



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, Χαρακτηρισμός και Αυτο-Οργάνωση Αποκρινόμενων
Συμπολυμερών Πολυ(αιθυλενοξειδίου), Πολυ(ιστιδίνης) και
Πολυ(κυστεΐνης) για τον Εγκλωβισμό και την Ελεγχόμενη
Αποδέσμευση Φαρμάκων**

ΒΑΡΛΑΣ ΣΠΥΡΙΔΩΝ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2016

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Σύνθεση, Χαρακτηρισμός και Αυτο-Οργάνωση Αποκρινόμενων Συμπολυμερών
Πολυ(αιθυλενοξειδίου), Πολυ(ιστιδίνης) και Πολυ(κυστεΐνης) για τον Εγκλωβισμό και την
Ελεγχόμενη Αποδέσμευση Φαρμάκων

ΒΑΡΛΑΣ ΣΠΥΡΙΔΩΝ

Α.Μ.: 141011

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Ιατρού Ερμόλαος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ιατρού Ερμόλαος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Πιτσικάλης Μαρίνος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Σακελλαρίου Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 24/06/2016

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε σύνθεση μίας σειράς υβριδικών πολυπεπτιδικών συμπολυμερών βασισμένων στην πολυ(L-ιστιδίνη) (PHis) και την πολυ(L-κυστεΐνη) (PCys), τα οποία έχουν την ιδιότητα να αποκρίνονται σε εξωτερικά ερεθίσματα μεταβάλλοντας τη δομή τους. Η σύνθεση των πολυμερών επετεύχθη μέσω πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου σε ένα στάδιο των αντίστοιχων προστατευμένων N-καρβοξυ ανυδριτών (μονομερή), με χρήση αμινο-τελικού πολυ(αιθυλενοξειδίου) (mPEO-NH₂) ως μακροαπαρχητή. Για τη σύνθεση των N-καρβοξυ ανυδριτών των α-αμινοξέων, τον καθαρισμό των διαλυτών, αλλά και για τη λήψη καλά καθορισμένων πολυμερών, χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές υψηλού κενού, εξασφαλίζοντας υψηλή καθαρότητα στο σύστημα και απουσία προσμίξεων που θα οδηγούσαν σε μη ελεγχόμενες διαδικασίες πολυμερισμού. Αυτά τα αμφίφιλα συμπολυμερή του τύπου PEO-*b*-P(His-co-Cys) έχουν την ικανότητα να αυτο-οργανώνονται σε υδατικά διαλύματα και να σχηματίζουν μικκυλιακές δομές σε νανοκλίμακα. Το εξωτερικό υδρόφιλο κέλυφος των νανοδομών αποτελείται από τις αλυσίδες του PEO, ενώ ο pH-αποκρινόμενος πυρήνας αποτελείται από την PHis και την PCys. Η PCys χρησιμοποιήθηκε ως υδρόφοβο συστατικό, αλλά και ως μέσο δικτύωσης των αλυσίδων, σχηματίζοντας διαμοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς που προσδίδουν στις δομές επιπλέον σταθερότητα και αποκρισημότητα σε οξειδοαναγωγικούς παράγοντες. Μελετώντας την επίδραση διαφορετικών ποσοστών δικτύωσης καθώς και τη σχέση μεταξύ υδρόφιλου και υδρόφοβου τμήματος, είναι δυνατό να βρεθεί το βέλτιστο πολυμερικό σύστημα και να εξαχθούν χρήσιμα συμπεράσματα γι' αυτούς τους δυνητικούς νανοφορείς φαρμακευτικών ουσιών. Εκτενής μοριακός χαρακτηρισμός πραγματοποιήθηκε με σκοπό να επιβεβαιωθεί η επιτυχής σύνθεση των πολυμερών και των επιθυμητών νανοδομών. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε σύνθεση και χαρακτηρισμός μεσοπορώδων νανοσωματιδίων πυριτίας (MSNs) και επακόλουθη τροποποίηση της επιφάνειάς τους με το πολυμερές PEO2K-*b*-P(His-co-Cys25), μέσω της μεθόδου «εμβολιασμού σε». Απώτερος στόχος είναι η δημιουργία καινοτόμων υβριδικών συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων, που θα χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές στοχευμένης και ελεγχόμενης αποδέσμευσης στα καρκινικά κύτταρα.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Πολυμερή

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: πολυπεπτίδια, πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου, N-καρβοξυ ανυδρίτες, αποκρινόμενα πολυμερή, δικτυωμένα νανοσωματίδια

ABSTRACT

In the present research project the synthesis of a series of hybrid polypeptide copolymers based on poly(L-histidine) (PHis) and poly(L-cysteine) (PCys) was performed, that possess the ability to respond to external stimuli by altering their structure. The synthesis of polymers was achieved through a one-step ring-opening polymerization (ROP) process of the corresponding protected N-carboxy anhydrides (monomers), using an amine end-functionalized poly(ethylene oxide) (mPEO-NH₂) macroinitiator. High-vacuum techniques were used for the synthesis of N-carboxy anhydrides of α -amino acids, for the purification of solvents and for the isolation of well-defined polymers as well, ensuring the high purity of the system and the absence of impurities that would result in uncontrolled polymerization processes. These amphiphilic copolymers of the PEO-*b*-P(His-*co*-Cys) type possess the ability to self-assemble in aqueous media and form micelle-like nanostructures. The outer hydrophilic corona of the nanostructures was comprised of poly(ethylene oxide) chains, while the pH-responsive core was based on PHis and PCys. PCys was used as a hydrophobic component and as a cross-linking agent, forming intermolecular disulfide bonds that impart extra stability and redox-responsiveness to the structures. By studying the effect of different cross-linking percentages as well as the relationship between the hydrophilic and hydrophobic segments, it is possible to find the optimum polymeric system and draw useful conclusions about these potential drug nanocarriers. Extensive molecular characterization studies were conducted in order to confirm the successful synthesis of the polymers and the desired nanostructures. Also, the synthesis and characterization of mesoporous silica nanoparticles (MSNs) and the subsequent modification of their surface with the polymer PEO2K-*b*-P(His-*co*-Cys25) were performed, utilizing the “grafting to” approach. The ultimate goal is to create novel hybrid drug delivery systems, which will be used for targeted and controlled drug release applications to cancer cells.

SUBJECT AREA: Polymers

KEYWORDS: polypeptides, ring-opening polymerization, N-carboxy anhydrides, stimuli-responsive polymers, cross-linked nanoparticles

*“If we knew what it was we were doing,
it would not be called research, would it?”*

– Albert Einstein (1879-1955)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ολοκληρώνοντας τον κύκλο των Μεταπτυχιακών μου σπουδών, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην υλοποίηση της παρούσας ερευνητικής εργασίας. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον προσωπικό μου επιβλέποντα, Καθηγητή Ερμόλαο Ιατρού, για την πολύτιμη καθοδήγηση του καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο, αλλά και για την ανάθεση ενός τόσο ενδιαφέροντος και απαιτητικού θέματος. Η μύηση μου στον κόσμο των πολυμερών και ειδικότερα των πολυπεπτιδίων, οφείλεται σε τεράστιο βαθμό στον κ. Ιατρού. Τον ευχαριστώ επίσης για τη βοήθεια του και τις καίριες συμβουλές του στην αναζήτηση για συνέχιση των σπουδών μου σε Διδακτορικό επίπεδο. Ελπίζω η άριστη συνεργασία μας να συνεχιστεί για πολλά χρόνια ακόμα.

Ξεχωριστά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Μαρίνο Πιτσικάλη, για την άριστη διδασκαλία του στα μαθήματα του μεταπτυχιακού προγράμματος, για τις απίστευτες γνώσεις που μου παρείχε σε οποιοδήποτε πεδίο της Επιστήμης Πολυμερών, αλλά και τη συμβολή του, ώστε να διαλέξω την καλύτερη επιλογή για τις μελλοντικές μου σπουδές. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα γιατί πάντα διέθετε χρόνο και πάντα προσπαθούσε να με βοηθήσει σε κάθε απορία και πρόβλημα που εμφανιζόταν. Οι συζητήσεις μας σε επιστημονικό επίπεδο έκαναν ευχάριστη την καθημερινότητά μου. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Γεώργιο Σακελλαρίου, τόσο για την εξαιρετική διδασκαλία του στα μαθήματα του μεταπτυχιακού προγράμματος, όσο και τη βοήθεια και τις συμβουλές του κατά τη διάρκεια των σπουδών μου. Ο δικός του ιδιαίτερος τρόπος στο να διδάσκει, να παρουσιάζει και να μεταφέρει γνώσεις στους φοιτητές θα αποτελεί παράδειγμα προς μίμηση για μένα στο μέλλον.

Ειδική αναφορά θα ήθελα να κάνω στον πρώην Μεταδιδακτορικό Ερευνητή του Εργαστηρίου Πολυμερών του ΕΚΠΑ και νυν Ερευνητή του King Abdullah University of Science & Technology (KAUST), Δρ. Παναγιώτη Μπιλάλη. Τον ευχαριστώ θερμά για την άριστη συνεργασία μας, την υποστήριξη και τις γνώσεις που μου παρείχε σε πειραματικό και θεωρητικό επίπεδο. Τον ευχαριστώ επίσης για την αμέριστη βοήθεια του και για τις αμέτρητες ώρες συζητήσεων καθ' όλη τη διάρκεια της συνύπαρξής μας στο εργαστήριο. Ο Δρ. Μπιλάλης είναι ένας εξαιρετικός επιστήμονας και είναι εκείνος που με βοήθησε να διευρύνω τους ορίζοντες μου και να κατανοήσω σε βάθος την πραγματική έννοια της έρευνας. Η υλοποίηση της παρούσας εργασίας οφείλεται σε μεγάλο βαθμό και στη συνεισφορά του ίδιου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους συναδέλφους μου από την ερευνητική ομάδα του κ. Ιατρού αλλά και από το υπόλοιπο εργαστήριο για όλη τη βοήθεια τους και για το

άριστο κλίμα συνεργασίας που υπήρχε κατά την παρουσία μου στο εργαστήριο. Ευχαριστώ επίσης τον Μεταδιδάκτορα Δρ. Ιωάννη Χοινόπουλο για τη λήψη των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$, την Μεταδιδάκτορα του Τμήματος Φαρμακευτικής Δρ. Νατάσσα Πίππα και τον Καθηγητή Κωνσταντίνο Δεμέτζο για την παροχή του οργάνου ανάλυσης του ζ-δυναμικού και τους εργαστηριακούς υπεύθυνους του Τμήματος Γεωλογίας για τη λήψη των εικόνων SEM.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τη σύντροφό μου Δανάη για τη στήριξη τους, τις συμβουλές και την βοήθεια τους όλα τα χρόνια των σπουδών μου. Ξέρω ότι πάντα θα είναι δίπλα μου και θα προσπαθούν να λύσουν όλα τα προβλήματα και τις δυσκολίες που θα εμφανιστούν στη ζωή μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	6
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	14
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	17
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	19
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	20
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	21
2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	24
2.1. Αμινοξέα, Πεπτίδια και Πρωτεΐνες	24
2.2. Σύνθεση Πεπτιδίων Μικρού Μοριακού Βάρους με Καθορισμένη Αλληλουχία	28
2.3. Σύνθεση Πολυπεπτιδίων Μεγάλου Μοριακού Βάρους	30
2.3.1. Πολυμερισμός Διάνοιξης Δακτυλίου (Ring-Opening Polymerization, ROP)	30
2.3.2. Πολυμερισμός Διάνοιξης Δακτυλίου (ROP) των N-καβοξυ ανυδριτών (NCAs) των α-αμινοξέων	33
2.3.2.1. Κανονικός Μηχανισμός Αμινών (Normal Amine Mechanism, NAM)	34
2.3.2.2. Μηχανισμός του Blout	35
2.3.2.3. Μηχανισμός Ενεργοποιημένου Μονομερούς (Activated Monomer Mechanism, AMM)	37
2.3.2.4. Σύνθεση Πολυπεπτιδίων με Χρήση Συμπλόκων των Στοιχείων Μετάπτωσης	39
2.3.2.5. Σύνθεση Πολυπεπτιδίων με Χρήση Πρωτοταγών Αμινών και Τεχνικών Υψηλού Κενού	40
2.4. Σύνθεση N-Καβοξυ Ανυδριτών των α-Αμινοξέων (NCAs)	42
2.5. Νανοτεχνολογία και Στοχευμένη Μεταφορά Φαρμάκων	44
2.5.1. Νανοτεχνολογία και Εφαρμογές της	44
2.5.2. Στοχευμένη Μεταφορά Φαρμάκων μέσω Πολυμερικών Υλικών	46
2.6. Πολυπεπτιδικά Συστήματα Μεταφοράς Φαρμάκων Αποκρινόμενα σε Εξωτερικά Ερεθίσματα	49
2.6.1. pH-Αποκρινόμενα Πολυπεπτιδικά Συστήματα Μεταφοράς Φαρμάκων	51
2.6.2. Θερμο-Αποκρινόμενα Πολυπεπτιδικά Συστήματα Μεταφοράς Φαρμάκων	54
2.6.3. Πολυπεπτιδικά Συστήματα Μεταφοράς Φαρμάκων Αποκρινόμενα σε Οξειδοαναγωγικούς Παράγοντες	54

2.7. Μεσοπορώδη Νανοσωματίδια Πυριτίας και Εμβολιασμός τους με Πολυπεπτίδια	56
2.8. Τεχνικές Μοριακού Χαρακτηρισμού	59
2.8.1. Φασματοσκοπία Υπερύθρου (Infrared Spectroscopy, IR)	60
2.8.2. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR)	62
2.8.3. Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών (Size Exclusion Chromatography, SEC)	65
2.8.4. Ζ-Δυναμικό (Zeta Potential).....	68
2.8.5. Θερμοσταθμική Ανάλυση (Thermogravimetric Analysis, TGA)	70
2.8.6. Κυκλικός Διχρωϊσμός (Circular Dichroism, CD)	71
2.8.7. Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM).....	73
2.8.8. Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διαπερατότητας (Transmission Electron Microscopy, TEM)	75
2.8.9. Ποροσιμετρία (Porosimetry)	75
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	77
3.1. Τεχνικές Υψηλού Κενού (High-Vacuum Techniques, HVT)	77
3.2. Καθαρισμός Διαλυτών.....	79
3.3. Καθαρισμός Απαρχητών και Αντιδραστηρίων	83
3.4. Σύνθεση και Καθαρισμός Μονομερών (N-Καρβοξυ Ανυδριτών)	85
3.4.1. Σύνθεση και Καθαρισμός του N-Carboxy Anhydride της $N_{(im)}$ -Trityl-L-Histidine ($N_{(im)}$ -Trt-His NCA).....	85
3.4.2. Σύνθεση και Καθαρισμός του N-Carboxy Anhydride της S-tert-Butylmercapto-L-Cysteine (tBMLC NCA)	89
3.4.3. Σύνθεση και Καθαρισμός του N-Carboxy Anhydride του γ -Benzyl-L-Glutamate (BLG NCA).....	91
3.5. Σύνθεση Γραμμικών Ομοπολυπεπτιδίων	93
3.5.1. Σύνθεση του Ομοπολυμερούς Poly(S-tert-Butylmercapto-L-Cysteine) (PtBMLC)	93
3.5.2. Αποπροστασία του Ομοπολυμερούς Poly(S-tert-Butylmercapto-L-Cysteine) (PtBMLC) για την Σύνθεση της Poly(L-Cysteine) (PCys)	96
3.5.3. Σύνθεση του Ομοπολυμερούς Poly(γ -Benzyl-L-Glutamate) (PBLG) με Ακραία Ομάδα Αλκινίου	97
3.6. Σύνθεση Υβριδικών Κατά Συστάδες Συμπολυμερών του Τύπου Poly(Ethylene Oxide)- <i>b</i> -Poly(L-Histidine-co-L-Cysteine) (PEO- <i>b</i> -P(His-co-Cys)).....	99
3.6.1. Σύνθεση Προστατευμένων Συμπολυμερών PEO- <i>b</i> -P(Trt-His-co-tBMLC) με Χρήση mPEO-NH ₂ ως Μακροαπαρχητή	100

3.6.2. Εκλεκτική Αποπροστασία των Δομικών Μονάδων της Πολυ(Ιστιδίνης) (PHis) ..	104
3.6.3. Εκλεκτική Αποπροστασία των Δομικών Μονάδων της Πολυ(Κυστεΐνης) (PCys)	107
3.7. Αυτο-οργάνωση και Δικτύωση των Υβριδικών Συμπολυμερών του Τύπου PEO- <i>b</i> -P(His-co-Cys) για τη Δημιουργία Υπερμοριακών Δομών.....	109
3.8. Σύνθεση Μεσοπορώδων Νανοσωματιδίων Πυριτίας και Εμβολιασμός τους με Πολυμερή.....	109
3.8.1. Σύνθεση Μεσοπορώδων Νανοσωματιδίων Πυριτίας (Mesoporous Silica Nanoparticles, MSNs)	110
3.8.2. Τροποποίηση της Επιφάνειας των Μεσοπορώδων Νανοσωματιδίων Πυριτίας με Εποξειδικούς Δακτυλίους (MSN@GPTMS)	111
3.8.3. Εμβολιασμός του Υβριδικού Πολυμερούς PEO2K- <i>b</i> -P(Trt-His-co-tBMLC25) σε Μεσοπορώδη Νανοσωματίδια Πυριτίας (MSN@PEO2K-PCys25).....	112
3.9. Οργανολογία Μοριακού Χαρακτηρισμού Πολυμερών και Νανοσωματιδίων	113
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	115
4.1. Σύνθεση των N-Καρβοξυ Ανυδριτών των α -Αμινοξέων (NCAs).....	115
4.1.1. Σύνθεση του $N_{(im)}$ -Trt-His NCA.....	115
4.1.2. Σύνθεση του tBMLC NCA.....	117
4.1.3. Σύνθεση του BLG NCA	120
4.2. Σύνθεση Γραμμικών Ομοπολυπεπτιδίων	122
4.2.1. Σύνθεση και Αποπροστασία του Ομοπολυμερούς PtBMLC για την Σύνθεση της PCys.....	122
4.2.2. Σύνθεση του Ομοπολυμερούς PBLG με Ακραία Ομάδα Αλκινίου	126
4.3. Σύνθεση και Αυτο-Οργάνωση Αποκρινόμενων Υβριδικών Συμπολυμερών PEO- <i>b</i> -P(His-co-Cys)	128
4.4. Σύνθεση MSNs και Εμβολιασμός τους με Πολυπεπτιδικά Πολυμερή	138
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ	145
6. ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	147
7. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	149
8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	152
9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	159

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 2.1: Αντίδραση πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου (ROP) των NCAs.....	33
Σχήμα 2.2: Στάδια έναρξης και διάδοσης του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβοξυ ανυδριτών μέσω του κανονικού μηχανισμού αμινών (NAM).....	34
Σχήμα 2.3: Αντίδραση τερματισμού κατόπιν προσβολής του καρβονυλίου στη θέση 2' από τον απαρχητή	35
Σχήμα 2.4: Στάδια έναρξης και διάδοσης σύμφωνα με τον μηχανισμό κατά Blout	36
Σχήμα 2.5: Στάδια ενεργοποίησης και έναρξης του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβοξυ ανυδριτών μέσω του μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς (AMM)	37
Σχήμα 2.6: Στάδιο διάδοσης του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβοξυ ανυδριτών μέσω του μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς (AMM)	38
Σχήμα 2.7: Προτεινόμενος μηχανισμός για τον πολυμερισμό των NCAs με χρήση συμπλόκων των στοιχείων μεταπτώσεως.....	40
Σχήμα 2.8: Μέθοδοι “Leuchs” και “Fuchs-Farthing” για τη σύνθεση των N-καρβοξυ ανυδριτών	43
Σχήμα 2.9: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης SEC	66
Σχήμα 2.10: Ισόθερμες καμπύλες προσρόφησης για διάφορα είδη πορώδων υλικών.....	76
Σχήμα 3.1: Σχηματική αναπαράσταση της γραμμής υψηλού κενού (HVL)	78
Σχήμα 3.2: Σχηματική αναπαράσταση της αντλίας διαχύσεως υδραργύρου	78
Σχήμα 3.3: Αντίδραση υδρόλυσης του DMF προς DMA και φορμικό οξύ.....	80
Σχήμα 3.4: Σχηματική αναπαράσταση συσκευής για την παραλαβή ενώσεων χαμηλού σημείου ζέσεως.....	83
Σχήμα 3.5: Σχηματική αναπαράσταση συσκευής αραίωσης απαρχητή.....	84
Σχήμα 3.6: Αντιδράσεις σύνθεσης του $N_{(im)}$ -Trt-His NCA	89
Σχήμα 3.7: Αντίδραση σύνθεσης του tBMLC NCA	91
Σχήμα 3.8: Αντίδραση σύνθεσης του BLG NCA.....	93
Σχήμα 3.9: Πορεία αντιδράσεων πολυμερισμού και αποπροστασίας του ομοπολυμερούς PtBMLC για τη σύνθεση της PCys	97
Σχήμα 3.10: Αντίδραση πολυμερισμού του PBLG με χρήση απαρχητή PAA	99
Σχήμα 3.11: Αντίδραση χημικής τροποποίησης του mPEO-OH σε mPEO-NH ₂	100
Σχήμα 3.12: Αντίδραση πολυμερισμού του PEO- <i>b</i> -P(Trt-His-co-tBMLC) με χρήση μακροαπαρχητή mPEO-NH ₂	103

Σχήμα 3.13: Αντίδραση εκλεκτικής αποπροστασίας των δομικών μονάδων της PHis στα πολυμερή του τύπου PEO- <i>b</i> -P(Trt-His-co-tBMLC)	107
Σχήμα 3.14: Αντίδραση εκλεκτικής αποπροστασίας των δομικών μονάδων της PCys για τη σύνθεση συμπολυμερών του τύπου PEO- <i>b</i> -P(His-co-Cys)	108
Σχήμα 3.15: Αντιδράσεις συμπύκνωσης που πραγματοποιούνται κατά τη σύνθεση νανοσωματιδίων πυριτίας (MSNs)	110
Σχήμα 3.16: Πειραματική πορεία σύνθεσης mesoporous silica nanoparticles με εποξειδικούς δακτυλίους στην επιφάνεια τους (MSN@GPTMS)	112
Σχήμα 3.17: Διαδικασία σύνθεσης εμβολιασμένων νανοσωματιδίων MSN@(PEO2K-PCys25) μέσω αντίδρασης “grafting to”	113
Σχήμα 4.1: Φάσμα IR (a) της πρόδρομης ένωσης BOC-His(Trt)-OH, (b) μετά από 2.5 ώρες αντίδρασης και (c) του τελικού προϊόντος $N_{(im)}$ -Trt-His NCA μετά τις ανακρυσταλλώσεις.....	116
Σχήμα 4.2: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του $N_{(im)}$ -Trt-His NCA, σε CDCl_3	117
Σχήμα 4.3: Φάσμα IR (a) της πρόδρομης ένωσης H-Cys(StBu)-OH και (b) του τελικού προϊόντος tBMLC NCA	118
Σχήμα 4.4: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του tBMLC NCA, σε CDCl_3	119
Σχήμα 4.5: Φάσμα IR (a) της πρόδρομης ένωσης H-Glu(OBzl)-OH και (b) του τελικού προϊόντος BLG NCA μετά τις ανακρυσταλλώσεις	121
Σχήμα 4.6: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του BLG NCA, σε CDCl_3	121
Σχήμα 4.7: Φάσμα IR (a) της σύνθεσης της PtBMLC μετά από 2 ημέρες αντίδρασης, (b) της σύνθεσης της PtBMLC μετά από 4 ημέρες αντίδρασης, (c) του τελικού προστατευμένου ομοπολυμερούς PtBMLC και (d) της PCys μετά την αντίδραση αποπροστασίας.....	123
Σχήμα 4.8: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του προστατευμένου πολυμερούς PtBMLC, σε CDCl_3	124
Σχήμα 4.9: Μηχανισμός αντίδρασης αποπροστασίας του προστατευμένου ομοπολυμερούς PtBMLC με χρήση DTT για τη λήψη της PCys.....	125
Σχήμα 4.10: Διάγραμμα TGA του προστατευμένου ομοπολυμερούς της PCys.....	125
Σχήμα 4.11: Φάσμα IR (a) του αρχικού BLG NCA και (b) του τελικού ομοπολυμερούς PBLG με ακραίο τριπλό δεσμό.....	127
Σχήμα 4.12: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του ομοπολυμερούς PBLG με ακραίο τριπλό δεσμό, σε CDCl_3	127
Σχήμα 4.13: Φάσμα IR (a) του πλήρως προστατευμένου πολυμερούς PEO5K- <i>b</i> -P(His-co-Cys25), (b) μετά την εκλεκτική αποπροστασία της PHis και (c) μετά την πλήρη αποπροστασία του.....	129
Σχήμα 4.14: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του προστατευμένου πολυμερούς PEO5K- <i>b</i> -P(His-co-Cys25), σε TFA-d	130

Σχήμα 4.15: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του πολυμερούς PEO5K- <i>b</i> -P(His-co-Cys25) μετά την αποπροστασία της PHis, σε TFA-d	131
Σχήμα 4.16: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του πλήρως αποπροστατευμένου πολυμερούς PEO5K- <i>b</i> -P(His-co-Cys25), σε TFA-d.....	131
Σχήμα 4.17: Χρωματογράφημα SEC του μακροαπαρχητή PEO5K-NH ₂ και του συμπολυμερούς PEO5K- <i>b</i> -P(His-co-Cys25)	132
Σχήμα 4.18: Χαρακτηριστικές αντιδράσεις απόκρισης πολυπεπτιδίων που περιέχουν δισουλφιδικούς δεσμούς σε οξειδοαναγωγικά αντιδραστήρια.....	134
Σχήμα 4.19: Χρωματογράφημα SEC των νανοσωματιδίων μετά την αντίδραση δικτύωσης του PEO5K- <i>b</i> -P(His-co-Cys25) με χρήση H ₂ O ₂	134
Σχήμα 4.20: Διάγραμμα TGA (A) της απώλειας βάρους του πολυμερούς PEO5K- <i>b</i> -P(His-co-Cys25) συναρτήσει της θερμοκρασίας και (B) της πρώτης παραγώγου του βάρους ως προς τη θερμοκρασία, πριν και μετά την αποπροστασία του	135
Σχήμα 4.21: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού (CD) του PEO5K- <i>b</i> -P(His-co-Cys25) συναρτήσει του pH.....	136
Σχήμα 4.22: Μετρήσεις ζ-δυναμικού των ναμοδομών που σχηματίστηκαν από τα αντίστοιχα υβριδικά συμπολυμερή του τύπου PEO- <i>b</i> -P(His-co-Cys), συναρτήσει της μεταβολής του pH.....	138
Σχήμα 4.23: Μηχανισμός αντίδρασης πυρηνόφιλης προσβολής μεταξύ των εποξειδικών δακτυλίων των MSNs και της ακραίας αμινομάδας του πολυμερούς.....	139
Σχήμα 4.24: Φάσμα IR των MSNs (a) πριν την εκδίωξη του CTAB, (b) μετά την εκδίωξη του CTAB, (c) μετά την τροποποίηση της επιφάνειάς τους με εποξειδικούς δακτυλίους (MSN@GPTMS) και (d) μετά τον εμβολιασμό τους με το πολυμερές PEO2K- <i>b</i> -P(His-co-PCys25)	140
Σχήμα 4.25: (A) Ισόθερμες καμπύλες προσρόφησης-εκρόφησης αερίου N ₂ των MSNs και (B) προσδιορισμός της κατανομής μεγέθους των πόρων	142
Σχήμα 4.26: Καμπύλες απώλειας βάρους των δειγμάτων MSN, MSN@GPTMS και MSN@PEO2K- <i>b</i> -P(His-co-Cys25) συναρτήσει της θερμοκρασίας	143
Σχήμα 4.27: Μετρήσεις ζ-δυναμικού των δειγμάτων MSN, MSN@GPTMS και MSN@PEO2K- <i>b</i> -P(His-co-Cys25), συναρτήσει του pH.....	144

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1: Σχηματισμός και δομικές μεταβάσεις των pH- και redox-αποκρινόμενων δικτυωμένων μικκυλίων της παρούσας εργασίας.....	22
Εικόνα 1.2: Σχηματική αναπαράσταση των διαδικασιών εγκλωβισμού και ενδοκυτταρικής απελευθέρωσης υδρόφοβων φαρμάκων μέσω πολλαπλά αποκρινόμενων πολυπεπτιδικών νανοφορέων	23
Εικόνα 2.1: Η δομή ενός α-αμινοξέος	24
Εικόνα 2.2: Τα είκοσι βασικά αμινοξέα που συντελούν τις πρωτεΐνες.....	25
Εικόνα 2.3: Η δημιουργία ενός πεπτιδικού δεσμού.....	26
Εικόνα 2.4: Σχηματική αναπαράσταση της δομής της α-έλικας και της β-πτυχωτής επιφάνειας.....	27
Εικόνα 2.5: Χαρακτηριστικοί NCAs διάφορων αμινοξέων που έχουν συντεθεί εργαστηριακά	44
Εικόνα 2.6: Χαρακτηριστικά μεγέθη μορίων, νανοϋλικών και βιολογικών οντοτήτων	45
Εικόνα 2.7: Κυριότεροι νανοφορείς φαρμακευτικών ουσιών βασισμένοι σε πολυμερικά υλικά και ανόργανα νανοσωματίδια	48
Εικόνα 2.8: Τα κυριότερα εξωτερικά ερεθίσματα που προκαλούν απόκριση στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες.....	51
Εικόνα 2.9: Ο ιοντισμός του ιμιδαζολικού δακτυλίου της πολυ(L-ιστιδίνης)	53
Εικόνα 2.10: Τρόπος λειτουργίας της αντλίας πρωτονίων κατά την είσοδο πολυμερούς στα ενδοσώματα ("proton sponge effect")	53
Εικόνα 2.11: Α) Δομή της γλουταθειόνης (GSH) και Β) αντιδράσεις οξείδωσης και αναγωγής των δομικών μονάδων πολυ(L-κυστεΐνης).....	56
Εικόνα 2.12: Τυπική αντίδραση σχηματισμού των MSNs (εδώ MCM-41) μέσω διαδικασίας sol-gel	57
Εικόνα 2.13: Μέθοδοι τροποποίησης της επιφάνειας των MSNs με πολυπεπτίδια μέσω "εμβολιασμού από" ή "εμβολιασμού σε"	59
Εικόνα 2.14: Χαρακτηριστικές δονήσεις τάσης και κάμψης των δεσμών ενός μορίου.....	60
Εικόνα 2.15: Διαχωρισμός μακρομορίων διαφορετικού υδροδυναμικού όγκου	67
Εικόνα 2.16: Το δυναμικό των νανοσωματιδίων συναρτήσει της απόστασης από την επιφάνεια τους	69
Εικόνα 2.17: Σχηματική αναπαράσταση του εσωτερικού ενός θερμοζυγού σε όργανο TGA.....	70
Εικόνα 2.18: Το ελλειπτικά πολωμένο φως (βιολετί) προέρχεται από την άνιση απορρόφηση του δεξιά (μπλε) και αριστερά (κόκκινο) κυκλικά πολωμένου φωτός.....	72

Εικόνα 2.19: Απορροφήσεις των τριών συνηθέστερων διαμορφώσεων μίας πολυπεπτιδικής αλυσίδας	73
Εικόνα 3.1: Διάλυμα της BOC-His(Trt)-OH σε THF πριν την προσθήκη του SOCl ₂ (αριστερά) και μετά από 2.5 ώρες αντίδρασης με SOCl ₂ (δεξιά).....	86
Εικόνα 3.2: Διάλυμα υδροχλωρικού άλατος του N _(im) -Trt-His NCA πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) την προσθήκη του διαλύματος της Et ₃ N	88
Εικόνα 3.3: Διάλυμα της H-Cys(StBu)-OH σε EtOAc πριν την προσθήκη τριφωσγενίου (αριστερά) και μετά από δύο ώρες αντίδρασης προς σχηματισμό του tBMLC NCA (δεξιά)	90
Εικόνα 3.4: Συσκευή πολυμερισμού για τη σύνθεση ομοπολυπεπτιδίων	94
Εικόνα 3.5: Πορεία του πολυμερισμού της PtBMLC με απαρχητή DMA μετά από (Α) 1 ημέρα, (Β) 2 ημέρες, (Γ) 3 ημέρες και (Δ) 5 ημέρες αντίστοιχα.....	95
Εικόνα 3.6: Πορεία του πολυμερισμού του υβριδικού συμπολυμερούς PEO- <i>b</i> -P(Trt-His-co-tBMLC) μετά από (Α) 1 ημέρα, (Β) 2 ημέρες, (Γ) 4 ημέρες και (Δ) 6 ημέρες αντίστοιχα.....	102
Εικόνα 3.7: Διάλυμα του πολυμερούς PEO- <i>b</i> -P(Trt-His-co-tBMLC) σε TFA πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) την προσθήκη ποσότητας (iPr) ₃ SiH αντίστοιχα	105
Εικόνα 3.8: Διαδικασία dialysis για την καθαρισμό του πολυμερούς από τις προστατευτικές τριτυλο-ομάδες	106
Εικόνα 3.9: Αιώρημα MSNs (Α) πριν και (Β) μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης απομάκρυνσης του CTAB	111
Εικόνα 4.1: (Α) Εικόνα SEM των μη τροποποιημένων MSNs και (Β) εικόνα TEM των μη τροποποιημένων MSNs (η γραμμή κλίμακας αντιστοιχεί σε 50 nm)	141

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 2.1: Σχετικές συχνότητες εμφάνισης καταλοίπων αμινοξέων στη δευτεροταγή δομή των πολυπεπτιδικών αλυσίδων	28
Πίνακας 2.2: Χαρακτηριστικές ομάδες κυκλικών μονομερών και ο συνήθης μηχανισμός πολυμερισμού ROP για κάθε κατηγορία	32
Πίνακας 2.3: Περιοχές απορρόφησης χαρακτηριστικών λειτουργικών ομάδων σε cm^{-1}	62
Πίνακας 2.4: Χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις στη φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ (ppm)	64
Πίνακας 3.1: Πειραματικά δεδομένα για τη σύνθεση των προστατευμένων υβριδικών συμπολυμερών $\text{PEO-}b\text{-P(Trt-His-co-tBMLC)}$	104
Πίνακας 4.1: Ποσότητες των συμπολυμερών μετά από κάθε συνθετικό βήμα και μοριακά χαρακτηριστικά τους όπως προκύπτουν από την SEC	133
Πίνακας 4.2: Πειραματικά αποτελέσματα της ανάλυσης ζ-δυναμικού των δομών που προκύπτουν από την αυτο-οργάνωση και δικτύωση των πολυμερών $\text{PEO-}b\text{-P(His-co-Cys)}$	137
Πίνακας 4.3: Πειραματικά αποτελέσματα της ανάλυσης ζ-δυναμικού των MSNs και των παραγώγων τους	144
Πίνακας Α: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων	147
Πίνακας Β: Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους	149

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία διπλώματος ειδίκευσης πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιομηχανικής Χημείας (Τομέας Επιστήμης Πολυμερών) του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Ερμόλαου Ιατρού. Αντικείμενο της συγκεκριμένης εργασίας είναι η σύνθεση αποκρινόμενων πολυπεπτιδικών πολυμερών και η μελέτη της αυτο-οργάνωσης τους σε υδατικά διαλύματα, με απώτερο σκοπό να αποτελέσουν έξυπνα νανοσυστήματα για την μεταφορά και την ελεγχόμενη αποδέσμευση φαρμακευτικών ουσιών στον ανθρώπινο οργανισμό. Το παρόν ερευνητικό θέμα είναι εξαιρετικά ελπιδοφόρο και προσφέρεται ως εναρκτήρια μελέτη για περαιτέρω διερεύνηση στο πεδίο των πολυπεπτιδικών νανοφορέων που αποκρίνονται σε μεταβολές των εξωτερικών ερεθισμάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τις προηγούμενες δεκαετίες έχει παρατηρηθεί τεράστια ανάπτυξη στη χημεία των πεπτιδίων σε σχέση όχι μόνο με την απομόνωση, σύνθεση, ταυτοποίηση δομής και διαλεύκανση του τρόπου δράσης τους, αλλά επίσης και στην εφαρμογή τους ως εργαλεία στο πλαίσιο των επιστημών υγείας. Τα πεπτίδια παρουσιάζουν ενδιαφέρον όχι μόνο στη βιοχημεία, αλλά και στη βιολογία, τη φαρμακευτική χημεία, τη βιοτεχνολογία και γονιδιακή τεχνολογία.^{1,2}

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον αναπτύσσεται επίσης, τόσο σε ακαδημαϊκό όσο και σε βιομηχανικό επίπεδο, για την παρασκευή βιοσυμβατών και βιοδιασπώμενων πολυμερών. Τα πολυπεπτίδια, είναι από τα κυριότερα πολυμερή αυτής της κατηγορίας, και πλήθος ερευνών έχουν διενεργηθεί πάνω στην σύνθεση, την διαμόρφωση και τις ιδιότητες τους. Το γεγονός αυτό δεν είναι τυχαίο, αν αναλογιστεί κανείς ότι οι πρωτεΐνες είναι τα πιο διαδεδομένα πολυμερή στη φύση, με την εξαιρετική ικανότητα που διαθέτουν, να οργανώνονται σε περίπλοκες τρισδιάστατες δομές.

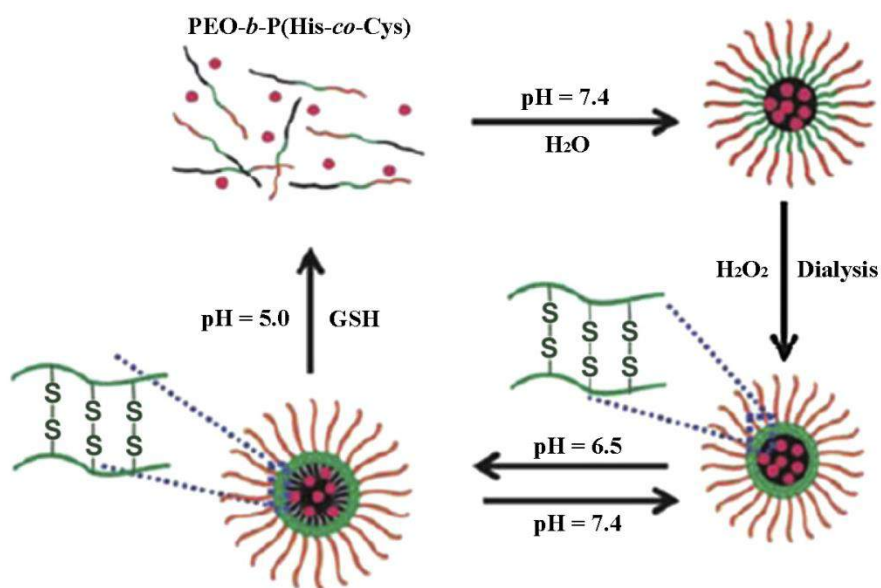
Από την δεκαετία κιόλας του 50', αναπτυχθήκαν πολλές μέθοδοι για την σύνθεση πεπτιδίων. Όμως μέχρι και σήμερα, η αποδοτικότερη, γρηγορότερη και οικονομικότερη τεχνική για την σύνθεση καλά καθορισμένων πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους χωρίς συγκεκριμένη αλληλουχία, περιλαμβάνει τον πολυμερισμό μέσω διάνοιξης δακτυλίου (ring-opening polymerization, ROP) των N-καρβοξυ-ανυδριτών των α -αμινοξέων (N-carboxy anhydrides, NCAs), μέθοδος που αναπτύσσεται λεπτομερώς στο Κεφάλαιο 2.3.³ Η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόστηκε για τη σύνθεση των γραμμικών ομοπολυπεπτιδίων (linear homopolymers) και των υβριδικών δισυσταδικών συμπολυμερών (diblock copolymers) του γενικού τύπου PEO-*b*-P(His-co-Cys) που μελετήθηκαν στο συγκεκριμένο πόνημα, αφού πρώτα συντέθηκαν εργαστηριακά οι αντίστοιχοι NCAs.

Τα αμφίφιλα κατά συστάδες συμπολυμερή, μπορούν να σχηματίσουν συσσωματώματα σε υδατικά διαλύματα, και να οργανωθούν σε μικκύλια, διπλοστιβάδες και κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, ακόμα και κυστίδια ανάλογα με το μέγεθος του υδρόφοβου και υδρόφιλου τμήματός τους. Έτσι, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πολυμερικοί νανοφορείς που έχουν την ικανότητα να διαλυτοποιούν υδρόφοβα φάρμακα (π.χ. everolimus, paclitaxel, doxorubicin), αυξάνοντας τον χρόνο κυκλοφορίας τους στο αίμα και οδηγώντας σε υψηλότερες συγκεντρώσεις φαρμάκου στον οργανισμό (Κεφάλαιο 2.5).^{4,5}

Σε αυτό το ερευνητικό πλαίσιο κινείται και το αντικείμενο της παρούσας ερευνητικής εργασίας διπλώματος ειδίκευσης, κατά τη διάρκεια της οποίας πραγματοποιήθηκε σύνθεση μίας

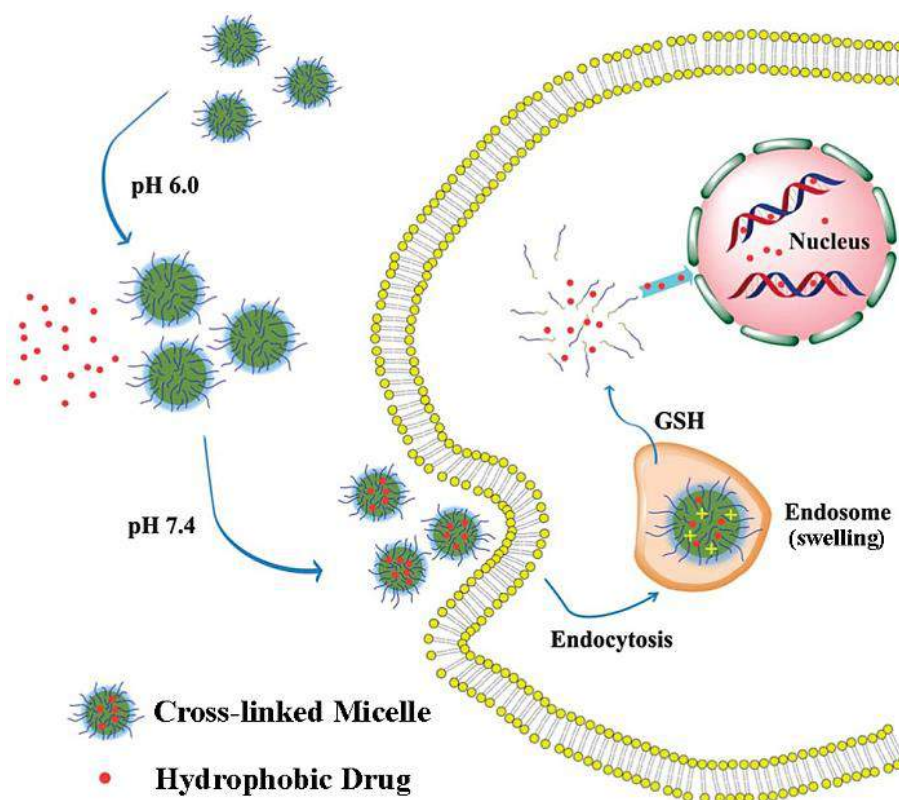
οικογένειας υβριδικών πολυμερών PEO-*b*-P(His-co-Cys), τα οποία στη συνέχεια αυτο-οργανώθηκαν προς το σχηματισμό ανώτερων δικτυωμένων υπερμοριακών δομών. Σε δεύτερο στάδιο, μελετήθηκε η διαδικασία της συσσωμάτωσης τους και η ικανότητά τους να αποκρίνονται σε εξωτερικά ερεθίσματα, μέσω των πειραματικών αποτελεσμάτων που προέκυψαν από μετρήσεις μοριακού χαρακτηρισμού (Κεφάλαια 3 και 4), καταλήγοντας σε συμπεράσματα σχετικά με το βέλτιστο πολυμερικό σύστημα που πρέπει να επιλεγεί έναντι των υπολοίπων, για περαιτέρω ανάπτυξη και μελέτη του ως νανοφορέα ουσιών με φαρμακευτικό ενδιαφέρον. Τέλος, τα πολυμερή αυτά εμβολιάστηκαν επιτυχώς σε νανοσωματίδια πυριτίας για την δημιουργία «έξυπνων» νανοςύνθετων υλικών για βιοϊατρικές εφαρμογές.

Ειδικότερα, το PEO αποτέλεσε το εξωτερικό υδρόφιλο τμήμα των νανοδομών, καθώς είναι βιοαποικοδομήσιμο και βιοσυμβατό πολυμερές, ενώ επιπλέον δεν αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες του ορού του αίματος, που θα το αναγνώριζαν ως αντιγόνο, προσδίδοντας “stealth” ιδιότητες στο σύστημα. Αντίστοιχα, ο δικτυωμένος πολυπεπτιδικός πυρήνας των νανοσωματιδίων αποτελείται από την πολυ(L-ιστιδίνη), που επιλέχθηκε με σκοπό να καταστήσει το σύστημα pH-αποκρινόμενο στην περιοχή pH=5.0-6.5, δηλαδή στο εύρος pH που διαθέτουν τα καρκινικά κύτταρα. Εξαιτίας, του ιμιδαζολικού δακτυλίου του μορίου, μπορεί να πρωτονιώνεται ή όχι ανάλογα με το pH του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκεται. Η δικτύωση του πυρήνα επετεύχθη μέσω πολυμερισμού του κατάλληλα προστατευμένου NCA της L-κυστεΐνης, και προσέδωσε στο σύστημα την ικανότητα απόκρισης σε οξειδοαναγωγικούς παράγοντες, όπως η γλουταθειόνη (GSH), λόγω της δημιουργίας δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των αλυσίδων (Εικόνα 1.1).⁶



Εικόνα 1.1: Σχηματισμός και δομικές μεταβάσεις των pH- και redox-αποκρινόμενων δικτυωμένων μικκυλίων της παρούσας εργασίας

Όπως γίνεται σαφές, απώτερος σκοπός της ερευνητικής ομάδας του επιβλέποντος της παρούσας εργασίας κ. Ιατρού, είναι η στοχευμένη εναπόθεση φαρμάκων μέσω αυτών των πολλαπλά αποκρινόμενων νανομεταφορέων σε καρκινικούς στόχους, βασιζόμενοι στο γεγονός ότι στην περιοχή κοντά στα καρκινικά κύτταρα το pH είναι χαμηλότερο του φυσιολογικού και η συγκέντρωση γλουταθειόνης (GSH) αρκετά υψηλότερη (Εικόνα 1.2), βελτιώνοντας σημαντικά την ποιότητα ζωής του ασθενούς. Με αυτό τον τρόπο εισάγεται μία πρωτότυπη ιδέα στον τομέα των Βιοπολυμερών και της Νανοϊατρικής, η οποία μπορεί να αναπτυχθεί με περεταίρω έρευνα, οδηγώντας σε ελπιδοφόρα αποτελέσματα ικανά να δώσουν τέλος στη μάστιγα του καρκίνου.⁷



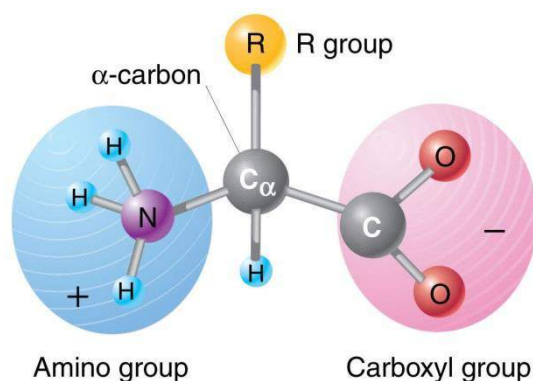
Εικόνα 1.2: Σχηματική αναπαράσταση των διαδικασιών εγκλωβισμού και ενδοκυτταρικής απελευθέρωσης υδρόφοβων φαρμάκων μέσω πολλαπλά αποκρινόμενων πολυπεπτιδικών νανοφορέων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. Αμινοξέα, Πεπτίδια και Πρωτεΐνες

Τα αμινοξέα είναι οι δομικές μονάδες των πρωτεϊνών και των πολυπεπτιδίων. Ένα α -αμινοξύ αποτελείται από ένα κεντρικό άτομο άνθρακα, συνδεδεμένο με μία αμινομάδα, μία καρβοξυλική ομάδα, ένα άτομο υδρογόνου και μία χαρακτηριστική για το κάθε αμινοξύ πλευρική ομάδα R (Εικόνα 2.1). Λόγω των τεσσάρων διαφορετικών ομάδων που είναι συνδεδεμένες με το άτομο του α -άνθρακα, τα α -αμινοξέα είναι χειρόμορφα με αποτέλεσμα να σχηματίζονται δυο κατοπτρικά είδωλα που ονομάζονται D- και L-ισομερή. Μάλιστα μόνο τα L-αμινοξέα απαντούν στις πρωτεΐνες, ενώ για όλα σχεδόν τα αμινοξέα, το L-ισομερές έχει διαμόρφωση S και όχι R.⁸

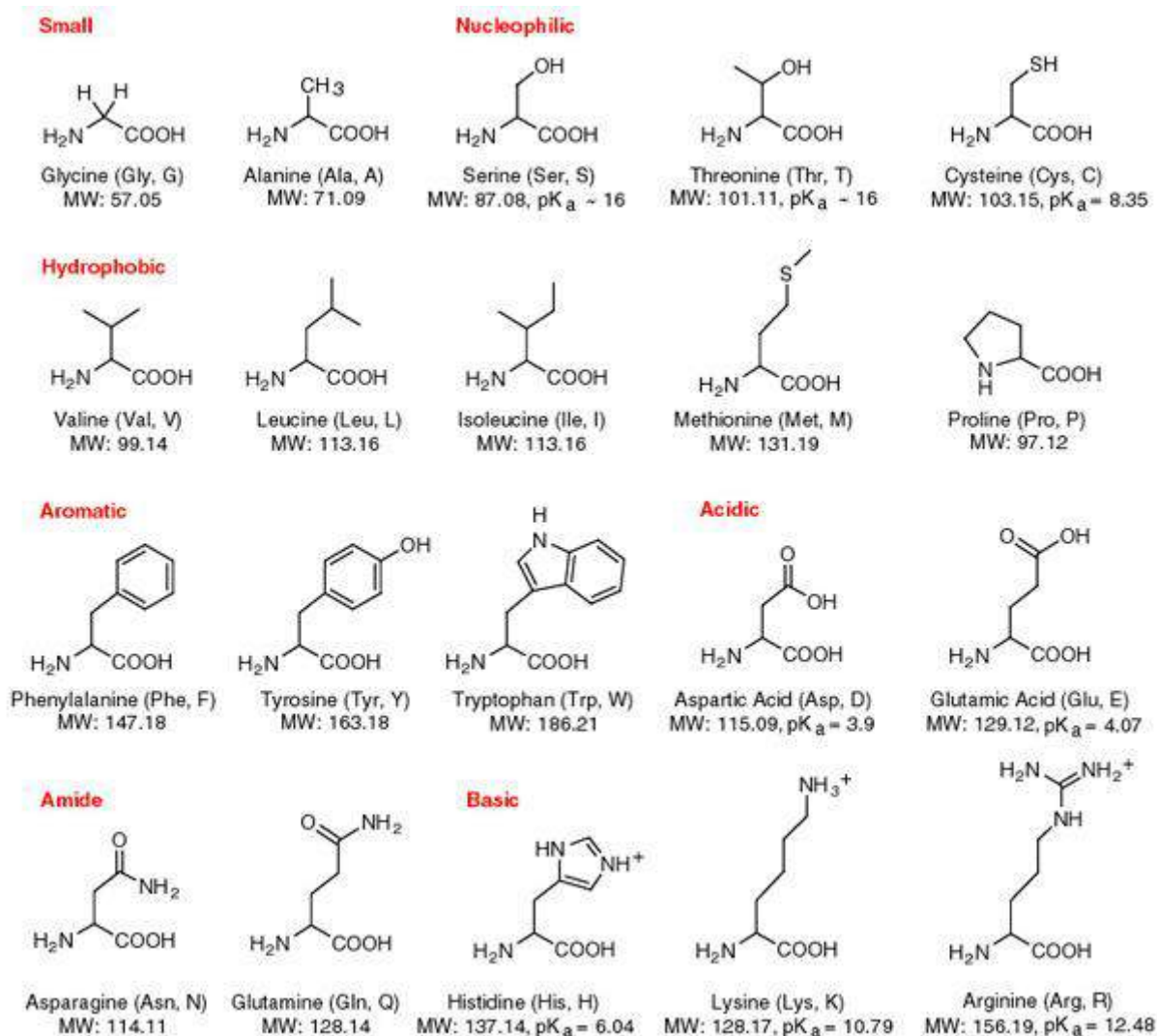


Εικόνα 2.1: Η δομή ενός α -αμινοξέος

Γενικότερα, το φορτίο των αμινοξέων ποικίλει ανάλογα με το pH του διαλύματος στο οποίο βρίσκονται. Παρατηρώντας τις τιμές pK_{a1} και pK_{a2} της καρβοξυλομάδας και της αμινομάδας αντίστοιχα του βασικού κορμού του μορίου, γίνεται αντιληπτό πως σε ουδέτερο pH και οι δύο ομάδες είναι φορτισμένες ($-\text{COO}^-$ και $-\text{NH}_3^+$), σχηματίζοντας ένα αμφοτερικό ιόν (zwitterion). Σε όξινα υδατικά διαλύματα, η ομάδα $-\text{COO}^-$ γίνεται δέκτης ενός πρωτονίου προς σχηματισμό ενός κατιόντος, ενώ αντίθετα σε αλκαλικά διαλύματα το δίπολο αποβάλλει ένα πρωτόνιο, οπότε σχηματίζεται ένα ανιόν. Το pH στο οποίο το συνολικό φορτίο του αμινοξέος είναι μηδέν, ονομάζεται ισοηλεκτρικό σημείο pI και είναι χαρακτηριστικό για κάθε αμινοξύ.⁸

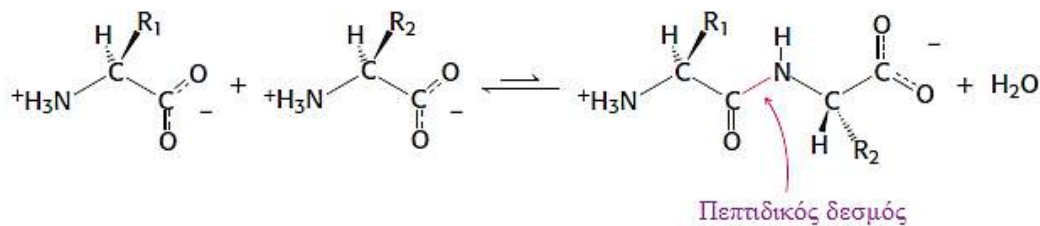
Υπάρχουν είκοσι διαφορετικά είδη πλευρικών ομάδων R, που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το σχήμα, το μέγεθος, το φορτίο, την υδροφοβικότητα/υδροφιλικότητα και τη χημική

δραστηριότητα. Συνεπώς, όλες οι πρωτεΐνες είναι δομημένες από τα ίδια 20 αμινοξέα. Τα είκοσι αυτά βασικά αμινοξέα και οι χαρακτηριστικότερες ιδιότητες τους παρατίθενται στην Εικόνα 2.2.



Εικόνα 2.2: Τα είκοσι βασικά αμινοξέα που συντελούν τις πρωτεΐνες

Η σύνδεση της καρβοξυλικής ομάδας ενός αμινοξέος με την αμινική ομάδα ενός άλλου αμινοξέος συντελεί στη δημιουργία ενός πεπτιδικού δεσμού (ονομάζεται και αμιδικός δεσμός), με παράλληλη απώλεια ενός μορίου ύδατος (Εικόνα 2.3). Πολλά αμινοξέα ενώνονται διαδοχικά μέσω πεπτιδικών δεσμών δημιουργώντας μια πολυπεπτιδική αλυσίδα. Αξίζει να αναφερθεί ότι ο πεπτιδικός δεσμός μεταξύ του καρβονυλίου και του αζώτου είναι άκαμπτος και επίπεδος, έχοντας χαρακτήρα μερικώς διπλού δεσμού (1.32 Å) λόγω απεντοπισμού των ηλεκτρονίων μέσω δομών συντονισμού. Το γεγονός αυτό εμποδίζει την ελεύθερη περιστροφή γύρω από τον δεσμό αυτό και μειώνει την δραστηριότητα του, καθιστώντας τον κινητικά σταθερό.^{8,9}



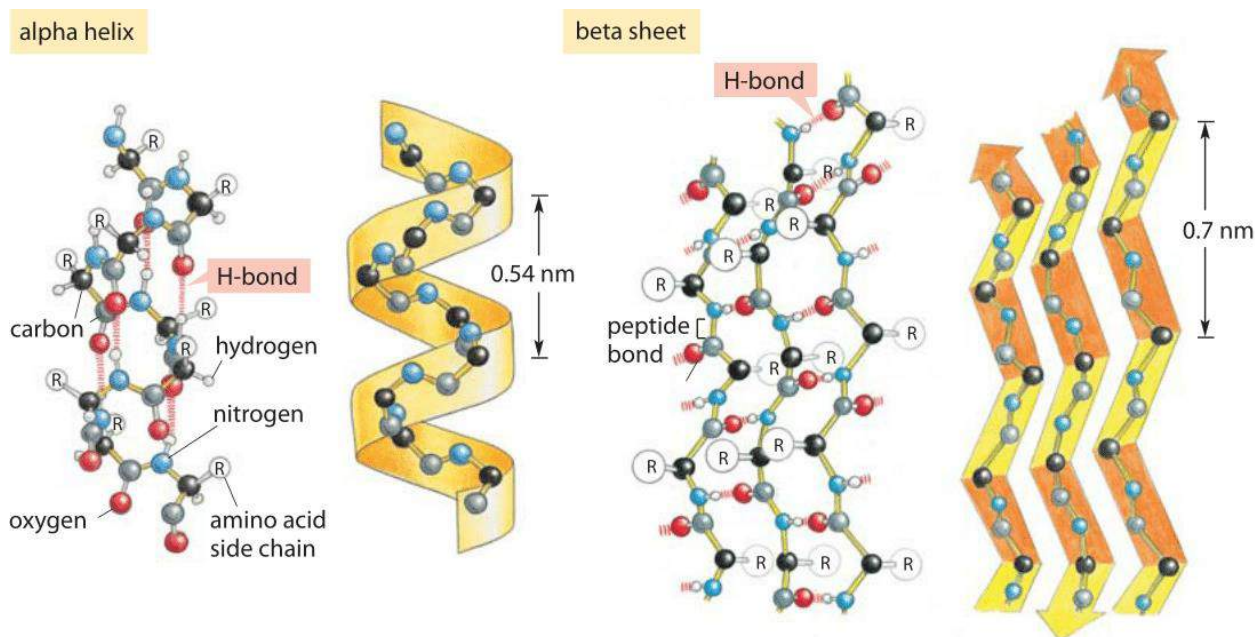
Εικόνα 2.3: Η δημιουργία ενός πεπτιδικού δεσμού

Η βασική διαφορά μεταξύ των πολυπεπτιδίων και των πρωτεϊνών είναι ότι τα πολυπεπτίδια είναι βιοπολυμερή που δημιουργούνται από επαναλαμβανόμενες δομικές μονάδες (μονομερή) ενός μόνο είδους αμινοξέος, ενώ οι πρωτεΐνες είναι σύνολα διαφόρων αμινοξέων με αυστηρά καθορισμένη αλληλουχία (πρωτοταγή δομή). Βέβαια, αν και τα συνθετικά πολυπεπτίδια χαρακτηρίζονται από πολυμοριακότητα, σε αντίθεση με τις φυσικές πρωτεΐνες, έχουν την ικανότητα να αναδιπλώνονται και να αποκτούν δευτεροταγή δομή ανάλογη με αυτή των πρωτεϊνών, όπως η α -έλικα που σταθεροποιείται με ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου και τα β -φύλλα που αναπτύσσουν δεσμούς υδρογόνου διαμοριακά (Εικόνα 2.4).^{3,10,11}

Ειδικότερα, η α -έλικα είναι μία ραβδόμορφη δομή. Ο κορμός, που αποτελείται από την κύρια πολυπεπτιδική αλυσίδα, έχει σχήμα σπειράματος και σχηματίζει το εσωτερικό της ράβδου, ενώ οι πλευρικές αλυσίδες εκτείνονται προς το εξωτερικό σε μία ελικοειδή διάταξη. Η α -έλικα, όπως προαναφέρθηκε, σταθεροποιείται από δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των ομάδων –NH και –CO της κύριας αλυσίδας, οι οποίες απέχουν 4 κατάλοιπα η μία από την άλλη, με κάθε κατάλοιπο να απέχει από το επόμενο 1.5 Å και να είναι περιστρεμμένο κατά 100° σε σχέση με τον κύριο άξονα, δίνοντας έτσι 3.6 κατάλοιπα αμινοξέων ανά στροφή της έλικας. Οι δεξιόστροφες έλικες είναι περισσότερο ευνοούμενες ενεργειακά διότι παρουσιάζουν λιγότερες στερεοχημικές παρεμποδίσεις μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων και του κορμού. Έτσι λοιπόν, όλες οι α -έλικες που απαντούν στις πρωτεΐνες είναι δεξιόστροφες. Η δημιουργία α -έλικας διευκολύνεται κυρίως από το γλουταμικό οξύ, τη μεθειονίνη και τη λευκίνη.^{8,12}

Το άλλο σύνηθες δομικό μοτίβο των πολυπεπτιδικών αλυσίδων και των πρωτεϊνών είναι η β -πτυχωτή επιφάνεια (ή β -φύλλο). Είναι μία δομή ανοικτή και επίπεδη με τους δεσμούς υδρογόνου να σχηματίζονται διαμοριακά μεταξύ –NH και –CO διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Η απόσταση μεταξύ γειτονικών αμινοξέων είναι 3.5 Å (σε αντίθεση με το 1.5 Å της α -έλικας), ενώ οι γειτονικές αλυσίδες σε μία β -πτυχωτή επιφάνεια μπορούν να έχουν την ίδια κατεύθυνση (παράλληλες) ή αντίθετη κατεύθυνση (αντιπαράλληλες). Τα β -φύλλα παρουσιάζουν μεγαλύτερη ποικιλία από τις α -έλικες, μπορεί να είναι ευθεία ή να εμφανίζονται με την κάθε

πτύχωση ελαφρά περιστρεμμένη. Δομές β -φύλλου διευκολύνονται κυρίως από την βαλίνη, την ισολευκίνη, την τυροσίνη και την φαινυλαλανίνη.^{8,12}



Εικόνα 2.4: Σχηματική αναπαράσταση της δομής της α -έλικας και της β -πτυχωτής επιφάνειας

Άλλες περιοδικές δομές που σχηματίζονται είναι η β -στροφή (β -turn) και η ω -θηλιά (ω -loop). Η β -στροφή έχει δομή φουρκέτας, όπου σχηματίζονται δεσμοί υδρογόνου στην ίδια αλυσίδα μεταξύ της ομάδας --CO της θέσης n ενός πολυπεπτιδίου και της ομάδας --NH που απέχει 3 κατάλοιπα ($n+3$) από αυτή τη θέση. Με τον τρόπο αυτό μία πολυπεπτιδική αλυσίδα μπορεί να αλλάξει ξαφνικά την κατεύθυνσή της. Οι β -στροφές συχνά συνδέουν αντιπαράλληλες β -πτυχωτές επιφάνειες. Η ω -θηλιά αναφέρεται σε ένα μεγαλύτερο βρόγχο που συνδέει πρωτεϊνικά τμήματα και στον οποίο δεν σχηματίζονται ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου. Η τάση ενός πεπτιδίου για δευτεροταγή δομή, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την σύσταση του σε αμινοξέα.^{8,12} Οι σχετικές πιθανότητες να εμφανιστεί ένα κατάλοιπο αμινοξέος σε μία συγκεκριμένη δευτεροταγή δομή έχουν προσδιοριστεί και αναφέρονται στον Πίνακα 2.1. Αυτές οι δευτεροταγείς δομές συμβάλλουν σημαντικά στην αυτο-οργάνωση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων, οδηγώντας σε νέες υπερμοριακές δομές με πιθανές βιοϊατρικές και φαρμακευτικές εφαρμογές. Τα πολυπεπτίδια έχουν αποτελέσει αντικείμενο εντατικών μελετών λόγω του θεμελιώδη ρόλου τους στον εγκλωβισμό και στην ελεγχόμενη αποδέσμευση φαρμακευτικών ουσιών που έχουν σχεδιαστεί για χρήση στη γονιδιακή και αντικαρκινική θεραπεία.¹³⁻¹⁵

Πίνακας 2.1: Σχετικές συχνότητες εμφάνισης καταλοίπων αμινοξέων στη δευτεροταγή δομή των πολυπεπτιδικών αλυσίδων

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

2.2. Σύνθεση Πεπτιδίων Μικρού Μοριακού Βάρους με Καθορισμένη Αλληλουχία¹⁶

Η σύνθεση πεπτιδίων μικρού μοριακού βάρους με συγκεκριμένη αλληλουχία αμινοξέων είναι μία μέθοδος ιδιαίτερης σημασίας, διότι βρίσκει εφαρμογές σε μελέτες με φαρμακευτικό και βιοϊατρικό ενδιαφέρον. Παρόλο που η σύνθεση αυτών των ενώσεων είναι μία δύσκολη και δαπανηρή διαδικασία, οι παρακάτω τρόποι είναι οι επικρατέστεροι και πιο αξιόπιστοι σε εργαστηριακή κλίμακα:

A. Σύνθεση σε στερεά φάση (Μέθοδος Merrifield)

Η σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση περιλαμβάνει την πρόσδεση του N-προστατευμένου C-τελικού αμινοξέος, σε ένα αδιάλυτο δικτυωμένο πολυμερές-υποστήριγμα (ρητίνη), ακολουθούμενη από αποπροστασία και ακυλίωση της ελεύθερης πλέον αμινομάδας με το προτελευταίο αμινοξύ, και την συνέχιση της ίδιας πορείας με παρόμοιους κύκλους αποπροστασίας και εισαγωγής των υπόλοιπων αμινοξέων. Η περίσσεια των αρχικών πρώτων υλών και των αντιδραστηρίων όπως επίσης και τα παραπροϊόντα των αντιδράσεων, απομακρύνονται εύκολα με έκπλυση του πεπτιδίου-πολυμερούς που προκύπτει με κατάλληλα επιλεγμένους διαλύτες. Η ιδέα αυτή εισήχθηκε για πρώτη φορά από τον Merrifield το 1963 και η ρητίνη του Merrifield, που χρησιμοποίησε τότε ως αδιάλυτο υποστήριγμα, αποτελεί μέχρι σήμερα ένα από τα κύρια στηρίγματα για τη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση. Η ρητίνη του Merrifield είναι ένα χλωρομεθυλιωμένο συμπολυμερές στυρενίου-διβινυλοβενζολίου, το οποίο χρησιμοποιήθηκε το ίδιο σε πολλές συνθέσεις αλλά αποτέλεσε επίσης βάση για την ανάπτυξη νέων ρητινών. Ως προστατευτική ομάδα των αμινοξέων χρησιμοποιείται η βενζυλοξυκαρβονυλομάδα (BOC), διότι μπορεί να απομακρυνθεί εύκολα με χρήση οξέων. Η ενεργοποίηση του καρβονυλίου, γίνεται με κάποιο αντιδραστήριο σύζευξης όπως το *N,N'*-δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμίδιο (DCC) ή το *N,N'*-δισοπροπυλοκαρβοδιϊμίδιο (DIC). Πλεονεκτήματα της σύνθεσης σε στερεά φάση είναι η μεγάλη ταχύτητα, η αποφυγή προβλημάτων διαλυτότητας, η αυξημένη απόδοση και η δυνατότητα αυτοματοποίησης της μεθόδου.

B. Σύνθεση σε διάλυμα

Ένα αμινοξύ προσκολλημένο σε ένα διαλυτό πολυμερές μέσω της καρβοξυλικής του ομάδας, μπορεί να ακυλωθεί από ένα κατάλληλα προστατευμένο και ενεργοποιημένο αμινοξύ, και να αρχίσει με αυτόν τον τρόπο η σύνθεση της πεπτιδικής αλυσίδας. Τα ενδιάμεσα πεπτίδια καταβυθίζονται και εκπλένονται ώστε να απομακρυνθούν τα αρχικά αντιδρώντα, καθώς και τα τυχόν παραπροϊόντα. Το τελικό καθαρό προϊόν επαναδιαλύεται, αποπροστατεύεται, ακυλιώνεται ξανά σε διάλυμα και ακολουθεί η ίδια διαδικασία. Μετά από τη σύζευξη, η πεπτιδική σύνθεση μπορεί να συνεχιστεί με απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων. Όταν χρησιμοποιούνται αμινοξέα με τρεις λειτουργικές ομάδες, θεωρείται απαραίτητη η προστασία της δραστικής πλευρικής ομάδας. Ενώ όμως οι πλευρικές ομάδες πρέπει να παραμένουν προστατευμένες καθ' όλη την διάρκεια της σύνθεσης, η α -προστατευτική ομάδα (αμινομάδα ή καρβοξυλομάδα) πρέπει να απομακρύνεται εύκολα πριν από κάθε σύζευξη. Επομένως, απαιτούνται δύο είδη

προστατευτικών ομάδων που να έχουν διαφορετική εκλεκτικότητα ως προς τα αντιδραστήρια αποπροστασίας. Μετά το τέλος της σύνθεσης, οι προστατευτικές ομάδες απομακρύνονται και λαμβάνεται το επιθυμητό πεπτίδιο, το οποίο στη συνέχεια καθαρίζεται από τα παραπροϊόντα. Το κυριότερο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η μέγιστη προστασία όλων των δραστικών ομάδων που μειώνει τις πιθανότητες πραγματοποίησης παράπλευρων αντιδράσεων, ενώ βασικά μειονεκτήματα είναι η δυσκολία απομάκρυνσης των προστασιών στο τέλος της σύνθεσης καθώς και η αυξημένη δυσδιαλυτότητα που εμφανίζουν τα μεγαλύτερα πεπτίδια.

2.3. Σύνθεση Πολυπεπτιδίων Μεγάλου Μοριακού Βάρους

Εκτός από την παρασκευή συνθετικών πεπτιδίων με απόλυτα καθορισμένη αλληλουχία αμινοξέων (πρωτοταγή δομή), την τελευταία εικοσαετία παρουσιάζει ενδιαφέρον η δημιουργία πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους χωρίς συγκεκριμένη αλληλουχία. Το ενδιαφέρον αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα συγκεκριμένα πολυμερή έχουν την ικανότητα να αναδιπλώνονται και να αποκτούν δευτεροταγή δομή ανάλογη με αυτή των πρωτεϊνών που προάγει την αυτο-οργάνωσή τους, ενώ επίσης είναι βιοσυμβατά και βιοδιασπώμενα και συνεπώς βρίσκουν μεγάλο αριθμό εφαρμογών.

Η σύνθεση πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους με καθορισμένο βαθμό πολυμερισμού, μοριακή σύσταση και άρα συγκεκριμένες ιδιότητες, που να μπορούν να μιμηθούν επαρκώς τις ιδιότητες φυσικών πρωτεϊνών, περιλαμβάνει τον πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου (ring-opening polymerization, ROP) των N-καρβοξυ ανυδριτών (N-carboxy anhydrides, NCAs) των α -αμινοξέων. Η συμβατική μέθοδος σύνθεσης σε στερεά φάση δεν μπορεί να εφαρμοστεί στη σύνθεση πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους, εξαιτίας των πολλών σταδίων αποπροστασίας και σύζευξης που την καθιστούν εξαιρετικά δύσκολη. Ακόμα, είναι σημαντικό να μπορούν να επιτευχθούν στενές κατανομές ($I \leq 1.2$), έτσι ώστε τα πολυπεπτίδια να αυτο-οργανώνονται σε καλά καθορισμένες νανοδομές, μεταφέροντας με αυτό τον τρόπο τις επιθυμητές ιδιότητες στη μακρο-κλίμακα.^{3,17-19}

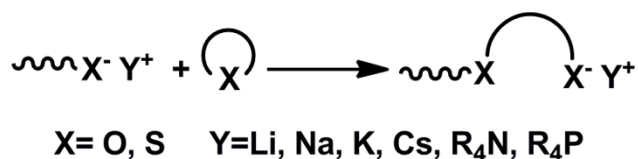
2.3.1. Πολυμερισμός Διάνοιξης Δακτυλίου (Ring-Opening Polymerization, ROP)^{20,21}

Ο πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (ROP) μαζί με τον ριζικό και τον ανιοντικό πολυμερισμό, θεωρούνται τα πιο διαδεδομένα είδη πολυμερισμού για τη σύνθεση καλά καθορισμένων μακρομορίων. Ο ROP αποτελεί το είδος πολυμερισμού κατά το οποίο η τελική μακρομοριακή αλυσίδα προέρχεται από ένα κυκλικό πρόδρομο μονομερές, κατόπιν διάνοιξης

του δακτυλίου του. Αν και ο ROP θεωρείται ως επί το πλείστον αλυσωτός πολυμερισμός (προσθήκη του μονομερούς σε μία αναπτυσσόμενη αλυσίδα), υπάρχουν αρκετές πιο περίπλοκες περιπτώσεις που περιλαμβάνουν ενεργοποιημένα μονομερή. Εκτός συγκεκριμένων εξαιρέσεων, όπως είναι ο ROP των N-καρβοξυ ανυδριτών (ή ανυδρίτες Leuchs), ο ROP δεν συνοδεύεται από την παραγωγή μικρών μορίων κατά τη διάδοση του πολυμερισμού, τα οποία πρέπει να απομακρύνονται ώστε να προάγεται η αντίδραση.

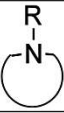
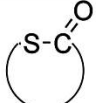
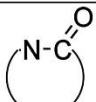
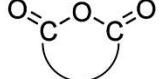
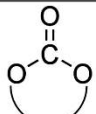
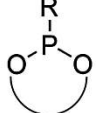
Στα περισσότερα είδη πολυμερισμού, η κινητήρια δύναμη για να προαχθεί ο πολυμερισμός είναι η μετατροπή ενός πολλαπλού δεσμού σε απλό. Αντιθέτως, στον ROP κινητήρια δύναμη αποτελεί η αυξημένη τάση διάνοιξης δακτυλίου (ring strain) του μονομερούς και οι στερεοχημικές αλληλεπιδράσεις που μπορεί να την συνοδεύουν. Ωστόσο, δεν μπορούν να πολυμεριστούν όλες οι κυκλικές ενώσεις. Για να γίνει αυτό εφικτό, θα πρέπει ο πολυμερισμός να ευνοείται τόσο κινητικά όσο και θερμοδυναμικά. Αφενός μεν τα μονομερή πρέπει να φέρουν μία κινητικά δραστική ομάδα που να μπορεί να αντιδράσει εύκολα και αφετέρου η τάση διάνοιξης του δακτυλίου πρέπει να είναι μεγάλη. Δακτύλιοι που περιέχουν 3, 4 ή 8, 9 άτομα, έχουν μεγάλη τάση δακτυλίου και ευνοείται η διάνοιξή τους, λόγω της μείωσης της ενθαλπίας που την συνοδεύει. Οι εξαμελείς δακτύλιοι είναι θερμοδυναμικά σταθεροί και κατά γενικό κανόνα δεν πολυμερίζονται, ενώ οι πενταμελείς και επταμελείς δακτύλιοι βρίσκονται ενδιάμεσα και τις περισσότερες φορές μπορούν να πολυμεριστούν. Τα συνηθέστερα κυκλικά μονομερή που πολυμερίζονται με διάνοιξη δακτυλίου περιέχουν κάποιο ετεροατόμο στο δακτύλιο τους, όπως O, S ή N, και μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε διάφορες οικογένειες ανάλογα με τις χαρακτηριστικές λειτουργικές ομάδες που φέρουν. Επιπλέον, ανάλογα με τον μηχανισμό με τον οποίο διαδίδεται ο πολυμερισμός ROP σε κάθε τύπο μονομερών, διακρίνονται τέσσερα είδη: ο ριζικός ROP (RROP), ο ανιοντικός ROP (AROP), ο κατιοντικός ROP (CROP) και ο πολυμερισμός μετάθεσης με διάνοιξη δακτυλίου (ROMP). Ειδικότερα, οι κυριότερες ομάδες κυκλικών μονομερών, το μέγεθος του δακτυλίου τους καθώς και το είδος του μηχανισμού με τον οποίο προάγεται ο ROP σε κάθε περίπτωση συνοψίζονται στον Πίνακα 2.2.

Όπως φαίνεται, ο ROP των NCAs των α-αμινοξέων αποτελεί ειδική περίπτωση πολυμερισμού που διαδίδεται μέσω ανιοντικού μηχανισμού. Κατά τον ανιοντικό ROP (anionic ROP, AROP) λαμβάνει χώρα πυρηνόφιλη προσβολή ενός ετεροκυκλικού μονομερούς από το άκρο της αναπτυσσόμενης πολυμερικής αλυσίδας, σύμφωνα με τη γενική αντίδραση:



Τα κυριότερα μονομερή που πολυμερίζονται μέσω AROP είναι το αιθυλενοξείδιο, το προπυλενοξείδιο, το λακτίδιο και η εξαμεθυλ(κυκλοτρισιλοξάνη) (D_3), από την οποία προκύπτει το γνωστό PDMS, ενώ οι σημαντικότεροι απαρχητές που χρησιμοποιούνται για την έναρξη του πολυμερισμού είναι οργανομεταλλικές ενώσεις των αλκαλίων (Li, Na, K) και διαφορές αμίνες.

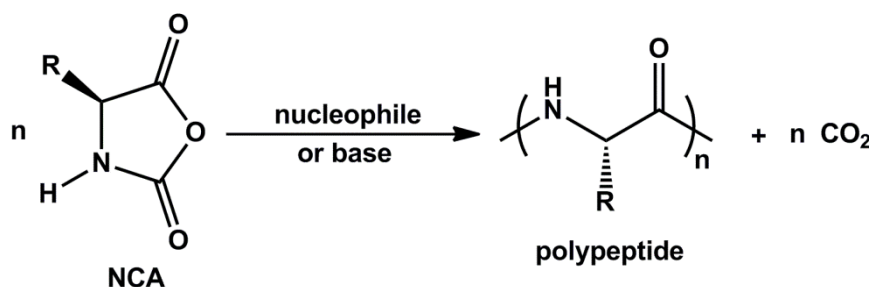
Πίνακας 2.2: Χαρακτηριστικές ομάδες κυκλικών μονομερών και ο συνήθης μηχανισμός πολυμερισμού ROP για κάθε κατηγορία

Name	Structure	Ring size	Mechanism
Olefin		4,5,8	Metathesis
Ether		3–5,7	Cationic, anionic
Thioether		3,4	Cationic, anionic
Amine		3,4,7	Cationic
Lactone		4,6–8	Anionic, cationic
Thiolactone		4–8	Anionic, cationic
Lactam		≥ 4	Anionic, cationic
Disulfide		≥ 8	Radical
Anhydride		5 and ≥ 7	Anionic
Carbonate		6–8 and ≥ 20	Anionic
Silicone		6,8 and ≥ 10	Anionic, cationic
Phosphazene		6	Cationic
Phosphonite		3,5–7	Anionic

2.3.2. Πολυμερισμός Διάνοιξης Δακτυλίου (ROP) των N-καβοξυ ανυδριτών (NCAs) των α -αμινοξέων^{3,17-19}

Η πιο διαδεδομένη και αποδοτική μέθοδος σύνθεσης πολυπεπτιδικών ομο- και συμπολυμερών, αποτελεί ο πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (ROP) των N-καβοξυ ανυδριτών (NCAs) των α -αμινοξέων. Μάλιστα στην περίπτωση των NCAs αυτό το είδος πολυμερισμού είναι συντομότερο, οικονομικότερο και μπορεί να δώσει ένα μεγάλο αριθμό παραγώγων πολυπεπτιδίων, σε σχέση με άλλες συνθετικές πορείες, χωρίς την ανεπιθύμητη λήψη ρακεμικού μίγματος των δύο οπτικών αντιπόδων των αμινοξέων.

Ο πολυμερισμός των NCAs μπορεί να προκληθεί από ένα μεγάλο αριθμό απαρχητών, περιλαμβάνοντας βάσεις όπως αμίνες, αλκοξείδια, υδροξυλικά ανιόντα, διάφορα άλατα, αλλά μπορεί επίσης να εκκινήσει με θέρμανση. Μέχρι σήμερα, έχει χρησιμοποιηθεί ένα μεγάλο εύρος μονομερών (και παραγώγων τους) για τη σύνθεση πολυπεπτιδίων, ανάλογα με τις επιθυμητές ιδιότητες που επιλέγονται για τα τελικά πολυμερή. Η αντίδραση συνοδεύεται από την παραγωγή αερίου CO₂, και κάτω από αυστηρά καθορισμένες συνθήκες μπορεί να δώσει προϊόντα μεγάλου μοριακού βάρους. Μελέτες ιχνηθετημένων μονομερών με ¹⁴C αποδεικνύουν ότι το παραγόμενο CO₂ προέρχεται αποκλειστικά από τον άνθρακα C(2). Η γενική αντίδραση πολυμερισμού των NCAs για την σύνθεση πολυπεπτιδίων δίνεται στο Σχήμα 2.1.



Σχήμα 2.1: Αντίδραση πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου (ROP) των NCAs

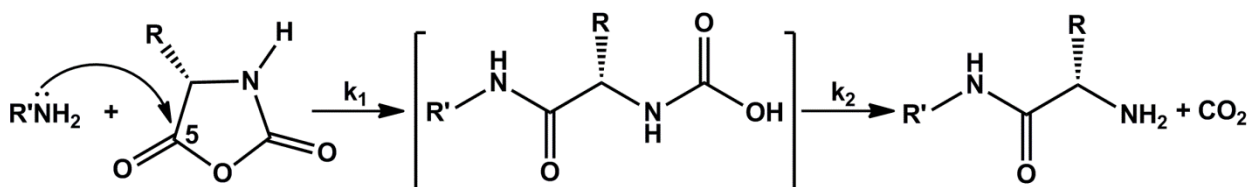
Βέβαια, για να επιτευχθεί ο πολυμερισμός των NCAs των α -αμινοξέων απαιτείται όλα τα αντιδραστήρια και κυρίως τα μονομερή, τα οποία βρίσκονται σε στερεή μορφή, να καθαριστούν ενδελεχώς από προσμίξεις με επαναλαμβανόμενες ανακρυσταλλώσεις κάτω από υψηλό κενό (high-vacuum techniques). Χρησιμοποιώντας τις τεχνικές υψηλού κενού ο πολυμερισμός χαρακτηρίζεται ως ζωντανός (απαραίτητη προϋπόθεση για την διατήρηση του ζωντανού χαρακτήρα του πολυμερισμού είναι η ποσοτική απομάκρυνση του παραγόμενου CO₂) και τα πολυπεπτίδια που λαμβάνονται διαθέτουν καλά καθορισμένες ιδιότητες.

Συνήθως, για την πραγματοποίηση της διάνοιξης του δακτυλίου χρησιμοποιούνται ως απαρχητές είτε πρωτοταγείς αμίνες που είναι ισχυρότερα πυρηνόφιλα παρά βάσεις, ή τριτοταγείς αμίνες και αλκοξείδια μετάλλων που είναι ισχυρότερες βάσεις και έτσι μπορούν να δώσουν πολυπεπτίδια μεγάλου μοριακού βάρους. Με βάση το είδος του απαρχητή που θα χρησιμοποιηθεί, υπάρχουν δύο κύριες μηχανιστικές πορείες ώστε να συντεθούν τα πολυπεπτίδια. Ο πρώτος μηχανισμός είναι γνωστός ως “κανονικός μηχανισμός αμινών” (“normal amine mechanism”, NAM), ενώ ο δεύτερος είναι ο “μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς” (“activated monomer mechanism”, AMM).

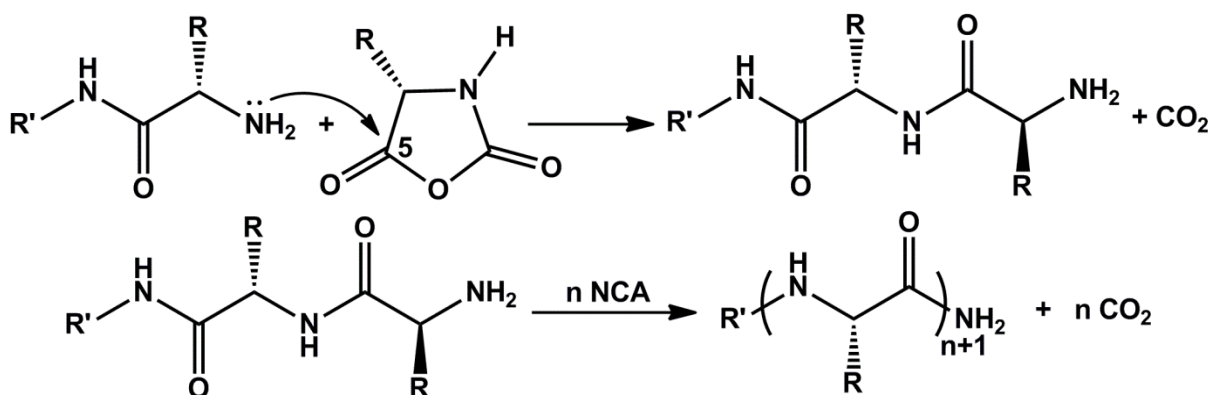
2.3.2.1. Κανονικός Μηχανισμός Αμινών (Normal Amine Mechanism, NAM)

Ο μηχανισμός αυτός εφαρμόζεται γενικά για τον πολυμερισμό των NCAs με χρήση μη ιοντικών απαρχητών που διαθέτουν τουλάχιστον ένα άτομο υδρογόνου, το οποίο μπορεί να απομακρυνθεί εύκολα (του τύπου βάση-H), όπως είναι οι πρωτοταγείς και δευτεροταγείς αμίνες (π.χ. *n*-εξυλαμίνη, διμεθυλαμίνη), οι αλκοόλες και το νερό. Οι απαρχητές αυτοί δρουν ως ισχυρότερα πυρηνόφιλα παρά βάσεις, με αποτέλεσμα να ενσωματώνονται κατάλοιπα τους στις τελικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Τα στάδια της έναρξης και της διάδοσης του πολυμερισμού μέσω αυτού του μηχανισμού δείχνονται στο Σχήμα 2.2.

Στάδιο Έναρξης:



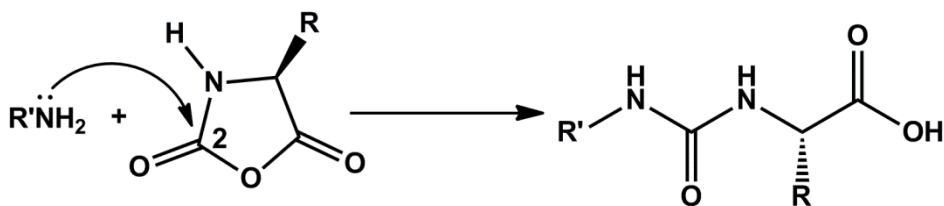
Στάδιο Διάδοσης:



Σχήμα 2.2: Στάδια έναρξης και διάδοσης του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβοξυ ανυδριτών μέσω του κανονικού μηχανισμού αμινών (NAM)

Όπως φαίνεται, κατά το στάδιο της έναρξης ο πυρηνόφιλος απαρχητής προσβάλλει το καρβονύλιο στη θέση 5' του ανυδρίτη. Το ενδιάμεσο καρβαμιδικό οξύ που παράγεται είναι θερμοδυναμικά ασταθές και συνεπώς αποκαρβοξυλιώνεται για να δώσει μια ελεύθερη αμινομάδα, η οποία είναι ικανή να προάγει τον πολυμερισμό. Στο στάδιο της διάδοσης η τελική αμινομάδα λειτουργεί με τον ίδιο τρόπο, προσβάλλοντας το καρβονύλιο της θέσης 5' ενός δεύτερου μορίου NCA και η πορεία συνεχίζεται μέχρι πλήρους κατανάλωσης του μονομερούς. Οι πρωτοταγείς αμίνες δίνουν τα καλύτερα αποτελέσματα, λαμβάνοντας υπόψη τη συμφωνία μεταξύ των πειραματικά παρατηρούμενων μοριακών βαρών και αυτών που αναμένονται θεωρητικά. Δεδομένου ότι οι πρωτοταγείς αμίνες είναι περισσότερο πυρηνόφιλες από τις ακραίες αμινομάδες που βρίσκονται στις αναπτυσσόμενες αλυσίδες, ο ρυθμός έναρξης είναι πολύ μεγαλύτερος από το ρυθμό διάδοσης. Αυτό αποτελεί ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά του «ζωντανού πολυμερισμού», και συνεπώς οι κατανομές των πολυπεπτιδίων που λαμβάνονται είναι ιδιαίτερα στενές.

Βέβαια, εκτός της προσβολής του καρβονυλίου στη θέση 5' κατά το στάδιο της έναρξης, μπορεί να πραγματοποιηθεί παράπλευρη αντίδραση με προσβολή στη θέση 2', προς σχηματισμό ενός ακραίου ουρείδο οξέος (Σχήμα 2.3). Με αυτό τον τρόπο επέρχεται πρόωρος τερματισμός του πολυμερισμού καθώς η αμίνη δεν μπορεί να αναγεννηθεί. Η πιθανότητα πραγματοποίησης της αντίδρασης τερματισμού μειώνεται όσο ισχυρότερο πυρηνόφιλο είναι ο απαρχητής που θα χρησιμοποιηθεί. Άλλοι παράγοντες που μπορεί να προκαλέσουν αποκλίσεις από τον «ζωντανό» χαρακτήρα του ROP είναι η ισορροπία μεταξύ καρβαμιδικού οξέος και CO₂, η επιλογή διαλύτη, η θερμοκρασία της αντίδρασης και η ύπαρξη υγρασίας ή άλλων προσμίξεων (υδρόλυση του μονομερούς).



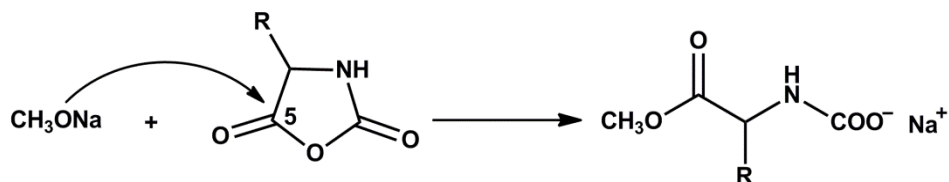
Σχήμα 2.3: Αντίδραση τερματισμού κατόπιν προσβολής του καρβονυλίου στη θέση 2' από τον απαρχητή

2.3.2.2. Μηχανισμός του Blout

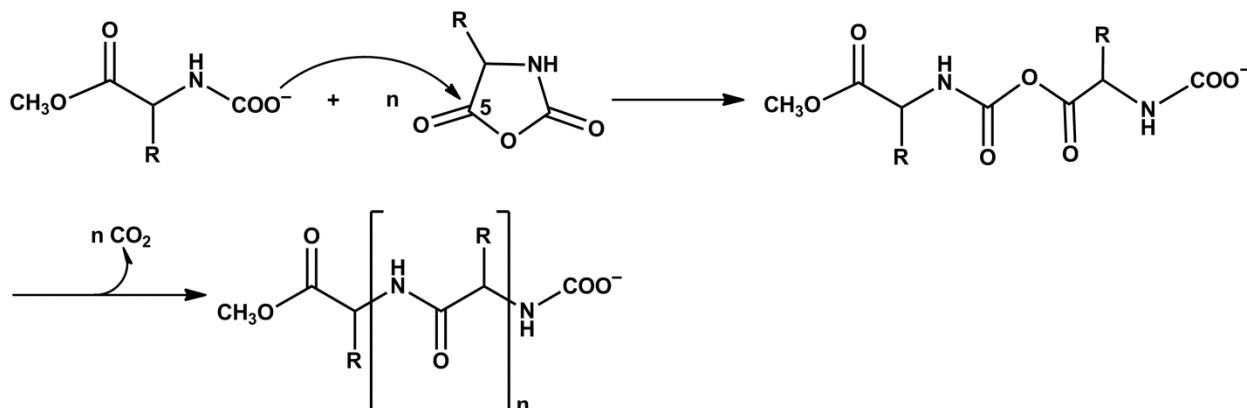
Ο μηχανισμός του Blout (“Blout mechanism”) είναι μια «ιοντική» μορφή του κανονικού μηχανισμού αμινών (NAM). Το 1958 οι Idelson και Blout, μελέτησαν τον πολυμερισμό των NCAs μέσω ισχυρών βάσεων, χρησιμοποιώντας μεθοξείδιο του νατρίου.²² Κατά το στάδιο της

έναρξης, το μεθοξείδιο του νατρίου προβάλλει πυρηνόφιλα τον C(5) του N-καρβοξυ ανυδρίτη προκαλώντας διάνοιξη δακτυλίου. Στο στάδιο έναρξης του πολυμερισμού δεν λαμβάνει χώρα παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα. Η διάνοιξη του δακτυλίου επέρχεται προς σχηματισμό του καρβαμιδικού ανιόντος, το οποίο είναι υπεύθυνο για την διάδοση του πολυμερισμού. Η αλυσίδα αναπτύσσεται με την προσθήκη του καρβαμιδικού ανιόντος σε ένα νέο μόριο ανυδρίτη, προς σχηματισμό ενός ενδιάμεσου καρβαμικού-καρβόξυλο μικτού ανυδρίτη. Εν συνεχεία, απελευθερώνεται CO₂ προς σχηματισμό ενός νέου καρβαμιδικού ανιόντος (Σχήμα 2.4). Επειδή όμως τα ενεργά καρβαμιδικά άκρα είναι ασθενέστερα πυρηνόφιλα σε σχέση με τα αντίστοιχα αμινο-τελικά, ο μηχανισμός αυτός είναι λιγότερο πιθανός.

Στάδιο Έναρξης:



Στάδιο Διάδοσης:



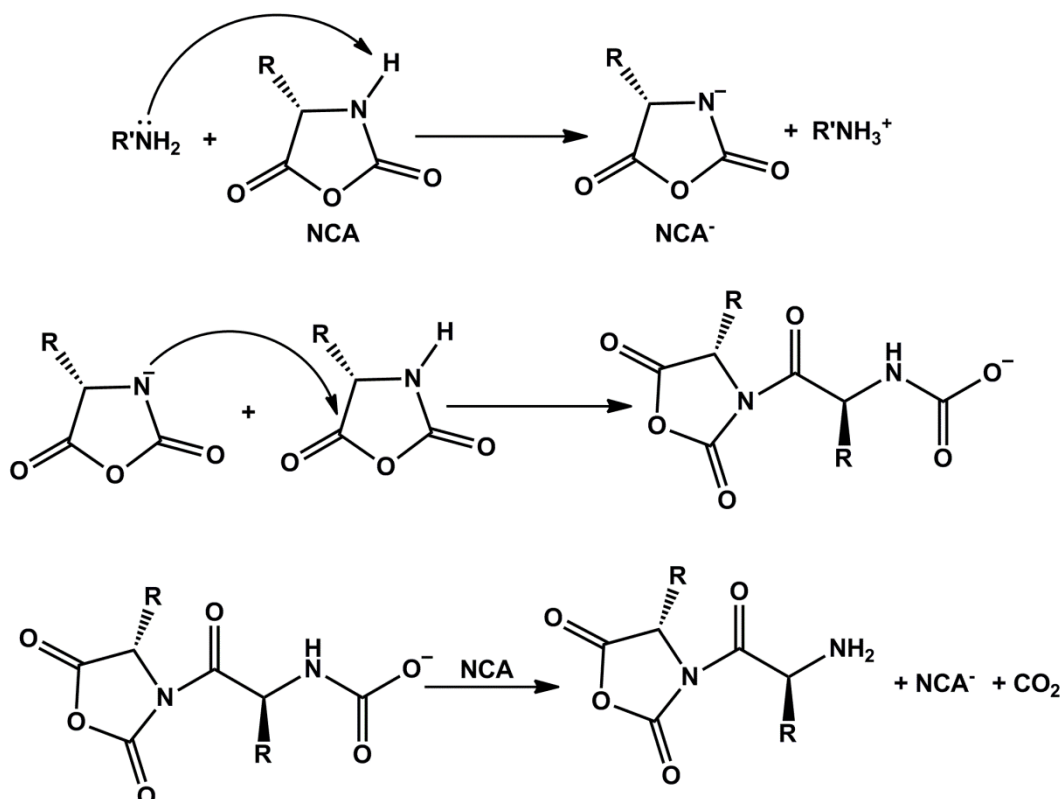
Σχήμα 2.4: Στάδια έναρξης και διάδοσης σύμφωνα με τον μηχανισμό κατά Blout

Ο συγκεκριμένος μηχανισμός δεν απαιτεί το πρωτόνιο από τον απαρχητή, και μπορεί να έχει εφαρμογή τόσο σε N-υποκατεστημένους NCAs, όσο και σε μη υποκατεστημένους. Παρ' ότι υπάρχουν έρευνες που δείχνουν ότι ο μηχανισμός του Blout μπορεί να εφαρμοστεί κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, είναι γενικά αποδεκτό ότι ο πολυμερισμός των NCAs με χρήση ισχυρών βάσεων, όπως το μεθοξείδιο του νατρίου, προχωρά μέσω του “μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς”.

2.3.2.3. Μηχανισμός Ενεργοποιημένου Μονομερούς (Activated Monomer Mechanism, AMM)

Αυξάνοντας την βασικότητα του απαρχητή, χρησιμοποιώντας τριτοταγείς αμίνες καθώς και δευτεροταγείς υψηλής βασικότητας, το σύστημα ακολουθεί ένα διαφορετικό μηχανισμό πολυμερισμού. Σε αυτόν ο απαρχητής δεν δρα ως πυρηνόφιλο δίνοντας ζεύγος ηλεκτρονίων, αλλά ως καταλύτης ενεργοποιώντας ένα μόριο μονομερούς. Απαραίτητη προϋπόθεση για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση είναι ότι το άζωτο στη θέση 3 του NCA πρέπει να μην είναι υποκατεστημένο και να διαθέτει ένα ευκίνητο υδρογόνο.

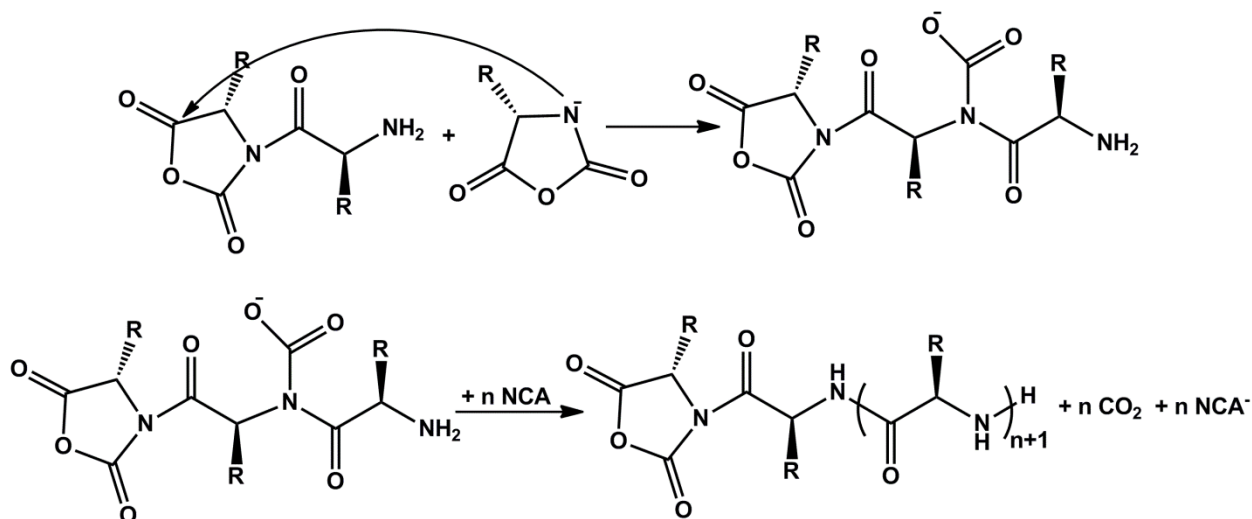
Επειδή ο μηχανισμός του ενεργοποιημένου μονομερούς (AMM) διαδίδεται μέσω ανιόντων, έχει αποδειχθεί ότι είναι ταχύτερος από τον αντίστοιχο κανονικό μηχανισμό αμινών (NAM) και τα πολυπεπίδια που παράγονται έχουν μεγαλύτερο μοριακό βάρος. Επιπλέον, όμως, τα πολυμερή που συντίθενται μέσω αυτού του μηχανισμού έχουν μεγαλύτερη κατανομή μοριακών βαρών, λόγω του ότι το ανιόν NCA^- δεν έχει εκλεκτικότητα και μπορεί να αντιδράσει τόσο με την μακρομοριακή αλυσίδα όσο και με ένα νέο μονομερές, δίνοντας έτσι προϊόντα με μεγάλη ανομοιογένεια. Τα στάδια της ενεργοποίησης του μονομερούς και της έναρξης του πολυμερισμού μέσω αυτού του μηχανισμού δείχνονται στο Σχήμα 2.5.



Σχήμα 2.5: Στάδια ενεργοποίησης και έναρξης του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβοξυ ανυδριτών μέσω του μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς (AMM)

Στο στάδιο της προέναρξης ο απαρχητής δρα ως βάση δεσμεύοντας το όξινο H του αζώτου στο δακτύλιο του μονομερούς. Ουσιαστικά, ο μηχανισμός έναρξης περιλαμβάνει την αποπρωτονίωση του δεσμού N-H του NCA από τον απαρχητή-βάση και την πυρηνόφιλη προσβολή το σχηματισθέντος ανιόντος σε ένα δεύτερο μόριο μονομερούς στον άνθρακα 5', ανοίγοντας τον δακτύλιο και δίνοντας ένα διμερές. Το καρβαμίδικό ανιόν που σχηματίζεται πρωτονιώνεται από ένα τρίτο μόριο μονομερούς, σχηματίζοντας το ασταθές καρβαμίδικό οξύ, το οποίο και αποκαρβοξυλιώνεται, παράγοντας ενεργές αμινομάδες ενώ αναγεννάται ο καταλύτης (NCA^-) και εκλύεται CO_2 .

Κατά το στάδιο της διάδοσης το διμερές που σχηματίστηκε προσβάλλεται από ένα άλλο ανιόν NCA^- για να δώσει ένα τριμερές, κ.ο.κ., με τον NCA^- να αναγεννάται σε κάθε βήμα της αντίδρασης (Σχήμα 2.6). Όπως γίνεται αντιληπτό ο AMM δεν περιλαμβάνει ενσωμάτωση τμήματος του απαρχητή στην τελική αλυσίδα.



Σχήμα 2.6: Στάδιο διάδοσης του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβοξυ ανυδριτών μέσω του μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς (AMM)

Τέλος, η καθαρότητα των μονομερών και του διαλύτη είναι κρίσιμοι παράγοντες για την έκβαση του AMM, ενώ υπάρχει επίσης πλήθος πιθανών παράπλευρων αντιδράσεων που μπορούν να τερματίσουν τον πολυμερισμό, όπως αντιδράσεις διάσπασης, μεταφοράς αλυσίδας, ισομερείωσης και ενδομοριακής κυκλοποίησης. Είναι, λοιπόν, εμφανές ότι ο συγκεκριμένος μηχανισμός δεν είναι επιθυμητός, καθώς ο πολυμερισμός αυτός ελέγχεται δύσκολα και απέχει πολύ από το να μπορεί χαρακτηριστεί ως ζωντανός.

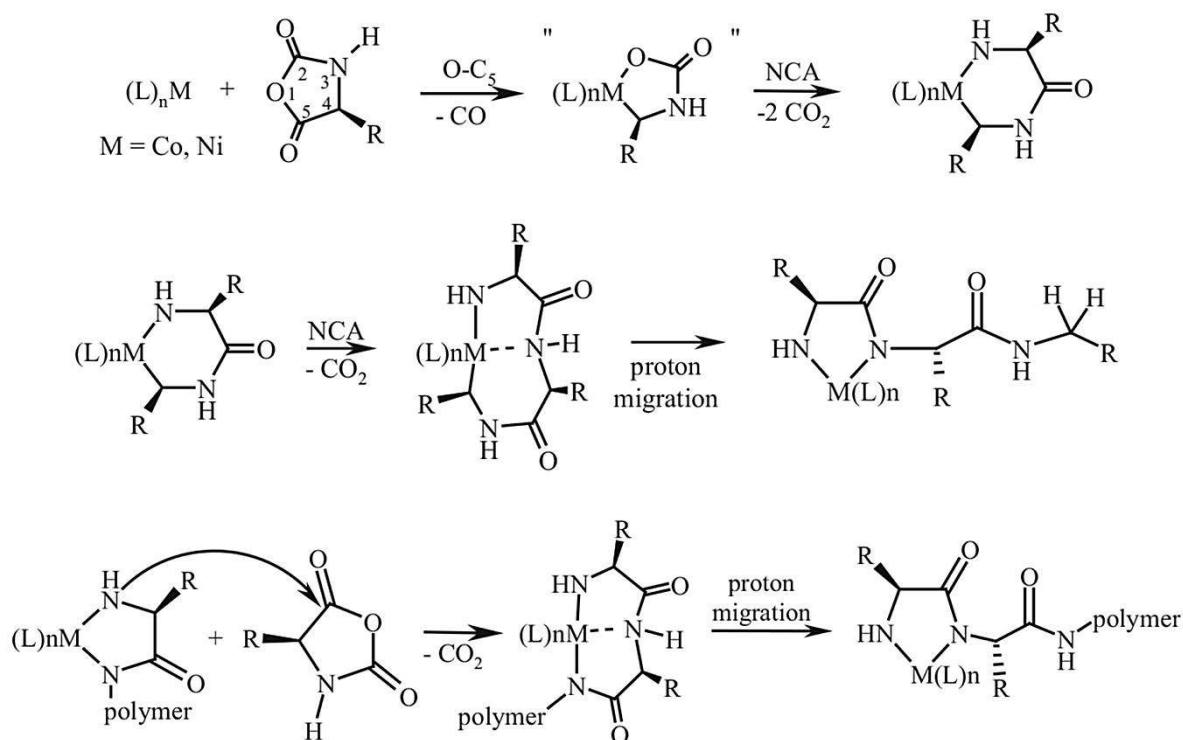
2.3.2.4. Σύνθεση Πολυπεπτιδίων με Χρήση Συμπλόκων των Στοιχείων Μετάπτωσης²³⁻²⁵

Μέχρι το 1997, οι προσπάθειες να συντεθούν πολυπεπτίδια μεγάλου μοριακού βάρους, με καθορισμένα μοριακά χαρακτηριστικά και μικρή κατανομή, ήταν ανεπιτυχείς, λόγω του μεγάλου αριθμού ανεπιθύμητων παράπλευρων αντιδράσεων. Η ερευνητική ομάδα του Deming κατάφερε κάτι τέτοιο προτείνοντας μια νέα σειρά απαρχητών, βασισμένους σε οργανομεταλλικές ενώσεις, οι οποίες μπορούν να περιορίσουν σε σημαντικό βαθμό τις αντιδράσεις τερματισμού. Ειδικότερα, χρησιμοποιώντας σύμπλοκα των στοιχείων μετάπτωσης (κυρίως Ni και Co) ως δραστικά κέντρα, επιτεύχθηκε ο έλεγχος της προσθήκης των μονομερών στα άκρα των αναπτυσσόμενων αλυσίδων.²³⁻²⁵

Αναπτύχθηκαν δραστικοί απαρχητές νικελίου και κοβαλτίου μηδενικού σθένους (π.χ. bipyNi(COD) , όπου $\text{bipy}=2,2'$ -διπυριδίνη, $\text{COD}=1,5$ -κυκλοοκταδιένιο, και $(\text{PMe}_3)_4\text{Co}$), οι οποίοι επιτρέπουν το «ζωντανό» πολυμερισμό των NCAs δίνοντας πολυπεπτίδια υψηλού μοριακού βάρους. Τα μεταλλικά ιόντα μπορούν στη συνέχεια να απομακρυνθούν από τα παραγόμενα πολυμερή με απλή καταβύθιση ή μέσω της διαδικασίας διαπίδυσης (dialysis). Τα σύμπλοκα που χρησιμοποιούνται παρέχουν ενεργά κέντρα που είναι λιγότερο προσβάσιμα λόγω στερεοχημικής και ηλεκτρονιακής παρεμπόδισης, με αποτέλεσμα οι παράπλευρες αντιδράσεις τερματισμού και μεταφοράς αλυσίδας να περιορίζονται. Με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατόν να παρασκευαστούν ομο- και συμπολυπεπτίδια με σχετικά μικρή κατανομή μοριακών βαρών και ελεγχόμενο μοριακό βάρος.

Οι μελέτες που πραγματοποιήθηκαν πάνω στο συγκεκριμένο μηχανισμό, έδειξαν ότι αυτά τα μέταλλα αντιδρούν με τους NCAs, σχηματίζοντας μεταλλοκυκλικά σύμπλοκα, μέσω οξειδωτικής προσθήκης στους δεσμούς του ανυδρίτη. Οι αντιδράσεις οξειδωτικής προσθήκης ακολουθούνται από προσθήκη ενός δεύτερου μορίου NCA για να δώσουν σύμπλοκα, που χαρακτηρίζονται ως εξαμελή αμιδο-αλκυλο μεταλλοκυκλικά. Όμως, έχει βρεθεί ότι με την προσθήκη των NCAs, κάποια στιγμή, οι ενδιάμεσοι εξαμελείς δακτύλιοι μετατρέπονται σε πενταμελείς, λόγω της μετανάστευσης ενός αμιδικού πρωτονίου στον άνθρακα που κάνει δεσμό με το μέταλλο, κάτι το οποίο απελευθερώνει το τέλος της αλυσίδας από το μέταλλο. Η διάδοση γίνεται, με την προσβολή της πυρηνόφιλης αμινομάδας στον ηλεκτρονιόφιλο C(5) του NCA. Η αντίδραση αυτή καταλήγει σε ένα μεταλλοκυκλικό ενδιάμεσο, ενώ συνοδεύεται από ταυτόχρονη απελευθέρωση CO_2 . Με αυτόν τον τρόπο, το μέταλλο μετακινείται σε όλο το μήκος της αναπτυσσόμενης πολυμερικής αλυσίδας, η οποία στο ενεργό της άκρο φέρει μια ισχυρά χηλική ένωση (Σχήμα 2.7). Ο σχηματισμός αυτών των χηλικών μεταλλοκυκλικών ενδιαμέσων κρίνεται

απαραίτητος για να χαρακτηρίζεται «ζωντανός» ένας πολυμερισμός που χρησιμοποιεί μέταλλα μετάπτωσης.



Σχήμα 2.7: Προτεινόμενος μηχανισμός για τον πολυμερισμό των NCAs με χρήση συμπλόκων των στοιχείων μεταπτώσεως

Το κυριότερο μειονέκτημα αυτού του μηχανισμού, είναι η παρουσία ιχνών των μετάλλων στα τελικά πολυπεπτίδια, καθιστώντας τα τοξικά και άρα αδύνατο να χρησιμοποιηθούν σε βιολογικές εφαρμογές. Επιπλέον, ο μηχανισμός αυτός εφαρμόζεται μόνο σε μη N-υποκατεστημένους NCAs, καθώς απαιτείται το πρωτόνιο στο 3-N.

2.3.2.5. Σύνθεση Πολυπεπτιδίων με Χρήση Πρωτοταγών Αμινών και Τεχνικών Υψηλού Κενού

Το 2004, η ερευνητική ομάδα των Iatrou και Hadjichristidis παρουσίασε τον πρώτο «ζωντανό πολυμερισμό» των NCAs, χρησιμοποιώντας πρωτοταγείς αμίνες ως απαρχητές ROP και τεχνικές υψηλού κενού (HVT).²⁶ Η αναγκαιότητα αυτών των τεχνικών οφείλεται στην ευαισθησία των απαρχητών και των μακροανιόντων που δημιουργούνται, στα ίχνη του νερού, του διοξειδίου του άνθρακα, του οξυγόνου και άλλων δραστικών προσμίξεων. Η χρήση αυτών των τεχνικών είναι επίσης αποτελεσματική σε περιπτώσεις που η διάρκεια της αντίδρασης είναι αρκετά μεγάλη.

Η τεχνική του υψηλού κενού, αντιμετωπίζει επαρκώς όλες εκείνες τις αδυναμίες του μηχανισμού NAM που προαναφέρθηκαν. Οι περιορισμοί του NAM έγκεινται κυρίως στην ευαισθησία του σε προσμίξεις, όπως τα υδροχλωρικά άλατα και ακυλοχλωρίδια που προέρχονται από τη σύνθεση των NCAs, που οδηγούν σε αντιδράσεις τερματισμού, όπως επίσης και στην ύπαρξη άλλων ειδών που μπορούν δυνητικά να εκκινήσουν τον πολυμερισμό (νερό και άλλες αμίνες), δίνοντας έτσι πολυμερικά υλικά με μεγάλες κατανομές μοριακών βαρών. Συνεπώς, ο ενδεδειγμένος καθαρισμός των μονομερών κρίνεται απαραίτητος και είναι δυνατό να επιτευχθεί τηρώντας αυστηρά τα πρωτόκολλα καθαρισμού για όλα τα επιμέρους αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται κατά τη σύνθεσή τους. Οι περισσότεροι NCAs βρίσκονται σε στερεή μορφή και απαιτούν προσεκτικές επαναλαμβανόμενες ανακρυσταλλώσεις υπό κενό για τον καθαρισμό τους, οι οποίες πρέπει να προηγούνται του πολυμερισμού. Μετά το πέρας της αντίδρασης, σύμφωνα με τα παραπάνω, κρίνεται αναγκαία η ποσοτική απομάκρυνση του παραγόμενου υδροχλωρίου αλλά και του τριφωσγενίου, που δεν αντέδρασε με το πρόδρομο αμινοξύ, γεγονός που επιτυγχάνεται με τη χρήση του υψηλού κενού.

Επιπλέον, με την χρήση υψηλού κενού επιτυγχάνεται η συνεχής απομάκρυνση του παραγόμενου CO₂, οδηγώντας την αντίδραση του πολυμερισμού προς τα προϊόντα μέσω της αποκαρβοξυλίωσης του καρβαμιδικού ενδιάμεσου. Λόγω της μικρής διαλυτότητας του διοξειδίου του άνθρακα σε διαλύτες όπως το DMF, η αποκαρβοξυλίωση του καρβαμιδικού οξέος δεν συμβαίνει ακαριαία, με αποτέλεσμα ορισμένα ενεργά κέντρα να παραμένουν όπως είναι και άλλα να δημιουργούν άλατα με τις ενεργές αμινομάδες. Και στις δυο περιπτώσεις οι δομές που δημιουργούνται είναι απενεργοποιημένες, και οδηγούν σε αντιδράσεις τερματισμού και σε μη ολοκληρωμένο πολυμερισμό. Με την χρήση ειδικών αντιδραστήρων πολυμερισμού, με όγκο τουλάχιστον τρεις φορές μεγαλύτερο από το εκλούμενο διοξείδιο του άνθρακα, αποφεύγεται ο σχηματισμός καρβαμιδικών αλάτων με τα αμινοτελικά άκρα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, λόγω της γρηγορότερης αποκαρβοξυλίωσης που συμβαίνει στο σύστημα.

Η τεχνική αυτή είναι γενική και έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για τον πολυμερισμό υποκατεστημένων όσο και μη υποκατεστημένων μονομερών. Με χρήση πρωτοταγών αμινών ευνοείται αποκλειστικά ο κανονικός μηχανισμός αμινών, ενώ τα προϊόντα έχουν μεγάλη συνθετική ομοιογένεια και υψηλές αποδόσεις. Επίσης μέσω αυτής της τεχνικής μπορούν να συντεθούν πολυπεπτιδικά πολυμερή από μία πληθώρα μονομερών που διαθέτουν πολύπλοκη μακρομοριακή αρχιτεκτονική (συμπολυμερή, αστεροειδή αλλά και υβριδικά πολυπεπτίδια). Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, η παρούσα πειραματική μελέτη βασίστηκε πάνω στην τεχνική του υψηλού κενού και στην εφαρμογή της στο πεδίο των πολυπεπτιδίων. Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί επίσης και ορισμένες πιο πρόσφατες αλλά λιγότερο διαδεδομένες

μεθοδολογίες για τη σύνθεση πολυπεπτιδικών δομών, όπως ο πολυμερισμός με χρήση τριμεθυλοπυριτικών αμινών ή με χρήση υδροχλωρικών αλάτων πρωτοταγών αμινοτελικών μακροαπαρχητών (μέθοδος Schlaad), που ουσιαστικά αποτελούν παραλλαγές των μηχανισμών που αναλύθηκαν.

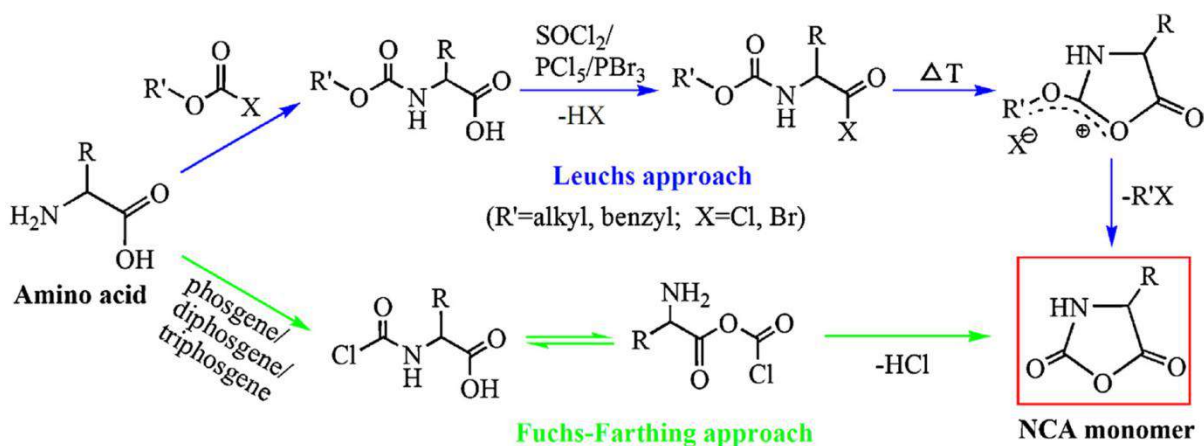
2.4. Σύνθεση N-Καρβοξυ Ανυδριτών των α -Αμινοξέων (NCAs) ^{14,27}

Οι N-καρβοξυ ανυδρίτες των α -αμινοξέων (N-carboxy anhydrides, NCAs) περιγράφηκαν για πρώτη φορά από τον Leuchs, το 1906. Επίσης ο Leuchs παρατήρησε τον πολυμερισμό τους και κατάφερε να απομονώσει το πρώτο συνθετικό πολυπεπτίδιο. Η συγκεκριμένη μέθοδος, περιλαμβάνει την αντίδραση κυκλοποίησης των προστατευμένων N-αλκοξυκαρβονυλοαμινοαλογονιδίων, υπό παρατεταμένη θερμοκρασία 70-90 °C (Σχήμα 2.8). Το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι στις υψηλές αυτές θερμοκρασίες μπορεί να πραγματοποιηθεί αποσύνθεση των NCAs και διάνοιξη του δακτυλίου.^{27,28}

Οι βελτιώσεις που επήλθαν αφορούσαν αντιδραστήρια, με τα οποία θα γινόταν σε χαμηλότερες θερμοκρασίες η δημιουργία του αλογονιδίου οξέος. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε το θειόνυλο χλωρίδιο (SOCl₂) από τον ίδιο τον Leuchs. Εν συνεχεία, δοκιμάστηκε το πενταχλωρίδιο του φωσφόρου, που ήταν δραστικότερο αλλά έδινε ως παραπροϊόν το αντίστοιχο οξείδιο και είχε επίδραση στην κρυστάλλωση του ανυδρίτη, ενώ το ισχυρότερο μέσω αλογόνωσης της καρβοξυλομάδας του αμινοξέος που χρησιμοποιήθηκε ήταν το τριβρωμίδιο του φωσφόρου (PBr₃). Επιπλέον, στην τελευταία περίπτωση το ανιόν του βρωμίου είναι καλύτερη αποχωρούσα ομάδα από το αντίστοιχο του χλωρίου στο στάδιο της κυκλοποίησης, αλλά και καλύτερο πυρηνόφιλο για το τελικό στάδιο. Συνεπώς η συνολική αντίδραση προχωράει γρηγορότερα και σε θερμοκρασίες μικρότερες από 25 °C. Όσον αφορά τον υποκαταστάτη R', ο Leuchs είχε παρατηρήσει ότι τα μεθόξυ- αντιδρούσαν πιο εύκολα από τα αντίστοιχα αιθοξυκαρβονυλοάμινο χλωρίδια οξέων, αποδεικνύοντας ότι το καθοριστικό (αργό) στάδιο της αντίδρασης είναι η αλκυλίωση του ιόντος αλογόνου.

Ωστόσο, η πιο διαδεδομένη μέθοδος για την προετοιμασία των NCAs, είναι η αντίδραση των αμινοξέων με φωσγένιο. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε αρχικά από τον Fuchs για την παρασκευή του NCA της N-φαινυλογλυκίνης και τροποποιήθηκε ακολούθως από τους Farthing, Coleman και Levy ώστε να εφαρμοστεί στη σύνθεση ενός μεγάλου εύρους NCAs. Η ονομασία που έχει επικρατήσει βιβλιογραφικά για την προσέγγιση αυτή είναι μέθοδος “Fuchs-Farthing”.^{29,30} Η συγκεκριμένη διαδικασία περιλαμβάνει ένα μόνο στάδιο, όπου στο πρώτο βήμα

της αντίδρασης το ελεύθερο αμινοξύ αντιδρά με το φωσγένιο, σχηματίζοντας πολύ γρήγορα το ενδιάμεσο N-χλωροφορμυλο αμινοξύ (συνήθως δεν απομονώνεται), το οποίο ακολούθως μετατρέπεται σε N-καρβοξυ ανυδρίτη, ενώ πραγματοποιείται και ταυτόχρονη παραγωγή HCl (Σχήμα 2.8). Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται διότι οι ανυδρίτες είναι διαλυτοί στους περισσότερους απρωτικούς πολικούς διαλύτες, ενώ τα ελεύθερα αμινοξέα είναι αδιάλυτα. Καθοριστικό ρόλο στην αντίδραση διαδραματίζουν ο διαλύτης, η θερμοκρασία αλλά και ο χρόνος της αντίδρασης.

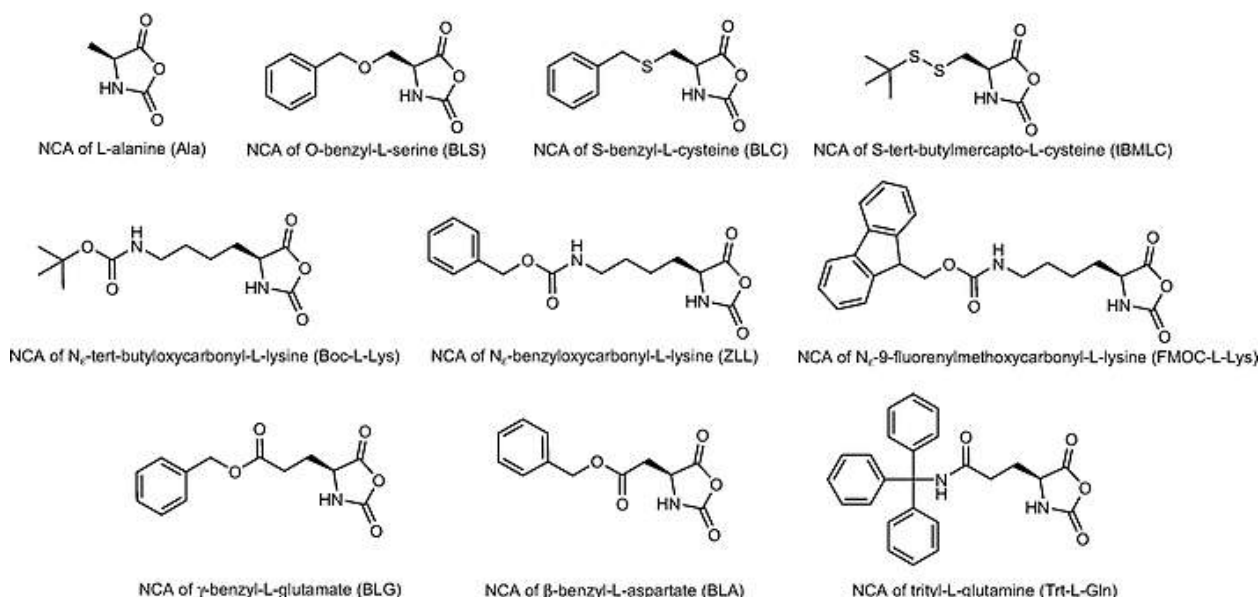


Σχήμα 2.8: Μέθοδοι “Leuchs” και “Fuchs-Farthing” για τη σύνθεση των N-καρβοξυ ανυδριτών

Το φωσγένιο, όμως, είναι ένα ιδιαίτερα δραστικό και τοξικό αντιδραστήριο, η μεταχείρισή του ακόμα και σε εργαστηριακή κλίμακα χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή. Επιπλέον είναι δύσκολο, λόγω της αέριας φύσης του, να τηρηθεί απόλυτα η στοιχειομετρία στις αντιδράσεις που συμμετέχει. Για το λόγο αυτό έχουν συχνά χρησιμοποιηθεί στην οργανική σύνθεση ως πηγές φωσγενίου, το τριχλωρομέθυλο- χλωροφορμικό (ή διφωσγένιο) και το δις(τριχλωρομέθυλο)- ανθρακικό (ή τριφωσγένιο). Το διφωσγένιο είναι υγρό ενώ αντίστοιχα το τριφωσγένιο είναι κρυσταλλικό στερεό, γεγονός που επιτρέπει την ευκολότερη και ασφαλέστερη χρησιμοποίησή τους, ως πρόδρομες ενώσεις δυο και τριών μορίων φωσγενίου. Στην σύνθεση των NCAs έχει επικρατήσει η χρήση του τριφωσγενίου, δίνοντας μονομερή υψηλής απόδοσης και καθαρότητας.

Οι παράπλευρες αντιδράσεις κατά τη σύνθεση ενός NCA περιλαμβάνουν κυρίως την διάνοιξη του δακτυλίου του τελικού προϊόντος και λαμβάνουν χώρα λόγω αυξημένης θερμοκρασίας, αυξημένου χρόνου αντίδρασης ή υψηλής συγκέντρωσης παραγόμενου υδροχλωρίου. Στις περισσότερες περιπτώσεις χαμηλής απόδοσης ανυδρίτη, το παραγόμενο HCl πρωτονιώνει την αμινομάδα κάποιων αμινοξέων, σχηματίζοντας άλας και εμποδίζοντας με αυτό

τον τρόπο το κλείσιμο του δακτυλίου. Ακόμα όμως και να σχηματιστεί ο δακτύλιος είναι πιθανό να επέλθει διάνοιξη του σε αυξημένες συγκεντρώσεις HCl. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιούνται βάσεις (όπως η Et₃N), ή ενώσεις της οικογένειας των πινενίων (όπως το D,L-λιμονένιο) ως αντιδραστήρια δέσμευσης του παραγόμενου HCl για την διευκόλυνση σχηματισμού του δακτυλίου του NCA. Τα τελευταία 15 χρόνια, έχει συντεθεί ένας πολύ μεγάλος αριθμός NCAs όλων των βασικών αμινοξέων αλλά και αρκετών παραγώγων τους, ορισμένοι εκ των οποίων παρατίθενται στην Εικόνα 2.5.³¹ Αναγκαία κρίνεται η χρησιμοποίηση διάφορων προστατευτικών ομάδων για τις δραστικές πλευρικές ομάδες των αμινοξέων, έτσι ώστε να αποφεύγονται παράπλευρες αντιδράσεις κατά τη διάρκεια της σύνθεσης των μονομερών και του πολυμερισμού.



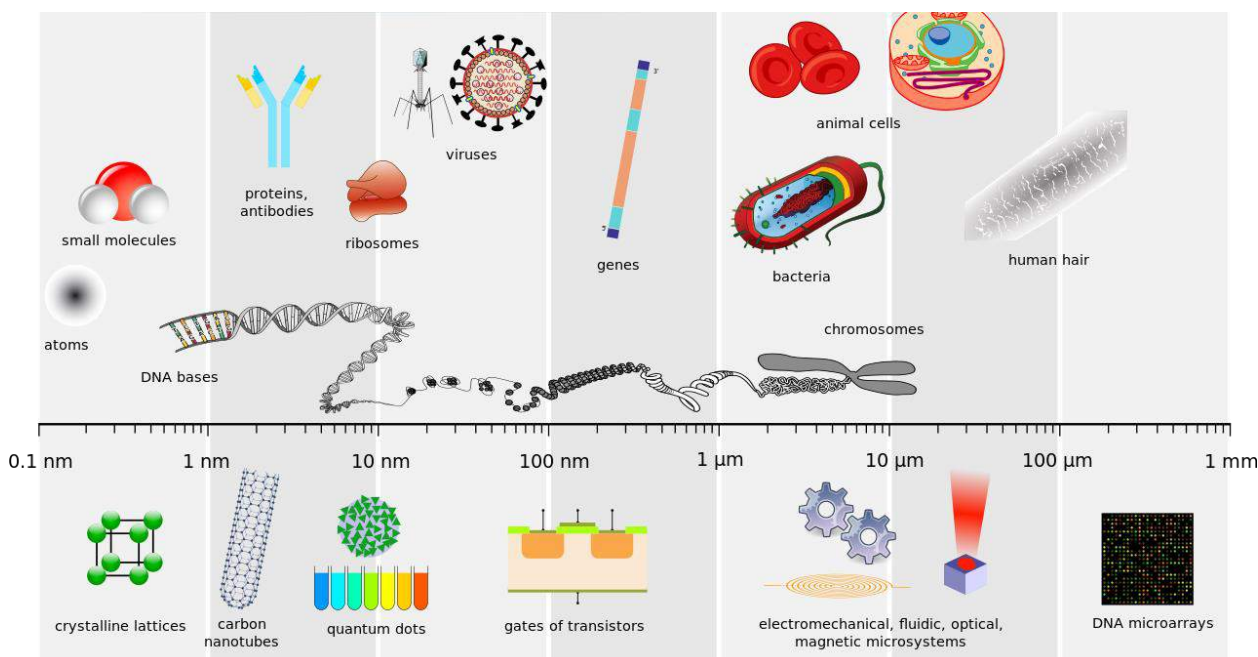
Εικόνα 2.5: Χαρακτηριστικοί NCAs διάφορων αμινοξέων που έχουν συντεθεί εργαστηριακά

2.5. Νανοτεχνολογία και Στοχευμένη Μεταφορά Φαρμάκων

2.5.1. Νανοτεχνολογία και Εφαρμογές της

Με τον όρο «νανοτεχνολογία» περιγράφεται ο τομέας της επιστήμης που αφορά την ανάπτυξη και χρήση υλικών με τα οποία μπορούν να παρασκευασθούν και να χρησιμοποιηθούν συσκευές και προϊόντα τα οποία να έχουν διαστάσεις της τάξης του δισεκατομμυριοστού του μέτρου (διαστάσεις τάξης μεγέθους μερικών δεκάδων ατόμων), δηλαδή δομές που δεν υπακούουν στους νόμους της Κλασσικής Μηχανικής, αλλά της Κβαντομηχανικής (Εικόνα

2.6).³² Τα νανοσωματίδια και τα νανοϋλικά παρουσιάζουν καινοτόμες ιδιότητες που εξαρτώνται από το μέγεθός τους. Στην επιστήμη και την τεχνολογία, το πρόθεμα «nano-» (από την ελληνική λέξη νάνος) σημαίνει 10^{-9} ($=0.000000001$). Ένα νανόμετρο (nm) ισούται με ένα δισεκατομμυριοστό του μέτρου. Στην παρούσα εργασία ο όρος νανοτεχνολογία χρησιμοποιείται ως περιληπτικός όρος, καλύπτοντας τους διαφόρους κλάδους νανοεπιστημών που σχετίζονται με την χημεία των πολυμερών.



Εικόνα 2.6: Χαρακτηριστικά μεγέθη μορίων, νανοϋλικών και βιολογικών οντοτήτων

Η νανοτεχνολογία αναφέρεται στην επιστήμη και τεχνολογία που αναπτύσσεται σε κλίμακα μορίων και υπερμοριακών συστημάτων (νανοκλίμακα), καθώς και σε επιστημονικές αρχές και νέες ιδιότητες με στόχο την εις βάθος κατανόηση των λειτουργιών και των δυνατοτήτων της ύλης σε αυτή την κλίμακα μεγέθους. Ταυτόχρονα, με την εξέλιξη και άλλων επιστημών, η νανοτεχνολογία αναμένεται να σημειώσει σημαντική πρόοδο την επόμενη δεκαετία στην ανάπτυξη βιοϊατρικών εφαρμογών, όπως η γονιδιακή θεραπεία, η στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων και η ανακάλυψη νέων καινοτόμων φαρμακευτικών ουσιών.

Η νανοτεχνολογία βρίσκει εφαρμογή σε ένα ευρύ πεδίο επιστημών όπως είναι η ενέργεια, η μικροηλεκτρονική και η μηχανική. Στην παρούσα εργασία θα μελετηθούν οι βιολογικές και βιοϊατρικές εφαρμογές της.³³⁻³⁵ Συγκεκριμένα, οι τομείς της ιατρικής και φαρμακευτικής που μπορεί να βρει εφαρμογή η νανοτεχνολογία είναι οι ακόλουθοι:

- Στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων (Drug delivery): Τα οχήματα μεταφοράς φαρμάκων, που το μέγεθος τους βρίσκεται στη νανοκλίμακα, μπορούν: α) να ενισχύσουν τη θεραπευτική ικανότητα ενός φαρμάκου, μειώνοντας τις παρενέργειες, που σχετίζονται με τα ήδη διαθέσιμα φάρμακα, β) να προωθήσουν την επαναδιερεύνηση νέων μοριακών οντοτήτων, που δεν μπορούν να χορηγηθούν απευθείας στον άνθρωπο, λόγω των μη βέλτιστων φαρμακολογικών ιδιοτήτων, που όμως, είναι βιολογικά ενεργές αλλά μέχρι στιγμής θεωρούνται μη αναπτύξιμες.³⁶
- Διαγνωστική: Οι νανο-«αισθητήρες» (όπως νανοσωλήνες άνθρακα ή άλλα νανοσωματίδια), μπορούν να επιτρέψουν τη γρήγορη και αποδοτική ανίχνευση των βιοδεικτών μίας νόσου, με πολύ μεγάλη ευαισθησία και με απαίτηση μικρής ποσότητας δείγματος. Επιπλέον, η νανοτεχνολογία δίνει ελπίδα για την έγκαιρη διάγνωση ιών, βακτηρίων αλλά και καρκινικών κυττάρων.
- Θεραπευτικές τεχνικές: Ορισμένα νανοϋλικά, έχουν μοναδικές θεραπευτικές ιδιότητες, που διαφέρουν από τα συνηθισμένα φάρμακα, όπως τα νανοσωματίδια χρυσού που μπορούν να ενισχύσουν την ακτινοθεραπεία, οι νανοσωλήνες άνθρακα και τα μαγνητικά νανοσωματίδια που μπορούν να προκαλέσουν υπερθερμία και να καταστρέψουν καρκινικά κύτταρα, ή τα νανοσωματίδια αργύρου που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντιμικροβιακοί παράγοντες.
- In vivo απεικόνιση: Η χρήση μορίων-στοχευμένων «διερευνητών», όπως είναι τα μαγνητικά νανοσωματίδια, μπορεί να παρέχει έγκυρο και ακριβή τρόπο διάγνωσης ασθενειών όπως ο καρκίνος καθώς και δυνατότητα παρακολούθησης της εξέλιξης μίας νόσου.
- Βιοϋλικά: Βιοσυμβατά νανοϋλικά που έχουν πολύ καλές μηχανικές ιδιότητες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ιατρικά εμφυτεύματα, στην οδοντιατρική ή ως υποκατάστατα οστών και εμφυτεύματα ιστών.

2.5.2. Στοχευμένη Μεταφορά Φαρμάκων μέσω Πολυμερικών Υλικών

Η τεχνολογία ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμακευτικών ουσιών αποτελεί μία από τις ταχύτερα αναπτυσσόμενες επιστημονικές περιοχές, εξαιτίας των πολλαπλών πλεονεκτημάτων που παρουσιάζει σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους δοσολογίας. Η μη εκλεκτική κυτταροτοξικότητα που εμφανίζουν τα αντικαρκινικά φάρμακα, που είναι η αιτία για τις σοβαρές παρενέργειες και τη χαμηλή ποιότητα ζωής των ασθενών, είναι αυτή που οδήγησε να στραφούν οι ερευνητές στη δημιουργία «μορίων-οχημάτων», που θα μεταφέρουν μία

φαρμακευτική ουσία και θα την απελευθερώνουν στοχευμένα στους πάσχοντες ιστούς και κύτταρα.³⁷

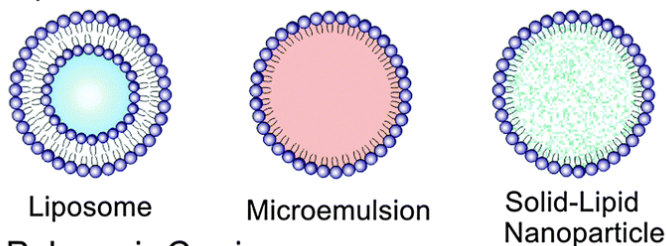
Επιπλέον, όλες οι νέες μοριακές οντότητες που εισάγονται στη φαρμακοβιομηχανία, κρίνονται όχι για την ισχυρή τους δραστηριότητα, που είναι και το ζητούμενο, αλλά για τη διαλυτότητά τους στο νερό ή το χρόνο ζωής τους στο αίμα. Αυτό συμβαίνει διότι όσο μεγάλη κι αν είναι η δραστηριότητα ενός μορίου, είναι πρακτικά άχρηστη όταν αυτό δεν μπορεί να κυκλοφορήσει στο αίμα. Έτσι, λιγότερο δραστικές ουσίες, αλλά με χαρακτηριστικά που να μπορούν να εισέλθουν στον ανθρώπινο οργανισμό, προτιμούνται για εξέλιξη και περαιτέρω διερεύνηση. Σε κάθε περίπτωση, υπάρχει πάντα ένα επίπεδο συμβιβασμού, που μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή μη ιδανικών φαρμάκων. Έτσι, η ανάγκη να μεταφέρονται στοχευμένα σε συγκεκριμένα κύτταρα και ιστούς, φαρμακευτικές ουσίες, ξεπερνώντας τα εμπόδια που βάζει ο οργανισμός σε οτιδήποτε ξένο προς τον ίδιο, αποτέλεσε το κίνητρο για την εκτενή έρευνα στο πεδίο που ονομάζεται “drug delivery”. Οι νανοφορείς φαρμάκων μακράς κυκλοφορίας χρησιμοποιούνται για να διατηρήσουν το απαιτούμενο επίπεδο της φαρμακευτικής ουσίας στο αίμα για εκτεταμένα χρονικά διαστήματα με σκοπό την αποτελεσματικότερη δράση του φαρμάκου.³⁸⁻⁴⁰

Το 1960 ήταν η πρώτη φορά που περιγράφηκαν τα λιποσώματα, και προτάθηκαν ως μεταφορείς φαρμάκων και πρωτεϊνών. Σήμερα, η νανοτεχνολογία έχει κάνει άλματα στην ανάπτυξη τέτοιων συστημάτων. Συγκεκριμένα, για το σκοπό αυτό έχουν σχεδιαστεί βιοαποικοδομήσιμα πολυμερικά νανοσωματίδια, πολυμερικά μικκύλια, δενδριμερή κ.ά.. Τα νανοσωματίδια ή τα μακρομοριακά συσσωματώματα μακράς κυκλοφορίας όταν διαθέτουν τους κατάλληλους υποδοχείς, συσσωρεύονται σταδιακά στις παθολογικές θέσεις (καρκινικοί όγκοι, φλεγμονές κλπ) και βελτιώνουν ή ενισχύουν την αποδέσμευση των φαρμάκων στις περιοχές αυτές.⁴¹

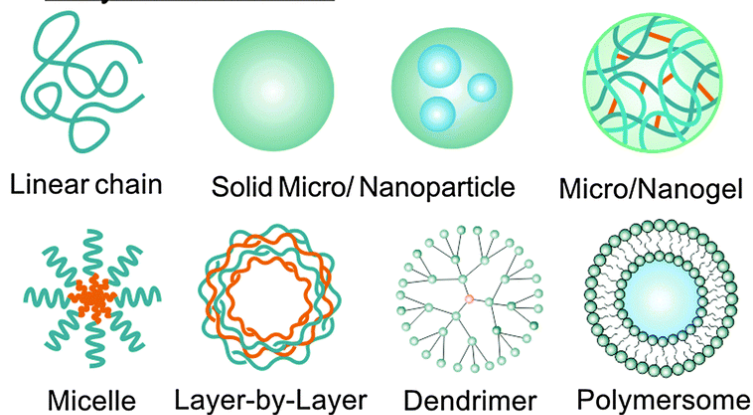
Η μεταφορά ενός φαρμάκου μέσω ειδικά σχεδιασμένων υπερμοριακών δομών, επιδιώκει να εξασφαλίσει την αύξηση του χρόνου παραμονής του στο αίμα, τη βελτίωση της διαλυτότητας του όταν πρόκειται για υδρόφοβο φάρμακο, τη μείωση της ανοσογονικότητας και τη μεταφορά του σε συγκεκριμένο στόχο. Η κυκλοφορία των δραστικών ουσιών για μακρό χρονικό διάστημα μπορεί να συντελέσει στην καλύτερη στόχευση, εφόσον αυξάνει τη συνολική ποσότητα του φορέα που συναντά το στόχο και τον αριθμό των αλληλεπιδράσεων μεταξύ φαρμάκου και περιοχής δράσης του. Έτσι ο όρος «drug delivery», περιλαμβάνει το σχεδιασμό και τη σύνθεση μορίων με χημικά χαρακτηριστικά τέτοια που να μπορέσουν να τα φέρουν όσο πιο κοντά στο κύτταρο-στόχο, αλλά και να τα καταστήσουν ικανά να εγκλωβίσουν ένα φάρμακο.⁴²

Για τη βελτίωση της εξειδικευμένης αποδέσμευσης των φαρμάκων έχουν αναπτυχθεί διάφοροι φορείς, όπως τα λιποσώματα, τα ανόργανα νανοσωματίδια, τα νανοσυσσωματώματα και τα πολυμερικά μικκύλια και κυστίδια (Εικόνα 2.7).⁴³ Πρόσφατα τα πολυμερικά μικκύλια (micelles) αποτέλεσαν το αντικείμενο έντονης ερευνητικής απασχόλησης. Τα μικκύλια είναι δομές της μορφής κορώνα/πυρήνας που συνήθως σχηματίζονται από αμφίφιλα κατά συστάδες πολυμερή και έχουν πάχος μόνο μερικά νανόμετρα, οι οποίες μπορούν να παίξουν σημαντικό ρόλο ως “νανομεταφορείς”. Έχουν αναδειχθεί ως δυνητικοί φορείς φαρμακευτικών ουσιών αδιάλυτων στο νερό, εξαιτίας της ικανότητάς τους να εγκλωβίζουν τις ουσίες αυτές στο υδρόφοβο τμήμα τους λόγω χημικής συγγένειας, προστατεύοντας τις με τις εξωτερικές υδατοδιαλυτές πολυμερικές αλυσίδες που διαθέτουν. Η ενσωμάτωση των φαρμάκων στις μικκυλιακές δομές πραγματοποιείται είτε με τη μέθοδο της διαπίδυσης (dialysis), με τη μέθοδο της διαλυτοποίησης-εξάτμισης ή μέσω της μεθόδου σχηματισμού λεπτών υμενίων (thin-film).⁴⁴

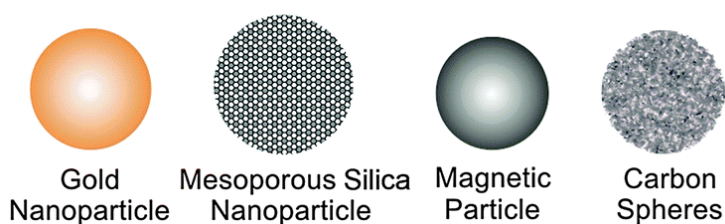
A Lipid-based Carriers



B Polymeric Carriers



C Inorganic Carriers



Εικόνα 2.7: Κυριότεροι νανοφορείς φαρμακευτικών ουσιών βασισμένοι σε πολυμερικά υλικά και ανόργανα νανοσωματίδια

Οι μικκυλιακές δομές, ως φορείς φαρμάκων προσφέρουν μερικά πολύ σημαντικά πλεονεκτήματα. Έχουν την ικανότητα να εγκλωβίζουν μη υδατοδιαλυτά φάρμακα, αυξάνοντας έτσι τη βιοδιαθεσιμότητα τους και έχουν μικρό σχετικά μέγεθος (έως 200 nm) αποτρέποντας την καταστροφή τους από τα φαγοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Έτσι μπορούν να παραμείνουν στο αίμα για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα παρέχοντας σταδιακή συσσώματωση της δραστικής ουσίας στην επιθυμητή περιοχή. Επιπλέον είναι δυνατό να παρασκευασθούν σε σχετικά μεγάλες ποσότητες εύκολα και επαναλήψιμα. Ωστόσο, η πιο σημαντική εφαρμογή τους είναι η χορήγηση αντικαρκινικών φαρμάκων χωρίς την εκδήλωση των ανεπιθύμητων παρενεργειών που μπορεί να εκδηλωθούν στον ανθρώπινο οργανισμό αν αυτά εισαχθούν ελεύθερα στο κυκλοφορικό σύστημα.^{44,45}

Τα υλικά που δομούνται από πολυπεπτίδια είναι ιδανικά για συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, χάρη στη βιοσυμβατότητα και τη βιοαποικοδομησιμότητα τους, την αρχιτεκτονική της δομής τους και διότι είναι ικανά να σχηματίζουν χαρακτηριστικές δευτεροταγείς δομές. Τα αμφίφιλα πολυπεπτιδικά υλικά μπορούν να αυτο-οργανώνονται, σε μια πληθώρα από διαφορετικές αρχιτεκτονικές μέσα από ετεροπολικές αλληλεπιδράσεις, έχοντας την ικανότητα να εγκλωβίζουν και να μεταφέρουν φάρμακα. Υιοθετώντας συγκεκριμένες διαμορφώσεις, όπως η α -έλικα ή το β -φύλλο, είναι πιο πιθανό να σχηματίσουν συγκεκριμένες επιθυμητές νανοδομές. Η αυτο-οργάνωση των αμφίφιλων πολυμερών μπορεί να καθοριστεί αν ελεγχθούν παράγοντες όπως η αναλογία των υδρόφοβων-υδρόφιλων συστατικών, το μοριακό βάρος και η χημική φύση των πολυμερών. Μέχρι στιγμής έχει δημοσιευτεί μία σειρά από νανοσυστήματα μεταφοράς φαρμάκων που βασίζονται στα πολυπεπτίδια, ενώ ήδη πολλά από αυτά τα συστήματα βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές.^{14,46}

Υπό διερεύνηση και διαρκή μελέτη βρίσκεται επίσης η ανάπτυξη της μεθοδολογίας έτσι ώστε το τελικό προϊόν σε ένα σύστημα μεταφοράς φαρμάκων, να έχει επιπρόσθετα χαρακτηριστικά εκτός από τη βιοσυμβατότητα. Τέτοιες επιθυμητές ιδιότητες είναι να παραμένει σταθερό όταν διαλύεται σε βιολογικά μέσα, να έχει ιδιότητες που το καθιστούν «αόρατο» για το ενδοθηλιακό δίκτυο και να κατευθύνεται εκλεκτικά σε συγκεκριμένα κύτταρα-στόχους.⁴⁷

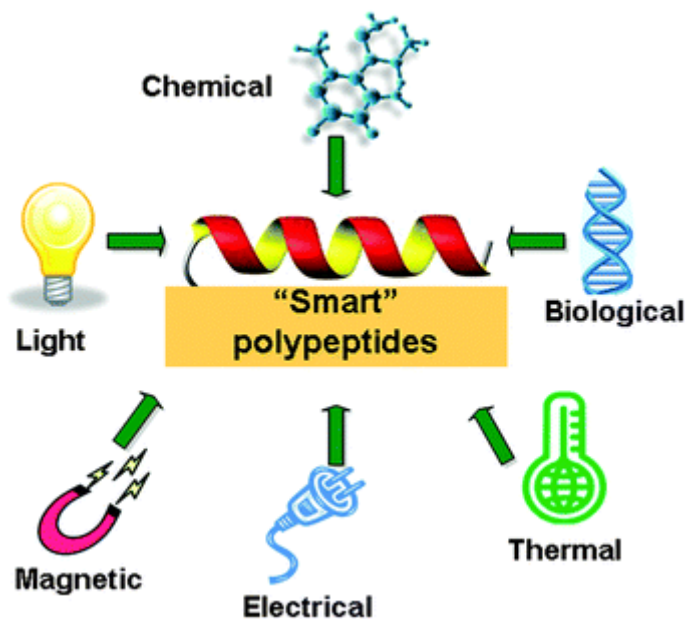
2.6. Πολυπεπτιδικά Συστήματα Μεταφοράς Φαρμάκων Αποκρινόμενα σε Εξωτερικά Ερεθίσματα⁴⁸⁻⁵⁰

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, το

δυναμικό οξειδοαναγωγής, το φως και η ιοντική ισχύς) και να δημιουργούν πολυμοριακά συσσωματώματα, όπως σφαιρικά και κυλινδρικά μικκύλια, κυστιδιακές δομές (vesicles), σύμπλοκα πολυηλεκτρολυτών και «σχιζοφρενικά» μικκύλια. Το ενδιαφέρον για αυτά τα πολυμερή έχει αυξηθεί σημαντικά λόγω των δυνητικών εφαρμογών στη βιομηχανία των χρωμάτων, των καλλυντικών, τον καθαρισμό του νερού, αλλά κυριότερα στο πεδίο της βιοϊατρικής.

Ως αποκρίσιμα σε εξωτερικά ερεθίσματα ορίζονται τα πολυμερή που υφίστανται σημαντικές και άμεσες φυσικές ή χημικές μεταβολές αποκρινόμενα σε μικρές εξωτερικές αλλαγές των περιβαλλοντικών συνθηκών. Σε αυτά τα πολυμερή έχουν δοθεί διάφορες ονομασίες όπως αποκρίσιμα, έξυπνα και περιβαλλοντικά ευαίσθητα (ενώ στα αγγλικά επικρατεί ο όρος “stimuli-responsive”). Αυτά τα συστήματα αναγνωρίζουν κάποιο 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 φυσικά. Τα χημικά ερεθίσματα, όπως το pH και η ιοντική ισχύς, 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 διαμοριακές αλληλεπιδράσεις. Η μεγάλη ποικιλομορφία των πλευρικών ομάδων των πολυπεπτιδίων, τα καθιστά άριστα πολυμερή που διαθέτουν την ικανότητα να αποκρίνονται σε εξωτερικά ερεθίσματα. Για το λόγο αυτό βρίσκουν τεράστια απήχηση σε εφαρμογές που απαιτείται η χρήση «έξυπνων» αποκρινόμενων υλικών, επιλέγοντας αντίστοιχα αμινοξέα που να εξυπηρετούν τις εκάστοτε ανάγκες (Εικόνα 2.8).

Αυτές οι αποκρίσεις των πολυμερικών και ειδικότερα των πολυπεπτιδικών συστημάτων είναι πολύ χρήσιμες σε βιολογικές εφαρμογές, όπως στη στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων, στη βιοτεχνολογία και στη χρωματογραφία. Επιπλέον, ορισμένα πολυμερικά συστήματα έχουν την ικανότητα να είναι πολλαπλά αποκρίσιμα (multi-stimuli responsive), καθώς συνδυάζουν την αποκρισημότητα σε δυο ή περισσότερα εξωτερικά 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 ώστε να υπάρξει απόκριση από το προς μελέτη πολυμερές. Μία καινούργια κατηγορία εξωτερικού ερεθίσματος που συναντάται στη βιβλιογραφία τα τελευταία χρόνια, θεωρείται το βιοχημικό ερέθισμα, το οποίο περιλαμβάνει απόκριση σε αντιγόνα, ένζυμα, υποκαταστάτες ή/και βιοχημικούς παράγοντες.



Εικόνα 2.8: Τα κυριότερα εξωτερικά ερεθίσματα που προκαλούν απόκριση στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες

2.6.1. pH-Αποκρινόμενα Πολυπεπτιδικά Συστήματα Μεταφοράς Φαρμάκων

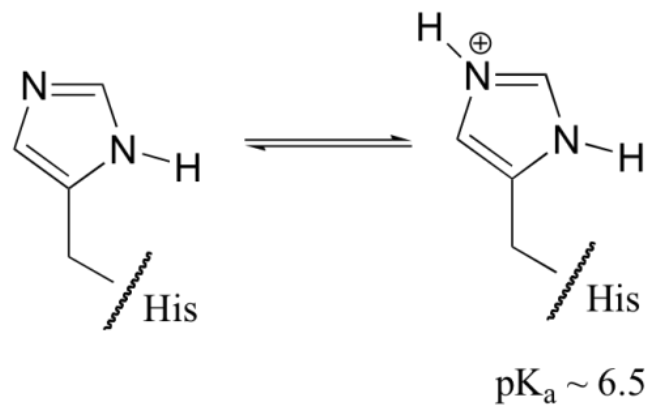
Είναι γνωστό ότι οι τιμές του pH διαφέρουν σε διαφορετικούς ιστούς και διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό. Οι περισσότεροι καρκινικοί ιστοί, καθώς είναι ιστοί που φλεγμαίνουν, παρουσιάζουν διαφορετικό pH από αυτό που έχουν οι φυσιολογικοί ιστοί. Συνήθως το pH των καρκινικών κυττάρων είναι όξινο και αρκετά χαμηλότερο του φυσιολογικού. Συγκεκριμένα, το pH στο εξωτερικό περιβάλλον ενός καρκινικού κυττάρου είναι περίπου 6.5, συνεπώς πιο όξινο από τους γειτονικούς φυσιολογικούς ιστούς που έχουν pH=7.4. Ενώ το pH μέσα σε ένα καρκινικό κύτταρο, και συγκεκριμένα στα λυσοσώματα και τα ενδοσώματα, είναι 5.0 έως 5.5, και άρα πιο χαμηλό σε σχέση με το pH του κυτοσολίου. Συνεπώς έχει μεγάλη πρακτική σημασία να ληφθεί αυτός ο παράγοντας υπόψη για την ανάπτυξη και το σχεδιασμό πολυμερικών συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων που θα αποκρίνονται στις αλλαγές του pH. Δηλαδή, πιθανώς θα παρουσιάζουν αύξηση του μεγέθους τους σε συγκεκριμένη τιμή pH, ώστε να αποδεσμεύουν σε συγκεκριμένο σημείο του σώματος το φάρμακο που μεταφέρουν.⁵¹⁻⁵³

Τα πολυπεπτίδια που εμφανίζουν ευαισθησία στο pH αποτελούνται από μονομερή των οποίων οι πλευρικές ομάδες μπορούν να ιονιστούν, δηλαδή έχουν την ικανότητα να λαμβάνουν ή να παρέχουν πρωτόνια σε εξάρτηση με τη μεταβολή του pH. Καθώς το pH αλλάζει, ο βαθμός

ιοντισμού του πολυμερούς αλλάζει δραματικά γύρω από μια συγκεκριμένη τιμή pH, που ονομάζεται pKa και δίδεται από τον αρνητικό λογάριθμο της σταθεράς ισορροπίας ασθενούς οξέος ($pK_a = -\log K_a$). Αυτή η γρήγορη εναλλαγή στο συνολικό φορτίο της αλυσίδας προκαλεί μεταβολή του υδροδυναμικού όγκου των πολυμερικών αλυσίδων. Η μετάβαση από συρρικνωμένη σε πλήρως εκτεταμένη διαμόρφωση ερμηνεύεται από την οσμωτική πίεση που προκαλούν τα αντισταθμιστικά ιόντα των φορτίων των αλυσίδων.

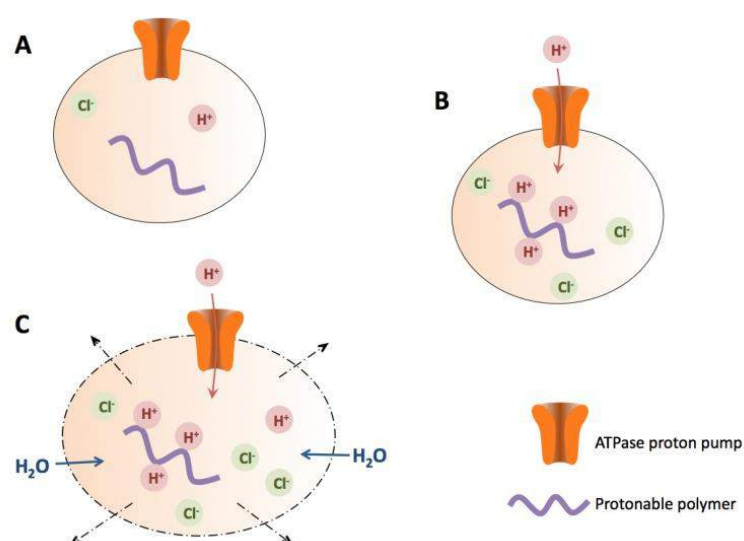
Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ένας μεγάλος αριθμός pH-αποκρινόμενων πολυπεπτιδικών νανοσυστημάτων, τα οποία συντίθενται από πολυμερή που φέρουν ασθενώς όξινες ομάδες (π.χ. καρβοξυλικές) ή ασθενώς βασικές (π.χ. αμινομαδές), και μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε ως δέκτες είτε ως δότες πρωτονίων (ή ως συνδυασμός των δύο). Οι μεταβολές του pH του περιβάλλοντος προάγουν την πρωτονίωση-αποπρωτονίωση των πολυπεπτιδίων που διαθέτουν αμινομάδες ή καρβοξυλικά οξέα στην πλευρική τους αλυσίδα. Τα πολυπεπτίδια οδηγούνται σε αντιστρεπτές μεταβολές στη διαμόρφωσή τους και στη συμπεριφορά της αυτο-οργάνωσής τους, κατά συνέπεια και της διαλυτότητας και της συσσωμάτωσής τους. Το πολυ(γ-βενζυλο-L-γλουταμικό οξύ) και η πολυ(L-λυσίνη) έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε pH-αποκρινόμενα συστήματα, ενώ εξέχουσα θέση κατέχει η πολυ(L-ιστιδίνη) (PHis), η οποία διαθέτει έναν ιμιδαζολικό δακτύλιο ανά δομική μονάδα που μπορεί να πρωτονιώνεται και να αποπρωτονιώνεται.^{48,52}

Η L-ιστιδίνη ως αμινοξύ παρουσιάζει τεράστιο ενδιαφέρον, καθώς το πολυμερές της αποτελεί ιδανικό πολυπεπτίδιο ως συστατικό σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων. Η ξεχωριστή ιδιότητα που διαθέτει είναι το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων στο μη υποκατεστημένο άζωτο του ιμιδαζολικού δακτυλίου, το οποίο προσδίδει στο μόριο $pK_a \sim 6.5$ και κατά συνέπεια pH-αποκρισιμότητα. Πρακτικά, αυτό για ένα σύστημα μεταφοράς φαρμάκων σημαίνει ότι σε $pH \sim 6.5$, δηλαδή το pH των καρκινικών κυττάρων, ο ιμιδαζολικός δακτύλιος της ιστιδίνης πρωτονιώνεται και προκαλείται διόγκωση στο σύστημα λόγω της αλλαγής της δευτεροταγούς δομής του πολυπεπτιδίου και άρα απελευθέρωση του φαρμάκου (Εικόνα 2.9). Αντίθετα, στους υγιείς ιστούς που έχουν τιμή $pH = 7.4$ το μόριο είναι αποπρωτονιομένο (υδρόφοβο) και απολύτως σταθερό. Επιπλέον, η πολυ(L-ιστιδίνη) μπορεί να φτιάχνει σταθερά πολυϊοντικά συμπλέγματα, με αρνητικά φορτισμένα μόρια όπως είναι το DNA ή διάφορα ένζυμα, μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Το γεγονός ότι σχηματίζει μη τοξικά και βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή, την κάνει ένα ιδανικό μέσο για να χρησιμοποιηθεί σε βιολογικούς και φαρμακευτικούς σκοπούς. Για τους παραπάνω λόγους, στην παρούσα εργασία επιλέχθηκε να συντεθούν πολυμερή βασισμένα στην PHis, που προκύπτουν από το μονομερές Trt-His-NCA, και έγινε προσπάθεια για δικτύωση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων προς σχηματισμό ανώτερων σταθερών μικκυλιακών δομών.^{6,52}



Εικόνα 2.9: Ο ιοντισμός του ιμιδαζολικού δακτυλίου της πολυ(L-ιστιδίνης)

Μια ακόμη πολύ ενδιαφέρουσα ιδιότητα που εμφανίζει τόσο η ιστιδίνη όσο και η πολυ(L-ιστιδίνη), είναι το λεγόμενο “proton sponge effect”, κατά το οποίο ένα πολυμερές εισέρχεται στο κύτταρο με τη διαδικασία της ενδοκύττωσης και στη συνέχεια παγιδεύεται στο ενδόσωμα. Με την μεμβράνη των ενδοσωμάτων είναι συνδεδεμένη μία αντλία πρωτονίων, η οποία τα εφοδιάζει συνεχώς με πρωτόνια, ειδικά όταν αντιληφθεί την ύπαρξη ξένου σώματος μέσα σε αυτά. Ένα πολυμερές όπως η πολυ(L-ιστιδίνη), που έχει τη δυνατότητα να πρωτονιωθεί, λαμβάνει αυτά τα πρωτόνια και έτσι η αντλία συνεχίζει να στέλνει πρωτόνια μέχρι να επιτευχθεί μείωση του pH. Η δράση αυτή της αντλίας, συνοδεύεται από παθητική είσοδο ιόντων χλωρίου, αυξάνοντας τη συγκέντρωση των ιόντων άρα και την εισροή νερού. Η υψηλή ωσμωτική πίεση, οδηγεί σε διόγκωση και τελικά σε ρήξη των ενδοσωμάτων, απελευθερώνοντας όλο το περιεχόμενο στο κυτοσόλιο (Εικόνα 2.10).⁵⁴



Εικόνα 2.10: Τρόπος λειτουργίας της αντλίας πρωτονίων κατά την είσοδο πολυμερούς στα ενδοσώματα ("proton sponge effect")

2.6.2. Θερμο-Αποκρινόμενα Πολυπεπτιδικά Συστήματα Μεταφοράς Φαρμάκων

Τα θερμο-αποκρινόμενα πολυμερή παρουσιάζουν μεταβολές των διαστάσεων τους σε μία συγκεκριμένη θερμοκρασία, η οποία είναι γνωστή ως θερμοκρασία μεταβατικής φάσης όγκου (volume phase transition temperature, VPTT), όπου προκαλείται ξαφνική αύξηση ή μείωση του μεγέθους του σωματιδίου. Επιπλέον, απαιτείται η θερμοκρασία μεταβατικής φάσης όγκου των πολυμερικών νανοσωματιδίων να είναι μεγαλύτερη από τη φυσιολογική θερμοκρασία του οργανισμού (37 °C), όπως η θερμοκρασία που αναπτύσσουν τα καρκινικά κύτταρα που φλεγμαίνουν (41 °C), έτσι ώστε τα κύτταρα αυτά να αποτελέσουν στόχο.⁴⁸

Χαρακτηριστικά παραδείγματα θερμο-αποκρινόμενων πολυπεπτιδίων, αποτελούν μία σειρά από αμφίφιλα υβριδικά συμπολυμερή που συντέθηκαν από την ερευνητική ομάδα του Jeong, του γενικού τύπου πολυ(αιθυλενοξείδιο)-*b*-πολυ(αλανίνη-co-φαινυλαλανίνη), πολυ(αιθυλενοξείδιο)-*b*-πολυ(φαινυλαλανίνη) και πολυ(αιθυλενοξείδιο)-*b*-πολυ(αλανίνη).^{55,56} Από τις συγκεκριμένες μελέτες βρέθηκε ότι οι δομές αυτές υφίστανται μεταβολή από διάλυμα σε gel, με την αύξηση της θερμοκρασίας. Η συσσωμάτωση των μικκυλίων και η αλλαγή της δευτεροταγούς δομής των πολυπεπτιδίων, είναι πιθανώς οι λόγοι που οδηγούν σε αυτή τη μετατροπή. Η εμφάνιση τέτοιων ιδιοτήτων σε συστήματα πολυπεπτιδίων, αποτέλεσε έναυσμα για την περαιτέρω μελέτη μιας πληθώρας συστημάτων. Πρόσφατα παρατηρήθηκαν αντίστοιχες ιδιότητες θερμοαποκρισιμότητας σε πολυμερή του τύπου πολυ(αιθυλενοξείδιο)-*b*-πολυ(τυροσίνη), από την ερευνητική ομάδα του Heise.⁵⁷

2.6.3. Πολυπεπτιδικά Συστήματα Μεταφοράς Φαρμάκων Αποκρινόμενα σε Οξειδοαναγωγικούς Παράγοντες

Πέρα από τη βιοσυμβατότητα, από τις βασικότερες απαιτήσεις, είναι η σταθερότητα του συστήματος μεταφοράς μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό. Εάν ένα σύστημα δεν είναι σταθερό στα βιολογικά υγρά, υπάρχει πιθανότητα να οδηγηθεί σε απελευθέρωση του φορτίου του συστήματος (στην συγκεκριμένη περίπτωση του φαρμάκου) σε περιοχές μακριά από τον επιθυμητό στόχο. Η πιο συνηθισμένη μέθοδος αύξησης της σταθερότητας ενός πολυμερικού συστήματος μεταφοράς φαρμάκων είναι η δικτύωση (cross-linking).

Τα νανοσωματίδια μπορούν να είναι δικτυωμένα, είτε στον πυρήνα, είτε στο κέλυφός τους, ή και στα δύο. Τα νανοσωματίδια που είναι δικτυωμένα και στο κέλυφος, ουσιαστικά ενισχύουν ακόμα περισσότερο τη σταθερότητα του συστήματος, σχηματίζοντας ένα διπλό

αμυντικό σύστημα. Η δικτύωση μπορεί να επιτευχθεί είτε χρησιμοποιώντας μικρά μόρια μέσω των οποίων δημιουργείται το δίκτυο, είτε προκαλώντας τη δικτύωση μέσω UV ακτινοβολίας σε συγκεκριμένα συστήματα που έχουν αυτή τη δυνατότητα. Βέβαια, υπάρχουν και ορισμένα μειονεκτήματα που συνδέονται με τη δικτύωση, όπως είναι η περιπλοκότητα των τρόπων με τους οποίους λαμβάνει χώρα, όσο και η αποδοτικότητα της αντίδρασης.⁵⁸

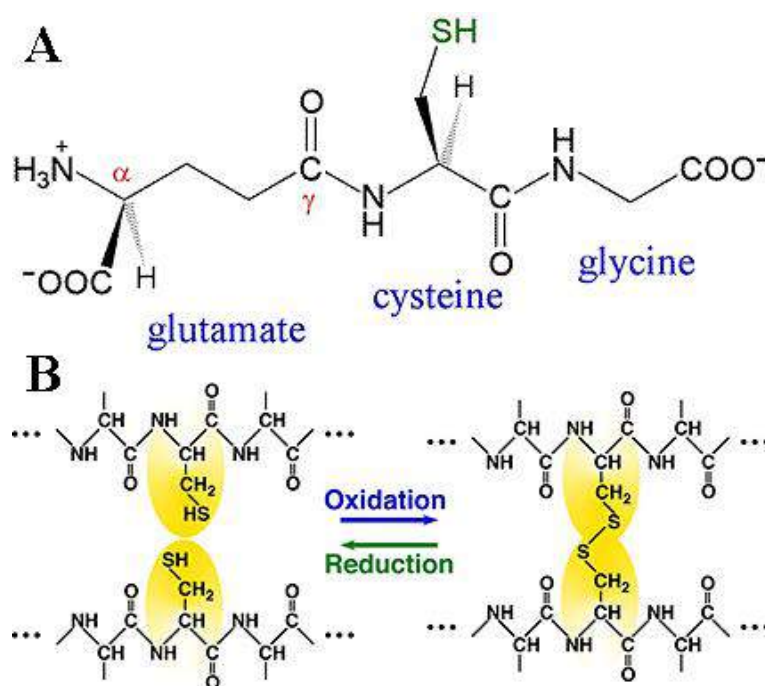
Μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους δικτύωσης είναι η χρήση δισουλφιδικών δεσμών. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί (S–S), είναι ομοιοπολικοί δεσμοί, οι οποίοι προκύπτουν από την οξειδωση δύο σουλφυδριλομάδων (ή θειόλες, –SH). Τα δύο βασικότερα χαρακτηριστικά αυτού του δεσμού, που τον καθιστούν ελκυστικό για πολλά συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, είναι η υψηλή σταθερότητά του στο πλάσμα του αίματος και η αναστρεψιμότητά του. Τα δικτυωμένα συστήματα που φέρουν δισουλφιδικούς δεσμούς, καθίστανται αυτόματα αποκρίσιμα σε οξειδοαναγωγικούς παράγοντες (redox-responsive), λόγω της ιδιότητας των δεσμών αυτών να οξειδώνονται και να ανάγονται ανάλογα τις συνθήκες που επικρατούν.⁵⁹

Στην περίπτωση των «έξυπνων» συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων, βασικός στόχος είναι οι δισουλφιδικοί δεσμοί να ανάγονται και συνεπώς να καταστρέφονται, μέσα ή κοντά στο κύτταρο-στόχο, έτσι ώστε να επηρεαστεί η αυτο-οργάνωσή τους και να απελευθερώσουν εκλεκτικά το φάρμακο στη συγκεκριμένη περιοχή.^{60,61}

Είναι γνωστό ότι στον ανθρώπινο οργανισμό υπάρχει η γλουταθειόνη (GSH), ένα τριπεπτίδιο, το οποίο ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς, δηλαδή τους μετατρέπει στις αντίστοιχες θειόλες (Εικόνα 2.11Α). Η γλουταθειόνη βρίσκεται σε αμελητέα συγκέντρωση στο αίμα (της τάξης των 1-2 μ M), ενώ μέσα στον ενδοκυττάριο χώρο η συγκέντρωση της γλουταθειόνης είναι πολύ μεγαλύτερη (της τάξης των 10 mM). Επιπρόσθετα, έχει αποδειχθεί ότι στα καρκινικά κύτταρα η συγκέντρωση αυτή είναι ακόμη μεγαλύτερη (10-20 mM). Κάτι τέτοιο εξασφαλίζει ότι εφόσον το σύστημα προσεγγίσει τα καρκινικά κύτταρα-στόχους, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης της γλουταθειόνης στο εσωτερικό τους, θα αποικοδομηθεί και θα απελευθερώσει το φάρμακο.^{6,62}

Τα τελευταία χρόνια έχει παρουσιαστεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον στον σχεδιασμό και στη σύνθεση πολυπεπτιδίων που μπορούν να οξειδώνονται ή να ανάγονται, ανάλογα με τον αντίστοιχο παράγοντα που υπάρχει στο χημικό περιβάλλον τους. Τα πολυπεπτίδια αυτά φέρουν συνήθως δισουλφιδικούς δεσμούς είτε στην κύρια αλυσίδα, είτε στην πλευρική, είτε πραγματοποιείται συμπολυμερισμός με μόρια που έχουν ήδη στη δομή τους δισουλφιδικούς δεσμούς. Αντίστοιχα, χαρακτηριστικά παραδείγματα cross-linker σε κάθε περίπτωση είναι η χρήση του μορίου κυσταμίνης,⁶³ η σύνθεση πολυπεπτιδίων βασισμένων στην πολυ(L-κυστεΐνη)

ή την πολυ(L-κυστίνη)⁶⁴ και ο συμπολυμερισμός μέσω μακροαπαρχητή πολυ(αιθυλενοξειδίου) που φέρει δισουλφιδικούς δεσμούς (PEO-SS-NH₂).⁶⁵ Στη συγκεκριμένη εργασία επιλέχθηκε η πολυ(L-κυστεΐνη) ως μέσο δικτύωσης, καθώς το μόριο αυτό έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε τέτοιου είδους εφαρμογές με μεγάλη επιτυχία. Για τον πολυμερισμό της επιλέχθηκε ο NCA της S-tert-butylmercapto-L-cysteine ως μονομερές, ο οποίος πολυμερίστηκε για πρώτη φορά από την επιστημονική ομάδα του Heise.⁶⁶ Με αυτή την επιλογή, οι δομικές ομάδες της πολυ(L-κυστεΐνης) παραμένουν προστατευμένες κατά τη διάρκεια όλων των αντιδράσεων, ενώ αποπροστατεύονται εκλεκτικά μόνο υπό την παρουσία αναγωγικών μέσων (π.χ. DTT) και στη συνέχεια δικτυώνονται δημιουργώντας σταθερούς δεσμούς S-S με χρήση H₂O₂ (Εικόνα 2.11B).



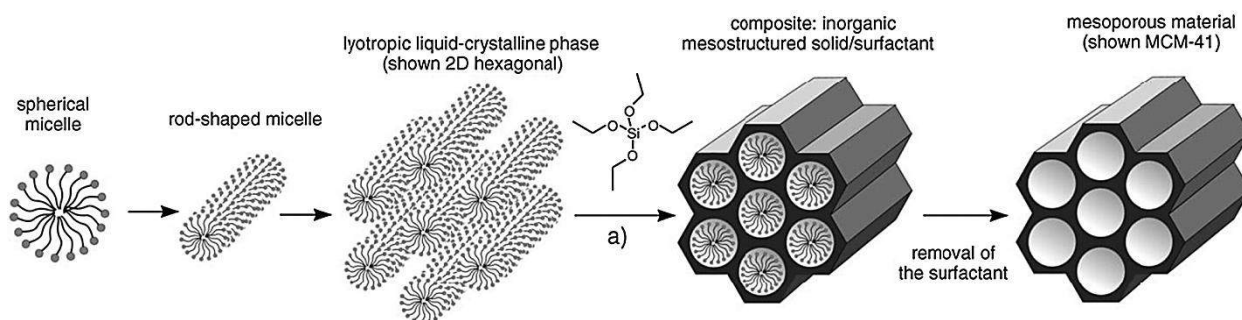
Εικόνα 2.11: Α) Δομή της γλουταθειόνης (GSH) και Β) αντιδράσεις οξείδωσης και αναγωγής των δομικών μονάδων πολυ(L-κυστεΐνης)

2.7. Μεσοπορώδη Νανοσωματίδια Πυριτίας και Εμβολιασμός τους με Πολυπεπίδια

Τα πορώδη νανοϋλικά είναι μία ειδική κατηγορία σύνθετων υλικών που εμφανίζονται σε πληθώρα διεργασιών με μεγάλο τεχνολογικό και επιστημονικό ενδιαφέρον. Είναι ετερογενή, πολυφασικά συστήματα τα οποία διαθέτουν πόρους και συνεπώς διαθέτουν και μεγάλη ειδική επιφάνεια. Έτσι, για παράδειγμα επιτρέπουν τη ροή, τη μεταφορά μάζας, την αλλαγή φάσης και την προσρόφηση ρευστών ή στερεών μέσα στη δομή τους. Τα δίκτυα των πόρων σε ένα

πορώδες στερεό παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία ως προς το μέγεθος και το σχήμα των πόρων που τα συνιστούν, των οποίων η μορφή και το πλήθος εξαρτάται από τη μέθοδο παρασκευής του υλικού.⁶⁷

Τα μεσοπορώδη νανοσωματίδια πυριτιάς (mesoporous silica nanoparticles, MSNs) σχηματίστηκαν για πρώτη φορά το 1990 από τον Kuroda, ενώ συνέχεια στην έρευνα αυτών των υλικών δόθηκε από την εταιρία Exxon Mobil, μέσω διαδικασιών sol-gel όπου χρησιμοποιήθηκαν κατιοντικά τασενεργά με ανθρακικές αλυσίδες μεταξύ 8-22 ανθράκων (Εικόνα 2.12). Τα υλικά αυτά ονομάστηκαν MCM (Mobil Composition of Matter) και σχηματίστηκαν τέσσερις διαφορετικές διευθετήσεις (μία εξαγωνική MCM-41, μία κυβική MCM-48, μία φυλλιδωτή MCM-50 και μία με μορφή κυβικού οκταμερούς). Αυτά τα υλικά διαθέτουν μεγαλύτερο πορώδες (από 20Å έως 500Å), μεγαλύτερη ειδική επιφάνεια (600 m²/g έως 1300 m²/g) και διαφορετική πλεγματική σύσταση, στοιχεία που τους δίνουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν σε αντιδράσεις κατάλυσης μεγαλύτερων μορίων αλλά και ως άριστοι νανοφορείς φαρμακευτικών ουσιών.^{67,68}



Εικόνα 2.12: Τυπική αντίδραση σχηματισμού των MSNs (εδώ MCM-41) μέσω διαδικασίας sol-gel

Η ελεγχόμενη σύνθεση των MSNs, τους προσδίδει μοναδικές χαρακτηριστικές ιδιότητες όπως η υψηλή θερμική σταθερότητα (μέχρι 700 °C), η μεγάλη ειδική επιφάνεια και ο μεγάλος όγκος πόρων ώστε να επιτυγχάνεται μεγάλο ποσοστό φόρτωσης φαρμάκου, ενώ το ελεγχόμενο μέγεθος πόρων βοηθάει στη ρύθμιση της συγκέντρωσης φαρμάκου ανά σωματίδιο ώστε να μην προκαλείται τοξικότητα στον ανθρώπινο οργανισμό. Άλλα πλεονεκτήματα είναι η μικρή πυκνότητα, η καλή ιστοσυμβατότητα και η δυνατότητα εύκολης τροποποίησης της επιφάνειας τους με μικρά μόρια ή πολυμερή για τη βελτίωση των ιδιοτήτων τους και την διεύρυνση των εφαρμογών τους.⁶⁸⁻⁷⁰

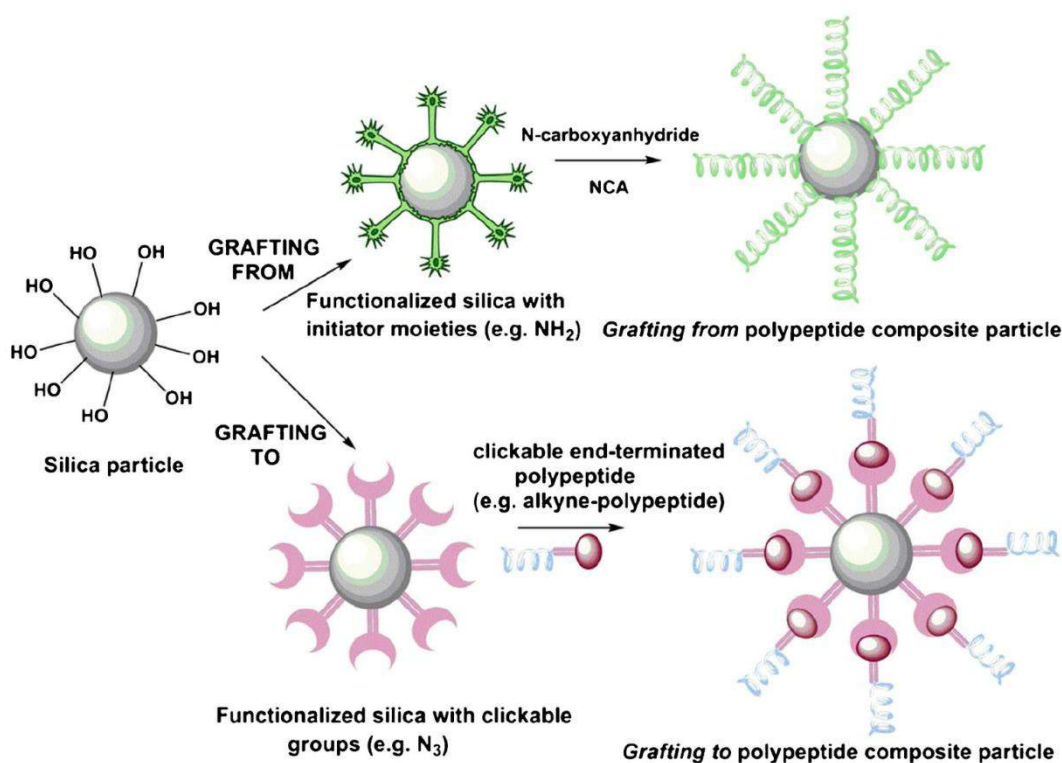
Τα μεσοπορώδη νανοσωματίδια πυριτιάς είναι ιδιαίτερα χρήσιμα για την προσρόφηση (εγκλωβισμό) και τη μεταφορά υδρόφοβων φαρμάκων. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα των MSNs είναι ο έλεγχος του τρόπου απελευθέρωσης του φαρμάκου βάσει συγκεκριμένων παραγόντων. Ο

βασικότερος παράγοντας ελέγχου είναι η στερεοχημική παρεμπόδιση. Η απελευθέρωση ενός φαρμάκου μειώνεται με τη μείωση του μεγέθους των πόρων και όπως είναι κατανοητό, με τη μείωση του μεγέθους των πόρων μειώνεται και το ποσοστό φόρτωσης του φαρμάκου. Επίσης, η συγγένεια φαρμάκου και πυριτίας επηρεάζει το ρυθμό απελευθέρωσης. Όταν έχει προηγηθεί τροποποίηση της επιφάνειάς τους (π.χ. εμβολιασμός με πολυμερή) για την αύξηση του ποσοστού εγκλωβισμού του φαρμάκου είτε για τη στοχευμένη απελευθέρωση του ή για την απελευθέρωση βάσει κάποιου εξωτερικού ερεθίσματος, τότε σχηματίζονται ισχυρότεροι ηλεκτροστατικοί δεσμοί μεταξύ φαρμάκου και μήτρας, ελαττώνοντας έτσι σημαντικά το ρυθμό απελευθέρωσής του.^{68,71}

Βέβαια, έρευνες βιοσυμβατότητας έδειξαν ότι μεσοπορώδη νανοσωματίδια πυριτίας με διάμετρο από 150 nm έως 4 μm παρουσιάζουν σημαντική τοξικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*. Σημαντική μείωση της τοξικότητας επιτυγχάνεται μέσω επικάλυψης των ελεύθερων πυριτικών ομάδων με πολυμερικό τοίχωμα, ώστε τα νανοσωματίδια να μην αλληλεπιδρούν με τις κυτταρικές μεμβράνες. Ο εμβολιασμός των MSNs με πολυμερή βελτιώνει επίσης το χρόνο παραμονής στο κυκλοφορικό σύστημα, ενώ δίνει τη δυνατότητα χημικής πρόσδεσης. Ουσιαστικά, μέσω των πολυμερών (και πιο συγκεκριμένα των πολυπεπτιδικών πολυμερών) επιτυγχάνεται ελεγχόμενη και σταδιακή αποδέσμευση του φορτίου-φαρμάκου για παρατεταμένες χρονικές περιόδους, αποτρέποντας με αυτό τον τρόπο την ανεξέλεγκτη και ταχεία απελευθέρωση που προκύπτει από μη τροποποιημένα MSNs (“burst release”). Η ελεγχόμενη αποδέσμευση μπορεί να λύσει αυτά τα προβλήματα ελέγχοντας όχι μόνο τη δόση αλλά και το μέρος που θα αποδεσμευτεί η φαρμακευτική ουσία. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται πιο γρήγορη και αποτελεσματική θεραπεία καθώς εξαλείφεται το ενδεχόμενο ανεπαρκούς ή υπερβολικής δόσης.

Πρόσφατα, συστήματα MSNs τροποποιημένα με πολυπεπτιδικές αλυσίδες γνώρισαν σημαντική άνθηση διότι συνδυάζουν τα πλεονεκτήματα και των δύο υλικών. Πιο συγκεκριμένα, τέτοια νανোসυστήματα μεταφοράς φαρμάκων έχουν την ικανότητα να αποκρίνονται σε εξωτερικά ερεθίσματα ανάλογα με τα αμινοξέα που έχουν επιλεχθεί και κατά συνέπεια να επηρεάζουν το προφίλ αποδέσμευσης του φαρμάκου. Επίσης, καθιστούν τα υβριδικά υλικά βιοσυμβατά, μη τοξικά και ιδιαίτερα σταθερά μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό. Όπως σε κάθε περίπτωση νανοσύνθετου υλικού, η στρατηγική για τη σύνθεση τέτοιων υβριδικών υλικών αποτελείται από τη δημιουργία ισχυρών δεσμών (ομοιοπολικών ή ιοντικών) μεταξύ των οργανικών και ανόργανων συστατικών. Η δημιουργία τέτοιων δεσμών επιτυγχάνεται μέσω των μεθόδων «εμβολιασμού από» (“grafting from”) ή «εμβολιασμού σε» (“grafting to”). Στην πρώτη περίπτωση η επιφάνεια των MSNs τροποποιείται με αμινομάδες (συνήθως με χρήση του

αντιδραστηρίου APTES), οι οποίες στη συνέχεια χρησιμοποιούνται ως απαρχητές ROP των εκάστοτε NCAs. Αντίθετα, στη δεύτερη περίπτωση χρησιμοποιούνται κατάλληλες οργανοπυριτικές ενώσεις που φέρουν χαρακτηριστικές λειτουργικές ομάδες, στις οποίες μπορούν να προσκολληθούν τροποποιημένες πολυμερικές αλυσίδες μέσω δημιουργίας σταθερών δεσμών (π.χ. αντιδράσεις τύπου “click”) (Εικόνα 2.13).⁷²



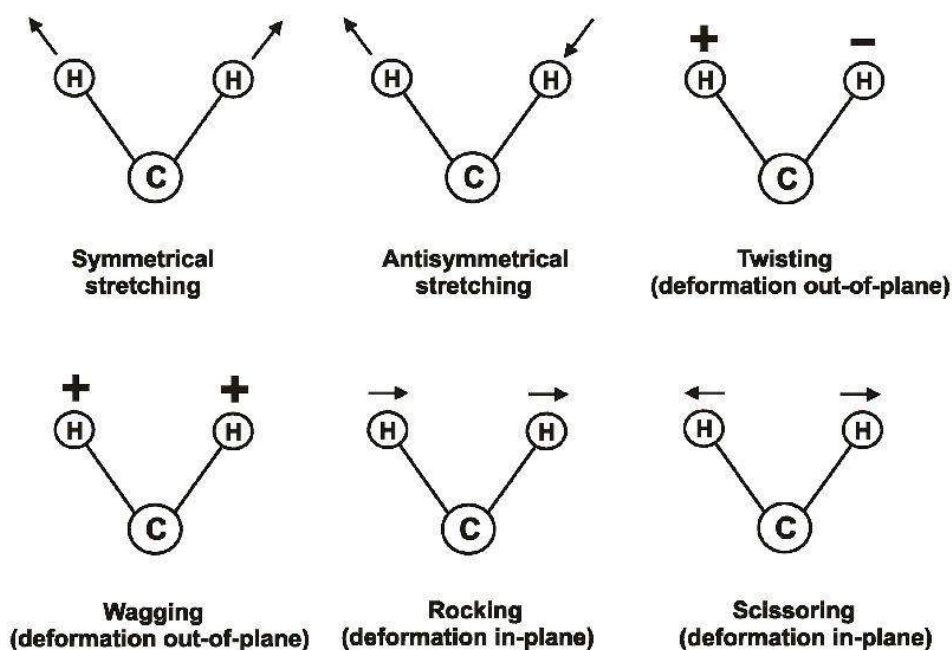
Εικόνα 2.13: Μέθοδοι τροποποίησης της επιφάνειας των MSNs με πολυπεπίδια μέσω "εμβολιασμού από" ή "εμβολιασμού σε"

2.8. Τεχνικές Μοριακού Χαρακτηρισμού

Το κεφάλαιο αυτό αναφέρεται στην κατανόηση των βασικών αρχών των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν για το χαρακτηρισμό των μορίων και των υπερμοριακών δομών που συντέθηκαν στην παρούσα μελέτη. Ειδικότερα πρόκειται να αναλυθούν οι τεχνικές της φασματοσκοπίας υπερύθρου (IR), της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού (SEC), του ζ-δυναμικού (zeta potential), της θερμοσταθμικής ανάλυσης (TGA), του κυκλικού διχρωϊσμού (CD), της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης (SEM), της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διαπερατότητας (TEM) και της ποροσιμετρίας (porosimetry).

2.8.1. Φασματοσκοπία Υπερύθρου (Infrared Spectroscopy, IR)^{73,74}

Η υπέρυθη φασματοσκοπία (IR) θεωρείται σημαντική φασματοσκοπική τεχνική στην Οργανική Χημεία, λόγω της ευκολίας λήψης φασμάτων και της σύγκρισής τους με φάσματα γνωστών οργανικών ενώσεων. Χρησιμοποιείται ευρύτατα κατά τη σύνθεση χημικών ενώσεων και για την πιστοποίηση της καθαρότητάς τους. Στην περιοχή υπέρυθρου του φάσματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας ($\lambda=0.7\text{ }\mu\text{m}-1000\text{ }\mu\text{m}$) πραγματοποιούνται απορροφήσεις που οφείλονται σε δονήσεις ή κάμψεις των δεσμών των μορίων για ενώσεις με μόνιμη διπολική ροπή, που μεταβάλλεται κατά την παραμόρφωση του μορίου και απορροφούν ισχυρά στην περιοχή υπέρυθρου. Εκτός από τις δονήσεις και τις κάμψεις υπάρχουν και άλλα είδη παραμόρφωσης της δομής των μορίων, όπως όταν αυτό σείεται (wagging), κλυδωνίζεται (rocking), στρεβλώνεται (twisting) ή κάνει ψαλιδωτή κίνηση (scissoring), κ.λπ. (Εικόνα 2.14).



Εικόνα 2.14: Χαρακτηριστικές δονήσεις τάσης και κάμψης των δεσμών ενός μορίου

Όλα τα μόρια διαθέτουν κάποια συγκεκριμένη ποσότητα ενέργειας κατανεμημένη σε όλη τη δομή τους, που προκαλεί στους δεσμούς δονήσεις (επιμηκύνσεις) και κάμψεις. Ταυτόχρονα λόγω της ενέργειας αυτής, τα άτομα πάλλονται και περιστρέφονται, ενώ παρατηρούνται και διάφορες άλλες μοριακές δονήσεις, όπως αυτές που προαναφέρθηκαν. Η ποσότητα της ενέργειας που περιλαμβάνει ένα μόριο δεν μεταβάλλεται κατά συνεχή τρόπο, αλλά είναι κβαντισμένη. Δηλαδή ένα μόριο μπορεί να επιμηκύνεται, να πάλλεται ή να κάμπτεται σε

συγκεκριμένες συχνότητες που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένα ενεργειακά επίπεδα. Στην πραγματικότητα οι δεσμοί συνεχώς δονούνται και κάμπτονται, με συνέπεια το μήκος τους να αυξάνεται και να μειώνεται ανάλογα. Έτσι ένας δεσμός που συνδέει δύο άτομα, στην πραγματικότητα πάλλεται σαν ελατήριο.

Όταν το μόριο δέχεται ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, απορροφάται ενέργεια μόνο στην περίπτωση που η ενέργεια της ακτινοβολίας είναι ίδια με την ενεργειακή διαφορά μεταξύ δυο δονητικών συχνοτήτων. Όταν ένα μόριο απορροφά ακτινοβολία IR, η μοριακή δόνηση που έχει συχνότητα ίση με εκείνη της ακτινοβολίας, αυξάνει το πλάτος της. Με άλλα λόγια, το «ελατήριο», που συνδέει τα δυο άτομα διαδοχικά, εκτείνεται και συμπιέζεται λίγο περισσότερο. Εφόσον κάθε συχνότητα που απορροφάται από ένα μόριο, αντιστοιχεί σε μια προκαθορισμένη μοριακή κίνηση μπορούν να διαπιστωθούν τις κινήσεις του μορίου, μελετώντας το φάσμα υπέρυθρου. Από την ερμηνεία αυτών των κινήσεων, μπορούμε να συμπεράνουμε τι είδους δεσμοί και κατά συνέπεια ποιες λειτουργικές ομάδες υπάρχουν στην προς μελέτη ένωση. Οι δονήσεις των χαρακτηριστικών ομάδων μίας ένωσης είναι ανεξάρτητες της υπόλοιπης δομής και συνήθως εμφανίζονται σε περιοχές του υπέρυθρου φάσματος όπου δεν απορροφούν οι δονήσεις σκελετού (Πίνακας 2.3). Πιο συγκεκριμένα, η υπέρυθρη περιοχή από 4000 cm^{-1} έως 400 cm^{-1} είναι δυνατό να χωριστεί σε τέσσερα τμήματα:

- Η περιοχή από 4000 cm^{-1} έως 2500 cm^{-1} αντιστοιχεί σε απορροφήσεις που προκαλούνται από δονήσεις επιμήκυνσης (τάσεις) των απλών δεσμών N-H, C-H, και O-H. Οι δεσμοί N-H και O-H απορροφούν στην περιοχή $3300\text{-}3650\text{ cm}^{-1}$, ενώ ο δεσμός C-H απορροφά γύρω στα 3000 cm^{-1} .
- Στην περιοχή $2500\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$ λαμβάνει χώρα η δόνηση επιμήκυνσης (τάση) των τριπλών δεσμών. Στη συγκεκριμένη περιοχή απορροφούν τα νιτρίλια και τα αλκίνια, όπως επίσης και η λειτουργική ομάδα -SH, που παρουσιάζει χαρακτηριστική απορρόφηση στα 2565 cm^{-1} .
- Στην περιοχή από 2000 cm^{-1} έως 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 εμφανίζεται συνήθως σε μια περιορισμένη περιοχή μεταξύ 1640 και 1680 cm^{-1} .
- Η περιοχή κάτω από τα 1500 cm^{-1} είναι περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος μίας ένωσης. Σε αυτή την περιοχή εμφανίζονται πολλές απορροφήσεις που οφείλονται σε μια ποικιλία δεσμών όπως C-C, C-O, C-N, C-X, C-S.

Πίνακας 2.3: Περιοχές απορρόφησης χαρακτηριστικών λειτουργικών ομάδων σε cm^{-1}

Λειτουργική Ομάδα	Περιοχή Απορρόφησης (1/cm)			
O-H	3650-3590			
N-H	3500-3300	1650-1590	900-650	
=CH-H	3100-3070	1420-1410	900-880	
=C-H	3100-3000	2000-1600		
C-H	2900-2700	1440-1320		
=-CH ₃	2880-2860	2970-2950	1380-1370	1470-1430
O-H	2700-2500	1320-1210	950-900	
C≡C	2140-2100			
C=O	1750-1700			
C=C	1600-1500			
C-N	1340-1250			
C-O-C	1200-1180			
-C-H	770-730			

Στη χημεία των πολυπεπτιδίων η χρήση του IR είναι πολύ σημαντική, τόσο για την ποιοτική εξακρίβωση σύνθεσης του εκάστοτε N-καρβοξυ ανυδρίτη των α -αμινοξέων (συνήθεις δονήσεις έκτασης στα 1785 cm^{-1} και 1855 cm^{-1}) όσο και για την επιτυχή σύνθεση των πολυπεπτιδίων (χαρακτηριστική δόνηση του αμιδικού δεσμού στα 1650 cm^{-1}).

2.8.2. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) ^{74,75}

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) χρησιμοποιείται ευρέως σχεδόν σε όλους τους κλάδους της χημείας και είναι μία μέθοδος προσδιορισμού της δομής των μορίων, η οποία παρέχει ένα “χάρτη” του ανθρακικού σκελετού και των ατόμων υδρογόνου σε ένα μόριο. Στο χώρο των πολυμερών αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο, διότι με τη βοήθεια της τεχνικής αυτής μπορεί να προσδιοριστεί η στερεοχημική απεικόνιση (τακτικότητα) καθώς και η γεωμετρική ισομέρεια ενός πολυμερούς, η δομή και η σύσταση των συμπολυμερών, ενώ επίσης πραγματοποιείται μελέτη της κίνησης των μακρομορίων σε διάλυμα και σε στερεά κατάσταση.

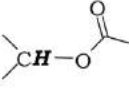
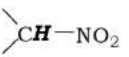
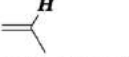
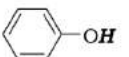
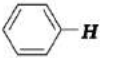
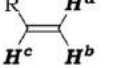
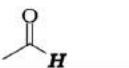
Το φαινόμενο του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού εκδηλώνουν όλοι οι πυρήνες με περιττό αριθμό πρωτονίων και όλοι οι πυρήνες με περιττό αριθμό νετρονίων. Μόνο οι πυρήνες με άρτιο αριθμό νετρονίων και πρωτονίων δεν εμφανίζουν μαγνητικές ιδιότητες και είναι αδρανείς στα πειράματα NMR (πυρηνικό spin $I=0$). Έτσι, οι πυρήνες πολλών ατόμων (^1H , ^{13}C)

συμπεριφέρονται σαν να περιστρέφονται γύρω από κάποιον άξονα ($I=1/2$). Δεδομένου ότι είναι θετικά φορτισμένοι, οι περιστρεφόμενοι πυρήνες λειτουργούν ως μικροσκοπικοί μαγνήτες και κατά συνέπεια αλληλεπιδρούν με ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο B_0 . Τα πυρηνικά spin των μαγνητικών πυρήνων προσανατολίζονται, απουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, κατά τυχαίο τρόπο και συνεπώς όλοι οι προσανατολισμοί της πυρηνικής μαγνητικής ροπής είναι εκφυλισμένοι ενεργειακά. Όταν, όμως, ένα δείγμα που περιέχει αυτούς τους πυρήνες τοποθετηθεί ανάμεσα στους πόλους ενός ισχυρού μαγνήτη, αίρεται ο εκφυλισμός και οι πυρήνες αποκτούν συγκεκριμένους προσανατολισμούς. Ο πυρήνας μπορεί να διαταχθεί έτσι ώστε το δικό του εξαιρετικά μικρό μαγνητικό πεδίο να είναι παράλληλο (ενεργειακή κατάσταση με κβαντικό μαγνητικό αριθμό spin $m_I=1/2$) ή αντιπαράλληλο (ενεργειακή κατάσταση με $m_I=-1/2$) προς την κατεύθυνση του εξωτερικού πεδίου. Οι δύο προσανατολισμοί δεν έχουν την ίδια ενέργεια και συνεπώς δεν είναι εξίσου πιθανοί. Ειδικότερα, ο παράλληλος προσανατολισμός είναι χαμηλότερης ενέργειας, ευνοώντας σχετικά αυτή την κατάσταση του spin έναντι του αντιπαράλληλου προσανατολισμού. Στην περίπτωση που οι προσανατολισμένοι πυρήνες ακτινοβοληθούν με κατάλληλης συχνότητας ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, λαμβάνει χώρα απορρόφηση ενέργειας και μεταβάλλονται οι πληθυσμοί των πυρήνων στις δύο καταστάσεις (αναστροφή spin). Όταν πραγματοποιηθεί αυτή η αναστροφή, οι πυρήνες συντονίζονται 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 των μορίων περιβάλλονται από ηλεκτρόνια. Όταν ασκηθεί ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο σε κάποιο μόριο, τα ηλεκτρόνια δημιουργούν δικά τους 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 ($B_{\text{πραγ.}} = B_{\text{εφαρμ.}} - B_{\text{τοπικό}}$). Περιγράφοντας αυτό το φαινόμενο, συμπεραίνεται 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 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. Η χημική μετατόπιση ενός πυρήνα είναι η διαφορά μεταξύ της συχνότητας συντονισμού του πυρήνα και μιας πρότυπης ουσίας αναφοράς. Ως ουσία αναφοράς

χρησιμοποιείται συνήθως το τετραμεθυλοσιλάνιο ((CH₃)₄Si, TMS), που έχει δώδεκα ισοδύναμα (δίνει μία κορυφή απορρόφησης) και ισχυρά προασπισμένα πρωτόνια. Οι χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις στη φασματοσκοπία ¹H-NMR συνοψίζονται στον Πίνακα 2.4.

Πίνακας 2.4: Χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις στη φασματοσκοπία ¹H-NMR (ppm)

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΕΣ ΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΕΙΣ ¹ H-NMR (ppm)					
R-CH ₃	0.8-1.2	Μεθύλιο			
R-CH ₂ -R	1.1-1.5	Μεθυλένιο			
R ₃ CH	1.4-1.9	Μεθίνιο			
C≡CH	1.5-3.0	Ακραία αλκίνια			
	1.6-1.8	Αλλυλικά μεθύλια			
	0.5-4.0*	Πρωτόνια αμινών			
R-OH	1.0-5.5*	Αλκοολικά υδροξύλια			
R-SH	1.1-1.9*	Αλκυλοθειόλες			
	2.0-3.6	α-Καρβονυλικά πρωτόνια			
	2.0-3.2	α-Πρωτόνια θειολών			
	2.2-3.0	Βενζυλικά πρωτόνια			
	2.2-3.6	α-Πρωτόνια Αμινών			
	2.7-4.2	Αρωματικές θειόλες			
	3.3-4.3	Αιθερικά πρωτόνια			
	3.5-4.0*	α-Πρωτόνια Αλκοολών			
				3.7-5.4	Εστερικά αλκύλια
			A-CH ₂ -Cl	~3.5 (A=R), ~4.5 (A=Ar)	Χλωρίδια
			A-CH ₂ -Br	~3.4 (A=R), ~4.4 (A=Ar)	Βρωμίδια
			A-CH ₂ -I	~3.2 (A=R), ~4.4 (A=Ar)	Ιωδιδία
			A-CH ₂ -F	~4.3 (A=R), ~5.3 (A=Ar)	Φθορίδια
				4.2-4.7	Νιτροαλκάνια
				4.5-6.0	Βινυλικά πρωτόνια
			$\left. \begin{matrix} \text{RCO-NHR} \\ \text{RCONH}_2 \end{matrix} \right\}$	5.0-8.0	Αμιδικά πρωτόνια
				5.0-8.0*	Φαινολικά υδροξύλια
				6.8-7.8	Αρωματικά πρωτόνια
				$\begin{matrix} \text{H}^a: 4.0-6.6 \\ \text{H}^b: 3.8-6.2 \\ \text{H}^c: 5.2-7.3 \end{matrix}$	Βινυλικά πρωτόνια
			RCOOH	10-13*	Καρβοξυλικά οξέα
				9.0-10.1	Αλδεϋδικά πρωτόνια

* Αφορούν σε ανταλλάξιμα πρωτόνια

Από τα παραπάνω διαπιστώνουμε ότι κάθε διαφορετικός πυρήνας (π.χ. ¹H) θα σχηματίζει μία απλή κορυφή. Ωστόσο, συχνό φαινόμενο αποτελεί η απορρόφηση ενός πυρήνα να διασπάται σε πολλαπλές κορυφές. Η απόσταση μεταξύ των επιμέρους κορυφών σε μία πολλαπλή κορυφή ονομάζεται σταθερά σύζευξης (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. 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 γειτονικούς πυρήνες με spin I=1/2 εμφανίζουν n+1 κορυφές στο

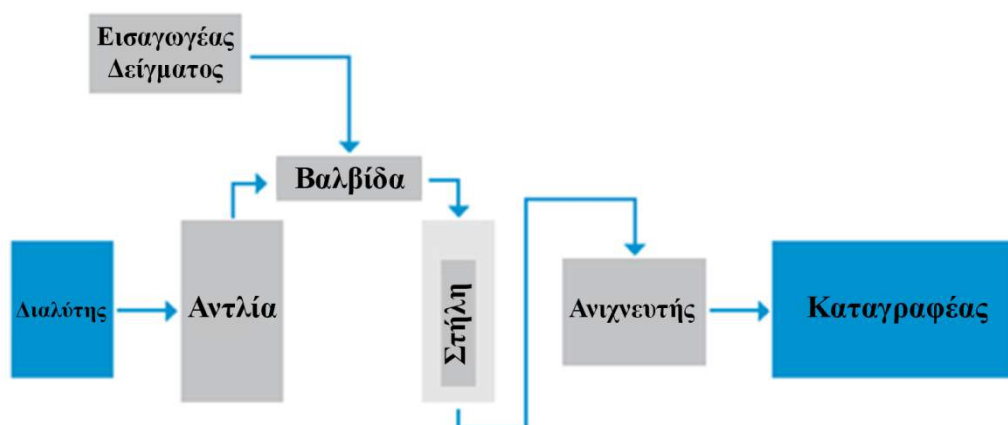
φάσμα του NMR. Οι σχετικές εντάσεις των κορυφών είναι οι συντελεστές των όρων του αναπτύγματος $(I+\chi)^n$.

Στη φασματοσκοπία ^1H -NMR (αλλά όχι στη ^{13}C -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 τη συγκεκριμένη κορυφή. Ολοκληρώνοντας, λοιπόν, το εμβαδόν κάθε κορυφής είναι δυνατό να μετρηθεί ο σχετικός αριθμός κάθε είδους πρωτονίων σε ένα μόριο. Με τον τρόπο αυτό εξάγονται ποσοτικά συμπεράσματα συγκρίνοντας το εμβαδόν χαρακτηριστικών κορυφών πρωτονίων ενός μορίου (π.χ. αν μία δραστική ομάδα έχει αντιδράσει με όλες τις μακρομοριακές αλυσίδες).

Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι υπάρχουν δύο είδη φασματοφωτομέτρων NMR, τα συνεχούς κύματος και τα παλμικά (ή μετασχηματισμού Fourier). Τα φασματοφωτόμετρα συνεχούς κύματος διέπονται από την ίδια αρχή που ισχύει και για τα οπτικά φασματοφωτόμετρα, στα οποία το σήμα απορρόφησης καταγράφεται σαν συνάρτηση της συχνότητας της πηγής. Στα παλμικά, το δείγμα δέχεται περιοδικά ακτινοβολία με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα σήμα στην περιοχή του χρόνου το οποίο φθίνει. Στη συνέχεια, μέσω μετασχηματισμού Fourier (Fourier Transform, FT) το σήμα αυτό μετατρέπεται σε σήμα στην περιοχή των συχνοτήτων, με αποτέλεσμα να λαμβάνεται ένα φάσμα ανάλογο με αυτό που προκύπτει από τα φασματοφωτόμετρα συνεχούς κύματος.

2.8.3. Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών (Size Exclusion Chromatography, SEC)

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (size exclusion chromatography, SEC) ή χρωματογραφία διαπερατότητας μέσω πηκτής (gel permeation chromatography, GPC) αποτελεί μία από τις δυναμικότερες μεθόδους χαρακτηρισμού των πολυμερών τόσο σε εργαστηριακή κλίμακα, όσο και στη βιομηχανία. Πρόκειται ουσιαστικά για μία τεχνική υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, προσαρμοσμένης για την ανάλυση μακρομορίων. Η σχετική απλότητα της μεθόδου, η ταχύτητα με την οποία πραγματοποιούνται οι αναλύσεις, η δυνατότητα εύρεσης οποιασδήποτε μέσης τιμής μοριακού βάρους και της κατανομής μοριακών βαρών ($I=M_w/M_n$), αλλά και η δυνατότητα διασύνδεσης με άλλες μεθόδους χαρακτηρισμού (όπως η ιξωδομετρία τριχοειδούς σωλήνα) για τη λήψη περισσότερων πληροφοριών είναι ενδεικτικά της σπουδαιότητας της μεθόδου και εξηγεί την ευρεία χρήση της. Σχηματικά η διάταξη της οργανολογίας σε μία συσκευή SEC φαίνεται στο Σχήμα 2.9.⁷⁶

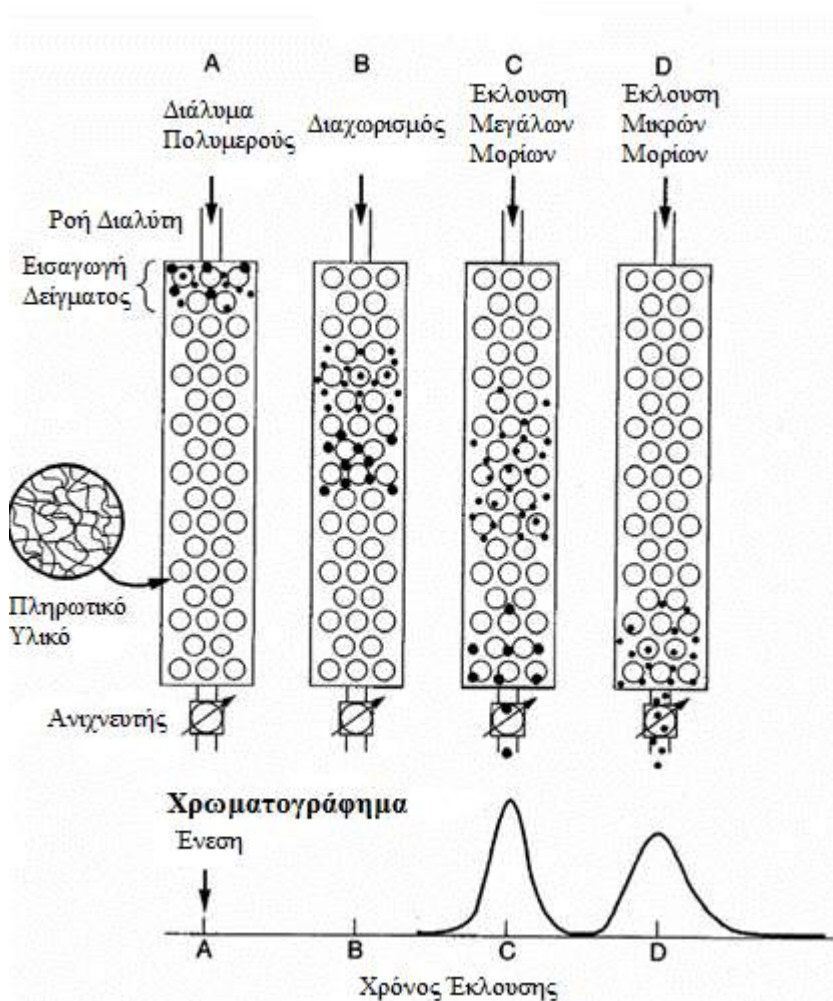


Σχήμα 2.9: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης SEC

Αραιό διάλυμα πολυμερούς ενίεται σε ποσότητα διαλύτη που κινείται με σταθερή ροή, η οποία εξασφαλίζεται από κατάλληλη αντλία. Το πολυμερές παρασύρεται από το διαλύτη στις στήλες του οργάνου, όπου πραγματοποιείται η διαδικασία διαχωρισμού. Οι στήλες περιέχουν τη στατική φάση, δηλαδή κόκκους από ένα πορώδες πληρωτικό υλικό (με εύρος διαστάσεων πόρων 10^2 - 10^6 Å). Το υλικό πλήρωσης των στηλών μπορεί να είναι οργανικής φύσεως (π.χ. δικτυωμένο πολυστυρένιο) ή ανόργανο (π.χ. silica gel ή πορώδες γυαλί). Τα μικρά μόρια του πολυμερούς (μικρότερος υδροδυναμικός όγκος) μπορούν να περνούν τόσο μεταξύ των κόκκων, όσο και να εισχωρούν μέσα στους πόρους του πληρωτικού υλικού με αποτέλεσμα να καθυστερεί η έκλουσή τους από τη στήλη. Αντίθετα τα μεγάλα σωματίδια, με διαστάσεις μεγαλύτερες από το μέγεθος των πόρων, δε μπορούν να διέλθουν μέσα από αυτούς με συνέπεια να κινούνται μόνο μεταξύ των κόκκων και να εκλούνται σε μικρότερους χρόνους. Μόρια με ενδιάμεσο μέγεθος μπορούν να εισχωρούν σε μερικούς από τους πόρους του κοκκώδους υλικού εμφανίζοντας διαφορετικό βαθμό καθυστέρησης στο υλικό της στήλης. Έτσι τελικά ο διαχωρισμός των διαλυμένων στην κινητή φάση υλικών επιτυγχάνεται ανάλογα με το μέγεθος τους, με τα μόρια μεγαλύτερου μεγέθους να εκλούνται πρώτα και να ακολουθούν κατόπιν μόρια κατά σειρά μειούμενου μεγέθους (Εικόνα 2.15).^{77,78}

Η πορεία του διαχωρισμού παρακολουθείται συνεχώς μέσω κατάλληλων ανιχνευτών, που συνδέονται σε σειρά με τις στήλες. Οι χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές πρέπει να χαρακτηρίζονται από μεγάλη ακρίβεια και ευαισθησία και να αποκρίνονται στη συγκέντρωση του διαλυμένου συστατικού. Η πιο κοινή περίπτωση είναι η χρήση διαφορικού διαθλασιμέτρου, που μετρά συνεχώς τη διαφορά στο δείκτη διάθλασης μεταξύ του διαλύτη και του διαλύματος, που περιέχει τα εκλούμενα συστατικά. Άλλοι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στηρίζονται σε διάφορες φασματοσκοπικές μεθόδους, όπως η φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) ή η

υπέρυθρη ακτινοβολία (IR). Τέλος, το επιθυμητό χρωματογράφημα αποτυπώνεται με τη βοήθεια ενός καταγραφέα.^{77,78}



Εικόνα 2.15: Διαχωρισμός μακρομορίων διαφορετικού υδροδυναμικού όγκου

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών αποτελεί έμμεση και όχι απόλυτη μέθοδο για τον προσδιορισμό των μοριακών βαρών, εξαιτίας της σύνδεσης μεταξύ μεγέθους και μοριακού βάρους. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη η βαθμονόμηση των στηλών, η οποία πραγματοποιείται με μέτρηση του χρόνου έκλουσης δειγμάτων γνωστού μοριακού βάρους (π.χ. πρότυπα πολυστυρένια). Επειδή όμως ο όγκος έκλουσης δεν εξαρτάται άμεσα από το μοριακό βάρος, αλλά από το μέγεθος των μακρομορίων, θα πρέπει τα δείγματα που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς και τα αγνώστου μοριακού βάρους δείγματα να έχουν την ίδια χημική σύσταση και την ίδια αρχιτεκτονική (π.χ. γραμμικά ή κυκλικά ή αστεροειδή με ίδιο αριθμό κλάδων κλπ.) και οι μετρήσεις των όγκων έκλουσης σε όλα τα δείγματα να γίνονται υπό τις ίδιες ακριβώς πειραματικές συνθήκες. Ο όγκος έκλουσης V_e κάθε μακρομορίου του πολυμερούς δίνεται από την εξίσωση:

$$V_e = V_o + K_{SEC} V_E,$$

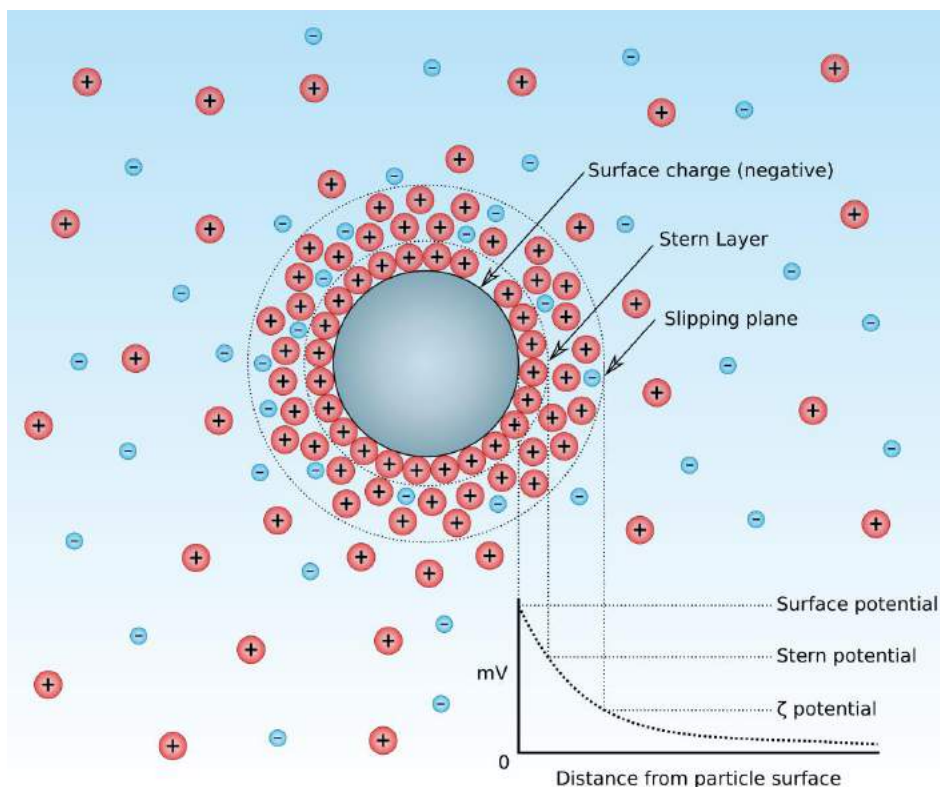
όπου V_o είναι ο νεκρός όγκος, ο όγκος δηλαδή της στήλης που δεν καταλαμβάνεται από το πορώδες υλικό, K_{SEC} είναι το ποσοστό του πολυμερούς που μπορεί να περάσει από τους πόρους (μπορεί να θεωρηθεί και ως η σταθερά κατανομής ενός συστατικού μεταξύ κινητής και στατικής φάσης), και V_E είναι ο συνολικός εσωτερικός όγκος όλων των πόρων. Για μακρομόρια που δεν μπορούν να περάσουν κανένα πόρο της στήλης ($K_{SEC}=0$) $V_e=V_o$ και για μακρομόρια που μπορούν να περάσουν όλους τους πόρους ($K_{SEC}=1$) $V_e=V_o+V_E$. Στις περιπτώσεις αυτές δεν επιτυγχάνεται διαχωρισμός και πρέπει να αλλαχθούν οι στήλες. Καλό διαχωρισμό έχουμε όταν ο K_{SEC} για όλα τα μακρομόρια που υπάρχουν στο πολυμερές κυμαίνεται μεταξύ 0 και 1.⁷⁷

2.8.4. Z-Δυναμικό (Zeta Potential)^{45,79}

Όταν μια στερεή επιφάνεια έρθει σε επαφή με ένα υδατικό διάλυμα, η ύπαρξη φορτίων στην μεσεπιφάνεια μεταξύ τους προκαλεί αναδιάταξη των τοπικών ελευθέρων ιόντων στο διάλυμα και έτσι δημιουργείται μια λεπτή περιοχή με μη μηδενική καθαρή πυκνότητα φορτίου. Η αναδιάταξη αυτή των φορτίων στην μεσεπιφάνεια μεταξύ στερεού-υγρού μαζί με τα αντισταθμιστικά ιόντα του διαλύματος σχηματίζουν μία ηλεκτρική διπλοστιβάδα.

Ακριβώς δίπλα από τη φορτισμένη στερεή επιφάνεια υπάρχει ένα λεπτό στρώμα από αντισταθμιστικά ιόντα, που ονομάζεται συμπαγές στρώμα ή στρώμα Stern (Stern layer). Το συμπαγές αυτό στρώμα αντισταθμιστικών ιόντων είναι ακίνητο λόγω της ισχυρής ηλεκτροστατικής έλξης με την επιφάνεια των σωματιδίων. Τα αντισταθμιστικά ιόντα έξω από το συμπαγές στρώμα είναι ασθενέστερα συνδεδεμένα και συνεπώς κινητά. Αυτό το μέρος της διπλοστιβάδας καλείται διάχυτη στιβάδα (diffuse layer ή slipping plane) και το ηλεκτροστατικό δυναμικό που αντιστοιχεί σε αυτό το στρώμα ονομάζεται ζ-δυναμικό (zeta potential) (Εικόνα 2.16).

Το ζ-δυναμικό σχετίζεται ποσοτικά με την ύπαρξη ή μη φορτίων στην επιφάνεια των σωματιδίων και επηρεάζει ένα ευρύ φάσμα ιδιοτήτων των κolloειδών συστημάτων όπως είναι η σταθερότητα τους, η αλληλεπίδραση τους με βιοδραστικές ενώσεις καθώς επίσης και οι ρεολογικές ιδιότητες των εναιωρημάτων. Η τιμή του ζ-δυναμικού αποτελεί ένδειξη για την εκτίμηση της σταθερότητας των κolloειδών διασπορών και είναι παράμετρος χαρακτηρισμού των βιοϊατρικών πολυμερών και υβριδικών συστημάτων, ενώ εξαρτάται άμεσα από το pH. Γενικά, διασπορές με μεγάλη τιμή ζ-δυναμικού (θετική ή αρνητική) παρουσιάζουν απωστικές δυνάμεις που εμποδίζουν την συσσωμάτωση και κατακρήμνιση των σωματιδίων τους.



Εικόνα 2.16: Το δυναμικό των νανοσωματιδίων συναρτήσει της απόστασης από την επιφάνεια τους

Οι ηλεκτρικές ιδιότητες της επιφάνειας των νανοσωματιδίων μπορούν να μελετηθούν μέσω μικροηλεκτροφόρησης, κατά την οποία προκαλείται κίνηση των σωματιδίων αυτών μέσα σε στάσιμο υγρό υπό την επίδραση εξωτερικά εφαρμοζόμενης διαφοράς δυναμικού. Η κίνηση αυτή μετريέται με τη μέθοδο της δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) σε ειδικό μηχάνημα (Zetasizer 3000HS_A) και βασίζεται στη μετατόπιση Doppler που προκαλείται από την πρόσπτωση μονοχρωματικής ακτινοβολίας (laser He-Ne, 5 mW, 633 nm) στα κινούμενα σωματίδια. Γενικά, δύο είναι οι παράμετροι που χαρακτηρίζουν την επιφάνεια των σωματιδίων και μπορούν να υπολογισθούν από τις μετρούμενες κινητικότητες: το δυναμικό στο επίπεδο ολίσθησης (ή ζ-δυναμικό) και η πυκνότητα επιφανειακού φορτίου (surface charge density). Η τιμή του ζ-δυναμικού υπολογίζεται βάσει της εξίσωσης Helmholtz-Smoluchowski:

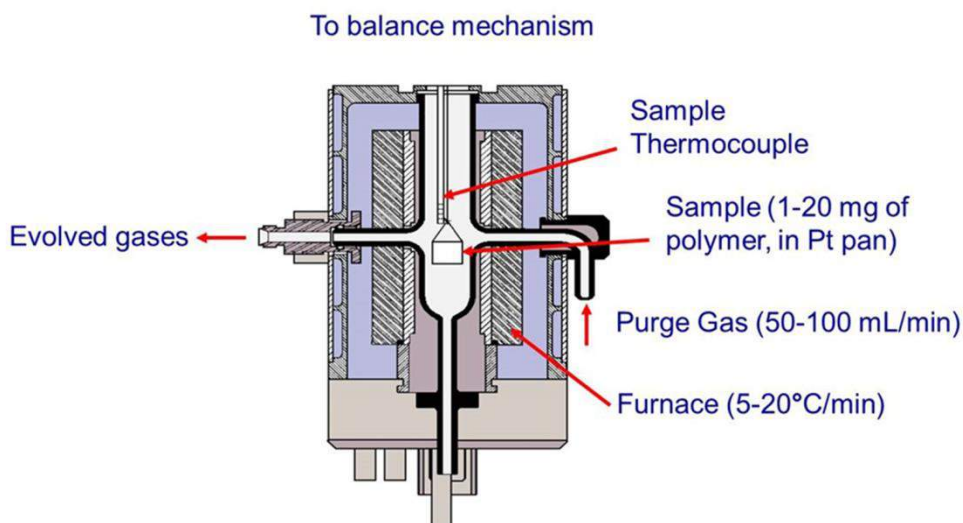
$$Z = \frac{u \cdot \eta}{E \cdot \epsilon} = \frac{\mu_e \cdot \eta}{\epsilon},$$

όπου u (cm/sec) είναι η ταχύτητα μετακίνησης του νανοσωματιδίου στην κυψελίδα της ηλεκτροφόρησης, η (dyne·sec/cm²) είναι το ιξώδες του μέσου, E (mV/cm) η ένταση του εφαρμοζόμενου δυναμικού, ϵ είναι η διηλεκτρική σταθερά του μέσου, ενώ ο λόγος u/E καλείται κινητικότητα της ηλεκτροφόρησης (μ_e).

2.8.5. Θερμοσταθμική Ανάλυση (Thermogravimetric Analysis, TGA) ⁸⁰

Η θερμοσταθμική ανάλυση (TGA) ανήκει στις μεθόδους θερμικής ανάλυσης. Κατά την μέθοδο αυτή προσδιορίζεται η μεταβολή μάζας του δείγματος, λόγω κάποιας μεταβολής στις ιδιότητες του υλικού, συναρτήσει της θερμοκρασίας (ή του χρόνου) καθώς αυτή αυξάνει. Παρακολουθείται η θερμική σταθερότητα και η διαδικασία της αποικοδόμησης του δείγματος, καθώς θερμαίνεται κάτω από διάφορες συνθήκες (συνήθως σε υψηλές θερμοκρασίες). Σημαντικές παράμετροι που πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά τη θερμοσταθμική ανάλυση είναι η αρχική και τελική θερμοκρασία του φούρνου, ο ρυθμός θέρμανσης του δείγματος, ο χρόνος ισοθερμοκρασιακής καταπόνησης, το περιβάλλον αερίου και η ποσότητα του δείγματος.

Κατά τη συγκεκριμένη μέθοδο γνωστή ποσότητα δείγματος τοποθετείται σε προζυγισμένο μεταλλικό χωνευτήριο από πλατίνα ή αλουμίνιο, το οποίο έπειτα κρεμιέται σε ευαίσθητο θερμοζυγό. Το όλο σύστημα τοποθετείται σε φούρνο ελεγχόμενης θερμοκρασίας, με δυνατότητα μεταβολής της. Η θέρμανση γίνεται είτε με την βοήθεια αντιστάσεων είτε, στα πιο σύγχρονα όργανα, με λάμπες φθορίου που φτάνουν σε θερμοκρασίες έως 1200 °C. Η θέρμανση πραγματοποιείται στις περισσότερες των περιπτώσεων υπό αδρανή ατμόσφαιρα, για την αποφυγή οξείδωσης του δείγματος από τον ατμοσφαιρικό αέρα, ενώ τα αποτελέσματα καταγράφονται με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή. Για την βαθμονόμηση του οργάνου χρησιμοποιούνται μέταλλα και κράματα με γνωστές θερμοκρασίες αποικοδόμησης, όπως Ni (358.2 °C) και Co (1116.0 °C). Σχηματική αναπαράσταση του εσωτερικού ενός φούρνου θερμοσταθμικής ανάλυσης φαίνεται στην Εικόνα 2.17.



Εικόνα 2.17: Σχηματική αναπαράσταση του εσωτερικού ενός θερμοζυγού σε όργανο TGA

Από την θερμοσταθμική ανάλυση μπορούν να ληφθούν ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες για τις φυσικοχημικές μεταβολές του δείγματος, την θερμική συμπεριφορά του, την σύσταση και την περιεκτικότητα του δείγματος σε μέταλλα. Συνήθως η θερμοσταθμική ανάλυση προηγείται της διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (DSC) για την εύρεση του εύρους θερμοκρασίας που μπορεί το δείγμα να εξεταστεί, χωρίς να καταστραφεί.

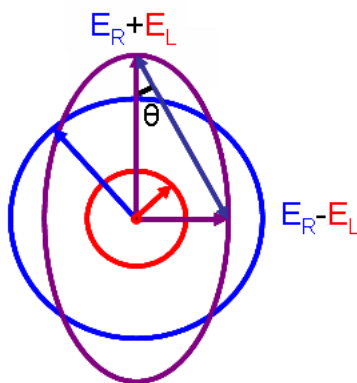
2.8.6. Κυκλικός Διχρωϊσμός (Circular Dichroism, CD) ⁸¹

Τα μόρια και ειδικότερα οι πρωτεΐνες (οπτικά ενεργές ενώσεις), απορροφούν κβάντα φωτός, προάγοντας τα ηλεκτρόνια σε υψηλότερες διεγερμένες καταστάσεις. Το εξερχόμενο φως έχει την ίδια συχνότητα αλλά έχει επιβραδυνθεί, εισάγοντας μια διάφορα φάσης, που είναι ανάλογη της ποσότητας του υλικού.

Στην τεχνική του κυκλικού διχρωϊσμού (CD), μετράται η διαφορά της μοριακής απορροφητικότητας ($\Delta\epsilon = \epsilon_R - \epsilon_L$), κατά την απορρόφηση από την πρωτεΐνη (ή το πολυπεπτίδιο), μίας κυκλικά πολωμένης (αριστερόστροφα ή δεξιόστροφα) μονοχρωματικής ακτινοβολίας φωτός στην περιοχή του far-UV, που οδηγεί σε $\pi \rightarrow \pi^*$ ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις. Αυτές οι μεταβάσεις αποδίδονται στους αμιδικούς δεσμούς των πεπτιδίων (χρωμοφόρα) και επηρεάζονται σημαντικά από την δευτεροταγή δομή τους. Η άνιση απορρόφηση των δύο συνιστώντων ανυσμάτων οδηγεί το συνιστάμενο άνυσμα να ιχνογραφεί μια έλλειψη. Το εξερχόμενο φως χαρακτηρίζεται ως ελλειπτικά πολωμένο, ενώ το φαινόμενο καλείται κυκλικός διχρωϊσμός (Εικόνα 2.18). Αποτελεί το άθροισμα της συνεισφοράς των αμινοξέων του πολυπεπτιδίου και της συνεισφοράς από την αναδίπλωση της κάθε αλυσίδας. Μπορεί να μετρηθεί μέσω της ελλειπτικότητας θ ($\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$), που αντιστοιχεί στην γωνία της οποίας η εφαπτομένη ισούται με τον λόγο του μικρού προς τον μεγάλο άξονα της έλλειψης.

$$[\theta] = \tan^{-1} \epsilon_R - \epsilon_L = 3298.2 \cdot (\epsilon_R - \epsilon_L)$$

$$\Delta\epsilon = \epsilon_R - \epsilon_L$$

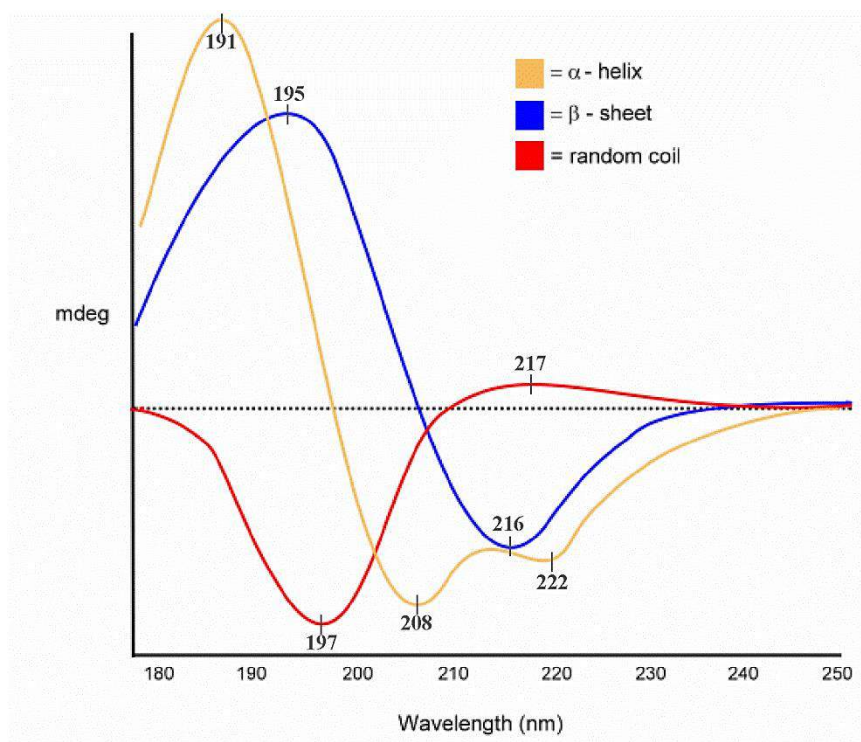


Εικόνα 2.18: Το ελλειπτικά πολωμένο φως (βιολετί) προέρχεται από την άνιση απορρόφηση του δεξιά (μπλε) και αριστερά (κόκκινο) κυκλικά πολωμένου φωτός

Η στροφή του επιπέδου μιας πολωμένης ακτινοβολίας που προκαλείται από ένα οπτικά ενεργό υλικό, ποικίλει με το μήκος κύματος. Η μέτρηση της οπτικής στροφής συναρτήσει του μήκους κύματος είναι η οπτική στροφική διασπορά (ORD), ενώ όπως προαναφέρθηκε κυκλικός διχρωϊσμός (CD) είναι η μέτρηση της άνισης απορρόφησης του δεξιά και αριστερά κυκλικά πολωμένου φωτός. Τα δύο φαινόμενα σχετίζονται μεταξύ τους κατά τον ίδιο τρόπο που η διασπορά σχετίζεται με την απορρόφηση. Συνοπτικά θα μπορούσε να γραφεί:

$$CD = \Delta A = A_L - A_R = \Delta \epsilon \cdot C \cdot l,$$

όπου C είναι η μοριακή συγκέντρωση και l το μήκος της κυψελίδας σε cm. Από τα παραπάνω μπορεί να γίνει αντιληπτό ότι οι έννοιες του κυκλικού διχρωϊσμού και της ελλειπτικότητας είναι ισοδύναμες, καθώς όταν υπάρχει εκλεκτική απορρόφηση του ενός συστατικού του E (δηλ. $CD = A_L - A_R \neq 0$) οι δύο εντάσεις δεν παραμένουν ίσες και επομένως η ακτίνα καθίσταται ελλειπτικά πολωμένη. Έτσι, αν και οι σύγχρονοι διχρωγράφοι μετρούν διαφορές απορρόφησης, είναι κοινή πρακτική να εκφράζεται ο κυκλικός διχρωϊσμός σε μονάδες ελλειπτικότητας, millidegrees ($1 \text{ mdeg} = 3.3 \cdot 10^{-5} \text{ a.u.}$). Το φαινόμενο του κυκλικού διχρωϊσμού προκύπτει από την ενδο- ή διαμοριακή ασυμμετρία μίας μοριακής δομής. Οι χαρακτηριστικές ταινίες απορρόφησης των τριών συνηθέστερων διαμορφώσεων μίας πολυπεπτιδικής δομής (α -έλικα, β -φύλλο και τυχαίο σπείραμα) δίνονται σχηματικά στην Εικόνα 2.19.



Εικόνα 2.19: Απορροφήσεις των τριών συνηθέστερων διαμορφώσεων μίας πολυπεπτιδικής αλυσίδας

2.8.7. Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) ^{79,82}

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) είναι μία από τις πιο σύγχρονες και ευέλικτες μεθόδους ανάλυσης της μικροδομής μεγάλου αριθμού υλικών. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης είναι ένα όργανο που λειτουργεί όπως περίπου και ένα οπτικό μικροσκόπιο, μόνο που χρησιμοποιεί δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας αντί για φως για να εξετάσει αντικείμενα σε λεπτομερή κλίμακα. Τα ηλεκτρόνια λόγω της κυματικής τους φύσης μπορούν να εστιαστούν όπως και τα φωτεινά κύματα αλλά σε πολύ μικρότερη επιφάνεια (π.χ. κόκκος υλικού). Η δέσμη ηλεκτρονίων σαρώνει την επιφάνεια του δείγματος με την οποία αλληλεπιδρά. Από την αλληλεπίδραση αυτή, προκύπτουν πληροφορίες σε σχέση με τα άτομα των στοιχείων που απαρτίζουν το εξεταζόμενο υλικό. Από τα άτομα των στοιχείων εκπέμπονται κυρίως δευτερογενή (secondary) και οπισθοσκεδαζόμενα (backscattered) ηλεκτρόνια καθώς και ακτίνες X. Η ένταση των εκπεμπόμενων ηλεκτρονίων επηρεάζεται από τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας. Έτσι η μικροσκοπία SEM δίνει πληροφορίες που αφορούν κυρίως στη μορφολογία και στη σύσταση της επιφανείας του προς εξέταση υλικού, μέσω λεπτομερών τρισδιάστατων εικόνων. Εφαρμόζοντας ένα σύστημα ανίχνευσης της διασποράς των ενεργειών των ακτίνων X που δημιουργούνται στην επιφάνεια από την προσπίπτουσα δέσμη, μπορεί να γίνει επίσης

ημιποσοτική στοιχειακή ανάλυση του υλικού. Επομένως, το SEM χρησιμοποιείται για την εξέταση της δομής στερεών δειγμάτων και δίνει εικόνες υψηλού βαθμού διεύθυνσης.

Η λειτουργία του SEM στηρίζεται στις αλληλεπιδράσεις του προς εξέταση δείγματος και της προσπίπτουσας σε αυτό δέσμης ηλεκτρονίων. Οι βασικές διατάξεις που υπάρχουν στο μικροσκόπιο είναι το σύστημα παραγωγής δέσμης ηλεκτρονίων, το σύστημα κατεύθυνσης της δέσμης, το σύστημα πληροφοριών και τέλος το σύστημα κενού. Τα βασικά στάδια λειτουργίας ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης είναι:

- Σχηματίζεται μία δέσμη ηλεκτρονίων από την πηγή, η οποία επιταχύνεται προς το δείγμα μέσω ενός θετικού ηλεκτρικού δυναμικού
- Χρησιμοποιώντας μεταλλικά ανοίγματα, ηλεκτρομαγνητικούς φακούς και πηνία σάρωσης, επιτυγχάνεται μία λεπτή εστιασμένη μονοχρωματική δέσμη η οποία σαρώνει την επιφάνεια του δείγματος
- Οι αλληλεπιδράσεις δέσμης δείγματος καταγράφονται από τους ανιχνευτές και μετατρέπονται σε εικόνα.

Τα ηλεκτρόνια παράγονται από ένα νήμα βολφραμίου (υπάρχουν και άλλα υλικά), το οποίο λειτουργεί σαν κάθοδος. Μέσα από το νήμα διέρχεται ρεύμα (filament current) και καθώς το ρεύμα αυξάνεται, εκπέμπονται ηλεκτρόνια τα οποία κατευθύνονται προς την άνοδο στην οποία εφαρμόζεται ένα δυναμικό 1-30 kV (accelerating voltage). Η άνοδος, που είναι θετική όπως και το κύκλωμα, δημιουργεί ισχυρές ελκτικές δυνάμεις στα ηλεκτρόνια. Αποτέλεσμα αυτού είναι ότι η άνοδος κατευθύνει και επιταχύνει τα ηλεκτρόνια, ελέγχει δηλαδή την ενέργειά τους. Καθώς αυξάνεται το ρεύμα του νήματος, φθάνει σε ένα σημείο που δεν εκπέμπονται πλέον άλλα ηλεκτρόνια. Αυτή η κατάσταση ονομάζεται κορεσμός του νήματος (filament saturation). Αν το ρεύμα του νήματος αυξηθεί επιπλέον, έχουμε υπερθέρμανση και εξάχνωση του βολφραμίου, δηλαδή το νήμα καίγεται. Ακόμα όμως και στο σημείο κορεσμού, μέρος του βολφραμίου εξαχνώνεται και γι' αυτό με την πάροδο του χρόνου το νήμα λεptaίνει.

Ο αριθμός ηλεκτρονίων στην δέσμη ορίζεται σαν ρεύμα εκπομπής (emission current). Καθορίζεται από την απόσταση ανάμεσα στην άκρη του νήματος και του ανοίγματος που υπάρχει στο καπάκι. Όσο πιο κοντά είναι τόσο περισσότερα ηλεκτρόνια έλκονται και τόσο μεγαλύτερο γίνεται το ρεύμα εκπομπής. Τα ηλεκτρόνια επιταχύνονται από την άνοδο και περνούν μέσα από ένα ηλεκτρομαγνητικό φακό συμπύκνωσης (condenser lens) που τα μετατρέπει σε δέσμη (στάδιο απομεγέθυνσης). Η ισχύς αυτού του φακού καθορίζει την διάμετρο της δέσμης (spot size). Άλλοι ηλεκτρομαγνητικοί φακοί ελέγχουν την εστίαση της δέσμης πάνω στην επιφάνεια του δείγματος. Κατά την χρήση του SEM, η στήλη πρέπει να βρίσκεται υπό κενό

για να μπορεί να παραχθεί και να διατηρηθεί σταθερή η ακτίνα των ηλεκτρονίων, αλλιώς τα ηλεκτρόνια συγκρούονται με τα μόρια του αέρα και απορροφώνται. Το κενό επιτυγχάνεται με την χρήση δύο αντλιών και είναι της τάξης των $2 \cdot 10^{-3}$ Pa.

2.8.8. Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διαπερατότητας (Transmission Electron Microscopy, TEM) ⁸²

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία διαπερατότητας (TEM) είναι μια τεχνική μικροσκοπίας στην οποία, όπως και στη μικροσκοπία SEM, αντί για φως χρησιμοποιείται δέσμη ηλεκτρονίων προκειμένου να δημιουργηθούν μεγεθυμένα είδωλα των αντικειμένων που εξετάζονται. Η τεχνική TEM πλεονεκτεί των άλλων τεχνικών, εξαιτίας του γεγονότος ότι μια εστιασμένη δέσμη ηλεκτρονίων δίνει τη δυνατότητα πολύ μεγάλης διακριτικής ικανότητας. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι με κατάλληλες διατάξεις και συνθήκες η διακριτική ικανότητα της τεχνικής μπορεί να φτάσει ακόμα και σε επίπεδο ατόμου.

Η τεχνική βασίζεται στο διαφορετικό ποσοστό σκέδασης της δέσμης των ηλεκτρονίων ανάλογα με την διαφορετική ηλεκτρονιακή πυκνότητα ή το διαφορετικό πάχος που έχουν τα υλικά, δημιουργώντας ένα είδωλο με φωτεινές και σκοτεινές περιοχές. Όσο μεγαλύτερη ηλεκτρονιακή πυκνότητα έχει ένα υλικό ή όσο πιο παχύ είναι, τόσο πιο σκοτεινό είναι το είδωλό του στην επιφάνεια καταγραφής. Τα μεταλλικά σωματίδια οδηγούν σε πολύ σκοτεινές περιοχές, ενώ οι ενώσεις με υδρογόνο και άνθρακα σκεδάζουν ελάχιστα. Επίσης, όσο πιο παχύ είναι ένα υλικό, επειδή αυξάνεται η διαδρομή που ακολουθεί η δέσμη των ηλεκτρονίων μέσα στο υλικό, τόσο πιο σκοτεινό είναι το είδωλό του στην εικόνα που καταγράφεται.

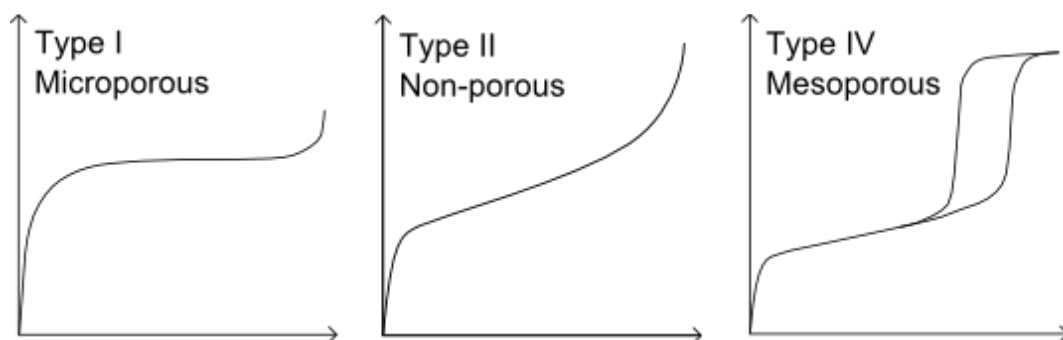
Η τεχνική TEM χρησιμοποιείται ευρύτατα για τη μελέτη πολλών συστημάτων και ιδιαίτερα στο πεδίο της νανοτεχνολογίας, δίνοντας τη δυνατότητα του μορφολογικού χαρακτηρισμού των υλικών που συντίθενται. Τα προς μελέτη υλικά εναποτίθενται πάνω σε κατάλληλες επιφάνειες, οι οποίες σκεδάζουν ελάχιστα την δέσμη ηλεκτρονίων. Η εναπόθεση γίνεται χρησιμοποιώντας αραιά διαλύματα των υλικών ώστε να είναι ομοιογενής η διασπορά των νανοσωματιδίων. Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετούνται στο μικροσκόπιο ώστε να παρατηρηθεί η μορφολογία τους. Περισσότερες λεπτομέρειες αναφορικά με την μέθοδο και την αρχή λειτουργίας του μικροσκοπίου TEM δίνονται στη βιβλιογραφία που παρατίθεται.

2.8.9. Ποροσιμετρία (Porosimetry) ⁸³

Η επιφάνεια και το πορώδες ενός νανοϋλικού μπορούν να επηρεάσουν σε πολύ μεγάλο βαθμό τις ιδιότητες και την συμπεριφορά του σε διάφορες εφαρμογές. Το εμβαδόν της

επιφάνειας ενός υλικού εξαρτάται από ποικίλες παραμέτρους όπως το μέγεθος των σωματιδίων, η τραχύτητα της επιφάνειας και η ύπαρξη ή μη πόρων. Τα χαρακτηριστικά των πόρων, όπως το μέγεθος, ο όγκος και το σχήμα, μπορούν επίσης να επηρεάσουν τις τελικές ιδιότητες του υλικού.

Για τη μέτρηση της επιφάνειας και του πορώδους των στερεών χρησιμοποιείται η τεχνική της προσρόφησης αερίου. Η τεχνική εφαρμόζεται τόσο σε μη πορώδη υλικά, όσο και σε πορώδη, στα όποια το μέγεθος των πόρων μπορεί να κυμαίνεται από την μικροπορώδη ($< 20 \text{ \AA}$) και την μεσοπορώδη ($20\text{-}500 \text{ \AA}$) περιοχή μέχρι την μακροπορώδη περιοχή ($500\text{-}1000 \text{ \AA}$). Το δείγμα αρχικά απαερώνεται ώστε να απομακρυνθούν τυχόν προσροφημένες ή επιφανειακές προσμίξεις (συνήθως υγρασία και CO_2) χρησιμοποιώντας κενό, θερμότητα ή/και αέριο άζωτο. Ένα αέριο-ανιχνευτής (συνήθως άζωτο) εισάγεται κάτω από κρυογονικές θερμοκρασίες και μέχρι κορεσμού της πίεσης. Έπειτα, εφαρμόζεται κενό ώστε να αφαιρεθεί το αέριο, το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε συμπεριφορά υστέρησης (hysteresis behavior). Ακολουθώς, μετρούνται η σχετική πίεση και η ποσότητα του προσροφημένου αερίου και προκύπτει μία ισόθερμη καμπύλη προσρόφησης, η οποία διαφέρει για τις διάφορες κατηγορίες υλικών, όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.10.



Σχήμα 2.10: Ισόθερμες καμπύλες προσρόφησης για διάφορα είδη πορώδων υλικών

Το εμβαδόν της επιφάνειας μπορεί στη συνέχεια να υπολογιστεί με τη χρήση των εξισώσεων Langmuir ή BET (Brunauer, Emmet και Teller), ενώ ένας μεγάλος αριθμός τεχνικών είναι διαθέσιμος για τον υπολογισμό του όγκου των πόρων και της κατανομής του μεγέθους τους, συμπεριλαμβανομένων των μεθόδων BJH (Barrett, Joyner και Halenda), Horvath-Kawazoe και DFT (Density Functional Theory).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

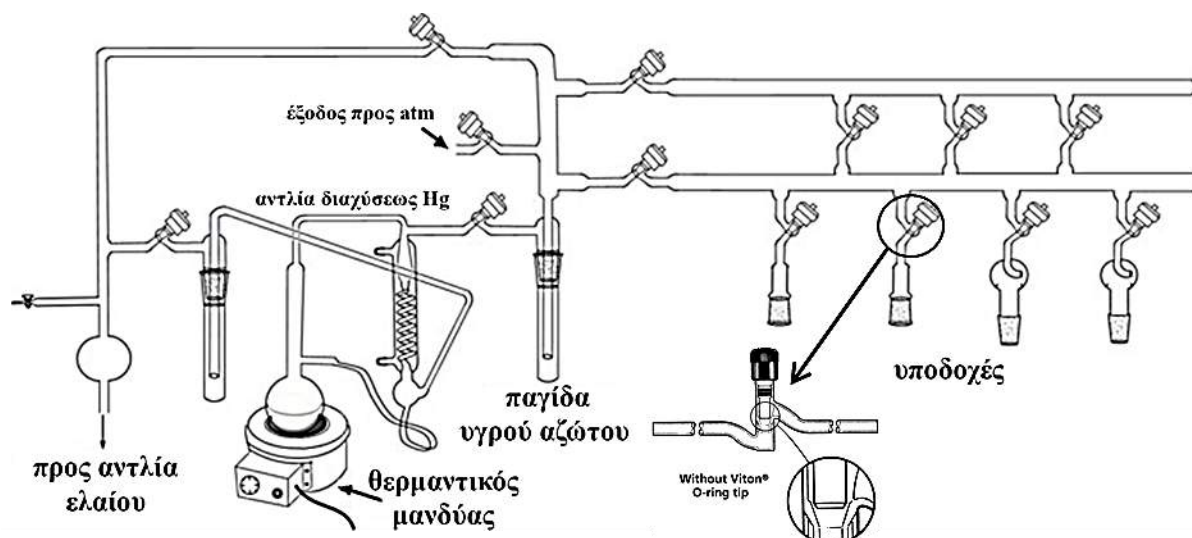
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1. Τεχνικές Υψηλού Κενού (High-Vacuum Techniques, HVT) ⁸⁴⁻⁸⁶

Η σύνθεση των πολυμερών, που αποτελούν το αντικείμενο της παρούσας εργασίας, πραγματοποιήθηκε μέσω τεχνικών υψηλού κενού κάτω από αυστηρά καθορισμένες συνθήκες και με χρήση ειδικά σχεδιασμένων συσκευών πολυμερισμού, οι οποίες κατασκευάζονται με τη βοήθεια υαλουργικών τεχνικών. Ο συνδυασμός αυτός αποτελεί ιδανική μέθοδο για τη σύνθεση μακρομορίων με καλά καθορισμένα μοριακά χαρακτηριστικά και με δυνατότητα άμεσης συσχέτισης μεταξύ της δομής και των ιδιοτήτων τους. Συνεπώς, για να επιτευχθούν τα επιθυμητά αποτελέσματα απαιτούνται κατάλληλες τεχνικές υψηλού κενού ώστε να απομακρυνθούν από το περιβάλλον των αντιδράσεων όλες εκείνες οι προσμείξεις που μπορούν να οδηγήσουν σε παράπλευρες αντιδράσεις.

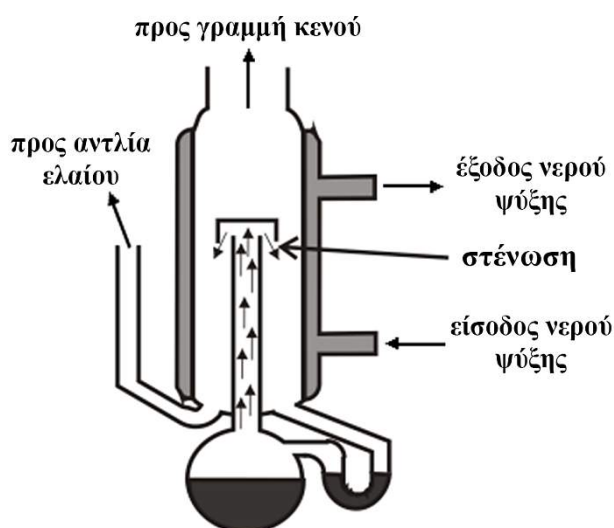
Αρχικά, με την επίτευξη υψηλού κενού στον αντιδραστήρα του πολυμερισμού απομακρύνεται ο ατμοσφαιρικός αέρας που περιέχει πλήθος ανεπιθύμητων προσμείξεων, όπως οξυγόνο, ίχνη υγρασίας, κτλ., οι οποίες μπορούν να αντιδράσουν με τους απαρχητές, τα μονομερή αλλά και τις αναπτυσσόμενες πολυμερικές αλυσίδες. Στη συνέχεια, με εφαρμογή κατάλληλων τεχνικών καθαρισμού των χρησιμοποιούμενων διαλυτών και αντιδραστηρίων επιτυγχάνεται η απομάκρυνση διάφορων ανεπιθύμητων ουσιών από το σύστημα, όπως αλκοόλες, αμίνες, οξέα και άλλες δραστικές προσμείξεις (π.χ. σταθεροποιητές), που περιέχονται στα εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια.

Όλες οι διαδικασίες καθαρισμού των αντιδραστηρίων, διαλυτών, απαρχητών όπως και οι διαδικασίες πολυμερισμού πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια της γραμμής υψηλού κενού (high-vacuum line, HVL), σχηματική αναπαράσταση της οποίας παρατίθεται στο σχήμα 3.1. Η γραμμή υψηλού κενού αποτελείται από γυάλινους σωλήνες τύπου Pyrex, στρόφιγγες Teflon υψηλού κενού (HI-VAC στρόφιγγες χωρίς Viton O-ring tip, εφαρμογή κενού έως $5 \cdot 10^{-7}$ mm Hg), μία αντλία διαχύσεως υδραργύρου και μία αντλία ελαίου. Οι αντλίες ελαίου και διαχύσεως Hg προστατεύονται από διάφορα πτητικά συστατικά (π.χ. ατμοί διαλυτών, αέρια που εκλύονται κατά τη διεξαγωγή αντιδράσεων) τα οποία συμπυκνώνονται σε παγίδες υγρού αζώτου. Με τις στρόφιγγες, το κενό εφαρμόζεται μόνο στα επιθυμητά τμήματα της γραμμής, ενώ τα υπόλοιπα τμήματα παραμένουν απομονωμένα. Η γραμμή υψηλού κενού περιλαμβάνει εξόδους με εσφυρίσματα, μέσω των οποίων συνδέονται οι διάφορες συσκευές και γίνεται η εισαγωγή και η απόσταξη των αντιδραστηρίων (διαλύτες, μονομερή, απαρχητές).



Σχήμα 3.1: Σχηματική αναπαράσταση της γραμμής υψηλού κενού (HVL)

Η αντλία ελαίου δημιουργεί ένα προκαταρκτικό κενό της τάξης των 10^{-2} – 10^{-3} mm Hg. Το κενό αυτό είναι απαραίτητο για να αποστάξει ο υδράργυρος που βρίσκεται στην αντλία διαχύσεως σε σχετικά χαμηλή θερμοκρασία (Σχήμα 3.2). Ο υδράργυρος θερμαίνεται με τη βοήθεια ενός θερμαντικού μανδύα και καθώς τα μόρια του κινούνται ανοδικά, διέρχονται από τη στένωση, η οποία προκαλεί αύξηση της ταχύτητάς τους με ταυτόχρονη ελάττωση της πίεσής τους, ακολουθώντας την αρχή του Bernoulli.



Σχήμα 3.2: Σχηματική αναπαράσταση της αντλίας διαχύσεως υδραργύρου

Σύμφωνα με την αρχή του Bernoulli, όταν ένα ασυμπίεστο ρευστό ρέει κατά μήκος ενός σωλήνα που δεν έχει σταθερή διατομή, ο ρυθμός ροής του δεν πρέπει να αλλάζει. Όταν ένα στοιχείο του ασυμπίεστου ρευστού επιταχύνεται, θα πρέπει να κινείται από μία περιοχή υψηλής

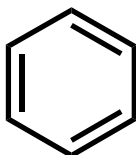
πίεσης προς μία άλλη χαμηλής πίεσης, ώστε να υπάρχει συνισταμένη δύναμη που να το επιταχύνει προς τα εμπρός. Έτσι, κατά τη δίοδο των μορίων του υδραργύρου μέσα από τη στένωση προκαλείται αύξηση της ταχύτητάς τους και λόγω της μείωσης της πίεσης που αυτό προκαλεί, δημιουργείται διαφορά πίεσης (υποπίεση) στα άκρα της στήλης. Κατά την επαφή του με τα τοιχώματα του ψυκτήρα, ο υδράργυρος συμπυκνώνεται και επιστρέφει στη φιάλη, όπου η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Έτσι επιτυγχάνεται το τελικό κενό που είναι της τάξης των 10^{-6} mm Hg, ίσο με την τάση ατμών του υδραργύρου.

Πριν χρησιμοποιηθεί η γραμμή υψηλού κενού πρέπει να τεθεί σε λειτουργία η αντλία ελαίου, να προσαρμοστεί σ' αυτήν η επιθυμητή κενή συσκευή 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 σύστημα. Οι αποστάξεις υπό υψηλό κενό γίνονται με σχετική ευκολία, θερμαίνοντας ελαφρά το προς απόσταξη υγρό και ψύχοντας τον υποδοχέα με υγρό άζωτο (-196°C). Λεπτομέρειες σχετικά με τον χειρισμό της γραμμής υψηλού κενού, τις απαραίτητες προφυλάξεις και τα μέτρα ασφαλείας που πρέπει να λαμβάνονται κατά τη χρήση της αναφέρονται εκτενώς στη βιβλιογραφία.⁸⁴⁻⁸⁶

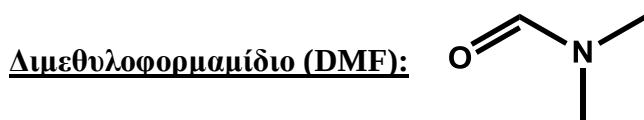
3.2. Καθαρισμός Διαλυτών⁸⁴⁻⁸⁶

Όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στις αντιδράσεις πολυμερισμού όπως επίσης και στις περισσότερες οργανικές αντιδράσεις είναι απαραίτητο να μην περιέχουν ίχνη υγρασίας και οξυγόνου αλλά και να έχουν απομακρυνθεί ανεπιθύμητες προσμείξεις που μπορεί να υπάρχουν. Οι ενώσεις αυτές επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό την πορεία των αντιδράσεων και ανάλογα τις συνθήκες μπορούν να δράσουν ως απαρχητές, επιβραδυντές ή αναστολείς πολυμερισμού, οδηγώντας σε μη επιθυμητά αποτελέσματα όπως είναι η ευρεία κατανομή μοριακών βαρών. Γι' αυτό το λόγο οι εμπορικά διαθέσιμοι διαλύτες υπόκεινται σε περαιτέρω διαδικασίες καθαρισμού, που στις περισσότερες των περιπτώσεων περιλαμβάνουν την αντίδραση τους με κάποιο ξηραντικό μέσο για απομάκρυνση της υγρασίας και εν συνεχεία την απαέρωση και απόσταξή τους υπό κενό. Ακολουθώς παρατίθενται οι διαδικασίες καθαρισμού των οργανικών διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία:

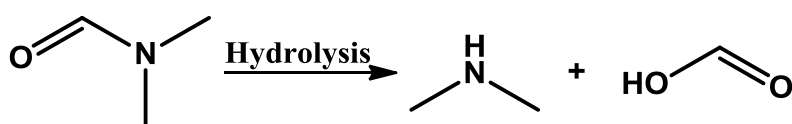
Βενζόλιο:



Το εμπορικά διαθέσιμο βενζόλιο (800 mL, 99% thiophen free grade, Sigma-Aldrich) τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη 1L, ακολούθως προστίθεται μικρή ποσότητα λεπτότατα διαμερισμένου υδριδίου του ασβεστίου (CaH_2) και αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση για μία ημέρα, για την δέσμευση ιχνών υγρασίας από το ξηραντικό μέσο. Στη συνέχεια η φιάλη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού και αφού πρώτα το βενζόλιο έχει ψυχθεί σε όλη του τη μάζα με χρήση υγρού αζώτου, απαερώνεται ενδεδειγμένα και αποστάζεται σε γειτονική σφαιρική φιάλη 1L στην οποία έχει γίνει προηγουμένως ένεση μικρής ποσότητας (~10 mL) κανονικού βουτυλολιθίου ($n\text{-BuLi}$), το οποίο αντιδρά με τις όποιες τυχόν προσμείξεις έχουν παραμείνει. Τέλος, η ποσότητα CaH_2 της αρχικής φιάλης απενεργοποιείται με χρήση τολουολίου και μεθανόλης.



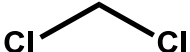
Το DMF αποτελεί το διαλύτη του πολυμερισμού των N-καρβοξυ ανυδριτών (N-carboxy anhydrides, NCAs) των α -αμινοξέων, ενώ χρησιμοποιείται επίσης για την αραίωση των απαρχητών κατά τη σύνθεση των πολυπεπτιδίων αλλά και σε διάφορες οργανικές αντιδράσεις (π.χ. αντιδράσεις αποπροστασίας των πολυπεπτιδίων, αντιδράσεις χημείας “click”).⁸⁷ Το DMF υπόκειται σε θερμική, αλλά και φωτοχημική αποικοδόμηση. Κατά την θερμική του αποικοδόμηση παράγεται διμεθυλαμίνη (DMA) και μονοξείδιο του άνθρακα. Επίσης υδrolύεται αργά παρουσία νερού, παράγοντας DMA και φορμικό οξύ, συστατικά που του αποδίδουν και την χαρακτηριστική οσμή του (Σχήμα 3.3).⁸⁸



Σχήμα 3.3: Αντίδραση υδρόλυσης του DMF προς DMA και φορμικό οξύ

Η παραγωγή DMA είναι μία διαδικασία που πρέπει να αποφεύγεται, καθώς κατά την διάρκεια του πολυμερισμού των NCAs μπορεί να δράσει ως απαρχητής, οδηγώντας σε μη επιθυμητά αποτελέσματα. Για το λόγο αυτό το εμπορικά διαθέσιμο DMF (99.9+% με <50 ppm προσμίξεις, Fischer Scientific) φυλάσσεται υπό αδρανή ατμόσφαιρα στο glove box. Κατά τον καθαρισμό του, περίπου 700 mL του διαλύτη μεταγγίζονται σε σφαιρική φιάλη 1L που φέρει στρόφιγγα, η οποία προηγουμένως έχει υποστεί ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού (flame-drying). Στη συνέχεια η φιάλη με τον διαλύτη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού και απαερώνεται ενδεδειγμένα. Έπειτα το DMF αποστάζεται κλασματικά σε διπλανή σφαιρική φιάλη

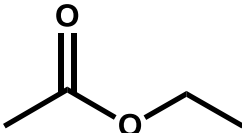
1L. Το πρώτο και το τελευταίο κλάσμα του διαλύτη απορρίπτονται πάντα κατά την απόσταξη και συλλέγονται μόνο τα μεσαία κλάσματα. Το απεσταγμένο DMF που λαμβάνεται, φυλάσσεται στους -20°C , προστατευμένο από το φως.

Διχλωρομεθάνιο (DCM): 

Το εμπορικά διαθέσιμο διχλωρομεθάνιο (800 mL, $\geq 99.8\%$, Sigma-Aldrich) μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη 1L, η οποία περιέχει μικρή ποσότητα πεντοξειδίου του φωσφόρου (P_2O_5) και αφήνεται υπό έντονη ανάδευση για μία ημέρα, ώστε να δεσμευτούν τυχόν ίχνη υγρασίας από το ξηραντικό μέσο. Σε μία δεύτερη σφαιρική φιάλη τοποθετείται μικρή ποσότητα μοριακών κόσκινων και ακολούθως η φιάλη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού και απαερώνεται. Μετά το πέρας των 24 ωρών, η φιάλη με τον διαλύτη τοποθετείται στη γραμμή υψηλού κενού και αφού πρώτα απαερωθεί η ποσότητα του CH_2Cl_2 , αποστάζεται στη γειτονική φιάλη που περιέχει τα μοριακά κόσκινα και αφήνεται υπό κενό. Ο απεσταγμένος διαλύτης αποθηκεύεται σε δροσερό και σκοτεινό μέρος.

Εξάνιο: 

Το εξάνιο χρησιμοποιείται ως μη διαλύτης κατά τη διαδικασία των ανακρυσταλλώσεων για τον καθαρισμό των μονομερών (N-καρβοξυ ανυδρίτες, NCAs). Ο καθαρισμός του εμπορικά διαθέσιμου εξανίου ($>99\%$, Merck Millipore) περιλαμβάνει αρχικά την κατεργασία του με μικρή ποσότητα λεπτότατα διαμερισμένου υδριδίου του ασβεστίου (CaH_2) για μια ημέρα σε σφαιρική φιάλη 2L, για την απομάκρυνση ιχνών υγρασίας. Ακολούθως, πραγματοποιείται απαέρωση και απόσταξη του διαλύτη στη γραμμή υψηλού κενού σε γειτονική σφαιρική φιάλη 2L, που περιέχει μικρή ποσότητα κανονικού βουτυλλιθίου ($n\text{-BuLi}$), το οποίο αντιδρά με τυχόν προσμίξεις, ενώ μετά το τέλος της απόσταξης ακολουθεί νέα απαέρωση. Η ποσότητα CaH_2 της αρχικής φιάλης απενεργοποιείται με χρήση τολουολίου και μεθανόλης.

Οξικός Αιθυλεστέρας (EtOAc): 

Ο οξικός αιθυλεστέρας χρησιμοποιείται ως διαλύτης τόσο για τη σύνθεση των μονομερών (N-καρβοξυ ανυδρίτες, NCAs) από τα αντίστοιχα α -αμινοξέα όσο και για τις ανακρυσταλλώσεις τους. Ο εμπορικά διαθέσιμος διαλύτης (1400 mL, $>99.5\%$, Merck Millipore) αφήνεται να αντιδράσει υπό ανάδευση σε σφαιρική φιάλη 2L με πεντοξειδίο του φωσφόρου (P_2O_5) για μια

ημέρα, οπότε ο διαλύτης αποκτά ένα χαρακτηριστικό μαύρο χρώμα. Στη συνέχεια η φιάλη τοποθετείται στη γραμμή υψηλού κενού, απαερώνεται και εν συνεχεία τα μεσαία κλάσματα του διαλύτη αποστάζονται σε διπλανή σφαιρική φιάλη 2L με στρόφιγγα. Μετά το πέρας της απόσταξης ακολουθεί νέα απαέρωση του διαλύτη.

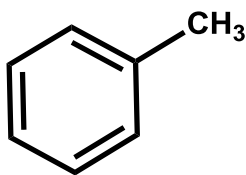
Τετραϋδροφουράνιο (THF):



Αρχικά, το εμπορικώς διαθέσιμο τετραϋδροφουράνιο (1200 mL, max 0.005% H₂O, Merck Millipore) αφήνεται να αντιδράσει για τρεις ώρες παρουσία μεταλλικού νατρίου και στη συνέχεια μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη 2L, η οποία περιέχει μικρή ποσότητα καλά λειοτριβημένου CaH₂ και αφήνεται υπό ανάδευση για μία ημέρα. Ακολουθώντας, η φιάλη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού και η ποσότητα του THF πρώτα απαερώνεται ενδεδειγμένα και έπειτα αποστάζεται σε νέα σφαιρική φιάλη που περιέχει κράμα μεταλλικού νατρίου και καλίου (Na/K alloy) σε αναλογία 1:3 κατά βάρος, όπου αφήνεται υπό ανάδευση για μία ημέρα. Η εμφάνιση χαρακτηριστικού έντονου κυανού χρώματος μετά από λίγες ώρες, αποτελεί ένδειξη υψηλής καθαρότητας του συγκεκριμένου διαλύτη. Έχει προταθεί ότι το χρώμα αυτό, προέρχεται από σύμπλοκα του διαλύτη με αρνητικά ιόντα των μετάλλων, κυρίως του καλίου, λόγω μεταφοράς ηλεκτρονίων μέσω του THF (επιδιαλυτωμένα ηλεκτρόνια) σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Τολουόλιο:

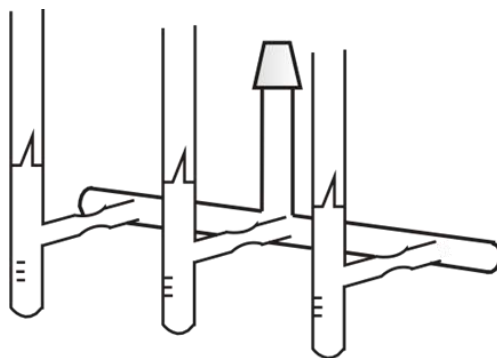


Όμοια με την διαδικασία που ακολουθείται για τον καθαρισμό του βενζολίου, το εμπορικώς διαθέσιμο τολουόλιο (800 mL, 99.8%, Sigma-Aldrich) τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη 1L που περιέχει μικρή ποσότητα καλά λειοτριβημένου υδριδίου του ασβεστίου (CaH₂) για να αντιδράσει τυχόν υγρασία και αφήνεται υπό ανάδευση για μία ημέρα. Στη συνέχεια η σφαιρική φιάλη τοποθετείται στη γραμμή υψηλού κενού και ο διαλύτης απαερώνεται και αποστάζεται σε βαθμονομημένο κύλινδρο στην οποία έχει γίνει ένεση μικρής ποσότητας κανονικού βουτυλλοιθίου (n-BuLi). Το ζωηρό πορτοκαλί χρώμα του παραπάνω διαλύματος αποτελεί ένδειξη υψηλής καθαρότητας του συγκεκριμένου διαλύτη. Η ποσότητα CaH₂ της αρχικής φιάλης απενεργοποιείται με χρήση τολουολίου και μεθανόλης.

3.3. Καθαρισμός Απαρχητών και Αντιδραστηρίων



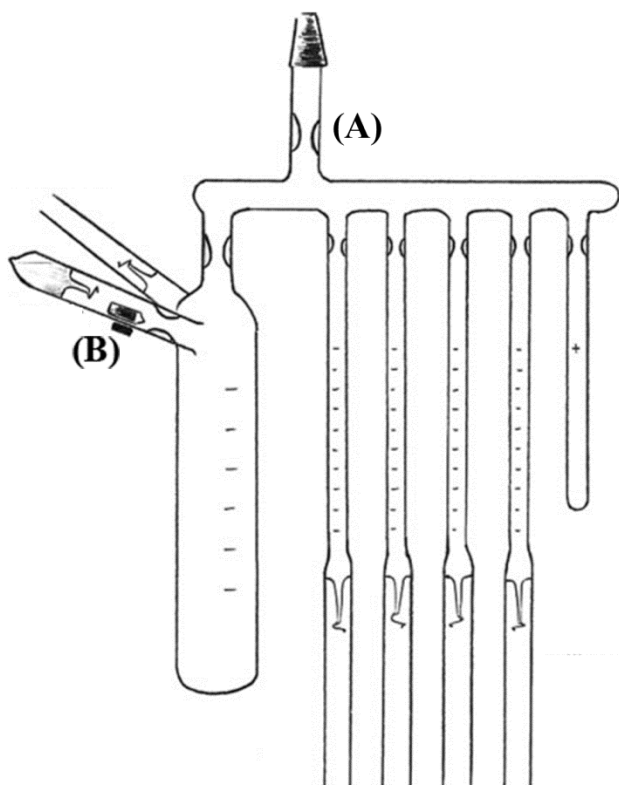
Η διμεθυλαμίνη (DMA) χρησιμοποιήθηκε ως απαρχητής για τον πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου των NCAs. Η DMA πρέπει να υγροποιηθεί για να ακολουθήσει ο καθαρισμός της, διότι βρίσκεται σε αέρια κατάσταση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (σ.ζ.=7 °C) με υψηλή τάση ατμών (170.3 kPa στους 20 °C). Για την υγροποίηση της προσαρμόζεται η οβίδα του αερίου στην γραμμή υψηλού κενού και πραγματοποιείται διεξοδικός έλεγχος με την βοήθεια του πηνίου Tesla για τυχόν διαρροές. Σε γειτονική υποδοχή προσαρμόζεται σφαιρική φιάλη των 100 mL που έχει απαερωθεί και περιέχει κάτοπτρο νατρίου. Η φιάλη εν συνεχεία ψύχεται με την βοήθεια λουτρού ισοπροπανόλης/ξηρού πάγου στους -78 °C. Τέλος ανοίγεται η στρόφιγγα της οβίδας σιγά και με ιδιαίτερη προσοχή ώστε να μην συμπυκνωθεί μεγαλύτερος όγκος αερίου από αυτόν της φιάλης. Όταν έχουν συμπυκνωθεί περίπου 10 mL DMA, το λουτρό ισοπροπανόλης/ξηρού πάγου ανταλλάσσεται γρήγορα με παγόνερο και αφήνεται το υγροποιημένο πλέον αέριο να αντιδράσει με το νάτριο για δύο ώρες. Περιοδικά συμπληρώνεται πάγος στο λουτρό, ώστε καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης η θερμοκρασία να μην υπερβεί το σημείο ζέσεως της DMA. Ακολούθως, η επιθυμητή ποσότητα DMA αποστάζεται σε κατάλληλη συσκευή που διαθέτει βαθμονομημένες αμπούλες (Σχήμα 3.4). Η κάθε αμπούλα του πυκνού απαρχητή ψύχεται με υγρό άζωτο, απαερώνεται, συντήκεται στην στένωση που φέρει και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.



Σχήμα 3.4: Σχηματική αναπαράσταση συσκευής για την παραλαβή ενώσεων χαμηλού σημείου ζέσεως

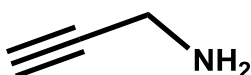
Μία από τις αμπούλες αυτές προσαρμόζεται σε συσκευή αραίωσης, η οποία μέσω του εσφυρίσματος που διαθέτει τοποθετείται στη γραμμή υψηλού κενού (Σχήμα 3.5). Ακολουθεί προσεκτική απαέρωση και ξήρανση της συσκευής (flame-drying) πριν την απόσταξη ποσότητας διαλύτη (DMF ή THF) ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση του απαρχητή. Κατόπιν, η

συσκευή απομακρύνεται από τη γραμμή κενού με σύντηξη στο σημείο (A) και προστίθεται ο απαρχητής με θραύση του γυάλινου υμένα (break-seal) της αμπούλας στο σημείο (B).



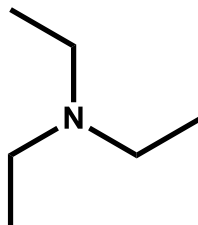
Σχήμα 3.5: Σχηματική αναπαράσταση συσκευής αραίωσης απαρχητή

Προπαργυλαμίνη (PAA):



Όμοια με την DMA, η προπαργυλαμίνη χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ως απαρχητής για τον πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου των NCAs. Η διαφορά της ένωσης αυτής είναι ότι ο τριπλός δεσμός που διαθέτει παραμένει στο ένα άκρο της πολυμερικής αλυσίδας και έτσι μπορεί να αξιοποιηθεί για καταλυόμενες από Cu(I) αντιδράσεις χημείας “click” μεταξύ του αλκινίου και ενός διαθέσιμου αζιδίου (CuAAC “click” reactions). Για τον καθαρισμό της ένωσης, η απαραίτητη ποσότητα PAA (5 mL, 98%, Sigma-Aldrich) προστίθεται σε σφαιρική φιάλη 50 mL που περιέχει μικρή ποσότητα καλά λειοτριβημένου CaH_2 και αφήνεται για ξήρανση για μία ημέρα. Ακολούθως η φιάλη τοποθετείται στη γραμμή υψηλού κενού με χρήση κατάλληλου επιθέματος και η ποσότητα διαδοχικά απαερώνεται και αποστάζεται σε βαθμονομημένο κύλινδρο ο οποίος διαθέτει στρόφιγγα όπου διατηρείται υπό κενό. Η ποσότητα CaH_2 της αρχικής φιάλης απενεργοποιείται με χρήση τολουολίου και μεθανόλης.

Τριαιθυλαμίνη (Et₃N):



Η τριαιθυλαμίνη χρησιμοποιείται κατά την σύνθεση του $N_{(im)}$ -Trt-His NCA ως μέσω δέσμευσης του παραγόμενου υδροχλωρίου. Για τον καθαρισμό της, η απαραίτητη ποσότητα Et₃N (150 mL, >99%, Acros Organics) τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη 250 mL που περιέχει μικρή ποσότητα καλά λειοτριβημένου CaH₂ και αφήνεται υπό ανάδευση για μία ημέρα. Έπειτα η σφαιρική φιάλη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού και αφού πρώτα απαερωθεί η ποσότητα της Et₃N, ακολουθεί απόσταξη σε σφαιρική φιάλη με στρόφιγγα που περιέχει λεπτότατα κομμένες πλάκες μεταλλικού νατρίου και αποθηκεύεται υπό κενό.

3.4. Σύνθεση και Καθαρισμός Μονομερών (N-Καρβοξυ Ανυδριτών των α-Αμινοξέων)

Τα μονομερή που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση καλά καθορισμένων πολυπεπτιδίων, δηλαδή οι N-καρβοξυ ανυδρίτες (N-Carboxy Anhydrides, NCAs) των α-αμινοξέων, δεν είναι εμπορικά διαθέσιμα κατά πλειονότητα και μπορούν να συντεθούν μόνο εργαστηριακά. Μόνο όταν είναι N-υποκατεστημένοι παρουσιάζουν σταθερότητα και άρα εμπορική εφαρμογή, ενώ χρησιμοποιούνται κατά την σύνθεση πεπτιδίων καθορισμένης αλληλουχίας. Η σύνθεση των NCAs που χρησιμοποιούνται στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, αλλά και με την εφαρμογή κατάλληλων τροποποιήσεων της συνθετικής πορείας όπου αυτό κρίθηκε απαραίτητο. Ακολούθως παρατίθενται οι μέθοδοι σύνθεσης και καθαρισμού των μονομερών $N_{(im)}$ -Trt-His NCA, tBMLC NCA και BLG NCA.

3.4.1. Σύνθεση και Καθαρισμός του N-Carboxy Anhydride της $N_{(im)}$ -Trityl-L-Histidine ($N_{(im)}$ -Trt-His NCA) ^{52,89}

Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη 1L, η οποία περιέχει μαγνητικό αναδευτήρα και αρχικά έχει πραγματοποιηθεί ξήρανση της (flame-drying) στη γραμμή υψηλού κενού (HVL) μέσω κατάλληλου προσαρμογέα, προστίθενται 20.0 g της πρόδρομης ένωσης BOC-His(Trt)-OH (40.2 mmol, MB=497.58 g/mol, Senn Chemicals), υπό συνεχή παροχή αργού. Η φιάλη με την ένωση προσαρμόζεται στην HVL και το στερεό αφήνεται να ξηρανθεί ενδελεχώς για μια ημέρα. Την επόμενη μέρα στη σφαιρική φιάλη με την ποσότητα της BOC-His(Trt)-OH αποστάζονται

περίπου 150 mL καθαρού THF (βλ. παραγρ. 3.2.). Παρατηρείται ότι το στερεό διαλύεται γρήγορα στο THF, δίνοντας ένα διαυγές και ελαφρώς υποκίτρινο διάλυμα.

Στη συνέχεια η φιάλη απομακρύνεται από τη γραμμή υψηλού κενού και μεταφέρεται σε απαγωγό όπου προετοιμάζεται η πειραματική διάταξη για την αντίδραση σύνθεσης του $N_{(im)}$ -Trt-His NCA. Η φιάλη τοποθετείται σε λουτρό με παγόνερο (0 °C) και στη μία είσοδο της προσαρμόζεται κατάλληλο επίθεμα για συνεχή παροχή αργού, ενώ στη δεύτερη είσοδο της φιάλης προσαρμόζεται γυάλινο σταγονομετρικό χωνί που διαθέτει στρόφιγγα, το οποίο έχει πρώτα ξηρανθεί σε φούρνο (150 °C). Παράλληλα, σε άλλη σφαιρική φιάλη των 50 mL, αποστάζονται μέσω της γραμμής υψηλού κενού περίπου 20 mL καθαρού THF και μεταγγίζονται στο σταγονομετρικό χωνί της συσκευής. Ακολούθως στο χωνί προστίθενται με χρήση σύριγγας και διαλύονται 3.52 mL θειονυλοχλωριδίου (SOCl_2 , 44.2 mmol, MB=118.97 g/mol, d=1.631 g/mL, 1.2 eq, Acros Organics) που χρησιμοποιείται ως μέσο χλωρίωσης κατά την αντίδραση σχηματισμού του δακτυλίου του NCA. Η προσθήκη του αραιωμένου SOCl_2 στη φιάλη της BOC-His(Trt)-OH γίνεται στάγδην και υπό συνεχή ανάδευση σε βάθος χρόνου περίπου 15 min. Αφού ολοκληρωθεί η προσθήκη του αντιδραστήριου, το σταγονομετρικό χωνί αποσπάται από τη διάταξη, η φιάλη πωματίζεται και η αντίδραση διατηρείται για 2.5 ώρες. Παρατηρείται ότι μόλις η αντίδραση ολοκληρωθεί, το διάλυμα αρχίζει να αποκτά ιξώδες και το χρώμα του από υποκίτρινο γίνεται πορτοκαλί (Εικόνα 3.1). Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης γίνεται λήψη φασμάτων FT-IR, έτσι ώστε να παρακολουθείται η πρόοδός της.



Εικόνα 3.1: Διάλυμα της BOC-His(Trt)-OH σε THF πριν την προσθήκη του SOCl_2 (αριστερά) και μετά από 2.5 ώρες αντίδρασης με SOCl_2 (δεξιά)

Στο σημείο αυτό, στη φιάλη της αντίδρασης υπάρχουν ο $N_{(im)}$ -Trt-His NCA, το υδροχλωρικό άλας του NCA ($N_{(im)}$ -Trt-His NCA·HCl) αλλά και ποσότητα της αρχικής ένωσης BOC-His(Trt)-OH που δεν έχει αντιδράσει. Για το λόγο αυτό στη φιάλη προστίθενται *in situ*

περίπου 700 mL διαιθυλαιθέρα και αμέσως παρατηρείται καταβύθιση του υδροχλωρικού άλατος του NCA ως το κύριο προϊόν. Στον διαιθυλαιθέρα παραμένει διαλυτή η μικρή ποσότητα της πρόδρομης ένωσης της ιστιδίνης και η περίσσεια του SOCl_2 , οι οποίες διαχωρίζονται από το $N_{(\text{im})}$ -Trt-His NCA·HCl και την ποσότητα του $N_{(\text{im})}$ -Trt-His NCA που έχει σχηματισθεί μέσω διήθησης υπό κενό σε χωνί Buchner. Η διήθηση πραγματοποιείται υπό συνεχή παροχή αργού. Το διήθημα απορρίπτεται ενώ το υποκίτρινο στερεό που παραμένει στο φίλτρο συλλέγεται σε άδεια σφαιρική φιάλη 500 mL, που έχει πρώτα υποστεί flame-drying, και αφήνεται για ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα.

Την επόμενη ημέρα αποστάζονται 200-250 mL καθαρού EtOAc στη φιάλη με το στερεό. Η φιάλη απομακρύνεται από τη HVL και έπειτα το γαλακτώδες και κιτρινωπό διάλυμα που προκύπτει μεταφέρεται σε απαγωγό όπου τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 45 °C για περίπου μία ώρα. Μετά το πέρας της μίας ώρας στους 45 °C, η φιάλη τοποθετείται σε λουτρό με παγόνερο (0 °C) για περίπου 15 min ακόμα οδηγώντας σε πλήρη καταβύθιση του $N_{(\text{im})}$ -Trt-His NCA·HCl με τη μορφή ιζήματος, ενώ ο $N_{(\text{im})}$ -Trt-His NCA παραμένει διαλυτός στον EtOAc. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό σε χωνί Buchner, όπου το στερεό ($N_{(\text{im})}$ -Trt-His NCA·HCl) που έχει παραμείνει στο φίλτρο ξεπλένεται με ποσότητα EtOAc προς απομάκρυνση τυχόν προσμίξεων, συλλέγεται σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη 500 mL και αφήνεται προς ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα.

Την επόμενη ημέρα ζυγίζεται η φιάλη με το ξηρό πλέον στερεό (14.61 g, 31.8 mmol, MB=459.5 g/mol) και έπειτα αποστάζονται σ' αυτή 200 mL EtOAc. Αφού ληφθεί η απαιτούμενη ποσότητα του διαλύτη, η φιάλη απομακρύνεται από την HVL και τοποθετείται σε υδατόλουτρο (25 °C) όπου αφήνεται υπό ανάδευση. Στη συνέχεια τιτλοδοτείται η ποσότητα του $N_{(\text{im})}$ -Trt-His NCA·HCl με ισομοριακή ποσότητα τριαθυλαμίνης (Et_3N), έτσι ώστε να δεσμευτεί το HCl από το άλας του NCA, δίνοντας το τελικό προϊόν του καθαρού $N_{(\text{im})}$ -Trt-His NCA. Έτσι, σε καθαρή σφαιρική φιάλη των 50 mL, στην οποία έχει γίνει ενδεδειγμένος flame-drying, αποστάζονται περίπου 20 mL EtOAc μέσω της γραμμής υψηλού κενού. Σε αυτό τον όγκο διαλύτη θα πραγματοποιηθεί αραίωση της ποσότητας Et_3N που θα χρησιμοποιηθεί στην διαδικασία της τιτλοδότησης ώστε να μην δημιουργηθεί τοπική περίσσεια κατά την προσθήκη της στη φιάλη της αντίδρασης. Παράλληλα, αποστάζεται στη γραμμή υψηλού κενού μικρή ποσότητα (~6 mL) καθαρής Et_3N σε κατάλληλη απαερωμένη συσκευή που φέρει στρόφιγγα.

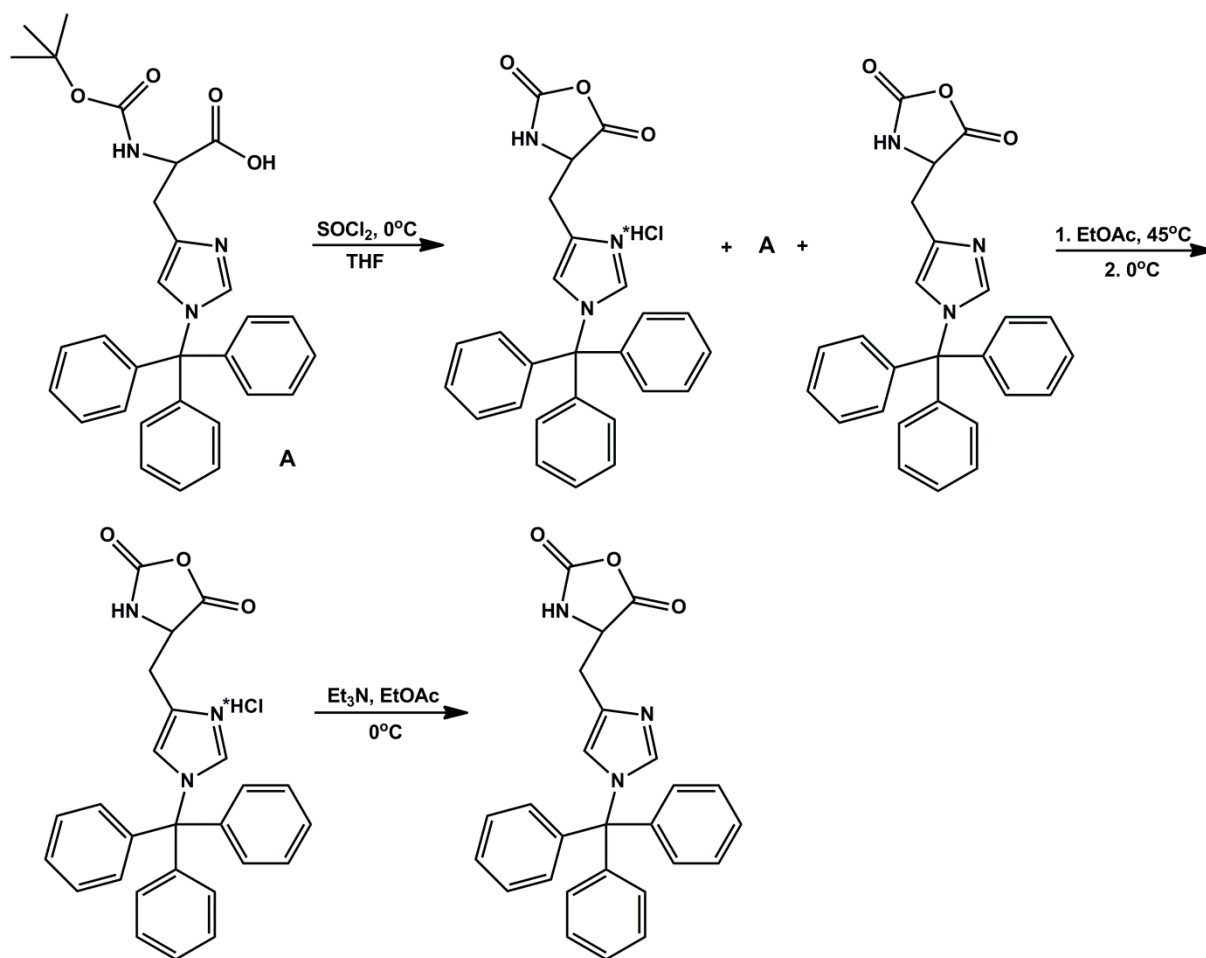
Η φιάλη που περιέχει το υδροχλωρικό άλας του NCA τοποθετείται σε λουτρό με παγόνερο (0 °C), ενώ προσαρμόζονται σε αυτή με χρήση κατάλληλων επιθεμάτων συνεχή παροχή αργού και γυάλινο σταγονομετρικό χωνί με στρόφιγγα, το οποίο έχει πρώτα ξηρανθεί σε φούρνο (150 °C). Τα 20 mL του EtOAc και 4.434 mL Et_3N (31.8 mmol, MB=101.19 g/mol, d=0.7255 g/mL)

(1:1 ποσότητα σε σχέση με τα mol του άλατος $N_{(im)}\text{-Trt-His NCA}\cdot\text{HCl}$) διαλύονται στο σταγονομετρικό χωνί και η προσθήκη του διαλύματος γίνεται στάγδην και υπό συνεχή ανάδευση σε βάθος χρόνου περίπου 15 min. Μετά την ολοκλήρωση της προσθήκης παρατηρείται χαρακτηριστική αλλαγή του χρώματος του διαλύματος που είναι ενδεικτική του σχηματισμού του τελικού προϊόντος (Εικόνα 3.2). Το υδροχλωρικό άλας της τριαιθυλαμίνης ($\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{HCl}$) που προκύπτει ως παραπροϊόν είναι αδιάλυτο στον EtOAc (σχηματισμός ιζήματος), ενώ ο $N_{(im)}\text{-Trt-His NCA}$ παραμένει διαλυτός. Συνεπώς, ο διαχωρισμός των δύο ενώσεων πραγματοποιείται μέσω διήθησης υπό κενό σε χωνί Buchner.



Εικόνα 3.2: Διάλυμα υδροχλωρικού άλατος του $N_{(im)}\text{-Trt-His NCA}$ πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) την προσθήκη του διαλύματος της Et_3N

Σε δίλιμη σφαιρική φιάλη 2L, προστίθενται περίπου 1.5L απεσταγμένου εξανίου και προσαρμόζεται σ' αυτή διηθητικό χωνί στο οποίο διηθείται το περιεχόμενο της παραπάνω φιάλης. Στο χωνί απομονώνεται το στερεό άλας $\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{HCl}$, ενώ το διήθημα οδηγείται στο εξάνιο, όπου καταβυθίζεται ο καθαρός πλέον $N_{(im)}\text{-Trt-His NCA}$. Αμέσως διηθείται σε άλλη φιάλη 2L, στην οποία έχει προσαρμοστεί χωνί Buchner, όπου η ποσότητα του NCA παραμένει στο φίλτρο. Οι διηθήσεις πραγματοποιούνται υπό συνεχή παροχή αργού. Το λευκό στερεό που προκύπτει συλλέγεται σε σφαιρική φιάλη των 250 mL, η οποία έχει πρώτα υποστεί ενδελεχώς flame-drying, και αφήνεται προς ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα. Την επόμενη ημέρα, η φιάλη απομακρύνεται από την HVL και μεταφέρεται στο glove box, όπου ζυγίζεται και στη συνέχεια φυλάσσεται ο τελικός $N_{(im)}\text{-Trt-His NCA}$ (12.1 g, 28.57 mmol, απόδοση=71.1%). Η πορεία των αντιδράσεων που ακολουθείται για τη σύνθεση του $N_{(im)}\text{-Trt-His NCA}$ συνοψίζεται στο Σχήμα 3.6.



Σχήμα 3.6: Αντιδράσεις σύνθεσης του $N_{(im)}$ -Trt-His NCA

3.4.2. Σύνθεση και Καθαρισμός του N-Carboxy Anhydride της S-tert-Butylmercapto-L-Cysteine (tBMLC NCA) ^{66,90}

Σε δύλαμη σφαιρική φιάλη 100 mL, η οποία περιέχει μαγνητικό αναδευτήρα και αρχικά έχει πραγματοποιηθεί ξήρανση της (flame-drying) στη γραμμή υψηλού κενού (HVL) μέσω κατάλληλου προσαρμογέα, προστίθενται 3.0 g της πρόδρομης ένωσης H-Cys(StBu)-OH (14.33 mmol, MB=209.33 g/mol, Bachem), υπό συνεχή παροχή αργού. Η φιάλη με την ένωση προσαρμόζεται στην HVL και το στερεό αφήνεται προς ξήρανση για μια ημέρα. Την επόμενη μέρα στη σφαιρική φιάλη με την ποσότητα της H-Cys(StBu)-OH αποστάζονται περίπου 50 mL καθαρού EtOAc (βλ. παραγρ. 3.2.). Παρατηρείται ότι το στερεό δεν διαλύεται πλήρως στον EtOAc δίνοντας ένα λευκό γαλακτώδες (μη διαυγές) αιώρημα.

Ακολούθως, η φιάλη απομακρύνεται από τη γραμμή υψηλού κενού και μεταφέρεται σε απαγωγό όπου προετοιμάζεται η πειραματική διάταξη για την αντίδραση σύνθεσης του tBMLC NCA. Στη μία είσοδο της φιάλης προσαρμόζεται κατάλληλο επίθεμα για συνεχή παροχή αργού, ενώ στη δεύτερη είσοδο της φιάλης τοποθετείται κατακόρυφος ψυκτήρας και γυάλινο

σταγονομετρικό χωνί που διαθέτει στρόφιγγα, το οποίο έχει πρώτα ξηρανθεί σε φούρνο (150 °C), με χρήση κατάλληλου προσαρμογέα. Αρχικά στη συσκευή της αντίδρασης προστίθενται 5.15 mL (R)-(+)-limonene (31.8 mmol, MB=136.23 g/mol, d=0.842 g/mL, 2.2 eq, Alfa Aesar), το οποίο δρα ως αντιδραστήριο δέσμευσης του παραγόμενου HCl, και στη συνέχεια το διάλυμα θερμαίνεται μέχρι να επιτευχθεί επαναρροή του διαλύτη με χρήση υδατόλουτρου (75-80 °C).

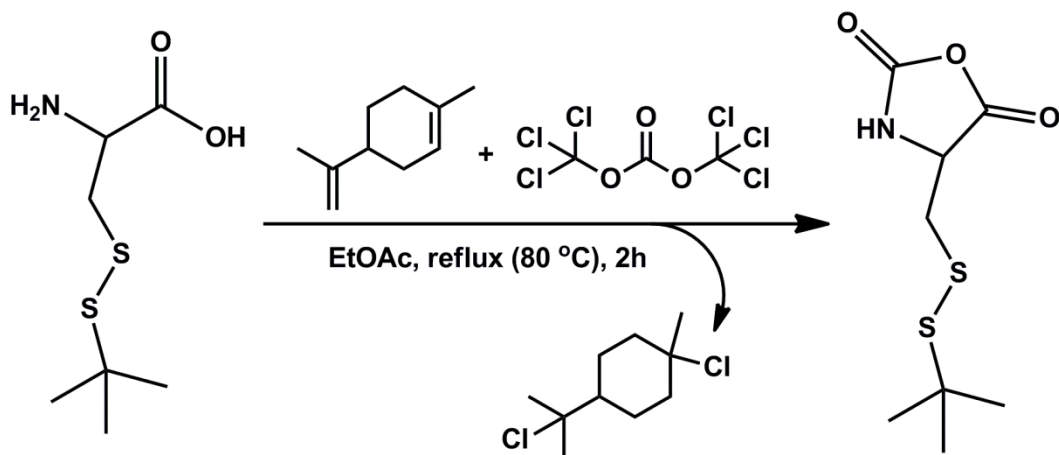
Παράλληλα σε άλλη σφαιρική φιάλη των 50 mL, αποστάζονται μέσω της γραμμής υψηλού κενού περίπου 25 mL καθαρού EtOAc και μεταγγίζονται στο σταγονομετρικό χωνί της συσκευής. Ακολούθως στην ποσότητα EtOAc που βρίσκεται στο χωνί, διαλύονται 2.96 g τριφωσγενίου (9.97 mmol, MB=296.75 g/mol, 0.69 eq, Acros Organics) που χρησιμοποιείται ως μέσο χλωρίωσης κατά την αντίδραση σχηματισμού του δακτυλίου του NCA. Η προσθήκη του διαλύματος του τριφωσγενίου στη φιάλη της H-Cys(StBu)-OH, που βρίσκεται υπό επαναρροή, γίνεται στάγδην και υπό συνεχή ανάδευση σε βάθος χρόνου περίπου 15 min. Αφού ολοκληρωθεί η προσθήκη του αντιδραστήριου, το σταγονομετρικό χωνί αποσπάται από τη διάταξη, η φιάλη πωματίζεται και το διάλυμα διατηρείται υπό επαναρροή για δύο ώρες ώστε να ολοκληρωθεί η αντίδραση. Παρατηρείται σταδιακή αλλαγή του χρώματος του διαλύματος όσο προχωράει η αντίδραση, το οποίο από λευκό και μη διαυγές μετατρέπεται σε ελαφρώς υποκίτρινο και διαυγές (Εικόνα 3.3), γεγονός που αποτελεί ένδειξη της επιτυχούς σύνθεσης του tBMLC NCA. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης γίνεται λήψη φασμάτων FT-IR, έτσι ώστε να παρακολουθείται η πρόοδος της.



Εικόνα 3.3: Διάλυμα της H-Cys(StBu)-OH σε EtOAc πριν την προσθήκη τριφωσγενίου (αριστερά) και μετά από δύο ώρες αντίδρασης προς σχηματισμό του tBMLC NCA (δεξιά)

Μετά το πέρας των δύο ωρών, το περιεχόμενο της φιάλης διηθείται υπό κενό σε χωνί Buchner προς απομάκρυνση τυχόν στερεών προσμίξεων και το διήθημα του tBMLC NCA καταβυθίζεται *in situ* σε περίπου 60 mL εξανίου. Ακολουθεί εκ νέου διήθηση υπό κενό σε χωνί

Buchner προς απομόνωση του ιριδίζοντος λευκού στερεού που προκύπτει. Οι διηθήσεις πραγματοποιούνται υπό συνεχή παροχή αργού. Το τελικό προϊόν συλλέγεται σε απαερωμένη σφαιρική φιάλη των 50 mL και αφήνεται προς ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα. Την επόμενη ημέρα, η φιάλη απομακρύνεται από την HVL και μεταφέρεται στο glove box, όπου ζυγίζεται και στη συνέχεια φυλάσσεται ο τελικός tBMLC NCA (2.4 g, 10.2 mmol, απόδοση=71.2%). Συνοπτικά, η αντίδραση που ακολουθείται για τη σύνθεση του tBMLC NCA δίνεται στο Σχήμα 3.7.



Σχήμα 3.7: Αντίδραση σύνθεσης του tBMLC NCA

3.4.3. Σύνθεση και Καθαρισμός του N-Carboxy Anhydride του γ -Benzyl-L-Glutamate (BLG NCA)^{52,66}

Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη 1L, η οποία περιέχει μαγνητικό αναδευτήρα και αρχικά έχει πραγματοποιηθεί ξήρανση της (flame-drying) στη γραμμή υψηλού κενού (HVL) μέσω κατάλληλου προσαρμογέα, προστίθενται 20.0 g της πρόδρομης ένωσης H-Glu(OBzl)-OH (84.3 mmol, MB=237.25 g/mol, Sigma-Aldrich), υπό συνεχή παροχή αργού. Η φιάλη με την ένωση προσαρμόζεται στην HVL και το στερεό αφήνεται προς ξήρανση για μια ημέρα. Την επόμενη μέρα στη σφαιρική φιάλη με την ποσότητα του H-Glu(OBzl)-OH αποστάζονται περίπου 400 mL καθαρού EtOAc. Παρατηρείται ότι το στερεό βρίσκεται υπό μορφή λευκού αιωρήματος στον συγκεκριμένο διαλύτη.

Ακολούθως, η φιάλη απομακρύνεται από τη γραμμή υψηλού κενού και μεταφέρεται σε απαγωγό όπου προετοιμάζεται η πειραματική διάταξη για την αντίδραση σύνθεσης του BLG NCA. Στη μία είσοδο της φιάλης προσαρμόζεται κατάλληλο επίθεμα για συνεχή παροχή αργού, ενώ στη δεύτερη είσοδο της φιάλης τοποθετείται κατακόρυφος ψυκτήρας και γυάλινο σταγονομετρικό χωνί που διαθέτει στρόφιγγα, το οποίο έχει πρώτα ξηρανθεί σε φούρνο (150

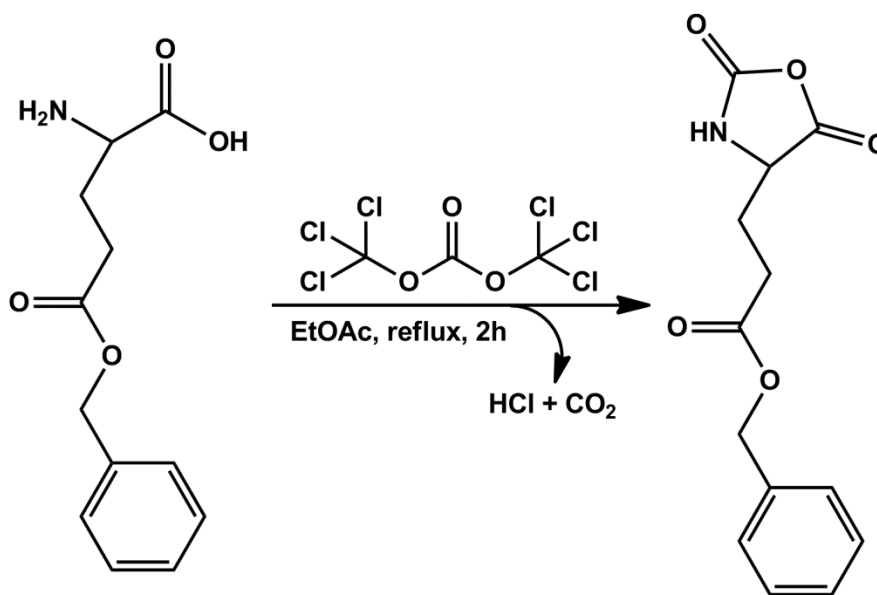
°C), με χρήση κατάλληλου προσαρμογέα. Στη συνέχεια το διάλυμα θερμαίνεται μέχρι να επιτευχθεί επαναρροή του διαλύτη με χρήση υδατόλουτρου (75-80 °C).

Παράλληλα σε άλλη σφαιρική φιάλη των 50 mL, αποστάζονται μέσω της γραμμής υψηλού κενού περίπου 35 mL καθαρού EtOAc και μεταγγίζονται στο σταγονομετρικό χωνί της συσκευής. Ακολούθως στην ποσότητα EtOAc που βρίσκεται στο χωνί, διαλύονται 11.26 g τριφωσγενίου (37.94 mmol, MB=296.75 g/mol, 0.45 eq, Acros Organics) που χρησιμοποιείται ως μέσο χλωρίωσης κατά την αντίδραση σχηματισμού του δακτυλίου του NCA. Η προσθήκη του διαλύματος του τριφωσγενίου στη φιάλη του H-Glu(OBzl)-OH, που βρίσκεται υπό επαναρροή, γίνεται στάγδην και υπό συνεχή έντονη ανάδευση σε βάθος χρόνου περίπου 15 min. Αφού ολοκληρωθεί η προσθήκη του αντιδραστήριου, το σταγονομετρικό χωνί αποσπάται από τη διάταξη, η φιάλη πωματίζεται και το διάλυμα διατηρείται υπό επαναρροή για δύο ώρες ώστε να ολοκληρωθεί η αντίδραση. Παρατηρείται σταδιακή ομογενοποίηση του διαλύματος όσο προχωράει η αντίδραση, το οποίο από λευκό και μη διαυγές μετατρέπεται σε άχρωμο και διαυγές, γεγονός που αποτελεί ένδειξη της επιτυχούς σύνθεσης του BLG NCA. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης γίνεται λήψη φασμάτων FT-IR, έτσι ώστε να παρακολουθείται η πρόοδος της.

Μετά το πέρας των δύο ωρών, το περιεχόμενο της φιάλης διηθείται υπό κενό σε χωνί Buchner προς απομάκρυνση τυχόν στερεών προσμίξεων και παραπροϊόντων. Το διήθημα του BLG NCA στον EtOAc συλλέγεται σε καθαρή σφαιρική φιάλη 1L, η οποία προσαρμόζεται στη HVL με τη βοήθεια κατάλληλου προσαρμογέα προς εκδίωξη του διαλύτη. Έπειτα, στη φιάλη του NCA αποστάζονται εκ νέου 400 mL EtOAc προς διαλυτοποίηση του ληφθέντος στερεού και ακολούθως η ποσότητα του διαλύτη εκδιώκεται και πάλι συμπαρασύροντας με αυτόν τον τρόπο τυχόν περίσσεια τριφωσγενίου από τη φιάλη του προϊόντος. Τέλος στη φιάλη προστίθενται 500 mL παγωμένου EtOAc και αφού πρώτα διαλυτοποιηθεί ο BLG NCA, ακολουθεί το στάδιο καθαρισμού μέσω εκχυλίσεων προς απομάκρυνση του παραγόμενου HCl, της πρόδρομης ένωσης που δεν έχει αντιδράσει αλλά και του υδροχλωρικού άλατος του αρχικού αμινοξέος που έχει σχηματισθεί.

Το διάλυμα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη των 2L και αρχικά εκχυλίζεται με παγωμένο υδατικό διάλυμα NaHCO₃ 0.5% (300 mL) και κατόπιν με παγωμένο απεσταγμένο νερό υψηλής καθαρότητας (300 mL), έως ότου επιτευχθεί ουδέτερο pH. Στη συνέχεια, λαμβάνεται η οργανική στιβάδα του EtOAc και ξηραίνεται με μικρή ποσότητα ενεργοποιημένου MgSO₄. Η οργανική φάση που λαμβάνεται διηθείται υπό κενό σε χωνί Buchner προς απομάκρυνση του ξηραντικού μέσου (MgSO₄) και το διήθημα του BLG NCA καταβυθίζεται *in situ* σε περίπου 1L καθαρού εξανίου. Ακολουθεί εκ νέου διήθηση υπό κενό σε χωνί Buchner

προς απομόνωση του λευκού στερεού που προκύπτει. Οι διηθήσεις πραγματοποιούνται υπό συνεχή παροχή αργού. Το τελικό προϊόν συλλέγεται σε απαερωμένη σφαιρική φιάλη των 250 mL και αφήνεται προς ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα. Την επόμενη ημέρα, η φιάλη απομακρύνεται από την HVL και μεταφέρεται στο glove box, όπου ζυγίζεται και στη συνέχεια φυλάσσεται ο τελικός BLG NCA (14.4 g, 54.8 mmol, απόδοση=65%). Συνοπτικά, η αντίδραση που ακολουθείται για τη σύνθεση του BLG NCA δίνεται στο Σχήμα 3.8.



Σχήμα 3.8: Αντίδραση σύνθεσης του BLG NCA

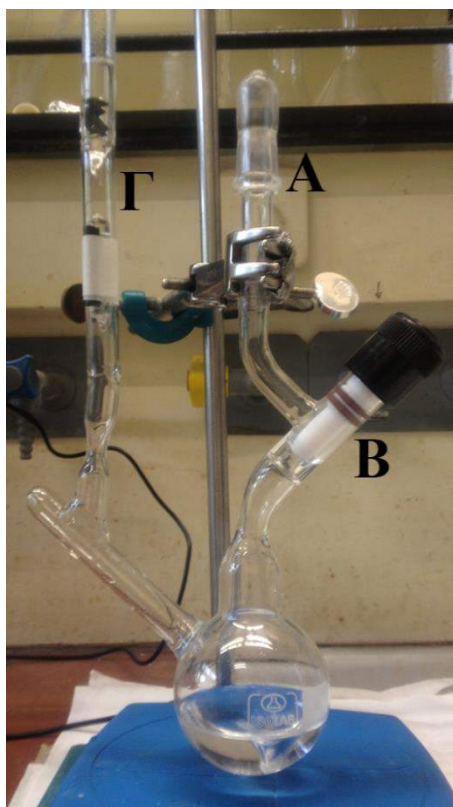
3.5. Σύνθεση Γραμμικών Ομοπολυπεπτιδίων⁵²

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (ring-opening polymerization, ROP) των tBMLC NCA και BLG NCA με χρήση δευτεροταγών (DMA) ή πρωτοταγών αμινών (PAA) ως απαρχητές, για τη σύνθεση των αντίστοιχων γραμμικών ομοπολυπεπτιδίων poly(S-tert-butylmercapto-L-cysteine) (PtBMLC) και poly(γ -benzyl-L-glutamate) (PBLG). Το ομοπολυμερές PtBMLC υπόκειται σε επιπλέον αντίδραση αποπροστασίας για την σύνθεση της poly(L-cysteine) (PCys), ενώ το PBLG που φέρει μία ακραία ομάδα αλκινίου, χρησιμοποιήθηκε σε αντιδράσεις τύπου “click” με άλλα πολυμερή.

3.5.1. Σύνθεση του Ομοπολυμερούς Poly(S-tert-Butylmercapto-L-Cysteine) (PtBMLC)

Από τη συσκευή αραίωσης απαρχητή (βλ. παραγρ. 3.3.) λαμβάνεται με σύντηξη στη στένωση μία από τις αμπούλες που φέρει, η οποία περιέχει 4 mL του απαρχητή DMA

συγκέντρωσης $1.1 \cdot 10^{-5}$ mol/mL αραιωμένα σε DMF (mol Init. = $4.4 \cdot 10^{-5}$). Η αμπούλα προσκολλάται μέσω υαλουργικών τεχνικών σε κατάλληλη συσκευή πολυμερισμού των 100 mL (Εικόνα 3.4), που είναι εφοδιασμένη με στρόφιγγα υψηλού κενού και περιέχει μαγνητικό αναδευτήρα, και στη συνέχεια η συσκευή προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού μέσω του εσφυρίσματος (θέση Α), ελέγχεται διεξοδικά για την ύπαρξη μικροοπών με χρήση του πηνίου Tesla και ξηραίνεται ενδεδειγμένα (flame-drying).



Εικόνα 3.4: Συσκευή πολυμερισμού για τη σύνθεση ομοπολυπεπτιδίων

Έπειτα η συσκευή απομονώνεται μέσω της στρόφιγγας (θέση Β) και μεταφέρεται από το υψηλό κενό στο glove box, όπου φυλάσσονται τα μονομερή (NCAs) υπό αδρανή ατμόσφαιρα αργού. Μετά την εισαγωγή της συσκευής στον κύριο θάλαμο, ανοίγεται και αφαιρείται η στρόφιγγα ώστε να εξισορροπηθεί η πίεση εντός της συσκευής και ακολούθως προστίθενται με τη βοήθεια χωνιού 0.5876 g από τον tBMLC NCA (2.5 mmol, MB=235.32 g/mol) στη φιάλη πολυμερισμού. Η συσκευή απομονώνεται πρώτα μέσω της στρόφιγγας και εξέρχεται από το glove box, ενώ ύστερα μεταφέρεται στη γραμμή υψηλού κενού και η ποσότητα του στερεού αφήνεται προς ξήρανση για τουλάχιστον μισή ώρα. Το θεωρητικά υπολογιζόμενο μοριακό βάρος του ομοπολυπεπτιδίου μετά την αποπροστασία του επιλέχθηκε να είναι 6 kDa (1 Da=1

g/mol), ενώ το θεωρητικό μοριακό βάρος του προστατευμένου ομοπολυμερούς PtBMLC είναι ίσο με 11 kDa.

Στη συνέχεια αποστάζονται περίπου 30 mL DMF στη συσκευή του πολυμερισμού, ενώ ο διαλύτης αποστάζεται κλασματικά απορρίπτοντας τα πρώτα mL στην παγίδα αζώτου. Αφού πρώτα πραγματοποιηθεί ενδεδειγμένη απαέρωση, η συσκευή απομακρύνεται από την HVL και τοποθετείται υπό ανάδευση σε υδατόλουτρο (25 °C) ώστε να υγροποιηθεί ο διαλύτης και να διαλυθεί πλήρως το μονομερές δίνοντας ένα ομοιογενές και άχρωμο διάλυμα. Μετά την πλήρη διάλυση του tBMLC NCA πραγματοποιείται θραύση του γυάλινου υμένα της αμπούλας της DMA (θέση Γ) και το περιεχόμενο αποχύνεται ποσοτικά και υπό συνεχή ανάδευση στη φιάλη πολυμερισμού, ώστε να αντιδράσουν ταυτόχρονα όλα τα μόρια του απαρχητή με το μονομερές και να αποφευχθεί κάποια τοπική περίσσεια που δυνητικά θα οδηγούσε σε διαφορετικούς χρόνους έναρξης πολυμερισμού των αλυσίδων.

Η έναρξη του πολυμερισμού συνοδεύεται από έντονη έκλυση διοξειδίου του άνθρακα από το διάλυμα, το οποίο αποτελεί την κινητήρια δύναμη για την διάδοση του πολυμερισμού. Ανά τακτές χρονικές περιόδους κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού, η συσκευή προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού ανοίγοντας για μικρό χρονικό διάστημα τη στρόφιγγα με σκοπό να εκτονωθεί και να απομακρυνθεί το υπερκείμενο αέριο διοξείδιο του άνθρακα που έχει παραχθεί και έτσι η ισορροπία της αντίδρασης να μετατοπίζεται προς την κατεύθυνση παραγωγής του πολυπεπτιδίου. Το διάλυμα παραμένει υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5 ημέρες μέχρι να καταναλωθεί πλήρως το μονομερές, ενώ η πορεία του πολυμερισμού παρακολουθείται μέσω φασματοσκοπίας FT-IR. Παρατηρείται ότι με την πάροδο των ημερών που διεξάγεται ο πολυμερισμός το διάλυμα μετατρέπεται σταδιακά από άχρωμο και διαυγές που ήταν αρχικά σε κιτρινωπό και μη διαυγές (θολό), γεγονός που αποδεικνύει την επιτυχή σύνθεση του πολυπεπτιδίου (Εικόνα 3.5).



Εικόνα 3.5: Πορεία του πολυμερισμού της PtBMLC με απαρχητή DMA μετά από (Α) 1 ημέρα, (Β) 2 ημέρες, (Γ) 3 ημέρες και (Δ) 5 ημέρες αντίστοιχα

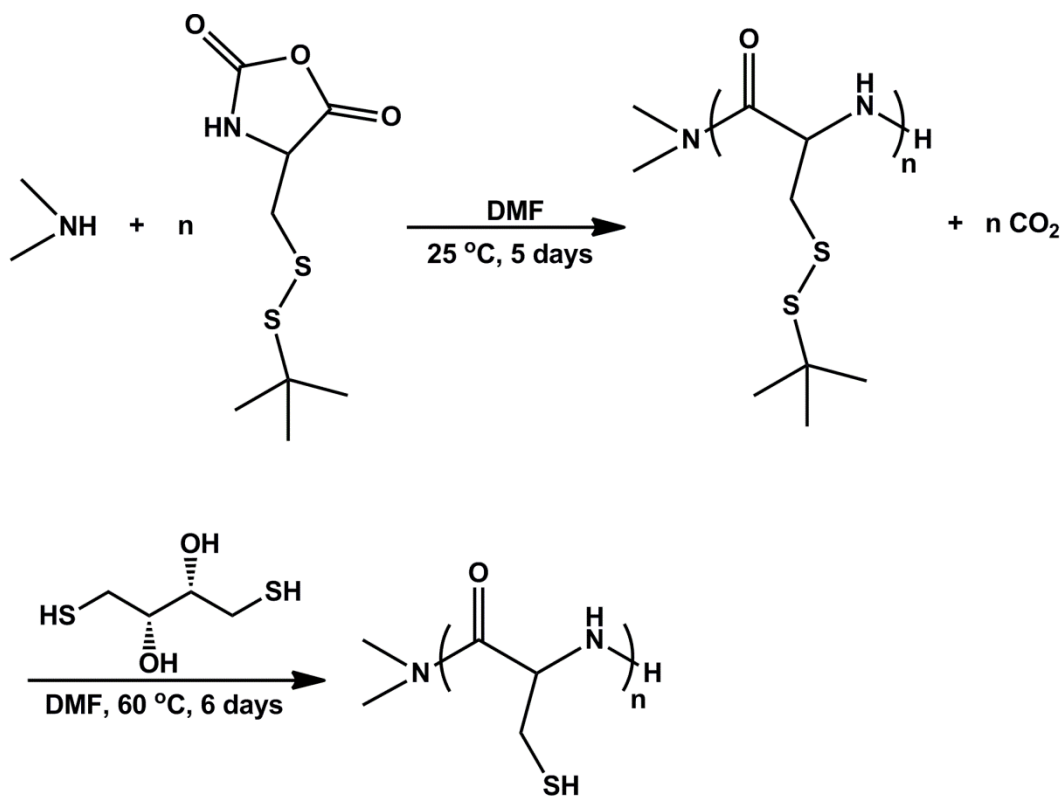
Όταν ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός (δεν παρατηρείται πλέον έκλυση διοξειδίου του άνθρακα), η απομόνωση του τελικού προϊόντος πραγματοποιείται με εκδίωξη του DMF από τη συσκευή μέσω της γραμμής υψηλού κενού και στη συνέχεια με διαδοχικές εκπλύσεις της στερεής μάζας που προκύπτει με ποσότητα διαιθυλαιθέρα προς απομάκρυνση του NCA που δεν έχει αντιδράσει. Το πολυμερές έπειτα μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη των 50 mL και αφήνεται προς ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα. Τέλος, το κίτρινο κοκκώδες στερεό της PtBMLC που συλλέγεται (0.18 g) φυλάσσεται σε φιαλίδιο υπό αδρανή ατμόσφαιρα αργού, απομονωμένο από τον ατμοσφαιρικό αέρα.

3.5.2. Αποπροστασία του Ομοπολυμερούς Poly(S-tert-Butylmercapto-L-Cysteine) (PtBMLC) για την Σύνθεση της Poly(L-Cysteine) (PCys)

Η αντίδραση αποπροστασίας της PtBMLC για την απομάκρυνση της tert-butylmercapto προστατευτικής ομάδας προς την σύνθεση του τελικού ομοπολυμερούς της πολυ(L-κυστεΐνης) (poly(L-cysteine), PCys) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη βιβλιογραφία.^{66,91} Ειδικότερα, 30.2 mg της PtBMLC (προστατευμένο ομοπολυμερές) τοποθετούνται σε vial που φέρει μαγνητικό αναδευτήρα και διαλύονται σε 4 mL άνυδρου DMF (η ποσότητα του διαλύτη λαμβάνεται από ειδικό μπουκάλι που φέρει septum με τη βοήθεια σύριγγας), υπό συνεχή παροχή αδρανούς αερίου (N₂ ή Ar). Ακολούθως, στο vial προστίθενται 36.0 mg από το αναγωγικό αντιδραστήριο DL-1,4-dithiothreitol (DTT, 0.23 mmol, MB=154.25 g/mol, Acros Organics) και διαλύονται υπό συνεχή έντονη ανάδευση. Το vial γεμίζεται με αδρανές αέριο, πωματίζεται αεροστεγώς και καλύπτεται με parafilm, ώστε το περιεχόμενο διάλυμα να διατηρείται απομονωμένο από το περιβάλλον. Στη συνέχεια, τοποθετείται σε ελαιόλουτρο στους 60 °C και η αντίδραση αποπροστασίας διατηρείται σε αυτή τη θερμοκρασία για 6 ημέρες υπό συνεχή ανάδευση.

Μέτα την πάροδο των 6 ημερών, η αντίδραση αποπροστασίας τερματίζεται με καταβύθιση του πολυμερούς σε περίπου 100 mL κρύου διαιθυλαιθέρα και στη συνέχεια το στερεό απομονώνεται μέσω διήθησης υπό κενό σε χωνί Buchner με χρήση υδρόφοβου φίλτρου. Είναι απαραίτητο η διήθηση να λαμβάνει χώρα στον ελάχιστο δυνατό χρόνο και υπό συνεχή παροχή αδρανούς αερίου ώστε να αποφευχθεί η οξείδωση των ελεύθερων θιολών που έχουν δημιουργηθεί, από τον ατμοσφαιρικό αέρα. Η περίσσεια του DTT που δεν έχει αντιδράσει παραμένει διαλυτή στον διαιθυλαιθέρα και άρα απομακρύνεται από το πολυμερές κατά τη διαδικασία της διήθησης. Το σκούρο καφέ στερεό που προκύπτει (12.4 mg) συλλέγεται σε σφαιρική φιάλη και ξηραίνεται στη γραμμή κενού για μία νύχτα, ενώ μετά την ξήρανσή του φυλάσσεται σε φιαλίδιο υπό αδρανή ατμόσφαιρα αργού, απομονωμένο από τον ατμοσφαιρικό αέρα. Συνοπτικά, η πορεία που ακολουθείται για τη σύνθεση του ομοπολυπεπτιδίου της PCys,

μέσω του πολυμερισμού του tBMLC NCA με DMA και της επακόλουθης αντίδρασης αποπροστασίας του πολυμερούς που προκύπτει, δίνεται στο Σχήμα 3.9.



Σχήμα 3.9: Πορεία αντιδράσεων πολυμερισμού και αποπροστασίας του ομοπολυμερούς PtBMLC για τη σύνθεση της PCys

3.5.3. Σύνθεση του Ομοπολυμερούς Poly(γ -Benzyl-L-Glutamate) (PBLG) με Ακραία Ομάδα Αλκινίου^{52,92}

Αρχικά σε βαθμονομημένο κύλινδρο, ο οποίος διαθέτει στρόφιγγα και κατάλληλο εσμύρισμα για την προσαρμογή του στη γραμμή υψηλού κενού, αποστάζονται 0.5 mL πυκνού απαρχητή προπαργυλαμίνης (PAA, 7.8 mmol, MB=55.08 g/mol, d=0.86 g/mL, Sigma-Aldrich) και αραιώνονται μέχρι τελικού όγκου 30 mL με προσθήκη απεσταγμένου DMF (συγκέντρωση απαρχητή=2.6·10⁻⁴ mol/mL).

Παράλληλα, ειδικά σχεδιασμένη συσκευή πολυμερισμού των 250 mL (Εικόνα 3.4), που είναι εφοδιασμένη με στρόφιγγα υψηλού κενού και περιέχει μαγνητικό αναδευτήρα, προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού μέσω του εσμυρίσματος (θέση Α), ελέγχεται διεξοδικά για την ύπαρξη μικροοπών με χρήση του πηνίου Tesla και ξηραίνεται ενδελεχώς (flame-drying). Έπειτα η συσκευή απομονώνεται μέσω της στρόφιγγας (θέση Β) και μεταφέρεται από το υψηλό κενό στο glove box, όπου φυλάσσονται τα μονομερή (NCAs) υπό

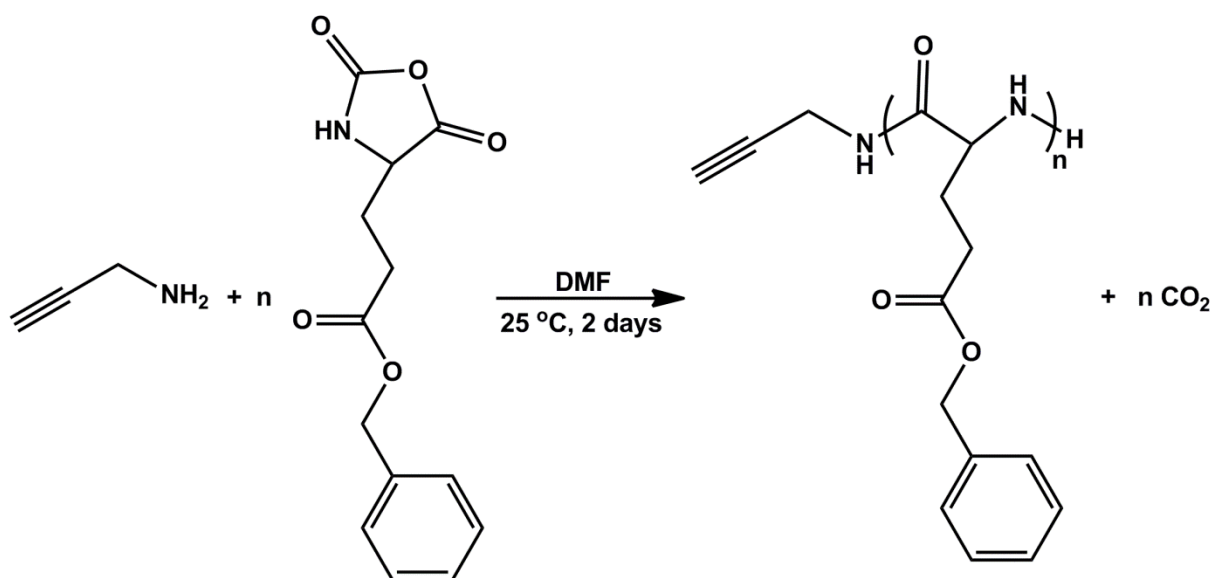
αδρανή ατμόσφαιρα αργού. Μετά την εισαγωγή της συσκευής στον κύριο θάλαμο, ανοίγεται και αφαιρείται η στρόφιγγα ώστε να εξισορροπηθεί η πίεση εντός της συσκευής και ακολούθως προστίθενται με τη βοήθεια χωνιού 1.0 g από τον BLG NCA (3.8 mmol, MB=263.25 g/mol) στη φιάλη πολυμερισμού. Η συσκευή απομονώνεται πρώτα μέσω της στρόφιγγας και εξέρχεται από το glove box, ενώ ύστερα μεταφέρεται στη γραμμή υψηλού κενού και η ποσότητα του στερεού αφήνεται προς ξήρανση για τουλάχιστον μισή ώρα. Το θεωρητικά υπολογιζόμενο μοριακό βάρος του ομοπολυπεπτιδίου PBLG επιλέχθηκε να είναι 5 kDa.

Στη συνέχεια αποστάζονται περίπου 30 mL DMF στη συσκευή του πολυμερισμού, ενώ ο διαλύτης αποστάζεται κλασματικά απορρίπτοντας τα πρώτα mL στην παγίδα αζώτου. Αφού πρώτα πραγματοποιηθεί ενδεδειγμένη απαέρωση, η συσκευή απομακρύνεται από την HVL και τοποθετείται υπό ανάδευση σε υδατόλουτρο (25 °C) ώστε να υγροποιηθεί ο διαλύτης και να διαλυθεί πλήρως το μονομερές δίνοντας ένα ομοιογενές και άχρωμο διάλυμα. Μετά την πλήρη διάλυση του BLG NCA στο DMF, λαμβάνονται 0.615 mL από την αραιωμένη PAA ($\text{mol Init.} = 1.6 \cdot 10^{-4}$) με τη βοήθεια σύριγγας μικρής διατομής καθώς απαιτείται υψηλή ακρίβεια και προστίθενται στο διάλυμα του NCA στάγδην και υπό συνεχή έντονη ανάδευση ύστερα από αφαίρεση της στρόφιγγας της συσκευής (θέση B). Η προσθήκη του απαραίτητη πραγματοποιείται υπό συνεχή παροχή αργού και για το λόγο αυτό όταν ολοκληρωθεί, η φιάλη του πολυμερισμού προσαρμόζεται στην HVL ώστε να εκδιωχθεί το υπερκείμενο αέριο και ο πολυμερισμός να διεξαχθεί υπό κενό.

Η έναρξη του πολυμερισμού συνοδεύεται από έντονη έκλυση φυσαλίδων διοξειδίου του άνθρακα από το διάλυμα, το οποίο αποτελεί την κινητήρια δύναμη για την διάδοση του πολυμερισμού. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού, η συσκευή προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού ανοίγοντας τη στρόφιγγα με σκοπό να εκτονωθεί και να απομακρυνθεί το υπερκείμενο αέριο διοξείδιο του άνθρακα που έχει παραχθεί και έτσι η ισορροπία της αντίδρασης να μετατοπίζεται προς την κατεύθυνση παραγωγής του πολυπεπτιδίου. Το διάλυμα παραμένει υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 2 ημέρες μέχρι να καταναλωθεί πλήρως το μονομερές, ενώ η πορεία του πολυμερισμού παρακολουθείται μέσω φασματοσκοπίας FT-IR. Παρατηρείται ότι με την πάροδο των ημερών που διεξάγεται ο πολυμερισμός το διάλυμα μετατρέπεται σταδιακά από άχρωμο σε ελαφρώς κιτρινωπό.

Όταν ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός του PBLG (δεν παρατηρείται πλέον έκλυση διοξειδίου του άνθρακα), η απομόνωση του πολυμερούς πραγματοποιείται με καταβύθισή του σε περίπου 400 mL κρύου διαιθυλαιθέρα και στη συνέχεια το στερεό απομονώνεται μέσω διήθησης υπό κενό σε χωνί Buchner με χρήση υδρόφοβου φίλτρου. Το λευκό στερεό που συλλέγεται

μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη των 50 mL και αφήνεται προς ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα. Μετά την ξήρανσή του, το τελικό προϊόν ζυγίζεται (0.64 g) και φυλάσσεται σε vial υπό αδρανή ατμόσφαιρα αργού απομονωμένο από τον ατμοσφαιρικό αέρα. Συνοπτικά, η συνθετική πορεία που ακολουθείται για τον πολυμερισμό του PBLG, με χρήση απαρχητή PAA ώστε η κάθε πολυμερική αλυσίδα να διαθέτει μία ακραία ομάδα αλκινίου, δίνεται στο Σχήμα 3.10.



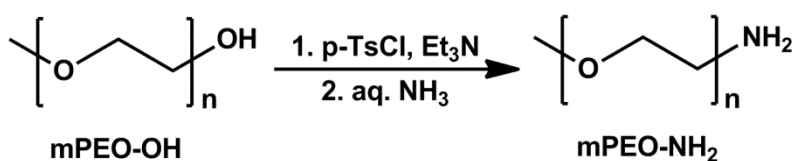
Σχήμα 3.10: Αντίδραση πολυμερισμού του PBLG με χρήση απαρχητή PAA

3.6. Σύνθεση Υβριδικών Κατά Συστάδες Συμπολυμερών του Τύπου Poly(Ethylene Oxide)-*b*-Poly(L-Histidine-*co*-L-Cysteine) (PEO-*b*-P(His-*co*-Cys))

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση υβριδικών κατά συστάδες συμπολυμερών του τύπου PEO-*b*-P(His-*co*-Cys), αρχικά μέσω πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου (ring-opening polymerization, ROP) των $N_{(im)}$ -Trt-His NCA και tBMLC NCA με χρήση του πολυμερούς mPEO-NH₂ ως μακροαπαρχητή. Τα προστατευμένα πολυμερή PEO-*b*-P(Trt-His-*co*-tBMLC) που προκύπτουν, υπόκεινται σε διαδοχικές αντιδράσεις αποπροστασίας των δομικών μονάδων της PHis και της PCys αντίστοιχα ώστε να ληφθούν τελικά τα πλήρως αποπροστατευμένα συμπολυμερή. Οι πειραματικές διαδικασίες που ακολουθούνται για τον πολυμερισμό και την αποπροστασία των πολυμερών περιγράφονται λεπτομερώς παρακάτω.

3.6.1. Σύνθεση Προστατευμένων Συμπολυμερών PEO-*b*-P(Trt-His-co-tBMLC) με Χρήση mPEO-NH₂ ως Μακροαπαρχητή^{6,52}

Αρχικά, πρέπει να αναφερθεί ότι το πολυ(αιθυλενοξειδίο) με ακραία αμινομάδα (mPEO-NH₂) που χρησιμοποιήθηκε ως μακροαπαρχητής για τον ROP των μονομερών *N*_(im)-Trt-His NCA και tBMLC NCA προς σύνθεση υβριδικών δισυσταδικών συμπολυμερών του τύπου PEO-*b*-P(His-co-Cys), έχει προέλθει ύστερα από χημική τροποποίηση του αντίστοιχου εμπορικής διαθέσιμου πολυμερούς mPEO-OH. Συνοπτικά, η τροποποίηση της ακραίας ομάδας -OH σε ομάδα -NH₂, πραγματοποιείται έπειτα από αντίδραση του πολυμερούς σε πρώτη φάση με *p*-TsCl και Et₃N και επακόλουθη κατεργασία του με υδατικό διάλυμα αμμωνίας (Σχήμα 3.11).



Σχήμα 3.11: Αντίδραση χημικής τροποποίησης του mPEO-OH σε mPEO-NH₂

Ειδικά σχεδιασμένη συσκευή πολυμερισμού των 100 mL, η οποία φέρει μαγνητικό αναδευτήρα και κατάλληλη αμπούλα με εσμύρισμα και break-seal για την προσθήκη των μονομερών, ελέγχεται πρώτα για την ύπαρξη μικροοπών με χρήση του πηνίου Tesla και ξηραίνεται ενδελεχώς στη γραμμή υψηλού κενού (flame-drying). Στη συσκευή προστίθενται 0.25 g μακροαπαρχητή mPEO-NH₂ ($5 \cdot 10^{-5}$ mol, $M_n=5$ kDa) υπό συνεχή παροχή αδρανούς αερίου και η ποσότητα του στερεού αφήνεται προς ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα. Ακολούθως, γίνεται απομάκρυνση κάθε ίχνους υγρασίας από το mPEO-NH₂, με την προσθήκη καθαρού βενζολίου στη φιάλη του πολυμερισμού. Το βενζόλιο έχει την ικανότητα να σχηματίζει αζεοτροπικό μείγμα με το H₂O και συνεπώς η υγρασία απομακρύνεται εύκολα από το πολυ(αιθυλενοξειδίο), καθώς η ποσότητα του διαλύτη αποστάζεται σε γειτονική φιάλη. Με αυτό τον τρόπο ίχνη υγρασίας συμπαρασύρονται κατά την απόσταξη του βενζολίου και έτσι απομακρύνονται ποσοτικά από τη συσκευή. Η υψηλή καθαρότητα τόσο του μακροαπαρχητή όσο και των μονομερών κρίνεται απαραίτητη για τον ελεγχόμενο χαρακτήρα του πολυμερισμού και για την αποφυγή παράπλευρων αντιδράσεων.

Ειδικότερα, την επόμενη ημέρα, αποστάζονται περίπου 15 mL βενζολίου στη συσκευή του πολυμερισμού που περιέχει την ποσότητα του μακροαπαρχητή μέσω της γραμμής υψηλού κενού. Μόλις ληφθεί η απαραίτητη ποσότητα, η φιάλη απομακρύνεται από την HVL και τοποθετείται σε υδατόλουτρο (25 °C) υπό συνεχή ανάδευση για 30 min, έτσι ώστε να διαλυθεί

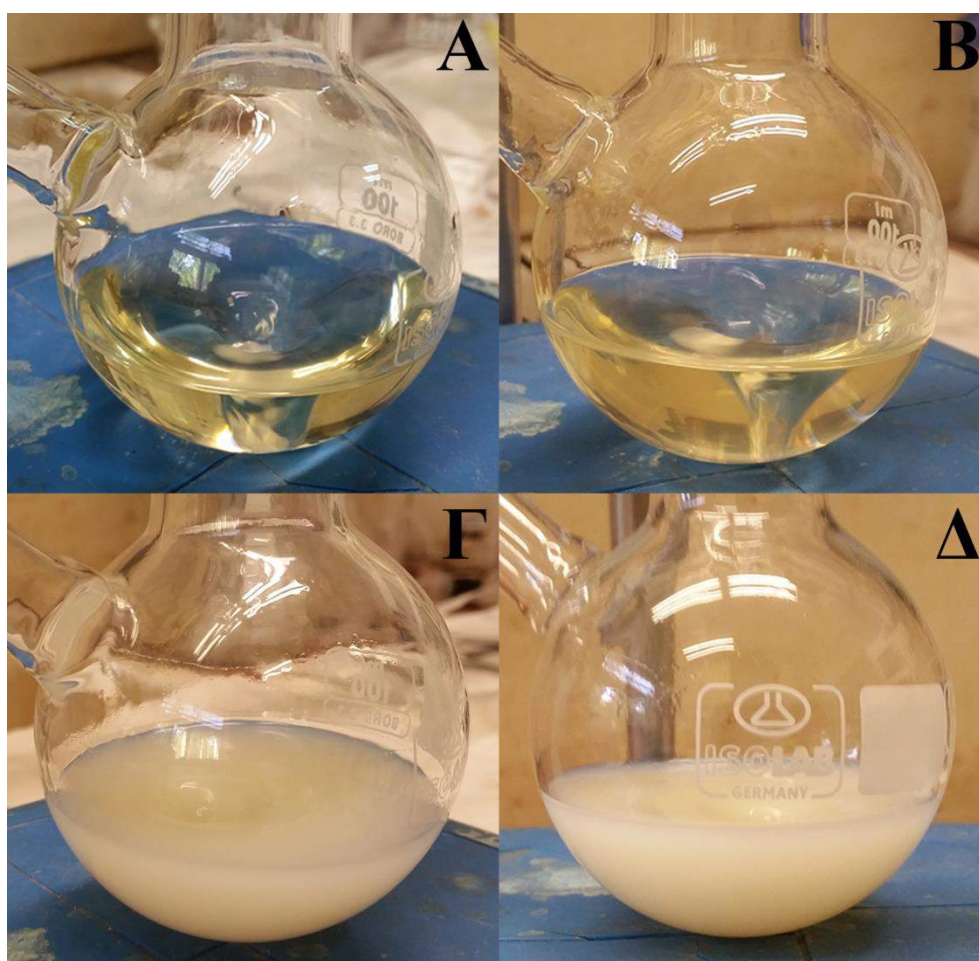
πλήρως το mPEO-NH₂. Στη συνέχεια η συσκευή επαναπροσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού, και η ποσότητα του βενζόλιο αποστάζεται σε γειτονική κενή σφαιρική φιάλη. Στη φιάλη του πολυμερισμού έχει πλέον απομείνει το καθαρό από υγρασία mPEO-NH₂, το οποίο αφήνεται προς ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα.

Την επόμενη ημέρα, αποστάζονται περίπου 20 mL καθαρού DMF στη συσκευή του πολυμερισμού, ενώ ο διαλύτης αποστάζεται κλασματικά απορρίπτοντας τα πρώτα mL στην παγίδα αζώτου. Αφού πρώτα πραγματοποιηθεί ενδεδειγμένη απαέρωση, η συσκευή απομακρύνεται από την HVL και τοποθετείται υπό ανάδευση σε υδατόλουτρο (25 °C) ώστε να υγροποιηθεί ο διαλύτης και να διαλυθεί πλήρως ο απαρχητής, δίνοντας ένα διαυγές και άχρωμο διάλυμα. Έπειτα η συσκευή προσαρμόζεται στην HVL από την πλευρά της αμπούλας και αφού απαερωθεί το συγκεκριμένο τμήμα της, μεταφέρεται στο glove box όπου φυλάσσονται τα μονομερή (NCAs) υπό αδρανή ατμόσφαιρα αργού. Μετά την εισαγωγή της συσκευής στον κύριο θάλαμο, ανοίγεται και αφαιρείται ο προσαρμογέας ώστε να εξισορροπηθεί η πίεση εντός της αμπούλας της συσκευής και ακολούθως προστίθενται διαδοχικά με τη βοήθεια χωνιού 0.932 g από τον *N*_(im)-Trt-His NCA (2.2 mmol, MB=423.46 g/mol) και 0.08 g από τον tBMLC NCA (0.3 mmol, MB=235.32 g/mol). Η αμπούλα απομονώνεται πρώτα μέσω της στρόφιγγας του προσαρμογέα και η συσκευή εξέρχεται από το glove box, ενώ ύστερα μεταφέρεται στη γραμμή υψηλού κενού και η ποσότητα των μονομερών αφήνεται προς ξήρανση για τουλάχιστον μισή ώρα. Το θεωρητικό μοριακό βάρος του πολυπεπτιδικού τμήματος του επιθυμητού συμπολυμερούς PEO-*b*-P(His-co-Cys) μετά την πλήρη αποπροστασία του επιλέχθηκε να είναι 6 kDa, ενώ το θεωρητικά υπολογιζόμενο μοριακό βάρος της αντίστοιχης προστατευμένης συστάδας είναι ίσο με 17 kDa. Επίσης το ποσοστό κατά mol της κυστεΐνης (Cys) ως προς την ιστιδίνη (His) στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι 15%.

Μετά την πάροδο των 30 min, αποστάζονται στην αμπούλα περίπου 15 mL καθαρού DMF, ώστε να διαλυτοποιηθούν τα μονομερή πριν γίνει η προσθήκη τους στο διάλυμα του μακροαπαρχητή. Όσο ακόμα το διάλυμα των μονομερών σε DMF είναι παγωμένο, η αμπούλα συντήκεται στη στένωση που φέρει ώστε να παραμείνει υπό κενό και η συσκευή απομακρύνεται από τη γραμμή υψηλού κενού. Μετά την πλήρη διάλυση των μονομερών στο DMF, πραγματοποιείται θραύση του γυάλινου υμένα της αμπούλας και το περιεχόμενο διάλυμα αποχύνεται ποσοτικά και υπό συνεχή ανάδευση στη φιάλη πολυμερισμού, ώστε να εκκινήσει ο πολυμερισμός και να αντιδράσουν ταυτόχρονα όλα τα μόρια του απαρχητή με τα μονομερή.

Η έναρξη του πολυμερισμού συνοδεύεται από έκλυση διοξειδίου του άνθρακα από το διάλυμα υπό μορφή φυσαλίδων, το οποίο αποτελεί την κινητήρια δύναμη για τη διάδοση του πολυμερισμού. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού, η συσκευή

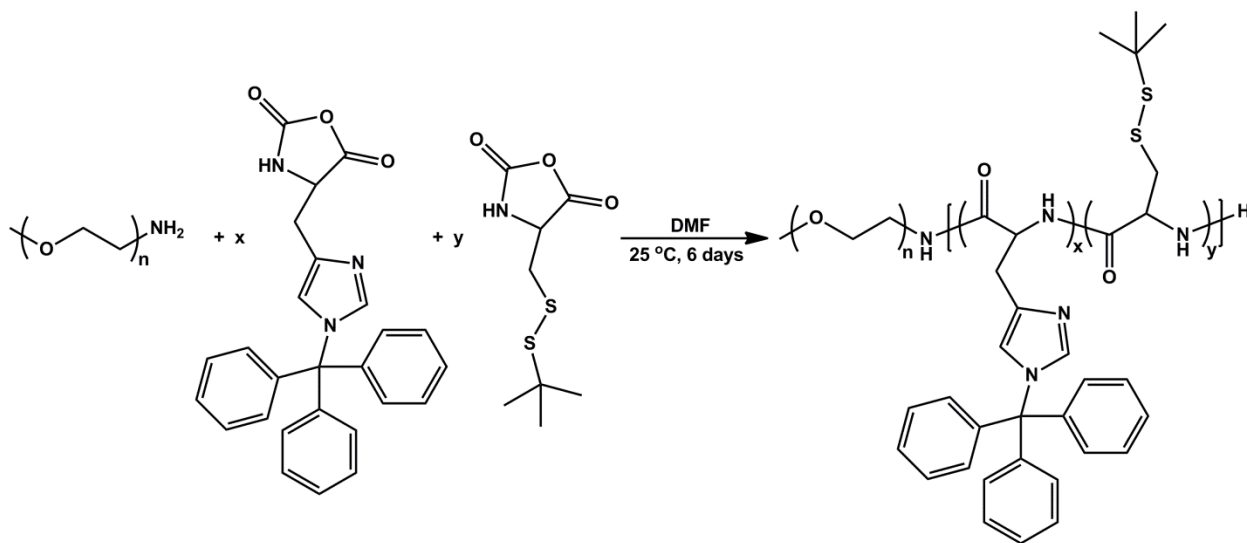
προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού ανοίγοντας τη στρόφιγγα με σκοπό να εκτονωθεί και να απομακρυνθεί το υπερκείμενο αέριο διοξείδιο του άνθρακα που έχει παραχθεί και έτσι η ισορροπία της αντίδρασης να μετατοπίζεται προς την κατεύθυνση παραγωγής του πολυπεπτιδίου. Το διάλυμα παραμένει υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 6 ημέρες μέχρι να καταναλωθούν πλήρως τα μονομερή, ενώ η πορεία του πολυμερισμού παρακολουθείται μέσω φασματοσκοπίας FT-IR. Παρατηρείται ότι με την πάροδο των ημερών που διεξάγεται ο πολυμερισμός το διάλυμα μετατρέπεται σταδιακά από έντονο κίτρινο και διαυγές που ήταν αρχικά σε λευκό-κιτρινωπό και μη διαυγές (θολό), γεγονός που αποτελεί ένδειξη για την επιτυχή σύνθεση του πολυπεπτιδικού συμπολυμερούς (Εικόνα 3.6).



Εικόνα 3.6: Πορεία του πολυμερισμού του υβριδικού συμπολυμερούς $\text{PEO-}b\text{-P(Trt-His-co-tBMLC)}$ μετά από (Α) 1 ημέρα, (Β) 2 ημέρες, (Γ) 4 ημέρες και (Δ) 6 ημέρες αντίστοιχα

Όταν ολοκληρωθεί ο τυχαίος συμπολυμερισμός του $\text{PEO-}b\text{-P(Trt-His-co-tBMLC)}$ (δεν παρατηρείται πλέον έκλυση διοξειδίου του άνθρακα), η απομόνωση του πολυμερούς πραγματοποιείται με καταβύθισή του σε περίπου 500 mL κρύου διαιθυλαιθέρα και στη συνέχεια το στερεό απομονώνεται μέσω διήθησης υπό κενό σε χωνί Buchner με χρήση υδρόφοβου

φίλτρου. Είναι απαραίτητο η διήθηση να λαμβάνει χώρα στον ελάχιστο δυνατό χρόνο και υπό συνεχή παροχή αδρανούς αερίου. Το λευκό στερεό που συλλέγεται, μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη των 50 mL και αφήνεται προς ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα. Μετά την ξήρανσή του, το τελικό προστατευμένο πολυμερές ζυγίζεται (0.713 g) και φυλάσσεται σε vial υπό αδρανή ατμόσφαιρα αργού απομονωμένο από τον ατμοσφαιρικό αέρα. Συνοπτικά, η γενική πορεία που ακολουθείται για τη σύνθεση πολυπεπτιδικών συμπολυμερών του τύπου PEO-*b*-P(Trt-His-co-tBMLC), με χρήση μακροαπαρχητή mPEO-NH₂, δίνεται στο Σχήμα 3.12.



Σχήμα 3.12: Αντίδραση πολυμερισμού του PEO-*b*-P(Trt-His-co-tBMLC) με χρήση μακροαπαρχητή mPEO-NH₂

Ακολουθώντας ακριβώς την ίδια πειραματική διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω, πραγματοποιείται η σύνθεση μίας σειράς υβριδικών δυσσταδικών συμπολυμερών του τύπου PEO-*b*-P(Trt-His-co-tBMLC) με χρήση μακροαπαρχητών διαφορετικού μοριακού βάρους αλλά και με διαφορετικά ποσοστά κατά mol της Cys ως προς την His. Το μοριακό βάρος του πολυπεπτιδικού τμήματος μετά την πλήρη αποπροστασία του επιλέχθηκε να διατηρείται πάντα σταθερό και ίσο με $6 \cdot 10^3$ g/mol. Τα συμπολυμερή αυτά συντέθηκαν με στόχο την μελέτη της εξάρτησης των ιδιοτήτων των νανοδομών που θα προκύψουν από το ποσοστό του δικτυωματοποιητή (cross-linker), δηλαδή της PCys, αλλά και για την μελέτη της επίδρασης της αναλογίας μεταξύ υδρόφιλου και υδρόφοβου τμήματος των πολυμερών στις τελικές ιδιότητες.

Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε σύνθεση ενός ακόμα πολυμερούς με χρήση του μακροαπαρχητή mPEO-NH₂ με μέσο μοριακό βάρος κατά αριθμό (M_n) $5 \cdot 10^3$ g/mol, αλλά με τη διαφορά ότι το ποσοστό κατά mol της Cys ως προς την His είναι 25%. Για τη σύνθεση του συγκεκριμένου πολυμερούς χρησιμοποιήθηκαν 0.25 g mPEO-NH₂ ($5 \cdot 10^{-5}$ mol, $M_n=5$ kDa),

0.932 g $N_{(im)}$ -Trt-His NCA (2.2 mmol, MB=423.46 g/mol) και 0.129 g από τον tBMLC NCA (0.55 mmol, MB=235.32 g/mol), ενώ λήφθηκαν 0.698 g προστατευμένου πολυμερούς. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν δύο πολυμερισμοί με χρήση μακροαπαρχητή mPEO-NH₂ με $M_n=2 \cdot 10^3$ g/mol και ποσοστά κατά mol της Cys ως προς την His 15% και 25% αντίστοιχα. Στην πρώτη περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν 0.20 g mPEO-NH₂ (10^{-4} mol, $M_n=2$ kDa), 1.438 g $N_{(im)}$ -Trt-His NCA (4.0 mmol, MB=423.46 g/mol) και 0.141 g από τον tBMLC NCA (0.6 mmol, MB=235.32 g/mol), ενώ λήφθηκαν 1.12 g προστατευμένου πολυμερούς. Στη δεύτερη περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν 0.20 g mPEO-NH₂ (10^{-4} mol, $M_n=2$ kDa), 1.148 g $N_{(im)}$ -Trt-His NCA (3.6 mmol, MB=423.46 g/mol) και 0.212 g από τον tBMLC NCA (0.9 mmol, MB=235.32 g/mol), ενώ λήφθηκαν 0.872 g προστατευμένου πολυμερούς. Τα πειραματικά δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των τεσσάρων δειγμάτων που περιγράφηκαν παραπάνω, συνοψίζονται στον Πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1: Πειραματικά δεδομένα για τη σύνθεση των προστατευμένων υβριδικών συμπολυμερών PEO-*b*-P(Trt-His-co-tBMLC)

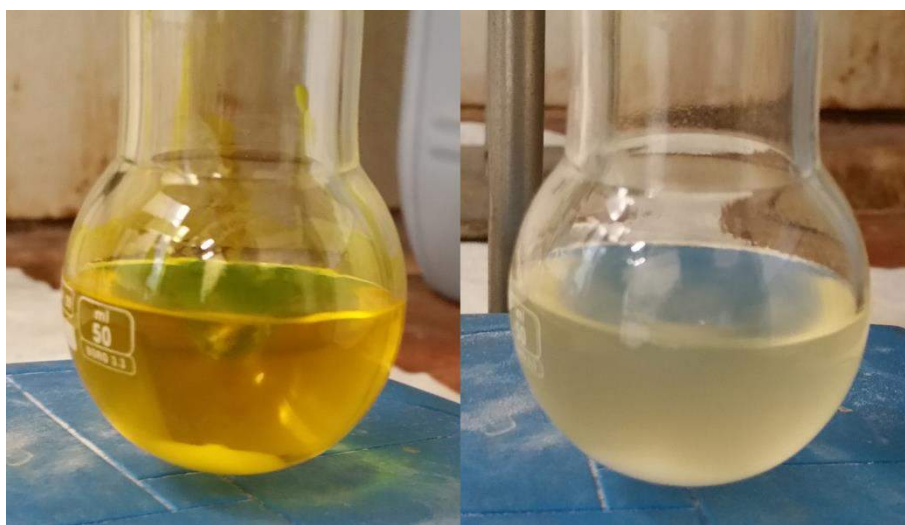
Πολυμερές	M_n 1 st Block (g/mol)	M_n 2 nd Block (g/mol)	% mol Cys	g mPEO- NH ₂	g $N_{(im)}$ -Trt- His NCA	g tBMLC NCA
PEO5K- <i>b</i> -P(His-co-Cys15)	$5 \cdot 10^3$	$6 \cdot 10^3$	15	0.25	0.932	0.08
PEO5K- <i>b</i> -P(His-co-Cys25)	$5 \cdot 10^3$	$6 \cdot 10^3$	25	0.25	0.932	0.129
PEO2K- <i>b</i> -P(His-co-Cys15)	$2 \cdot 10^3$	$6 \cdot 10^3$	15	0.20	1.438	0.141
PEO2K- <i>b</i> -P(His-co-Cys25)	$2 \cdot 10^3$	$6 \cdot 10^3$	25	0.20	1.148	0.212

3.6.2. Εκλεκτική Αποπροστασία των Δομικών Μονάδων της Πολυ(Ιστιδίνης) (PHis)⁵²

Ακολουθώς περιγράφεται η γενική πειραματική διαδικασία που ακολουθείται για την εκλεκτική αποπροστασία των δομικών μονάδων της PHis στα υβριδικά συμπολυμερή του τύπου PEO-*b*-P(Trt-His-co-tBMLC) που συντέθηκαν. Με τον τρόπο αυτό εξασφαλίζεται ότι οι προστατευτικές ομάδες της PCys παραμένουν ανέπαφες και με την σειρά τους απομακρύνονται εκλεκτικά σε δεύτερη φάση, ώστε να προκύψουν τα επιθυμητά πλήρως αποπροστατευμένα συμπολυμερή PEO-*b*-P(His-co-Cys).

Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL προστίθενται 10 mL διχλωρομεθανίου (CH₂Cl₂, DCM) και στη συνέχεια προστίθεται σχεδόν όλη η ποσότητα που λήφθηκε από το εκάστοτε πλήρως προστατευμένο πολυμερές PEO-*b*-P(Trt-His-co-tBMLC). Το πολυμερές αφήνεται υπό έντονη ανάδευση για 15 min, ώστε να διαλυθεί και να διογκωθεί στο CH₂Cl₂ (καλός διαλύτης για το πολυμερές). Έπειτα στη φιάλη προστίθενται 25 mL τριφθοροξικού οξέος (CF₃COOH, TFA,

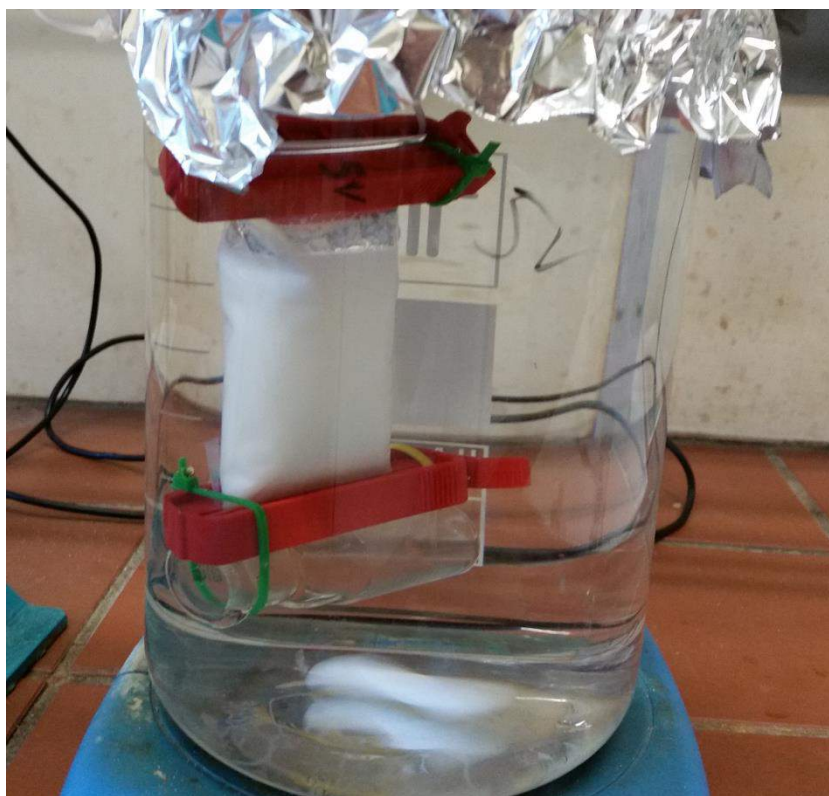
$\geq 99.5\%$, Fischer) και το έντονο κίτρινο και διαυγές διάλυμα που προκύπτει αφήνεται υπό ανάδευση για 20-30 min. Με την χρήση του TFA επιτυγχάνεται η απομάκρυνση των προστατευτικών τρίτυλο-ομάδων από τις δομικές μονάδες της PHis. Επιπλέον, για να εξασφαλιστεί ότι οι τρίτυλο-ομάδες που έχουν κοπεί δεν θα επανασυνδεθούν στην PHis, καθώς είναι καρβοκατιόντα, προστίθεται μικρή ποσότητα (μερικές σταγόνες) τρισοπροπυλοσιλανίου μέχρι πλήρους αποχρωματισμού του διαλύματος ((iPr)₃SiH, 99%, Sigma-Aldrich), το οποίο σχηματίζει σταθερό δεσμό μαζί τους και τις καθιστά ανενεργές (Εικόνα 3.7). Η ποσότητα του (iPr)₃SiH που απαιτείται είναι πολύ μικρή, έτσι εξασφαλίζεται ότι δεν θα επηρεαστούν οι δισουλφιδικοί δεσμοί που υπάρχουν στο πολυμερές.



Εικόνα 3.7: Διάλυμα του πολυμερούς PEO-*b*-P(Trt-His-co-tBMLC) σε TFA πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) την προσθήκη ποσότητας (iPr)₃SiH αντίστοιχα

Στη συνέχεια η φιάλη της αντίδρασης προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού σε ειδική διάταξη για “short-path” απόσταξη προς απομάκρυνση των DCM και TFA σε κενή γειτονική φιάλη. Συνεπώς στη φιάλη παραμένει μόνο το πολυμερές, το οποίο διαλύεται σε 30 mL νερό Milli-Q και αφήνεται υπό ανάδευση για 10-15 min. Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος, στη φιάλη γίνεται προσθήκη στερεού NaHCO₃ (εξουδετέρωση) μέχρι να μην παρατηρείται πλέον αφρισμός του διαλύματος λόγω του παραγόμενου CO₂. Το περιεχόμενο της φιάλης τοποθετείται με την βοήθεια πιπέτας σε κατάλληλη μεμβράνη διαπίδυσης (dialysis) (όριο αποκλεισμού MWCO=3.5 kDa), η οποία με τη σειρά της τοποθετείται σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει 2L νερό Milli-Q υπό ανάδευση (Εικόνα 3.8). Η διαδικασία της διαπίδυσης λαμβάνει χώρα για την απομάκρυνση των δεσμευμένων τριτυλο-ομάδων από το πολυμερές διαμέσου των πόρων της μεμβράνης. Το pH του εξωτερικού διαλύματος ρυθμίζεται στο 9 με προσθήκη 4-5 σταγόνων NaOH 1N. Τις επόμενες ημέρες παρατηρείται μείωση του pH του νερού, οπότε

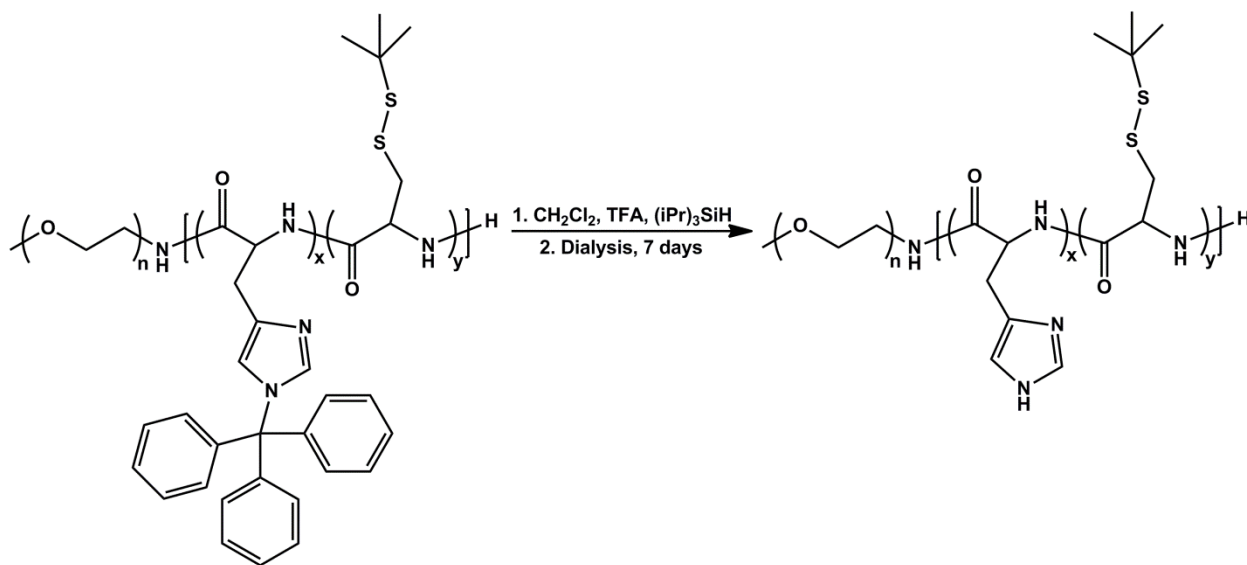
πραγματοποιούνται διαδοχικές αλλαγές του ανά τακτές περιόδους με νέα ποσότητα και προσθήκη σταγόνων NaOH 1N, μέχρι να παρατηρηθεί σταθεροποίηση του pH στην περιοχή 7-8. Όταν το pH σταθεροποιηθεί γίνονται ακόμα δύο αλλαγές νερού με σκέτο Milli-Q, ώστε να απομακρυνθεί τυχόν περίσσεια του NaOH. Η διαδικασία του dialysis διαρκεί 7-8 ημέρες και στη συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία της λυοφιλοποίησης (freeze-drying), για την εκδίωξη του νερού από το πολυμερές.



Εικόνα 3.8: Διαδικασία dialysis για την καθαρισμό του πολυμερούς από τις προστατευτικές τριτυλοομάδες

Το περιεχόμενο της μεμβράνης (πολυμερές διαλυμένο σε νερό) αποχύνεται σε σφαιρική φιάλη των 50 mL, παγώνει με τη βοήθεια υγρού αζώτου και προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού σε συσκευή απόσταξης “short-path” με χρήση κατάλληλου προσαρμογέα. Η φιάλη αρχικά απαερώνεται και το νερό αποστάζεται από τη μητρική φιάλη σε κενή γειτονική φιάλη, η οποία ψύχεται διαρκώς με χρήση υγρού αζώτου. Η διαδικασία του freeze-drying διαρκεί 3-4 ημέρες ανάλογα των όγκο του διαλύματος που συλλέγεται μετά από το dialysis και τα στερεά που λαμβάνονται τελικά είναι λευκά και κοκκώδη. Μετά την ξήρανσή του, το κάθε αποπροστατευμένο ως προς την PHis πολυμερές PEO-*b*-P(His-co-tBMLC) ζυγίζεται και φυλάσσεται σε vial υπό αδρανή ατμόσφαιρα αργού απομονωμένο από τον ατμοσφαιρικό αέρα. Συνοπτικά, η πειραματική πορεία που ακολουθείται για την διαδικασία αποπροστασίας των

δομικών μονάδων της PHis στα πολυπεπτιδικά συμπολυμερή που συντέθηκαν δίνεται στο Σχήμα 3.13.



Σχήμα 3.13: Αντίδραση εκλεκτικής αποπροστασίας των δομικών μονάδων της PHis στα πολυμερή του τύπου PEO-*b*-P(Trt-His-co-tBMLC)

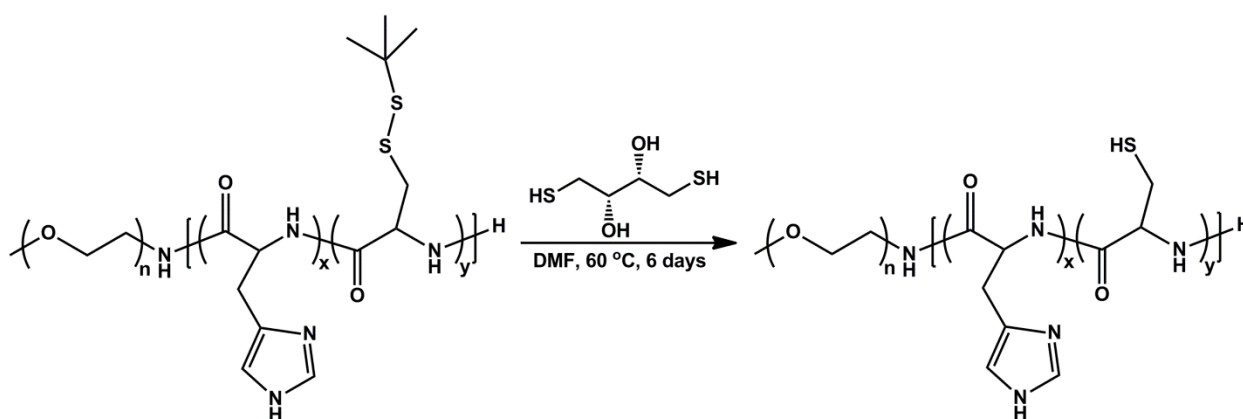
3.6.3. Εκλεκτική Αποπροστασία των Δομικών Μονάδων της Πολυ(Κυστεΐνης) (PCys)^{66,91}

Ακολουθώς περιγράφεται η γενική πειραματική διαδικασία που ακολουθείται για την εκλεκτική αποπροστασία των δομικών μονάδων της PCys στα συμπολυμερή που προκύπτουν μετά από την αντίστοιχη αντίδραση αποπροστασίας της PHis, ώστε τελικά να προκύψουν τα επιθυμητά πλήρως αποπροστατευμένα συμπολυμερή PEO-*b*-P(His-co-Cys). Είναι απαραίτητο η αντίδραση αποπροστασίας της PCys να πραγματοποιείται μετά από εκείνη των δομικών μονάδων της PHis, διότι η συγκεκριμένη αντίδραση λαμβάνει χώρα σε υδατικά μέσα. Αν η σειρά των αντιδράσεων ήταν αντίθετη, τότε οι ελεύθερες θιόλες των δομικών μονάδων της PCys θα δικτυώνονταν στο νερό κατά την διαδικασία αποπροστασίας της PHis, δημιουργώντας δισουλφιδικούς δεσμούς.

Η οξειδοαναγωγική αντίδραση αποπροστασίας είναι όμοια με αυτή που περιγράφηκε στην παράγραφο 3.5.2., με τη μόνη διαφορά να έγκειται στις ποσότητες των αντιδραστηρίων και του διαλύτη που χρησιμοποιήθηκαν, ενώ είναι ίδια και για τα τέσσερα δείγματα που συντέθηκαν. Ειδικότερα, 0.5 g του εκάστοτε συμπολυμερούς PEO-*b*-P(His-co-tBMLC) τοποθετούνται σε σφαιρική φιάλη των 50 mL που φέρει μαγνητικό αναδευτήρα και διαλύονται σε 30 mL άνυδρου DMF (η ποσότητα του διαλύτη λαμβάνεται από ειδικό μπουκάλι που φέρει septum με τη

βοήθεια σύριγγας), υπό συνεχή παροχή αδρανούς αερίου (N_2 ή Ar). Ακολούθως, στη φιάλη προστίθενται 0.3 g DL-1,4-dithiothreitol (DTT, 1.9 mmol, MB=154.25 g/mol, Acros Organics) και διαλύονται υπό συνεχή έντονη ανάδευση. Η φιάλη γεμίζεται με αδρανές αέριο, πωματίζεται αεροστεγώς και καλύπτεται με parafilm ώστε το περιεχόμενο διάλυμα να διατηρείται απομονωμένο από το ατμοσφαιρικό περιβάλλον. Στη συνέχεια, τοποθετείται σε ελαιόλουτρο στους 60 °C και η αντίδραση αποπροστασίας διατηρείται σε αυτή τη θερμοκρασία για 6 ημέρες υπό συνεχή ανάδευση.

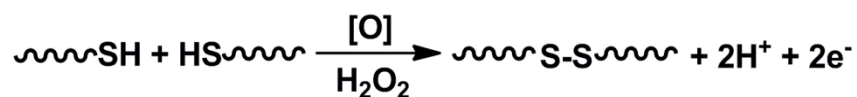
Μετά την πάροδο των 6 ημερών, η αντίδραση αποπροστασίας τερματίζεται με καταβύθιση του πολυμερούς σε περίπου 400 mL κρύου διαιθυλαιθέρα και στη συνέχεια το στερεό απομονώνεται μέσω διήθησης υπό κενό σε χωνί Buchner με χρήση υδρόφοβου φίλτρου. Είναι απαραίτητο η διήθηση να λαμβάνει χώρα στον ελάχιστο δυνατό χρόνο και υπό συνεχή παροχή αδρανούς αερίου ώστε να αποφευχθεί η οξείδωση των ελεύθερων θιολών που έχουν δημιουργηθεί, από τον ατμοσφαιρικό αέρα. Η περίσσεια του DTT που δεν έχει αντιδράσει παραμένει διαλυτή στον διαιθυλαιθέρα και άρα απομακρύνεται από το πολυμερές κατά τη διαδικασία της διήθησης. Το ελαφρώς κιτρινωπό στερεό που προκύπτει συλλέγεται σε σφαιρική φιάλη και ξηραίνεται στη γραμμή κενού για μία νύχτα, ενώ μετά την ξήρανσή του φυλάσσεται σε vial υπό αδρανή ατμόσφαιρα αργού απομονωμένο από τον ατμοσφαιρικό αέρα. Συνοπτικά, η πειραματική πορεία που ακολουθείται για την εκλεκτική αποπροστασία των δομικών μονάδων της PCys για τη σύνθεση των τελικών πλήρως αποπροστατευμένων υβριδικών συμπολυμερών PEO-*b*-P(His-co-Cys) δίνεται στο Σχήμα 3.14.



Σχήμα 3.14: Αντίδραση εκλεκτικής αποπροστασίας των δομικών μονάδων της PCys για τη σύνθεση συμπολυμερών του τύπου PEO-*b*-P(His-co-Cys)

3.7. Αυτο-οργάνωση και Δικτύωση των Υβριδικών Συμπολυμερών του Τύπου PEO-*b*-P(His-co-Cys) για τη Δημιουργία Υπερμοριακών Δομών

Η δημιουργία ανώτερων υπερμοριακών δομών πραγματοποιείται μέσω της διαδικασίας μικυλλίωσης των πλήρως αποπροστατευμένων πολυμερών PEO-*b*-P(His-co-Cys). Αρχικά, οι πολυμερικές αλυσίδες αυτο-οργανώνονται σε υδατικά μέσα και στη συνέχεια οι δομές που προκύπτουν δικτυώνονται μέσω δισουλφιδικών δεσμών (cross-linking). Οι δεσμοί αυτοί σχηματίζονται διαμοριακά με οξείδωση των θιολών των καταλοίπων κυστεΐνης που υπάρχουν στα συμπολυμερή, σύμφωνα με την αντίδραση:



Η διαδικασία σχηματισμού των μικυλλιακών δομών πραγματοποιείται σύμφωνα με παρόμοιες βιβλιογραφικές αναφορές και με κατάλληλες τροποποιήσεις, όπου αυτό κρίνεται απαραίτητο.^{93,94} Έτσι, λοιπόν, σε vial των 15 mL, που περιέχει μαγνητικό αναδευτήρα, προστίθενται 10 mg από το εκάστοτε δείγμα PEO-*b*-P(His-co-Cys) και διαλύονται σε 2 mL άνυδρου DMF. Ακολούθως στο διάλυμα προστίθενται σταδιακά και υπό έντονη ανάδευση 8 mL Tris Buffer 50 mM (pH=7.4, MB=121.14 g/mol, τέσσερις προσθήκες των 2 mL). Το προκύπτον διάλυμα (c=1 mg/mL) μεταφέρεται με χρήση πιπέτας σε κατάλληλη μεμβράνη διαπίδυσης με MWCO=1 kDa και υπόκειται σε διαδικασία dialysis για 24 h με 3x2L διαλύματος Tris Buffer 50 mM με pH=7.4 προς εκδίωξη του οργανικού διαλύτη. Έπειτα το περιεχόμενο της μεμβράνης συλλέγεται σε νέο vial, όπου ρίχνονται 200 μL H_2O_2 (30% w/w, Sigma-Aldrich) σε δύο δόσεις και υπό συνεχή ανάδευση, ώστε να σχηματισθούν οι γέφυρες των δισουλφιδικών δεσμών και να δικτυωθούν οι δομές.

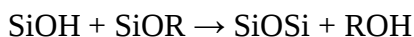
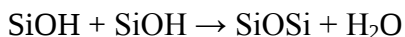
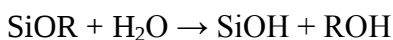
3.8. Σύνθεση Μεσοπορώδων Νανοσωματιδίων Πυριτίας και Εμβολιασμός τους με Πολυμερή

Στην παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε σύνθεση μεσοπορώδων νανοσωματιδίων πυριτίας (mesoporous silica nanoparticles, MSNs) και στη συνέχεια έγινε εμβολιασμός της επιφάνειάς τους με πολυπεπτιδικές αλυσίδες μέσω της διαδικασίας “grafting to”, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. Με τον τρόπο αυτό στις υβριδικές δομές που προκύπτουν προσδίδονται ιδιότητες λόγω των πολυμερών, όπως η αποκρισημότητα σε εξωτερικά

ερεθίσματα (pH, δυναμικό οξειδοαναγωγής) και οι “stealth” ιδιότητες, καθιστώντας τις δομές πολλά υποσχόμενες για εφαρμογές ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμακευτικών ουσιών.

3.8.1. Σύνθεση Μεσοπορώδων Νανοσωματιδίων Πυριτίας (Mesoporous Silica Nanoparticles, MSNs)^{69,95}

Σε σφαιρική φιάλη 1L, που φέρει μαγνητικό αναδευτήρα, προστίθενται 480 mL νερό Milli-Q και στη συνέχεια διαλύονται σε αυτό τον όγκο διαλύτη 0.28 g NaOH (7.0 mmol) και 1 g της επιφανειοδραστικής ουσίας cetyltrimethylammonium bromide (CTAB, 2.74 mmol, Sigma-Aldrich). Το διάλυμα θερμαίνεται με χρήση ελαιόλουτρου στους 80 °C για 15 min και έπειτα προστίθενται στάγδην και υπό συνεχή έντονη ανάδευση 5.3 mL από την ένωση tetraethyl orthosilicate (TEOS, 5.0 g, 22.4 mmol, Acros Organics). Αφού ολοκληρωθεί η προσθήκη του αντιδραστηρίου, το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση στους 80 °C για ακόμα δύο ώρες προς σχηματισμό των νανοσωματιδίων πυριτίας μέσω διαδοχικών αντιδράσεων συμπύκνωσης. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης σχηματίζονται δεσμοί σιλοξάνης (-Si-O-Si-), δημιουργώντας ένα τρισδιάστατο δίκτυο (Σχήμα 3.15).⁹⁶

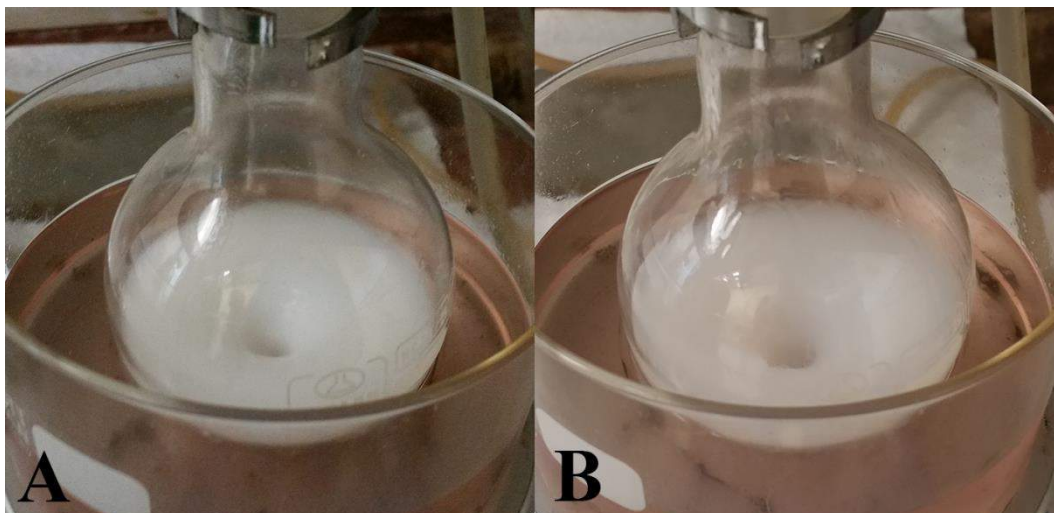


Σχήμα 3.15: Αντιδράσεις συμπύκνωσης που πραγματοποιούνται κατά τη σύνθεση νανοσωματιδίων πυριτίας (MSNs)

Το λευκό στερεό που δημιουργείται (υπό μορφή αιωρήματος), απομονώνεται μέσω φυγοκέντρησης στις 8000 rpm για 15 min, και στη συνέχεια εκπλένεται διεξοδικά με νερό Milli-Q (τρεις φορές) και έπειτα με MeOH (πέντε φορές) για την απομάκρυνση των παραπροϊόντων. Τέλος, η ποσότητα του στερεού συλλέγεται σε σφαιρική φιάλη των 50 mL και αφήνεται προς ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα.

Την επόμενη ημέρα, πραγματοποιείται η αντίδραση απομάκρυνσης του CTAB ώστε να δημιουργηθούν οι νανοπόροι στα MSNs. Ειδικότερα, η ποσότητα των νανοσωματιδίων (~1 g) διαλύεται σε 85 mL μείγματος MeOH και πυκνού HCl (37.4%) (16:1 v/v) και το προκύπτον διάλυμα θερμαίνεται με χρήση ελαιόλουτρου στους 60 °C και αφήνεται υπό επαναροή σε αυτή την θερμοκρασία για 36 h. Παρατηρείται ότι μετά την πάροδο των 36 h το διάλυμα γίνεται ελαφρώς πιο διαυγές, γεγονός που αποτελεί ένδειξη για την επιτυχή δημιουργία των νανοπόρων

(Εικόνα 3.9). Το λευκό στερεό απομονώνεται μέσω φυγοκέντρησης στις 8000 rpm για 15 min, εκπλένεται διεξοδικά με MeOH (πέντε φορές) για την απομάκρυνση των παραπροϊόντων (κυρίως του HCl), ενώ στη συνέχεια μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη των 50 mL και αφήνεται προς ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα. Την επόμενη ημέρα η ποσότητα των MSNs ζυγίζεται (0.72 g) και φυλάσσεται σε φιαλίδιο υπό αδρανή ατμόσφαιρα αργού.



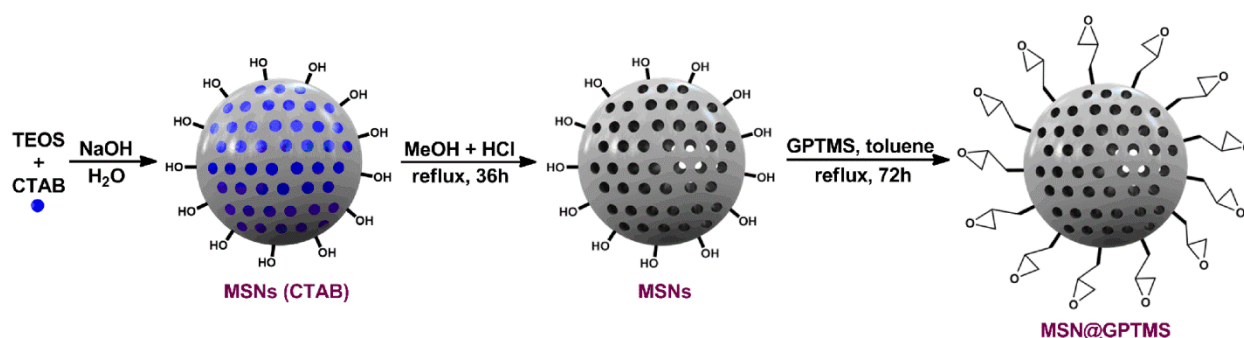
Εικόνα 3.9: Αιώρημα MSNs (A) πριν και (B) μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης απομάκρυνσης του CTAB

3.8.2. Τροποποίηση της Επιφάνειας των Μεσοπορώδων Νανοσωματιδίων Πυριτίας με Εποξειδικούς Δακτυλίους (MSN@GPTMS)⁹⁷

Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL προστίθενται 0.6 g των μη τροποποιημένων MSNs και ακολούθως στη φιάλη αποστάζονται 35 mL καθαρού τολουολίου μέσω της γραμμής υψηλού κενού. Το στερεό διασπείρεται στο διαλύτη με χρήση υπερήχων (sonication) για 15 min και έπειτα προστίθεται 1 mL (3-glycidyloxypropyl)trimethoxysilane (GPTMS, 4.6 mmol, Sigma-Aldrich) στο αιώρημα που έχει προκύψει. Στη συνέχεια, η φιάλη τοποθετείται σε ελαιόλουτρο και προσαρμόζεται κατακόρυφος ψυκτήρας, ενώ επίσης στη συσκευή προσαρμόζεται παροχή αδρανούς αερίου (άζωτο) με χρήση του κατάλληλου επιθέματος. Το μείγμα θερμαίνεται μέχρι να επιτευχθεί επαναροή του διαλύτη (110-120 °C) και αφήνεται για 72 h σε αυτή τη θερμοκρασία υπό συνεχή παροχή αζώτου και υπό έντονη ανάδευση προς ολοκλήρωση της αντίδρασης τροποποίησης.

Μετά το πέρας των 72 h, διακόπτεται η θέρμανση και το μεγαλύτερο μέρος του τολουολίου απομακρύνεται από τη φιάλη της αντίδρασης μέσω απόσταξης στη γραμμή υψηλού

κενού. Στο διάλυμα των τροποποιημένων νανοσωματιδίων MSN@GPTMS προστίθεται ποσότητα MeOH και το στερεό απομονώνεται μέσω φυγοκέντρησης στις 4000 rpm για 10 min, εκπλένεται διεξοδικά με MeOH (πέντε φορές) για την απομάκρυνση των παραπροϊόντων (κυρίως του HCl) ενώ στη συνέχεια μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη των 50 mL και αφήνεται προς ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα. Την επόμενη ημέρα η ποσότητα των νανοσωματιδίων MSN@GPTMS ζυγίζεται (0.60 g) και φυλάσσεται σε vial υπό αδρανή ατμόσφαιρα αργού. Συνοπτικά, η διαδικασία σύνθεσης και τροποποίησης της επιφάνειας των MSNs για τη δημιουργία μεσοπορώδων νανοσωματιδίων πυριτίας με εποξειδικούς δακτυλίους στην επιφάνειά τους (MSN@GPTMS) δίνεται στο Σχήμα 3.16.



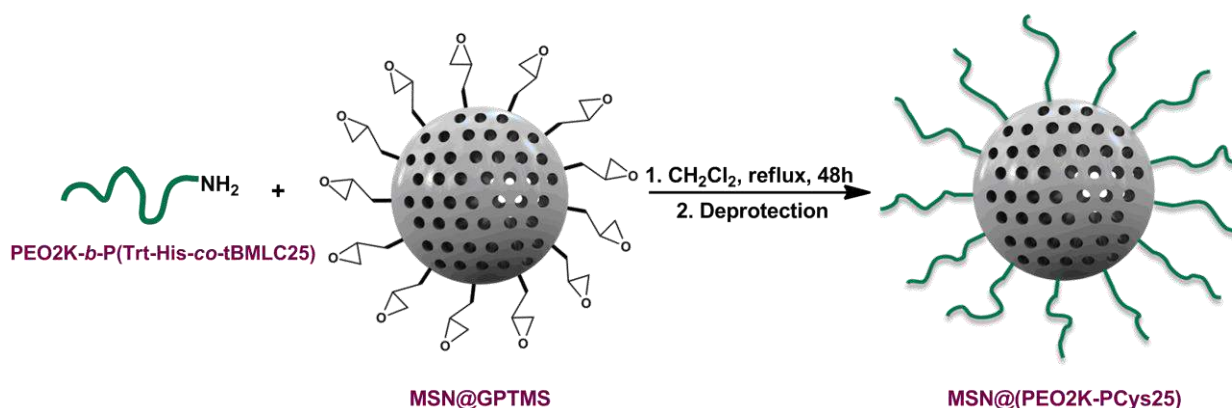
Σχήμα 3.16: Πειραματική πορεία σύνθεσης mesoporous silica nanoparticles με εποξειδικούς δακτυλίους στην επιφάνειά τους (MSN@GPTMS)

3.8.3. Εμβολιασμός του Υβριδικού Πολυμερούς PEO2K-*b*-P(Trt-His-co-tBMLC25) σε Μεσοπορώδη Νανοσωματίδια Πυριτίας (MSN@PEO2K-PCys25)

Ο εμβολιασμός των νανοσωματιδίων MSN@GPTMS επιλέχθηκε να γίνει μέσω “grafting to” με το πολυμέρες PEO2K-*b*-P(Trt-His-co-tBMLC25), που συντέθηκε στην παρούσα εργασία (βλ. παραγρ. 3.6.1).⁹⁷ Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιείται πυρηνόφιλη αντίδραση διάνοιξης του εποξειδικού δακτυλίου από την ακραία αμινομάδα του συμπολυμερούς, όσο ακόμα το πολυπεπτιδικό τμήμα του είναι πλήρως προστατευμένο για την αποφυγή παράπλευρων αντιδράσεων. Ακολούθως πραγματοποιούνται κατά σειρά οι αντιδράσεις αποπροστασίας της PHis και της PCys για να ληφθεί το τελικό δείγμα MSN@(PEO2K-PCys25).

Έτσι, λοιπόν, σε σφαιρική φιάλη των 50 mL, που περιέχει μαγνητικό αναδευτήρα, προστίθενται 50 mg του MSN@GPTMS και διασπείρονται σε 30 mL καθαρού CH₂Cl₂ με χρήση υπερήχων (sonication), ενώ στη συνέχεια προστίθενται και διαλύονται 100 mg του προστατευμένου συμπολυμερούς PEO2K-*b*-P(Trt-His-co-tBMLC25). Στη φιάλη προσαρμόζεται

κατακόρυφος ψυκτήρας και παροχή αδρανούς αερίου (άζωτο) με χρήση του κατάλληλου επιθέματος. Το μείγμα θερμαίνεται μέχρι να επιτευχθεί επαναρροή του διαλύτη (40 °C) και αφήνεται για δύο ημέρες σε αυτή τη θερμοκρασία υπό συνεχή παροχή αζώτου και υπό έντονη ανάδευση προς ολοκλήρωση της αντίδρασης εμβολιασμού. Έπειτα, διακόπτεται η θέρμανση και το στερεό απομονώνεται μέσω φυγοκέντρωσης στις 4000 rpm για 15 min, ενώ εκπλένεται διεξοδικά με CH₂Cl₂ (πέντε φορές) για την απομάκρυνση της περίσσειας του πολυμερούς. Στη συνέχεια μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη των 50 mL και αφήνεται προς ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα. Την επόμενη ημέρα η ποσότητα του δείγματος ζυγίζεται (65 mg) και φυλάσσεται σε vial υπό αδρανή ατμόσφαιρα αργού. Ακολούθως πραγματοποιούνται διαδοχικά οι αντιδράσεις αποπροστασίας PHis και PCys στις εμβολιασμένες πολυμερικές αλυσίδες, όπως ακριβώς περιγράφηκαν στις παραγράφους 3.6.2. και 3.6.3. και με μόνη διαφορά ότι στη διαδικασία του dialysis χρησιμοποιήθηκε μεμβράνη με MWCO=12-14 kDa. Συνοπτικά, η πειραματική διαδικασία εμβολιασμού (“grafting to”) του πολυμερούς PEO2K-*b*-P(Trt-His-co-tBMLC25) στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων MSN@GPTMS και της επακόλουθης αποπροστασίας του για τη σύνθεση των τελικών υβριδικών νανοσωματιδίων MSN@(PEO2K-PCys25) δίνεται στο Σχήμα 3.17.



Σχήμα 3.17: Διαδικασία σύνθεσης εμβολιασμένων νανοσωματιδίων MSN@(PEO2K-PCys25) μέσω αντίδρασης “grafting to”

3.9. Οργανολογία Μοριακού Χαρακτηρισμού Πολυμερών και Νανοσωματιδίων

Η λήψη φασμάτων IR πραγματοποιήθηκε σε όργανο Perkin Elmer Spectrum One, με χρήση δισκίων KBr. Για το σχηματισμό του κάθε δισκίου απαιτούνται 1 mg της προς ανάλυση ουσίας και 0.2 g KBr. Η λήψη των φασμάτων ¹H-NMR, τόσο για τον προσδιορισμό της δομής

και της σύστασης των πολυμερών που συντέθηκαν καθώς και για την ταυτοποίηση της επιτυχούς σύνθεσης των NCAs, πραγματοποιήθηκε σε όργανο Varian Unity Plus 300/54 (300 MHz), σε θερμοκρασία δωματίου. Τα φάσματα των μονομερών λήφθηκαν σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3) ως διαλύτη, ενώ των πολυμερών σε δευτεριωμένο τριφθοροξικό οξύ (CF_3COOD). Η ανάλυση μέσω χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών πραγματοποιήθηκε με χρήση συστήματος SEC, αποτελούμενο από όργανο Waters Breeze που είναι εξοπλισμένο με διαφορικό διαθλασίμετρο 2410 και ανιχνευτή σκέδασης φωτός δύο γωνιών (15° , 90°) Precision PD 2020. Ο φέρων διαλύτης ήταν μείγμα νερού/ακετονιτριλίου (60/40) με 0.10% TFA και ροή 0.8 mL/min, στους 35°C . Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκαν τρεις στήλες υδρογέλης Waters συνδεδεμένες σε σειρά. Η ανάλυση του ζ-δυναμικού έγινε μέσω της τεχνικής της μικροηλεκτροφόρησης, χρησιμοποιώντας όργανο Malvern Zetasizer 300HS_A στα 633 nm. Η θερμοσταθμική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε όργανο TA Instruments TGA Q50 υπό ατμόσφαιρα αζώτου και σε εύρος θερμοκρασιών $23\text{--}800^\circ\text{C}$ (ρυθμός θέρμανσης $10^\circ\text{C}/\text{min}$). Οι μετρήσεις κυκλικού διχρωϊσμού έγιναν με χρήση φασματοφωτομέτρου Jasco J-815 CD, εξοπλισμένο με λάμπα Xe 150 W και σύστημα ελέγχου της θερμοκρασίας Jasco Peltier PTC-423S/15 (στους 37°C), στην περιοχή 180-260 nm. Η συγκέντρωση διαλυμάτων ήταν της τάξης των $5 \cdot 10^{-4}$ g/mol. Οι εικόνες SEM λήφθηκαν μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης JEOL JSM 5600, που διαθέτει δυναμικό επιτάχυνσης 20 kV, ρεύμα ακτίνας 0.5 nA και διάμετρο ακτίνας 1 έως 2 mm. Οι εικόνες TEM λήφθηκαν μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης JEOL 2000FX στα 200 kV. Τέλος, οι ισόθερμες καμπύλες προσρόφησης-εκρόφησης λήφθηκαν σε όργανο Micromeritics ASAP 2020 (Accelerated Surface Area and Porosimetry System) με χρήση αερίου αζώτου. Πριν την μέτρηση τα δείγματα των MSNs απαερώθηκαν στους 60°C για τουλάχιστον 16 ώρες. Το ειδικό εμβαδόν επιφανείας υπολογίστηκε μέσω της εξίσωσης Brunauer–Emmett–Teller (BET), ενώ η κατανομή του μεγέθους των πόρων υπολογίστηκε από την εξίσωση Barrett–Joyner–Halenda (BJH), εφαρμόζοντας την στην καμπύλη εκρόφησης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

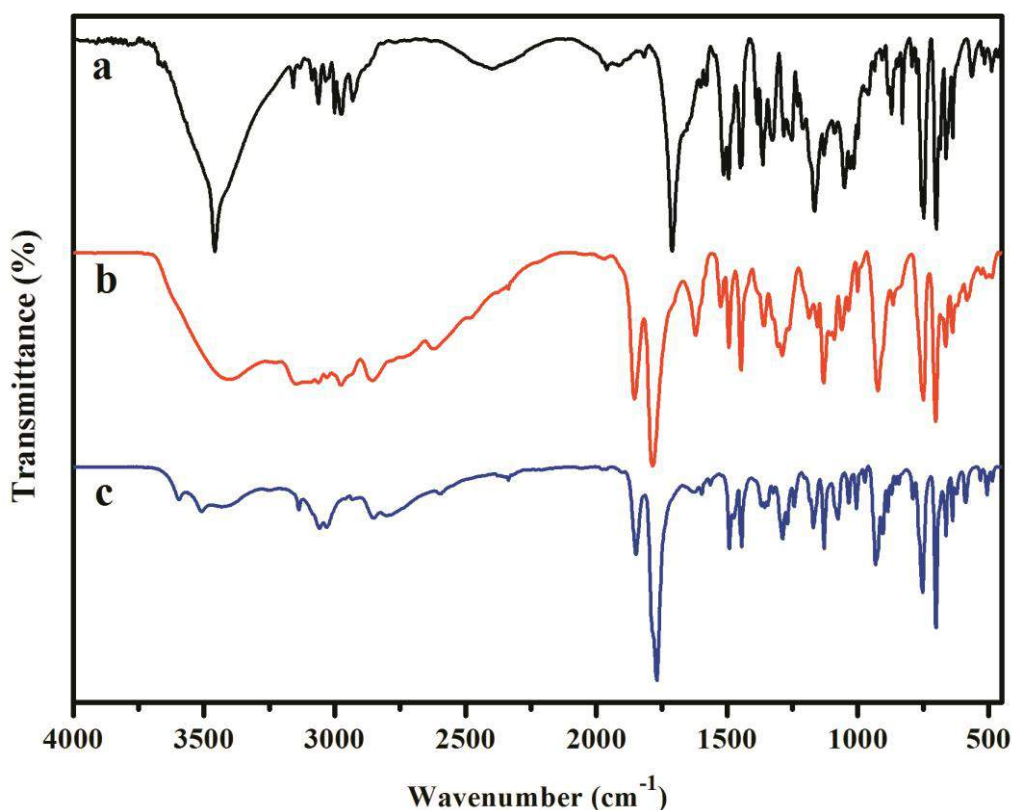
4.1. Σύνθεση των N-Καρβοξυ Ανυδριτών των α -Αμινοξέων (NCAs)

Η σύνθεση των NCAs των α -αμινοξέων αποτελεί το πρώτο στάδιο της παρούσας εργασίας, καθώς αποτελούν τα μονομερή για τον επακόλουθο ROP προς σχηματισμό των πολυπεπτιδίων. Ο έλεγχος της επιτυχούς σύνθεσης τους πραγματοποιείται μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου (FT-IR), και πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ($^1\text{H-NMR}$). Η φασματοσκοπία υπερύθρου επιτρέπει τη γρήγορη και αξιόπιστη αναγνώριση των NCAs, εφόσον διατίθεται βιβλιογραφικά πρότυπο φάσμα για σύγκριση. Επιπλέον, όταν οι NCAs αρχίζουν να πολυμερίζονται, οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις των καρβονυλίων του δακτυλίου εξαφανίζονται σταδιακά και παίρνουν την θέση τους οι χαρακτηριστικές δονήσεις των αμιδικών δεσμών, υποδηλώνοντας τον επιτυχή πολυμερισμό τους.

4.1.1. Σύνθεση του $N_{(\text{im})}$ -Trt-His NCA

Αρχικά, προηγείται η λήψη φάσματος IR της πρόδρομης ένωσης BOC-His(Trt)-OH (Σχήμα 4.1a). Παρατηρείται η χαρακτηριστική κορυφή στα 1710 cm^{-1} , η οποία οφείλεται στη δόνηση του καρβονυλίου ($\text{C}=\text{O}$) του αμινοξέος της ιστιδίνης. Ακολούθως, στο διάλυμα της ένωσης προστίθεται το SOCl_2 που χρησιμοποιείται ως μέσο χλωρίωσης για την πραγματοποίηση της αντίδρασης κυκλοποίησης και η αντίδραση αφήνεται για 2.5 ώρες. Η προσθήκη του SOCl_2 πρέπει υποχρεωτικά να γίνεται σε χαμηλή θερμοκρασία, διότι σε υψηλές θερμοκρασίες ελλοχεύει ο κίνδυνος της απόσπασης των τρίτυλο-προστατευτικών ομάδων. Η ολοκλήρωση της αντίδρασης επιβεβαιώνεται με λήψη νέου φάσματος IR μετά την πάροδο του συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος (Σχήμα 4.1b). Σε αυτό το φάσμα είναι ορατή η μείωση της κορυφής του αρχικού αντιδρώντος στα 1710 cm^{-1} και η εμφάνιση των δύο χαρακτηριστικών κορυφών του $N_{(\text{im})}$ -Trt-His NCA στα 1785 cm^{-1} και 1850 cm^{-1} . Η εμφάνιση αυτών των δύο κορυφών, υποδηλώνει την επιτυχή σύνθεση του N-καρβοξυ ανυδρίτη. Ειδικότερα, η κορυφή στα 1785 cm^{-1} αποδίδεται στο καρβονύλιο που βρίσκεται δίπλα στο άζωτο του NCA (δηλ. του C_2), ενώ η δεύτερη κορυφή στα 1850 cm^{-1} αφορά, αντίστοιχα, το καρβονύλιο που βρίσκεται δίπλα από την πλευρική ομάδα του NCA (δηλ. του C_5). Επιπλέον είναι ορατή και μία κορυφή στα 1620 cm^{-1} , η οποία οφείλεται σε έκταση δόνησης του δεσμού N-H και αποδίδεται στο σχηματισθέν υδροχλωρικό άλας του NCA της ιστιδίνης. Η πλήρης δέσμευση του HCl από τον ιμιδαζολικό

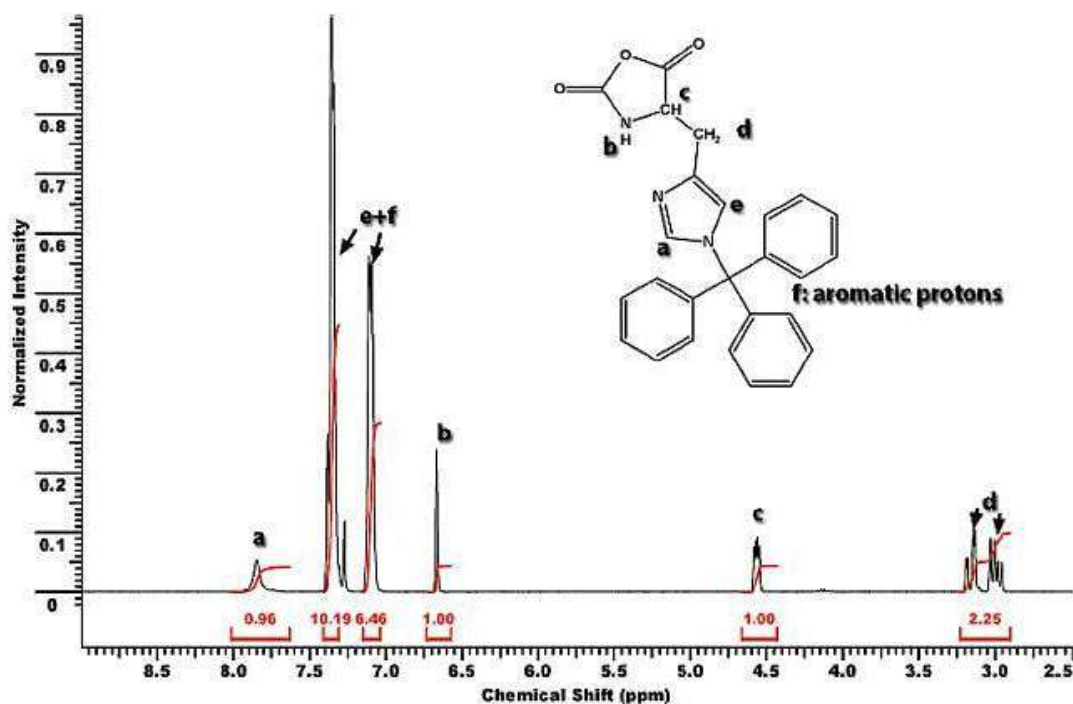
δακτύλιο του NCA επιτυγχάνεται με χρήση ισομοριακής ποσότητας Et_3N , προς σχηματισμό του άλατος $\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{HCl}$ υπό μορφή ιζήματος, το οποίο απομακρύνεται από το επιθυμητό προϊόν μέσω διήθησης. Στο φάσμα IR του τελικού NCA απουσιάζει η κορυφή στα 1710 cm^{-1} , που υποδηλώνει ότι το αρχικό αμινοξύ της ιστιδίνης έχει καταναλωθεί πλήρως, η κορυφή στα 1620 cm^{-1} , που δείχνει ότι δεσμεύτηκε ποσοτικά το HCl μετά την προσθήκη της ποσότητας τριαιθυλαμίνης και τέλος, η κορυφή στα 1650 cm^{-1} , που θα οφειλόταν στη δόνηση του πεπτιδικού δεσμού λόγω πιθανής έναρξης του πολυμερισμού από τυχόν περίσσεια της Et_3N (Σχήμα 4.1c). Καθ' όλη τη διάρκεια της συνθετικής πορείας δεν παρατηρείται, επίσης, μεταβολή των χαρακτηριστικών κορυφών της προστατευτικής ομάδας στα 701 cm^{-1} και 751 cm^{-1} , που οφείλονται στις δονήσεις των δεσμών $-\text{CH}=\text{CH}-$ των βενζολικών δακτυλίων.



Σχήμα 4.1: Φάσμα IR (a) της πρόδρομης ένωσης BOC-His(Trt)-OH , (b) μετά από 2.5 ώρες αντίδρασης και (c) του τελικού προϊόντος $N_{(\text{im})}\text{-Trt-His NCA}$ μετά τις ανακρυσταλλώσεις

Επιπρόσθετα, η επιτυχής σύνθεση και η υψηλή καθαρότητα του $N_{(\text{im})}\text{-Trt-His NCA}$ επιβεβαιώνονται με λήψη φάσματος $^1\text{H-NMR}$ του ληφθέντος στερεού σε διαλύτη CDCl_3 (Σχήμα 4.2). Παρατηρείται ότι όλες οι κορυφές αποδίδονται σε υδρογόνα του NCA, ενώ οι ολοκληρώσεις των εμβαδών συμπίπτουν επακριβώς με τις θεωρητικά προβλεπόμενες. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 2.80–3.20 (2H, $-\text{CH}_2-$), 4.50–4.65 (1H, $-\text{CH}-$ του δακτυλίου του NCA), 6.70 (1H, $-\text{NH}-$ του δακτυλίου του NCA), 7.00–7.45 (16H, ArH των τριτυλο-ομάδων

και N-CH=C του ιμιδαζολικού δακτυλίου), 7.65–7.85 (1H, N-CH=N του ιμιδαζολικού δακτυλίου).

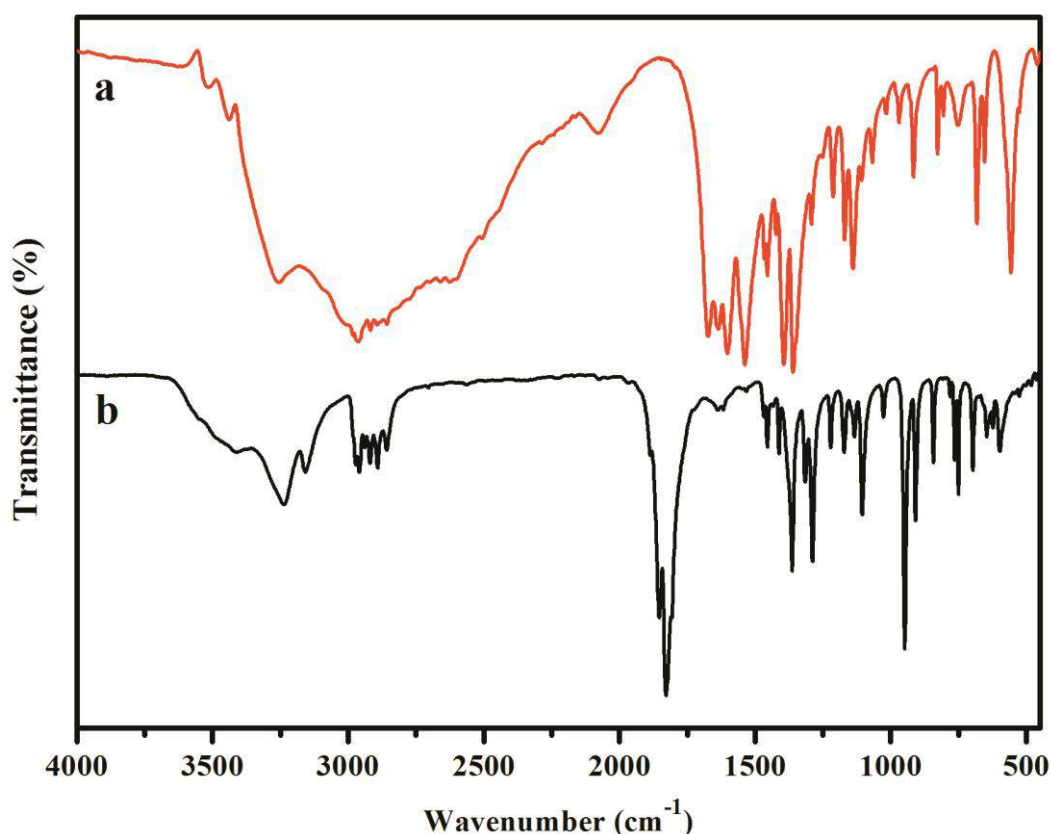


Σχήμα 4.2: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του $N_{(\text{im})}\text{-Trt-His NCA}$, σε CDCl_3

4.1.2. Σύνθεση του tBMLC NCA

Αρχικά, προηγείται η λήψη φάσματος IR της πρόδρομης ένωσης H-Cys(StBu)-OH (Σχήμα 4.3a). Παρατηρείται η χαρακτηριστική κορυφή στα 1674 cm^{-1} , η οποία οφείλεται στη δόνηση του καρβονυλίου (C=O) του προστατευμένου αμινοξέος της κυστεΐνης, και δύο κορυφές στα 1538 cm^{-1} και 1605 cm^{-1} , που οφείλονται στη δόνηση κάμψης του δεσμού της ελεύθερης αμινομάδας ($-\text{NH}_2$). Η αντίστοιχη δόνηση έκτασης του δεσμού $-\text{NH}_2$ εμφανίζεται στην ευρεία περιοχή $3175\text{--}3440\text{ cm}^{-1}$. Ακολούθως, στο διάλυμα της ένωσης προστίθεται το (R)-(+)-limonene που χρησιμοποιείται ως αντιδραστήριο δέσμευσης του παραγόμενου HCl, αποτρέποντας έτσι την πραγματοποίηση παράπλευρων αντιδράσεων, όπως είναι η απόσπαση της S-tert-butylmercapto προστατευτικής ομάδας. Το διάλυμα θερμαίνεται μέχρι να επιτευχθεί επαναρροή και έπειτα προστίθεται η ποσότητα του τριφωσγενίου, που λειτουργεί ως μέσο χλωρίωσης για την πραγματοποίηση της αντίδρασης κυκλοποίησης προς σχηματισμό του NCA και η αντίδραση αφήνεται για 2 ώρες. Η σταδιακή διαύγηση του διαλύματος κατά τη διάρκεια της αντίδρασης αποτελεί ένδειξη του επιτυχούς σχηματισμού του tBMLC NCA, καθώς είναι διαλυτός στον

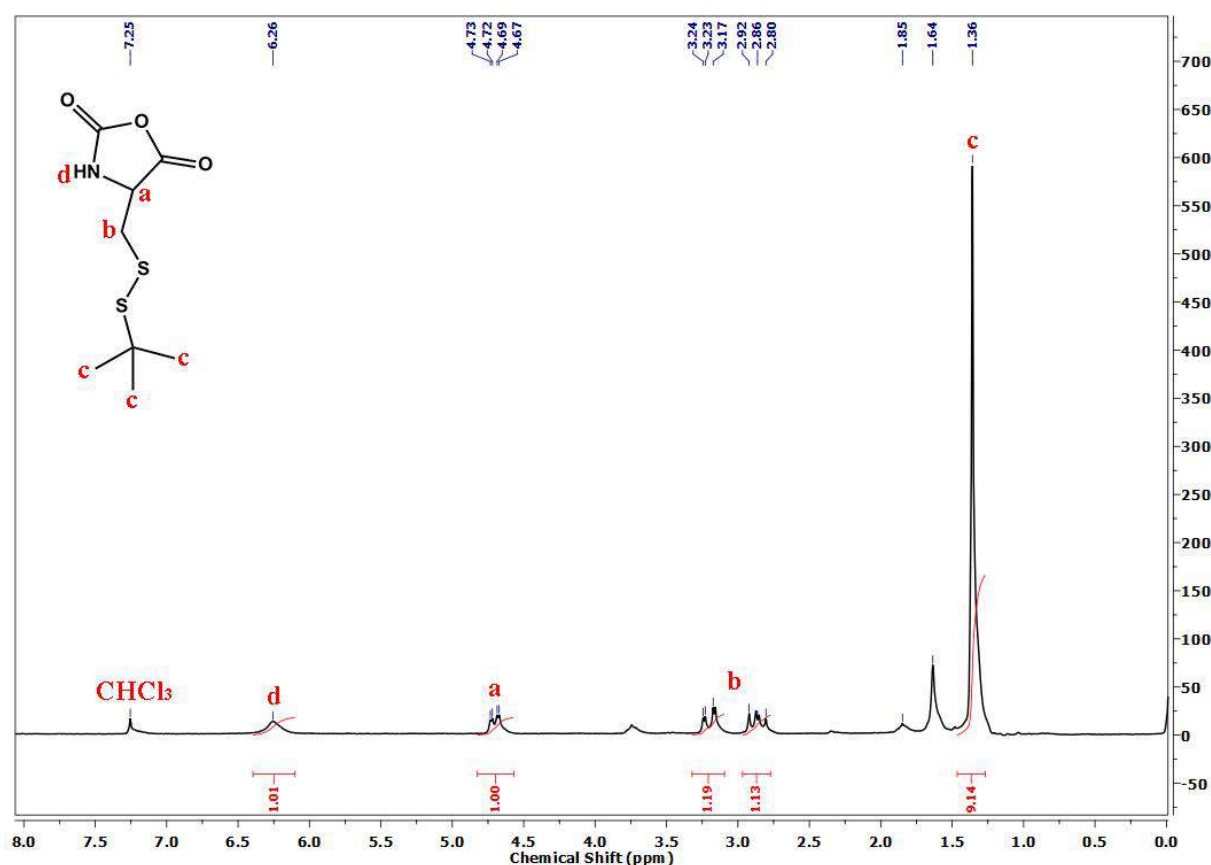
EtOAc ενώ το αρχικό αμινοξύ δεν είναι διαλυτό. Η ολοκλήρωση της αντίδρασης επιβεβαιώνεται με λήψη νέου φάσματος IR μετά την πάροδο του συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος, ενώ η απομόνωση του τελικού προϊόντος επιτυγχάνεται μέσω καταβύθισης σε εξάνιο και επακόλουθης διήθησης. Πριν την *in situ* καταβύθιση του NCA, προηγείται διήθηση του διαλύματος ώστε να απομακρυνθούν οι ποσότητες των αρχικών αντιδρώντων και τυχόν αδιάλυτες προσμίξεις που υπάρχουν στο μέσο της αντίδρασης. Στο φάσμα IR του τελικού NCA παρατηρείται ότι το αρχικό αμινοξύ της κυστεΐνης έχει μετατραπεί ποσοτικά, καθώς απουσιάζουν οι χαρακτηριστικές κορυφές στην περιοχή κορυφή $1500\text{--}1690\text{ cm}^{-1}$ και $2390\text{--}2828\text{ cm}^{-1}$. Επιπλέον, παρατηρείται η εμφάνιση των δύο χαρακτηριστικών κορυφών του tBMLC NCA στα 1828 cm^{-1} και 1853 cm^{-1} . Η εμφάνιση αυτών των δύο κορυφών, υποδηλώνει την επιτυχή σύνθεση του N-καρβοξυ ανυδρίτη. Ειδικότερα, η κορυφή στα 1828 cm^{-1} αποδίδεται στο καρβονύλιο που βρίσκεται δίπλα στο άζωτο του NCA (δηλ. του C₂), ενώ η δεύτερη κορυφή στα 1853 cm^{-1} αφορά, αντίστοιχα, το καρβονύλιο που βρίσκεται δίπλα από την πλευρική ομάδα του NCA (δηλ. του C₅) (Σχήμα 4.3b).



Σχήμα 4.3: Φάσμα IR (a) της πρόδρομης ένωσης H-Cys(StBu)-OH και (b) του τελικού προϊόντος tBMLC NCA

Επίσης, χαρακτηριστικές κορυφές του NCA εμφανίζονται στα 598 cm^{-1} , η οποία οφείλεται στη δόνηση έκτασης του δεσμού S-S, αλλά και στην περιοχή $2830\text{--}2980\text{ cm}^{-1}$, που οφείλεται

στη συμμετρική και αντισυμμετρική δόνηση έκτασης του δεσμού $\text{CH}_2\text{-S}$ και των δεσμών -CH_3 της προστατευτικής ομάδας (StBuM). Η απουσία της χαρακτηριστικής κορυφής της δόνησης έκτασης του δεσμού S-H στα 2566 cm^{-1} , σε συνδυασμό πάντα με τα αποτελέσματα από το φάσμα $^1\text{H-NMR}$, αποδεικνύει ότι η προστατευτική ομάδα του μονομερούς παρέμεινε ανέπαφη καθ' όλη τη συνθετική πορεία.⁹⁸ Η επιτυχής σύνθεση και η υψηλή καθαρότητα του tBMLC NCA επιβεβαιώνονται με λήψη φάσματος $^1\text{H-NMR}$ του ληφθέντος στερεού σε διαλύτη CDCl_3 (Σχήμα 4.4). Παρατηρείται ότι οι ολοκληρώσεις των εμβαδών των κορυφών συμπίπτουν επακριβώς με τις θεωρητικά προβλεπόμενες, ενώ οι δύο κορυφές που εμφανίζονται στα 1.64 και 1.85 ppm αποδίδονται σε υδρογόνα του (R)-(+)-limonene, μικρή ποσότητα του οποίου παρέμεινε ως πρόσμειξη, αλλά σε καμία περίπτωση δεν επηρεάζει την έκβαση του πολυμερισμού. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 1.36 (9H, $(\text{CH}_3)_3\text{-C-}$), 2.80–3.23 (2H, $\text{-CH}_2\text{-}$), 4.67–4.73 (1H, -CH- του δακτυλίου του NCA), 6.26 (1H, -NH- του δακτυλίου του NCA, ευκίνητο). Ο tBMLC NCA εμφανίζει καλή διαλυτότητα στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες, όπως CHCl_3 , DMSO, THF, EtOAc και DMF.



Σχήμα 4.4: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του tBMLC NCA, σε CDCl_3

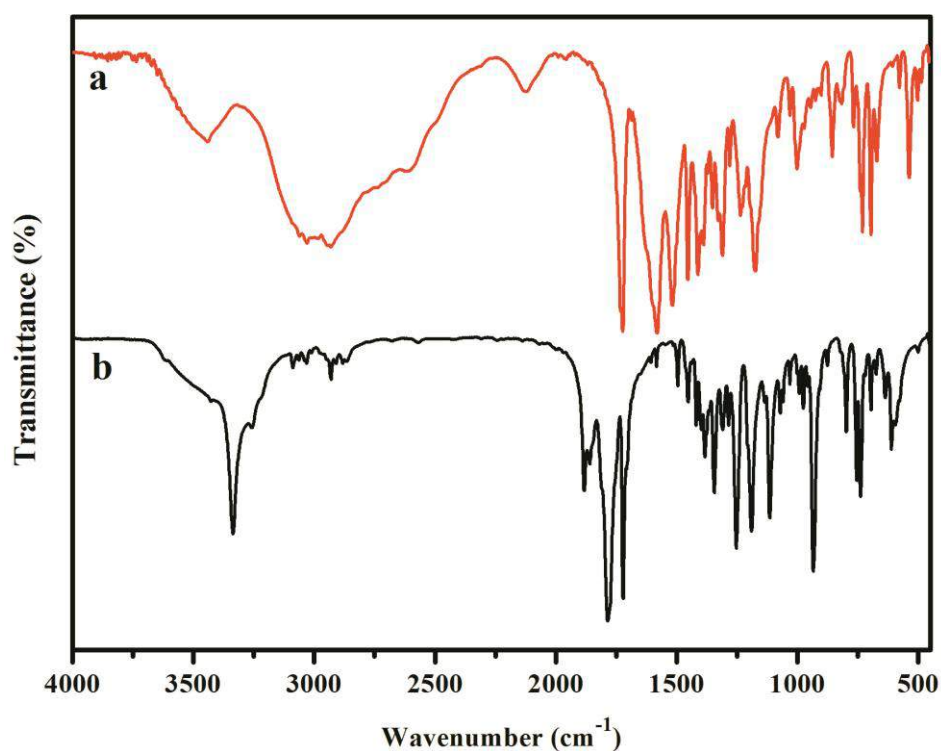
4.1.3. Σύνθεση του BLG NCA

Αρχικά, προηγείται η λήψη φάσματος IR της πρόδρομης ένωσης H-Glu(OBzl)-OH (Σχήμα 4.5a). Η ευρεία κορυφή στην περιοχή $2500-3300\text{ cm}^{-1}$ αντιστοιχεί στη δόνηση της πρωτοταγούς αμίνης, σε συνδυασμό με την υδροξυλομάδα του καρβοξυλίου. Τα καρβοξυλικά οξέα απαντώνται ως διμερή όταν βρίσκονται σε στερεά φάση μέσω δεσμών υδρογόνου, αποδίδοντας ευρείες κορυφές στα φάσματα IR (C=O στα 1582 cm^{-1}). Στα 1724 cm^{-1} απορροφάει ο αρωματικός εστέρας της πλευρικής ομάδας του αμινοξέος, ενώ στην περιοχή $600-800\text{ cm}^{-1}$ εμφανίζονται οι ταινίες του αρωματικού δακτυλίου της προστασίας. Το αρχικό αμινοξύ βρίσκεται υπό τη μορφή αιωρήματος στον οξικό αιθυλεστέρα και για την σύνθεση του ανυδρίτη απαιτείται υψηλή θερμοκρασία και μικρή περίσσεια τριφωσγενίου, ενώ η όλη αντίδραση σχηματισμού του δακτυλίου διατηρείται για περίπου 2 ώρες. Το BLG είναι το μοναδικό αμινοξύ η σύνθεση του οποίου δεν απαιτεί τη χρήση τριαιθυλαμίνης ή λιμονενίου για τη δέσμευση του παραγόμενου HCl, διότι η προστατευτική ομάδα είναι ανθεκτική στις όξινες συνθήκες. Η σταδιακή διαύγαση του διαλύματος κατά τη διάρκεια της αντίδρασης αποτελεί ένδειξη του επιτυχούς σχηματισμού του BLG NCA, καθώς είναι διαλυτός στον EtOAc. Η ολοκλήρωση της αντίδρασης επιβεβαιώνεται με λήψη νέου φάσματος IR, ενώ η απομόνωση και ο καθαρισμός του τελικού προϊόντος επιτυγχάνεται μέσω ανακρυσταλλώσεων σε σύστημα EtOAc/εξάνιο.

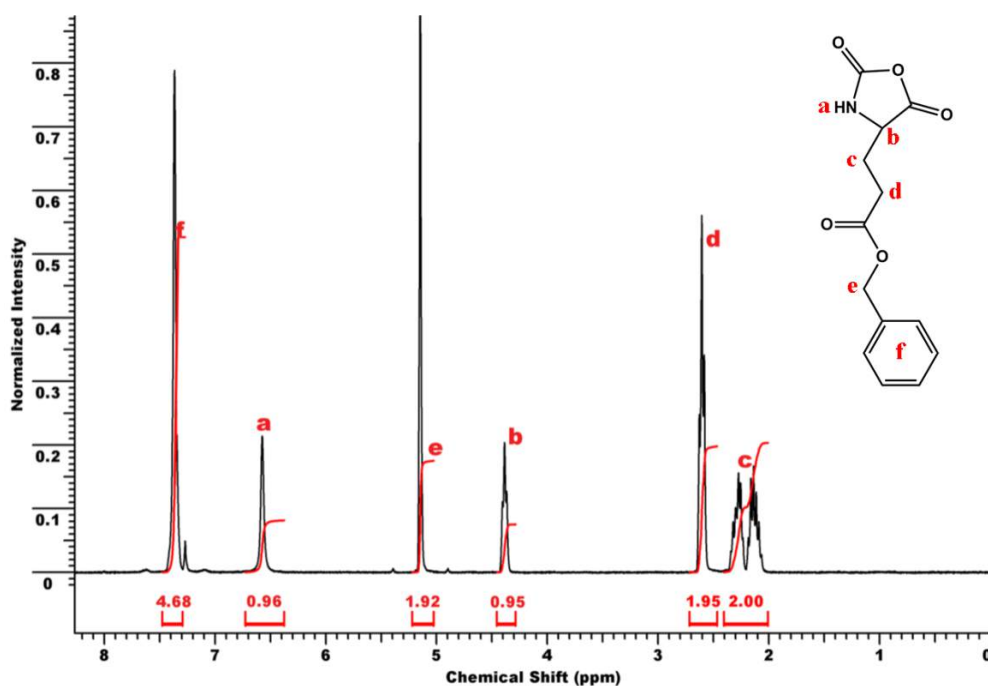
Στο φάσμα IR του τελικού NCA παρατηρείται ότι το αρχικό αμινοξύ του γ-βενζυλεστέρα του γλουταμικού οξέος έχει καταναλωθεί πλήρως, καθώς απουσιάζουν οι χαρακτηριστικές κορυφές της ελεύθερης αμινομάδας και του καρβοξυλίου. Επιπλέον, στην περιοχή του καρβονυλίου παρατηρούνται δύο νέες ταινίες που υποδηλώνουν την επιτυχή σύνθεση του NCA. Η απορρόφηση στα 1785 cm^{-1} αφορά τη δόνηση έκτασης του καρβονυλίου που βρίσκεται δίπλα στο άζωτο του ανυδρίτη (δηλ. του C_2), και η δεύτερη στα 1882 cm^{-1} οφείλεται στη δόνηση έκτασης του καρβονυλίου που βρίσκεται δίπλα από την πλευρική ομάδα του NCA (δηλ. του C_5) (Σχήμα 4.5b). Επιπλέον, στην περιοχή του καρβονυλίου απουσιάζει η χαρακτηριστική ταινία του αμιδικού δεσμού στα 1650 cm^{-1} , γεγονός που αποδεικνύει ότι η τεχνική υψηλού κενού διασφαλίζει όλα τα συνθετικά στάδια, ενώ η απορρόφηση του αρωματικού εστέρα της πλευρικής ομάδας παραμένει ανέπαφη.

Επιπρόσθετα, η επιτυχής σύνθεση και η υψηλή καθαρότητα του BLG NCA επιβεβαιώνονται με λήψη φάσματος $^1\text{H-NMR}$ του ληφθέντος στερεού σε διαλύτη CDCl_3 (Σχήμα 4.6). Παρατηρείται ότι όλες οι κορυφές αποδίδονται σε υδρογόνα του NCA, ενώ οι ολοκληρώσεις των εμβαδών συμπίπτουν επακριβώς με τις θεωρητικά προβλεπόμενες. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 2.10–2.40 (2H, $-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{CO}-$), 2.60 (2H, $-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{CO}-$), 4.37

(1H, $-\text{CH}-$ του δακτυλίου του NCA), 5.14 (2H, $-\text{O}-\text{CH}_2-$ φαινύλιο), 6.57 (1H, $-\text{NH}-$ του δακτυλίου του NCA), 7.30–7.50 (5H, ArH του αρωματικού δακτυλίου της προστατευτικής ομάδας).



Σχήμα 4.5: Φάσμα IR (a) της πρόδρομης ένωσης H-Glu(OBzl)-OH και (b) του τελικού προϊόντος BLG NCA μετά τις ανακρυσταλλώσεις



Σχήμα 4.6: Φάσμα ^1H -NMR του BLG NCA, σε CDCl_3

4.2. Σύνθεση Γραμμικών Ομοπολυπεπτιδίων

Σε πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε η σύνθεση γραμμικών ομοπολυπεπτιδίων με χρήση αμινών ως απαρχητές ROP. Αρχικά, συντέθηκε το πολυμερές PtBMLC με σκοπό να μελετηθεί αν ο πολυμερισμός του tBMLC NCA γίνεται με ελεγχόμενο τρόπο, οδηγώντας σε καλά καθορισμένα πολυμερή με μικρή κατανομή I και MB που να συμπίπτει με το θεωρητικά υπολογιζόμενο. Επίσης, στο ίδιο ομοπολυμερές διερευνήθηκε αν πραγματοποιείται επιτυχώς η αντίδραση αποπροστασίας της S-tert-butylmercapto ομάδας για τη λήψη του ομοπολυπεπτιδίου της PCys, ώστε να εφαρμοστεί έπειτα στα συμπολυμερή που συντέθηκαν. Επίσης, συντέθηκε το ομοπολυμερές PBLG που φέρει ακραία ομάδα αλκινίου, ώστε να χρησιμοποιηθεί σε αντιδράσεις χημείας “click” για τον εμβολιασμό πολυ(βινυλαιθέρων) που φέρουν πλευρικές ομάδες αζιδίου, σε συνεργασία με την ερευνητική ομάδα του κ. Πιτσικάλη.

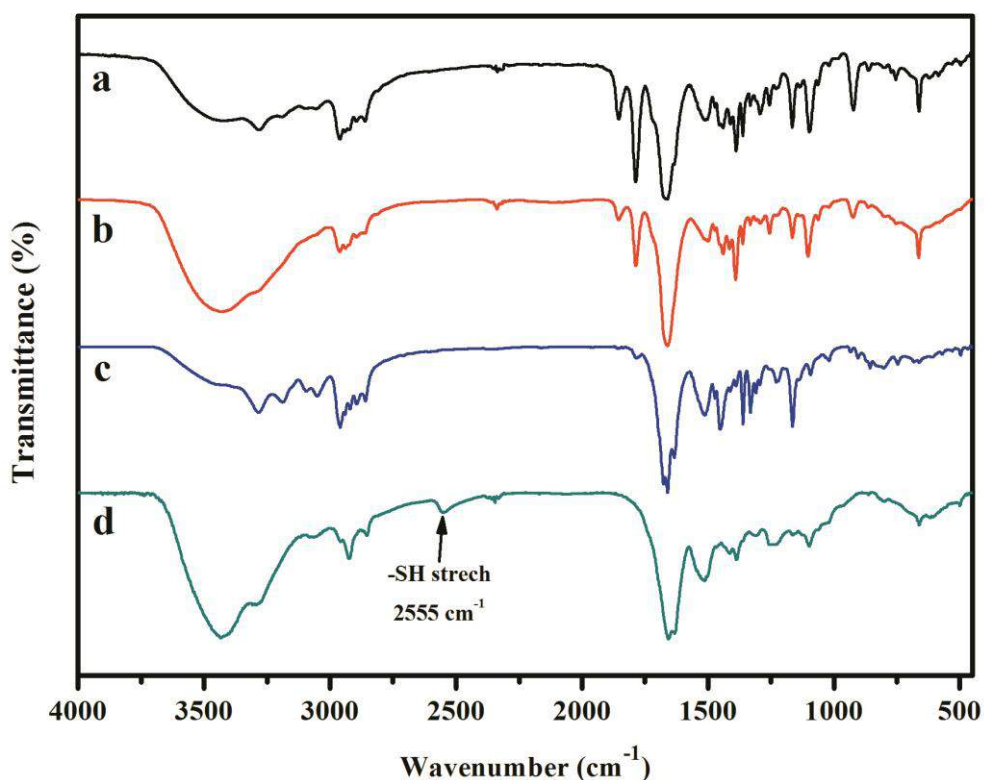
4.2.1. Σύνθεση και Αποπροστασία του Ομοπολυμερούς PtBMLC για την Σύνθεση της PCys

Ο πολυμερισμός ROP για τη σύνθεση του ομοπολυμερούς PtBMLC πραγματοποιήθηκε με χρήση DMA ως απαρχητή και διήρκησε 5 ημέρες στους 25 °C. Το θεωρητικό μοριακό βάρος του τελικού προστατευμένου πολυπεπτιδίου επιλέχθηκε να είναι ίσο με 11 kDa. Η αντίδραση πολυμερισμού παρακολουθήθηκε μέσω φασματοσκοπίας IR και ¹H-NMR. Κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού του συγκεκριμένου ομοπολυμερούς που συντέθηκε στην παρούσα εργασία, λήφθηκαν φάσματα IR, τα οποία δίνουν τη δυνατότητα, να παρακολουθηθεί η πορεία του πολυμερισμού με επιτυχία, λόγω της χαρακτηριστικής κορυφής που δίνει η δόνηση του αμιδικού δεσμού (που σχηματίζεται στα εν λόγω πολυπεπτιδικά πολυμερή).

Συγκεκριμένα, ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της σύνθεσης του πολυμερούς, λαμβάνονται φάσματα IR, όπου είναι ευδιάκριτες οι χαρακτηριστικές κορυφές που δίνουν οι δονήσεις των καρβονυλίων του N-καρβοξυ ανυδρίτη tBMLC NCA στα 1785 cm⁻¹, που αποδίδεται στο καρβονύλιο που βρίσκεται δίπλα στο άζωτο του NCA (δηλ. του C₂), και στα 1850 cm⁻¹ που αφορά, αντίστοιχα, το καρβονύλιο που βρίσκεται δίπλα από την πλευρική ομάδα του NCA (δηλ. του C₅). Επιπλέον, αρχίζει να εμφανίζεται η ταινία απορρόφησης της δόνησης του αμιδικού δεσμού των πολυμερών στα 1660 cm⁻¹, δηλαδή η δόνηση του αζώτου της μίας δομικής μονάδας που συνδέεται με το καρβονύλιο της επόμενης (Σχήμα 4.7a και 4.7b). Όσο ο πολυμερισμός προχωράει, η κορυφή του αμιδικού δεσμού γίνεται μεγαλύτερη, ενώ οι αντίστοιχες των NCAs εξαφανίζονται σταδιακά (Σχήμα 4.7c). Επιπλέον, παρατηρείται η εμφάνιση χαρακτηριστικής ταινίας απορρόφησης στην περιοχή 2830-2980 cm⁻¹, που οφείλεται στη συμμετρική και αντισυμμετρική δόνηση έκτασης του δεσμού CH₂-S και των δεσμών -CH₃

της προστατευτικής ομάδας (StBuM). Η απουσία της χαρακτηριστικής κορυφής της δόνησης έκτασης του δεσμού S–H στα 2556 cm^{-1} , σε συνδυασμό πάντα με τα αποτελέσματα από το φάσμα $^1\text{H-NMR}$, αποδεικνύει ότι η προστατευτική ομάδα των δομικών μονάδων παρέμεινε ανέπαφη καθ' όλη τη συνθετική πορεία.

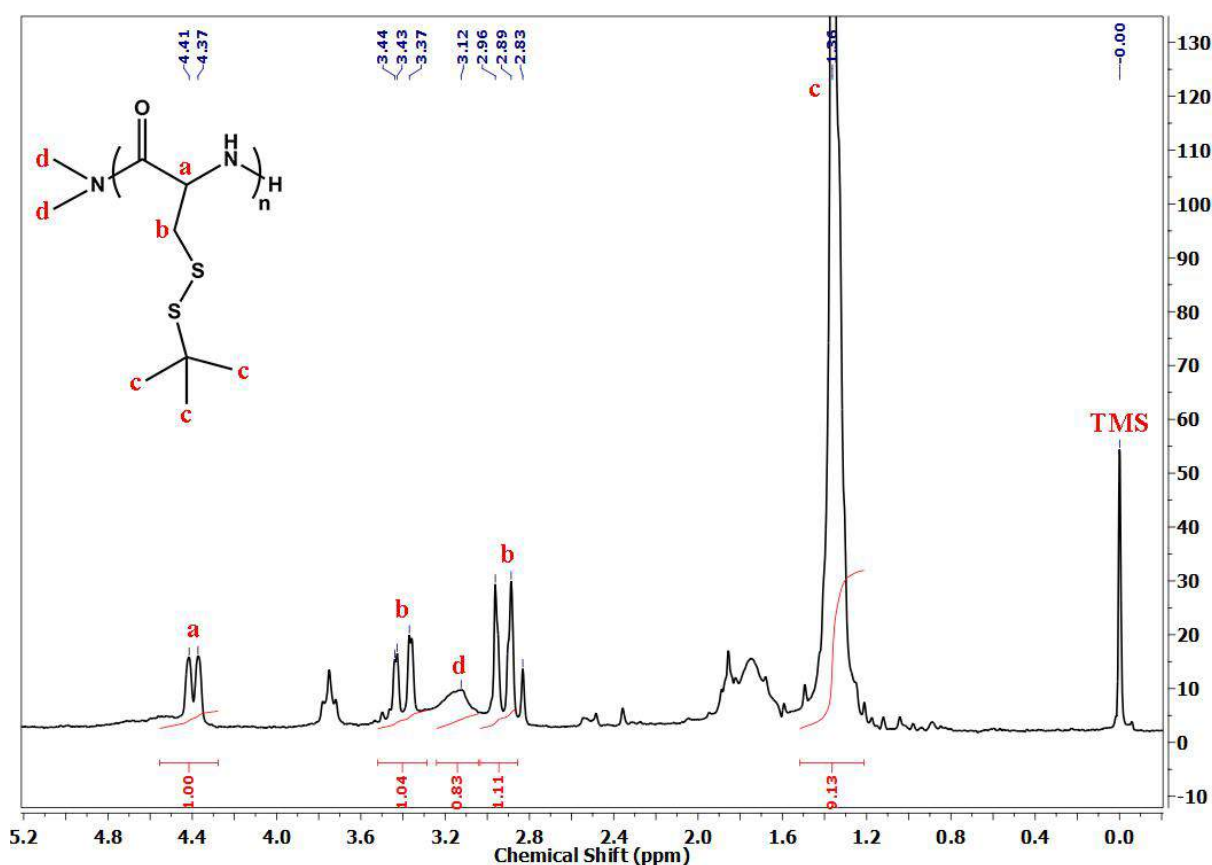
Επιπρόσθετα, η επιτυχής σύνθεση και η υψηλή καθαρότητα του προστατευμένου πολυμερούς PtBMLC επιβεβαιώνονται με λήψη φάσματος $^1\text{H-NMR}$ του ληφθέντος στερεού σε διαλύτη CDCl_3 (Σχήμα 4.8). Παρατηρείται ότι όλες οι κορυφές αποδίδονται σε υδρογόνα του πολυμερούς ή του απαρχητή, ενώ οι ολοκληρώσεις των εμβαδών τους συμπίπτουν επακριβώς με τις θεωρητικά προβλεπόμενες. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 1.36 (9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C-}$), 2.80–3.45 (2H, $-\text{CH}_2\text{-S-S-}$), 3.10–3.20 (6H, $(\text{CH}_3)_2\text{-N-}$), 4.35–4.45 (1H, $\text{NH-CH}(\text{CH}_2\text{-S-S-})\text{-C=O}$).



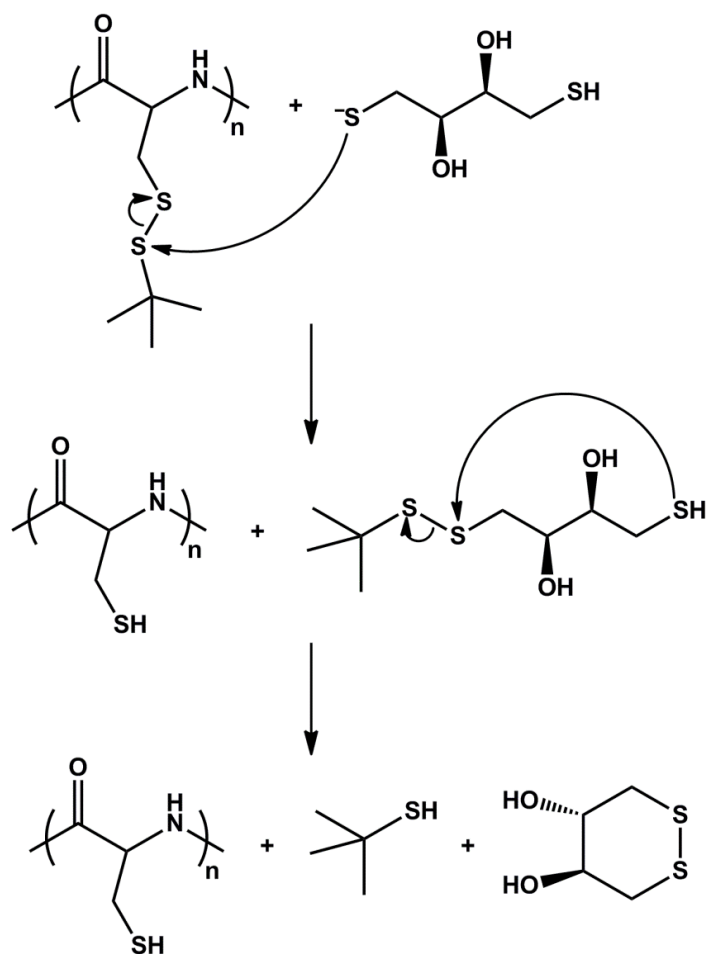
Σχήμα 4.7: Φάσμα IR (a) της σύνθεσης της PtBMLC μετά από 2 ημέρες αντίδρασης, (b) της σύνθεσης της PtBMLC μετά από 4 ημέρες αντίδρασης, (c) του τελικού προστατευμένου ομοπολυμερούς PtBMLC και (d) της PCys μετά την αντίδραση αποπροστασίας

Κατόπιν, πραγματοποιείται η αντίδραση αποπροστασίας για τη σύνθεση της PCys με χρήση DTT σε DMF για 6 ημέρες, σύμφωνα με το μηχανισμό που παρατίθεται στο Σχήμα 4.9. Το τελικό αποπροστατευμένο πολυμερές απομονώνεται μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης μέσω διήθησης και λαμβάνεται φάσμα IR, στο οποίο εμφανίζεται η χαρακτηριστική κορυφή της

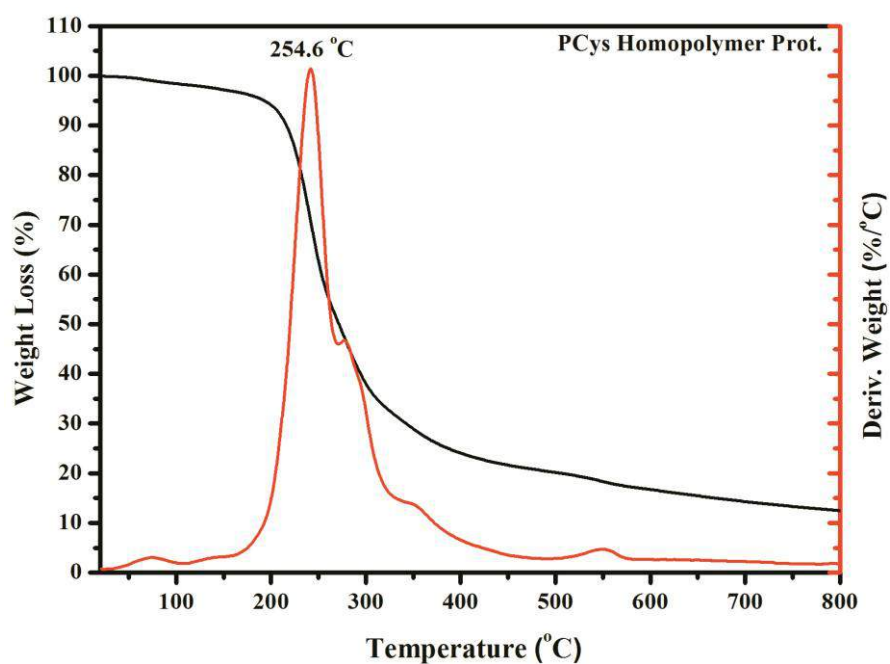
δότησης έκτασης του δεσμού S–H στα 2555 cm^{-1} (Σχήμα 4.7d), υποδηλώνοντας την επιτυχή και ποσοτική έκβαση της αντίδρασης. Επιπλέον, παρατηρείται ότι η χαρακτηριστική κορυφή των μεθυλίων της *tert*-butyl προστατευτικής ομάδας στα 1380 cm^{-1} , εξαφανίζεται μετά την αντίδραση αποπροστασίας. Πρέπει, επίσης, να αναφερθεί ότι στο συγκεκριμένο πολυμερές δεν ήταν δυνατή η λήψη χρωματογραφήματος SEC, λόγω της κακής του διαλυτότητας στους διαθέσιμους φέροντες διαλύτες αλλά και για λόγους προστασίας των στηλών. Τέλος, η θερμική αποικοδόμηση του πολυμερούς PtBMLC αναλύεται μέσω TGA, όπου παρατηρείται η ύπαρξη μίας απότομης μετάπτωσης της απώλειας βάρους στους $254.6\text{ }^{\circ}\text{C}$, που πιθανότατα οφείλεται στην διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών των πλευρικών προστατευτικών ομάδων (Σχήμα 4.10).



Σχήμα 4.8: Φάσμα ^1H -NMR του προστατευμένου πολυμερούς PtBMLC, σε CDCl_3



Σχήμα 4.9: Μηχανισμός αντίδρασης αποπροστασίας του προστατευμένου ομοπολυμερούς PtBMLC με χρήση DTT για τη λήψη της PCys



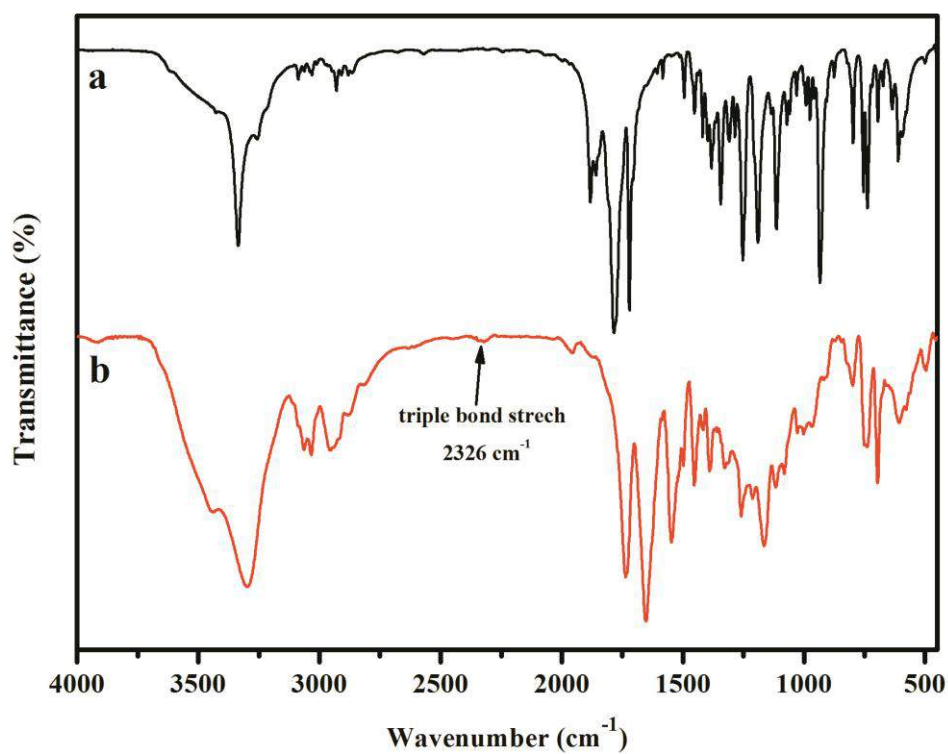
Σχήμα 4.10: Διάγραμμα TGA του προστατευμένου ομοπολυμερούς της PCys

4.2.2. Σύνθεση του Ομοπολυμερούς PBLG με Ακραία Ομάδα Αλκινίου

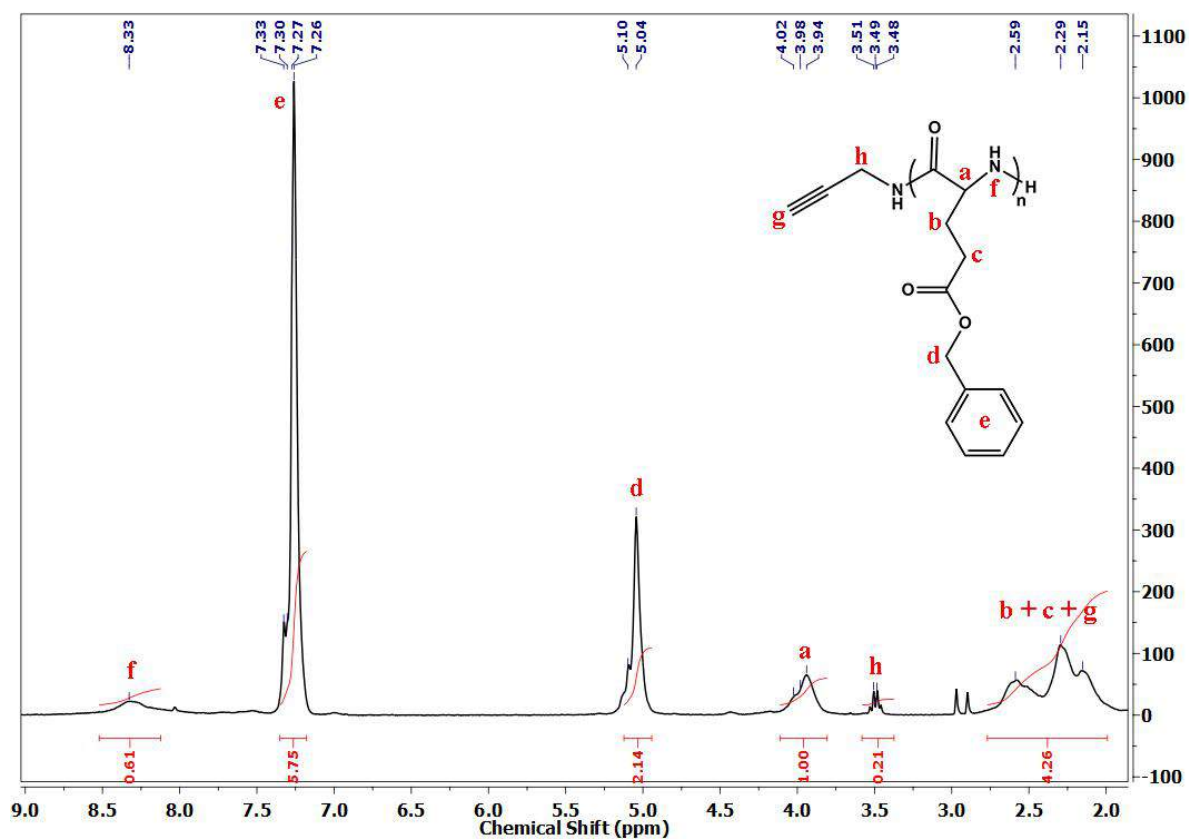
Ο πολυμερισμός ROP για τη σύνθεση του ομοπολυμερούς PBLG που φέρει ακραία ομάδα αλκινίου πραγματοποιήθηκε με χρήση PAA ως απαρχητή και διήρκεσε 2 ημέρες στους 25 °C. Το θεωρητικό μοριακό βάρος του τελικού πολυπεπτιδίου επιλέχθηκε να είναι ίσο με 5 kDa. Η αντίδραση πολυμερισμού παρακολουθήθηκε μέσω φασματοσκοπίας IR και $^1\text{H-NMR}$. Κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού του συγκεκριμένου ομοπολυμερούς που συντέθηκε στην παρούσα εργασία, λήφθηκαν φάσματα IR, τα οποία δίνουν τη δυνατότητα, να παρακολουθηθεί η πορεία του πολυμερισμού με επιτυχία, λόγω της χαρακτηριστικής κορυφής που δίνει η δόνηση του αμιδικού δεσμού (που σχηματίζεται στα εν λόγω πολυπεπτιδικά πολυμερή).

Συγκεκριμένα, ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της σύνθεσης του πολυμερούς, λαμβάνονται φάσματα IR, όπου είναι ευδιάκριτες οι χαρακτηριστικές κορυφές που δίνουν οι δονήσεις των καρβονυλίων του BLG NCA στα 1785 cm^{-1} , που αποδίδεται στο καρβονύλιο που βρίσκεται δίπλα στο άζωτο του NCA (δηλ. του C_2), και στα 1885 cm^{-1} που αφορά, αντίστοιχα, το καρβονύλιο που βρίσκεται δίπλα από την πλευρική ομάδα του NCA (δηλ. του C_5). Επιπλέον, αρχίζει να εμφανίζεται η ταινία απορρόφησης της δόνησης του αμιδικού δεσμού των πολυμερών στα 1660 cm^{-1} , δηλαδή η δόνηση του αζώτου της μίας δομικής μονάδας που συνδέεται με το καρβονύλιο της επόμενης. Όσο ο πολυμερισμός προχωράει, η κορυφή του αμιδικού δεσμού γίνεται μεγαλύτερη, ενώ οι αντίστοιχες των NCAs εξαφανίζονται σταδιακά. Στο Σχήμα 4.11 παρατίθενται τα φάσματα IR του αρχικού μονομερούς BLG NCA και του τελικού πολυμερούς PBLG, όπου διακρίνεται η χαρακτηριστική κορυφή της δόνησης του τριπλού δεσμού στα 2326 cm^{-1} . Εμφανής είναι επίσης η ποσοτική μετατροπή των κορυφών του NCA προς την αντίστοιχη κορυφή του πεπτιδικού δεσμού. Καθ' όλη τη διάρκεια της συνθετικής πορείας δεν παρατηρείται, επίσης, μεταβολή των χαρακτηριστικών κορυφών της προστατευτικής ομάδας στα 701 cm^{-1} και 751 cm^{-1} , που οφείλονται στις δονήσεις κάμψης των δεσμών $-\text{CH}=\text{CH}-$ των βενζολικών δακτυλίων.

Επιπρόσθετα, η επιτυχής σύνθεση και η υψηλή καθαρότητα του επιθυμητού ομοπολυμερούς PBLG επιβεβαιώνονται με λήψη φάσματος $^1\text{H-NMR}$ του ληφθέντος στερεού σε διαλύτη CDCl_3 (Σχήμα 4.12). Παρατηρείται ότι όλες οι κορυφές αποδίδονται σε υδρογόνα του πολυμερούς ή του απαρχητή, ενώ οι ολοκληρώσεις των εμβαδών τους συμπίπτουν επακριβώς με τις θεωρητικά προβλεπόμενες. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 2.05–2.60 (2H, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$ benzyl ester), 2.25–2.60 (2H, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$ benzyl ester), 3.48–3.51 (2H, CH_2-NH PAA), 3.94–4.02 (1H, $\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\gamma\text{-benzyl ester})$), 5.04–5.10 (2H, $\text{O}-\text{CH}_2-\text{Ar}$), 7.20–7.35 (5H, $\text{ArH C}=\text{C}-\text{H}$), 8.20–8.35 (1H, $-\text{NH}-$ του backbone του πολυμερούς, ευκίνητο).



Σχήμα 4.11: Φάσμα IR (a) του αρχικού BLG NCA και (b) του τελικού ομοπολυμερούς PBLG με ακραίο τριπλό δεσμό



Σχήμα 4.12: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του ομοπολυμερούς PBLG με ακραίο τριπλό δεσμό, σε CDCl_3

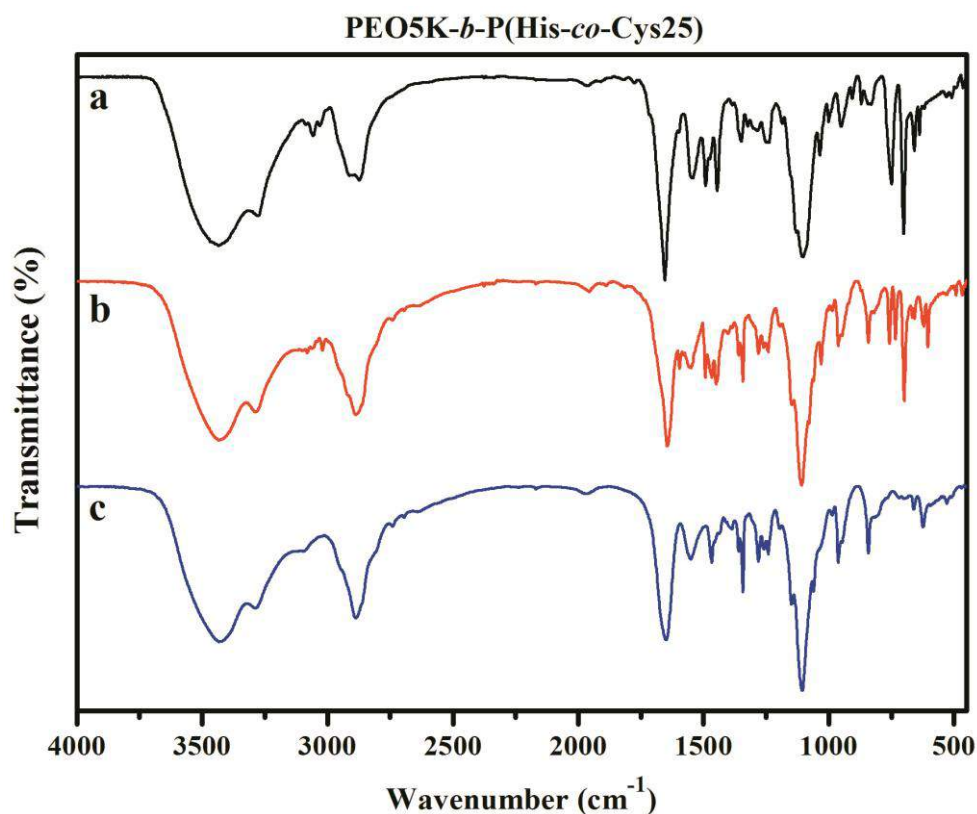
4.3. Σύνθεση και Αυτο-Οργάνωση Αποκρινόμενων Υβριδικών Συμπολυμερών PEO-*b*-P(His-co-Cys)

Ο συμπολυμερισμός ROP για τη σύνθεση των δειγμάτων της σειράς PEO-*b*-P(His-co-Cys) πραγματοποιήθηκε με χρήση του μακροαπαρχητή PEO-NH₂ με μοριακό βάρος 5 kDa ή 2 kDa και διήρκησε 6 ημέρες στους 25 °C. Το πολυπεπτιδικό τμήμα σε όλα τα δείγματα διατηρήθηκε σταθερό και ίσο με περίπου 6 kDa, ενώ το ποσοστό κατά mol της PCys (cross-linker) ως προς την PHis επιλέχθηκε να είναι 15% ή 25%. Το ποσοστό μετατροπής σε όλες τις περιπτώσεις κυμαίνεται αυστηρά μεταξύ 90-100%. Οι αντιδράσεις πολυμερισμού παρακολούθηθηκαν μέσω φασματοσκοπίας IR, ενώ ο ελεγχόμενος χαρακτήρας του πολυμερισμού επιβεβαιώθηκε μέσω των τεχνικών ¹H-NMR και SEC.

Κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού των τεσσάρων συμπολυμερών που συντέθηκαν στην παρούσα εργασία, λήφθηκαν φάσματα IR, τα οποία δίνουν τη δυνατότητα, να παρακολουθηθεί η πορεία του πολυμερισμού με επιτυχία, λόγω της χαρακτηριστικής κορυφής που δίνει η δόνηση του αμιδικού δεσμού (που σχηματίζεται στα εν λόγω πολυπεπτιδικά πολυμερή).

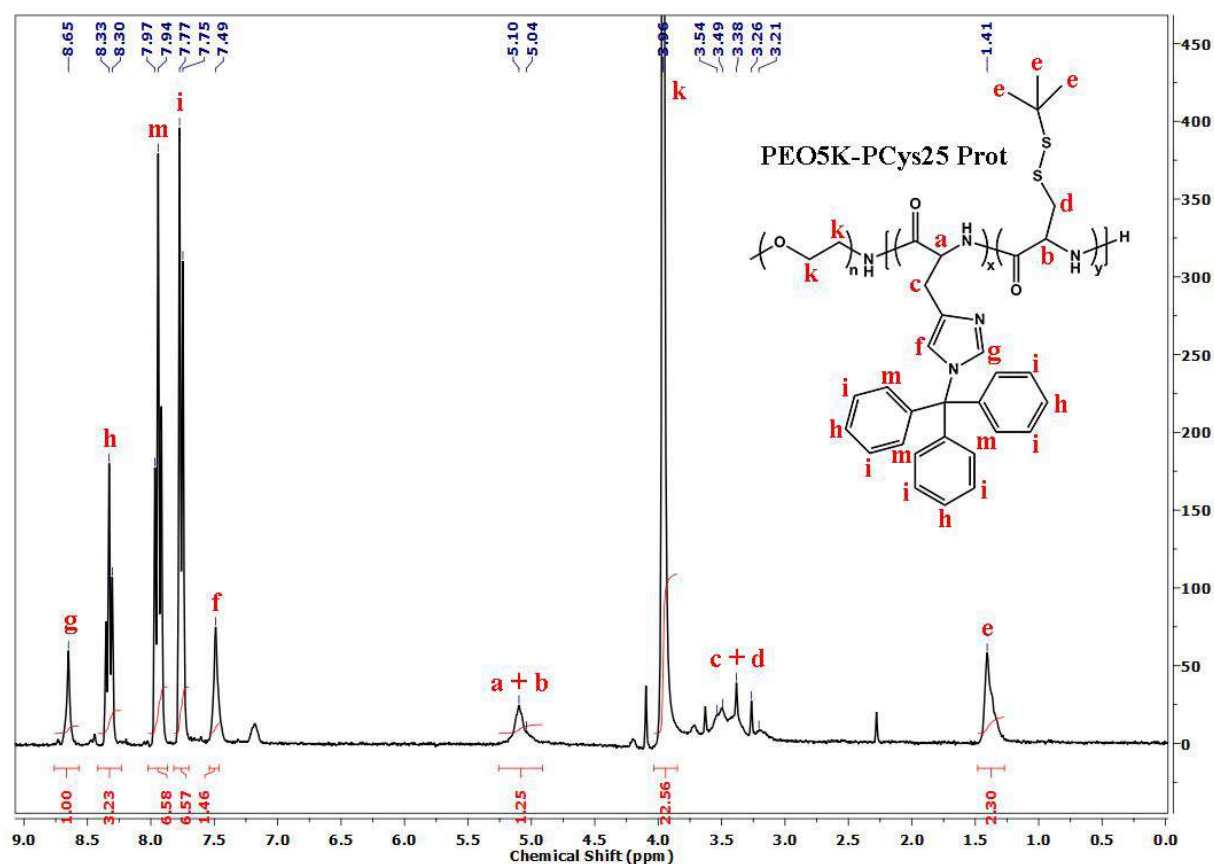
Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της σύνθεσης και των τεσσάρων κατά συστάδες συμπολυμερών, αρχικά λαμβάνονται φάσματα IR, όπου είναι ευδιάκριτες οι χαρακτηριστικές κορυφές που δίνουν οι δονήσεις των καρβονυλίων των N-καρβοξυ ανυδριτών της His και της Cys στα 1785 cm⁻¹, που αποδίδεται στο καρβονύλιο που βρίσκεται δίπλα στο άζωτο του NCA (δηλ. του C₂), και στα 1850 cm⁻¹ που αφορά, αντίστοιχα, το καρβονύλιο που βρίσκεται δίπλα από την πλευρική ομάδα του NCA (δηλ. του C₅). Επιπλέον, αρχίζει να εμφανίζεται η ταινία απορρόφησης της δόνησης του αμιδικού δεσμού των πολυμερών στα 1660 cm⁻¹, δηλαδή η δόνηση του αζώτου της μίας δομικής μονάδας που συνδέεται με το καρβονύλιο της επόμενης. Όσο ο πολυμερισμός προχωράει, η κορυφή του αμιδικού δεσμού γίνεται μεγαλύτερη, ενώ οι αντίστοιχες των NCAs εξαφανίζονται σταδιακά (Σχήμα Π1).

Άλλες χαρακτηριστικές κορυφές εμφανίζονται στα 1105 cm⁻¹ και στα 2888 cm⁻¹, όπου βρίσκεται η δόνηση του αιθερικού δεσμού C–O–C του πολυ(αιθυλενοξειδίου). Στα 675 cm⁻¹-730 cm⁻¹, εμφανίζονται κορυφές που οφείλονται στις δονήσεις των δεσμών –CH=CH–, των βενζολικών δακτυλίων των τρίτυλο- προστατευτικών ομάδων, οι οποίες λείπουν στο τελικό φάσμα των πολυμερών καθώς έχουν απομακρυνθεί με τη διαδικασία της αποπροστασίας (αντίδραση με TFA και επακόλουθη διαδικασία διαπίδυσης). Χαρακτηριστικό φάσμα IR του τελικού προστατευμένου πολυμερούς PEO5K-*b*-P(His-co-Cys25), όπου διακρίνονται οι κορυφές που προαναφέρθηκαν, δίνεται στο Σχήμα 4.13a.



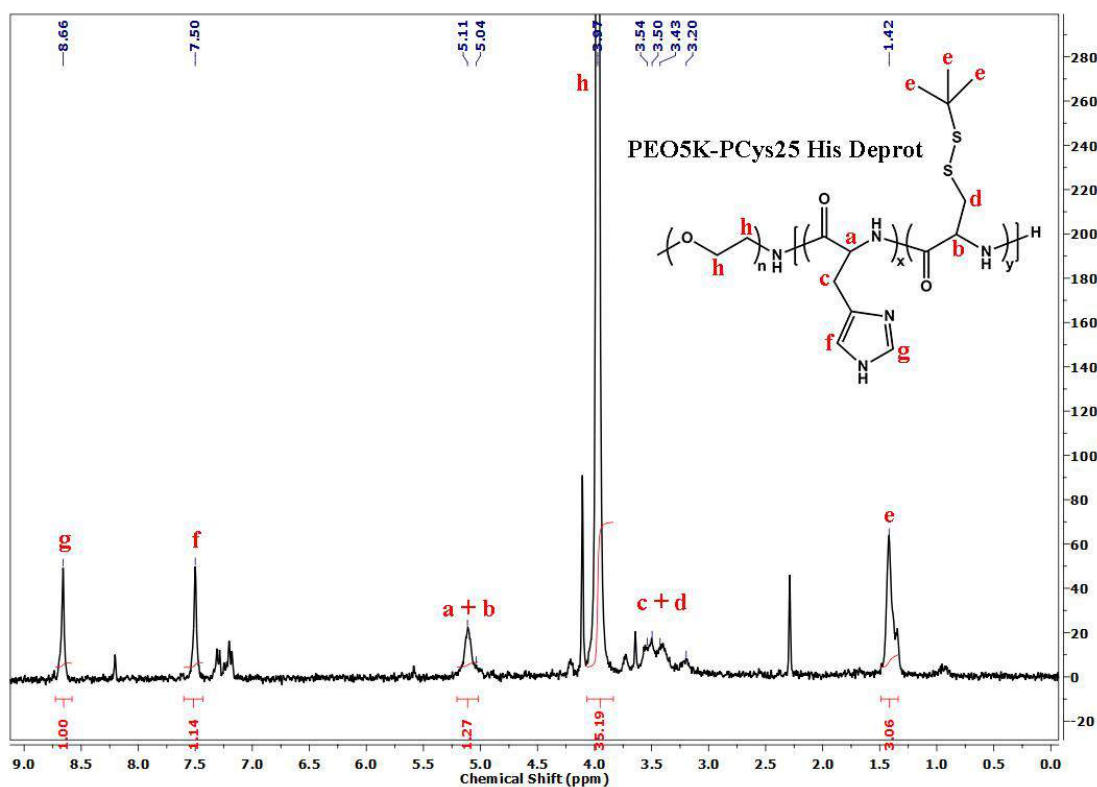
Σχήμα 4.13: Φάσμα IR (a) του πλήρως προστατευμένου πολυμερούς PEO5K-*b*-P(His-*co*-Cys25), (b) μετά την εκλεκτική αποπροστασία της PHis και (c) μετά την πλήρη αποπροστασία του

Επιπρόσθετα, η επιτυχής σύνθεση και η υψηλή καθαρότητα των υβριδικών συμπολυμερών επιβεβαιώνονται με λήψη φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ των ληφθέντων στερεών σε διαλύτη CF_3COOD (Σχήμα 4.14 και Π5-Π7). Παρατηρείται ότι όλες οι κορυφές αποδίδονται σε υδρογόνα του εκάστοτε πολυμερούς, ενώ οι ολοκληρώσεις των εμβαδών συμπίπτουν επακριβώς με τις θεωρητικά προβλεπόμενες. Στο Σχήμα 4.14 δίνεται το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του προστατευμένου πολυμερούς PEO5K-*b*-P(His-*co*-Cys25): $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CF_3COOD , δ , ppm): 1.40 (9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C-}$), 3.20–3.40 (2H, $-\text{CH}_2\text{-S-S-}$), 3.20–3.50 (2H, $-\text{CH}_2\text{-Im}$), 3.92–3.97 (4H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$), 5.00–5.10 (1H, $\text{NH-CH}(\text{CH}_2\text{-S-S-})\text{-C=O}$), 5.00–5.10 (1H, $\text{NH-CH}(\text{CH}_2\text{-Im})\text{-C=O}$), 7.50 (1H, $-\text{C=CH-N-}$), 7.70–8.30 (15H, ArH of trityl groups), 8.55–8.65 (1H, $-\text{N=CH-N-}$).

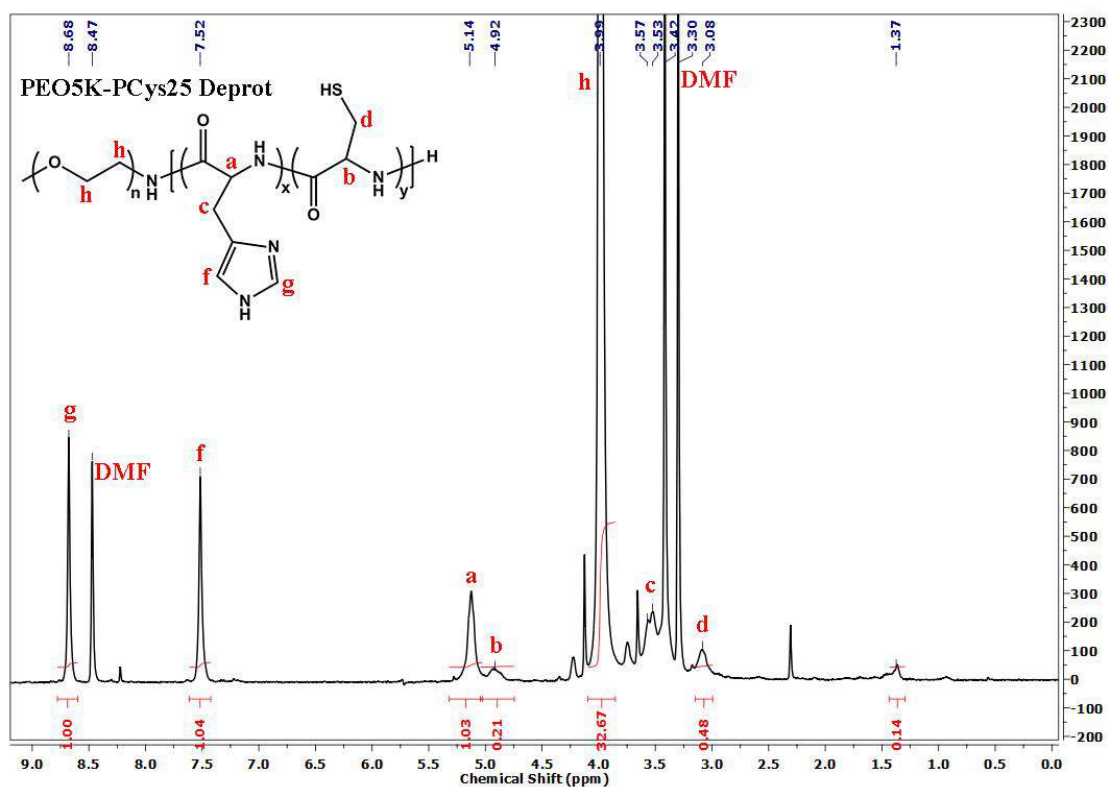


Σχήμα 4.14: Φάσμα ^1H -NMR του προστατευμένου πολυμερούς PEO5K-*b*-P(His-*co*-Cys25), σε TFA-*d*

Το επόμενο πειραματικό στάδιο περιλαμβάνει τις διαδικασίες εκλεκτικής αποπροστασίας των δομικών μονάδων PHis και PCys. Η σειρά που πρέπει να πραγματοποιηθούν οι αντιδράσεις πρέπει να ακολουθείται αυστηρά, με αυτή της PHis να προηγείται πάντα. Σε περίπτωση που συνέβαινε το αντίθετο, τότε οι ελεύθερες θειόλες που θα είχαν δημιουργηθεί κατά την αποπροστασία της PCys θα δικτυώνονταν με τυχαίο τρόπο κατά τη διαδικασία dialysis. Επιπλέον, πρέπει να τονισθεί ότι η StBuM προστατευτική ομάδα είναι σταθερή σε όξινες συνθήκες και απομακρύνεται αποκλειστικά παρουσία αναγωγικών μέσων. Οι ελεύθερες ομάδες -SH της PCys είναι δυνατό να προσδιοριστούν ποσοτικά μέσω διεξαγωγής της δοκιμασίας Ellman's με χρήση φασματοσκοπίας UV. Στα αντίστοιχα φάσματα IR των πολυμερών μετά την αποπροστασία κάθε πολυπεπτιδίου, παρατηρείται η απουσία των χαρακτηριστικών κορυφών των προστατευτικών ομάδων (Σχήμα 4.13b και 4.13c, Σχήμα Π2-Π4), ενώ η επιτυχής εκλεκτική αποπροστασία κάθε συστατικού επιβεβαιώνεται μέσω φασματοσκοπίας ^1H -NMR των ληφθέντων στερεών σε διαλύτη CF_3COOD (Σχήμα 4.15 και Σχήμα 4.16 ενδεικτικά για το πολυμερές PEO5K-*b*-P(His-*co*-Cys25)). Ειδικότερα, διακρίνεται η απουσία των χαρακτηριστικών κορυφών στην περιοχή 1.40 ppm (tBuM ομάδες) και 7.70-8.30 ppm (τρίτυλο ομάδες).

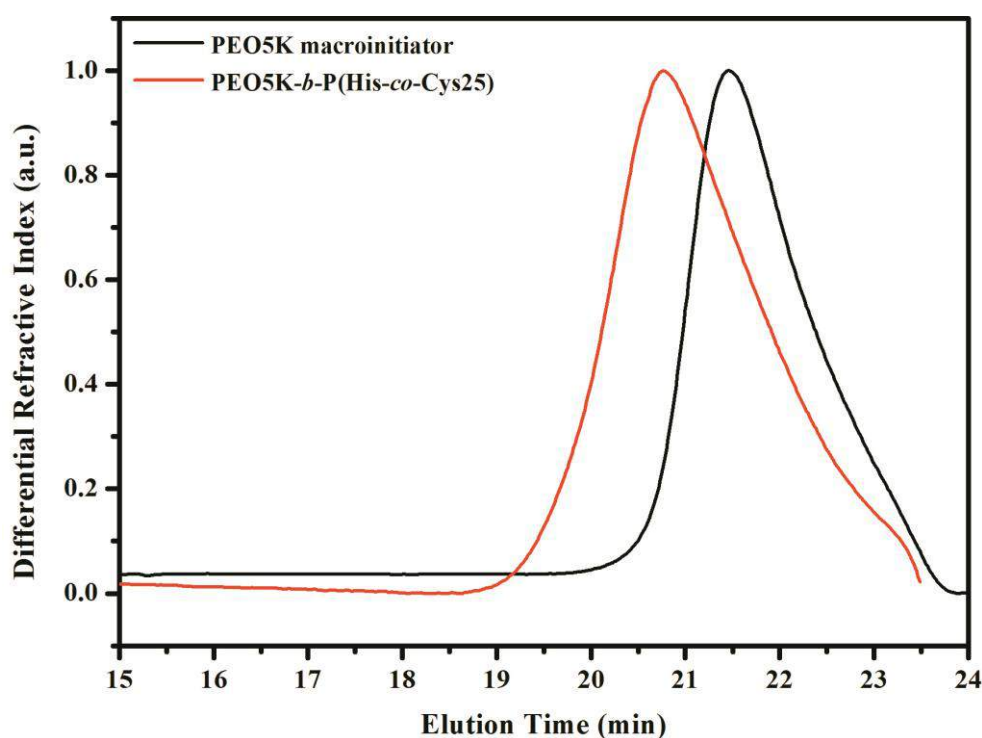


Σχήμα 4.15: Φάσμα ^1H -NMR του πολυμερούς PEO5K-*b*-P(His-co-Cys25) μετά την αποπροστασία της PHis, σε TFA-d



Σχήμα 4.16: Φάσμα ^1H -NMR του πλήρως αποπροστατευμένου πολυμερούς PEO5K-*b*-P(His-co-Cys25), σε TFA-d

Τα χρωματογραφήματα SEC των υβριδικών πολυμερών του τύπου PEO-*b*-P(His-co-Cys) που συντέθηκαν, παρατίθενται σε άμεση συσχέτιση με τα αντίστοιχα των μακροαπαρχητών που χρησιμοποιήθηκαν και φανερώνουν τον ελεγχόμενο χαρακτήρα των διαδικασιών πολυμερισμού όλων των δειγμάτων (Σχήμα 4.17, βλ. Σχήμα Π8-Π.10). Ειδικότερα, σε όλα τα δείγματα παρατηρούνται στενές κατανομές μοριακών βαρών ($I \leq 1.2$) και πειραματικά μοριακά βάρη που είναι πολύ κοντά στα θεωρητικά υπολογιζόμενα. Ενδεικτικά, δίνεται το χρωματογράφημα SEC για το δείγμα PEO5K-*b*-P(His-co-Cys25), καθώς τα αποτελέσματα των υπολοίπων πολυμερών είναι πανομοιότυπα. Είναι εμφανές ότι το μοριακό βάρος του συμπολυμερούς είναι μεγαλύτερο από αυτό του μακροαπαρχητή, καθώς η κορυφή του εμφανίζεται σε μικρότερο χρόνο έκλουσης (10.1 kDa και 5.0 kDa αντίστοιχα). Το γεγονός αυτό συνεπάγεται την επιτυχή διάδοση του πολυμερισμού για τη σύνθεση του πολυπεπτιδικού τμήματος. Ακόμα, παρατηρείται μία συμμετρική και σχετικά στενή καμπύλη ($I=1.19$) που δεν διαθέτει «ουρές» ή «ώμους», η οποία βέβαια είναι πιο ευρεία από την αντίστοιχη του μακροαπαρχητή ($I=1.08$). Οι ποσότητες των πολυμερών που παραλήφθηκαν μετά από κάθε πειραματικό στάδιο (πολυμερισμός και αντιδράσεις αποπροστασίας), όπως επίσης και τα μοριακά χαρακτηριστικά τους συνοψίζονται στον Πίνακα 4.1.



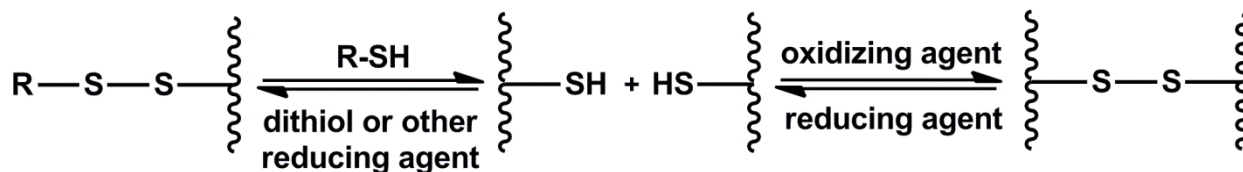
Σχήμα 4.17: Χρωματογράφημα SEC του μακροαπαρχητή PEO5K-NH₂ και του συμπολυμερούς PEO5K-*b*-P(His-co-Cys25)

Πίνακας 4.1: Ποσότητες των συμπολυμερών μετά από κάθε συνθετικό βήμα και μοριακά χαρακτηριστικά τους όπως προκύπτουν από την SEC

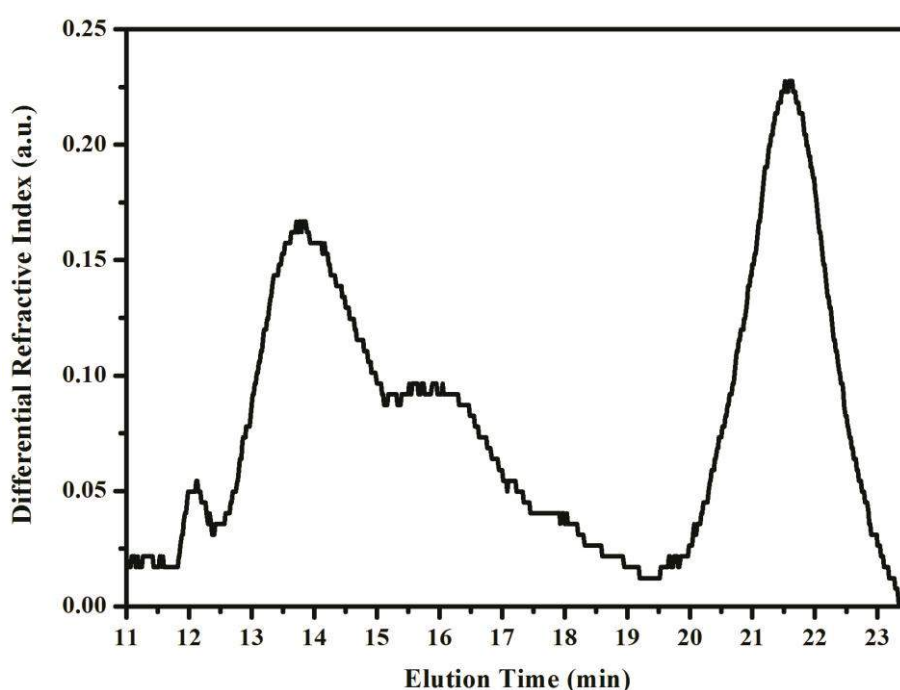
Δείγμα	g Prot.	g His Deprot.	g Full Deprot.	M _n (g/mol)	I
PEO5K- <i>b</i> -P(His-co-Cys25)	0.696	0.540	0.243	10100	1.19
PEO5K- <i>b</i> -P(His-co-Cys15)	0.713	0.575	0.261	9400	1.16
PEO2K- <i>b</i> -P(His-co-Cys25)	0.870	0.672	0.312	7400	1.20
PEO2K- <i>b</i> -P(His-co-Cys15)	1.120	0.793	0.316	7100	1.14

Η ικανότητα των υβριδικών κατά συστάδες συμπολυμερών να αυτο-οργανώνονται σε υδατικά διαλύματα και να αποκρίνονται σε αντιδραστήρια οξειδοαναγωγής μελετήθηκε εκτενώς. Πιο συγκεκριμένα, στα πολυμερή που έχει προηγηθεί η αποπροστασία των δομικών μονάδων της PCys, πραγματοποιείται δικτύωση μέσω σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών με χρήση του οξειδωτικού αντιδραστηρίου H₂O₂ για τη δημιουργία πολυμερικών νανοσωματιδίων, σύμφωνα με τις αντιδράσεις που δίνονται στο Σχήμα 4.18. Η αντίστροφη πορεία αποικοδόμησης των δομών αυτών με χρήση αναγωγικών, όπως το DTT και η GSH, είναι επίσης εφικτή. Μακροσκοπικά, ύστερα από το σχηματισμό των νανοσωματιδίων σε pH=7.4, παρατηρήθηκε ότι τα πολυμερή που έχουν PEO5K παρέμεναν σε διάλυμα για μεγάλα χρονικά διαστήματα (5 ημέρες), ενώ τα αντίστοιχα με PEO2K, λόγω του μικρότερου ποσοστού του υδρόφιλου συστατικού, εμφάνιζαν σημάδια κατακρήμνισης και σχηματισμό ιζημάτων μετά την έλευση μερικών ωρών. Όλα τα συστήματα σχημάτιζαν θολά διαλύματα σε pH=7.4, ενώ με ελάττωση του pH γίνονταν σταδιακά διαυγή. Για το λόγο αυτό ως σταθερά πολυμερικά νανοσυστήματα με βέλτιστες ιδιότητες θεωρούνται τα πρώτα δύο δείγματα (PEO5K-PCys25 και PEO5K-PCys15), ενώ τα δύο επόμενα χρησιμοποιήθηκαν σε άλλου είδους συστήματα όπως περιγράφεται παρακάτω. Χαρακτηριστικό είναι το χρωματογράφημα που δίνεται στο Σχήμα 4.19 και το οποίο λήφθηκε αμέσως μετά την δικτύωση του δείγματος PEO5K-*b*-P(His-co-Cys25). Όπως φαίνεται, υπάρχει μετατόπιση της καμπύλης σε πολύ μεγάλα μοριακά βάρη, γεγονός που αποδεικνύει τον επιτυχή σχηματισμό σταθερών υπερμοριακών δομών. Βέβαια, υπάρχει ακόμα μικρή κορυφή στον ίδιο χρόνο έκλουσης των ελεύθερων αλυσίδων του πολυμερούς, που όμως οφείλεται σε μη ποσοτική δικτύωση, λόγω του όξινου pH του φέροντος διαλύτη των στηλών SEC. Η ποιότητα

του γραφήματος δεν είναι η βέλτιστη δυνατή, διότι χρησιμοποιήθηκε διάλυμα πολύ μικρής συγκέντρωσης για λόγους προστασίας των στηλών.



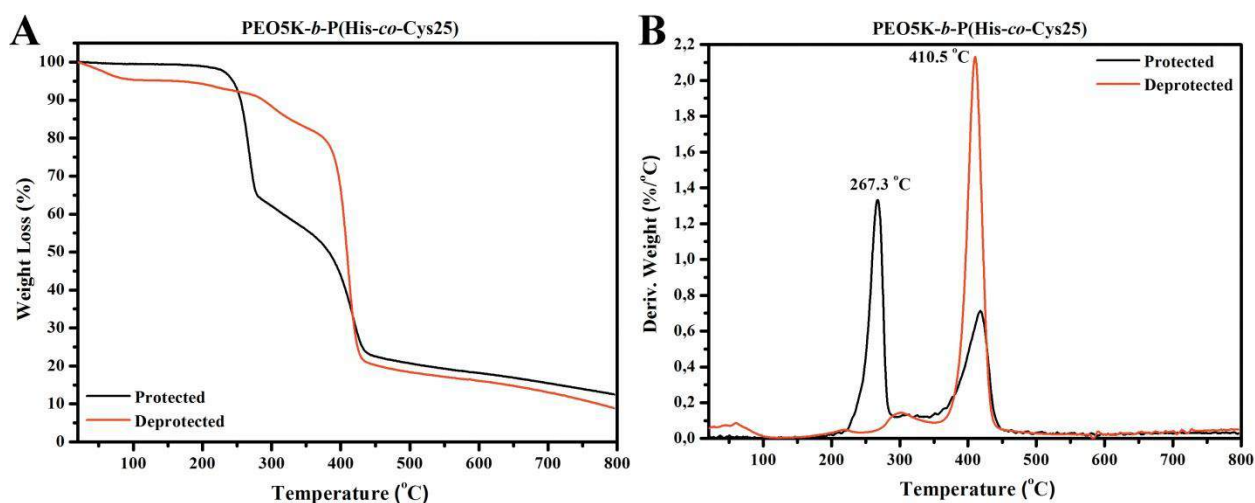
Σχήμα 4.18: Χαρακτηριστικές αντιδράσεις απόκρισης πολυπεπτιδίων που περιέχουν δισουλφιδικούς δεσμούς σε οξειδοαναγωγικά αντιδραστήρια



Σχήμα 4.19: Χρωματογράφημα SEC των νανοσωματιδίων μετά την αντίδραση δικτύωσης του PEO5K-*b*-P(His-co-Cys25) με χρήση H₂O₂

Η ανάλυση αμιγώς πολυπεπτιδικών πολυμερών μέσω της τεχνικής TGA δεν είναι ευρέως διαδεδομένη και εφαρμόζεται σπανίως βιβλιογραφικά. Παρ' όλα αυτά τα συγκεκριμένα δείγματα μελετήθηκαν μέσω θερμοσταθμικής ανάλυσης TGA, πριν και μετά την αποπροστασία του πολυπεπτιδικού τμήματος. Από τα πειραματικά αποτελέσματα που προέκυψαν και από τα τέσσερα δείγματα της σειράς, συμπεραίνεται ότι το προφίλ της θερμικής αποικοδόμησης των πολυμερών άλλαξε ριζικά ύστερα από τις αντιδράσεις αποπροστασίας (Σχήμα 4.20 και Π11-Π13). Από το ενδεικτικό διάγραμμα TGA του πολυμερούς PEO5K-*b*-P(His-co-Cys25), το οποίο παρατίθεται στο Σχήμα 4.20Α, φαίνεται ότι το πλήρως προστατευμένο πολυμερές εμφανίζει δύο

απότομες μεταπτώσεις του βάρους συναρτήσει της αύξησης της θερμοκρασίας. Το πρώτο μέγιστο στο ρυθμό αποικοδόμησης παρατηρείται στους 267.3 °C, ενώ το δεύτερο στους 410.5 °C (Σχήμα 4.20B). Αντιθέτως, στο αντίστοιχο διάγραμμα του αποπροστατευμένου πολυμερούς εμφανίζεται μόνο η μετάπτωση στους 410.5 °C, η οποία είναι χαρακτηριστική του PEO. Η έλλειψη της πρώτης μετάπτωσης, την καθιστά αποκλειστικά υπεύθυνη του πολυπεπτιδίου. Το γεγονός αυτό ίσως οφείλεται στην πλήρη απομάκρυνση των πλευρικών (αρωματικών και αλειφατικών) προστατευτικών ομάδων από την πολυπεπτιδική συστάδα, που καθιστούν έτσι παρατηρήσιμη μόνο την θερμική αποικοδόμηση των δεσμών C–O–C του backbone του PEO.

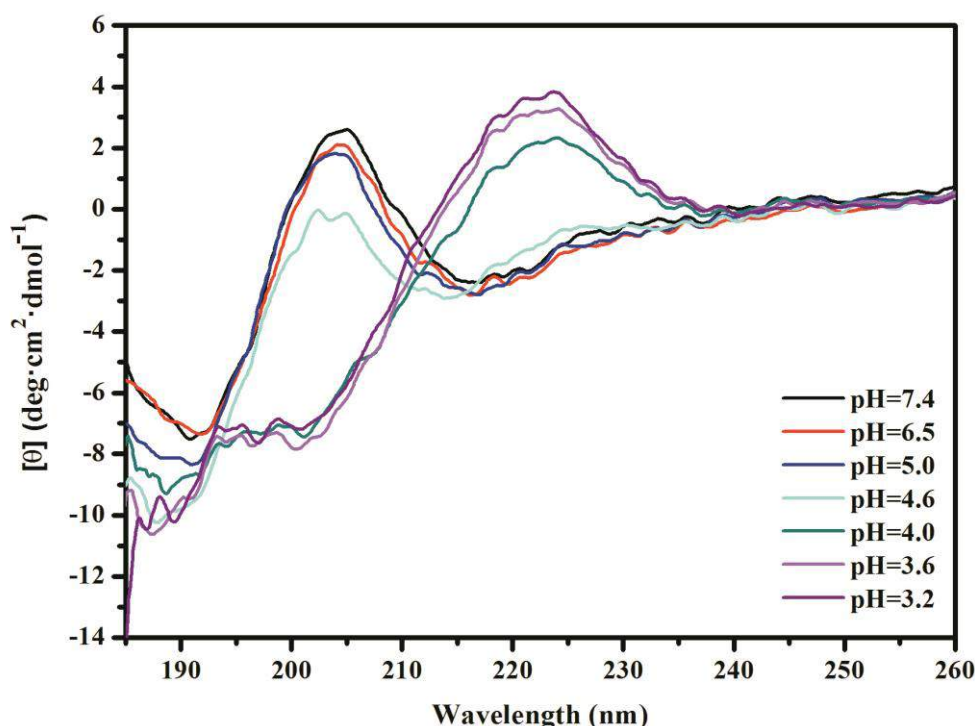


Σχήμα 4.20: Διάγραμμα TGA (A) της απώλειας βάρους του πολυμερούς PEO5K-*b*-P(His-co-Cys25) συναρτήσει της θερμοκρασίας και (B) της πρώτης παραγώγου του βάρους ως προς τη θερμοκρασία, πριν και μετά την αποπροστασία του

Η μελέτη της δευτεροταγούς δομής του δείγματος PEO5K-*b*-P(His-co-Cys25) σε διάφορες τιμές pH πραγματοποιήθηκε μέσω μετρήσεων κυκλικού διχρωϊσμού (Σχήμα 4.21). Η ρύθμιση του pH επετεύχθη ξεκινώντας από νερό Milli-Q και με επακόλουθη προσθήκη σταγόνων υδατικού διαλύματος HCl 0.1N, το οποίο μετρήθηκε με ψηφιακό πεχάμετρο, έτσι ώστε να μειώνεται σταδιακά το pH και να λαμβάνεται το αντίστοιχο φάσμα σε κάθε ενδιαμέση τιμή. Από το συγκεκριμένο φάσμα φαίνεται ότι πραγματοποιείται μετάβαση της δευτεροταγούς δομής του πολυμερούς από β -φύλλο, η οποία επικρατεί σε υψηλές τιμές pH, σε δομή τυχαίου σπειράματος όσο η τιμή του pH ελαττώνεται. Είναι εμφανές ότι σε pH>5.0 επικρατεί η διαμόρφωση του β -φύλλου, η οποία ενισχύεται όσο αυξάνεται το pH. Ειδικότερα, οι παρατηρούμενες αρνητικές κορυφές στα 217 nm και 188 nm σε συνδυασμό με τη θετική κορυφή στα 205 nm είναι χαρακτηριστικές της δομής του β -φύλλου. Σε pH<5.0, πιο συγκεκριμένα σε pH=4.6, παρατηρείται μία μεταβατική κατάσταση κατά την οποία οι δύο διαμορφώσεις συνυπάρχουν,

ενώ σε ακόμα χαμηλότερες τιμές ($\text{pH} \leq 4.0$) επικρατεί πλέον αποκλειστικά η δομή του τυχαίου σπειράματος.

Σε $\text{pH}=7.4$ οι δομικές μονάδες της πολυ(L-ιστιδίνης) είναι αποπρωτονιωμένες και άρα είναι ακόμα υδρόφοβες, όσο όμως το pH ελαττώνεται, η PHis πρωτονιώνεται χάνοντας σταδιακά τον υδρόφοβο χαρακτήρα της. Η πρωτονίωση αυτή δημιουργεί απωστικές δυνάμεις μεταξύ των αλυσίδων, αποτρέποντας έτσι την οργάνωση σε β -φύλλο. Συγκρίνοντας το φάσμα που λήφθηκε με το αντίστοιχο του «τυφλού» πολυμερούς PEO-*b*-PHis από παλαιότερη μελέτη, φαίνεται ότι οι δομικές μονάδες της PCys δεν επηρέασαν σημαντικά τη δευτεροταγή δομή του πολυμερούς. Παρ' όλα αυτά, η μετάβαση από τη μία δευτεροταγή δομή στην άλλη σε αυτό το πολυμερές, παρατηρήθηκε σε $\text{pH}=5.7$. Η διαφορά αυτή ανάμεσα στα δύο πολυμερή, οφείλεται στην παρουσία υδρόφοβων μονάδων PCys στις αλυσίδες της PHis, που αναγκάζει την μετάβαση να πραγματοποιείται σε μικρότερη τιμή pH . Λόγω του συγκεκριμένου αποτελέσματος, αναμένεται ο δικτυωμένος πυρήνας των νανοσωματιδίων να μην διογκώνεται σημαντικά στους εξωκυττάτριους χώρους, παρά μόνο ενδοκυτταρικά. Αντίστοιχα φάσματα της ίδιας μορφής αναμένονται και για τα υπόλοιπα τρία δείγματα από την σειρά συμπολυμερών που συντέθηκαν και για το λόγο αυτό παραλείπονται.



Σχήμα 4.21: Φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού (CD) του PEO5K-*b*-P(His-co-Cys25) συναρτήσεως του pH

Το ζ-δυναμικό είναι μία ακόμα σημαντική παράμετρος που μπορεί να δώσει χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με τη δομή των νανοσωματιδίων. Ουσιαστικά, το ζ-δυναμικό σχετίζεται με

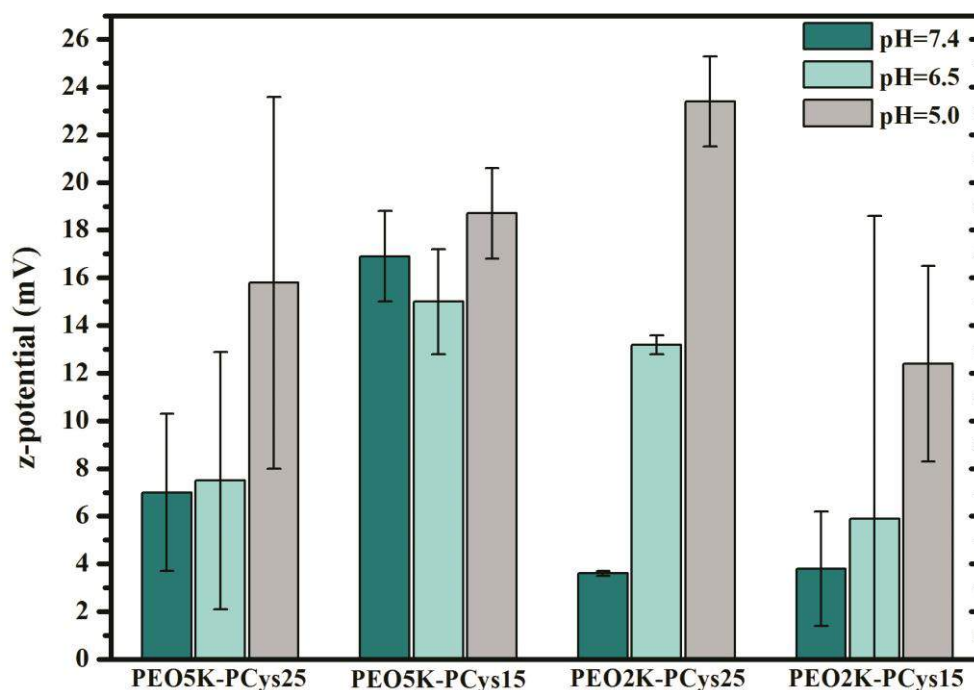
το επιφανειακό φορτίο που έχουν τα πολυμερικά νανοσωματίδια. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, το επιφανειακό φορτίο των πολυμερών επηρεάζει άμεσα τις αλληλεπιδράσεις τους με τα συστατικά του αίματος, εφόσον τα νανοσυστήματα αυτά προορίζονται για στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων. Το ουδέτερο φορτίο (~ 0 mV) εξασφαλίζει την αποφυγή της ενεργοποίησης των μακροφάγων του ανθρώπινου οργανισμού, αποτρέποντας έτσι την επίθεση τους στα νανοσωματίδια, καθώς αυτά καθίστανται «αόρατα».

Παρατηρώντας τις τιμές ζ-δυναμικού για όλα τα δείγματα σε pH=7.4, συμπεραίνεται ότι ισχύει ο αρχικός σχεδιασμός που αναφέρθηκε παραπάνω, καθώς είναι ελαφρώς θετικές και κυμαίνονται σε τιμές παραπλήσιες των 0 mV (έως +10 mV) (Πίνακας 4.2). Μικρή απόκλιση από τα υπόλοιπα δείγματα εμφανίζει το PEO5K-PCys15 ($+16.8 \pm 1.9$ mV), η τιμή του οποίου παρ' αυτά παραμένει εντός των αποδεκτών ορίων. Αποδεικνύεται, λοιπόν, ότι οι υδρόφιλες συστάδες του PEO, σχηματίζουν ένα «κέλυφος» γύρω από το δικτυωμένο πυρήνα των μικυλλιακών δομών. Σε αντίθετη περίπτωση η ύπαρξη φορτίων λόγω της PHis, θα οδηγούσε σε αρκετά θετικότερες τιμές του ζ-δυναμικού. Το γεγονός ότι τα δείγματα με PEO2K έχουν μικρότερες τιμές ζ-δυναμικού από τα αντίστοιχα δείγματα με PEO5K, πιθανώς να οφείλεται στην πιο συμπαγή διευσθέτηση και οργάνωση των αλυσίδων.

Πίνακας 4.2: Πειραματικά αποτελέσματα της ανάλυσης ζ-δυναμικού των δομών που προκύπτουν από την αυτο-οργάνωση και δικτύωση των πολυμερών PEO-*b*-P(His-co-Cys)

Δείγμα	pH	Zeta (mV)	+/-	KCps	Mob.	Width
PEO5K- <i>b</i> -P(His-co-Cys25)	7.4	7.0	3.3	41.2	0.548	21.2
	6.5	7.5	5.4	318.2	0.590	15.7
	5.0	15.8	7.8	57.6	1.242	19.0
PEO5K- <i>b</i> -P(His-co-Cys15)	7.4	16.8	1.9	393.6	1.490	7.6
	6.5	15.0	2.2	319.0	0.545	17.7
	5.0	18.7	1.9	136.0	0.982	20.6
PEO2K- <i>b</i> -P(His-co-Cys25)	7.4	3.6	0.1	304.6	0.286	18.3
	6.5	13.2	0.4	93.7	1.037	16.3
	5.0	23.4	1.9	476.1	1.838	7.7
PEO2K- <i>b</i> -P(His-co-Cys15)	7.4	3.8	2.4	58.5	0.300	16.0
	6.5	5.9	12.7	177.3	0.465	18.5
	5.0	12.4	4.1	184.7	0.971	10.3

Η παρατηρούμενη αύξηση του ζ-δυναμικού όσο το pH ελαττώνεται κάνει εμφανή την pH-εξαρτώμενη φύση όλων των δομών (Σχήμα 4.22). Πιο συγκεκριμένα, αυτή η αύξηση αποδίδεται κυρίως στην διόγκωση που υφίστανται τα δικτυωμένα νανοσωματίδια, λόγω της σταδιακής πρωτονίωσης της PHis καθώς το pH μειώνεται από 7.4 σε 6.5 και έπειτα σε 5.0. Η πιθανή ύπαρξη μικρών μη δικτυωμένων τμημάτων των πολυπεπτιδικών συστάδων ανάμεσα στις εξωτερικές αλυσίδες του PEO, ίσως ενισχύει την αύξηση του ζ-δυναμικού σε θετικότερες τιμές.

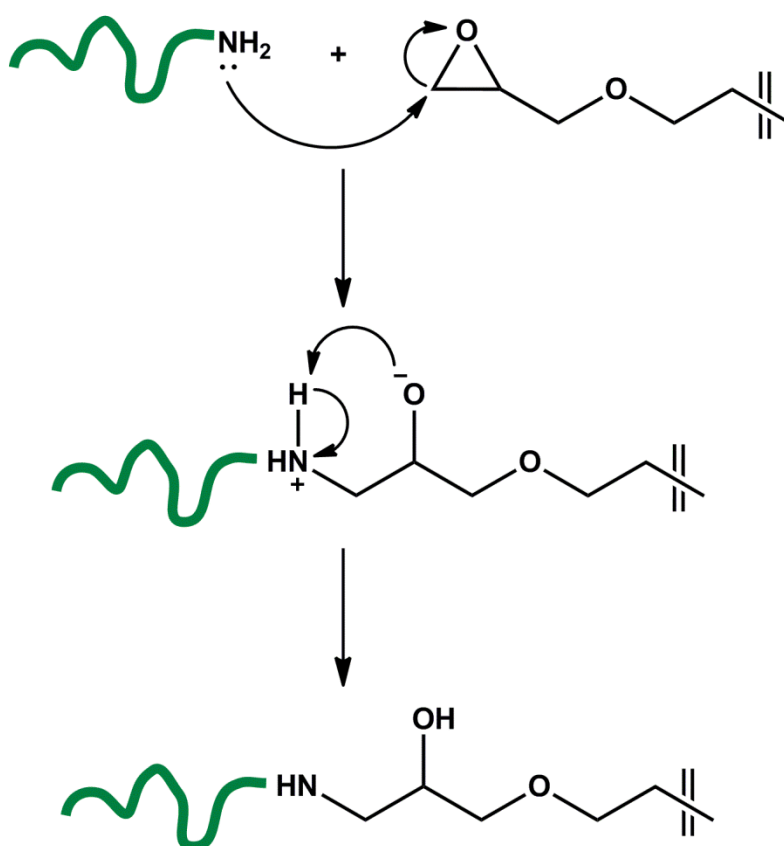


Σχήμα 4.22: Μετρήσεις ζ-δυναμικού των ναμοδομών που σχηματίστηκαν από τα αντίστοιχα υβριδικά συμπολυμερή του τύπου PEO-*b*-P(His-co-Cys), συναρτήσει της μεταβολής του pH

4.4. Σύνθεση MSNs και Εμβολιασμός τους με Πολυπεπτιδικά Πολυμερή

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε σύνθεση των mesoporous silica nanoparticles (MSNs) μέσω διαδοχικών αντιδράσεων συμπύκνωσης κάτω από βασικές συνθήκες και έπειτα τροποποιήθηκε η επιφάνεια των νανοσωματιδίων με εποξειδικούς δακτυλίους (MSN@GPTMS), σύμφωνα με πρότυπες βιβλιογραφικές αναφορές. Πριν την τροποποίηση, προηγείται υποχρεωτικά η απομάκρυνση της επιφανειοδραστικής μήτρας του CTAB χρησιμοποιώντας μείγμα MeOH/HCl ώστε να δημιουργηθούν οι νανοπόροι του υλικού, αποτρέποντας έτσι την πιθανή διάνοιξη των δακτυλίων κάτω από τις συγκεκριμένες όξινες συνθήκες. Μία μικρή ποσότητα μη τροποποιημένων MSNs απομονώθηκε για περαιτέρω χαρακτηρισμό.

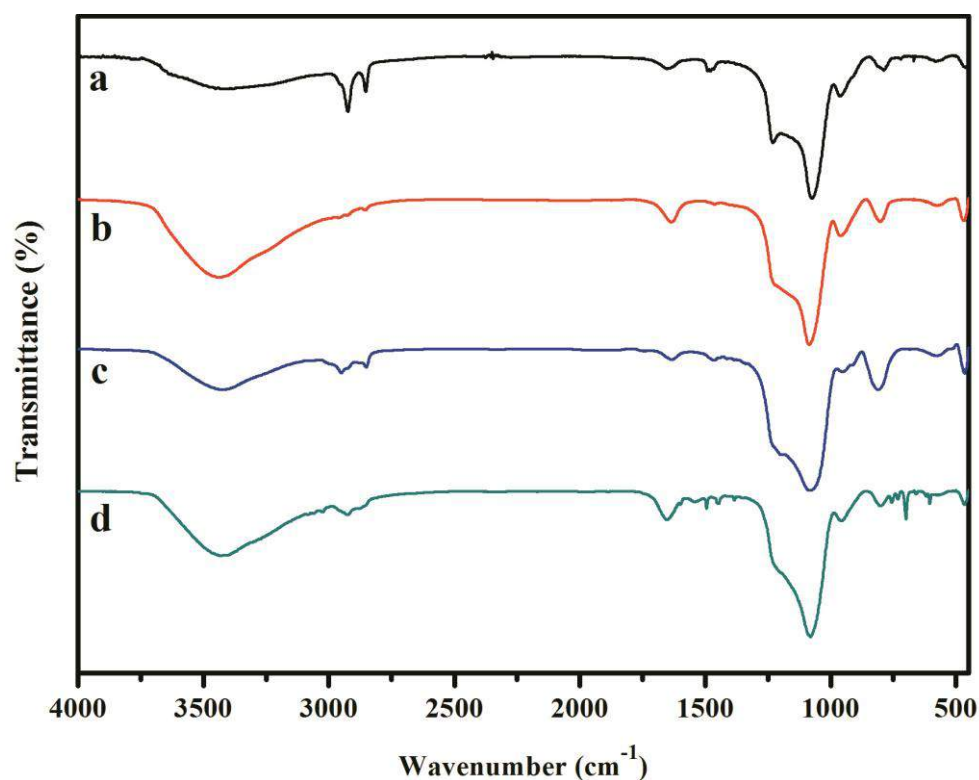
Τα τελικά νανοσωματίδια πυριτίας που φέρουν εποξειδικούς δακτυλίους εμβολιάστηκαν επιτυχώς με το προστατευμένο πολυμερές PEO2K-*b*-P(Trt-His-*co*-tBMLC25), που συντέθηκε στην παρούσα εργασία, όπως αποδεικνύεται από τα αποτελέσματα μοριακού χαρακτηρισμού των ληφθέντων νανοςύνθετων υλικών. Το πολυμερές αυτό επιλέχθηκε έναντι των υπολοίπων διότι συνδυάζει το υψηλό ποσοστό του cross-linker με το μικρό μοριακό βάρος του PEO, γεγονός που δεν θα οδηγεί σε μεγάλη αύξηση του μεγέθους των τελικών νανοςύνθετων. Η αντίδραση «εμβολιασμού σε» διεξάγεται όσο ακόμα το πολυπεπτιδικό τμήμα είναι πλήρως προστατευμένο για την αποφυγή παράπλευρων αντιδράσεων (π.χ. αντίδραση μεταξύ των εποξειδικών δακτυλίων και των ελευθέρων ομάδων -SH της PCys), ενώ ακολούθως πραγματοποιούνται κατά σειρά οι αντιδράσεις αποπροστασίας των δομικών μονάδων της PHis και της PCys για να ληφθεί το τελικό δείγμα MSN@(PEO2K-PCys25). Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιείται πυρηνόφιλη αντίδραση διάνοιξης του εποξειδικού δακτυλίου από την ακραία αμινομάδα του συμπολυμερούς, σύμφωνα με το μηχανισμό που δίνεται στο Σχήμα 4.23.



Σχήμα 4.23: Μηχανισμός αντίδρασης πυρηνόφιλης προσβολής μεταξύ των εποξειδικών δακτυλίων των MSNs και της ακραίας αμινομάδας του πολυμερούς

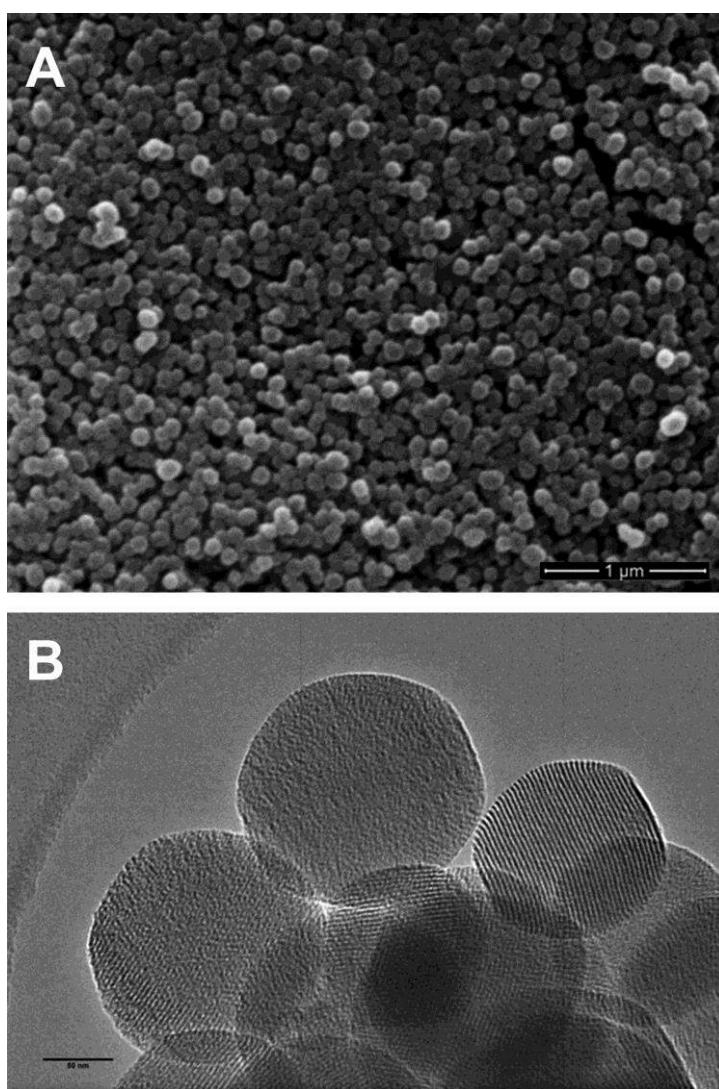
Όλη η συνθετική πορεία για τη λήψη των MSN@(PEO2K-PCys25) παρακολουθήθηκε μέσω φασματοσκοπίας FT-IR (Σχήμα 4.24). Τα φάσματα IR των αρχικών MSNs πριν και μετά

την εκδίωξη του CTAB παρατίθενται στο Σχήμα 4.24a και 4.24b αντίστοιχα. Και στις δύο περιπτώσεις, οι κορυφές στα 802, 960 και 1076-1230 cm^{-1} αποδίδονται στις δονήσεις έκτασης των δεσμών Si-O, Si-OH και Si-O-Si, αντίστοιχα. Η μόνη διαφορά παρατηρείται στην εξαφάνιση των ταινιών απορρόφησης στα 2853 και 2926 cm^{-1} ύστερα από την απομάκρυνση του CTAB (ομάδες $-\text{CH}_2$). Η επιτυχής εισαγωγή των εποξειδικών δακτυλίων στην επιφάνεια των MSNs μέσω του αντιδραστηρίου GPTMS αποδεικνύεται από την επανεμφάνιση κορυφών διαφορετικής μορφής στην περιοχή 2850-2950 cm^{-1} που αποτελούν ένδειξη της ύπαρξης οργανικών ομάδων στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων, αλλά και από την εμφάνιση των χαρακτηριστικών κορυφών του εποξειδικού δακτυλίου στα 913 και 1220 cm^{-1} (Σχήμα 4.24c). Ο εμβολιασμός των πολυμερικών αλυσίδων φαίνεται στο Σχήμα 4.24d, όπου είναι εμφανής η ενίσχυση της κορυφής στα 1652 cm^{-1} που αποδίδεται στην χαρακτηριστική ταινία του αμιδικού δεσμού, ενώ παράλληλα εξαφανίζονται οι χαρακτηριστικές κορυφές των εποξειδικών δακτυλίων. Ακόμα, στο ίδιο φάσμα παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές κορυφές των προστατευτικών ομάδων της PHis στα 701 cm^{-1} και 751 cm^{-1} , που οφείλονται στις δονήσεις των δεσμών $-\text{CH}=\text{CH}-$ των βενζολικών δακτυλίων.



Σχήμα 4.24: Φάσμα IR των MSNs (a) πριν την εκδίωξη του CTAB, (b) μετά την εκδίωξη του CTAB, (c) μετά την τροποποίηση της επιφάνειάς τους με εποξειδικούς δακτυλίους (MSN@GPTMS) και (d) μετά τον εμβολιασμό τους με το πολυμερές PEO2K-*b*-P(His-co-PCys25)

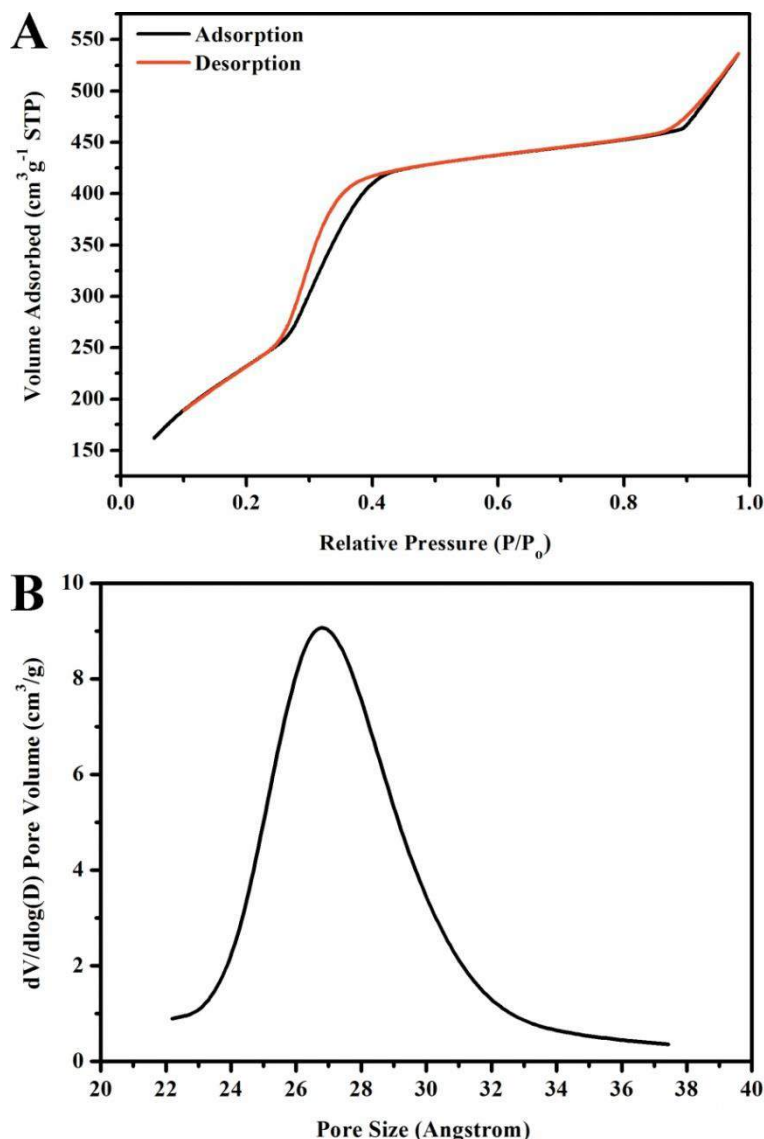
Η μορφολογία, το μέγεθος και η μέση διάμετρος των πόρων των μη εμβολιασμένων MSNs μελετήθηκε μέσω των τεχνικών ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM), ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης (TEM) και ποροσιμετρίας μέσω προσρόφησης αερίου N₂. Όπως παρατηρείται από την Εικόνα 4.1Α, τα MSNs που παρασκευάστηκαν διαθέτουν σφαιρικό σχήμα και χαρακτηρίζονται από υψηλή ομοιογένεια, καλή διασπορά και ομοιόμορφη κατανομή μεγεθών. Επιπλέον, από την Εικόνα 4.1Β του ίδιου δείγματος, γίνεται εμφανής η άριστα διατεταγμένη μεσοπορώδης δομή του υλικού και η στενή κατανομή μεγέθους των νανοπόρων. Συνδυάζοντας τις παρατηρήσεις και από τις δύο εικόνες, συμπεραίνεται ότι το μέγεθος των νανοσωματιδίων κυμαίνεται σε ένα στενό εύρος μεταξύ 110-130 nm.



Εικόνα 4.1: (Α) Εικόνα SEM των μη τροποποιημένων MSNs και (Β) εικόνα TEM των μη τροποποιημένων MSNs (η γραμμή κλίμακας αντιστοιχεί σε 50 nm)

Οι μετρήσεις ποροσιμετρίας των MSNs με χρήση αερίου N₂ έδειξαν μία ισόθερμη καμπύλη προσρόφησης-εκρόφησης τύπου IV, με μία μετάπτωση στην περιοχή χαμηλών τιμών

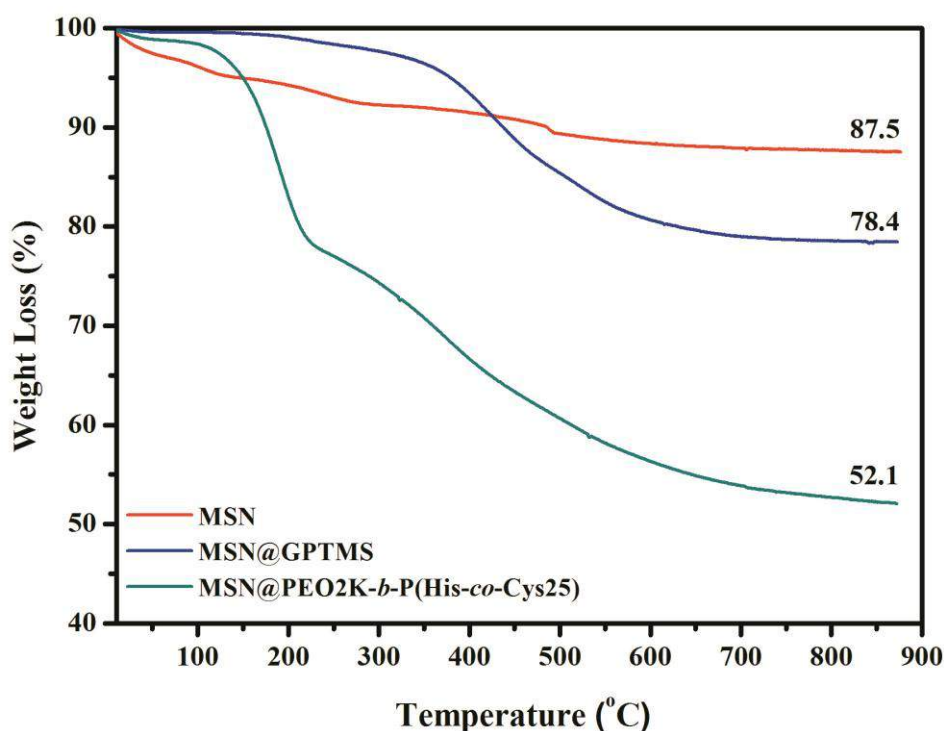
σχετικής πίεσης, η οποία είναι χαρακτηριστική για τα μεσοπορώδη υλικά (Σχήμα 4.25A). Το βήμα αυτό σε συνδυασμό με τη διαβάθμιση υστέρησης τύπου-H1 που παρατηρείται στην καμπύλη εκρόφησης στην περιοχή 0.3-0.4 P/P_0 , είναι ενδεικτικά της κυλινδρικής αρχιτεκτονικής των πόρων. Μέσω της εφαρμογής των εξισώσεων BET και BJH, προσδιορίστηκε το εμβαδόν της επιφάνειας και το μέγεθος των πόρων των νανοσωματιδίων. Η ειδική επιφανειακή έκταση είναι ίση με $817 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, ενώ ο όγκος των πόρων βρέθηκε ίσος με $0.8 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ με μέση διάμετρο 2.8 nm (Σχήμα 4.25B).



Σχήμα 4.25: (A) Ισόθερμες καμπύλες προσρόφησης-εκρόφησης αερίου N_2 των MSNs και (B) προσδιορισμός της κατανομής μεγέθους των πόρων

Η τροποποίηση και ο επιτυχής εμβολιασμός των νανοσωματιδίων MSN@GPTMS με το υβριδικό πολυμερές που επιλέχθηκε για αυτό το σκοπό, επιβεβαιώθηκαν επιπρόσθετα μέσω ανάλυσης TGA υπό ατμόσφαιρα αζώτου (Σχήμα 4.26). Από τις καμπύλες TGA των δειγμάτων

συναρτήσει της θερμοκρασίας, φαίνεται ότι η απώλεια βάρους αυξάνεται μετά από κάθε συνθετικό βήμα. Ειδικότερα, η απώλεια βάρους που σημειώθηκε κατά την καύση του μη τροποποιημένου δείγματος των MSNs ήταν μόλις 12.5% και οφείλεται κυρίως στην αποικοδόμηση των επιφανειακών ομάδων Si-OH. Η εισαγωγή των εποξειδικών δακτυλίων οδηγεί και σε αύξηση του ποσοστού απώλειας βάρους (21.6%), με την παρατηρούμενη διαφορά να οφείλεται στην ύπαρξη επιπλέον οργανικών ομάδων στην επιφάνεια των MSNs. Έπειτα από την αντίδραση «εμβολιασμού σε» παρατηρείται μία σταδιακή μείωση του βάρους που οφείλεται αποκλειστικά στις αλυσίδες του υβριδικού πολυπεπτιδίου (47.9%). Συνεπώς, εύκολα υπολογίζεται ότι το ποσοστό του πολυμερούς ως προς το ανόργανο τμήμα του υλικού είναι 26.3%, το οποίο είναι εξαιρετικά ικανοποιητικό για μία τέτοια πειραματική προσέγγιση. Στην καμπύλη του τελικού δείγματος παρατηρείται μία απότομη μετάβαση της απώλειας βάρους μεταξύ 112 °C και 225 °C, που αποδίδεται κυρίως στην καύση του πολυπεπτιδικού τμήματος των αλυσίδων.



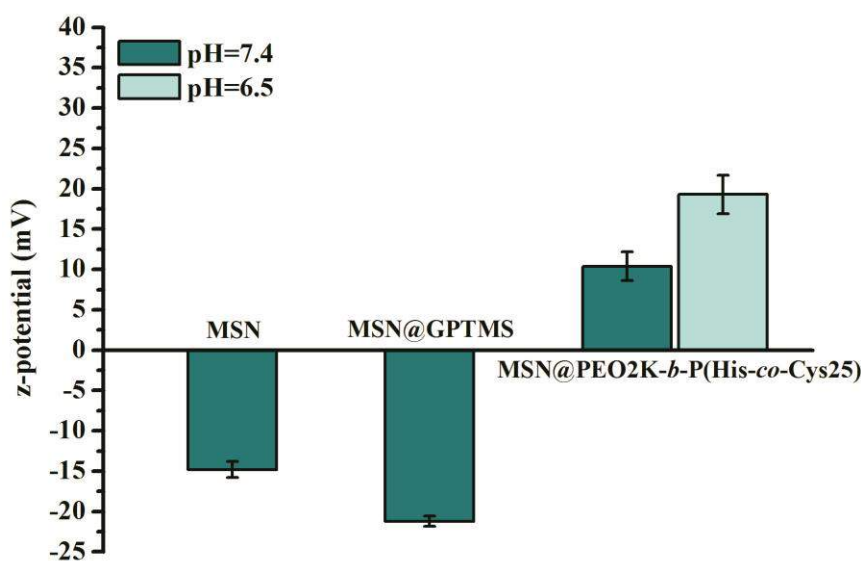
Σχήμα 4.26: Καμπύλες απώλειας βάρους των δειγμάτων MSN, MSN@GPTMS και MSN@PEO2K-*b*-P(His-co-Cys25) συναρτήσει της θερμοκρασίας

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση ζ-δυναμικού ως συμπληρωματική μέθοδος χαρακτηρισμού των νανοσωματιδίων που απομονώθηκαν (Σχήμα 4.27). Τα πειραματικά αποτελέσματα που λήφθηκαν από τη συγκεκριμένη τεχνική συνοψίζονται στον Πίνακα 4.3. Όπως φαίνεται, η τιμή του ζ-δυναμικού μειώθηκε σημαντικά κατά την εισαγωγή των

εποξειδικών δακτυλίων στην επιφάνεια των MSNs. Για ακρίβεια, από -14.8 ± 1.0 mV για τα μη τροποποιημένα MSNs μεταβλήθηκε σε πιο αρνητική τιμή των -21.2 ± 0.6 mV για το δείγμα MSN@GPTMS (σε pH=7.4). Αντίθετα, παρατηρήθηκε ραγδαία μεταβολή του ζ-δυναμικού σε θετικότερες τιμές, για την ίδια τιμή pH, ύστερα από την αντίδραση εμβολιασμού των πολυμερικών αλυσίδων ($+10.4 \pm 1.8$ mV). Η ελαφρώς θετική τιμή (που δεν αποκλίνει σημαντικά από τα 0 mV) αποδεικνύει την διευθέτηση των υδρόφιλων αλυσίδων του PEO προς το εξωτερικό των νανοσωματιδίων, οι οποίες σχηματίζουν ένα κέλυφος που προσδίδει “stealth” ιδιότητες στο σύστημα. Καθώς μειώνεται το pH από 7.4 σε 6.5, παρατηρείται η αύξηση της τιμής του ζ-δυναμικού για το δείγμα MSN@PEO2K-*b*-P(His-co-Cys25) στα $+19.3 \pm 2.4$ mV, λόγω της μερικής πρωτονίωσης των δομικών μονάδων της PHis, φανερώνοντας έτσι τον pH-αποκρινόμενο χαρακτήρα των νανοδομών που συντέθηκαν.

Πίνακας 4.3: Πειραματικά αποτελέσματα της ανάλυσης ζ-δυναμικού των MSNs και των παραγώγων τους

Δείγμα	pH	Zeta (mV)	+/-	KCps	Mob.	Width
MSN	7.4	-14.8	1.0	130.5	-1.164	3.6
MSN@GPTMS	7.4	-21.2	0.6	310.8	-1.664	60.8
MSN@PEO2K- <i>b</i> -P(His-co-Cys25)	7.4	+10.4	1.8	361.5	0.815	80.4
MSN@PEO2K- <i>b</i> -P(His-co-Cys25)	6.5	+19.3	2.4	251.7	1.724	73.5



Σχήμα 4.27: Μετρήσεις ζ-δυναμικού των δειγμάτων MSN, MSN@GPTMS και MSN@PEO2K-*b*-P(His-co-Cys25), συναρτήσει του pH

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Ολοκληρώνοντας την περιγραφή των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν και την παρουσίαση των αποτελεσμάτων που λήφθηκαν στα πλαίσια αυτής της ερευνητικής εργασίας, συνοψίζονται τα συμπεράσματα που προέκυψαν από την σύνθεση «έξυπνων» υβριδικών νανοδομών, που έχουν την ικανότητα να αποκρίνονται σε εξωτερικά ερεθίσματα (pH και δυναμικό οξειδοαναγωγής) και πληρούν όλες τις απαραίτητες προϋποθέσεις για τη χρήση τους ως προηγμένα συστήματα μεταφοράς φαρμακομορίων (κυρίως με αντικαρκινική δράση).

Ειδικότερα, όπως γίνεται εμφανές από τα αποτελέσματα των τεχνικών χαρακτηρισμού, σε πρώτη φάση συντέθηκαν επιτυχώς τα απαιτούμενα μονομερή $N_{(im)}$ -Trt-His NCA, tBMLC NCA και BLG NCA που επιλέχθηκαν να χρησιμοποιηθούν. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε ο ελεγχόμενος πολυμερισμός ROP ($I < 1.2$) με σκοπό τη σύνθεση καλά καθορισμένων γραμμικών ομοπολυπεπτιδίων PCys και PBLG χρησιμοποιώντας την DMA ως εκκινητή, αλλά και συμπολυμερών του τύπου PEO-*b*-P(His-co-Cys) χρησιμοποιώντας μακροαπαρχητές PEO-NH₂ διαφορετικού μοριακού βάρους. Το γεγονός ότι τα παραγόμενα πολυμερή συντέθηκαν χωρίς την ανάγκη απομάκρυνσης μετάλλων, τα οποία χρησιμοποιούνται για τον πολυμερισμό των NCAs μέσω συμπλόκων στοιχείων μεταπτώσεως, τα καθιστά ικανά για χρήση σε βιοϊατρικές εφαρμογές. Ακολούθησε κατά σειρά η εκλεκτική αποπροστασία των δομικών μονάδων PHis και PCys, καταλήγοντας στο ότι η PCys πρέπει να αποπροστατεύεται δεύτερη ώστε να μην δικτυωθούν οι αλυσίδες του πολυμερούς με τυχαίο τρόπο. Αξίζει να τονιστεί ότι μόνο μέσω σωστού σχεδιασμού και επιλογής της κατάλληλης προστατευτικής ομάδας για την PHis είναι εφικτός ο συνδυασμός των δύο πολυπεπτιδίων. Αυτό συμβαίνει διότι άλλες κοινές προστατευτικές ομάδες που έχουν χρησιμοποιηθεί βιβλιογραφικά (π.χ. DNP) είναι ευαίσθητες στη θειόλυση.

Σε επόμενο βήμα, χαρακτηρίστηκαν ενδελεχώς τα υβριδικά πολυμερή και στη συνέχεια μελετήθηκε η διαδικασία αυτο-οργάνωσης και δικτύωσής τους σε υδατικά διαλύματα. Αποδείχθηκε ότι τα νανοσωματίδια που προκύπτουν αποκρίνονται επιτυχώς σε μεταβολές του pH και υπό την επίδραση οξειδοαναγωγικών παραγόντων (DTT, H₂O₂, GSH), μεταβάλλοντας τη δευτεροταγή τους διαμόρφωση. Ακόμα, βρέθηκε ότι η διαφορά μοριακού βάρους των αλυσίδων PEO που αποτελούν την εξωτερική υδρόφιλη στιβάδα, επηρεάζει άμεσα τις μικρο- και μακροσκοπικές ιδιότητες των νανοσυστημάτων. Έτσι, συμπεραίνεται ότι το βέλτιστο σύστημα για επιπλέον μελέτη είναι το PEO5K-PCys25, το οποίο παραμένει σταθερό σε εναιώρημα για

μεγάλα χρονικά διαστήματα. Αντίθετα, τα πολυμερή με PEO₂K κατακρημνίζονται μετά την πάροδο μερικών ωρών, και γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκαν ως συστατικά για την τροποποίηση της επιφανείας MSNs με σκοπό τη δημιουργία νέων νανοσύνθετων υλικών.

Ένα ακόμα πολύ σημαντικό συμπέρασμα της εργασίας είναι η απόδειξη μέσω μετρήσεων ζ-δυναμικού, ότι η συστάδα του PEO βρίσκεται στην εξωτερική πλευρά τόσο των δικτυωμένων πολυμερικών νανοσωματιδίων, όσο και των εμβολιασμένων MSNs. Η απόδειξη αυτή είναι υψίστης σημασίας, διότι με αυτό τον τρόπο είναι δυνατό να προσαρτηθούν πάνω στην επιφάνεια των δομών ειδικά μόρια (π.χ. φολικό οξύ, πεπτίδια RGD κτλ) που θα στοχεύουν ενεργητικά τα καρκινικά κύτταρα, απελευθερώνοντας εκλεκτικά την φαρμακευτική ουσία, χωρίς η απελευθέρωση της να γίνεται πρόωρα μέσα στον οργανισμό που θα οδηγούσε σε πιθανή εμφάνιση ανεπιθύμητων παρενεργειών.

Το επόμενο στάδιο αναμένεται να είναι ο εγκλωβισμός υδρόφοβων αντικαρκινικών φαρμάκων στους πολυμερικούς νανοφορείς και μελέτη της ελεγχόμενης αποδέσμευσής τους υπό την επίδραση εξωτερικών ερεθισμάτων μέσω *in vitro* και *in vivo* πειραμάτων. Επίσης, σημαντική κρίνεται και η μελέτη των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των νέων δομών που θα προκύψουν, ώστε να προσδιοριστεί η επίδραση του φαρμάκου στη μορφολογία τους. Λαμβάνοντας υπόψη τα συμπεράσματα που εξήχθησαν από την παρούσα εργασία, επιπλέον προτείνεται η μελέτη της σταθερότητας των νανοδομών σε βιολογικά υγρά που προσομοιάζουν τον όρο του αίματος (π.χ. FBS και PBS), αλλά και σε διαλύματα που προσομοιάζουν το χημικό περιβάλλον των καρκινικών κυττάρων (χαμηλό pH και υψηλά επίπεδα GSH). Επιπρόσθετα απαραίτητος είναι και ο προσδιορισμός των χαρακτηριστικών τους κάτω από αυτές τις συνθήκες (μέγεθος, φορτίο επιφανείας).

Ως μελλοντικός στόχος για περαιτέρω διερεύνηση, προτείνεται η σύνθεση νέων συμπολυμερών με βάση την πολυ(L-ιστιδίνη) και την πολυ(L-κυστεΐνη), τα οποία θα διαθέτουν πολυπλοκότερη αρχιτεκτονική, οδηγώντας σε νέες αποκρινόμενες υπερμοριακές δομές. Τέτοια παραδείγματα είναι τα πολυμερή PEO-SS-PHis, PEO-*b*-PCys-*b*-PHis, και (PEO)₂-*b*-P(His-co-Cys). Ακόμα, μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η σύνθεση αμφίφιλων πολυπεπτιδικών πολυμερών που θα σχηματίζουν δικτυωμένες κυστιδιακές δομές σε υδατικά διαλύματα, και θα έχουν την ικανότητα ταυτόχρονου εγκλωβισμού υδρόφιλων και υδρόφοβων φαρμάκων που θα δρουν συνεργιστικά. Τέτοια παραδείγματα είναι τα πολυμερή PEO-*b*-P(His-co-Cys)-*b*-PLL, PLL-*b*-P(His-co-Cys)-*b*-PLL και PEO-*b*-PHis-*b*-PCys-*b*-PLL. Κλείνοντας πρέπει να τονισθεί ότι ο τομέας των βιοπολυμερών και η χημεία των πολυπεπτιδίων αναπτύσσονται τάχιστα τα τελευταία χρόνια δείχνοντας το σωστό μονοπάτι που πρέπει να στραφεί η επιστημονική έρευνα για την εύρεση αποτελεσματικής θεραπείας ενάντια στον καρκίνο.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας Α: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων

Ξενόγλωσσος Όρος	Ελληνικός Όρος
Zwitterion	Αμφοτερικό ιόν
β -Turn	β -Στροφή
ω -Loop	ω -Θηλιά
Ring-opening polymerization	Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου
N-Carboxy anhydride	N-Καρβοξυ ανυδρίτης
Ring strain	Τάση διάνοιξης δακτυλίου
High-vacuum techniques	Τεχνικές υψηλού κενού
Normal amine mechanism	Κανονικός μηχανισμός αμινών
Activated monomer mechanism	Μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς
Blout mechanism	Μηχανισμός του Blout
Dialysis	Διαπίδυση
Drug delivery	Τεχνολογία μεταφοράς φαρμάκων
Micelle	Μικκύλιο
Vesicle (ή polymersome)	Κυστίδιο
Stimuli-responsiveness	Απόκριση σε εξωτερικά ερεθίσματα
Cross-linking	Δικτύωση
Zeta-potential	ζ -Δυναμικό
Porosimetry	Ποροσιμετρία
Nuclear Overhauser effect	Πυρηνικό φαινόμενο Overhauser
Fourier transform	Μετασχηματισμός Fourier
Size exclusion chromatography	Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών
Gel permeation chromatography	Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών
Stern layer	Στρώμα Stern
Diffuse layer	Διάχυτη στιβάδα
Backscattered	Οπισθοσκεδαζόμενος
Condenser lens	Φακός συμπύκνωσης
Spot size	Διάμετρος δέσμης
High-vacuum line	Γραμμή υψηλού κενού

Glove box	Χώρος αποθήκευσης χημικών υλικών υπό αδρανή ατμόσφαιρα, όπου οι χειρισμοί γίνονται με την βοήθεια γαντιών προσαρμοσμένων σε υάλινο διάφραγμα
Flame-drying	Ξήρανση συσκευής στη γραμμή υψηλού κενού προς απομάκρυνση υγρασίας με χρήση φλόγας
Na/K alloy	Κράμα μεταλλικού νατρίου και καλίου
Break-seal	Υάλινος υμένας αμπούλας
“Click” reactions	Αντιδράσεις κυκλοπροσθήκης αζιδίου-αλκινίου
Milli-Q	Απεσταγμένο και φιλτραρισμένο νερό υψηλής καθαρότητας
Freeze-drying	Λυοφιλοποίηση
Mesoporous silica nanoparticles	Μεσοπορώδη νανοσωματίδια πυριτίας
Grafting to	Εμβολιασμός σε
Grafting from	Εμβολιασμός από

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

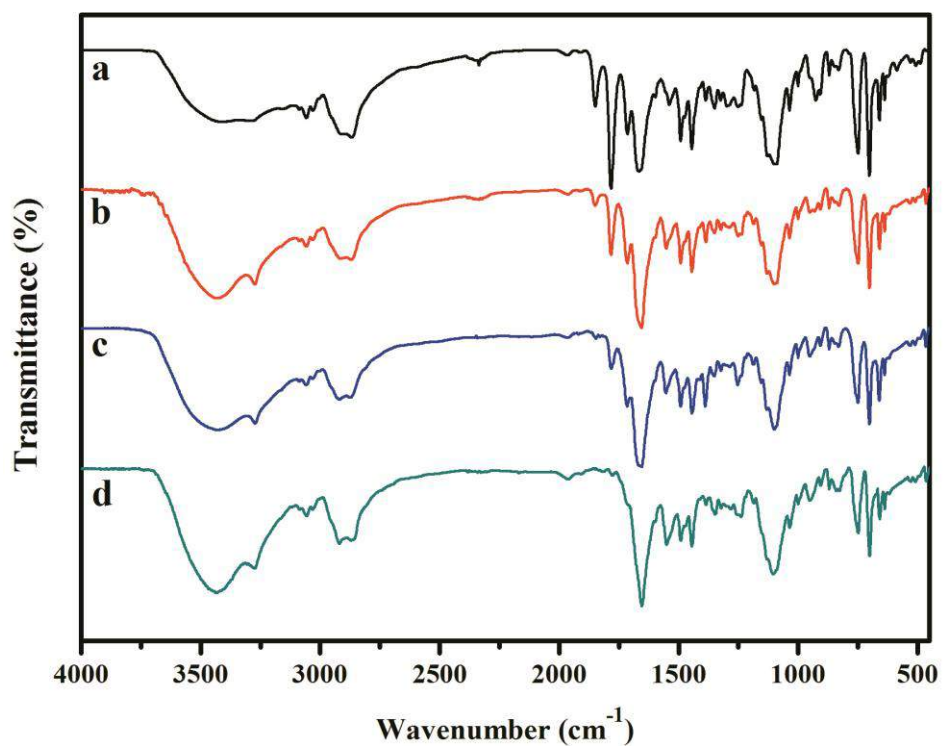
Πίνακας Β: Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

pI	Ισοηλεκτρικό σημείο
BOC	Βενζυλοξυκαρβονυλομάδα
DCC	<i>N,N'</i> -δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμίδιο
DIC	<i>N,N'</i> -δισοπροπυλοκαρβοδιϊμίδιο
ROP	Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου
NCA	N-Καρβοξυ ανυδρίτης
I	Κατανομή μοριακών βαρών
RROP	Ριζικός πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου
AROP	Ανιοντικός πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου
CROP	Κατιοντικός πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου
ROMP	Πολυμερισμός μετάθεσης με διάνοιξη δακτυλίου
D ₃	Εξαμεθυλ(κυκλοτρισιλοξάνη)
PDMS	Πολυ(διμεθυλοσιλοξάνη)
HVT	Τεχνικές υψηλού κενού
NAM	Κανονικός μηχανισμός αμινών
AMM	Μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς
bipy	2,2'-Διπυριδίνη
COD	1,5-Κυκλοοκταδιένιο
DMF	Διμεθυλοφορμαμίδιο
SOCl ₂	Θειονυλοχλωρίδιο
Et ₃ N	Τριαιθυλαμίνη
VPTT	Θερμοκρασία μεταβατικής φάσης όγκου
GSH	Γλουταθειόνη
MCM	Mobil composition of matter
APTES	(3-Aminopropyl)triethoxysilane
IR	Υπέρυθρη ακτινοβολία
NMR	Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
SEC (ή GPC)	Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών
TGA	Θερμοσταθμική ανάλυση

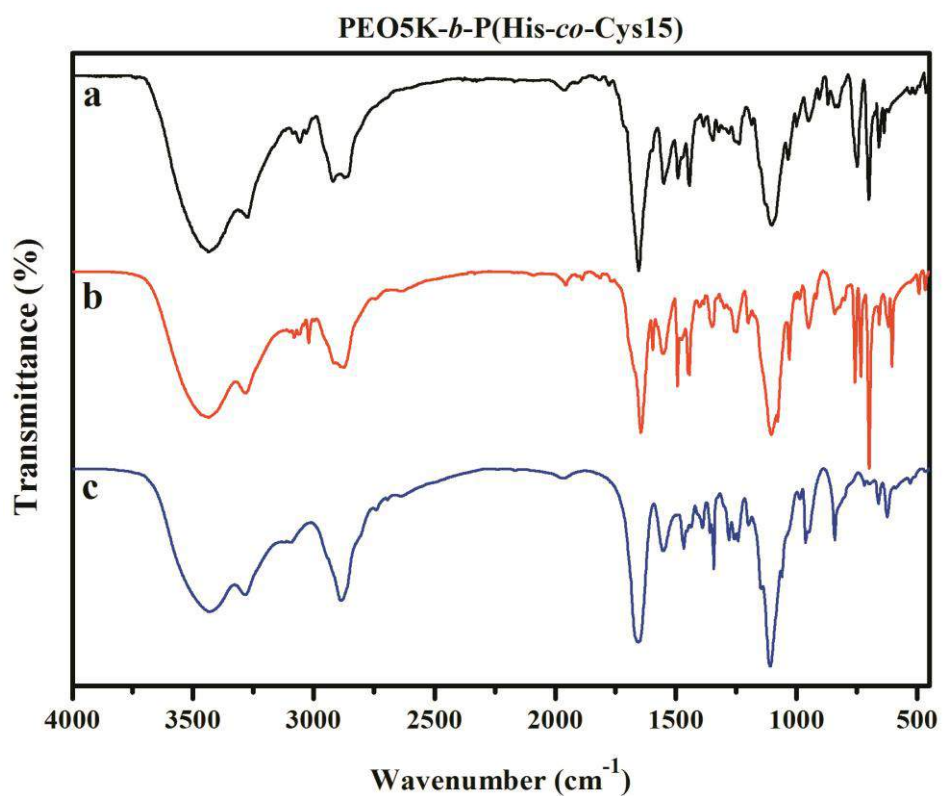
CD	Κυκλικός διχρωϊσμός
SEM	Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης
TEM	Ηλεκτρονική μικροσκοπία διαπερατότητας
cm ⁻¹	Κυμματαρίθμοι
TMS	Τετραμεθυλοσιλάνιο
J	Σταθερά σύζευξης
NOE	Nuclear Overhauser effect
UV-Vis	Υπεριώδες-ορατό
DSC	Διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης
ORD	Οπτική στροφική διασπορά
BET	Brunauer, Emmet και Teller
BJH	Barrett, Joyner και Halenda
DFT	Density functional theory
HVL	Γραμμή υψηλού κενού
CaH ₂	Υδρίδιο του ασβεστίου
<i>n</i> -BuLi	Κανονικό βουτυλλίθιο
DMA	Διμεθυλαμίνη
DCM (ή CH ₂ Cl ₂)	Διχλωρομεθάνιο
EtOAc	Οξικός αιθυλεστέρας
THF	Τετραϋδροφουράνιο
PAA	Προπαργυλαμίνη
BOC-His(Trt)-OH	<i>N</i> _α -BOC- <i>N</i> _(im) -trityl-L-histidine
H-Cys(StBu)-OH	<i>S</i> - <i>tert</i> -Butylmercapto-L-cysteine
H-Glu-(OBzl)-OH	L-Glutamic acid γ -benzyl ester
NaHCO ₃	Όξινο ανθρακικό νάτριο
PtBMLC	Poly(<i>S</i> - <i>tert</i> -Butylmercapto-L-cysteine)
PBLG	Poly(γ -benzyl-L-glutamate)
PCys	Poly(L-cysteine)
DTT	1,4-Dithiothreitol
PEO (ή PEG)	Πολυ(αιθυλενοξειδίο) (ή Πολυ(αιθυλενογλυκόλη))
p-TsCl	4-Toluenesulfonyl chloride
PHis	Poly(L-Histidine)
TFA	Τριφθοροξικό οξύ

(iPr) ₃ SiH	Τρισοπροπυλοσιλάνιο
MWCO	Όριο αποκλεισμού μοριακών βαρών
H ₂ O ₂	Υπεροξείδιο του υδρογόνου
MSNs	Μεσοπορώδη νανοσωματίδια πυριτίας
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromide
TEOS	Tetraethyl orthosilicate
MeOH	Μεθανόλη
GPTMS	(3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane
CDCl ₃	Δευτεριωμένο χλωροφόρμιο
DNP	Dinitrophenyl

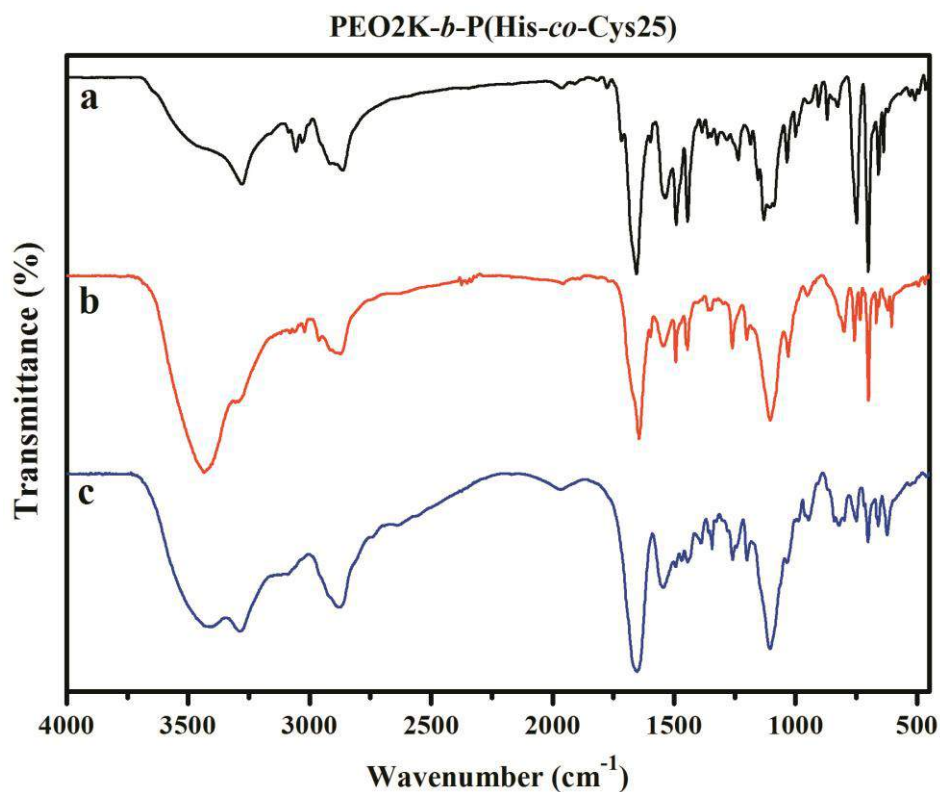
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



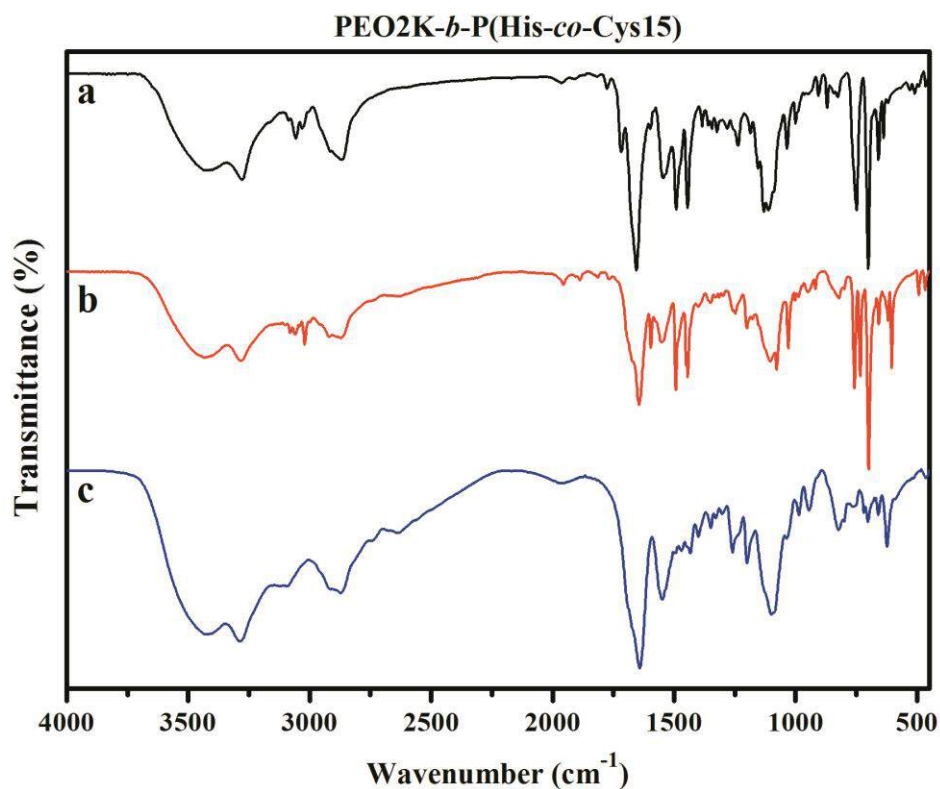
Σχήμα Π1: Παρακολούθηση της πορείας πολυμερισμού του PEO5K-*b*-P(His-co-Cys15) μέσω FT-IR



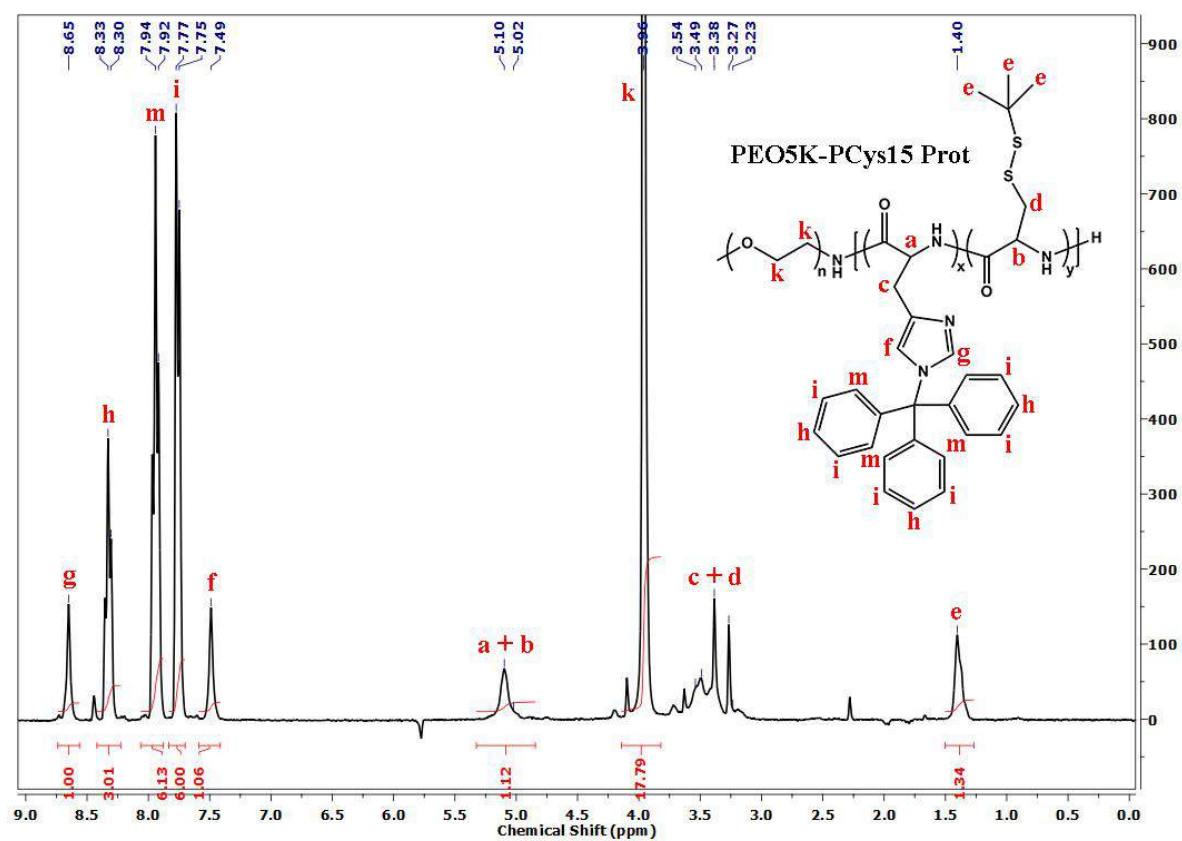
Σχήμα Π2: Φάσμα IR (a) του πλήρως προστατευμένου πολυμερούς PEO5K-*b*-P(His-co-Cys15), (b) μετά την εκλεκτική αποπροστασία της PHis και (c) μετά την πλήρη αποπροστασία του



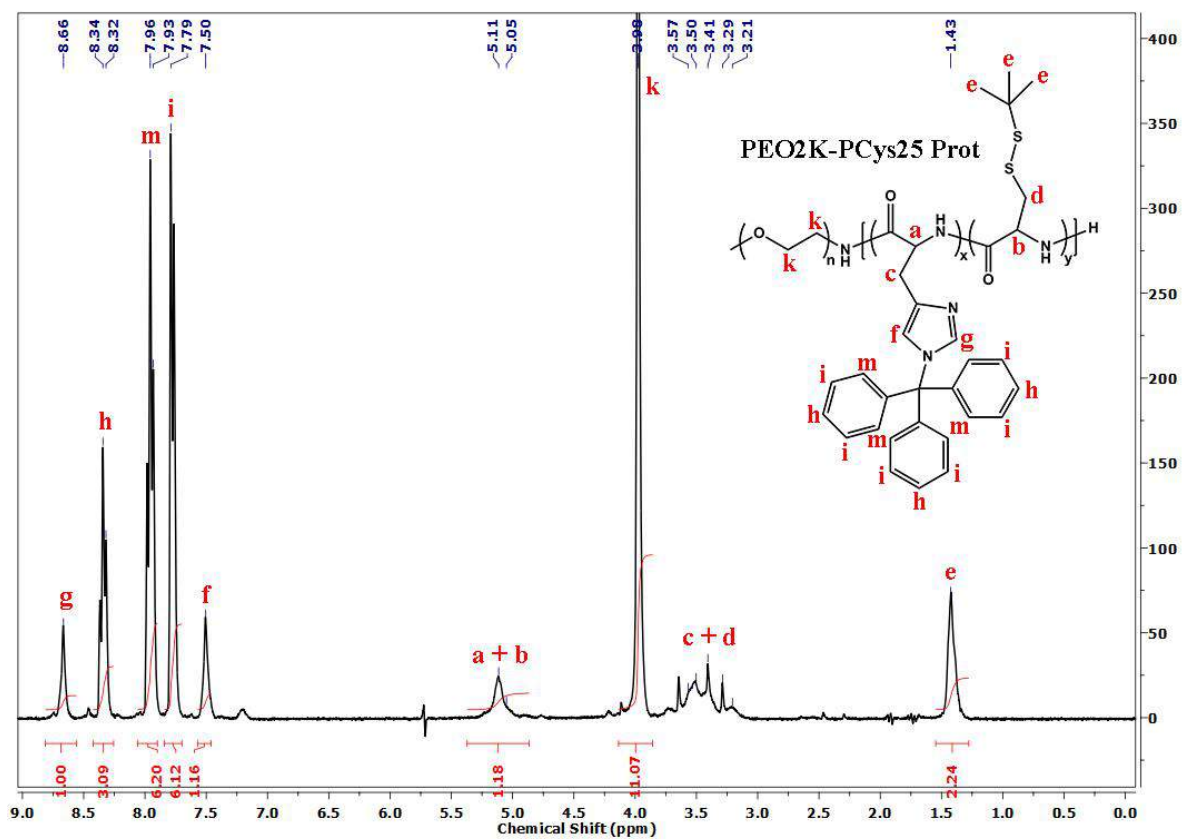
Σχήμα Π3: Φάσμα IR (a) του πλήρως προστατευμένου πολυμερούς PEO2K-*b*-P(His-*co*-Cys25), (b) μετά την εκλεκτική αποπροστασία της PHis και (c) μετά την πλήρη αποπροστασία του



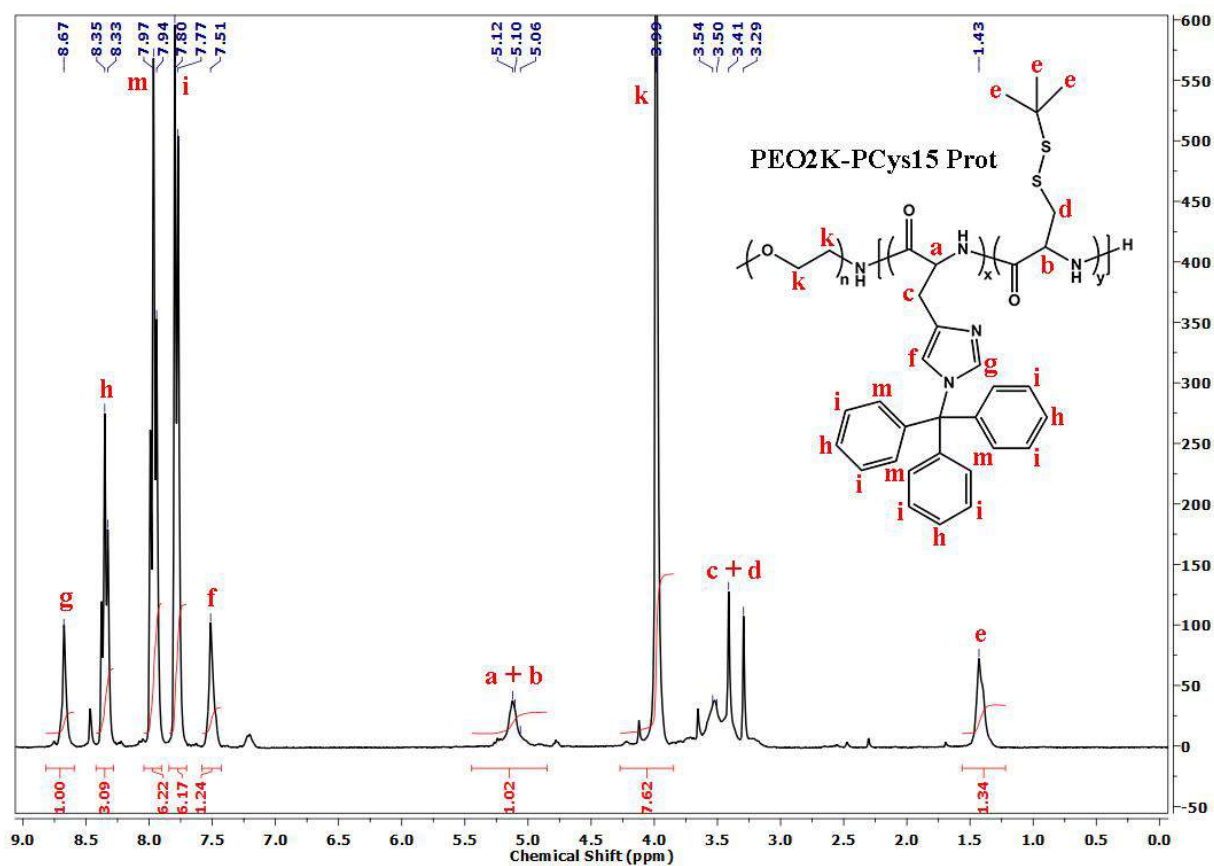
Σχήμα Π4: Φάσμα IR (a) του πλήρως προστατευμένου πολυμερούς PEO2K-*b*-P(His-*co*-Cys15), (b) μετά την εκλεκτική αποπροστασία της PHis και (c) μετά την πλήρη αποπροστασία του



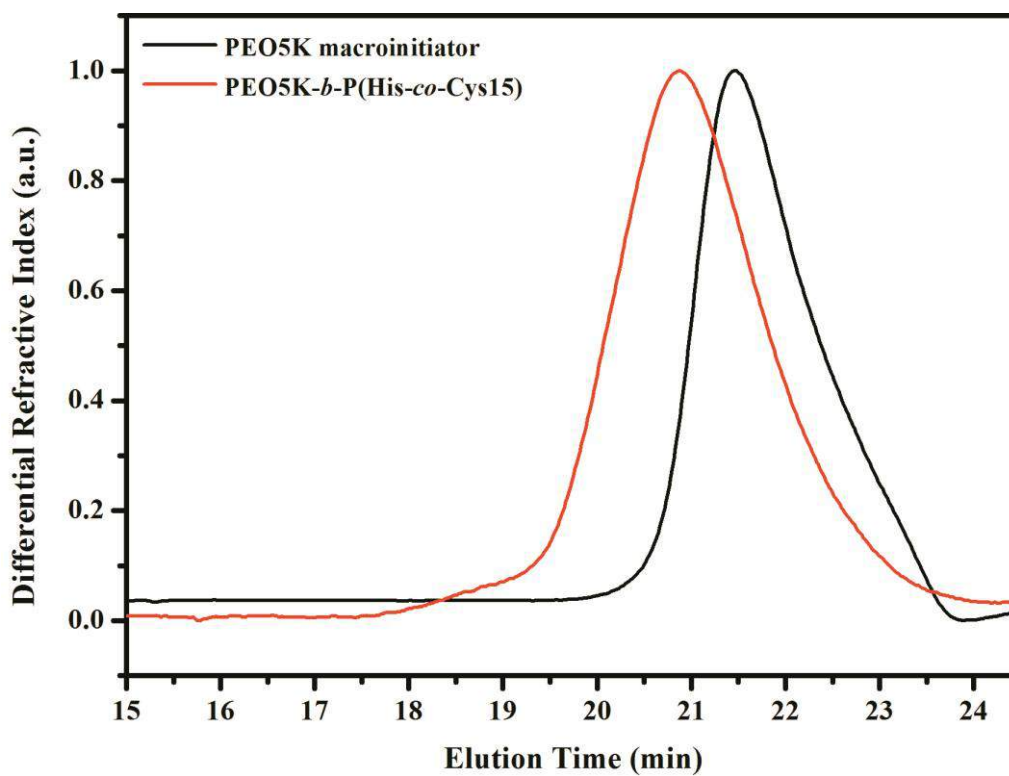
Σχήμα Π5: Φάσμα ^1H -NMR του προστατευμένου πολυμερούς PEO5K-*b*-P(His-*co*-Cys15), σε TFA-d



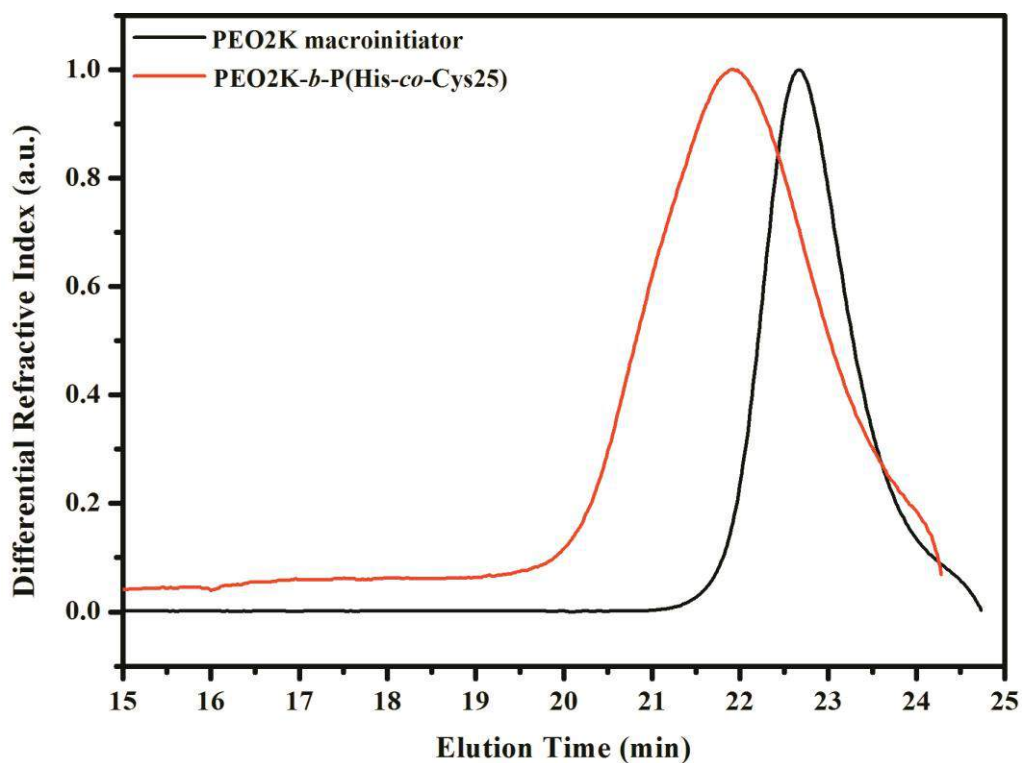
Σχήμα Π6: Φάσμα ^1H -NMR του προστατευμένου πολυμερούς PEO2K-*b*-P(His-*co*-Cys25), σε TFA-d



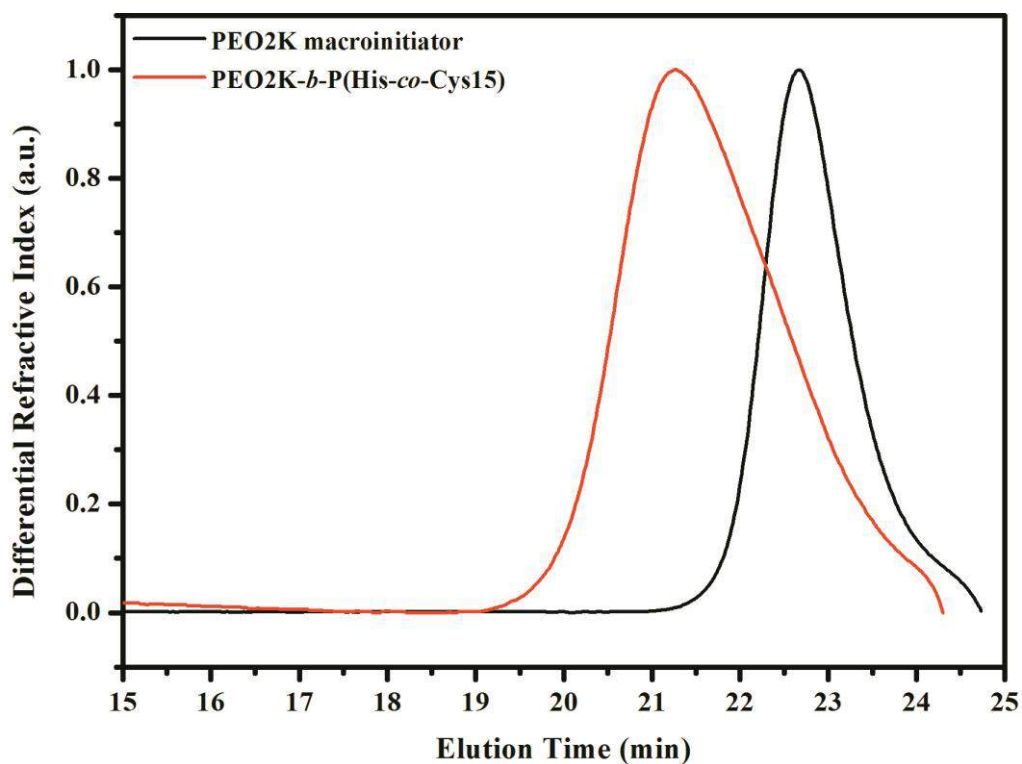
Σχήμα Π7: Φάσμα ^1H -NMR του προστατευμένου πολυμερούς PEO2K-*b*-P(His-*co*-Cys15), σε TFA-*d*



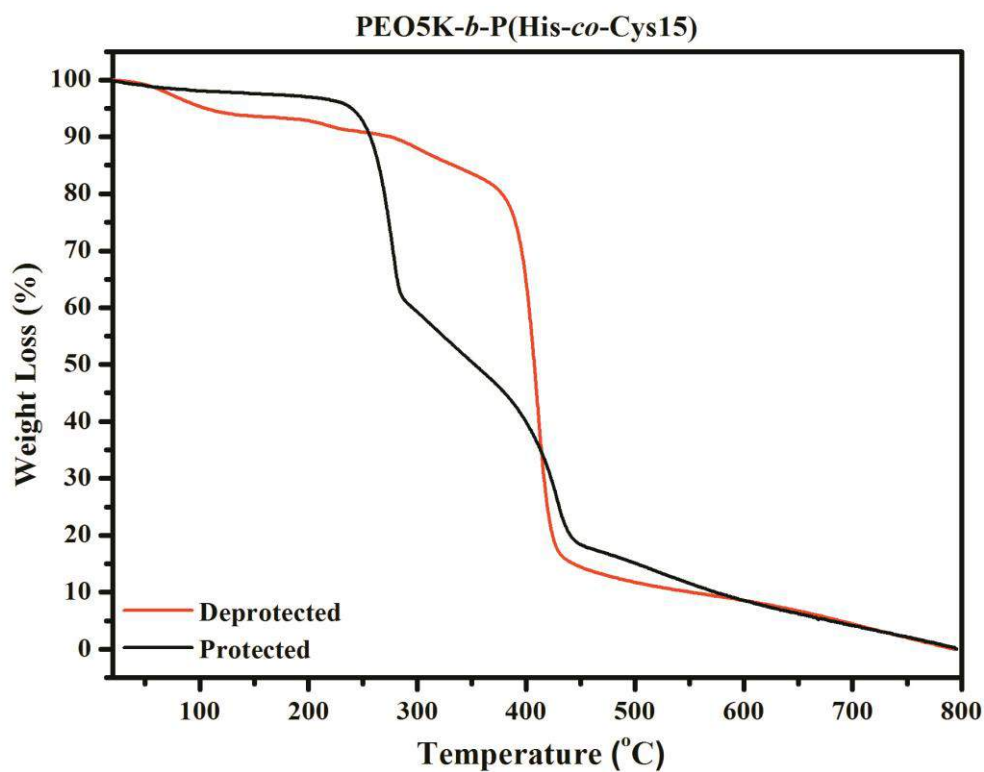
Σχήμα Π8: Χρωματογράφημα SEC του μακροαπαρχιτή PEO5K-NH₂ και του συμπολυμερούς PEO5K-*b*-P(His-*co*-Cys15)



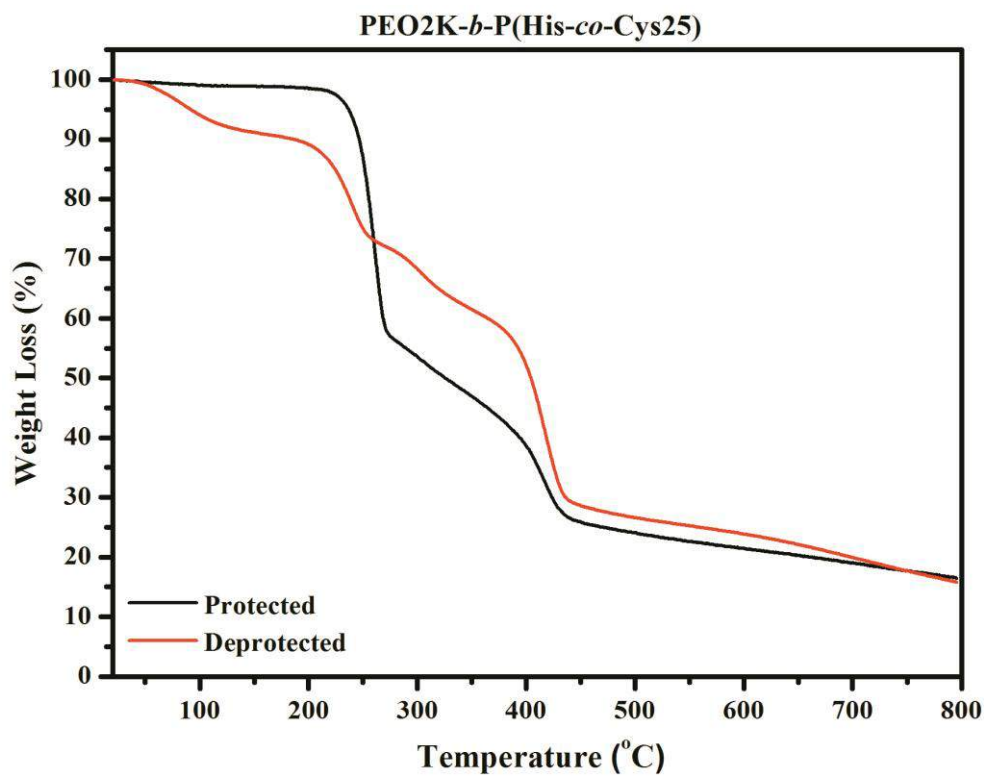
Σχήμα Π9: Χρωματογράφημα SEC του μακροαπαρχητή PEO2K-NH₂ και του συμπολυμερούς PEO2K-*b*-P(His-co-Cys25)



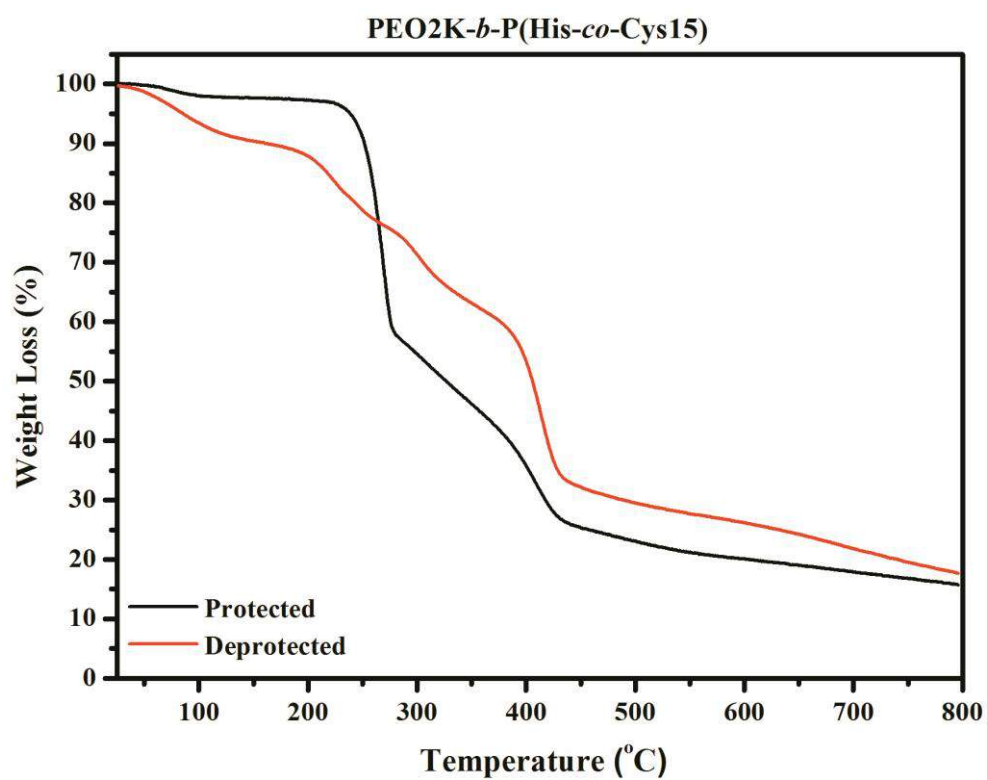
Σχήμα Π10: Χρωματογράφημα SEC του μακροαπαρχητή PEO2K-NH₂ και του συμπολυμερούς PEO2K-*b*-P(His-co-Cys15)



Σχήμα Π11: Διάγραμμα TGA της απώλειας βάρους του πολυμερούς PEO5K-*b*-P(His-co-Cys15) συναρτήσει της θερμοκρασίας, πριν και μετά την αποπροστασία του



Σχήμα Π12: Διάγραμμα TGA της απώλειας βάρους του πολυμερούς PEO2K-*b*-P(His-co-Cys25) συναρτήσει της θερμοκρασίας, πριν και μετά την αποπροστασία του



Σχήμα Π13: Διάγραμμα TGA της απώλειας βάρους του πολυμερούς PEO2K-*b*-P(His-*co*-Cys15) συναρτήσει της θερμοκρασίας, πριν και μετά την αποπροστασία του

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. N. Sewald, H.-D. Jakubke, *Peptides: Chemistry and Biology*, 2nd ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, **2002**.
2. C. Alemán, A. Bianco, M. Venanzi, *Peptide Materials: From Nanostructures to Applications*, 1st ed. John Wiley & Sons, Ltd: United Kingdom, **2013**.
3. N. Hadjichristidis, H. Iatrou, M. Pitsikalis, G. Sakellariou, Synthesis of well-defined polypeptide-based materials via the ring-opening polymerization of α -amino acid N-carboxyanhydrides, *Chem. Rev.* **2009**, 109, 5528-5578.
4. M. L. Adams, A. Lavasanifar, G. S. Kwon, Amphiphilic block copolymers for drug delivery, *J. Pharm. Sci.* **2003**, 92, 1343-1355.
5. M. Lazzari, G. Liu, S. Lecommandoux, *Block Copolymers in Nanoscience*, 1st ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, **2006**.
6. P. Bilalis, S. Varlas, A. Kiafa, A. Velentzas, D. Stravopodis, H. Iatrou, Preparation of hybrid triple-stimuli responsive nanogels based on poly(L-histidine), *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2016**, 54, 1278-1288.
7. M. Li, Z. Tang, H. Sun, J. Ding, W. Song, X. Chen, pH and reduction dual-responsive nanogel cross-linked by quaternization reaction for enhanced cellular internalization and intracellular drug delivery, *Polym. Chem.* **2013**, 4, 1199-1207.
8. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, 6th ed. W. H. Freeman: New York, **2007**.
9. Ε. Γκίκας, *Αμφίφιλα Πολυπεπίδια: Σύνθεση, Χαρακτηρισμός και Μελέτη Αυτοοργάνωσης σε Υδατικά Διαλύματα*. Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ, Αθήνα, **2012**.
10. G. S. Kumbar, C. T. Laurencin, M. Deng, *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*, 1st ed. Elsevier Inc.: Burlington, **2014**.
11. B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, J. E. Lemons, *Biomaterials Science: an Introduction to Materials in Medicine*, 3rd ed. Elsevier Academic Press: Oxford, **2013**.
12. Α. Καρατζάς, *Μακρομοριακή Αρχιτεκτονική Πολυπεπτιδίων*. Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ, Αθήνα, **2007**.
13. H. Iatrou, K. Dimas, M. Gkikas, C. Tsimblouli, S. Sofianopoulou, Polymersomes from polypeptide containing triblock co- and terpolymers for drug delivery against pancreatic cancer: Asymmetry of the external hydrophilic blocks, *Macromol. Biosci.* **2014**, 14, 1222-1238.

14. C. Deng, J. Wu, R. Cheng, F. Meng, H.-A. Klok, Z. Zhong, Functional polypeptide and hybrid materials: Precision synthesis via α -amino acid N-carboxyanhydride polymerization and emerging biomedical applications, *Prog. Polym. Sci.* **2014**, 39, 330-364.
15. C. He, X. Zhuang, Z. Tang, H. Tian, X. Chen, Stimuli-sensitive synthetic polypeptide-based materials for drug and gene delivery, *Adv. Healthcare Mater.* **2012**, 1, 48-78.
16. M. Bodansky, A. Bodansky, *The practice of peptide synthesis*, 2nd ed. Springer-Verlag: New York, **1993**.
17. M. Goodman, J. Hutchison, The mechanisms of polymerization of N-unsubstituted N-carboxyanhydrides, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 3627-3630.
18. T. J. Deming, Synthesis and self-assembly of well-defined block copolypeptides via controlled NCA polymerization, *Adv. Polym. Sci.* **2013**, 262, 1-38.
19. T. J. Deming, *Peptide-Based Materials*, 1st ed. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, **2012**.
20. O. Nuyken, S. D. Pask, Ring-opening polymerization—An introductory review, *Polymers* **2013**, 5, 361-403.
21. P. Dubois, O. Coulembier, J.-M. Raquez, *Handbook of Ring-Opening Polymerization*, 1st ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, **2009**.
22. M. Idelson, E. R. Blout, Polypeptides XVII. A kinetic study of the polymerization of amino acid N-carboxyanhydrides initiated by strong bases, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 2387-2393.
23. T. J. Deming, Facile synthesis of block copolypeptides of defined architecture, *Nature* **1997**, 390, 386-389.
24. T. J. Deming, Amino acid derived nickelacycles: Intermediates in nickel-mediated polypeptide synthesis, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 4240-4241.
25. T. J. Deming, Cobalt and iron initiators for the controlled polymerization of α -amino acid-N-carboxyanhydrides, *Macromolecules* **1999**, 32, 4500-4502.
26. T. Aliferis, H. Iatrou, N. Hadjichristidis, Living polypeptides, *Biomacromolecules* **2004**, 5, 1653-1656.
27. H. R. Kricheldorf, *α -Aminoacid N-carboxyanhydrides and Related Heterocycles*, 1st ed. Springer-Verlag: New York, **1987**.
28. H. R. Kricheldorf, Polypeptides and 100 years of chemistry of α -amino acid N-carboxyanhydrides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 5752-5784.
29. A. L. Levy, Anhydro-N-carboxy-DL- β -phenylalanine, *Nature*, **1950**, 165, 152-153.
30. D. Coleman, A. C. Farthing, Synthetic polypeptides, Part I. Synthesis of oxazolid-2,5-diones and a new reaction of glycine, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 72, 3218-3222.

31. G. J. M. Habraken, M. Peeters, C. H. J. T. Dietz, C. E. Koning, A. Heise, How controlled and versatile is N-carboxy anhydride (NCA) polymerization at 0 °C? Effect of temperature on homo-, block- and graft (co)polymerization, *Polym. Chem.* **2010**, 1, 514-524.
32. J. Shi, A. R. Votruba, O. C. Farokhzad, R. Langer, Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: From discovery to applications, *Nanolett.* **2010**, 10, 3223-3230.
33. S. K. Sahoo, V. Labhasetwar, Nanotech approaches to drug delivery and imaging, *Drug Discovery Today* **2003**, 8, 1112-1120.
34. O. C. Farokhzad, R. Langer, Impact of nanotechnology on drug delivery, *ACS Nano* **2009**, 3, 16-20.
35. M. M. Amiji, *Nanotechnology for Cancer Therapy*, 1st ed. Taylor & Francis Group, LLC: Boca Raton, **2007**.
36. J. L. Arias, *Nanotechnology and Drug Delivery, Volume 1: Nanoplatfroms in Drug Delivery*, 1st ed. Taylor & Francis Group, LLC: Boca Raton, **2015**.
37. E. P. Holowka, S. K. Bhatia, *Drug Delivery: Materials Design and Clinical Perspective*, 1st ed. Springer: New York, **2014**.
38. C. Demetzos, N. Pippa, Advanced drug delivery nanosystems (aDDnSs): a mini-review, *Drug Deliv.* **2014**, 21, 250-257.
39. D. Peer, J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit, R. Langer, Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy, *Nat. Nanotechnol.* **2007**, 2, 751-760.
40. Μ. Πιτσικάλης, Μ. Χατζηχρηστίδη, *Ειδικά Θέματα Επιστήμης Πολυμερών*, ΕΚΠΑ, Αθήνα, **2010**.
41. R. Duncan, The drawing era of polymer therapeutics, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, 2, 347-360.
42. D. Douroumis, A. Fahr, *Drug Delivery Strategies for Poorly Water-Soluble Drugs*, 1st ed. John Wiley & Sons, Ltd: United Kingdom, **2013**.
43. X. Chen, S. Wong, *Cancer Theranostics*, 1st ed. Elsevier Academic Press: San Diego, **2014**.
44. U. Kedar, P. Phutane, S. Shidhaye, V. Kadam, Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting, *Nanomedicine* **2010**, 6, 714-729.
45. Σ. Βάρλας, *Εγκλωβισμός Φαρμάκων σε Πολυπεπίδια*. Πτυχιακή Εργασία, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ, Αθήνα, **2014**.
46. T. J. Deming, Synthetic polypeptides for biomedical applications, *Prog. Polym. Sci.* **2007**, 32, 858-875.
47. S. Salmaso, P. Caliceti, Stealth Properties to Improve Therapeutic Efficacy of Drug Nanocarriers, *J. Drug Deliv.* **2013**, Article ID 374252, 19 pages.

48. J. Huang, A. Heise, Stimuli responsive synthetic polypeptides derived from N-carboxyanhydride (NCA) polymerization, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 7373-7390.
49. S. Zhang, Z. Li, Stimuli-responsive polypeptide materials prepared by ring-opening polymerization of α -amino acid N-carboxyanhydrides, *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* **2013**, *51*, 546-555.
50. Y. Shen, X. Fu, W. Fu, Z. Li, Biodegradable stimuli-responsive polypeptide materials prepared by ring opening polymerization, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 612-622.
51. P. Vaupel, F. Kallinowski, P. Okunieff, Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review, *Cancer Res.* **1989**, *49*, 6449-6465.
52. D. Mavroggiorgis, P. Bilalis, A. Karatzas, D. Skoulas, G. Fotinogiannopoulou, H. Iatrou, Controlled polymerization of histidine and synthesis of well-defined stimuli responsive polymers. Elucidation of the structure–aggregation relationship of this highly multifunctional material, *Polym. Chem.* **2014**, *5*, 6256-6278.
53. Y. Li, D. Maciel, J. Rodrigues, X. Shi, H. Tomás, Biodegradable polymer nanogels for drug/nucleic acid delivery, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 8564-8608.
54. P. Midoux, C. Pichon, J.-J. Yaouanc, P. A. Jaffrès, Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers, *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *157*, 166-178.
55. Y. Jeong, M. K. Joo, K. H. Bahk, Y. Y. Choi, H. T. Kim, W. K. Kim, H. J. Lee, Y. S. Sohn, B. Jeong, Enzymatically degradable temperature-sensitive polypeptide as a new in situ gelling biomaterial, *J. Control. Release*, **2009**, *137*, 25-30.
56. M. K. Joo, M. H. Park, B. G. Choi, B. Jeong, Reverse thermogelling biodegradable polymer aqueous solutions, *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 5891-5905.
57. J. Huang, C. L. Hastings, G. P. Duffy, H. M. Kelly, J. Raeburn, D. J. Adams, A. Heise, Supramolecular hydrogels with reverse thermal gelation properties from (oligo)tyrosine containing block copolymers, *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 200-206.
58. R. K. O'Reilly, C. J. Hawker, K. L. Wooley, Cross-linked block copolymer micelles: functional nanostructures of great potential and versatility, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 1068-1083.
59. B. Gyarmati, Á. Némethy, A. Szilágyi, Reversible disulphide formation in polymer networks: A versatile functional group from synthesis to applications, *Eur. Polym. J.* **2013**, *49*, 1268-1286.
60. R. L. McCarley, Redox-responsive delivery systems, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2012**, *5*, 391-411.

61. M. Huo, J. Yuan, L. Tao, Y. Wei, Redox-responsive polymers for drug delivery: from molecular design to applications, *Polym. Chem.* **2014**, 5, 1519-1528.
62. R. Cheng, F. Feng, F. Meng, C. Deng, J. Feijen, Z. Zhong, Glutathione-responsive nano-vehicles as a promising platform for targeted intracellular drug and gene delivery, *J. Control. Release* **2011**, 152, 2-12.
63. X. Chang, L. Liu, Y. Guan, C.-M. Dong, Disulfide-centered star-shaped polypeptide-PEO block copolymers for reduction-triggered drug release, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2014**, 52, 2000-2010.
64. G. Liu, L. Zhou, Y. Guan, C.-M. Dong, Multi-responsive polypeptidosome: characterization, morphology transformation, and triggered drug delivery, *Macromol. Rapid Commun.* **2014**, 35, 1673-1678.
65. H. Zhu, C. Dong, H. Dong, T. Ren, X. Wen, J. Su, Y. Li, Cleavable PEGylation and hydrophobic histidylation of polylysine for siRNA delivery and tumor gene therapy, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, 6, 10393-10407.
66. G. J. M. Habraken, C. E. Koning, J. P. A. Heuts, A. Heise, Thiol chemistry on well-defined synthetic polypeptides, *Chem. Commun.* **2009**, 3612-3614.
67. A. B. D. Nandiyanto, S.-G. Kim, F. Iskandar, K. Okuyama, Synthesis of spherical mesoporous silica nanoparticles with nanometer-size controllable pores and outer diameters, *Microporous Mesoporous Mater.* **2009**, 120, 447-453.
68. F. Tang, L. Li, D. Chen, Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis, biocompatibility and drug delivery, *Adv. Mater.* **2012**, 24, 1504-1534.
69. P. Bilalis, L.-A. Tziveleka, S. Varlas, H. Iatrou, pH-Sensitive nanogates based on poly(L-histidine) for controlled drug release from mesoporous silica nanoparticles, *Polym. Chem.* **2016**, 7, 1475-1485.
70. T. Asefa, Z. Tao, Biocompatibility of mesoporous silica nanoparticles, *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, 25, 2265-2284.
71. A. Baeza, M. Colilla, M. Vallet-Regí, Advances in mesoporous silica nanoparticles for targeted stimuli-responsive drug delivery, *Expert Opin. Drug Deliv.* **2015**, 12, 319-337.
72. C. Rosu, S. Selcuk, E. Soto-Cantu, P. S. Russo, Progress in silica polypeptide composite colloidal hybrids: from silica cores to fuzzy shells, *Colloid. Polym. Sci.* **2014**, 292, 1009-1040.
73. B. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, 1st ed. Wiley: Weinheim, **2004**.
74. J. McMurry, *Organic Chemistry*, 7th ed. Thomson Learning, Inc: Belmont, **2008**.

75. N. Χατζηχρηστίδης, Κ. Βύρας, Ε. Ιατρού, Σ. Πίσπας, Μ. Πιτσικάλης, Π. Πίσσης, *Μέθοδοι Χαρακτηρισμού Πολυμερών*, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ, Αθήνα, **1998**.
76. H. G. Barth, J. W. Mays, *Modern Methods of Polymer Characterization*, 1st ed. John Wiley & Sons, Inc.: New York, **1991**.
77. N. Χατζηχρηστίδης, Μ. Πιτσικάλης, Ε. Ιατρού, *Βιομηχανική Χημεία*, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ, Αθήνα, **2011**.
78. I. Teraoka, *Polymer Solutions: An Introduction to Physical Properties*, 1st ed. John Wiley & Sons, Inc.: New York, **2002**.
79. Α.-Γ. Πίππα, *Φαρμακευτική Νανοτεχνολογία: Μελέτη της μορφολογίας χιμαιρικών συστημάτων μεταφοράς φαρμακομορίων*. Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ, Αθήνα, **2015**.
80. J. D. Menczel, R. B. Prime, *Thermal Analysis of Polymers: Fundamentals and Applications*, 1st ed. John Wiley & Sons, Inc.: New Jersey, **2009**.
81. Δ. Σκουλάς, *Σύνθεση Συμπολυμερών Πολυαιθυλενοξειδίου και Ιστιδίνης με γ-Βενζυλεστέρα του Γλουταμικού Οξέος και Επίδραση του Εστέρα στο pKa της Πολυιστιδίνης*. Ερευνητική Εργασία Διπλώματος Ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ, Αθήνα, **2014**.
82. G. H. Michler, *Electron Microscopy of Polymers*, 1st ed. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, **2008**.
83. C. D. Tsakiroglou, V. N. Burganos, J. Jacobsen, Pore-Structure Analysis by Using Nitrogen Sorption and Mercury Intrusion Data, *AIChE J.* **2004**, 50, 489-510.
84. N. Hadjichristidis, H. Iatrou, S. Pispas, M. Pitsikalis, Anionic polymerization: High vacuum techniques, *J. Poly. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2000**, 38, 3211-3234.
85. D. Uhrig, J. W. Mays, Experimental techniques in high-vacuum anionic polymerization, *J. Poly. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2005**, 43, 6179-6222.
86. N. Hadjichristidis, A. Hirao, *Anionic Polymerization: Principles, Practice, Strength, Consequences and Applications*, 1st ed. Springer: Japan, **2015**.
87. L. Liang, D. Astruc, The copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) “click” reaction and its applications. An overview, *Coord. Chem. Rev.* **2011**, 255, 2933-2945.
88. G. Z. Hu, F. Nitze, X. Jia, T. Sharifi, H. R. Barzegar, E. Gracia-Espino, T. Wagberg, Reduction free room temperature synthesis of a durable and efficient Pd/ordered mesoporous carbon composite electrocatalyst for alkaline direct alcohols fuel cell, *RSC Adv.* **2014**, 4, 676-682.
89. I. W. Hamley, S. Kirkham, A. Dehsorkhi, V. Castelletto, J. Adamcik, R. Mezzenga, J. Ruokolainen, C. Mazzuca, E. Gato, M. Venanzi, , E. Placidi, P. Bilalis, H. Iatrou, Self-

- assembly of a model peptide incorporating a hexa-histidine sequence attached to an oligo-alanine sequence, and binding to gold NTA/nickel nanoparticles, *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 3412-3420.
90. B. J. Sparks, J. G. Ray, D. A. Savin, C. M. Stafford, D. L. Patton, Synthesis of thiol-clickable and block copolypeptide brushes via nickel-mediated surface initiated polymerization of α -amino acid N-carboxyanhydrides (NCAs), *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 6245-6247.
 91. N. V. Tsarevsky, K. Matyjaszewski, Reversible redox cleavage/coupling of polystyrene with disulfide or thiol groups prepared by atom transfer radical polymerization, *Macromolecules* **2002**, *35*, 9009-9014.
 92. W. Agut, D. Taton, S. Lecommandoux, A versatile synthetic approach to polypeptide based rod-coil block copolymers by click chemistry, *Macromolecules* **2007**, *40*, 5653-5661.
 93. X. Wu, L. Zhou, Y. Su, C.-M. Dong, An autoreduction method to prepare plasmonic gold-embedded polypeptide micelles for synergistic chemo-photothermal therapy, *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 2142-2152.
 94. S.-Y. Lee, S. Kim, J. Y. Tyler, K. Park, J.-X. Cheng, Blood-stable, tumor-adaptable disulfide bonded mPEG-(Cys)₄-PDLLA micelles for chemotherapy, *Biomaterials* **2013**, *34*, 552-561.
 95. G.-F. Luo, W.-H. Chen, Y. Liu, J. Zhang, S.-X. Cheng, R.-X. Zhuo, X.-Z. Zhang, Charge-reversal plug gate nanovalves on peptide-functionalized mesoporous silica nanoparticles for targeted drug delivery, *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 5723-5732.
 96. J. A. Oshiro Junior, M. P. Abuçafy, E. B. Manaia, B. Lallo da Silva, B. G. Chiari-Andréo, L. A. Chiavacci, Drug delivery systems obtained from silica based organic-inorganic hybrids, *Polymers* **2016**, *8*, 91.
 97. J. A. A. Sales, A. G. S. Prado, C. Airoidi, The incorporation of propane-1,3-diamine into silylant epoxide group through homogeneous and heterogeneous routes, *Polyhedron* **2002**, *21*, 2647-2651.
 98. Y. Wang, N. Han, Q. Zhao, L. Bai, J. Li, T. Jiang, S. Wang, Redox-responsive mesoporous silica as carriers for controlled drug delivery: A comparative study based on silica and PEG gatekeepers, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2015**, *72*, 12-20.