυτού είναι να αποδειχθεί πως, δημιουργούνται δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των πλευρικών ομάδων ή και πλευρικών ομάδων-κύριας αλυσίδας, ακόμα και όταν οι δύο συστάδες των αμινοξέων δεν αποτελούν τμήμα του ίδιου πολυμερούς. Τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού για τα δύο διαλύματα παρατίθενται παρακάτω.



Σχήμα 52 : Φάσματα CD του διαλύματος που περιέχει τα πολυμερή PEO-PHis και PEO-PTyr αναμειγμένα σε DMSO, για a) διαφορετικές θερμοκρασίες και b) pH .

Από το παραπάνω φάσμα, προκύπτει πως δευτεροταγής δομή και κατ'επέκταση, η δημιουργία δεσμών υδρογόνου, υπάρχει και όταν οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες αναμειγνύονται μεταξύ τους σε κοινό «καλό» διαλύτη και για τα δύο πολυμερή. Το παραπάνω φάσμα κυκλικού

διχρωισμού διαφέρει από τα φάσματα των PEO-PHis και PEO-PTyr γεγονός που αποδεικνύει πως η δευτεροταγής δομή των πολυπεπτιδίων δεν οφείλεται μόνο στη διαμόρφωση της κύριας αλυσίδας, αλλά και στην αλληλεπίδραση των πλευρικών ομάδων. Το φάσμα α) αποτυπώνει θερμοκρασιακή εξάρτηση, η οποία προκύπτει από τη φύση των δεσμών υδρογόνου, οι οποίοι σε θερμοκρασίες >80 °C «σπάνε», όπως φαίνεται παραπάνω. Ο παρακάτω πίνακας συμπεριλαμβάνει τις διαμορφώσεις που υιοθετούνται από τη συνένωση των 2 πολυπεπτιδικών αλυσίδων με διαμοριακές δυνάμεις. Τα αποτελέσματα του φάσματος b) το οποίο αποτυπώνει την pH-εξάρτηση, φαίνονται στον **Πίνακα 8**.

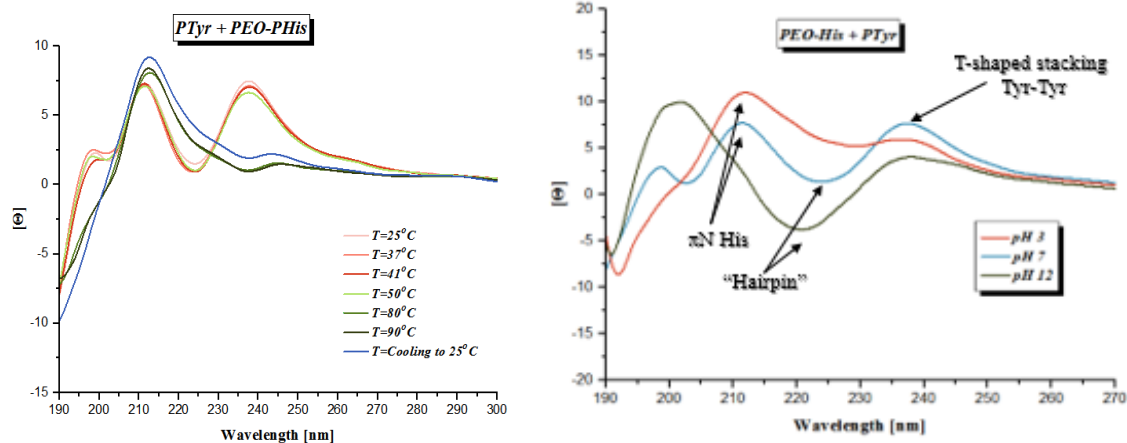
Πίνακας 7 : Αποτελέσματα του αλγορίθμου BeStSel για τη δευτεροταγή δομή των πολυμερών PEO-PHis και PEO-PTyr σε DMSO και σε pH ~7 για διαφορετικές θερμοκρασίες.

<i>Θερμοκρασία</i>	<i>α-έλικα %</i>	<i>Αντιπ/λο β-φύλλο %</i>	<i>Στροφή %</i>	<i>Τυχαίο σπείραμα/άλλες δομές %</i>
25°C	47	13	10	30
37 °C	40	10	10	40
41 °C	38	10	10	42
50 °C	38	7	10	45
80 °C	33	-	13	54
90 °C	32	-	13	55
Cooling to 25 °C	32	6	7	55

Συμπερασματικά, οι τύποι δευτεροταγών δομών που λαμβάνουν μέρος είναι στο μεγαλύτερο ποσοτό η α-έλικα και το τυχαίο σπείραμα ή άλλες δομές-μοτίβα και, ακολουθούν το β-φύλλο και το τυχαίο σπείραμα σε ίδια περίπου μεταξύ τους και πολύ μικρότερα σε σύγκριση με την α-έλικα, ποσοστά. Η αύξηση της θερμοκρασίας επηρεάζει το β-φύλλο, μειώνοντας την παρουσία του, με πλήρη έκλειψη αυτού στους 80 °C και στους 90 °C, θερμοκρασίες στις οποίες «σπάνε» οι δεσμοί υδρογόνου. Ωστόσο, με αύξηση της θερμοκρασίας, δεν επηρεάζεται η α-έλικα σε σημείο έκλειψης αυτής, παρά σημειώνεται μικρή μείωση του ποσοστού της. Επιπροσθέτως, ύστερα από τους 90 °C η θερμοκρασία προσαρμόσθηκε απευθείας στους 25 °C και είχε σαν αποτέλεσμα την επανεμφάνιση του β-φύλλου ενώ η διαμόρφωση της α-έλικας έμεινε σταθερή όπως στις υψηλές θερμοκρασίες.

Πίνακας 8 : Αποτελέσματα του αλγορίθμου BeStSel για τη δευτεροταγή δομή των πολυμερών PEO-PHis και PEO-PTyr σε DMSO και σε T=25 °C για διαφορετικές τιμές pH .

pH	α -έλικα %	Αντιπ/λο β -φύλλο %	Στροφή %	Τυχαίο σπείραμα/ άλλες δομές %
3	10	50	20	20
7	30	40	10	20
12	-	60	20	20



Σχήμα 53 : Φάσματα CD του διαλύματος που περιέχει τα πολυμερή PEO-PHis και PTyr αναμεμειγμένα σε DMSO.

Πίνακας 9: Αποτελέσματα του αλγορίθμου BeStSel για τη δευτεροταγή δομή των πολυμερών PEO-PHis και PTyr αναμεμειγμένων σε DMSO και σε pH ~7 και διαφορετικές θερμοκρασίες.

Θερμοκρασία	α -έλικα %	Αντιπ/λο β -φύλλο %	Στροφή %	Τυχαίο σπείραμα/ άλλες δομές %
25°C	30	40	10	20
37 °C	20	40	20	20
41 °C	20	50	10	20

50 °C	10	50	10	30
80 °C	-	50	20	30
90 °C	-	55	25	20
Cooling to 25 °C	5	55	20	20

* Οι τιμές προέκυψαν από στρογγυλοποίηση.

Πίνακας 10 : Αποτελέσματα του αλγορίθμου BeStSel για τη δευτεροταγή δομή των πολυμερών PEO-PHis και PTyr αναμεμειγμένων σε DMSO, σε διαφορετικές τιμές pH.

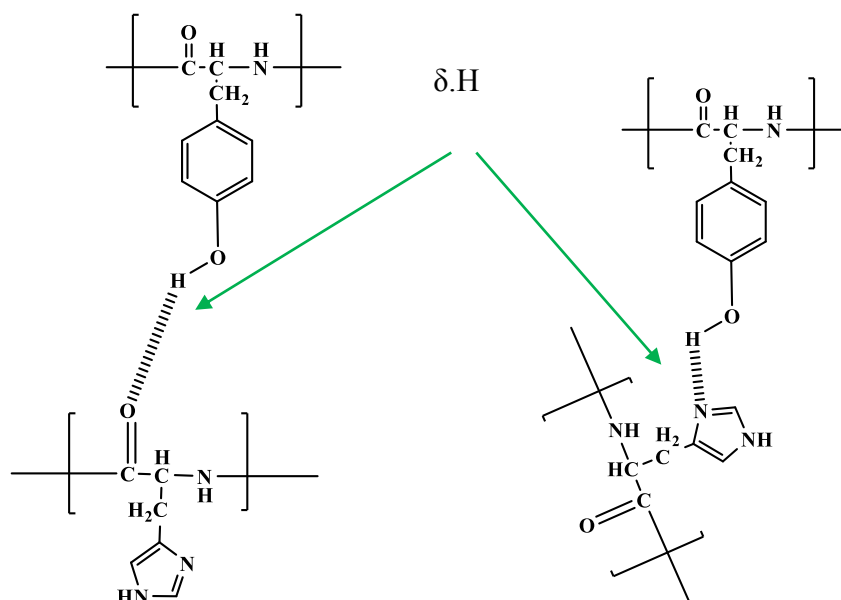
<i>pH</i>	<i>α-έλικα %</i>	<i>Αντιπ/λο β-φύλλο %</i>	<i>Στροφή %</i>	<i>Τυχαίο σπείραμα/ άλλες δομές %</i>
3	10	50	20	20
7	30	40	10	20
12	-	60	20	20

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 9 και του φάσματος (Σχήμα 53), προκύπτει πως στην περίπτωση που η πολυτυροσίνη δεν είναι συζευγμένη με το πολυαιθυλενοξειδίο, κυριαρχεί το β-φύλλο και, μάλιστα, αυξάνεται το ποσοστό του με αύξηση της θερμοκρασίας. Η διαμόρφωση της α-έλικας, αν και διατηρεί αξιοσέβαστο ποσοστό μέχρι τους 41 °C, με περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας μειώνεται σημαντικά με αποτέλεσμα στους 80 και 90 °C να μην εμφανίζεται καθόλου. Ύστερα από cooling στους 25 °C, η α-έλικα δεν ανακτάται ως διαμόρφωση ενώ το β-φύλλο παραμένει σε πολύ μεγάλο ποσοστό. Επίσης, αξιοσημείωτη είναι η διαμόρφωση της β-στροφής, η οποία παραμένει, ανεξάρτητα της αύξησης της θερμοκρασίας.

Συμπερασματικά, θεωρείται δεδομένη η δημιουργία δεσμών υδρογόνου πέραν της κύριας αλυσίδας των συστάδων που υπάρχει στα τριπολυμερή και παρατηρείται πως η μεγαλύτερη συμμετοχή πολυαιθυλενοξειδίου (Σχήμα 52) σταθεροποιεί την α-έλικα και την καθιστά, σχετικά, ανεπηρέαστη από την αύξηση της θερμοκρασίας, σε αντίθεση με τα αποτελέσματα του φάσματος στο Σχήμα 53. Επομένως, μπορεί να διεξαχθεί το συμπέρασμα πως, τουλάχιστον όσον αφορά τα πολυμερή που μελετώνται στην παρούσα εργασία, ο ρόλος του PEO αφορά και στη σταθερότητα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας αναφορικά με τη θερμοκρασία, προάγοντάς την. Περαιτέρω αναφορά στο ρόλο του πολυαιθυλενοξειδίου γίνεται στο υποκεφάλαιο 6.7.

6.6 Ο ρόλος της πλευρικής ομάδας της τυροσίνης.

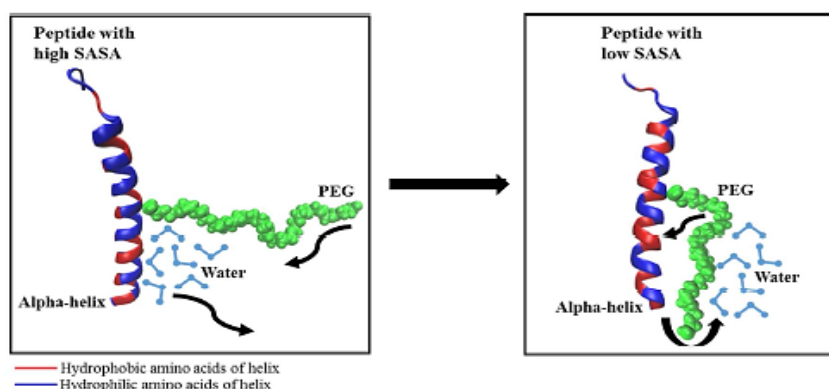
Καθώς η τυροσίνη διαθέτει υδροξυλομάδα στο φαινολικό της δακτύλιο, προδιαθέτει τη μελέτη σχηματισμού δεσμών υδρογόνου με πλευρικές ομάδες άλλων αμινοξέων ή και ομάδες, NH ή και C=O της κύριας αλυσίδας. Σύμφωνα με τον Hemmingsen ¹⁰⁴, το υδροξύλιο του φαινολικού δακτυλίου της τυροσίνης, όταν αυτή βρίσκεται σε θέση i, μπορεί να δημιουργήσει δεσμούς υδρογόνου με τις ομάδες NH ή C=O της κύριας αλυσίδας του αμινοξέως που βρίσκεται σε θέση i+3, i+4 ή i+5. Συγκεκριμένα, εάν η δευτεροταγής δομή που παραδοσιακά υιοθετείται από το δεύτερο, κάθε φορά, αμινοξύ, είναι το β-φύλλο, η αλυσίδα του δεύτερου μπορεί να αναδιπλώνεται γύρω από το δακτύλιο της τυροσίνης και να προκύπτει η υπερδευτεροταγής δομή Greek key (ελληνικό κλειδί). Σε αυτή την κατηγορία, ανήκει και το μοτίβο Tyrosine Corner, το οποίο αναφέρεται στη γωνία που σχηματίζει η τυροσίνη κατά τη δημιουργία δεσμών υδρογόνου με το δεύτερο αμινοξύ, όπως περιγράφεται παραπάνω. Σύμφωνα δε, με τον αλγόριθμο BeStSel, παράγωγο του DSSP και βασιζόμενο στους κλασσικούς αλγορίθμους SELCON3, CONTIN and CDSSTR, οι δομές και τα μοτίβα που υιοθετούν οι αλυσίδες των πολυμερών που μελετώνται στην παρουσία εργασία, είναι όμοιες με των Immunoglobulins και Cathepsins, ομάδες πρωτεϊνών, οι οποίες παρουσιάζουν γωνίες τυροσίνης και δισμορφώνουν β-barrels (β-βαρέλια).



Εικόνα 14: Πιθανή διαμοριακή σύνδεση μεταξύ τυροσίνης-ιστιδίνης α) με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ του -OH της τυροσίνης και του καρβονυλίου της ιστιδίνης και β) με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ πλευρικών ομάδων .

6.7 Ο ρόλος του πολυαιθυλενοξειδίου στη δευτεροταγή δομή

Το PEO που χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία έχει $M_n=5 \text{ k g}^*\text{mol}^{-1}$ και $10 \text{ k g}^*\text{mol}^{-1}$ για τα τριπολυμερή και το συμπολυμερές, αντίστοιχα. Όσον αφορά το ρόλο του στη δευτεροταγή δομή που υιοθετεί η πολυπεπτιδική αλυσίδα, όταν η διαμόρφωση παίρνει τη μορφή α-έλικας, το PEO λειτουργεί επικουρικά στη σταθεροποίησή της. Όταν ο διαλύτης είναι το νερό, υπάρχουν 2 κύριες αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα και οι οποίες δρουν ‘συναγωνιστικά’ μεταξύ τους. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις περιγράφονται ως peptide-peptide interactions και peptide-water interactions¹¹⁰. Παλαιότερα, η διαμόρφωση της α-έλικας, σε μικρού μήκους πολυπεπτιδία, σταθεροποιούνταν μέσω δεσμών υδρογόνου, δισουλφιδικών δεσμών, με αύξηση της υδροφοβικότητας του συστήματος κ.α. Ωστόσο, με τη χρησιμοποίηση του PEO για τη δημιουργία επιπλέον συστάδας, ο ρόλος του διερευνήθηκε περαιτέρω, αποδεικνύοντας πως η συμμετοχή του ως επιπλέον συστάδα, προσαρτημένη στο αμινοτελικό ή καρβοξυτελικό άκρο ενός πολυπεπτιδίου, προάγει τη σταθερότητα, μειώνοντας τον παράγοντα SASA (solvent accessible surface area). Συγκεκριμένα, ο ρόλος του είναι να δημιουργεί ένα ‘κέλυφος’ πάνω από την κύρια αλυσίδα, να προάγει ένα υδρόφοβο περιβάλλον, να μην αφήνει το διαλύτη να αλληλεπιδρά με την κύρια αλυσίδα και να προστατεύονται με αυτό τον τρόπο οι δεσμοί υδρογόνου της κύριας αλυσίδας, ανεπηρέαστοι από ‘water attacks’. Επιπρόσθετα, όσο μεγαλύτερο το μοριακό βάρος του PEO, τόσο περισσότερο ευνοείται, για τους παραπάνω λόγους, η σταθερότητα της α-έλικας.^{111, 112}



Εικόνα 15 : Ο ‘προστατευτικός’ ρόλος του PEO στην κύρια αλυσίδα.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

PTyr	Πολυτυροσίνη
PHis	Πολυιστιδίνη
DDS	Drug Delivery System
ROP	Ring Opening Polymerization
NCA	N-καβοξανυδρίτης
PEO	Πολυαιθυλενοξείδιο
GPC	Gel Permeation Chromatography
SEC	Size Exclusion Chromatography
HPLC	High Performance/Pressure Liquid Chromatography
IR	Infrared
DLS	Dynamic Light Scattering
DMF	Διμέθυλοφορμαμίδιο

Mn	Μοριακό Βάρος κατ' αριθμό
Mw	Μοριακό Βάρος κατά βάρος
NMR	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός
THF	Τετραϋδροφουράνιο
EtAc	Οξικός Αιθυλεστέρας
DPw	Μέσος κατά βάρος βαθμός πολυμερισμού
$I=M_w/M_n$	Συντελεστής κατανομής Μοριακού Βάρους

DMA	Διμεθυλαμίνη
HVT	Τεχνικές Υψηλού Κενού
Bz	Βένζυλο ομάδα
BOC	Τριτοταγής Βουτόξυ Καρβονυλομάδα
t-Bu	Τερτ-βουτυλομάδα

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Stryer, L. *Βιοχημεία*, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο 2001, Έκδοση 5η, Κεφάλαιο II, σελ. 15-55
2. Sewald, N, Jakubke, H, *Peptides: Chemistry and Biology*, Wiley, 2002, 4, 195-201
3. Stryer, L. *Βιοχημεία*, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο 2001, Έκδοση 5η, Κεφάλαιο II, σελ. 55-77
4. Zhulina E.B., Birshtein, T. M., *Conformations of Block-Copolymer Molecules in Selective Solvents (Micellar Structures)*, Polym. Sci. U.S.S.R 1985, 27, 570.
5. Merrifield, R., *Automated Synthesis of Peptides*, Science 1965, 150, 178-185.
6. Merrifield, R., *Automated Synthesis of Peptides*, Nature 1966, 207, 522-523.
7. Dawson, P., Muir, T., Clark-Lewis, I. H. And Kent, S., *Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation*, Science 1994, 266, 776-779
8. Kricheldorf, H. *α -Aminoacid N-carboxyanhydrides and Related Materials*, Έκδοση 1η, Springer-Verlag, New York 1987.
9. Leuchs, H., *Ueber die Glycin-carbonsäure*, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 1906, 39, 857-861.
10. Leuchs, H. and Geiger, W., *Über die Anhydride von α -Amino-N-carbonsauren und die von α -Aminosauern*, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 1908, 41, 1721-1726.
11. Katchalski, E., Shalitin, Y., Gehatia, M., J. *Theoretical analysis of the polymerization kinetics of N-carboxy- α -amino acid anhydrides*. Am. Chem. Soc. 1955, 77, 1925.
12. Fessler, J., Ogston, J., Trans. Faraday. Sec., 1951, 47, 667
13. Lundberg, R. D., Doty, P., *Polypeptides. XVII. A Study of the Kinetics of the Primary Amine-initiated Polymerization of N-Carboxy-anhydrides with Special Reference to Configurational and Stereochemical Effects*, J. Am. Chem. Soc., 1957, 79, 3961
14. Lundberg, R. D., Doty, P., *The Reaction of p-Nitrophenyl Acetate with Chymotrypsin*, J. Am. Chem. Soc. 1958, 78, 4810.
15. Katchalski, E., Shalitin, V., Gehatia, M., *Theoretical Analysis of the Polymerization Kinetics of N-carboxy- α -amino Acid Anhydrides*, J. Am. Chem. Soc., 1955, 77, 1925
16. Ballard, H. G., Bamford, H. C., *Additional comments of the amine-initiated polymerization*, J. Am. Chem. Soc. 1956, 79, 2338.

17. Blout, E. R. and Idelson, M., *Polypeptides XVIII, A Kinetic Study of the Polymerization of Amino Acid N-Carboxyanhydrides Initiated by Strong Bases*, J. Am. Chem. Soc. 1958, 80, 2387-2393.
18. Thunng, D., Semen, J. and Elias, H. G., *Carbon dioxide influence on NCA polymerizations*, Macromol. Chem. 1977, 178, 603-607.
19. Bailey, L. L., *A New Peptide Synthesis*, Nature 1949, 164, 889-899.
20. Ballard, D. G., Bamford, C. H. and Weymouth, F. J., *New observations on the Chemistry of N-Carboxy- α -Amino-Acid Anhydrides*, Nature 1954, 174, 173-175.
21. Ballard, D. G. and Bamford, C. H., *The Polymerization of α -Benzyl-L-Glutamate N-Carboxy Anhydride*, J. Am. Chem. Soc. 1957, 79, 2336-2338.
22. Ballard, D. G., Bamford, C. H. and Elliot, A., *Synthetic Polypeptides*, Macromol. Chem. 1960, 35, 222-238
23. Goodman, M. and Hutchison, U., *The Mechanisms of Polymerization of N-Unsubstituted N-Carboxyanhydrides*, J. Am. Chem. Soc. 1966, 88, 3627-360.
24. Ballard, D. G., Bamford, C. H. and Weymouth, F. J., *Studies in Polymerization. VIII. Reactions of N-Carboxy- α -Amino Acid Anhydrides Initiated by Metal Cations*, Proc. R. Soc. 1955, 227, 155-183.
25. Kopple, K. D., *The Reaction of Amines with Amino Acid N-Carboxy-Anhydrides*, J. Am. Chem. Soc. 1957, 79, 662-664.
26. Kopple, K. D., *Some Reactions of Amino Acid N-Carboxy Anhydrides*, J. Am. Chem. Soc. 1957, 79, 6442-6446.
27. Seeney, C. And Harwood, J., *Carbamate Ions as Propagating Species in N-Carboxy Anhydride Polymerizations*, J. Macromol. Sci. Chem. 1957, 9, 779-795.
28. Aliferis, T., Iatrou, H. and Hadjichristidis, N., *Living Polypeptides*, Biomacromolecules 2004, 5, 1653-1656.
29. Aliferis, T., Iatrou, H., and Hadjichristidis, N., *Well-defined Linear Multiblock and Branched Polypeptides by Linking Chemistry*, J. Polym. Sci. 2005, Part A, 43, 4670-4673.
30. Aliferis, T., Iatrou, H., Hadjichristidis, N., Messman, J and Mays, J., *Synthesis and Characterization of 3- and 4- Arm Star-Block Copolpeptides using Multifunctional Amino Initiators and High Vacuum Techniques*, L. Macromol. Symp. 2006, 240, 12-17.
31. Karatzas, A., Iatrou, H., Hadjichristidis, N., Inoue, K., Sugiyama, K. And Hirao, A., *Complex Macromolecular Chimeras*, Biomacromolecules 2008, 9, 2072-2080

32. Iatrou, H., Frielinghaus, H., Hanski, S., Ferderigos, N., Ruokolainen, J., Ikkala, O., Richter, D., Mays, J. and Hadjichristidis, N., *Architecturally Induced Multiresponsive Vesicles from Well-Defined Polypeptides: Formation of Gene Vehicles*, *Biomacromolecules* 2007, 8, 2173-2181.
33. Papadopoulos, P., Floudas, G., Schnell, I., Aliferis, T., Iatrou, H. and Hadjichristidis, N., *Nanodomain-Induced Chain Folding in Poly(γ -benzyl-L-glutamate)-*b*-Polyglycine Diblock Copolymers*, *Biomacromolecules* 2005, 6, 2352-2361.
34. Gitsaa, A., Floudas, G., Mondeshki, M., Butt, H. J., Spiess, H. W., Iatrou, H. and Hadjichristidis, N., *Effect of chain topology on the self-organization and dynamics of block copolypeptides: from diblock copolymers to stars*, *Biomacromolecules* 2008, 9 (7), 1959–1966
35. Quirk, L., Hsieh, L. H., *Anionic Polymerization-Principles and Practical Applications*, New York 1996.
36. Szwarc, M., *Living Polymers*, *Nature* 1956, 178, 1168-1169.
37. Fuchs, F., *Über N-Carbonsäure-anhydride*, *Chem. Ber.* 1922, 55, 2943
38. Brown, C. J., Coleman, D. And Farthing, A. C., *Further Studies in Synthetic Polypeptides*, *Nature* 1949, 163, 834-835.
39. Farthing, A. C. and Reynolds, R. J. W., *Anhydro-N-Carboxy-DL- β -Phenylalanine*, *Nature* 1950, 165, 645-647.
40. Farthing, A. C., *Synthetic Polypeptides, Part I. Synthesis of Oxazolid-2,5-diones and a New Reaction of Glycine*, *J. Chem. Soc.* 1950, 22, 3213-3217.
41. Coleman, D. and Farthing, A. C., *Synthetic Polypeptides, Part I. Synthesis of Oxazolid-2,5-diones and a New Reaction of Glycine*, *J. Chem. Soc.* 1950, 32, 3218-3222.
42. Levy, A. L., *Anhydro-N-Carboxy-DL- β -Phenylalanine*, *Nature* 1950, 165, 152-153.
43. Kricheldorf, H. R., *Models of Biopolymers by Ring-Opening Polymerization* Έκδοση 1η, CRC Press, Boca Raton 1990, 8-11.
44. Iwakura, Y., Uno, K. and Kang, S., *The Synthesis and Reactions of 2-Isocyanatoacyl Chlorides*, *J. Org. Chem.* 1965, 30, 1158-1161
45. Kricheldorf, H. R., *Mechanism of the NCA-Polymerization, Catalysis by Secondary Amines*, *Macromol. Chemie.* 1977, 178, 1959-1970.
46. Sekiguchi, H. and Froyer, G., *Anionic Polymerization Mechanism of N-Carboxy- α -amino Acid Anhydrides*, *J. Polym. Sci.* 1975, 52, 157-171.

47. Sekiguchi, H., *Mechanism of N-Carboxy- α -amino Acid anhydride (NCA) Polymerization*, Pure. Appl. Chem. 1981, 53, 1689-1714
48. McCormick, C. L.; Bock, J.; Schulz, D. N. *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*; John Wiley: New York, N Y 1989; Vol. 17, 730
49. Kopecek, J., Benoit, H. and Rempp, P., *Biodegradation of Polymers for Biomedical Use*, Macromol. 1982, Oxford, England, 305.
50. Molyneux, P., *Water Soluble Synthetic Polymers: Properties and Behavior*, CRC: Boca Raton, FL, 1985.
51. Moradi-Araghi, A., Beardmore, D. H., Stahl, G. A. Stahl, G. A., Schulz, D. N., *In Water Soluble Polymers for Petroleum Recovery*, New York 1988, p 299-312.
52. Price, C., and Goodman, I., *Development in Block Copolymers Applied Science*, London 1985, 2, 27.
53. Elias, H. G., Huglin, M. B., *Light Scattering from Polymer Solutions*, Academic Press, London 1972, 9.
54. Philippova, O. E., Hourdet, D., Audebert, R., Khokhlov, A. R., *pH-Responsive Gels of Hydrophobically Modified Poly (acrylic acid)*, Macromol. 1997, 30, 8278–8285
55. Qiu, Y. L., Bae, H. Y., *Polymer Architecture and Drug Delivery, Pharmaceutical Research* 2006, Vol. 23, No. 1 (Review).
56. Zhulina E.B., Birshtein, T. M., *Conformations of Block-Copolymer Molecules in Selective Solvents (Micellar Structures)*, Polym. Sci. U.S.S.R 1985, 27, 570.
57. M. Massignani, H. Lomas, G. Battaglia., *Polymersomes: a synthetic biological approach to encapsulation and delivery*, Adv. Polym. Sci. 2010, 229, 115-154.
58. D.E. Discher, V. Ortiz, G. Srinivas, M. L. Klein, Y. Kim, D. Christian, S. Cai, P.J. Photos, F. Ahmed, *Polymersomes as viral capsid mimics*, Prog.Polym. Sci. 2007, 838–857.
59. J.N. Israelachvili, *Intermolecular and surface forces*, Academic Press, London 1992.
60. D.E. Discher, A. Eisenberg, *Polymer vesicles*, Science 2002, 297, 967-973
61. M. Antonietti, S. Forster, *Vesicles and liposomes: a self-assembly principle beyond lipids*, Adv. Mater. 2003, 15, 1323-1333
62. J. D. Harper, S. S. Wong, C. M. Lieber, P. T. Lansbury, *Assembly of A beta amyloid protofibrils: an in vitro model for a possible early event in Alzheimer's disease*, Biochemistry 1999, 38, 8972-8980
63. Bermúdez M.D., Carrión F.J., Cervantes J.J., *Structural characterization of polymer–liquid crystal dispersions*, Polym. Int., 2002

64. David A. Christian, Aiwei Tian, Wouter G. Ellenbroek, Ilya Levental, Karthikan Rajagopal, Paul A. Janmey, Andrea J. Liu, Tobias Baumgart, Dennis E. Discher, *Spotted vesicles, striped micelles and Janus assemblies induced by ligand binding*, Nature Materials 2009
65. C. LoPresti, H. Lomas, M. Massignani, T. Smart, G. Battaglia J., *Polymersomes: nature inspired nanometer sized compartments*, Mater. Chem. 2009, 19, 3576-3590
66. G. Battaglia, A.J. Ryan J., *Bilayers and interdigitation in block copolymer vesicles*, Am. Chem. Soc. 2005, 127, 8757-8764
67. R. Levicky, N. Koneripalli, M. Tirrell, J.F. Ankner, H. Kaiser, S.K. Satija, *Selectively Swollen Films of Triblock/Diblock Copolymer Blends: Dependence of Swollen Film Structure on Blend Composition*, Macromol. 1998, 31, 4908-4914
68. A. Blanazs, M. Massignani, G. Battaglia, S.P. Armes, A.J. Ryan, *Tailoring Macromolecular Expression at Polymersome Surfaces*, Adv. Funct. Mater 2009, 19, 2906-2914.
69. A. Wittemann, T. Azzam, A. Eisenberg, *Biocompatible Polymer Vesicles from Biamphiphilic Triblock Copolymers and Their Interaction with Bovine Serum Albumin*, Langmuir 2007, 23, 2224-22.
70. X. Huang, P. Jain, I. El-Sayed, M. El-Sayed, *Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles*, Lasers Med. Sci. 2008, 23, 217-228.18
71. S. Jain, F.S. Bates, *Consequences of Nonergodicity in Aqueous Binary PEO-PB Micellar Dispersions*, Macromolecules 2004, 37, 1511-1523
72. Y.Y. Won, A.K. Brannan, H.T. Davis, F.S. Bates J., *Cryogenic Transmission Electron Microscopy (Cryo-TEM) of Micelles and Vesicles Formed in Water by Poly (ethylene oxide)-Based Block Copolymers*, Phys. Chem. B 2002, 106, 3354-3364.
73. Y.J. Kim, S. Choi, J.J. Koh, M. Lee, K.S. Ko, S.W. Kim, *Controlled release of insulin from injectable biodegradable triblock copolymer*, Pharma. Res. 2001, 18, 548-550
74. S. Pautot, B. J. Frisken, D. A. Weitz, *Production of Unilamellar Vesicles Using an Inverted Emulsion*, Langmuir 2003, 19, 2870.
75. F. Meng, C. Hiemstra, G.H.M Engbers, J. Feijen, *Biodegradable Polymersomes*, Macromolecules 2003, 36, 3004-6
76. S. H. Qin, Y. Geng, D. E. Discher, S. Yang, *Temperature-Controlled Assembly and Release from Polymer Vesicles of Poly (ethylene oxide)-block- poly(N-isopropylacrylamide)*, Adv. Mater. 2006, 18, 2905-2909.

77. Veena Pata, Fariyal Ahmed, Dennis E. Discher, Nily Dan, *Membrane Solubilization by Detergent: Resistance Conferred by Thickness*, Langmuir 2004, 20, 3888-3893
78. T. Ruysschaert, L. Paquereau, M. Winterhalter, D. Fournier, *Stabilization of liposomes through enzymatic polymerization of DNA*, Nano Lett. 2006, 6.
79. de Las Heras Alarcon C., Pennadam S, Alexander C., *Stimuli responsive polymers for biomedical applications*, Chem Soc Rev. 2005
80. Ahmed F, Pakunlu RI, Brannan A, Bates F, Minko T, Discher DE. *Biodegradable polymersomes loaded with both paclitaxel and doxorubicin permeate and shrink tumors, inducing apoptosis in proportion to accumulated drug*, Journal of Controlled Release 2006
81. Ahmed F, Discher DE. *Self-porating polymersomes of PEG-PLA and PEG- PCL: hydrolysis-triggered controlled release vesicles*, Journal of Controlled Release. 2004, 96,37– 53
82. Najafi F, Sarbolouki MN. *Biodegradable micelles/polymersomes from fumaric/sebacic acids and poly (ethylene glycol)*, Biomaterials. 2003, 24, 1175– 82.
83. F. Checot, J. Rodriguez-Hernandez, Y. Gnanou, S. Lecommandoux., *Responsive micelles and vesicles based on polypeptide diblock copolymers.*, Polym. Adv. Technol. 2006, 17, 782–785
84. Guang Wang, Xia Tong, and Yue Zhao, *Preparation of Azobenzene-Containing Amphiphilic Diblock Copolymers for Light-Responsive Micellar Aggregates*, Macromolecules 2004, 37 (24), pp 8911–8917
85. Elyes Mabrouk, Damien Cuvelier, Françoise Brochard-Wyart, Pierre Nassoy, Min-Hui Li, *Bursting of sensitive polymersomes induced by curling*, Proc Natl Acad Sci U S A. 2009,106(18),7294-8
86. Alcantar NA1, Aydil ES, Israelachvili JN., *Polyethylene glycol-coated biocompatible surfaces.*, J Biomed Mater Res. 2000, 50, 343-51.
87. P.J. Photos, L Bacakova, B. Discher, F.S. Bates, D.E. Discher, *Polymer vesicles in vivo: correlations with PEG molecular weight*, J Control Release 2003, 90, 323.
88. P.P. Ghoroghchian, J.J. Lin, A.K. Brannan, P.R. Frail, F.S. Bates, M.J. Therien, D.A. Hammer, *Quantitative membrane loading of polymer vesicles*, Soft Matter 2006, 2, 973-980
89. Z Cheng, A Tsourkas, *Paramagnetic porous polymersomes*, Langmuir, 2008
90. F. Ahmed, P.J. Photos, D.E. Discher, *Polymersomes as viral capsid mimics*, Drug Dev. Res. 2006, 67, 4-14

91. L. Zhang, A. Eisenberg, *Multiple Morphologies of "Crew-Cut" Aggregates of Polystyrene-*b*-poly (acrylic acid) Block Copolymers*, Science 1995, 268, 1728.
92. Robert M. Silverstein, Francis X. Webster, David J. Kiemle, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, Silverstein 2005, Edition 7,7, 306-322
93. Jones-Cortis B., *Gel Filtration of Organic Compounds*, Nature 1961, 191, 272.
94. Moore, J. C., Gel Permeation Chromatography. I. A New Method for Molecular Weight Distribution of High Polymers, J of Pol Sci: Part A: Polymer Chemistry 1964, 2, 835-843.
95. Hadjichristidis, N., Pispas, A. G. and Floudas., *Block Copolymers: Synthetic Strategies, Physical Properties and Applications*, John Wiley & Sons 2003, chapter 3.
96. Stuart, B., *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, Wiley, 2004
97. Sharon M. Kelly, Thomas J. Jess, Nicholas C. Price, *How to study proteins by circular dichroism*, Biochimica et Biophysica Acta 1751, 2005, 119 – 139
98. Χατζηχρηστίδης, Ν., Βύρας, Κ., Ιατρού, Ε., Πίσπας, Σ., Πιτσικάλης, Μ., Πίσσης, Π., *Μέθοδοι Χαρακτηρισμού Πολυμερών*, Αθήνα, 1998, 2,38
99. Zimm, J., *The Scattering of Light and the Radial Distribution Function of High Polymer Solutions*, J. Chem. Phys., 1948, 16, 1093
100. Hadjichristidis, N., Iatrou, H., Pispas, S. and Pitsikalis M., *Anionic Polymerization: High Vacuum Techniques*, J. Polym. Sci. Polym. Chem., 2000, 38, 3211
101. Juillard, J., Pure & Appl. Chem., 1977, 49, 855
102. Bisel P., Al-Momani L., Müller M., *The tert-butyl group in chemistry and biology*, Org Biomol Chem. 7, 6(15), 2655- 65.
103. Yi-Syuan Lu and Shiao-Wei Kuo, *Miscible polypeptide blends of polytyrosine and poly (γ-methyl L-glutamate) with rigid-rod conformations*, RSC Adv., 2015, 5, 88539
104. Hemmingsen JM, Gernert KM, Richardson JS, Richardson DC., *The tyrosine corner: a feature of most Greek key beta-barrel proteins*, Protein Sci. 1994, 11, 1927-37.
105. Provencher SW, Glöckner J., *Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism*, Biochemistry, 1981 Jan 6, 20(1), 33-7.
106. Micsonai A, Wien F, Kernya L, Lee YH, Goto Y, Réfrégiers M, Kardos J., *Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy*, Proc Natl Acad Sci U S A. 2015, 112(24), E3095-103.
107. Meier M, Seelig J., *Thermodynamics of the coil <=> beta-sheet transition in a membrane environment*, J Mol Biol. 2007 May 25, 369(1), 277-89.

108. Pastor, M. T., Lopez de la Paz, M., Lacroix, E., Serrano, L. and Perez-Paya, E., *Combinatorial approaches: A new tool to search for highly structured β -hairpin peptides*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 614–619.
109. Makwana, K.M., Mahalakshmi, R., *Circular Dichroism of Designed Peptide Helices and β -Hairpins: Analysis of Trp- and Tyr-Rich Peptides*, ChemBioChem 15, 2357-2360
110. Amit Jain and Henry S. Ashbaugh, *Helix Stabilization of Poly (ethylene glycol)–Peptide Conjugates*, Biomacromolecules, 2011, 2729–2734
111. Hamed E, Xu T, Keten S., *Poly (ethylene glycol) conjugation stabilizes the secondary structure of α -helices by reducing peptide solvent accessible surface area*, Biomacromol. 2013, 4053-60.
112. Guido W. M. Vandermeulen, Christos Tziatzios, and Harm-Anton Klok, *Reversible Self-Organization of Poly (ethylene glycol)-Based Hybrid Block Copolymers Mediated by a De Novo Four-Stranded α -Helical Coiled Coil Motif*, Macromol. 2003, 36, 4107-4114

