

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 διπλά αποκρινόμενων δικτυωμένων υβριδικών τρισυσταδικών συμπολυμερών πολυαιθυλενοξειδίου, πολυκυστεΐνης και πολυϊστιδίνης

> ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΜΑΘΙΑΝΑΚΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΑΣ ΥΛΙΚΩΝ

> > ΑΘΗΝΑ ΣΕΠΤΕΜΒΡΗΣ 2018

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Σύνθεση διπλά αποκρινόμενων υβριδικών τρισυσταδικών συμπολυμερών πολυαιθυλενοξειδίου, πολυκυστεΐνης και πολυϊστιδίνης

ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΜΑΘΙΑΝΑΚΗ

A.M.: 161005

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Ιατρού Ερμόλαος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ιατρού Ερμόλαος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Πιτσικάλης Μαρίνος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Σακελλαρίου Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

HMEPOMHNIA ΕΞΕΤΑΣΗΣ 12/10/2018

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα ερευνητική εργασία παρουσιάζεται η σύνθεση μίας σειράς υβριδικών αποκρινόμενων τρισυσταδικών συμπολυμερών τύπου mPEO₁₁₄-b-PCys_m-b-PHis_n με δύο διαφορετικά ποσοστά 15% και 20% κατά mol ως προς την περιεκτικότητα της κυστείνης. Επίσης πραγματοποιήθηκε η σύνθεση ομοπολυμερούς Cys-PHis 6K με στόχο την μετέπειτα σύνδεσή του μέσω χημείας "click" με άλλα μόρια ή μακρομοριακές αλυσίδες. Η σύνθεση των πολυμερών πραγματοποιήθηκε μέσω πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των αντίστοιχων προστατευμένων Ν-καρβοξυ ανυδριτών (μονομερή) με χρήση αμινο-τελικού πολυ(αιθυλενοξειδίου) (m-PEO₁₁₄-NH₂) ως μακροαπαρχητή για τα συμπολυμερή. Για το ομοπολυμερές χρησιμοποιήθηκε ως απαρχητής κατάλληλα προστατευμένη κυστεΐνη. Για τη σύνθεση των Ν-καρβοξυ ανυδριτών, τον καθαρισμό των διαλυτών, αλλά και τελικών συμπολυμερών, χρησιμοποιήθηκαν υψηλού εξασφαλίζοντας τεχνικές κενού, υψηλή σύστημα. Η επιτυχής σύνθεση των καθαρότητα στο πολυμερών επιβεβαιώθηκε με τις τεχνικές χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών (SEC), πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (¹H-NMR), και της φασματοσκοπίας υπερύθρου (FT-IR). Τέλος, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) προκειμένου να μελετηθεί η ικανότητα αυτοοργάνωσης των υβριδικών συμπολυμερών. Απώτερος στόχος είναι η δημιουργία σταθερών και αποκρίσιμων σε καρκινικό περιβάλλον νανοδομών που θα χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές στοχευμένης και ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμάκων στους καρκινικούς ιστούς.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Πολυμερή

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου, Ν-καβοξυ ανυδρίτες, πολυπεπτίδια, μεταφορά φαρμάκων, αποκρισιμότητα

ABSTRACT

In this work, a series of novel amphiphilic hybrid block terpolymers based on polyethyleneoxide (PEO), polyhistidine (PHis) and polycysteine (PCys) have been synthesized. These terpolymers possess the ability to respond to external stimuli and consist of different molar ratio of PCys to the whole polypeptide part. In addition, a PHis homopolymer was synthesized using a Cterminus protected Cysteine as the macroinitiator in order to bond with different macromolecules via "click" chemistry. The synthetic route for the hybrid terpolymers and the homopolymer was conducted via Ring Opening Polymerization of the corresponding protected N-Caboxy Anhydrides and in the case of the terpolymers mPEO₁₁₄-NH₂ was used as the macroinitiator. High Vacuum Techniques were used both for the purification of the solvents and the polymerizations avoiding undesirable sidechain reactions. The desirable polymers were characterized by Size Exclusion Chromatography (SEC/GPC), Nuclear Magnetic Resonance (NMR), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) and Dynamic Light Scattering (DLS). 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.

SUBJECT AREA: Polymers

KEYWORDS: Ring Opening Polymerization, N-Carboxy Anhydrides, polypeptides, drug delivery, responsiveness

Σε όλους εκείνους που πίστεψαν και πιστεύουν σε εμένα και εύχομαι μια μέρα να βγάλω ασπροπρόσωπους...

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιομηχανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και θα ήταν παράλειψή μου να μην ευχαριστήσω όσους συνέβαλαν στην ολοκλήρωσή της ο καθένας με το δικό του τρόπο.

Αρχικά, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον επιβλέποντά μου Καθηγητή Ερμόλαο Ιατρού πρωτίστως για την πρότασή του να ενσωματωθώ στην ερευνητική του ομάδα αλλά και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε τα τελευταία 2 χρόνια. Ο ενθουσιασμός, η παρότρυνση, οι συμβουλές και η στήριξή του σε ερευνητικό αλλά και προσωπικό επίπεδο είναι ανεκτίμητης αξίας για μένα και συνέβαλαν με το δικό τους τρόπο στην εξέλιξή μου. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για τις ατέλειωτες συζητήσεις μας αλλά και την προθυμία του να μου επιλύσει οποιαδήποτε απορία ανά πάσα ώρα και στιγμή!

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω από καρδιάς τα μέλη της τριμελούς επιτροπής μου: Καθηγητή Μαρίνο Πιτσικάλη και Επίκουρο Καθηγητή Γεώργιο Σακελλαρίου. Η καθημερινή συναναστροφή μας κατά τη διάρκεια του Μεταπτυχιακού μου με γέμισε όχι μόνο με γνώσεις στην Επιστήμη των Πολυμερών αλλά συνέβαλε και καθοριστικά στην εξέλιξή μου ως άνθρωπο και ως επιστήμονα. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον κο.Πιτσικάλη για το καθημερινό «κουράγιο» και τις συμβουλές που μου έδινε αλλά και τον κο.Σακελλαρίου είναι πρόθυμος να συζητήσουμε που πάντα πάσης φύσεως προβληματισμούς μου. Η παρότρυνση και η στήριξη και των δύο προς το πρόσωπό μου είναι ανυπολόγιστης αξίας. Το Εργαστήριο δε θα ήταν ίδιο χωρίς εκείνους!

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω επίσης σε δύο κυρίες, μάστερ στο είδος τους η καθεμία, που με χαρά προσπάθησαν να συμβάλουν στον εμπλουτισμό των γνώσεών μου και την «ανασκαφή» σημαντικών αποτελεσμάτων, τη Δρ. Δήμητρα Μπενάκη (Τμήμα Φαρμακευτικής Χημείας, ΕΚΠΑ) και την κα. Antje Larsen (Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και Λέιζερ, Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας). Ευχαριστώ θερμά τη Δρ.Μπενάκη για τις αμέτρητες ώρες στο NMR, τις συμβουλές αλλά και την αδιάκοπη προθυμία της να επιλύσουμε κάθε πρόβλημα που ανέκυπτε στις μετρήσεις των δειγμάτων μου. Επίσης

9

ευχαριστώ θερμά την κα.Larsen για τις γνώσεις και την καθοδήγηση που μου παρείχε στις μετρήσεις DLS αλλά και όλες τις φορές που ήταν διαθέσιμη να μου επεξηγήσει οποιαδήποτε απορία εμφανιζόταν.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Καθηγητές μου από το Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών του Πανεπιστημίου Κρήτης: Καθηγητή Δημήτρη Βλασσόπουλο, Επίκουρη Καθηγήτρια Κέλλυ Βελώνια και Καθηγήτρια Άννα Μητράκη για την απλόχερη βοήθεια που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια του Μεταπτυχιακού μου.

Ευχαριστώ επίσης ιδιαίτερα τους συναδέλφους: Δρ.Κατσίκη Σωτήρη (Τμήμα Φαρμακευτικής Χημείας, ΕΚΠΑ), Υποψήφια Διδάκτορα Ηρώ Τριανταφυλλίδη (Εργαστήριο Οργανικής Χημείας, ΕΚΠΑ) και Υποψήφια Διδάκτορα Νικόλ Σπηλιωπούλου (Εργαστήριο Οργανικής Χημείας, ΕΚΠΑ) για την πολύτιμη βοήθειά τους στις μετρήσεις NMR και των Υποψήφιο Διδάκτορα Άκη Γεροκωνσταντή (Εργαστήριο Οργανικής Χημείας, ΕΚΠΑ) για τις πολύτιμες συμβουλές του σε θέματα Οργανικής Συνθετικής Χημείας.

Επιπλέον, ευχαριστώ θερμά τον Μεταδιδακτορικό Ερευνητή Δρ.Ιωάννη Χοινόπουλο (Εργαστήριο Βιομηχανικής Χημείας ΕΚΠΑ), την Επίκουρη Καθηγήτρια Παναγιώτα Φραγκούλη (Τμήμα Μηχανικών Βιομηχανικής Σχεδίασης και Παραγωγής, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής) και την κα.Julie Stain (Εργαστήριο Βιομηχανικής Χημείας ΕΚΠΑ) για τη διαρκή στήριξή τους όποτε τους χρειάστηκα.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ προορίζεται σε όλους τους συναδέλφους μου από το εργαστήριο Βιομηχανικής Χημείας που με την ευχάριστη ατμόσφαιρα έκαναν την καθημερινότητά μου ομορφότερη και πιο ενδιαφέρουσα.

Ιδιαίτερο ευχαριστώ στους: Υποψήφιο Διδάκτορα Παναγιώτη Χριστακόπουλο, Μεταπτυχιακή Φοιτήτρια Μαρία Κασιμάτη, Υποψήφια Διδάκτορα Δήμητρα Σταυρουλάκη, Υποψήφια Διδάκτορα Βαρβάρα Αθανασίου, Μεταπτυχιακή Φοιτήτρια Ντιάνα Καζαριάν, Μεταπτυχιακή Φοιτήτρια Ρουμελιώτη Νίκη και Μεταπτυχιακή Φοιτήτρια Φωτεινή Αρφαρά που συνεργαστήκαμε στην ίδια ερευνητική ομάδα και όλα δούλεψαν ρολόι!!!

Τέλος, το μεγαλύτερο και βαθύτερο ευχαριστώ προορίζεται στην οικογένειά μου χωρίς τη στήριξή της οποίας δε θα ήμουν αυτή που είμαι σήμερα. Τους

ευχαριστώ βαθύτατα για την αστείρευτη αγάπη, υπομονή, πίστη και στήριξη που λαμβάνω καθημερινά οπλίζοντάς με με τόσο γερά εφόδια ώστε να μη στέκεται τίποτα εμπόδιο σε κάθε μου όνειρο και φιλοδοξία!!!

Περιεχόμενα

1. КЕФА	ΛΑΙΟ 1 – ΕΙΣΑΓΩΓΗ26
2. КЕФА	ΛΑΙΟ 2 – ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ
2.1. Aµıv	/οξέα, πεπτίδια και πρωτεΐνες29
2.2. Επί	πεδα οργάνωσης πρωτεϊνών32
2.2.1	Πρωτοταγής Δομή32
2.2.2	Δευτεροταγής Δομή33
2.2.3	Τριτοταγής δομή36
2.2.4	Τεταρτοταγής δομή36
2.3. Πεπ	τιδική σύνθεση37
2.3.1 αλληλουχία.	Σύνθεση πεπτιδίων μικρού μοριακού βάρους και με καθορισμένη 37
2.3.2	Σύνθεση Πολυπεπτιδίων Μεγάλου Μοριακού Βάρους
2.3.3 Polymerizati	Πολυμερισμός Διάνοιξης Δακτυλίου (Ring-Opening on, ROP)39
2.3.4 ανυδριτών (Ι	Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (ROP) των Ν-καρβοξυ NCAs) των α- αμινοξέων ^{9,10,11,} 41
2.3.4.1 NAM)	Κανονικός Μηχανισμός Αμινών (Normal Amine Mechanism, 43
2.3.4.2	Μηχανισμός του Blout46
2.3.4.3 Monomer M	Μηχανισμός του ενεργοποιημένου μονομερούς (Activated echanism, AMM)46
2.3.5 NCAs μετά τ	Μηχανιστικές μελέτες πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των ο 199748
2.3.6 μετάπτωσης	Σύνθεση πολυπεπτιδίων με χρήση συμπλόκων των στοιχείων
2.3.7 αμινών	Σύνθεση πολυπεπτιδίων με υδροχλωρικά άλατα πρωτοταγών 49

2.3.8	Σύνθεση πολυπεπτιδίων με πρωτοταγείς αμίνες και χρήση	ן 0
2.4.	Σύνθεση Ν-Καρβοξυ Ανυδριτών των α-Αμινοξέων (NCAs)5	3
2.5.	Αποκρινόμενα πολυμερή5	6
2.5.1	Θέρμο-αποκρινόμενα πολυμερή5	9
2.5.2	Φώτο-αποκρινόμενα πολυμερή6	0
2.5.3	ρΗ-αποκρινόμενα πολυμερή6	0
2.5.4	Ιοντικά αποκρινόμενα πολυμερή6	1
2.5.5	Πολυπεπτιδικά Συστήματα Μεταφοράς Φαρμάκων Αποκρινόμενα σε	Ξ
Οξειδο	αναγωγικούς Παράγοντες6	1
3. KI	ΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ64	4
3.1.	Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών6	4
3.2.	Φασματοσκοπία Υπερύθρου6	8
3.3.	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός7	1
3.4.	Δυναμική Σκέδαση Φωτός7	5
4. K	ΕΦΑΛΑΙΟ 4 – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ7	7
4.1	Τεχνική Υψηλού Κενού (High Vacuum Technique, HVT)7	7
4.2	Καθαρισμός Διαλυτών ⁶² 7	9
4.2.1	Βενζόλιο (Benzene)7	9
4.2.2	Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)8	0
4.2.3	Διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF)8	0
4.2.4	Διχλωρομεθάνιο (DCM)8	1
4.2.5	Εξάνιο8	1
4.2.6	Μεθανόλη (MeOH)8	1
4.2.7	Οξικός Αιθυλεστέρας (EtOAc)8	1
4.2.8	Τετραϋδροφουράνιο (THF)8	2

4.3	Καθαρισμός και Συλλογή Λοιπών Αντιδραστηρίων ⁶² 82
4.3.1	Τριαιθυλαμίνη (Et₃N)82
4.3.2	Τριμεθυλοχλωροσιλάνιο (TMSCI)82
4.3.3	Συλλογή S-tert-butyl-mercapto-L-Cysteine Methyl Ester83
4.4	Σύνθεση S-tert-butyl-mercapto-L-Cysteine N-Carboxy Anhydride
(tBM-L-	Cys NCA) ^{51,}
4.5 NCA)	Σύνθεση N ^{im} -Trityl-L-Histidine N-Carboxy Anhydride (Nim-Trt-His
4.5.1	Σύνθεση N ^{im} -Trityl-L-Histidine NCA*HCI87
4.5.2	Σύνθεση Nim-Trityl-L-Histidine N-Carboxy Anhydride (N ^{im} -Trt-His
NCA)	
4.6	Σύνθεση Υβριδικών Τρισυσταδικών Συμπολυμερών Τύπου mPEO ₁₁₄ -
b-Poly(l	Cysteine) _m -b-Poly(L-Histidine) _n (mPEO ₁₁₄ -b-PCys _m -b-PHis _n)91
4.6.1	Σύνθεση Υβριδικού Τρισυσταδικού Συμπολυμερούς mPEO ₁₁₄ -b-
PtBMLC	Cys ₇ -b-PTrtHis ₃₈ 92
4.6.2	Εκλεκτική αποπροστασία μονομερικών μονάδων με σκοπό τη
σύνθεσι	η υβριδικών τριπολυμερών τύπου mPEO ₁₁₄ -b-PCys _m -b-PHis _n 95
4.6.3	Εκλεκτική αποπροστασία μονομερικών μονάδων πολυϊστιδίνης
(PTrtHis	s) ⁶⁵ 96
4.6.4	Εκλεκτική αποπροστασία μονομερικών μονάδων πολυκυστεΐνης
(PtBML	Cys) ^{44, 51} 97
4.7	Αυτοοργάνωση και Δικτύωση Τρισυσταδικών Συμπολυμερών τύπου
mPEO ₁	₁₄ -b-PCys _m -b-PHis _n 98
4.8	Σύνθεση Ομοπολυμερούς Πολυϊστιδίνης (Cys-PHis 6K) Εκκινούμενη
Από Κι	υστεΐνη
4.8.1	Σύνθεση S-tert-butyl-mercapto-L- Cysteine Methyl Ester101
4.8.1.1	Σύνθεση S-tert-butyl-mercapto-L- Cysteine Methyl Ester με
Χρήση ⁻	TMSCI ⁷¹ 102

4.8.2 Σύνθεση Πλήρως Προστατευμένου Ομοπολυμερούς Πολυϊστιδίνης με χρήση S-tert-butyl-mercapto-L-Cysteine Methyl Ester ως 4.8.3 Εκλεκτική αποπροστασία μονομερικών μονάδων πολυϊστιδίνης ομοπολυμερούς Cys-PTrtHis......107 Εκλεκτική αποπροστασία S-tert-Butyl-mercapto προστατευτικής 4.8.4 ομάδας ομοπολυμερούς Cys-PHis109 5. 5.1 Χαρακτηρισμός S-tert-butyl-mercapto-L-Cysteine N-Carboxy Anhydride (tBM-L-Cys NCA).....111 5.2 Χαρακτηρισμός Nim-Trityl-L-Histidine N-Carboxy Anhydride (Nim-Trt-L-His NCA)......115 5.3 Χαρακτηρισμός Υβριδικού Τρισυσταδικού Συμπολυμερούς mPEO₁₁₄b-PtBMLCys₇-b-PTrtHis₃₈.....118 5.4 Μελέτη Αυτοοργάνωσης Με Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS).......133 4.4.1 Μελέτη Αυτοοργάνωσης mPEO₁₁₄-b-PtBMLCys₇-b-PHis₃₈ σε DMSO......135 Μελέτη Αυτοοργάνωσης mPEO₁₁₄-b-PCys₇-b-PHis₃₈ σε DMSO139 4.4.2 4.4.3 Μελέτη Αυτοοργάνωσης mPEO₁₁₄-b-PtBMLCys₇-b-PHis₃₈ σε buffer pH=7.4, 150mM NaCl + 2 σταγόνες HCl 1N145 5.5 Χαρακτηρισμός S-tert-butyl-mercapto-L-Cysteine Methyl Ester 147 5.6 Χαρακτηρισμός Ομοπολυμερούς Πολυϊστιδίνης (6K) με χρήση S-tertbutyl-mercapto-L-Cysteine ως απαρχητή152 5.7 6. 7. 15

Σύνθεση S-tert-butyl-mercapto-L- Cysteine Methyl Ester με

Χρήση SOCI₂⁷²......104

4.8.1.2

8.	ΑΝΑΦΟΡΕΣ	166
----	----------	-----

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Χαρακτηριστικά παραδείγματα R.O.P μονομερών41
Σχήμα 2: Αντίδραση πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου (ROP) των NCAs42
Σχήμα 3: Στάδια έναρξης και διάδοσης του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των Ν-καρβοξυ ανυδριτών μέσω του κανονικού μηχανισμού αμινών (NAM). 43
Σχήμα 4: Αντίδραση τερματισμού κατόπιν προσβολής του καρβονυλίου στη θέση 2' από τον απαρχητή45
Σχήμα 5: Μηχανισμός του Blout, στάδια έναρξης και διάδοσης46
Σχήμα 6: Στάδια μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς. Το ανιόν ΝCA μπορεί να προσβάλλει είτε την αναπτυσσόμενη αλυσίδα είτε ένα νέο μόριο NCA47
Σχήμα 7: Χρήση υδροχλωρικού άλατος πρωτοταγούς αμίνης ως απαρχητή για τον ελεγχόμενο πολυμερισμό των NCAs από την ομάδα του Schlaad50
Σχήμα 8: Η αντίδραση με το νερό δίνει το αρχικό αμινοξύ και εν συνεχεία πολυμερισμό. Η αντίδραση με το υδροχλώριο και το φωσγένιο δίνει ισοκυανατο χλωρίδιο και μετέπειτα Ν-χλωροφορμυλοκαρβόξυ ανυδρίτη52
Σχήμα 9: Μέθοδοι "Leuchs" και "Fuchs-Farthing" για τη σύνθεση των Ν- καρβοξυ ανυδριτών55
Σχήμα 10: Αντίδραση Υδρόλυσης DMF80
Σχήμα 11: Αντίδραση σύνθεσης του προστατευμένου ανυδρίτη της L- κυστεΐνης tBM-L-Cys NCA84
Σχήμα 12: Αντίδραση σύνθεσης του προστατευμένου ανυδρίτη της L-Ιστιδίνης N ^{im} -Trt-L-His NCA87
Σχήμα 13: Αντίδραση ROP για τα πλήρως προστατευμένα υβριδικά τρισυσταδικά συμπολυμερή τύπου mPEO ₁₁₄ -b-PtBMLCys _m -b-PTrtHis92
Σχήμα 14: Πειραματική πορεία για την πλήρη αποπροστασία των τρισυσταδικών συμπολυμερών τύπου mPEO ₁₁₄ -b-PtBMLCys _m -b-PTrtHis _n καταλήγοντας στα τελικά επιθυμητά προϊόντα mPEO ₁₁₄ -b-PCys _m -b-PHis _n 96

Σχήμα 15: Σχηματική απεικόνιση πιθανής πορείας αυτοοργάνωσης και
δικτύωσης υβριδικών τρισυσταδικών συμπολυμερών τύπου mPEO114-b-
PCys _m -b-PHis _n 99
Σχήμα 16: Χημειοεκλεκτική προσθήκη Michael για τη δημιουργία αμφίφιλων αποκρίσιμων βιοσυζυγών πολυπεπτιδίου-πολυμερούς
Σχήμα 17: Αντίδραση καρβόξυ-προστασίας s-tert-butyl-mercapto-L-Cysteine
(I) για το σχηματισμό S-tert-butyl-mercapto-L-Cysteine Methyl Ester (IV) με
χρήση TMSCI102
Σχήμα 19: Σύνθεση πλήρως προστατευμένου ομοπολυμερούς πολυϊστιδίνης
(PTrtHis) με χρήση S-tert-butyl-mercapto-L-Cysteine Methyl Ester ως
απαρχητή106
Σχήμα 20: Εκλεκτική αποπροστασία δομικών μονάδων πολυϊστιδίνης
ομοπολυμερούς Cys-PTrtHis 6Κ107
Σχήμα 21: Εκλεκτική αποπροστασία κυστεΐνης ομοπολυμερούς Cys-PHis 6K.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Απεικόνιση κυτταρικής μεμβράνης. Επισημαίνονται οι υδρόφοβες ουρές των λιπιδίων και οι υδρόφιλες κεφαλές τους
Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση των διαδικασιών εγκλωβισμού και ενδοκυτταρικής απελευθέρωσης υδρόφοβων φαρμάκων μέσω πολλαπλά αποκρινόμενων πολυπεπτιδικών νανοφορέων
Εικόνα 3: Τα L- και D- ισομερή των α-αμινοξέων ¹ 30
Εικόνα 4: Τα 20 βασικά αμινοξέα ² 31
Εικόνα 5: Δημιουργία πεπτιδικού δεσμού ³ 32
Εικόνα 6: Πρωτοταγής Δομής Πρωτεϊνών ⁴ 33
Εικόνα 7: Δευτεροταγής δομή πρωτεϊνών. Μπλε σχέδιο: β-πτυχωτή επιφάνεια, Πράσινο σχέδιο: α-έλικα ⁵ 34
Εικόνα 8: Τριτοταγής Δομή36
Εικόνα 9: Τεταρτοταγής Δομή ⁶ 37
Εικόνα 10: Ταξινόμηση των αποκρινόμενων πολυπεπτιδίων
Εικόνα 11: Α) Δομή γλουταθειόνης (GSH) και Β) αντιδράσεις οξείδωσης και αναγωγής των δομικών μονάδων πολυ(L-κυστεΐνης)
Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση Γραμμής Υψηλού Κενού (High Vacuum Line, HVL) ^{62,63}
Εικόνα 13: Αμπούλα συλλογής TMSCI83
Εικόνα 14: Αμπούλα συλλογής απαρχητή S-tert-butyl-mercapto-L-Cysteine Methyl Ester
Εικόνα 15: Α: Πρόδρομο αμινοξύ Η-Cys(StBu)-ΟΗ σε EtOAc πριν την προσθήκη τριφωσγενίου, Β: μετά από δυόμιση ώρες αντίδρασης προς σχηματισμό του tBM-L-Cys NCA85
Εικόνα 16: Πρόδρομο αμινοξύ Boc-His(Trt)-OH σε THF αμέσως μετά την προσθήκη SOCl ₂ , Β: μετά από 1.5 ώρα αντίδρασης προς σχηματισμό του Ν ^{im} - Trt-L-His-NCA*HCI

Εικόνα 19: Φάσμα ¹HNMR σε CDCI₃ για τον tBM-L-Cys NCA......114

Εικόνα 21: Φάσμα ¹HNMR σε CDCI₃ για τον τελικό N^{im}-Trt-L-His NCA 117

Εικόνα 27: Φάσμα HSQC (2D) σε TFA-d για το μερικώς αποπροστατευμένο συμπολυμερές mPEO₁₁₄-b-PtBMLCys₇-b-PHis₃₈......127 Εικόνα 28: Φάσμα HSQC (2D) σε TFA-d για το μερικώς αποπροστατευμένο συμπολυμερές mPEO₁₁₄-b-PtBMLCys₇-b-PHis₃₈. Μεγέθυνση από 1.0 - 4.3 Εικόνα 29: Φάσμα HSQC (2D) σε TFA-d για το μερικώς αποπροστατευμένο συμπολυμερές mPEO₁₁₄-b-PtBMLCvs₇-b-PHis₃₈. Μενέθυνση από 1.0 - 6.5 Εικόνα 30: Φάσματα ¹HNMR. Φάσμα Α: Πλήρως αποπροστατευμένο συμπολυμερές mPEO₁₁₄-b-PCys₇-b-PHis₃₈ σε D₂O/DCI, Φάσμα Β: Μερικώς αποπροστατευμένο συμπολυμερές mPEO₁₁₄-b-PtBMLCys₇-b-PHis₃₈ σε Εικόνα 31: Χρωματογράφημα GPC για το συμπολυμερές mPEO₁₁₄-b-PCys₁₁b-PHis₃₄. Γκρι γράφημα: μακροαπαρχητής mPEO₁₁₄-NH₂ 5K, Κόκκινο γράφημα: mPEO₁₁₄-b-PCys₁₁-b-PHis₃₄ (πλήρως αποπροστατευμένο), Μπλε γράφημα: mPEO₁₁₄-b-PCys₁₁-b-PHis₃₄ αντίδραση με αναγωγικό μέσο DTT για Εικόνα 32: Συνάρτηση αυτοσυσχέτισης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.....136 Εικόνα 33: Συντελεστής διάχυσης για την κύρια διαδικασία αυτοοργάνωσης Εικόνα 34: Συντελεστής διάχυσης για τις δύο διαδικασίες αυτοοργάνωσης συναρτήσει των διαφορετικών συγκεντρώσεων......137 Εικόνα 35: Διάγραμμα ρυθμού απόσβεσης συναρτήσει q σε διαφορετικές συγκεντρώσεις......137 Εικόνα 36: Διάγραμμα κανονικοποιημένης έντασης συναρτήσει q σε Εικόνα 37: Συνάρτηση αυτοσυσχέτισης για συγκέντρωση δείγματος 0.08 Εικόνα 38: Συντελεστής διάχυσης για την κύρια διαδικασία αυτοοργάνωσης

Εικόνα 39: Διάγραμμα ρυθμού απόσβεσης συναρτήσει q σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις
Εικόνα 40: Διάγραμμα κανονικοποιημένης έντασης συναρτήσει q σε δύο διαφορετικές
Εικόνα 41: Συνάρτηση αυτοσυσχέτισης για συγκέντρωση δείγματος 10.13 mg/mL. Μαύρο γράφημα: Αρχικό δείγμα, Μπλε γράφημα: έπειτα από 2.5 βδομάδες
Εικόνα 42: Διάγραμμα ρυθμού απόσβεσης συναρτήσει q για συγκέντρωση δείγματος 10.13 mg/mL. Γεμάτα σύμβολα: Πρώτη μέτρηση, Άδεια σύμβολα: Μέτρηση μετά από 2.5 εβδομάδες142
Εικόνα 43: Διάγραμμα κανονικοποιημένης έντασης συναρτήσει q για συγκέντρωση δείγματος 10.13 mg/mL143
Εικόνα 44: Σύγκριση δειγμάτων. Α συναρτήσεις αυτοσυσχέτισης: πολυμερές με προστατευμένη συστάδα κυστεΐνης (mPEO ₁₁₄ -b-PtBMLCys ₇ -b-PHis ₃₈), Β συναρτήσεις αυτοσυσχέτισης: πλήρως αποπροστατευμένο πολυμερές (mPEO ₁₁₄ -b-PCys ₇ -b-PHis ₃₈)
Εικόνα 45: Συνάρτηση αυτοσυσχέτισης για συγκέντρωση δείγματος 0.06 mg/mL
Εικόνα 46: Συντελεστής διάχυσης για την κύρια διαδικασία αυτοοργάνωσης συναρτήσει q ²
Εικόνα 47: Φάσματα FT-IR κατά την πορεία προστασίας του καρβοξυ-τελικού άκρου της κυστεΐνης. Α: πρόδρομο αμινοξύ, Β: 30 λεπτά μετά την προσθήκη του μέσου χλωρίωσης SOCl ₂
Εικόνα 48: Φάσμα ¹ HNMR σε D_2O για το μείγμα της αντίδρασης που περιέχει
S-tert-butyl-mercapto-L-Cysteine Methyl Ester Hydrochloride (V) kal S-tert- butyl-mercapto-L-Cysteine Hydrochloride (VI)
Εικόνα 49: Φάσιματα ¹ ΗΝΜΡ σε D ₂ Ο Α νοάφοιμα: Μείνμα αντίδοασος ποιν
την απομόνωση του τελικού προϊόντος (V). Β νράφημα: πρόδρομο αμινοξύ Η-
(StBu)Cys-OH (I)

Εικόνα 50: Φάσματα ¹HNMR σε CDCl₃ του τελικού προϊόντος S-tert-butylmercapto-L-Cysteine Methyl Ester (VII).....151 Εικόνα 51: Φάσμα ¹HNMR σε D₂O/DCI 2% του ομοπολυμερούς Cys-PHis 153 Εικόνα 52: Φάσμα ¹HNMR COSY 2D σε D₂O/DCI 2% του ομοπολυμερούς Εικόνα 53: Φάσμα ¹HNMR σε D₂O/DCI 1% του πλήρως αποπροστατευμένου ομοπολυμερούς Cys-PHis155 Εικόνα 54: Φάσμα ¹HNMR COSY 2D σε D₂O/DCI 1% του πλήρως Εικόνα 55: Χρωματογράφημα αποκλεισμού μεγεθών (GPC) σε διαφορετικό Εικόνα 56: Δομές Ομοπολυμερούς στα δείγματα GPC. Α: Μερικώς αποπροστατευμένο ομοπολυμερές (ροζ χρωματογράφημα), Β: Διμερές Ομοπολυμερούς και πλήρως αποπροστατευμένο ομοπολυμερές (μαύρο, κόκκινο, μπλε, πράσινο χρωματογράφημα).....157 Εικόνα 57: Φάσματα FT-IR για το τρισυσταδικό συμπολυμερές mPEO₁₁₄-b-PCys11-PHis35. Φάσμα Α: 5 ημέρες μετά την έναρξη του πολυμερισμού της πολυκυστεΐνης, Φάσμα Β: Μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού της πολυϊστιδίνης, Φάσμα C: Πλήρως αποπροστατευμένο συμπολυμερές mPEO₁₁₄-b-PCys₁₁-PHis₃₅.....165 Εικόνα 58: Φάσμα ¹HNMR για το μερικώς αποπροστατευμένο συμπολυμερές mPEO₁₁₄-b-PtBMLCys₁₁-b-PHis₃₅. Μέτρηση με χρήση μείγματος διαλυτών

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Περιοχές απορρόφησης χαρακτηριστικών λειτουργικών ομάδων σε cm ⁻¹ 70
Πίνακας 2: Χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις στη φασματοσκοπία ¹ HNMR (ppm)
Πίνακας 3: Ποσότητες αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση του εκάστοτε συμπολυμερούς και τελικές μάζες που συλλέχθησαν 92
Πίνακας 4: Αντιστοίχιση Χαρακτηριστικών Δονήσεων και Κυματαριθμών: Φάσμα Α: Πρόδρομο αμινοξύ Η-(StBu)-Cys-OH, Φάσμα Β: 45 λεπτά μετά την προσθήκη τριφωσγενίου στην αντίδραση, Φάσμα C: Τελικός tBM-L-Cys NCA
Πίνακας 5: Αντιστοίχιση Χαρακτηριστικών Δονήσεων και Κυματαριθμών για το Πρόδρομο αμινοξύ Boc-His(trt)-OH (Φάσμα Α), για το N ^{im} -Trt-L-His NCA*HCl (Φάσμα Β) και για τον τελικό N ^{im} -Trt-L-His NCA (Φάσμα C)116
Πίνακας 6: Αντιστοίχιση Χαρακτηριστικών Δονήσεων και Κυματαριθμών. Φάσμα Α: μία μέρα πριν την ολοκλήρωση του πολυμερισμού της πρώτης συστάδας, Φάσμα Β: Κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού της PHis, Φάσμα C: Μετά την καταβύθιση σε διαιθυλαιθέρα, πλήρως προστατευμένο συμπολυμερές, Φάσμα D: Πλήρως αποπροστατευμένο συμπολυμερές120
Πίνακας 7: Αντιστοίχιση χημικών μετατοπίσεων-χαρακτηριστικών υδρογόνων στη μέτρηση με D ₂ O/DCI 1%. Φάσμα Α: Συμπολυμερές mPEO ₁₁₄ -b-PCys ₇ - PHis ₃₈ , Φάσμα Β: Συμπολυμερές mPEO ₁₁₄ -b-PtBMLCys ₇ -PHis ₃₈ 130
Πίνακας 8: Επιθυμητές συνθήκες μελέτης αυτοοργάνωσης133
Πίνακας 9: Αντιστοίχιση Χαρακτηριστικών Δονήσεων και Κυματαριθμών για το Πρόδρομο αμινοξύ H-(tBM)Cys-OH (Φάσμα A) και S-tert-butyl-mercapto-L- Cysteine Methyl Ester Hydrochloride (Φάσμα B)
Πίνακας 10: Μοριακά Χαρακτηριστικά Ομοπολυμερούς Cys-PHis 6K σύμφωνα με το GPC158

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία διπλώματος ειδίκευσης εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιομηχανικής Χημείας (Εργαστήριο Πολυμερών) του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών με επιβλέποντα των Καθηγητή Ερμόλαο Ιατρού.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η σύνθεση διπλά αποκρινόμενων δικτυωμένων υβριδικών τρισυσταδικών συμπολυμερών και η μέλετη της αυτοοργάνωσής τους με απότερο σκοπό της χρήση τους ως νανομεταφορείς υδρόφοβων καρκινικών φαρμάκων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τις τελευταίες δεκαετίες η επιστημονική-ερευνητική κοινότητα προκειμένου να σχεδιάσει και να συνθέσει νέα, καινοτόμα υλικά έχει στραφεί σε μηχανισμούς που ακολουθεί η ίδια η Φύση. Ακολουθώντας διεργασίες της Φύσης, ή καλύτερα μιμούμενοι αυτές, ολοένα και αυξάνεται ο αριθμός των νέων ερευνητικών επιτευγμάτων που βρίσκουν εφαρμογές στην καθημερινότητά μας.

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η κυτταρική μεμβράνη. Η κυτταρική μεμβράνη είναι η εξωτερική μεμβράνη που περιβάλλει το κύτταρο και το διαχωρίζει από το εξωτερικό του περιβάλλον. Κατά κύριο λόγο αποτελείται από ένα διπλό στρώμα φωσφολιπιδίων τα οποία αποτελούνται από μία υδρόφιλη κεφαλή και μία ή δύο υδρόφοβες ουρές. Η λιπιδική διπλοστιβάδα αυτοοργανώνεται αυθόρμητα με στόχο τη διαμερισματοποίηση του κυττάρου.



Εικόνα 1: Απεικόνιση κυτταρικής μεμβράνης. Επισημαίνονται οι υδρόφοβες ουρές των λιπιδίων και οι υδρόφιλες κεφαλές τους.

Τα λιπίδια αντιπροσωπεύονται από αμφίφιλο χαρακτήρα, δηλαδή αποτελούνται από ένα υδρόφιλο και ένα υδρόφοβο τμήμα. Αυτό το χαρακτηριστικό των λιπιδίων ενέπνευσε την ερευνητική κοινότητα να στραφεί στη σύνθεση καλά καθορισμένων βιοσυμβατών και βιοδιασπώμενων αμφίφιλων δομών με στόχο την επιτυχημένη μεταφορά φαρμάκων σε καρκινικούς ιστούς. Λόγω των ισχυρών υδρόφοβων/υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων, οι αμφίφιλοι νανομεταφορείς χαρακτηρίζονται από σταθερή δομή και ικανότητα εγκλωβισμού υδρόφοβων φαρμάκων στο εσωτερικό τους. Τα πολυπεπτίδια, είναι από τα κυριότερα πολυμερή αυτής της κατηγόριας, και πλήθος ερευνών έχουν διενεργηθεί πάνω στη σύνθεση, τη 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.

Μέχρι και σήμερα, η αποδοτικότερη και γρηγορότερη τεχνική για τη σύνθεση καλά καθορισμένων πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους χωρίς συγκεκριμένη αλληλουχία, αποτελεί ο πολυμερισμός μέσω διάνοιξης δακτυλίου (ring-opening polymerization, ROP) των Ν-καρβοξυ-ανυδριτών των α-αμινοξέων (N-carboxy anhydrides, NCAs). Η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόστηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας για τη σύνθεση υβριδικών τρισυσταδικών συμπολυμερών του γενικού τύπου mPEO₁₁₄-b-PCys_m-b-PHis_n αφού πρώτα προηγήθηκε η σύνθεση των αντίστοιχων προστατευμένων Ν-καρβοξυ ανυδριτών (NCAs).

Ως μακροαπαρχητής χρησιμοποιήθηκε το mPEO114NH2 και το οποίο αποτέλεσε το εξωτερικό υδρόφιλο τμήμα των νανοδομών. Ο συγκεκριμένος χαρακτηρίζεται βιοαποικοδομησιμότητα μακροαπαρχητής από και βιοσυμβατότητα και είναι υλικό εγκεκριμένο από τον FDA. Αντίστοιχα, ο πυρήνας των νανοδομών αποτελείται από την pH-αποκρίσιμη πολυϊστιδίνη. Η πολυϊστιδίνη, στην περιοχή pH=5.0-6.5 (όσο δηλαδή και το pH των καρκινικών ιστών), πρωτονιώνεται σε αντίθεση με τιμές του pH=7.4 (όσο δηλαδή του που αποπρωτονιώνεται. Έτσι, εναλλάσσει αίματος) υδρόφιλη/υδρόφιλη συμπεριφορά ανάλογα Jμ то περιβάλλον της επιτρέποντας έτσι τη δημιουργία σταθερών δομών ή την κατάρρευσή τους. Τέλος, ως ενδιάμεση συστάδα επιλέχθηκε η πολυκυστεΐνη η οποία λόγω των θειολών που περιέχει επιτρέπει στο σύστημα τη δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών που προσδίδουν επιπλέον σταθερότητα, εξασφαλίζουν επιτυχία στην αυτοοργάνωση αποφεύγοντας την ύπαρξη ελεύθερων αλυσίδων και προσδίδουν redox-αποκρισιμότητα. Πιο συγκεκριμένα, οι δισουλφιδικές

27

γέφυρες της πολυκυστεΐνης εφόσον εκτεθούν σε συνθήκες υγιούς ιστού δεν επηρεάζονται καθώς η συγκέντρωση του αναγωγικού τριπεπτιδίου της γλουταθειόνης (GSH) ισούται περίπου με 0.2 mM. Όταν όμως εκτεθούν σε περιβάλλον όπως τα καρκινικά κύτταρα όπου η συγκέντρωση της GSH αγγίζει τα 10 mM, τότε οι δισουλφιδικοί δεσμοί σπάνε και σε συνδυασμό με την υδρόφιλη πολυϊστιδίνη οδηγούν στην πιθανή αποδέσμευση καρκινικού φαρμάκου.



Εικόνα 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

Οι πρωτεΐνες ανήκουν στην οικογένεια των βιομορίων μαζί με τα νουκλεϊκά οξέα, τους υδατάνθρακες και τα λιπίδια. Είναι πολυλειτουργικά μακρομόρια που βρίσκονται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς και διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο σε όλες σχεδόν τις βιολογικές διεργασίες. Παράδειγμα αυτών των διεργασιών αποτελεί η ενζυμική κατάλυση καθώς τα ένζυμα είναι εξειδικευμένες πρωτεΐνες, η μεταφορά και αποθήκευση μικρών μορίων και ιόντων όπως το οξυγόνο, η κίνηση και η μηχανική υποστήριξη όπως η κίνηση των μυών και η υψηλή αντοχή του δέρματος και των οστών λόγω της πρωτεΐνης του κολλαγόνου και η ανοσολογική προφύλαξη λόγω των αντισωμάτων που είναι εξειδικευμένες πρωτεΐνες και συνδέονται με ιούς και βακτήρια.

Οι δομικοί λίθοι των πρωτεϊνών είναι τα αμινοξέα. Στη φύση υπάρχουν 20 διαφορετικά αμινοξέα, που όλα αποτελούνται από μια βασική αμινομάδα, μια όξινη καρβοξυλομάδα, ένα άτομο υδρογόνου και μια χαρακτηριστική ομάδα R, η οποία ονομάζεται και πλευρική αλυσίδα και διαφέρει για κάθε αμινοξύ. Οι τέσσερις διαφορετικές ομάδες βρίσκονται συνδεδεμένες σε ένα κεντρικό άτομο άνθρακα, των α-άνθρακα. Με εξαίρεση το απλούστερο αμινοξύ, τη γλυκίνη, στο οποίο η ομάδα R είναι το υδρογόνο, τα υπόλοιπα α-αμινοξέα είναι χειρόμορφα (chiral) καθώς ο α-άνθρακας είναι στερεογονικό κέντρο. Οι δύο εναντιομερείς μορφές είναι το L- ισομερές και το D-ισομερές, όμως στη φύση υπάρχουν μόνο τα L-αμινοξέα (Εικόνα 3)¹.



Εικόνα 3: Τα L- και D- ισομερή των α-αμινοξέων¹

Τα αμινοξέα εμφανίζονται με τη μορφή διπολικών ή αμφοτερικών ιόντων (zwitterions), στα οποία η αμινομάδα είναι πρωτονιωμένη (-NH₃⁺) και η καρβοξυλομάδα είναι αποπρωτονιωμένη (-COO⁻). Ανάλογα με το pH του περιβάλλοντος διαφοροποιείται και ο βαθμός ιοντισμού ενός αμινοξέος. Έτσι, σε όξινο διάλυμα, το καρβοξυλικό ανιόν (-COO⁻) πρωτονιώνεται και τα αμινοξέα εμφανίζονται ως κατιόντα. Αντίθετα, σε βασικό διάλυμα, το κατιόν αμμωνίου (-NH₄⁺) αποπρωτονιώνεται και επομένως τα αμινοξέα εμφανίζονται ως ανιόντα. Σε ενδιάμεση τιμή pH, επέρχεται ισορροπία ανάμεσα στην ανιοντική και κατιοντική μορφή και έτσι το αμινοξύ βρίσκεται στην ουδέτερη μορφή του διπολικού ιόντος. Η τιμή αυτή του pH ονομάζεται ισοηλεκτρικό

Όπως προαναφέρθηκε, οι πρωτεΐνες είναι πολυδύναμα μακρομόρια με πολλαπλούς βιολογικούς ρόλους. Η ιδιότητα αυτή οφείλεται στα 20 διαφορετικά αμινοξέα, δηλαδή, στα 20 είδη πλευρικών ομάδων, τα οποία διαφέρουν ως προς το μέγεθος, το σχήμα, το φορτίο, τη δεσμευτική συγγένεια υδρογόνου, την υδροφοβικότητα και τη χημική δραστικότητα (Εικόνα 4)².



Εικόνα 4: Τα 20 βασικά αμινοξέα²

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 5)³.Πολλά αμινοξέα ενώνονται διαδοχικά μέσω πεπτιδικών δεσμών δημιουργώντας μια πολυπεπτιδική αλυσίδα. Η συνένωση δύο αμινοξέων δημιουργεί ένα διπεπτίδιο, η συνένωση τριών αμινοξέα ονομάζονται πεπτίδια κ.ο.κ. Οι αλυσίδες με λιγότερα από 50 αμινοξέα ονομάζονται πεπτίδια, ενώ ο όρος πρωτεΐνες χρησιμοποιείται για τις μεγαλύτερες αλυσίδες.



Εικόνα 5: Δημιουργία πεπτιδικού δεσμού³

Ο πεπτιδικός δεσμός είναι βασικά επίπεδος. Η επίπεδη φύση του εξηγείται από το χαρακτήρα διπλού δεσμού του αμιδικού δεσμού, ο οποίος αποτρέπει την περιστροφή γύρω από τον εαυτό του περιορίζοντας τις στερεοδιατάξεις του πεπτιδικού κορμού. Η περιστροφή γύρω από το δεσμό C-N είναι εφικτή μόνο όταν προσφερθεί ενέργεια, γι' αυτό και οι πεπτιδικοί δεσμοί είναι αρκετά σταθεροί κινητικά, αλλά όχι και θερμοδυναμικά¹.

2.2. Επίπεδα οργάνωσης πρωτεϊνών

Στις πρωτεΐνες διακρίνονται τέσσερα επίπεδα οργάνωσης, η πρωτοταγής δομή, η δευτεροταγής δομή, η τριτοταγής δομή και η τεταρτοταγής δομή. Παρακάτω αναλύεται ξεχωριστά κάθε ένα από τα επίπεδα οργάνωσης¹.

2.2.1 Πρωτοταγής Δομή

Το πρώτο επίπεδο οργάνωσης της δομής μια πρωτεΐνης αναφέρεται ως πρωτοταγής δομή και περιλαμβάνει την αλληλουχία και τον αριθμό των αμινοξέων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Είναι δηλαδή ο τρόπος με τον οποίο τα αμινοξέα συνδέονται μεταξύ τους (Εικόνα 6)⁴.



Εικόνα 6: Πρωτοταγής Δομής Πρωτεϊνών⁴

2.2.2 Δευτεροταγής Δομή

Η ανάπτυξη δεσμών υδρογόνου μεταξύ γειτονικών αμινοξέων, ή περιοχών της ίδιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας, ή παραπλήσιων πεπτιδικών αλυσίδων και η επακόλουθη τοπική αναδίπλωσή της, συνιστά τη δευτεροταγή δομή. Η δευτεροταγής δομή καθορίζεται τοπικά, αυτό σημαίνει ότι πολλά διαφορετικά είδη αναδιπλώσεων μπορούν να συνυπάρχουν στην ίδια πολυπεπτιδική αλυσίδα.

Οι Pauling και Corey το 1951 παρατήρησαν ότι δύο κυρίως τύποι αναδίπλωσης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας εμφανίζονται συχνά σε περιοχές των πρωτεϊνών. Ο πρώτη μορφή αναδίπλωσης ονομάζεται α-έλικα και δεύτερη, β-πτυχωτή δομή ή αλλιώς β-φύλλο. Οι αναδιπλώσεις οφείλονται σε δεσμούς υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ των ομάδων CO και NH των πεπτιδικών δεσμών, χωρίς να εμπλέκονται οι πλευρικές αλυσίδες.

ο Η α-έλικα

Στην α-έλικα (α-helix) ο κορμός της πολυπεπτιδικής αλυσίδας έχει σχήμα σπειράματος και οι πλευρικές ομάδες εκτείνονται προς τα έξω σε μια ελικοειδή διάταξη. Οι δεσμοί υδρογόνου που δημιουργούνται είναι ενδομοριακοί και σχεδόν παράλληλοι προς τον κυρίως άξονα της έλικας, σταθεροποιώντας έτσι τη δομή και κρατώντας σε σταθερή θέση τις περιστροφές της έλικας. Η έλικα κάνει μία περιστροφή κάθε 3,6 αμινοξέα, φέρνοντας κοντά τους πεπτιδικούς δεσμούς κάθε τέταρτου αμινοξέος. Στη δομή αυτή όλες οι ομάδες CO και NH του πολυπεπτιδικού κορμού συνδέονται με υδρογονικούς δεσμούς, εκτός από εκείνες που βρίσκονται στα άκρα της έλικας. Η στροφή της έλικας μπορεί να είναι δεξιόστροφη ή αριστερόστροφη (Εικόνα 7)⁵. Οι δεξιόστροφες έλικες είναι **Σ3**Λ3ΗΛΟΟΛΠ3 ενεργειακά λόγω των περιορισμένων πιο στερικών συγκρούσεων μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων και του κορμού. Όλες οι αέλικες που απαντούν στις πρωτεΐνες είναι δεξιόστροφες. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι α-έλικες σε πολυπεπτίδια μεγάλου μήκους δεν είναι απόλυτα τέλειες αλλά περιέχουν «σπασίματα» (ατέλειες). Η λυσίνη, η ιστιδίνη, το γλουταμικό, η αλανίνη και η λευκίνη είναι μερικά αμινοξέα που δημιουργούν δομή α-έλικας.



Εικόνα 7: Δευτεροταγής δομή πρωτεϊνών. Μπλε σχέδιο: β-πτυχωτή επιφάνεια, Πράσινο σχέδιο: α-έλικα⁵

Η β-πτυχωτή επιφάνεια

Μια β-επιφάνεια, ή β-φύλλο (β-sheet) δημιουργείται όταν δύο ή περισσότερες β-πτυχώσεις συνδεθούν με δεσμούς υδρογόνου. Οι υδρογονικοί δεσμοί αναπτύσσονται είτε ενδομοριακά, είτε μεταξύ κοντινών πολυπεπτιδικών αλυσίδων ή ομάδων τους. Η β-επιφάνεια είναι σχεδόν απόλυτα απλωμένη σε σύγκριση με το σφιχτό σπείραμα της α-έλικας. Οι διαδοχικές β-πτυχώσεις μπορεί να έχουν την ίδια κατεύθυνση (παράλληλη β-επιφάνεια) ή αντίθετη κατεύθυνση (αντιπαράλληλη β-επιφάνεια). Στην αντιπαράλληλη β-επιφάνεια οι ομάδες NH και CO ενός αμινοξέος συνδέονται αντίστοιχα με δεσμούς υδρογόνου με τις ομάδες CO και NH του αμινοξέος της γειτονικής βπτύχωσης (Εικόνα 7)⁵. Στην παράλληλη β-επιφάνεια η ομάδα NH κάθε αμινοξέος συνδέεται στο CO του αμινοξέος της γειτονικής β-πτύχωσης, ενώ η ομάδα CO συνδέεται στο CO του αμινοξέος που βρίσκεται δύο κατάλοιπα πιο κάτω στην αλυσίδα (Εικόνα 7)⁵. Οι β-επιφάνειες μπορεί να είναι καθαρά παράλληλες, αντιπαράλληλες ή και μικτές. Παρουσιάζουν μεγαλύτερη ποικιλία από τις α-έλικες και μπορεί να είναι σχετικά ευθείες, αν και οι περισσότερες εμφανίζονται με την κάθε πτύχωση ελαφρά στριμμένη. Στα σχηματικά διαγράμματα παρουσιάζονται ως φαρδιά βέλη με κατεύθυνση προς το καρβοξυ-τελικό άκρο. Η βαλίνη, η ισολευκίνη, η φαινυλαλανίνη και η τυροσίνη είναι μερικά από τα αμινοξέα που δημιουργούν δομή β-φύλλου.

ο Η β-στροφή

Η β-στροφή (β-turn), γνωστή και ως στροφή αναστροφής ή κάμψη φουρκέτας, είναι η διάταξη εκείνη που έχει η πρωτεΐνη, στις περιπτώσεις εκείνες όπου η πολυπεπτιδική αλυσίδα πρέπει να καμπυλωθεί για να αλλάξει κατεύθυνση. Έτσι, υπάρχουν τέσσερα αμινοξέα που διευθετούνται στο χώρο κατάλληλα, ώστε να αντιστραφεί η αρχική κατεύθυνση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας κατά 180⁰. Η δομή αυτή σταθεροποιείται με μία γέφυρα υδρογόνου που αναπτύσσεται μεταξύ του πρώτου και του τέταρτου αμινοξέος (Εικόνα 6)¹. Τα αμινοξέα γλυκίνη, ασπαραγίνη και προλίνη έχουν την τάση να βρίσκονται σε στροφές.



Εικόνα 6: Η β-στροφή¹

ο Η ω-θηλιά

Οι ω-θηλιές (ω-loops) είναι πιο πολύπλοκες δομές, μέσω των οποίων επίσης επιτυγχάνεται αναστροφή της αλυσίδας. Οι στροφές και οι θηλιές βρίσκονται κυρίως στην επιφάνεια των πρωτεϊνών έχουν σταθερές και απόλυτα καθορισμένες δομές, όμως δεν έχουν κανονικές περιοδικές δομές όπως οι αέλικες και οι β-επιφάνειες.

2.2.3 Τριτοταγής δομή

Η τριτοταγής δομή μιας πρωτεΐνης αναφέρεται στη συνολική διαμόρφωση μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας στο χώρο, ώστε να σχηματιστεί η συμπαγής δομή της. Αυτή η δομή είναι αποτέλεσμα ασθενών κυρίως δεσμών, όπως δεσμών υδρογόνου, ιοντικών δεσμών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων. Επίσης, σε ορισμένες περιπτώσεις η στερεοδομή σταθεροποιείται με δισουλφιδικούς δεσμούς.



Εικόνα 8: Τριτοταγής Δομή⁶

2.2.4 Τεταρτοταγής δομή

Η τεταρτοταγής δομή είναι ένα επιπλέον επίπεδο οργάνωσης αρκετών πρωτεϊνών και αναφέρεται στις πρωτεΐνες που αποτελούνται από δύο ή περισσότερες πολυπεπτιδικές αλυσίδες και στο πώς αυτές διατάσσονται στο χώρο.


Εικόνα 9: Τεταρτοταγής Δομή⁶

2.3. Πεπτιδική σύνθεση

2.3.1 Σύνθεση πεπτιδίων μικρού μοριακού βάρους και με καθορισμένη αλληλουχία

Η σύνθεση των πεπτιδίων μικρού μοριακού βάρους με καθορισμένη αλληλουχία αμινοξέων, είναι πολύ σημαντική γιατί βρίσκει εφαρμογές σε μελέτες με φαρμακευτικό και ιατρικό ενδιαφέρον. Η σύνθεση αυτού του είδους των πεπτιδίων είναι δύσκολη, απαιτητική και δαπανηρή διαδικασία, εντούτοις λαμβάνει χώρα μέσω των ακόλουθων επικρατέστερων μεθόδων⁷.

Σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση (Μέθοδος Merrifield)

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

Σύνθεση σε διάλυμα

Ένα αμινοξύ προσκολλημένο σε ένα διαλυτό πολυμερές, από την καρβοξυλική του ομάδα μπορεί να ακυλιωθεί 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 για να απομακρυνθούν όσα από τα αντιδρώντα δεν αντέδρασαν, και παραπροϊόντα. Το καθαρό προϊόν επαναδιαλύεται, αποπροστατεύεται, ακυλιώνεται ξανά σε διάλυμα κ.ο.κ. 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.

2.3.2 Σύνθεση Πολυπεπτιδίων Μεγάλου Μοριακού Βάρους

Η σύνθεση πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους χωρίς συγκεκριμένη αλληλουχία παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς τα συγκεκριμένα πολυμερή έχουν την ικανότητα να αναδιπλώνονται και να αποκτούν δευτεροταγή δομή ανάλογη με αυτή των πρωτεϊνών που προάγει την αυτοοργάνωσή 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 Ν-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≤1.2), έτσι ώστε τα πολυπεπτίδια να αυτοοργανώνονται σε καλά καθορισμένες νανοδομές, μεταφέροντας με αυτό τον τρόπο τις επιθυμητές ιδιότητες στη μακρο-κλίμακα^{8,9,10,11}.

2.3.3 Πολυμερισμός Διάνοιξης Δακτυλίου (Ring-Opening Polymerization, ROP)^{12,13}

Ο πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου αποτελεί, μαζί με τον ανιοντικό και ριζικό πολυμερισμό, μία από τις τρεις βασικές πορείες για τη σύνθεση των πιο σημαντικών για τη ζωή πολυμερών του 21^{ου} αιώνα. Ειδικότερα, ο πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου έχει αποδειχθεί ότι είναι μία εξαιρετικά χρήσιμη συνθετική πορεία για την παρασκευή τεχνολογικά προηγμένων πολυμερών με εξειδικευμένες και ελεγχόμενες ιδιότητες, όπως βιοδιασπώμενα πολυμερή για εφαρμογή στην καλλιέργεια, καθώς και πολυμερή με ιατροβιολογικές και φαρμακευτικές εφαρμογές.

Μερικά είδη πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου μπορούν να θεωρηθούν ως τύποι αλυσωτού πολυμερισμού, με την έννοια ότι γίνεται προσθήκη μονομερούς στο τελικό άκρο της αναπτυσσόμενης πολυμερικής αλυσίδας, όμως οι περισσότερες αντιδράσεις είναι πιο πολύπλοκες και λαμβάνουν χώρα μέσω διαφορετικών μηχανισμών όπως για παράδειγμα μέσω ενεργοποιημένου μονομερούς. Σε κάθε περίπτωση η κινητήριος δύναμη στον ROP αποτελεί η αυξημένη τάση διάνοιξης δακτυλίου (ring strain) του μονομερούς και οι στερεοχημικές αλληλεπιδράσεις που μπορεί να την συνοδεύουν, σε αντίθεση με τα άλλα είδη πολυμερισμού στα οποία το έναυσμα δίνεται από τη μετατροπή των πολλαπλών δεσμών σε απλούς. Συνήθως, ο πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου δεν συνοδεύεται από την παραγωγή μικρών μορίων με εξαίρεση τον ROP των Ν-καρβοξυ ανυδριτών (ή ανυδρίτες Leuchs) και τον ROP του μονομερούς 2,2-diphenyl-4-methylene-1,3-dioxolane. Όλοι οι τύποι πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου έχουν ως κοινό το γεγονός ότι τα μονομερή είναι κυκλικά μόρια, όμως ο λόγος που καθένα από αυτά μπορεί να πολυμεριστεί διαφέρει. Γενικότερα, τα μονομερή πρέπει να φέρουν μία κινητικά δραστική ομάδα που να μπορεί να αντιδράσει εύκολα και επίσης η τάση διάνοιξης του δακτυλίου πρέπει να είναι μεγάλη. Δακτύλιοι που αποτελούνται από 3, 4 ή 8, 9 άτομα, έχουν μεγάλη τάση δακτυλίου και ευνοείται η διάνοιξή τους, εξαιτίας της απώλειας ενθαλπίας, η οποία συνδέεται με την απώλεια της τάσης του δακτυλίου. 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. Επιπλέον, σε δακτυλίους που περιέχουν δισουλφιδικούς δεσμούς, καρβονύλιο ή ομάδες Si, ένα επιπρόσθετο φαινόμενο που οδηγεί στον πολυμερισμό τους μέσω διάνοιξης δακτυλίου είναι η αυξημένη ελευθερία περιστροφής αυτών των ομάδων στην τελική γραμμική αλυσίδα, η οποία οδηγεί σε αύξηση της

εντροπίας. Ανάλογα με τον μηχανισμό με τον οποίο πραγματοποιείται 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), με τη χρήση καταλυτών μετάθεσης. Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι πολλά πολυμερή βιομηχανικής σημασίας παρασκευάζονται μέσω του ROP, όπως για παράδειγμα το πολυαιθυλενοξείδιο, το πολυνορβορνένιο, η πολυσιλοξάνη κ.α.¹⁴



Σχήμα 1: Χαρακτηριστικά παραδείγματα R.O.P μονομερών.

2.3.4 Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (ROP) των Ν-καρβοξυ ανυδριτών (NCAs) των α- αμινοξέων^{9,10,11,15}

Τα τελευταία χρόνια, έχει εκδηλωθεί μεγάλο ενδιαφέρον για τη σύνθεση πολυπεπτιδικών πολυμερών. Τα συνθετικά πολυπεπτίδια, ως μιμητές των φυσικών αναλόγων τους των πρωτεϊνών, έχουν τη δυνατότητα να αποκτούν σταθερές δευτεροταγείς δομές σε διάλυμα (β-πτυχωτή δομή, α-έλικα, κ.α.) εξαιτίας των δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται. Αυτές οι δευτεροταγείς δομές, σε συνδυασμό με τις υδρόφοβες και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αμινοξέων, συνεισφέρουν σημαντικά στην ικανότητα αυτοοργάνωσης των πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Αυτή η ικανότητα των πολυπεπτιδίων να αυτοοργανώνονται σε διάλυμα έχει ανοίξει νέους ορίζοντες

για βιοϊατρικές και φαρμακευτικές εφαρμογές αυτών των υλικών, όπως για παράδειγμα η χρήση τους ως μεταφορείς φαρμάκων, ως βιοαισθητήρες, ως διαγνωστικά μέσα, στη μηχανική ιστών κ.α.

Η σύνθεση πολυπεπτιδικών αλυσίδων μπορεί να πραγματοποιηθεί με πολλές μεθόδους, κάθε μία από τις οποίες παρουσιάζει ορισμένα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Η απευθείας σύνθεση πολύπλοκων συμπολυπεπτιδίων από μονομερή αμινοξέων αποτελεί μία απλή διαδικασία, όμως δεν μπορεί να αποδώσει πολυπεπτίδια μεγάλου μοριακού βάρους. Συγκεκριμένα, η συμβατική μέθοδος πεπτιδικής σύνθεσης στερεάς-φάσης δεν είναι χρήσιμη και πρακτική για την παρασκευή πολυπεπτιδίων απο 100 κατάλοιπα αμινοξέων, εξαιτίας των πολλαπλών αποπροστασιών και σταδίων σύζευξης. Η καλύτερη, γρηγορότερη και πιο οικονομική τεχνική για τη σύνθεση πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους, χωρίς συγκεκριμένη αλληλουχία και χωρίς ρακεμείωση των χειρόμορφων κέντρων αποτελεί ο πολυμερισμός των Ν-καβοξυ ανυδριτών (N-carboxy anhydrides NCAs) των α-αμινοξέων. Επιπλέον, ο μεγάλος αριθμός των NCAs (>200) που έχει συντεθεί, αντανακλά και στην εξαιρετική ποικιλία των διαφορετικών πολυπεπτιδικών δομών που μπορούν να παρασκευατούν.

Ο πολυμερισμός των NCAs των α-αμινοξέων λαμβάνει χώρα, όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, μέσω του μηχανισμού διάνοιξης δακτυλίου (ROP). Στο μηχανισμό αυτό, σε κάθε στάδιο προσθήκης ενός μονομερούς, απελευθερώνεται ένα μόριο CO₂, όπως παρουσιάζεται και στην παρακάτω γενική αντίδραση:



Σχήμα 2: Αντίδραση πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου (ROP) των NCAs

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) ^{9,11,16,17}.

2.3.4.1 Κανονικός Μηχανισμός Αμινών (Normal Amine Mechanism, NAM)

Ο μηχανισμός αυτός εφαρμόζεται στον πολυμερισμό των NCAs με χρήση μη ιοντικών απαρχητών, οι οποίοι διαθέτουν τουλάχιστον ένα ευκίνητο άτομο υδρογόνου (του τύπου βάση-Η), όπως είναι οι πρωτοταγείς και δευτεροταγείς αμίνες (π.χ. n-εξυλαμίνη, διμεθυλαμίνη), οι αλκοόλες και το νερό. Τα στάδια της έναρξης και της διάδοσης του πολυμερισμού μέσω αυτού του μηχανισμού παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.

<u>Στάδιο έναρξης</u>



Σχήμα 3: Στάδια έναρξης και διάδοσης του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των Ν-καρβοξυ ανυδριτών μέσω του κανονικού μηχανισμού αμινών (NAM). Η έναρξη βασίζεται στην πυρηνόφιλη προσβολή του απαρχητή στο καρβονύλιο στη θέση 5' του ανυδρίτη. Στη συνέχεια, το ασταθές ενδιάμεσο καρβαμιδικό οξύ που παράγεται αποκαρβοξυλιώνεται για να δώσει μια νέα ελεύθερη αμινομάδα, η οποία προωθεί 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 ως απαρχητές δίνουν τα καλύτερα αποτελέσματα, σε ότι αφορά τη συμφωνία μεταξύ του θεωρητικά υπολογιζόμενου στοιχειομετρικού μοριακού βάρους και αυτού που λαμβάνεται πειραματικά. 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, οδηγώντας σε πολυπεπτίδια με στενές κατανομές μοριακών βαρών.

Οι διάφορες ερευνητικές ομάδες έχουν διαπιστώσει ότι, εκτός από την επιθυμητή αντίδραση που παίρνουμε με τις πρωτοταγείς αμίνες, υπάρχουν αποκλίσεις από τον ζωντανό χαρακτήρα του ROP των NCAs, καθώς επίσης και από τη σύνθεση πολυπεπτιδίων μεγάλων μοριακών βαρών. Οι παράγοντες στους οποίους οφείλονται οι αποκλίσεις από τον ζωντανό χαρακτήρα αυτού του είδους πολυμερισμού 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).

Συγκεκριμένα, το ενδιάμεσο καρβαμιδικό οξύ παίζει σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό NAM. Ο Ballard παρουσίασε τα ιδιαίτερα κινητικά χαρακτηριστικά του πολυμερισμού του NCA της σαρκοσίνης (Sar-NCA) σε νιτροβενζόλιο και παρατήρησε ότι το καρβαμιδικό οξύ σχηματίζει άλας με τις αμινομάδες των αναπτυσσόμενων αλυσίδων, παρεμποδίζοντας έτσι τις αλυσίδες να συνεχίσουν τη διάδοση. Το φαινόμενο εξαφανίζεται όταν ο πολυμερισμός γίνεται σε διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF). Το DMF έχει μεγαλύτερη οξύτητα σε σχέση με το νιτροβενζόλιο, η οποία μειώνει τη βασικότητα του ενεργού κέντρου της αμίνης, παρεμποδίζοντας έτσι το σχηματισμό άλατος. Επιπλέον, η πίεση στην οποία λαμβάνει χώρα η αντίδραση, αποτελεί έναν ακόμη

παράγοντα που επηρεάζει την κινητική της αντίδρασης. Συγκεκριμένα, υπό σταθερή πίεση (συνεχής απομάκρυνση του CO₂ από το διαλύτη), το καρβαμιδικό οξύ είναι ασταθές και επομένως παρατηρείται κινητική 1^{ης} τάξης, ενώ όταν η αντίδραση πραγματοποιείται χωρίς απομάκρυνση του CO₂, σχηματίζονται άλατα του καρβαμιδικού οξέος και ευνοούνται διαφορετικές κινητικές.

Ένα άλλο σημείο κλειδί στο ROP είναι η καθαρότητα των NCAs, όπως έχει τονιστεί από πολλούς ερευνητές. Το νερό είναι η πιο κοινή ακαθαρσία που μπορεί να επηρεάσει τον πολυμερισμό των NCAs. Σύμφωνα με διάφορους επιστήμονες η αντίδραση των NCAs καταλήγει σε σχηματισμό πολυπεπτιδίων όταν ο λόγος NCA/H₂O είναι μεγαλύτερος από 10, ενώ λαμβάνει χώρα πλήρης υδρόλυση όταν ο λόγος είναι μικρότερος από 10⁻³. Ενδιάμεσοι λόγοι ευνοούν το σχηματισμό ολιγοπεπτιδίων. Η υδρόλυση των NCAs επηρεάζεται επίσης από τη θερμοκρασία του συστήματος και μάλιστα σε χαμηλή θερμοκρασία είναι πιο αργή.

Τέλος, παράπλευρες αντιδράσεις μπορούν να πραγματοποιηθούν κατά το στάδιο της έναρξης, από την προσβολή του απαρχητή στη θέση 2-CO έναντι της επιθυμητής θέσης 5-CO, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός ακραίου ουρέιδο οξέος (Σχήμα 4). Με αυτό τον τρόπο επέρχεται πρόωρος τερματισμός του πολυμερισμού καθώς η αμίνη δεν μπορεί να αναγεννηθεί. Όσο μεγαλύτερη είναι η πυρηνοφιλικότητα του αμινο-απαρχητή, τόσο μικρότερη είναι η πιθανότητα προσβολής της θέσης 2-CO.



Σχήμα 4: Αντίδραση τερματισμού κατόπιν προσβολής του καρβονυλίου στη θέση 2' από τον απαρχητή.

2.3.4.2 Μηχανισμός του Blout

Ο μηχανισμός του Blout είναι μία ιοντική εκδοχή του μηχανισμού NAM, που προτάθηκε στην περίπτωση του πολυμερισμού του BLG-NCA σε διοξάνη, με χρήση μεθοξειδίου του νατρίου ως απαρχητή. Το στάδιο της έναρξης περιλαμβάνει την πυρηνόφιλη προσβολή του ανιοντικού κέντρου του άλατος, η οποία ακολουθείται από διάνοιξη του δακτυλίου, ενώ δεν λαμβάνει χώρα αποκαρβοξυλίωση. Στο στάδιο της διάδοσης, το λαμβανόμενο καρβαμιδικό ανιόν συμπεριφέρεται όπως το ανιόν μεθοξειδίου και επομένως απελευθερώνεται CO₂. Ο συνολικός μηχανισμός παρατίθεται στο Σχήμα 5. Ο μηχανισμός αυτός μπορεί να εφαρμοστεί τόσο σε N-μη υποκατεστημένους, όσο και σε N-υποκατεστημένους NCAs.



Σχήμα 5: Μηχανισμός του Blout, στάδια έναρξης και διάδοσης.

2.3.4.3 Μηχανισμός του ενεργοποιημένου μονομερούς (Activated Monomer Mechanism, AMM)

Ο μηχανισμός του ενεργοποιημένου μονομερούς βρίσκει εφαρμογή στους πολυμερισμούς όπου εκκινούνται από ισχυρές βάσεις ή τριτοταγείς αμίνες. Στον μηχανισμό του ενεργοποιημένου μονομερούς ο βασικός απαρχητής δεν δρα ως απαρχητής αλυσίδας μέσω της πυρηνοφιλικότητας του αλλά ως καταλύτης μέσω της βασικότητάς του για τον ιοντισμό του μονομερούς σε αντίδραση οξέος βάσεως προς σχηματισμό ανιόντος ανυδρίτη που δρα ως πυρηνόφιλο (Σχήμα 6). Στην περίπτωση αυτή η πολυμερική αλυσίδα είναι αυτοεκκινούμενη. Αυτός ο μηχανισμός εφαρμόζεται σε Ν-μη υποκατεστημένους NCAs.

Στην προέναρξη ο απαρχητής δρα ως βάση αποσπώντας το πρωτόνιο του N του NCA, οπότε προκύπτει το αντίστοιχο ανιόν. Στο στάδιο της έναρξης, ο ενεργός απαρχητής είναι το σχηματιζόμενο ανιόν του NCA, το οποίο δρα ως πυρηνόφιλο προσβάλλοντας τον 5-C ενός μονομερούς NCA, οπότε λαμβάνεται ένα διμερές και απελευθερώνεται CO₂. Φαίνεται ότι ο μηχανισμός περιλαμβάνει τρία μόρια μονομερούς και ότι αυτό που αναγεννάται είναι το ανιόν του NCA σε κάθε στάδιο της αντίδρασης.



Σχήμα 6: Στάδια μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς. Το ανιόν NCA μπορεί να προσβάλλει είτε την αναπτυσσόμενη αλυσίδα είτε ένα νέο μόριο NCA.

Ο μηχανισμός αυτός είναι πάρα πολύ γρήγορος, τουλάχιστον 100 φορές γρηγορότερος από τον κανονικό μηχανισμό. Επιπλέον, εφόσον ο μηχανισμός AMM λαμβάνει χώρα μέσω ανιόντων, ο ρυθμός διάδοσης είναι πολύ μεγάλος και επομένως τα λαμβανόμενα πολυπεπτίδια έχουν υψηλό μοριακό βάρος. Επίσης, η ταχύτητα έναρξης στον AMM είναι μικρότερη από την ταχύτητα διάδοσης, οπότε τα σχηματιζόμενα πολυπεπτίδια εμφανίζουν μεγάλη κατανομή μοριακών βαρών. Ακόμη, το ανιόν NCA που αναγεννάται δεν έχει καμία εκλεκτικότητα καθώς μπορεί να αντιδράσει είτε με την αναπτυσσόμενη αλυσίδα είτε με ένα άλλο μονομερές με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγάλη παράπλευρων αντιδράσεων, όπως αντιδράσεις διάσπασης, μεταφοράς αλυσίδας, ακόμα και ενδομοριακής κυκλοποίησης μπορούν να προκαλέσουν τερματισμό της πολυμερικής αλυσίδας. Υπό αυτές τις συνθήκες, αυτό το είδος πολυμερισμού δεν θεωρείται «ζωντανός».

2.3.5 Μηχανιστικές μελέτες πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των NCAs μετά το 1997

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. Έκτοτε, πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν ασχοληθεί με την πολυπεπτιδική σύνθεση και έχουν καταφέρει να προτείνουν εναλλακτικούς τρόπους πολυμερισμού των NCAs των α-αμινοξέων, βελτιώνοντας σημαντικά τις ιδιότητες και τα μοριακά χαρακτηριστικά των λαμβανόμενων πολυπεπτιδίων. Οι σημαντικότερες ερευνητικές προσπάθειες που έχουν γίνει στον τομέα αυτό, αφορούν τη σύνθεση πολυπεπτιδίων με χρήση συμπλόκων των στοιχείων μετάπτωσης^{9,11,16,17} τον πολυμερισμό με υδροχλωρικές αμίνες^{9,11,16,17}, την πολυπεπτιδική σύνθεση με τη χρήση τεχνικών υψηλού κενού^{11,16,17,18}, τον πολυμερισμό πεπτιδίων με πρωτοταγείς αμίνες και χαμηλή θερμοκρασία^{9,11,16,17} και τέλος την σύνθεση πεπτιδίων με παράγωγα σιλανίων^{9,11,16,17}. Παρακάτω, αναφέρονται συνοπτικά τα γενικά χαρακτηριστικά των τριών πιο σημαντικών μεθόδων πολυμερισμού, που αποτέλεσαν σταθμούς στην προσπάθεια σύνθεσης «ζωντανών πολυμερών».

2.3.6 Σύνθεση πολυπεπτιδίων με χρήση συμπλόκων των στοιχείων μετάπτωσης

Πρώτος ο Deming πρότεινε μια νέα σειρά απαρχητών, βασισμένους σε οργανομεταλλικές ενώσεις, οι οποίοι μπορούν να περιορίσουν τις αντιδράσεις τερματισμού. Ο Deming χρησιμοποίησε σύμπλοκα νικελίου μηδενικού σθένους του τύπου bipyNi(COD) (bipy=2,2'-bipyridyl, COD=1,5-

cyclooctadiene) και κατάφερε να συνθέσει ομοπολυμερή και κατά συστάδες συμπολυμερή με καθορισμένα μοριακά χαρακτηριστικά και στενές κατανομές μοριακών βαρών. Αργότερα, ανακάλυψε ότι και η χρήση απαρχητών με κοβάλτιο, του τύπου (PMe₃)₄Co είναι επίσης αποτελεσματική. 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 Ν-υποκατεστημένους NCAs^{9,11,16,17}.

2.3.7 Σύνθεση πολυπεπτιδίων με υδροχλωρικά άλατα πρωτοταγών αμινών

Η δραστικότητα των υδροχλωρικών αμινών είχε πρώτα μελετηθεί από τον Knober το 1960 σε αντιδράσεις με NCAs. Είχε διαπιστωθεί ότι μόνο ένα μόριο NCA αντιδρά με το υδροχλωρικό άλας της αμίνης, χωρίς διάδοση, εξαιτίας της μειωμένης πυρηνοφιλίας του άλατος σε σχέση με την ελεύθερη αμίνη. Σε αυτή την ισορροπία, ευνοείται η ανενεργή μορφή των υδροχλωρικού άλατος της αμίνης, επομένως οι ελεύθερες αμίνες μπορούν να δράσουν για πολύ μικρό χρονικό διάστημα και άρα η εκτεταμένη διάδοση από αυτές δεν είναι εφικτή. Ο Knober επίσης παρατήρησε ότι η συγκέντρωση στο διάλυμα των ελεύθερων αμινών αυξάνεται συναρτήσει της θερμοκρασίας, όπως επίσης και ο ρυθμός ανταλλαγής μεταξύ ενεργών (ελεύθερες υδροχλωρικές αμίνες) και ανενεργών ειδών (υδροχλωρικά άλατα αμινών).

Έχοντας ως βάση τα παραπάνω ο Schlaad, χρησιμοποίησε υδροχλωρικά άλατα αμινοτελικών μακροαπαρχητών, με την σκέψη ότι τα επιπλέον πρωτόνια του συστήματος θα εμπόδιζαν τον σχηματισμό του ενεργοποιημένου μονομερούς, εφόσον η επαναπρωτονίωση του μονομερούς θα ήταν γρηγορότερη από την πυρηνόφιλη προσβολή σε ένα άλλο μονομερές (Σχήμα 7).



Σχήμα 7: Χρήση υδροχλωρικού άλατος πρωτοταγούς αμίνης ως απαρχητή για τον ελεγχόμενο πολυμερισμό των NCAs από την ομάδα του Schlaad.

Ο Schlaad κατάφερε να συνθέσει πολυπεπτίδια με αρκετά στενή κατανομή μοριακών βαρών <1.1, όμως τα λαμβανόμενα μοριακά βάρη των πολυμερών ήταν κατά 20-30% μεγαλύτερα από τα αναμενόμενα. Αυτό ίσως, μπορεί να αποδοθεί σε μερικό τερματισμό των ειδών που εκκινούν τον πολυμερισμό από ίχνη ακαθαρσιών των NCAs.

Περιορισμοί προέρχονται από τις χαμηλές αποδόσεις της τεχνικής αυτής, καθώς είναι απαραίτητο να απομακρυνθεί το μονομερές που δεν αντέδρασε, πριν την προσθήκη του δεύτερου μονομερούς. Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι η δυσκολία σύνθεσης πολυμερών με πιο πολύπλοκη αρχιτεκτονική πέραν της δισυσταδικής.

2.3.8 Σύνθεση πολυπεπτιδίων με πρωτοταγείς αμίνες και χρήση τεχνικών υψηλού κενού

Το 2004 η ομάδα των latrou, Aliferis, Hadjichristidis ανέφερε το πρώτο ζωντανό σύστημα πολυμερισμού με πρωτοταγείς αμίνες ως απαρχητές, με τη χρήση τεχνικών υψηλού κενού (high vacuum techniques, HVT)^{11,16,17,18,19}. Οι τεχνικές αυτές είναι αναγκαίες εξαιτίας ευαισθησίας της των χρησιμοποιούμενων απαρχητών (π.χ. sec-Buli) 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 (π.χ. μερικές μέρες, ή λίγες εβδομάδες). Σε εναλλακτικές συνθήκες αδρανούς ατμόσφαιρας, η καθαρότητα του συστήματος δεν είναι επαρκής ώστε να ληφθούν τα επιθυμητά πολυπεπτίδια.

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. Με την τεχνική υψηλού κενού, είναι δυνατόν να αποφευχθούν όλα εκείνα τα προβλήματα που προκύπτουν στον κανονικό μηχανισμό αμινών ΝΑΜ. Οι περιορισμοί του ΝΑΜ 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. Επιπλέον, η παρουσία CO₂ επηρεάζει την κινητική των αντιδράσεων και οδηγεί σε ανεπιθύμητα προϊόντα. Με βάση τα ανωτέρω, κρίνεται αναγκαίος ο καθαρισμός των μονομερών, ο οποίος μπορεί να επιτευχθεί τηρώντας αυστηρά τα πρωτόκολλα καθαρισμού για όλα τα επιμέρους αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται κατά τη σύνθεσή τους.

Οι Ν-καρβοξυ ανυδρίτες παρουσιάζουν εξαιρετική ευαισθησία σε θέρμανση, νερό και βάσεις. Αντιδρούν ταχύτατα ακόμα και σε στερεή φάση δίνοντας πολυπεπτιδικά προϊόντα μέχρι την τελική τους κατανάλωση. Ακόμα και κατά την σύνθεσή τους αν δεν τηρηθούν τα πρότυπα καθαρότητας δίνουν παράπλευρες αντιδράσεις (Σχήμα 8). Έτσι, απαιτούνται προσεκτικές επαναλαμβανόμενες ανακρυσταλλώσεις υπό κενό (για να αποφύγουν την μόλυνση από την ατμοσφαιρική υγρασία) για τον καθαρισμό των NCAs, οι οποίες πρέπει να προηγούνται του πολυμερισμού. Επιπλέον, μετά το πέρας της αντίδρασης, για να αποφευχθούν οι παράπλευρες αντιδράσεις, γίνεται ποσοτική απομάκρυνση του παραγόμενου υδροχλωρίου αλλά και του τριφωσγενίου, που δεν αντέδρασε με το πρόδρομο αμινοξύ, με τη χρήση του υψηλού κενού.



Σχήμα 8: Η αντίδραση με το νερό δίνει το αρχικό αμινοξύ και εν συνεχεία πολυμερισμό. Η αντίδραση με το υδροχλώριο και το φωσγένιο δίνει ισοκυανατο χλωρίδιο και μετέπειτα Νχλωροφορμυλοκαρβόξυ ανυδρίτη

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, μία παράμετρος κλειδί για τον επιτυχή ζωντανό πολυμερισμό των NCAs των α- αμινοξέων αποτελεί η απομάκρυνση του CO2 που παράγεται κατά το στάδιο της διάδοσης. Η χρήση τεχνικών υψηλού κενού προσφέρει τη συνεχή απομάκρυνση του παραγόμενου CO₂, οδηγώντας την προϊόντα αντίδραση TOU πολυμερισμού προς тα μέσω της αποκαρβοξυλίωσης του καρβαμιδικού ενδιαμέσου. 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 τρείς φορές μεγαλύτερο από το εκλουόμενο διοξείδιο του άνθρακα, αποφεύγεται ο σχηματισμός καρβαμιδικών αλάτων με τα αμινο-τελικά άκρα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, λόγω της γρηγορότερης αποκαρβοξυλίωσης που συμβαίνει στο σύστημα.

Με τη εφαρμογή των παραπάνω μεθόδων και τεχνικών, η ομάδα των latrou, Aliferis, Hadjichristidis κατάφερε για πρώτη φορά να επιτύχει ζωντανό πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου των Ν-καρβοξυ ανυδριτών των ααμινοξέων και να συνθέσει πολυπεπτίδια με τις μικρότερες κατανομές μοριακών βαρών που έχουν αναφερθεί ως τώρα στη βιβλιογραφία. Επίσης με

αυτή την τεχνική, επετεύχθη η σύνθεση καλά καθορισμένων όμο- και συμπολυπεπτιδίων με πολύπλοκη μακρομοριακή αρχιτεκτονική, όπως για παράδειγμα γραμμικά πολυσυσταδικά πολυμερή, αστεροειδή πολυμερή, αστεροειδή κατά συστάδες συμπολυμερή κ.α., ανοίγοντας το δρόμο για τη δημιουργία πολύπλοκων δομών με πολλές βιοϊατρικές και φαρμακευτικές εφαρμογές.

Το 2009 η ομάδα του Avgeropoulos¹⁹ μια ομάδα εξοικειωμένη τόσο με τις τεχνικές υψηλού κενού όσο και με τις παραδοσιακές, κατάφερε να ενισχύσει ακόμη περισσότερο τα πλεονεκτήματα από τη χρήση τεχνικών υψηλού κενού, έναντι των συμβατικών μεθόδων, αναλύοντας για πρώτη φορά τις ακραίες ομάδες των λαμβανόμενων πολυμερών. Η ομάδα διεξήγαγε παράλληλους πολυμερισμούς υπό συνθήκες υψηλού κενού αλλά και υπό αδρανή ατμόσφαιρα σε glovebox και τα πολυμερή που ελήφθησαν χαρακτηρίστηκαν φασματοσκοπικά (¹³C-NMR, MALDI-TOF-MS). Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι πολυμερισμοί σε υψηλό κενό ακολουθούσαν πλήρως τον κανονικό μηχανισμό, ενώ αντίδραση τερματισμού πραγματοποιήθηκε μόνο σε ένα πολύ μικρό ποσοστό. Αντίθετα, τα πολυπεπτίδια που παρασκευάστηκαν στο glovebox ακολουθούσαν τόσο τον κανονικό μηχανισμό αμινών, όσο και τον μηχανισμό ενεργοποιημένου μονομερούς, ενώ πολλαπλές αντιδράσεις τερματισμού έλαβαν χώρα. Έτσι, απέδειξαν ότι μόνο με την τεχνική υψηλού κενού μπορούν να συντεθούν πολυπεπτίδια που να προσομοιάζουν στη δομή και τις ιδιότητες τα φυσικά ανάλογα τους, ενώ ταυτόχρονα το άμινο-τελικό τους άκρο να παραμένει ενεργό για περαιτέρω διάδοση του πολυμερισμού και δημιουργία πολύπλοκων αρχιτεκτονικών.

2.4. Σύνθεση Ν-Καρβοξυ Ανυδριτών των α-Αμινοξέων (NCAs)

Οι Ν-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 Ν-αλκοξυκαρβονυλοαμινοαλογονιδίων, υπό παρατεταμένη θερμοκρασία 70-90 °C (Σχήμα 9). Το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι στις υψηλές αυτές θερμοκρασίες μπορεί να πραγματοποιηθεί αποσύνθεση των NCAs και διάνοιξη του δακτυλίου.

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. Η μέθοδος του Leuchs δεν είναι μόνο ιστορικής σημασίας, αλλά χρησιμοποιείται ακόμη με τις παραλλαγές της, για τον σχηματισμό διαφόρων NCAs.

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος για την σύνθεση των NCAs σήμερα, είναι η αντίδραση των αμινοξέων με φωσγένιο. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε αρχικά από τον Fuchs το 1922 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". 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 9). 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. Το τετραϋδροφουράνιο (THF) και το 1,4-διοξάνιο είναι οι περισσότερο χρησιμοποιούμενοι διαλύτες, ωστόσο δίνουν παράπλευρες αντιδράσεις όταν κατεργάζονται με υδροχλώριο για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Γενικά, όλοι οι διαλύτες που είναι αδρανείς ως προς το φωσγένιο, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέσα αντίδρασης, αλλά οι λιγότερο πολικοί όπως το χλωροφόρμιο, ο τετραχλωράνθρακας και ο οξικός αιθυλεστέρας, αυξάνουν τους χρόνους της αντίδρασης. Από τους πιο πολικούς διαλύτες μόνο το ακετονιτρίλιο είναι αδρανές αρκετά και μπορεί να χρησιμοποιηθεί, προτιμάται για την σύνθεση του NCA της γλυκίνης.



Σχήμα 9: Μέθοδοι "Leuchs" και "Fuchs-Farthing" για τη σύνθεση των Ν-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 χρησιμοποίηση 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 HCI 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 διάνοιξή του σε αυξημένες συγκεντρώσεις HCI. 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 HCI 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. 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^{20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32}.

2.5. Αποκρινόμενα πολυμερή

Οι προκλήσεις που αντιμετωπίζει σήμερα η ιατρική περιλαμβάνουν την αυξανόμενη ζήτηση για ευαίσθητα, αποτελεσματικά συστήματα που θα βελτιώσουν την θεραπεία των ασθενών. Από την άποψη αυτή, υπάρχει ανάγκη για νέα υλικά που θα αυξήσουν την ευαισθησία ενώ ταυτόχρονα οι συγκεντρώσεις τους στο σώμα θα είναι μειωμένες για να αποφευχθεί η συσσώρευση και οι παρενέργειες. Τέτοια υλικά θα μπορούν να ανιχνεύουν αποτελεσματικά τις παθολογικές καταστάσεις στα αρχικά στάδια, ή να διακρίνουν μικρές αλλαγές στις περιοχές όπου έχει γίνει εγχείρηση, ενισχύοντας με αυτόν τον τρόπο την πρόγνωση πολύπλοκων ασθενειών όπως ο καρκίνος, ο HIV και άλλων εκφυλιστικών ασθενειών. Ο σχεδιασμός νέων συστημάτων και προσεγγίσεων πρέπει να ανταποκρίνεται στις προκλήσεις που συνδέονται με τη χορήγηση στο σώμα: 1) απλή οδός χορήγησης, 2) αποτελεσματική παράδοση στο επιθυμητό βιολογικό

διαμέρισμα, 3) προσαρμοσμένη απόκριση στο παθολογικό συμβάν, 4) χρήση μη τοξικών, βιοσυμβατών και βιοαποικοδομήσιμων συστημάτων.

Η τρέχουσα τεχνογνωσία στη νανοτεχνολογία καθιστά δυνατούς νέους τρόπους για την καταπολέμηση μεγάλου αριθμού ασθενειών. Ο διαρκώς αναπτυσσόμενος τομέας της νανοϊατρικής χρησιμοποιεί νανοδομές για τη διάγνωση, τη θεραπεία και την πρόληψη ασθενειών. Από αυτή την άποψη, η νανοεπιστήμη προσφέρει καινοτόμα συστήματα και μεθόδους για ιατρική χρήση παρέχοντας φορείς όπως σωματίδια, μικκύλια, δενδριμερή και κυστίδια για μεταφορά δραστικών ενώσεων (φάρμακα, πρωτεΐνες, DNA), καθώς επίσης και "ενεργές" επιφάνειες προσαρμοσμένες σε βιοαισθητήρες για την αναγέννηση και την επούλωση πληγών. Ένας αποτελεσματικός τρόπος για να βελτιωθούν αυτά συστήματα είναι να τα καταστήσουμε στιγμιαία αποκρινόμενα (stimuli-responsive). Η απόκριση σε εξωτερικά ή εσωτερικά ερεθίσματα επιτρέπει: 1) καλύτερο εντοπισμό του συστήματος στο επιθυμητό βιολογικό διαμέρισμα, 2) ελεγχόμενη απελευθέρωση του ωφέλιμου φορτίου στην τοποθεσία του παθολογικού συμβάντος και 3) ταχεία αντιμετώπιση του παθολογικού γεγονότος. Συγκεκριμένα, тα πολυμερή έχουν αποδειχθεί έξυπνες επιλογές στην ανάπτυξη συστημάτων που ανταποκρίνονται στα ερεθίσματα. Μια μεγάλη ποικιλία πολυμερών/ συμπολυμερών έχει συντεθεί σε απόκριση σε φυσικά ερεθίσματα (physical stimuli) (θερμοκρασία, pH, φως), χημικά ερεθίσματα (chemical stimuli) (διάφορα μόρια σηματοδότησης) ή βιολογικά ερεθίσματα (biological stimuli) (ένζυμα). Τα ευαίσθητα σε διεγέρσεις πολυμερή υφίστανται δραματικές και απότομες αντιδράσεις, φυσικές και χημικές αλλαγές ως απάντηση σε εξωτερικά ερεθίσματα. Ονομάζονται επίσης "έξυπνα", ή "ευαίσθητα στο περιβάλλον" πολυμερή. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό αυτού του τύπου υλικού είναι η αντιστρεψιμότητα, δηλαδή η ικανότητα του πολυμερούς να επιστρέψει στην αρχική του κατάσταση. Στη φύση, βιοπολυμερή όπως οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα είναι όλα βασικά εξαρτήματα που ανταποκρίνονται στα ερεθίσματα των ζωντανών οργανικών συστημάτων. Αυτά τα "φυσικά" πολυμερή που ανταποκρίνονται στα ερεθίσματα έχουν οδηγήσει στην ανάπτυξη πολυάριθμων συνθετικών πολυμερών που έχουν σχεδιαστεί για να μιμούνται τα φυσικά τους ανάλογα.

Η στρατηγική στην οποία βασίζεται η απόκριση των πολυμερών είναι μια δραματική φυσικοχημική αλλαγή που προκαλείται από κάποιο ερέθισμα. Σε μακρομοριακό επίπεδο, οι αλυσίδες των πολυμερών μπορούν να μεταβάλλονται με διάφορους τρόπους, συμπεριλαμβανομένων των αλλαγών στην υδρόφιλη-προς-υδρόφοβη ισορροπία, στη διαμόρφωση, τη διαλυτότητα, την αποικοδόμηση και τη διάσπαση του δεσμού, οι οποίες, με τη σειρά τους, προκαλούν ανιχνεύσιμες αλλαγές Η απόκριση μπορεί να είναι αναστρέψιμη ή όχι, ανάλογα σχετικά με τη χρησιμοποιούμενη στρατηγική.

Τα αποκρινόμενα πολυμερή ταξινομούνται συνήθως σε τρεις κατηγορίες: 1) Τα φυσικώς αποκρινόμενα (φως, θερμοκρασία, υπερήχους, μαγνητικά, μηχανικά, ηλεκτρικά), τα οποία συνήθως τροποποιούν τη δυναμική της αλυσίδας, δηλαδή το επίπεδο ενέργειας του συστήματος πολυμερούς/ διαλύτη. 2) Тα χημικώς αποκρινόμενα (διαλύτης, ιοντική ισχύς, ηλεκτροχημικά, ρΗ), τα οποία διαμορφώνουν μοριακές αλληλεπιδράσεις, είτε μεταξύ πολυμερών και μορίων διαλύτη, ή μεταξύ αλυσίδων πολυμερούς. 3) Τα βιολογικώς αποκρινόμενα (ένζυμα, υποδοχείς), τα οποία σχετίζονται με την πραγματική λειτουργία των μορίων: ενζυμικές αντιδράσεις, αναγνώριση μορίων. Τέλος, υπάρχουν τα διπλά αποκρινόμενα πολυμερή (dual stimuliresponsive), τα οποία ανταποκρίνονται ταυτόχρονα σε περισσότερα από ένα ερεθίσματα (Εικόνα 9)^{33,34,35,36,37,38,39,40,41,42}.



Εικόνα 10: Ταξινόμηση των αποκρινόμενων πολυπεπτιδίων.

2.5.1 Θέρμο-αποκρινόμενα πολυμερή

Τα πολυμερή που αποκρίνονται στην θερμοκρασία έχουν προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον στις εφαρμογές βιοτεχνολογίας, επειδή ορισμένες ασθένειες εμφανίζουν αλλαγές θερμοκρασίας. Κανονικά, αυτά тα συμπολυμερή χαρακτηρίζονται από μια κρίσιμη θερμοκρασία διαλύματος, γύρω από την οποία οι υδρόφοβες και υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων και του υδατικού μέσου μεταβάλλονται απότομα μέσα σε ένα μικρό εύρος θερμοκρασίας. Αυτό προκαλεί τη διακοπή των ενδοκαι διαμοριακών ηλεκτροστατικών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και οδηγεί σε κατάρρευση ή επέκταση αλυσίδας. Τυπικά, αυτά τα πολυμερικά διαλύματα διαθέτουν ανώτερη κρίσιμη θερμοκρασία διαλύματος (upper critical solution temperature, UCST), πάνω από την οποία υπάρχει μία φάση πολυμερούς και κάτω από την οποία υπάρχει ένας διαχωρισμός φάσεων. Εναλλακτικά, διαλύματα πολυμερών που εμφανίζονται ως μονοφασικά κάτω από μια συγκεκριμένη θερμοκρασία και διφασικά πάνω από αυτή, γενικά έχουν μια λεγόμενη χαμηλότερη κρίσιμη θερμοκρασία διαλύματος (lower critical solution temperature, LCST). Ανάλογα με τον μηχανισμό και τη χημεία των ομάδων, έχουν αναφερθεί διάφορα θερμο-αποκρινόμενα πολυμερή: πολυ(Ν-αλκύλιο υποκατεστημένα ακρυλαμίδια), πολυ(Νπ.χ. ισοπροπυλακρυλαμίδιο) (PNiPAAm), πολυ(Ν-βινυλαλκυλαμίδια), π.χ. πολυ(N-βινυλοκαπρολακτάμη) (PNVC) και συμπολυμερή όπως πολυ(Lγαλακτικό οξύ) - πολυ(αιθυλενογλυκόλη) - πολυ(L-γαλακτικό οξύ) (PLLA-PEG-PLLA) και πολυ(αιθυλενοξείδιο) πολυ(προπυλενοξείδιο) πολυ(αιθυλενοξείδιο) (ΡΕΟ-ΡΡΟ-ΡΕΟ). Θα πρέπει στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι η ερευνητική ομάδα του κυρίου Ιατρού ανέφερε τη σύνθεση του συμπολυμερούς πολυ(αιθυλενοξειδίου)-πολυ(L-ιστιδίνη) (PEO-PHis), то οποίο βρέθηκε ότι αποκρίνεται και σε μεταβολές της θερμοκρασίας εκτός των μεταβολών του pH^{33,34,35,36,37,38,39,40,41,42}

2.5.2 Φώτο-αποκρινόμενα πολυμερή

Επειδή το φως μπορεί να εφαρμοστεί στιγμιαία και κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες με υψηλή ακρίβεια, τα φωτο-αποκρινόμενα πολυμερή εμφανίζουν πολλά πλεονεκτήματα. То φως μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας στην επιφάνεια του πολυμερούς ή μπορεί να μεταδοθεί σε απομακρυσμένες τοποθεσίες χρησιμοποιώντας οπτικές ίνες. Τα περισσότερα φωτο-ευαίσθητα πολυμερή περιέχουν χρωμοφόρες ομάδες όπως ομάδες αζοβενζολίου, σπιροπυρανικές ομάδες, ή νιτροβενζυλομάδες^{33,34,35,36,37,38,39,40,41,42}.

2.5.3 pH-αποκρινόμενα πολυμερή

Το pH είναι μια σημαντική περιβαλλοντική παράμετρος για τις βιοϊατρικές εφαρμογές, επειδή οι αλλαγές στο pH συμβαίνουν σε πολλά παθολογικά διαμερίσματα. Για παράδειγμα, υπάρχει μία εμφανής αλλαγή στο pH κατά μήκος της γαστρεντερικής οδού, από το στομάχι (ρΗ = 1-3) στο έντερο (ρΗ = 5-8). Επίσης, οι χρόνιες πληγές έχουν τιμές ρΗ μεταξύ 7,4 και 5,4, και ο καρκινικός όγκος είναι όξινος εξωκυτταρικά. Επομένως, σε αντίθεση με τις αλλαγές θερμοκρασίας, αυτή η ιδιότητα μπορεί να εκμεταλλευτεί για άμεση απόκριση σε συγκεκριμένο ιστό ή σε κυτταρικό διαμέρισμα. Το βασικό στοιχείο για τα pH-αποκρινόμενα πολυμερή είναι η παρουσία ιονιζόμενων, ασθενών όξινων ή βασικών τμήματα που συνδέονται με μια υδρόφοβη σπονδυλική στήλη, όπως οι πολυηλεκτρολύτες. Κατά τον ιονισμό, οι ηλεκτροστατικές απώσεις των παραγόμενων φορτίων (ανιόντα ή κατιόντα) προκαλούν μια δραματική επέκταση των σπειροειδών αλυσίδων. Ένα άλλο τυπικό πολυμερές που αποκρίνεται στο ρΗ φέρει ομάδες που μπορούν να πρωτονιώνονται ή να αποπροτωνιόνονται ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται, όπως για παράδειγμα καρβοξυλομάδες ή αμινομάδες. Τα ρΗ-αποκρινόμενα πολυμερή τυπικά περιλαμβάνουν χιτοζάνη, αλβουμίνη, ζελατίνη, πολυ(ακρυλικό οξύ) (PAAc)/χιτοζάνη IPN, πολυ(μεθακρυλικό οξύ-gαιθυλενογλυκόλη) [P(MAA-g-EG)], πολυ(αιθυλενο ιμίνη) (PEI), πολυ (Ν, Νδιακυλαμινο αιθυλομεθακρυλικά άλατα) (PDAAEMA) και πολυ(λυσίνη) (PL). Θα πρέπει στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι η ερευνητική ομάδα του κυρίου

Ιατρού ανέφερε τη σύνθεση του συμπολυμερούς πολυ(αιθυλενοξειδίου)πολυ(L-ιστιδίνη) (PEO-PHist), το οποίο βρέθηκε ότι αποκρίνεται και σε μεταβολές του pH λόγω ύπαρξης του ιμιδαζολικού δακτυλίου της ιστιδίνης, ο οποίος ανάλογα με τις μεταβολές του pH μπορεί να πρωτονιώνεται ή να αποπροτωνιώνεται^{33,34,35,36,37,38,39,40,41,42}.

2.5.4 Ιοντικά αποκρινόμενα πολυμερή

Η απόκριση στην ιοντική ισχύ είναι μια τυπική ιδιότητα των πολυμερών που περιέχουν ιονιζόμενες ομάδες. Αυτά τα πολυμερικά συστήματα παρουσιάζουν ασυνήθιστη ρεολογική συμπεριφορά ως αποτέλεσμα των ελκτικών αλληλεπιδράσεων Coulomb μεταξύ των αντίθετα φορτισμένων ειδών, τα οποία μπορεί να καθιστούν το πολυμερές αδιάλυτο σε απιονισμένο νερό, αλλά διαλυτό παρουσία κρίσιμης συγκέντρωσης των προστιθέμενων ηλεκτρολυτών. Επομένως, οι μεταβολές της ιοντικής ισχύος προκαλούν αλλαγές στο μήκος των πολυμερικών αλυσίδων, την διαλυτότητα και τον φθορισμό των πολυμερών^{33,34,35,36,37,38,39,40,41,42}.

2.5.5 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 μεταφορά 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 αντίδρασης⁴³.

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 οξείδωση 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 αντιστρεψιμότητα 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 επικρατούν⁴⁴.

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^{45,46}.

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 11Α). Η γλουταθειόνη βρίσκεται σε αμελητέα συγκέντρωση στο αίμα (της τάξης των 1-2 μM), 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 κύτταραστόχους, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης της γλουταθειόνης στο εσωτερικό τους, θα αποικοδομηθεί και θα απελευθερώσει το φάρμακο^{47,48}.

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)⁴⁹ και ο συμπολυμερισμός μέσω μακροαπαρχητή πολυ(αιθυλενοξειδίου) που φέρει δισουλφιδικούς δεσμούς (PEO-SS-NH₂)⁵⁰. 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 Heise⁵¹. 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 11B).



Εικόνα 11: Α) Δομή γλουταθειόνης (GSH) και Β) αντιδράσεις οξείδωσης και αναγωγής των δομικών μονάδων πολυ(L-κυστεΐνης)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ

3.1. Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών

Δεδομένου ότι οι ιδιότητες και οι χρήσεις των πολυμερικών υλικών επηρεάζονται από χαρακτηριστικά όπως η χημική δομή, το μέσο μοριακό βάρος, η κατανομή των μοριακών βαρών, ο βαθμός διακλάδωσης, η τακτικότητα και η κρυσταλλικότητα, έγινε σαφής η ανάγκη εύρεσης μεθόδων χαρακτηρισμού που θα μπορούσαν να δώσουν πληροφορίες για τα βασικά αυτά χαρακτηριστικά. Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (Size μέσω (Gel Exclusion Chromatography) ή πηκτής Permeation Chromatography), εμφανίστηκε ως η πιο αξιόπιστη μέθοδος για την εύρεση της κατανομής μοριακών βαρών των πολυμερών (MWD=Molecular Weight Distribution) κάτι που ήταν πολύ σημαντικό αφού η τελευταία αποτελεί τον πιο σημαντικό παράγοντα ποιότητας των μακρομορίων. Μικρότερες κατανομές οι οποίες πολλές φορές αγγίζουν και την μονομοριακότητα δίνουν στα πολυμερή πολύ καλές ιδιότητες τόσο μηχανικές όσο και χημικές.

Η SEC είναι ένα είδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC=High Performance Liquid Chromatography) προσαρμοσμένης στα μεγέθη των πολυμερών τα οποία χαρακτηρίζονται από μοριακά βάρη πολύ μεγαλύτερα από εκείνα των απλών χημικών ενώσεων. Οι προϋποθέσεις τις οποίες πρέπει να ικανοποιεί μια πολυμερική ουσία για να μπορέσει να προσδιοριστεί μέσω αυτής της μεθόδου είναι οι εξής:

Α. Να είναι πολύ καλά διαλυτή στον διαλύτη που χρησιμοποιείται στη διάταξη.

Β. Να μην αντιδρά με τον διαλύτη.

Γ. Να μην αντιδρά με το μέσο διαχωρισμού.

Ο μηχανισμός διαχωρισμού των πολυμερών μέσω της SEC είναι ο εξής:

Διάλυμα πολυμερούς διέρχεται μέσω στηλών οι οποίες περιέχουν ένα μέσο διαχωρισμού, συνήθως σφαιρικούς πόρους από δικτυωμένο πολυστυρένιο γνωστό με την εμπορική ονομασία styragel. Η πηκτή styragel διαθέτει πόρους το μέγεθος των οποίων κυμαίνεται από 60-10⁷Å (μέση διάμετρος). Το gel είναι πλήρως εμβαπτισμένο στον διαλύτη της διάταξης χωρίς την παρουσία αερίων. Όταν διάλυμα πολυμερούς εισέρχεται από τις στήλες, τα μόρια του πολυμερούς διέρχονται από τους πόρους οι οποίοι είναι αρκετά μεγάλοι ώστε αρκετά μεγάλα μόρια όπως είναι τα πολυμερή να χωρούν μέσα σε αυτούς. Επομένως, αφού οι στήλες είναι πακεταρισμένες με υλικό που παρουσιάζει κατανομή μεγέθους πόρων, είναι εφικτός ο διαχωρισμός των πολυμερικών μορίων με βάση τη διαφορά μεγέθους τους. Τα μεγάλα μόρια περνούν από ελάχιστους πόρους με αποτέλεσμα να εκλούονται νωρίτερα από τα μικρότερα που λόγο του μικρού μεγέθους τους παραμένουν σε περισσότερους πόρους. Ουσιαστικά ο υδροδυναμικός όγκος είναι το μοριακό μέγεθος που καθορίζει τον χρόνο έκλουσης του πολυμερούς. Αν ο διαλύτης που χρησιμοποιείται είναι καλός για κάποιο συγκεκριμένο πολυμερές τότε αυτό διογκώνεται και αποκτά όγκο (υδροδυναμικός όγκος). Έτσι καταλαβαίνουμε ότι μπορεί ο υδροδυναμικός όγκος να συνδεθεί άμεσα με τον χρόνο έκλουσης στην περίπτωση των γραμμικών μονομοριακών πολυμερών. Δεν συμβαίνει όμως το ίδιο με τα μίγματα ομοπολυμερών, συμπολυμερών και διακλαδισμένων ομοπολυμερών ή συμπολυμερών γιατί:

Α. Για δεδομένο μοριακό βάρος ο υδροδυναμικός όγκος ενός διακλαδισμένου
ομοπολυμερούς είναι μικρότερος από του αντίστοιχου γραμμικού.

Β. Σε ένα συμπολυμερές, ο μερικός μοριακός όγκος M_i / V_h για κάθε μία από τις επαναλαμβανόμενες μονάδες είναι διαφορετικός.

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών δεν είναι μία απόλυτη μέθοδος και ως εκ τούτου είναι απαραίτητη η βαθμονόμηση του χρωματογράφου με πρότυπα δείγματα. Αυτά περιλαμβάνουν συνήθως ομοπολυμερή πολυστυρενίου διαφορετικού μοριακού βάρους παρασκευασμένα με ανιοντικό πολυμερισμό για να εμφανίζουν στενές κατανομές προσδίδοντας στον χρωματογράφο μεγαλύτερη ακρίβεια στον προσδιορισμό του μοριακού βάρους και της κατανομής μοριακών βαρών (I = M_w/M_n). Αν κοιτάξει κανείς την καμπύλη βαθμονόμησης, θα παρατηρήσει ότι αυτή παρουσιάζει μια περιοχή που εμφανίζει γραμμικότητα. Αυτή είναι και η περιοχή καλής ακρίβειας στον προσδιορισμό του μοριακού βάρους. Σε πολύ μικρά ή πολύ μεγάλα μοριακά βάρη η διαχωριστική ικανότητα της μεθόδου μικραίνει με αποτέλεσμα να μεγαλώνει η πιθανότητα σφάλματος που έτσι και αλλιώς

αγγίζει στη GPC το 10%. Όπως προαναφέραμε, ένα διακλαδισμένο ομοπολυμερές (π.χ. αστέρι πολυστυρενίου) παρόλο που μπορεί να έχει το ίδιο μοριακό βάρος με ένα γραμμικό πολυστυρένιο, εκλούεται πρώτο αφού ο υδροδυναμικός του όγκος είναι μικρότερος. Αυτό καθιστά σαφές ότι ο χρόνος έκλουσης ενός πολυμερούς εξαρτάται άμεσα και από την αρχιτεκτονική κάτι που περιπλέκει τα πράγματα όσο αφορά στον προσδιορισμό του μοριακού βάρους μέσω της SEC. Έπρεπε λοιπόν να βρεθεί ένας τρόπος για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα. Η λύση ήρθε από τον Άλμπερτ Αϊνστάιν ο οποίος πρώτος συσχέτισε τον χρόνο έκλουσης με το μοριακό βάρος M και το εσωτερικό ιξώδες [η] σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$[\eta]M = 0.025 N_A V_h$

Αν λοιπόν το εσωτερικό ιξώδες [η] κάποιων προτύπων και του προς εξέταση πολυμερούς έχουν καθοριστεί ανεξάρτητα, το μοριακό βάρος του αγνώστου δείγματος μπορεί να υπολογιστεί από την καμπύλη βαθμονόμησης του γινομένου [η] Μ συναρτήσει του όγκου έκλουσης (V_e). Στην παραπάνω εξίσωση το N_A είναι ο αριθμός Avogadro και το V_h συμβολίζει τον υδροδυναμικό όγκο του πολυμερούς σε συγκεκριμένο διαλύτη.

Πολύ σημαντικό ρόλο στην χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών παίζει και ο ανιχνευτής ή οι ανιχνευτές οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι με τον χρωματογράφο. Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται χωρίζονται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με το μέγεθος που προσδιορίζουν. Χρησιμοποιούνται ανιχνευτές συγκέντρωσης-μάζας όπως είναι ο ανιχνευτής UV, ο IR και ο DRI. Επίσης, χρησιμοποιούνται ανιχνευτές μοριακής μάζας όπως ο ανιχνευτής σκέδασης φωτός και ο ιξωδομετρικός ανιχνευτής.

Ο ανιχνευτής UV χρησιμοποιείται όταν τα προς ανάλυση πολυμερή διαθέτουν κάποια χρωμοφόρο ομάδα η οποία απορροφά σε αυτήν την περιοχή (συνήθως δουλεύουν μεταξύ 190 και 400 nm). Σε συνδυασμό με τον ανιχνευτή DRI, δίνουν από κοινού πληροφορίες για τη σύσταση ενός συμπολυμερούς που διαθέτει κάποια συστάδα που απορροφά στην περιοχή του υπεριώδους. Μπορεί να λειτουργήσει κάτω από μέσες θερμοκρασίες και οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται δεν θα πρέπει να απορροφούν στην περιοχή αυτή.

Ο ανιχνευτής DRI (Differential Refractometer Index), θεωρείται παγκόσμιος ανιχνευτής αφού είναι ευαίσθητος στις διαφορές του δείκτη διάθλασης του διαλύτη και της διαλυμένης προς προσδιορισμό πολυμερικής ουσίας. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ακόμα και σε υψηλές θερμοκρασίες, δίνει γραμμικές αποκρίσεις σε ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων αλλά είναι πολύ ευαίσθητος στις ατμοσφαιρικές συνθήκες.

Από την άλλη μεριά, οι ανιχνευτές σκέδασης που χρησιμοποιούνται στην χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών, εμφανίζουν μεγάλη ακρίβεια στον προσδιορισμό του πραγματικού μοριακού βάρους αλλά και στον προσδιορισμό της κατανομής μοριακών βαρών σε όλους τους χρόνους έκλουσης αφού αποτελούνται από μικρούς ανιχνευτές που μπορούν να μετρούν την ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σε διάφορες γωνίες και με ειδική επεξεργασία των αποτελεσμάτων να δίδουν το πραγματικό μοριακό βάρος M_w αφού ο λόγος Rayleigh που προσδιορίζεται σχετίζεται με αυτό μέσω της παρακάτω σχέσης :

$K_{\rm c}/\Delta R_{\theta} = 1/M_{\rm w} + 2A_2C + 3A_3C$

(Με C συμβολίζουμε την κατά βάρος προς όγκο συγκέντρωση του πολυμερούς στο διάλυμα, A₂ και A₃ τον δεύτερο και τον τρίτο συντελεστή virial και με M_w το πραγματικό μοριακό βάρος).

Τέλος, όσο αφορά στον ιξωδομετρικό ανιχνευτή, αυτός χρησιμοποιείται συνήθως σε σειρά με κάποιο ανιχνευτή μάζας-συγκέντρωσης από αυτούς που προαναφέρθηκαν και μπορεί να δώσει πολύ καλές πληροφορίες για την απόλυτη μέση μοριακή μάζα, το εσωτερικό ιξώδες και το βαθμό διακλάδωσης. Σε αυτούς τους ανιχνευτές προσδιορίζεται το εσωτερικό ιξώδες του διαλύματος του πολυμερούς από την διαφορά πίεσης μέσω ενός τριχοειδούς που καταγράφεται από ένα διαφορικό μετατροπέα πίεσης. Το μεγάλο πλεονέκτημα του ιξωδομετρικού ανιχνευτή είναι η δυνατότητα λήψης μέσων μοριακών βαρών με βάση την παγκόσμια καμπύλη βαθμονόμησης για διαφορετικής σύστασης πολυμερή ανεξαρτητοποιώντας τον υδροδυναμικό όγκο από τον παράγοντα αρχιτεκτονική.

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών αποτελεί μία εύχρηστη και γρήγορη μέθοδο με τη βοήθεια της οποίας μπορεί να σχηματιστεί μία πρώτη εικόνα για

το πολυμερές που παρασκευάστηκε, ως προς το μέσο μοριακό του βάρος, αλλά κυρίως προς την κατανομή μοριακών βαρών του και να εξαχθούν συμπεράσματα για την επίτευξη ή όχι της σύνθεσης του επιθυμητού μακρομορίου^{52,53,54}. Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC) πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας όργανο αποτελούμενο από αντλία της Waters μοντέλο 510 και ανιχνευτές διαφορικού διαθλασιμέτρου της Waters μοντέλο 401 και διοδική διάταξη UV-Vis. Η ταχύτητα ροής ρυθμίστηκε στο 1 mL/min και ως φέρων διαλύτης χρησιμοποιήθηκε milliQ : TFA 2% : MeCN 10 %.

3.2. Φασματοσκοπία Υπερύθρου

Η φασματοσκοπία υπερύθρου (infrared, IR) είναι μία από τις καλύτερες τεχνικές για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό κάθε είδους ουσίας και βρίσκει ευρεία εφαρμογή στην Οργανική και Φαρμακευτική Χημεία και στην ανάλυση φαρμάκων, πετρελαιοειδών, πολυμερών κλπ. Η περιοχή της υπέρυθρης ακτινοβολίας ή, όπως συνήθως αναφέρεται, το υπέρυθρο, εκτείνεται από το ορατό μέχρι τα μικροκύματα, 0,75-1000 μm. Για το χαρακτηρισμό του υπερύθρου χρησιμοποιούνται μονάδες μήκους κύματος (L σε μm) και συνηθέστερα κυματαριθμού (v σε cm⁻¹) που αλληλοσυνδέονται με τις σχέσεις: $(1/\lambda = v)$ και $[v (cm^{-1}) = 10^4/L (µm)]$. Η περιοχή της υπέρυθρης ακτινοβολίας υποδιαιρείται στο εγγύς υπέρυθρο (0,75-2,5 μm, 1330-4000 cm⁻ ¹), το μέσο υπέρυθρο (2,5-25 μm, 4000-400 cm⁻¹) και το άπω υπέρυθρο (25-1000 μm, 400-10 cm⁻¹). Η περισσότερο χρησιμοποιούμενη περιοχή είναι η μέση υπέρυθρη περιοχή. Η εγγύς υπέρυθρη περιοχή χρησιμοποιείται για ποσοτικούς προσδιορισμούς συγκεκριμένων ουσιών όπως το νερό, το διοξείδιο του άνθρακα, το θείο, υδρογονάνθρακες χαμηλού μοριακού βάρους, το αμινικό άζωτο και πολλές άλλες απλές ενώσεις που παρουσιάζουν ενδιαφέρον στη γεωργία και τη βιομηχανία. Η κύρια χρήση της άπω υπέρυθρης περιοχής αφορά στον προσδιορισμό των δομών ανόργανων και οργανομεταλλικών ουσιών. Τα φάσματα υπερύθρου απεικονίζονται γραφικώς ως μεταβολή της διαπερατότητας (τεταγμένη) ή σπάνια της απορρόφησης, συναρτήσει του μήκους κύματος σε μm ή συνηθέστερα του κυματαριθμού σε cm⁻¹ (τετμημένη).

Τα φάσματα απορρόφησης, εκπομπής και ανάκλασης υπερύθρου των διαφόρων ουσιών μπορούν να ερμηνευθούν θεωρώντας ότι οφείλονται σε μια ποικιλία ενεργειακών μεταβολών. Οι μεταβολές αυτές είναι αποτέλεσμα μεταπτώσεων των μορίων από μια δονητική ή μια περιστροφική ενεργειακή κατάσταση σε μια άλλη. Η απορρόφηση της υπέρυθρης ακτινοβολίας περιορίζεται στα μόρια στα οποία παρουσιάζονται μικρές ενεργειακές διαφορετικών διαφορές μεταξύ των δονητικών και περιστροφικών καταστάσεων. Ένα μόριο θα απορροφήσει υπέρυθρη ακτινοβολία μόνο εφόσον η διπολική ροπή του μορίου μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της δονήσεως, διαφορετικά η δόνηση θεωρείται ανενεργή στο υπέρυθρο. Για παράδειγμα, όταν δονούνται ή περιστρέφονται ομοπυρηνικά διατομικά μόρια, όπως τα O₂, N₂ ή Cl₂, δεν πραγματοποιείται καθαρή μεταβολή στη διπολική ροπή, οπότε τέτοιου είδους μόρια δεν απορροφούν στην υπέρυθρη περιοχή του φάσματος. Με εξαίρεση λίγων μορίων αυτού του είδους, όλα τα άλλα μόρια απορροφούν την υπέρυθρη ακτινοβολία και μάλιστα όσο μεγαλύτερη είναι η μεταβολή της διπολικής τους ροπής, τόσο ισχυρότερη είναι η απορρόφηση.

Οι δονήσεις διακρίνονται σε δονήσεις τάσεως ή εκτατικές δονήσεις και δονήσεις κάμψεως. Στις δονήσεις τάσεως, η δόνηση γίνεται κατά μήκος του χημικού δεσμού, που συνδέει τα δονούμενα άτομα και αλλάζει η απόσταση μεταξύ τους, και η δόνηση μπορεί να είναι συμμετρική ή ασύμμετρη. Στις δονήσεις κάμψεως αλλάζει η γωνία μεταξύ δύο δεσμών, και η δόνηση μπορεί να είναι ψαλιδοειδής, ή λικνιζόμενη, ή παλλόμενη, ή συστρεφόμενη.

Το φάσμα υπερύθρου μπορεί να χωριστεί στις πιο κάτω περιοχές με βάση τα άτομα ή τις ομάδες των οποίων οι δονήσεις προκαλούν την απορρόφηση στις περιοχές αυτές:

 Περιοχή τάσεως υδρογόνου (4000-2500 cm⁻¹). Η απορρόφηση στην περιοχή αυτή προκαλείται από δονήσεις τάσεως των δεσμών C-H, O-H, N-H και S-H. Οι δεσμοί N-H και O-H απορροφούν στην περιοχή 3300-3650 cm⁻¹, ενώ ο δεσμός C-H απορροφά γύρω στα 3000 cm⁻¹.

- Περιοχή τάσεως τριπλού δεσμού (2500-2000 cm⁻¹). Στην περιοχή αυτή απορροφούν οι τριπλοί δεσμοί άνθρακα-άνθρακα και άνθρακα-αζώτου, καθώς επίσης και δύο διπλοί δεσμοί (C=C=C, N=C=O).
- 3. Περιοχή τάσεως διπλού δεσμού (2000-1500 cm⁻¹). Υπεύθυνες για την απορρόφηση στην περιοχή αυτή είναι οι δονήσεις των δεσμών C=C, C=O, C=N. 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.
- 4. Περιοχή τάσεως και κάμψεως απλού δεσμού (1500-700 cm⁻¹). Στην περιοχή αυτή εμφανίζονται πολλές απορροφήσεις, όπως π.χ. οι δονήσεις κάμψεως των δεσμών C-H και οι δονήσεις τάσεως και κάμψεως απλών δεσμών που συνδέουν ομάδες, όπως του μεθυλενίου, μεθυλίου και αμινομάδες, π.χ. C-C, C-O, C-N, C-X, C-S. Η περιοχή αυτή ονομάζεται περιοχή των αποτυπωμάτων, επειδή το φάσμα στην περιοχή αυτή χαρακτηρίζει το μόριο ως σύνολο και αποτελεί κατά κάποιο τρόπο το δακτυλικό αποτύπωμα του μορίου.

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		
=-CH3	2880-2860	2970-2950	1380-1370	1470-1430
O-H	2700-2500	1320-1210	950-900	
C≡C	2140-2100			
C=0	1750-1700			
C=C	1600-1500			
C-N	1340-1250			
C-O-C	1200-1180			
-C-H	770-730			

Πίνακας 1: Περιοχές απορρόφησης χαρακτηριστικών λειτουργικών ομάδων σε cr	n ⁻¹ .
---	-------------------

Η τεχνική του IR εφαρμόζεται στα πολυπεπτίδια προκειμένου να διερευνηθεί ποιοτικά η επιτυχής σύνθεση είτε του Ν-καρβοξυ ανυδρίτη των αμινοξέων

(συνήθεις δονήσεις έκτασης στα 1785 cm⁻¹ και 1855 cm⁻¹), είτε για τη σύνθεση των πολυμερικών πεπτιδίων (δόνηση του αμιδικού δεσμού στα 1650 cm⁻¹)^{55,56}.

Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε μηχάνημα Perkin-Elmer Spectrum 100 FTIR. Για την Παρασκευή του δείγματος χρησιμοποιείται περίπου 1 mg ουσίας και 0.2 g ξηρής σκόνης KBr. Τα δύο υλικά αναμιγνύονται και λειοτριβούνται καλά σε γουδί, σε σημείο που το μέγεθος των σωματιδίων να είναι μικρότερο από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας, ώστε να αποφευχθεί η σκέδαση της ακτινοβολίας. Στη συνέχεια το μίγμα πιέζεται σε ειδική μήτρα σε πίεση μέχρι 10 τόνων για να δημιουργηθεί ένα διαφανές δισκίο. Τα αποτελέσματα είναι καλύτερα εάν το δισκίο παρασκευαστεί σε συνθήκες κενού για να ελαχιστοποιηθεί ο εγκλωβισμός αέρα. Τέλος, το δισκίο τοποθετείται στην οπτική δέσμη του φασματόμετρου και γίνεται η καταγραφή του φάσματος και η ταυτοποίηση της ένωσης με την βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή.

3.3. Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός

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

Το φαινόμενο του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού εκδηλώνουν όλοι οι πυρήνες με περιττό αριθμό πρωτονίων και όλοι οι πυρήνες με περιττό αριθμό νετρονίων. Μόνο οι πυρήνες με άρτιο αριθμό νετρονίων και πρωτονίων δεν προξενούν μαγνητικά φαινόμενα (*I* = 0). Έτσι, οι πυρήνες πολλών ατόμων (¹H, ¹³C) συμπεριφέρονται σαν να περιστρέφονται γύρω από κάποιον άξονα

(πυρηνικό spin, I = 1/2). Δεδομένου ότι είναι θετικά φορτισμένοι, οι περιστρεφόμενοι πυρήνες λειτουργούν ως μικροσκοπικοί μαγνήτες και κατά συνέπεια αλληλεπιδρούν με ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο H_0 . Τα πυρηνικά spin των μαγνητικών πυρήνων προσανατολίζονται, απουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, κατά τυχαίο τρόπο. Όταν, όμως, ένα δείγμα που περιέχει αυτούς τους πυρήνες τοποθετηθεί ανάμεσα στους πόλους ενός ισχυρού μαγνήτη, οι πυρήνες αποκτούν συγκεκριμένους προσανατολισμούς. Ο πυρήνας μπορεί να διαταχθεί έτσι ώστε το δικό του εξαιρετικά μικρό μαγνητικό πεδίο να είναι είτε παράλληλο (ενεργειακή κατάσταση με κβαντικό μαγνητικό αριθμό spin, $m_1 = 1/2$) είτε αντιπαράλληλο (ενεργειακή κατάσταση με $m_1 = -1/2$) προς το εξωτερικό πεδίο. Οι δύο προσανατολισμοί δεν έχουν την ίδια ενέργεια και συνεπώς δεν είναι εξίσου πιθανοί. Ο παράλληλος προσανατολισμός είναι χαμηλότερης ενέργειας, ευνοώντας σχετικά αυτή την κατάσταση του spin έναντι του αντιπαράλληλου προσανατολισμού.

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

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

$H_{\pi\rho\alpha\gamma\mu\alpha\tau\imath\kappa\delta} = H_{\epsilon\phi\alpha\rho\mu\sigma\zeta\delta\mu\epsilon\nu\sigma} - H_{\tau\sigma\pi\imath\kappa\delta}$.

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

Συνέπεια των παραπάνω είναι ότι οι πυρήνες σε διαφορετικά χημικά περιβάλλοντα δίνουν διαφορετική γραμμή συντονισμού. Για να εκφραστούν με ενιαίο τρόπο οι μεταβολές των γραμμών συντονισμού, στους διάφορους πυρήνες, χρησιμοποιούνται πρότυπες ουσίες αναφοράς και εισάγεται η έννοια της χημικής μετατόπισης. Ως ουσία αναφοράς χρησιμοποιείται συνήθως το τετραμεθυλοσιλάνιο [TMS, (CH₃)₄Si], που έχει δώδεκα ισοδύναμα (άρα δίνει μία κορυφή απορρόφησης) και ισχυρά προασπισμένα πρωτόνια. Η χημική μετατόπιση ορίζεται από τις σχέσεις:

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

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

όπου *H*_α και *H*_δ τα πεδία συντονισμού των πυρήνων της ουσίας αναφοράς και του δείγματος αντίστοιχα, ενώ *v*_α και *v*_δ οι συχνότητες συντονισμού της ουσίας αναφοράς και του δείγματος αντίστοιχα. Όπως ορίζεται το δ στις σχέσεις είναι αδιάστατο και ανεξάρτητο του *H*_{εφαρμοζόμενο}. Από τις ίδιες εξισώσεις φαίνεται ότι όσο πιο θωρακισμένος είναι ένας πυρήνας τόσο ο συντονισμός θα επιτυγχάνεται σε υψηλά εφαρμοζόμενα μαγνητικά πεδία, όταν σαρώνεται το μαγνητικό πεδίο, αλλά σε χαμηλότερη συχνότητα, όταν μεταβάλλεται η ραδιοσυχνότητα.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΕΣ ΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΕΙΣ ¹ Η-NMR (ppm)										
R-C H 3	0.8-1.2	Μεθύλιο	CH-O		3.7-5.4	Εστερικά αλκύλια				
R-C H 2-R	1.1-1.5	Μεθυλένιο								
R ₃ C H	1.4-1.9	Μεθίνιο	A-C H 2-C1		~3.5 (A=R), ~4.5 (A=Ar)	Χλωρίδια				
C≡C H	1.5-3.0	Ακραία αλκίνια								
=	1.6-1.8	Αλλυλικά μεθύλια	A-C H 2-Br		~3.4 (A=R), ~4.4 (A=Ar)	Βρωμίδια				
N-H	0.5-4.0*	Πρωτόνια αμινών	А-С <i>Н</i> ₂ -І		~3.2 (A=R), ~4.4 (A=Ar)	Ιωδίδια				
R-O H	1.0-5.5*	Αλκοολικά υδροξύλια	A-C H 2-F		~4.3 (A=R), ~5.3 (A=Ar)	Φθορίδια				
R-S H	1.1-1.9*	Αλκυλοθειόλες		CH-NO ₂	4.2-4.7	Νιτροαλκάνια				
°-C <i>H</i>	2.0-3.6	α-Καρβονυλικά πρωτόνια	H		4.5-6.0	Βινυλικά πρωτόνια				
CH-SH	2.0-3.2	α-Πρωτόνια θειολών	$\left[\begin{array}{c} \text{RCO-N}\boldsymbol{H} \\ \text{RCON}\boldsymbol{H}_{2} \end{array}\right]$		5.0-8.0	Αμιδικά πρωτόνια				
CH	2.2-3.0	Βενζυλικά πρωτόνια		Лон	5.0-8.0*	Φαινολικά υδροξύλια				
CH-N	2.2-3.6	α-Πρωτόνια Αμινών	М — Н		6.8-7.8	Αρωματικά πρωτόνια				
SH	2.7-4.2	Αρωματικές θειόλες	$\begin{array}{c} \mathbb{R} \qquad H^{a} \\ H^{c} \qquad H^{b} \end{array}$		$H^{a}: 4.0-6.6$ $H^{b}: 3.8-6.2$ $H^{c}: 5.2-7.3$	Βινυλικά πρωτόνια				
$CH - OR(\eta OAr)$	3.3-4.3	Αιθερικά πρωτόνια		RCOO H	10-13*	Καρβοξυλικά οξέα				
CH-OH	3.5-4.0*	α-Πρωτόνια Αλκοολών		↓ ↓ ↓ ↓	9.0-10.1	Αλδεϋδικά πρωτόνια				

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις στη φασματοσκοπία ¹HNMR (ppm).

* Αφορούν σε ανταλλάξιμα πρωτόνια

Από τα παραπάνω διαπιστώνεται ότι κάθε διαφορετικός πυρήνας (π.χ. ¹Η) θα σχηματίζει μία απλή κορυφή. Συχνό φαινόμενο αποτελεί, ωστόσο, η απορρόφηση ενός πυρήνα να διασπάται σε πολλαπλές κορυφές. Το φαινόμενο των πολλαπλών απορροφήσεων αποκαλείται σχάση spin – spin και προκαλείται από την αλληλεπίδραση ή σύζευξη των πυρηνικών spin γειτονικών πυρήνων. Εκτός από την ηλεκτρονιακή προστασία, το μαγνητικό πεδίο που υφίσταται ένας πυρήνας επηρεάζεται επίσης από τους γειτονικούς μαγνητικούς πυρήνες. Σύμφωνα με ένα γενικό κανόνα, που αποκαλείται κανόνας *ν*+1, πυρήνες με *ν* ισοδύναμους γειτονικούς πυρήνες εμφανίζουν *ν*+1 κορυφές στο φάσμα του NMR. Οι σχετικές εντάσεις των κορυφών είναι οι συντελεστές των όρων του αναπτύγματος (1+ χ)^ν. Έτσι για παράδειγμα, ένας πυρήνας που διαχωρίζεται από δύο άλλους γειτονικούς θα δίνει μια τριπλή κορυφή με εντάσεις κορυφών 1:2:1. Η απόσταση μεταξύ των επιμέρους κορυφών σε μία πολλαπλή κορυφή ονομάζεται σταθερά σύζευξης και συμβολίζεται *J*. Η σταθερά σύζευξης είναι ίδια και για τους δύο πυρήνες, τα

spin των οποίων συζεύγνυνται και δεν εξαρτάται από την ισχύ πεδίου του φασματοφωτομέτρου.

Στη φασματοσκοπία ¹H–NMR και όχι στη ¹³C–NMR (λόγω του πυρηνικού φαινομένου Overhauser, Nuclear Overhauser Effect, NOE) το εμβαδόν που περικλείει κάθε κορυφή είναι ανάλογο προς τον αριθμό των πρωτονίων που προκαλούν την κορυφή. Ολοκληρώνοντας το εμβαδόν κάθε κορυφής είναι δυνατό να μετρήσουμε το σχετικό αριθμό των κάθε είδους πρωτονίων σε ένα μόριο. Με τον τρόπο αυτό εξάγονται ποσοτικά συμπεράσματα συγκρίνοντας το εμβαδόν 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 φασματοφωτόμετρων 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^{57,58}.

Οι μετρήσεις της φασματοσκοπίας ¹Η–ΝΜR πραγματοποιήθηκαν σε συσκευή Bruker 600 MHz.

3.4. Δυναμική Σκέδαση Φωτός

Σε ένα διάλυμα πολυμερούς τα μόρια του βρίσκονται σε διαρκή τυχαία κίνηση που προκαλείται από τη θερμική ενέργεια που μεταβιβάζεται σε αυτά μέσω συγκρούσεων με τα μόρια του διαλύτη (κίνηση Brown). Εξαιτίας των συγκρούσεων τα μόρια του πολυμερούς εκτελούν μεταφορική αλλά και περιστροφική κίνηση και οι συντελεστές διάχυσής τους συνδέονται άμεσα με την κίνησή τους. Αφού τα κινούμενα μόρια σκεδάσουν φως με τρόπο που συνδέεται ποσοτικά με την κίνησή τους, είναι δυνατόν χρησιμοποιώντας πειράματα σκέδασης φωτός να προσδιοριστούν οι συντελεστές διάχυσης των μορίων. Οι συντελεστές αυτοί συνδέονται άμεσα με χαρακτηριστικές ιδιότητες των μορίων, όπως το μοριακό βάρος, το σχήμα και το μέγεθός τους.

Όταν μονοχρωματική ακτινοβολία στο ορατό φάσμα προσπίπτει σε ένα διάλυμα, το φως σκεδάζεται λόγω διακυμάνσεων συγκέντρωσης. Οι διακυμάνσεις αυτές συνδέονται με την κίνηση Brown. Τα σκεδαζόμενα μακρομόρια σε ένα διάλυμα κινούνται με παρόμοιες ταχύτητες αλλά σε τυχαίες κατευθύνσεις. Εξαιτίας της ομοιότητας της κίνησής τους το σκεδαζόμενο φως δηλαδή ο αριθμός των σκεδαζόμενων φωτονίων εμφανίζει συσχέτιση με το χρόνο. Μια συνάρτηση χρονικής συσχέτισης μεταξύ δύο σημάτων Α και Β δίνεται από την σχέση:

$$g(t) = \lim_{T \to \infty} (1/T) \int_{t_0}^{t_0+T} A(t)B(t-\tau)dt$$

όπου τ ο χρόνος καθυστέρησης (ή χρόνος δειγματοληψίας), to ο αρχικός χρόνος, Τ ο χρόνος διεξαγωγής της μέτρησης. Εάν η Β είναι μία αργοπορημένη μορφή της Α τότε η παραπάνω εξίσωση αποτελεί συνάρτηση αυτοσυσχέτισης.

Στην απλή περίπτωση συνόλου από σφαιρικά μη αλληλεπιδρώντα μεταξύ τους ομοειδή σωματίδια που κινούνται μέσα σε ένα διάλυμα η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης έχει την μορφή:

$$g(\tau) = A_o + A\exp(-\Gamma t)$$

όπου $\Gamma = D_t q^2$ είναι η σταθερά παρακμής της συνάρτησης όπου χάνεται, δηλαδή η συσχέτιση των σημάτων, D_t ο συντελεστής διάχυσης και q το άνυσμα σκέδασης ^{59,60,61}.

Οι μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός, πραγματοποιήθηκαν με κατάλληλη διάταξη (ALV 5000 setup) που αποτελείται από γωνιόμετρο με εύρος γωνιών 25°-150° και laser Nd-Yang με λ=532 nm και P=120mW.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1 Τεχνική Υψηλού Κενού (High Vacuum Technique, HVT)⁶²

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές υψηλού κενού τόσο για τη σύνθεση των επιθυμητών μονομερών και πολυμερών, όσο και για τον καθαρισμό των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν. Αξίζει να τονιστεί ότι είναι αναγκαία η υψηλή καθαρότητα όλων των αντιδραστηρίων προκειμένου να αποφευχθούν παράπλευρες ανεπιθύμητες αντιδράσεις όπως μη ελεγχόμενος πολυμερισμός ή η ύπαρξη παραπροϊόντων στα μονομερή. Ο συνδυασμός τεχνικών υψηλού κενού και κατασκευής ειδικών συσκευών πολυμερισμού με χρήση υαλουργίας εξασφαλίζει τον ελεγχόμενο χαρακτήρα των αντιδράσεων και ως εκ τούτου τη σύνθεση καλά καθορισμένων μακρομορίων.

Όσο αφορά τη σύνθεση των επιθυμητών μονομερών (Ν-καρβοξυ ανυδριτών), η τεχνική υψηλού κενού συμβάλει στην απομάκρυνση πιθανών προσμείξεων από τα αντιδραστήρια όπως ο ατμοσφαιρικός αέρας και η υγρασία που όπως ήδη έχει αναφερθεί¹¹ προκαλούν διάσπαση (υδρόλυση) του δακτυλίου είτε ανεπιθύμητη εκκίνηση πολυμερισμού. Επίσης επιτυγχάνεται η απομάκρυνση προσμείξεων όπως αμίνες, αλκοόλες, οξέα ή σταθεροποιητές που εμπεριέχονται στους εμπορικά διαθέσιμους διαλύτες και έχουν την ικανότητα να δρουν είτε ως απαρχητές στο ROP Ν-καρβοξυ ανυδριτών είτε να προκαλούν πρόωρο τερματισμό των μακρομορίων.

Η γραμμή υψηλού κενού (High Vacuum Line, HVL)^{62,63} (Εικόνα 12) κατασκευάστηκε στο εργαστήριο με χρήση υαλουργίας. Αποτελείται από γυάλινους σωλήνες τύπου Pyrex (Α, Εικόνα 12), στρόφιγγες τεφλόν υψηλού κενού ώστε να απομονώνεται το σύστημα από τον ατμοσφαιρικό αέρα (Β, Εικόνα 12), αντλία ελαίου (Γ, Εικόνα 12), αντλία διαχύσεως υδραργύρου (Δ, Εικόνα 12) και παγίδα υγρού αζώτου (Ε, Εικόνα 12). Η εφαρμογή κενού στις επιθυμητές συσκευές πραγματοποιείται με την προσαρμογή τους στη γραμμή υψηλού κενού σε μία από τις πιθανές εξόδους ΣΤ (Εικόνα 12). Χρησιμοποιώντας τις κατάλληλες στρόφιγγες, είναι δυνατή η απομόνωση των

επιθυμητών τμημάτων της γραμμής ώστε τελικά οι διεργασίες να πραγματοποιούνται υπό κενό και ελεγχόμενα. Η παγίδα υγρού αζώτου είναι καθοριστικής σημασίας αφού συμπυκνώνει οτιδήποτε πτητικό εντοπίζεται στη γραμμή αποφεύγοντας έτσι τη διαρροή του προς την απόσταξη υδραργύρου ή την αντλία ελαίου. Για τον έλεγχο ύπαρξης κενού, πτητικών ουσιών, ατμοσφαιρικού αέρα ή υγρασίας χρησιμοποιείται πηνίο Tesla το οποίο δρα ως οπτικοακουστικό μέσο για τη εξασφάλιση των επιθυμητών συνθηκών.



Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση Γραμμής Υψηλού Κενού (High Vacuum Line, HVL)^{62,63}

Η λειτουργία της γραμμής υψηλού κενού βασίζεται στην απόσταξη υδραργύρου και παρέχει κενό της τάξης των 10⁻⁶ mm Hg. Σε πρώτο στάδιο, η αντλία ελαίου δημιουργεί ένα προκαταρκτικό τυπικό κενό της τάξης των 10⁻²-10⁻³ mm Hg το οποίο είναι απαραίτητο ώστε να επιτευχθεί η απόσταξη του υδραργύρου. Ο υδράργυρος θερμαίνεται με τη βοήθεια θερμομανδύα και καθώς τα μόρια του κινούνται ανοδικά, διέρχονται από τη στένωση της αντλίας διαχύσεως όπου προκαλείται αύξηση της ταχύτητάς του και ελάττωση της πίεσής τους. Το παραπάνω φαινόμενο οφείλεται στην αρχή Bernoulli κατά την οποία ο ρυθμός ροής ενός ασυμπίεστου ρευστού δεν πρέπει να αλλάζει όταν το ρευστό ρέει κατά μήκος σωλήνα που δεν έχει σταθερή διατομή. Όταν επιταχύνεται ένα στοιχείο του ασυμπίεστου ρευστού θα πρέπει να κινείται από μία περιοχή υψηλής πίεσης σε περιοχή χαμηλής πίεσης ώστε τελικά να

υπάρχει συνισταμένη δύναμη που το επιταχύνει προς τα εμπρός. Όταν η διατομή του σωλήνα ροής μεταβάλλεται, θα πρέπει να αλλάζει και η πίεση ακόμα και αν δεν υπάρχει διαφορά στο ύψος. Έτσι, κατά τη διέλευση του υδραργύρου από τη στένωση, προκαλείται αύξηση της ταχύτητας και λόγω της ταυτόχρονης ελάττωσης της πίεσης δημιουργείται διαφορά πίεσης στα άκρα της στήλης. Ο υδράργυρος κατά την επαφή του με τα τοιχώματα του ψυκτήρα συμπυκνώνεται και επιστρέφει στη φιάλη όπου επαναλαμβάνεται όλη η διαδικασία (Εικόνα 12). Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται το υδραργύρου.

4.2 Καθαρισμός Διαλυτών⁶²

Όπως προαναφέρθηκε, η υψηλή καθαρότητα των διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν είναι καθοριστικής σημασίας καθώς προσμείξεις όπως υγρασία, ατμοσφαιρικός αέρας ή διάφοροι σταθεροποιητές μπορούν να οδηγήσουν σε μη ελεγχόμενες αντιδράσεις και υψηλές κατανομές μοριακών βαρών. Για το λόγο αυτό, οι διαλύτες πριν τη χρήση τους υπέστησαν καθαρισμό με χρήση της γραμμής υψηλού κενού εκτός και αν αναφέρεται κάπου το αντίθετο.

4.2.1 Βενζόλιο (Benzene)

Το εμπορικά διαθέσιμο βενζόλιο τοποθετήθηκε σε φιάλη με λεπτόκοκκα διαμερισμένο υδρίδιο ασβεστίου (CaH₂) και αφέθηκε υπό ανάδευση για μία νύχτα. Την επόμενη μέρα, έπειτα από ενδελεχής απαέρωση, το βενζόλιο αποστάχθηκε σε καθαρή σφαιρική φιάλη στην οποία έχουν πρώτα εισαχθεί με ένεση ~10 mL κανονικού βουτυλολιθίου (n-BuLi). Το n-BuLi αντιδρά με υπολείμματα προσμείξεων και με την ολοκλήρωση της απόσταξης το καθαρό βενζόλιο απέκτησε κίτρινο χρώμα (ένδειξη υψηλής καθαρότητας) και φυλάχθηκε υπό κενό.

4.2.2 Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)

Το DMSO που χρησιμοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας δεν υπέστη συγκεκριμένο καθαρισμό. Όπου ήταν απαραίτητη η χρήση άνυδρου DMSO χρησιμοποιήθηκε εμπορικά διαθέσιμο άνυδρο DMSO το οποίο φυλάσσεται σε μοριακά κόσκινα εντός glove box.

4.2.3 Διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF)

Σε σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκαν ~2.5 q ρητίνης ισοκυανικών (StratoSpheres[™] PL-NCO (Isocyanate) resin) και αφέθηκαν για ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για 2 ώρες. Στη συνέχεια, εντός glove box, η ρητίνη μεταφέρθηκε σε καθαρή φιάλη μαζί με την επιθυμητή ποσότητα DMF και αφέθηκαν υπό ανάδευση εντός glove box για μία νύχτα. Το DMF λόγω της ρητίνης απέκτησε κίτρινο χρώμα. Την επόμενη μέρα, έπειτα από ενδελεχή απαέρωση, το DMF αποστάχθηκε κλασματικά σε καθαρή φιάλη και φυλάχθηκε στους 3 °C υπό κενό. Το DMF χρησιμοποιείται ως διαλύτης στο ROP Ν-καρβοξυ ανυδριτών. Σε περίπτωση θερμικής και φωτοχημικής αποικοδόμησής του παράγεται διμεθυλαμίνη (DMA) ενώ σε περίπτωση υδρόλυσής του (Σχήμα 10) παράγεται DMA και φορμικό οξύ.



Σχήμα 10: Αντίδραση Υδρόλυσης DMF

Όλα τα προαναφερόμενα δρουν ως απαρχητές στο ROP Ν-καρβοξυ ανυδριτών και για το λόγο αυτό η υψηλή καθαρότητά του είναι κομβικής σημασίας για τη σύνθεση καλά καθορισμένων μακρομορίων.

4.2.4 Διχλωρομεθάνιο (DCM)

Η επιθυμητή ποσότητα εμπορικά διαθέσιμου DCM τοποθετήθηκε σε φιάλη με λεπτόκοκκα διαμερισμένο CaH₂ και αφέθηκε υπό ανάδευση για 2 ημέρες (η παραμονή του DCM στο CaH₂ είναι ικανοποιητική και για μόνο μερικές ώρες). Στη συνέχεια, έπειτα από ενδελεχή απαέρωση, το DCM αποστάχθηκε σε φιάλη που περιείχε προξηραμένα μοριακά κόσκινα 3 Å και φυλάχθηκε υπό κενό μέχρι τη χρήση του.

4.2.5 Εξάνιο

Το εμπορικά διαθέσιμο εξάνιο τοποθετήθηκε σε σφαιρική φιάλη με λεπτόκοκκα διαμερισμένο CaH₂ και αφέθηκε υπό ανάδευση για μία νύχτα. Στη συνέχεια, ο διαλύτης, έπειτα από ενδελεχή απαέρωση, αποστάχθηκε σε καθαρή φιάλη που είχαν προηγουμένως εισαχθεί μέσω ένεσης ~10 mL n-BuLi και τέλος φυλάχθηκε υπό κενό.

4.2.6 Μεθανόλη (MeOH)

Η επιθυμητή ποσότητα MeOH μεταφέρθηκε σε σφαιρική φιάλη που περιείχε λεπτόκοκκα διαμερισμένο CaH₂ και αφέθηκε υπό ανάδευση για 2 ώρες. Ακολούθως, έπειτα από ενδελεχή απαέρωση, ο διαλύτης αποστάχθηκε σε καθαρή σφαιρική και φυλάχθηκε υπό κενό μέχρι τη χρήση του.

4.2.7 Οξικός Αιθυλεστέρας (EtOAc)

Ο οξικός αιθυλεστέρας τοποθετήθηκε σε σφαιρική φιάλη με ποσότητα πεντοξειδίου του φωσφόρου (P₂O₅) και αφέθηκαν υπό ανάδευση για μία νύχτα. Χαρακτηριστικό της δέσμευσης της υγρασίας του διαλύτη από το ξηραντικό μέσο αποτελεί το μαύρο χρώμα που αποκτά το P₂O₅ μετά από μερικές ώρες. Στη συνέχεια ο διαλύτης αποστάχθηκε σε καθαρή σφαιρική φιάλη και φυλάχθηκε υπό κενό.

4.2.8 Τετραϋδροφουράνιο (THF)

Το εμπορικά διαθέσιμο THF τοποθετήθηκε σε φιάλη και αφέθηκε υπό ανάδευση με λεπτόκοκκα διαμερισμένο CaH₂ για μία νύχτα. Στη συνέχεια, έπειτα από εκτενή απαέρωση, το THF μεταφέρθηκε μέσω απόσταξης σε καθαρή φιάλη που περιείχε κομμάτια μεταλλικού νατρίου και αφέθηκε υπό ανάδευση στη γραμμή για μία νύχτα. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ξανά ενδελεχής απαέρωση και το THF αποστάχθηκε σε καθαρή φιάλη που περιείχε κράμα νατρίου/καλίου σε αναλογία 1/3 και αφέθηκε υπό ανάδευση. Έπειτα από μερικές ώρες ο διαλύτης απέκτησε χαρακτηριστικό μπλε χρώμα πράγμα που αποδεικνύει την υψηλή καθαρότητά του. Ο διαλύτης φυλάχθηκε υπό κενό.

4.3 Καθαρισμός και Συλλογή Λοιπών Αντιδραστηρίων⁶²

4.3.1 Τριαιθυλαμίνη (Et₃N)

Η επιθυμητή ποσότητα τριαιθυλαμίνης μεταφέρθηκε σε φιάλη με λεπτόκοκκα διαμερισμένο CaH₂ και αφέθηκε υπό ανάδευση για μία νύχτα. Στη συνέχεια, αφού η Et₃N απαερώθηκε εκτενώς, μεταφέρθηκε μέσω απόσταξης σε φιάλη με κομμάτια μεταλλικού Na και φυλάχθηκε υπό κενό.

4.3.2 Τριμεθυλοχλωροσιλάνιο (TMSCI)

Σε σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκαν 10 mL TMSCI και έπειτα από ενδελεχή απαέρωση ~6 mL εκδιώχθηκαν σε διπλανή σφαιρική φιάλη και 2 mL συλλέχθηκαν σε καθαρή, ειδικά κατασκευασμένη βαθμονομημένη αμπούλα με στρόφιγγα (Εικόνα 13). Το TMSCI παρέμεινε υπό κενό στην αμπούλα για μία νύχτα μέχρι τη χρήση του. Για τη διατήρηση αδρανών συνθηκών, πριν την προσθήκη του στη φιάλη της αντίδρασης, η αμπούλα πληρώθηκε με αργό. Αξίζει να αναφερθεί ότι είναι σημαντικό να πραγματοποιηθεί εκτενή απαέρωση όπως και κλασματική απόσταξη λόγω του ότι το TMSCI διασπάται με την πάροδο του χρόνου παράγοντας HCI.



Εικόνα 13: Αμπούλα συλλογής TMSCI

4.3.3 Συλλογή S-tert-butyl-mercapto-L-Cysteine Methyl Ester

Ο συγκεκριμένος απαρχητής σχεδιάστηκε και συντέθηκε στο εργαστήριο όπως αναλύεται διεξοδικά στην παράγραφο 3.8.1. Μετά τη σύνθεσή του, ήταν απαραίτητη η συλλογή του σε βαθμονομημένη αμπούλα ώστε στο επόμενο στάδιο να προσαρτηθεί στην ειδικά κατασκευασμένη συσκευή πολυμερισμού με τεχνική υαλουργίας. Για τη συλλογή του αρχικά κατασκευάστηκε η αμπούλα της Εικόνας 14. Στη συνέχεια, στη φιάλη που βρισκόταν το τελικό προϊόν (110 mg) σε ατμόσφαιρα αργού, προστέθηκαν 7,65 mL καθαρό DCM (c_{διαλύματος}=0.064M) και από αυτό το διάλυμα, μεταφέρθηκαν εντός της αμπούλας με ένεση 2 mL (0.1288 mmol). Έπειτα από 2 απαερώσεις, απομακρύνθηκε με σύντηξη στη στένωση το τμήμα που έφερε το septum και ξανά με σύντηξη η αμπούλα απομακρύνθηκε από τη γραμμή και φυλάχθηκε στους -20 °C.



Εικόνα 14: Αμπούλα συλλογής απαρχητή S-tert-butyl-mercapto-L-Cysteine Methyl Ester

4.4 Σύνθεση S-tert-butyl-mercapto-L-Cysteine N-Carboxy Anhydride (tBM-L-Cys NCA)^{51,64}



Σχήμα 11: Αντίδραση σύνθεσης του προστατευμένου ανυδρίτη της L-κυστεΐνης tBM-L-Cys NCA

Η σύνθεση του tBM-L-Cys NCA πραγματοποιήθηκε όπως έχει ήδη αναφερθεί^{51,64}. Πιο συγκεκριμένα, σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκαν αρχικά 5.372 g (25.663 mmol) πρόδρομου αμινοξέος H-Cys(StBu)-OH και αφέθηκαν για ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα. Στη συνέχεια αποστάχθηκαν στη φιάλη 120 mL EtOAc και παρατηρήθηκε η δημιουργία λευκού γαλακτώματος λόγω του ότι το πρόδρομο αμινοξύ δεν διαλύεται σε EtOAc (Εικόνα 15, Α). Έπειτα, η φιάλη απομακρύνθηκε από τη γραμμή όπου ακολούθησε η προετοιμασία της διάταξης για την υπόλοιπη πειραματική πορεία. Προσαρμόστηκαν στη συσκευή είσοδος και έξοδος για

παροχή αργού καθώς και ψυκτήρας με προσθετική χοάνη για τη διαδοχική προσθήκη των αντιδραστηρίων. Σε T=25 °C και υπό ροή αργού προστέθηκαν στη φιάλη 9.22 mL (56.986 mmol) (R)-(+)-limonene (αντιδραστήριο δέσμευσης του παραγόμενου υδροχλωρίου) σε μία δόση και η φιάλη θερμάνθηκε σταδιακά έως ότου επιτευχθεί επαναρροή (reflux, 75-80 °C). Στη συνέχεια, σε καθαρή σφαιρική φιάλη αποστάχθηκαν μέσω γραμμής 40 mL καθαρού EtOAc. Η φιάλη πληρώθηκε με αργό και μέσα προστέθηκαν 5.31 g (17.894 mmol) τριφωσγενίου. Το διάλυμα προστέθηκε στάγδην, υπό ανάδευση, ροή αργού και καθώς η αντίδραση βρισκόταν υπό επαναρροή. Η προσθήκη διήρκησε περίπου 40 λεπτά και η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση, ροή αργού και επαναρροή για περίπου 2.5 ώρες. Πρώτη ένδειξη σχηματισμού του Ν-καβοξυ ανυδρίτη αποτέλεσε η αλλαγή από λευκό γαλάκτωμα υποκίτρινο διαυγές διάλυμα διάρκεια σε κατά тη πραγματοποίησης της αντίδρασης.



Εικόνα 15: Α: Πρόδρομο αμινοξύ H-Cys(StBu)-ΟΗ σε ΕtΟΑc πριν την προσθήκη τριφωσγενίου, Β: μετά από δυόμιση ώρες αντίδρασης προς σχηματισμό του tBM-L-Cys NCA.

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, η φιάλη ψύχθηκε υπό ανάδευση και συνεχή παροχή αργού και το διάλυμα συμπυκνώθηκε μέσω γραμμής υψηλού κενού σε τελικό όγκο 40 mL. Ακολούθησε ανακρυστάλλωση του προϊόντος με καταβύθιση υπό ροή αργού σε δεκαπλάσιο όγκο παγωμένου εξανίου και διήθηση υπό κενό σε χωνί Buchner. Ο στερεός tBM-L-Cys NCA συλλέχθηκε σε φιάλη και αφέθηκε για ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα. Η διαδικασία της ανακρυστάλλωσης πραγματοποιήθηκε την επόμενη μέρα ξανά με απόσταξη 50 mL EtOAc στο προϊόν και χρήση υδατόλουτρου με χλιαρό νερό ώστε να διαλυθεί πλήρως. Ακολούθησε καταβύθιση σε δεκαπλάσιο όγκο παγωμένου εξανίου και διήθηση υπό κενό σε χωνί Buchner προς απομόνωση του τελικού ιριδίζοντος στερεού tBM-L-Cys NCA που προέκυψε. Το ιριδίζον στερεό αφέθηκε για ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού και μεταφέρθηκε εντός glove box για αποθήκευσή του σε αδρανή ατμόσφαιρα. Η τελική μάζα του tBM-L-Cys NCA ήταν ίση με 4.4 g (18.698 mmol).

Απόδοση αντίδρασης: $\alpha = \frac{n_{\pi \epsilon i \rho \alpha \mu \alpha \tau i \kappa \dot{\alpha}}}{n_{\theta \epsilon \omega \rho \eta \tau i \kappa \dot{\alpha}}} * 100 \% = \frac{18.698 \ mmol}{25.663 \ mmol} * 100 \% = 73 \%$

4.5 Σύνθεση N^{im}-Trityl-L-Histidine N-Carboxy Anhydride (Nim-Trt-His NCA)⁶⁵

Η σύνθεση του Ν-καβοξυ ανυδρίτη της Ν^{im}-Τριτυλο-L-Ιστιδίνης (Ν^{im}-Trt-His NCA) πραγματοποιήθηκε όπως έχει ήδη αναφερθεί⁶⁵. Πιο συγκεκριμένα, η πειραματική πορεία αποτελείται από δύο κύρια στάδια. Στο πρώτο στάδιο λαμβάνει χώρα η σύνθεση του υδροχλωρικού άλατος της Ν^{im}-Τριτυλο-L-Ιστιδίνης (Ν^{im}-Trityl-L-Histidine-NCA*HCI) με χρήση θειονυλοχλωριδίου (SOCI₂) ως μέσω χλωρίωσης κατά την αντίδραση σχηματισμού του δακτυλίου του Ν-καβοξυ ανυδρίτη. Στο δεύτερο και τελικό στάδιο επιτυγχάνεται η απομάκρυνση του HCI με χρήση ισομοριακής ποσότητας τριαιθυλαμίνης (Et₃N) καταλήγοντας στο επιθυμητό προϊόν του N^{im}-Trt-His NCA.



Σχήμα 12: Αντίδραση σύνθεσης του προστατευμένου ανυδρίτη της L-Ιστιδίνης N^{im}-Trt-L-His NCA

4.5.1 Σύνθεση N^{im}-Trityl-L-Histidine NCA*HCI

Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκαν 20 g (40.194 mmol) πρόδρομου αμινοξέος Boc-His(trt)-OH και αφέθηκαν για ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα. Την επόμενη μέρα αποστάχθηκαν στο αμινοξύ περίπου 200 mL καθαρού THF και έπειτα πραγματοποιήθηκε απαέρωση. Παρατηρήθηκε η δημιουργία κιτρινωπού διαλύματος. Στη συνέχεια η φιάλη απομακρύνθηκε από τη γραμμή, πληρώθηκε με αργό και ακολούθησε η προετοιμασία της διάταξης για την υπόλοιπη πειραματική πορεία η οποία αποτελούνταν από είσοδο και έξοδο αργού στο σύστημα και προσθετική χοάνη για τη στάγδην προσθήκη των αντιδραστηρίων. Ταυτόχρονα, στη γραμμή υψηλού κενού προσαρμόστηκε καθαρή φιάλη, φιάλη που περιείχε SOCI₂ και βαθμονομημένη αμπούλα για τη συλλογή του. Έπειτα από εκτενή ξήρανση (flame-drying) των συσκευών αποστάχθηκαν 30 mL καθαρού THF στην καθαρή φιάλη και 3.25 mL (44.801 mmol) SOCl₂ στη βαθμονομημένη αμπούλα και τελικά το SOCl₂ μεταφέρθηκε μέσω απόσταξης στη φιάλη με το THF. Η φιάλη με το διάλυμα του αμινοξέος τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο και υπό ροή αργού μεταφέρθηκε στην προσθετική χοάνη της διάταξης το διάλυμα του SOCl₂/THF. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε στάγδην και υπό ροή αργού η προσθήκη του SOCl₂/THF στην αντίδραση σε διάρκεια 30 λεπτών. Παρατηρήθηκε ότι με το πέρας της προσθήκης το διάλυμα είχε αποκτήσει ανοιχτό πορτοκαλί χρώμα με αυξημένο, σε σχέση με το αρχικό, ιξώδες. Έπειτα από 1 ώρα αντίδρασης του πρόδρομου αμινοξέος με το SOCl₂ παρατηρήθηκε περαιτέρω αύξηση του ιξώδους και τελικά σχηματισμός λευκού συμπαγούς ιζήματος σε όλη την έκταση του αρχικού διαλύματος (Εικόνα 16).



Εικόνα 16: Πρόδρομο αμινοξύ Boc-His(Trt)-OH σε THF αμέσως μετά την προσθήκη SOCI₂, Β: μετά από 1.5 ώρα αντίδρασης προς σχηματισμό του N^{im}-Trt-L-His-NCA*HCI

Το παραπάνω γεγονός αποτελεί ένδειξη για την ολοκλήρωση της αντίδρασης και την υψηλή απόδοσή της. Στη συνέχεια, υπό ροή αργού, ακολούθησε προσθήκη 1.5 L διαιθυλαιθέρα (Et₂O) στη φιάλη και θραύση του ιζήματος με ταυτόχρονη συνεχή ανάδευση προς απομάκρυνση ενδιάμεσων παραπροϊόντων και καταβύθιση του N^{im}-Trityl-L-Histidine-NCA*HCI ως κύριου προϊόντος. Έπειτα πραγματοποιήθηκε διήθηση υπό κενό και συνεχή παροχή αργού σε χωνί Buchner. Το στερεό συλλέχθηκε σε φιάλη και αφέθηκε για ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα. Ακολούθησε απόσταξη ~300 mL EtOAc στη φιάλη με το στερεό και παρατηρήθηκε η δημιουργία κίτρινου γαλακτώματος καθώς το N^{im}-Trityl-L-Histidine-NCA*HCl δε διαλύεται σε EtOAc . Η φιάλη με το γαλάκτωμα πληρώθηκε με αργό, τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 40 °C περίπου και αφέθηκε υπό ανάδευση για μία ώρα. Στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε παγόλουτρο στους 0 °C έτσι ώστε να καταβυθιστεί πλήρως το επιθυμητό προϊόν N^{im}-Trityl-L-Histidine-NCA*HCl. Τέλος, ακολούθησε διήθηση υπό κενό και συνεχή παροχή αργού σε χωνί Buchner και το υποκίτρινο προϊόν συλλέχθηκε σε προζυγισμένη φιάλη και αφέθηκε για ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα. Η μάζα του τελικού προϊόντος N^{im}-Trityl-L-Histidine-NCA*HCl ήταν ίση με 14.621 g (31.79 mmol).

Απόδοση αντίδρασης:
$$\alpha = \frac{n_{\pi \epsilon l \rho \alpha \mu \alpha \tau l \kappa \dot{\alpha}}}{n_{\theta \epsilon \omega \rho \eta \tau l \kappa \dot{\alpha}}} * 100 \% = \frac{31.79 \ mmol}{40.194 \ mmol} * 100 \% = 79 \%$$

4.5.2 Σύνθεση Nim-Trityl-L-Histidine N-Carboxy Anhydride (N^{im}-Trt-His NCA)

Στο επόμενο στάδιο της πειραματικής πορείας αποστάχθηκαν στη φιάλη που περιείχε το N^{im}-Trityl-L-Histidine-NCA*HCl ~250 mL EtOAc καταλήγοντας σε λευκό γαλάκτωμα. Στη συνέχεια η φιάλη απομακρύνθηκε από τη γραμμή, πληρώθηκε με αργό, τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο στους 0 °C με συνεχή ροή αργού και προετοιμάστηκε η διάταξη για την υπόλοιπη πειραματική διαδικασία. Η διάταξη αποτελούνταν από είσοδο και έξοδο αργού και προσθετική χοάνη για τη στάγδην προσθήκη των αντιδραστηρίων. Ταυτόχρονα παρασκευάστηκε διάλυμα Et₃N, 4.21 mL (30.205 mmol) Et₃N σε 40 mL EtOAc, όπως ακριβώς προαναφέρθηκε και για το SOCI₂. Αφού η φιάλη με το διάλυμα Et₃N/EtOAc πληρώθηκε με αργό, το διάλυμα μεταφέρθηκε στην προσθετική χοάνη της διάταξης και ξεκίνησε η στάγδην προσθήκη του στο γαλάκτωμα του N^{im}-Trityl-L-Histidine-NCA*HCI υπό ισχυρή ανάδευση και ροή αργού στους 0 °C. Είναι κρίσιμης σημασίας να διατηρηθούν οι συγκεκριμένες συνθήκες αφού η Et₃N δρα και ως απαρχητής για την έναρξη πολυμερισμού του ανυδρίτη. Επομένως, με τη χρήση παγόλουτρου και ισχυρής ανάδευσης αποφεύγεται η τοπική περίσσεια Et₃N και επιτυγχάνεται μόνο η ποσοτική δέσμευση του HCI από το N^{im}-TrityI-L-Histidine-NCA*HCI δίνοντας ως προϊόν το στερεό υδροχλωρικό άλας της τριαιθυλαμίνης. Μετά το πέρας της προσθήκης η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση και ροή αργού στο παγόλουτρο επιπλέον 30 λεπτά ώστε να ολοκληρωθεί η δέσμευση του HCI από την τριαιθυλαμίνη καταλήγοντας στο στερεό άλας της τριαιθυλαμίνης. Ακολούθησε διήθηση υπό κενό και ροή αργού με χρήση γυάλινου φίλτρου por. 3 προς απομάκρυνση του άλατος και ταυτόχρονη καταβύθιση του διηθήματος σε 1.5 L εξάνιο. Πραγματοποιήθηκε ξανά διήθηση υπό ροή αργού και κενό σε χωνί Buchner και ο λευκός στερεός ανυδρίτης που προέκυψε συλλέχθηκε σε σφαιρική φιάλη και αφέθηκε για ξήρανση στη γραμμή για μία νύχτα. Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε ξανά ανακρυστάλλωση. Πιο συγκεκριμένα, αποστάχθηκαν 400 mL EtOAc στη φιάλη με το στερεό και παρατηρήθηκε η δημιουργία υποκίτρινου γαλακτώματος. Στη συνέχεια το γαλάκτωμα διηθήθηκε υπό κενό και ροή αργού από γυάλινο φίλτρο por. 4 και ταυτόχρονα το διήθημα καταβυθίστηκε σε 1.5 L εξάνιο. Έπειτα ακολούθησε διήθηση σε χωνί Buchner και ο στερεός ανυδρίτης συλλέχθηκε σε σφαιρική και αφέθηκε ξανά για ξήρανση στη γραμμή για μία νύχτα. Την επόμενη μέρα, πραγματοποιήθηκε η τελική ανακρυστάλλωση όπως ακριβώς περιγράφηκε παραπάνω με χρήση 500 mL EtOAc και 1.5 L εξάνιο, διήθηση υπό κενό και ροή αργού από χωνί Buchner και τελικά ξήρανση του καθαρού ανυδρίτη στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα. Τέλος, ο ανυδρίτης συλλέχθηκε και φυλάχθηκε εντός glove box σε αδρανή ατμόσφαιρα. Η τελικά μάζα του N^{im}-Trityl-L-Histidine-NCA ήταν ίση με 8.553 g (20.197 mmol).

Απόδοση αντίδρασης:
$$\alpha = \frac{n_{\pi \epsilon i \rho \alpha \mu \alpha \tau i \kappa \dot{\alpha}}}{n_{\theta \epsilon \omega \rho \eta \tau i \kappa \dot{\alpha}}} * 100 \% = \frac{20.197 \ mmol}{31.79 \ mmol} * 100 \% = 64 \%$$

4.6 Σύνθεση Υβριδικών Τρισυσταδικών Συμπολυμερών Τύπου mPEO₁₁₄-b-Poly(L-Cysteine)_m-b-Poly(L-Histidine)_n (mPEO₁₁₄-b-PCys_m-b-PHis_n)

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η σύνθεση διπλά αποκρινόμενων τρισυσταδικών υβριδικών συμπολυμερών τύπου mPEO₁₁₄-b-PCys_m-b-PHis_n με δύο διαφορετικά ποσοστά περιεκτικότητας κυστεΐνης, 15% και 25%, ως προς το πολυπεπτιδικό τμήμα. Το μοριακό βάρος του πολυπεπτιδικού τμήματος επιλέχθηκε να είναι συνολικά 6000 g/mol. Το πρώτο βήμα της συνθετικής πορείας αποτέλεσε ο διαδοχικός πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (ROP) των κατάλληλα προστατευμένων ανυδριτών (tBM-L-Cys NCA και N^{im}-Trt-His NCA). Ως μακροαπαρχητής για την πρώτη πολυπεπτιδική συστάδα χρησιμοποιήθηκε το mPEO₁₁₄-NH₂ (Mw=5000g/mol) ενώ μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού του mPEO₁₁₄b-P(tBMLCys)_m προστέθηκε στη φιάλη το δεύτερο μονομερές για το οποίο ως απαρχητής δρα η τελική αμινομάδα της συστάδας P(tBMLCys)_m. Η χρήση προστατευτικών ομάδων στους Ν-καρβοξυ ανυδρίτες είναι καθοριστικής σημασίας καθώς έτσι αποφεύγονται ανεπιθύμητες παράπλευρες αντιδράσεις κατά τη διάρκεια της σύνθεσής τους αλλά και κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού. Έτσι, αρχικά πραγματοποιήθηκε η σύνθεση των πλήρως προστατευμένων πολυμερών mPEO₁₁₄-b-PtBMLCys₇-b-PTrtHis₃₈ (15% ως προς τις δομικές μονάδες της κυστεΐνης στο πολυπεπτιδικό τμήμα) και mPEO₁₁₄-b-PtBMLCys₁₁-b-PTrtHis₃₄ (25% ως προς τις δομικές μονάδες της κυστεΐνης στο πολυπεπτιδικό τμήμα) με τεχνική υψηλού κενού^{18,62,65} και στη συνέχεια ακολούθησε η εκλεκτική αποπροστασία των δομικών μονάδων κάθε πολυπεπτιδικής συστάδας^{65,66} καταλήγοντας στα επιθυμητά συμπολυμερή mPEO₁₁₄-b-PCys₇-b-PHis₃₈ και mPEO₁₁₄-b-PCys₁₁-b-PHis₃₄ αντίστοιχα. Για τη σύνθεση των συμπολυμερών ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία και για το λόγο αυτό θα περιγραφεί αναλυτικά μόνο για το συμπολυμερές mPEO₁₁₄-b-PCys₇-b-PHis₃₈ (15%).

	mPEO ₁₁₄ - NH ₂	tBML- Cys NCA	N ^{im} - trt-His NCA	D M F	Πλήρως Προστατευμένα	Πλήρως Αποπροστατευμένα
mPEO ₁₁₄ - b-PCys ₇ - b-PHis ₃₈	0.499 g	0.160 g	1.62 g	45 mL	1.616 g	0.305 g
mPEO ₁₁₄ - b-PCys ₁₁ - b-PHis ₃₄	0.5 g	0.252 g	1.44 g	44 mL	1.328 g	0.061 g

Πίνακας 3: Ποσότητες αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση του εκάστοτε συμπολυμερούς και τελικές μάζες που συλλέχθησαν

4.6.1 Σύνθεση Υβριδικού Τρισυσταδικού Συμπολυμερούς mPEO₁₁₄-b-PtBMLCys₇-b-PTrtHis₃₈



Σχήμα 13: Αντίδραση ROP για τα πλήρως προστατευμένα υβριδικά τρισυσταδικά συμπολυμερή τύπου mPEO₁₁₄-b-PtBMLCys_m-b-PTrtHis.

Αρχικά κατασκευάστηκε ειδική συσκευή με χρήση υαλουργικών τεχνικών για τη διεξαγωγή της αντίδρασης πολυμερισμού. Η συσκευή αποτελούνταν από σφαιρική φιάλη των 250 mL και δύο αμπούλες με γυάλινους υμένες (breakseals) για την προσθήκη των δύο μονομερών και στη συνέχεια ελέγχθηκε για μικροοπές με χρήση πηνίου Tesla. Τοποθετήθηκαν στη φιάλη 0.499 g (0.0998 mmol) μακροαπαρχητή mPEO₁₁₄-NH₂ (Mw=5000 g/mol) και αφέθηκαν για ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για περίπου 2 ώρες. Στη συνέχεια, αποστάχθηκαν στη φιάλη περίπου 23 mL καθαρού βενζολίου το οποίο σχηματίζει αζεοτροπικό μείγμα με το νερό. Στη φιάλη τοποθετήθηκε υδρόλουτρο (35 °C) ώστε τελικά ο διαλύτης να επαναρρεύσει στα τοιχώματα και να απομακρύνει ίχνη υγρασίας από τη συσκευή και τον απαρχητή και το διάλυμα βενζολίου/μακροαπαρχητή αφέθηκε υπό ανάδευση και επαναρροή για 1 ώρα. Στη συνέχεια το αζεοτροπικό μείγμα βενζολίου/υγρασίας εκδιώχθηκε σε γειτονική φιάλη μέσω απόσταξης και ο μακροαπαρχητής αφέθηκε για ξήρανση στη γραμμή για μία νύχτα. Την επόμενη μέρα αποστάχθηκαν κλασματικά στο μακροαπαρχητή 18 mL καθαρού DMF και τοποθετήθηκε στη συσκευή υδατόλουτρο (~32 °C). Η φιάλη παρέμεινε υπό ανάδευση στους 32 °C για 10 λεπτά, έως ότου δηλαδή επιτευχθεί πλήρης διάλυση του mPEO₁₁₄-NH₂ στο διαλύτη καταλήγοντας σε διαυγές διάλυμα. Έπειτα, η συσκευή προσαρμόστηκε στη γραμμή από την πλευρά της αμπούλας του πρώτου μονομερούς και αφού πραγματοποιήθηκε ενδελεχής ξήρανση (flame-drying) στο συγκεκριμένο τμήμα, μεταφέρθηκαν εντός glove box 0.160 g (0.6799 mmol) tBM-L-Cys NCA εντός της αμπούλας. Στη συνέχεια η συσκευή προσαρμόστηκε στη γραμμή υψηλού κενού από την πλευρά της αμπούλας του μονομερούς μέσω ειδικού προσαρμογέα που διατηρεί αδρανή ατμόσφαιρα μετά την εξαγωγή από το glove box και ο tBM-L-Cys NCA αφέθηκε για απαέρωση για 35 λεπτά. Ακολούθως αποστάχθηκαν κλασματικά 12 mL καθαρού DMF στο μονομερές και όσο η αμπούλα του μονομερούς ήταν ακόμα παγωμένη, η συσκευή απομακρύνθηκε από τη γραμμή μέσω σύντηξης από την πλευρά της αμπούλας ώστε να παραμείνει υπό αδρανή συνθήκες καθ'όλη τη διάρκεια του πολυμερισμού. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε για 1 ώρα υδατόλουτρο (32-35 °C) στην αμπούλα του μονομερούς για ενίσχυση στη διαλυτοποίηση του μονομερούς και το μονομερές προστέθηκε ποσοτικά και υπό συνεχή ανάδευση στο διάλυμα του

απαρχητή έπειτα από θραύση του γυάλινου υμένα. Μετά το πέρας 45 λεπτών από την έναρξη του πολυμερισμού, η αντίδραση απαερώθηκε και παρατηρήθηκε έκλυση διοξειδίου του άνθρακα σε μορφή φυσαλίδων, ένδειξη διάδοση χαρακτηριστική για тη TOU πολυμερισμού. Πραγματοποιούνταν απαέρωση του συστήματος καθημερινά με σκοπό την απομάκρυνση του διοξειδίου του άνθρακα που δρα ως κινητήρια δύναμη για τη διάδοση του πολυμερισμού. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση συνολικά 6 μέρες ώστε να καταναλωθεί το πρώτο μονομερές. Η πορεία του πολυμερισμού ελεγχόταν με φασματοσκοπία FT-IR ενώ παρατηρήθηκε ότι με την πάροδο των ημερών, το διάλυμα απέκτησα ελαφρά θολή, κίτρινη μορφή με ελάχιστους κόκκους στα τοιχώματα.

Με την ολοκλήρωση του πολυμερισμού του mPEO₁₁₄-b-P(tBMLCys)7, δεν παρατηρήθηκε πλέον έκλυση διοξειδίου του άνθρακα και ακολούθως πραγματοποιήθηκε η προσθήκη του δεύτερου μονομερούς (N^m-Trt-His NCA) στο διάλυμα του πολυμερισμού χωρίς να προηγηθεί διαδικασία απομόνωσης. Πιο συγκεκριμένα, η συσκευή προσαρμόστηκε στη γραμμή υψηλού κενού από την πλευρά της αμπούλας του δεύτερου μονομερούς, πραγματοποιήθηκε ενδελεχής ξήρανση (flame-drying) στο συγκεκριμένο τμήμα και μεταφέρθηκαν στην αμπούλα 1.62 g (3.8233 mmol) N^m-Trt-His NCA εντός glove box. Στη συνέχεια η συσκευή προσαρμόστηκε στη γραμμή από την πλευρά της αμπούλας του μονομερούς μέσω κατάλληλου προσαρμογέα που διατηρεί αδρανή ατμόσφαιρα μετά την εξαγωγή από το glove box και το μονομερές αφέθηκε για απαέρωση για 30 λεπτά. Στη συνέχεια αποστάχθηκαν κλασματικά 15 mL καθαρού DMF στον N^{im}-Trt-His NCA και ενώ το διάλυμα ήταν παγωμένο, η συσκευή απομακρύνθηκε από τη γραμμή μέσω σύντηξης στη στένωση που φέρει η αμπούλα. Μετά την πλήρη διάλυση του μονομερούς, το κίτρινο διάλυμα του N^m-Trt-His NCA προστέθηκε ποσοτικά και υπό συνεχή ανάδευση στη φιάλη του πολυμερισμού με θραύση του γυάλινου υμένα. Με την προσθήκη του δεύτερου μονομερούς στη φιάλη, το κίτρινο χρώμα της αντίδρασης ενισχύθηκε. Μετά το πέρας 45 λεπτών από την έναρξη του πολυμερισμού το σύστημα απαερώθηκε και παρατηρήθηκαν οι χαρακτηριστικές φυσαλίδες διοξειδίου του άνθρακα που υποδεικνύουν την έναρξη και διάδοση του πολυμερισμού. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση

για 29 μέρες. Με την πάροδο των ημερών, ο πολυμερισμός απέκτησε κίτρινη θολή μορφή λόγω τις πολυϊστιδίνης και τις τελευταίες μέρες ήταν χαρακτηριστική η αύξηση του ιξώδους της αντίδρασης. Η πορεία του πολυμερισμού ελεγχόταν με φασματοσκοπία FT-IR. Με την ολοκλήρωση του πολυμερισμού και του δεύτερου μονομερούς δεν παρατηρήθηκε πλέον έκλυση φυσαλίδων διοξειδίου του άνθρακα, στη φιάλη εισήχθη ατμοσφαιρικός αέρας ανοίγοντας της στρόφιγγα της συσκευής και ακολούθησε καταβύθιση σε 500 mL κρύου διαιθυλαιθέρα. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε διήθηση υπό κενό σε χωνί Buchner, το στερεό συλλέχθηκε σε σφαιρική φιάλη και αφέθηκε στη γραμμή για ξήρανση για μία νύχτα. Η μάζα του τελικού πλήρως προστατευμένου τρισυσταδικού συμπολυμερούς ήταν ίση με 1.616 g.

4.6.2 Εκλεκτική αποπροστασία μονομερικών μονάδων με σκοπό τη σύνθεση υβριδικών τριπολυμερών τύπου mPEO₁₁₄-b-PCys_m-b-PHis_n

Η πειραματική διαδικασία για την εκλεκτική αποπροστασία των πολυπεπτιδικών συστάδων αρχικά πραγματοποιήθηκε πρώτα για τις δομικές μονάδες της πολυϊστιδίνης και στη συνέχεια για τις δομικές μονάδες της πολυκυστεΐνης. Ο λόγος για τον οποίο ακολουθήθηκε αυτή η σειρά είναι γιατί σε περίπτωση που οι δομικές μονάδες της πολυκυστεΐνης παρέμεναν αποπροστατευμένες, ως ελεύθερες θειόλες δηλαδή, θα προκαλούνταν αυθόρμητη δικτύωση μεταξύ τους κατά την αποπροστασία των δομικών μονάδων την πολυϊστιδίνης κάτι που είναι ανεπιθύμητο. Στο Σχήμα 13 απεικονίζεται η πειραματική πορεία για την πλήρη αποπροστασία των τρισυσταδικών συμπολυμερών τύπου mPEO₁₁₄-b-PtBMLCys_m-b-PTrtHis_n καταλήγοντας στα τελικά επιθυμητά προϊόντα mPEO₁₁₄-b-PCys_m-b-PHis_n.



Σχήμα 14: Πειραματική πορεία για την πλήρη αποπροστασία των τρισυσταδικών συμπολυμερών τύπου mPEO₁₁₄-b-PtBMLCys_m-b-PTrtHis_n καταλήγοντας στα τελικά επιθυμητά προϊόντα mPEO₁₁₄-b-PCys_m-b-PHis_n.

4.6.3 Εκλεκτική αποπροστασία μονομερικών μονάδων πολυϊστιδίνης (PTrtHis)⁶⁵

Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 13 η αποπροστασία των δομικών μονάδων της πολυϊστιδίνης επιτυγχάνεται με τη διασπορά-διόγκωση αρχικά του πολυμερούς σε διχλωρομεθάνιο (DCM), στη συνέχεια με χρήση τριφθοροοξικού οξέος (TFA) το οποίο απομακρύνει την τρίτυλο- ομάδα από κάθε δομική μονάδα και τέλος με τη δέσμευση των ελεύθερων τρίτυλο-ομάδων από το τριισοπροπυλο- σιλάνιο ((iPr)₃SiH).

Πιο συγκεκριμένα, στη φιάλη που περιείχε το πλήρως προστατευμένο συμπολυμερές mPEO₁₁₄-b-PCys₇-b-PHis₃₈ (15%) προστέθηκαν 20 mL DCM καταλήγοντας σε έντονο κίτρινο αιώρημα. Το αιώρημα αφέθηκε υπό ισχυρή ανάδευση για 1 ώρα ώστε να διογκωθούν όσο το δυνατόν περισσότερο οι πολυμερικές αλυσίδες. Παρατηρήθηκε ότι αρχικά κομμάτια συμπολυμερούς παρέμειναν σαν συμπαγές ίζημα στη φιάλη όμως με την πάροδο της 1 ώρας

είχαν διασπαρθεί πλήρως στο διχλωρομεθάνιο. Στη συνέχεια προστέθηκαν υπό ανάδευση στη φιάλη τμηματικά 10 mL (130.68 mmol) TFA και το αιώρημα μετατράπηκε σταδιακά σε ανοιχτό κίτρινο διάλυμα και τελικά σε καφέ διάλυμα. Το διάλυμα αφέθηκε υπό ανάδευση για 1 ώρα και στη συνέχεια προστέθηκαν στάγδην 2.4 mL (11.715 mmol) (iPr)₃SiH έως ότου τελικά το ελαφρά σε ανοιχτό καφέ και το χρώμα διάλυμα αποχρωματιστεί σταθεροποιηθεί. Έπειτα, εκδιώχθηκαν οι διαλύτες μέσω γραμμής υψηλού κενού σε γειτονική φιάλη και το στερεό αφέθηκε για ξήρανση για μία νύχτα. Την επόμενη μέρα στη φιάλη προστέθηκαν υπό ανάδευση συνολικά 45.5 mL milliQ με τις τρίτυλο- ομάδες να καθιζάνουν στη φιάλη και το αιώρημα διηθήθηκε υπό κενό με χρήση γυάλινου φίλτρου por. 3 δύο φορές. Το διήθημα, το οποίο ήταν θολό κίτρινο, συλλέχθηκε και ακολούθησε μέτρηση του pH του που ήταν ίσο με 1.44. Στη συνέχεια, με χρήση ~1.2 mL υδατικού διαλύματος K₂CO₃ 20%, το pH προσαρμόστηκε στο 5.4 και το διήθημα μεταφέρθηκε σε μεμβράνη διαπίδυσης (dialysis, MWCO=3.5k). Πραγματοποιήθηκε 2 φορές dialysis σε 2 L milliQ με pH=3.1 (προσαρμογή pH με χρήση υδατικού διαλύματος HCI 1N), dialysis σε 2 L milliQ με pH=10 (προσαρμογή pH με χρήση υδατικού διαλύματος NaOH 1M) έως ότου το pH του εξωτερικού διαλύματος παραμείνει σταθερό σε τιμή ≥ 7.4 και 2 φορές dialysis σε 2 L milliQ. Τέλος, το διάλυμα μεταφέρθηκε σε φιάλη και πραγματοποιήθηκε λυοφιλοποίηση (freeze-drying) σε ειδικά κατασκευασμένη συσκευή στη γραμμή υψηλού κενού. Το πολυμερές που συλλέχθηκε είχε υποκίτρινο χρώμα και μάζα ίση με 0.485 g.

4.6.4 Εκλεκτική αποπροστασία μονομερικών μονάδων πολυκυστεΐνης (PtBMLCys)^{44, 51}

Για την αποπροστασία των μονομερικών μονάδων της πολυκυστεΐνης (PtBMLCys) ακολουθήθηκε πειραματική πορεία σύμφωνα με τη βιβλιογραφία^{44,55}. Αξίζει να τονιστεί ότι κάθε στάδιο της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε σε αδρανή ατμόσφαιρα αργού για να παρεμποδιστεί ο αυθόρμητος σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των ελεύθερων θειολών.

Πιο συγκεκριμένα, σε σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκαν 0.3517 g συμπολυμερούς mPEO₁₁₄-b-PtBMLCys₇-b-PHis₃₈ (15%) και αφέθηκαν στη γραμμή για απαέρωση (απομάκρυνση οξυγόνου που δρα ως οξειδωτικός παράγοντας οδηγώντας στη δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών). Στη συνέχεια, αφού η φιάλη πληρώθηκε με αργό, μεταφέρθηκαν εντός 0.275 α (1.7828 mmol) D-L-dithiothreitol (DTT, αναγωγικό μέσο) και υπό ισχυρή ανάδευση 20 mL καθαρού άνυδρου DMSO. Η φιάλη τοποθετήθηκε σε ελαιόλουτρο στους 60 °C και αφέθηκε υπό ανάδευση για 7 ημέρες και 2 επιπλέον μέρες σε θερμοκρασία δωματίου. Επίσης, για εξασφάλιση αδρανούς ατμόσφαιρας προσαρμόστηκε στη φιάλη μπαλόνι με αργό. Με την προσθήκη του DMSO παρατηρήθηκε η δημιουργία υποκίτρινου διαλύματος με μικρή ποσότητα τζελ στα τοιχώματα της φιάλης που την επόμενη μέρα είχε πλήρως διαλυθεί. Με την πάροδο των ημερών το χρώμα του διαλύματος μετατράπηκε κίτρινο. Ακολούθησε σε έντονο ŋ απομόνωση του πλήρως αποπροστατευμένου συμπολυμερούς mPEO₁₁₄-b-PtBMLCys₇-b-PHis₃₈ με στάγδην και υπό ισχυρή ανάδευση καταβύθιση σε συνολικά 240 mL διαιθυλαιθέρα που βρισκόταν σε θερμοκρασία δωματίου. Η καταβύθιση πραγματοποιήθηκε τμηματικά σε 3 στάδια και στο τέλος κάθε σταδίου ακολουθούσε αμέσως διήθηση υπό κενό σε χωνί Buchner υπό ροή αργού. Το κίτρινο στερεό πλήρως αποπροστατευμένο συμπολυμερές συλλέχθηκε σε φιάλη και αφέθηκε στη γραμμή για ξήρανση για μία νύχτα. Η τελική του μάζα ήταν ίση με 0.305 g.

4.7 Αυτοοργάνωση και Δικτύωση Τρισυσταδικών Συμπολυμερών τύπου mPEO₁₁₄-b-PCys_m-b-PHis_n⁶⁷

Μετά την πλήρη αποπροστασία των συμπολυμερών ακολούθησε η διαδικασία αυτοοργάνωσης και δικτύωσής τους. Ακολουθήθηκε πειραματική πορεία σύμφωνα με τη βιβλιογραφία⁶⁷. Αρχικά το εκάστοτε συμπολυμερές διαλύθηκε σε DMSO παρουσία περίσσειας DTT (ώστε να αποφευχθεί μηελεγχόμενη δικτύωση), στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε προσθήκη milliQ σταδιακά και τέλος dialysis σε milliQ, Tris buffer 10 mM pH=7.4 150 mM NaCl και milliQ παρουσία H₂O₂. Πρέπει να αναφερθεί ότι η παραπάνω διαδικασία

πραγματοποιήθηκε και για τα συμπολυμερή mPEO₁₁₄-b-P(Cys-co-His)_x (15% και 25% ως προς τις δομικές μονάδες της κυστεΐνης) που είχαν συντεθεί παλαιότερα στο εργαστήριο⁶⁸ με στόχο τη μελέτη της αυτοοργάνωσής τους. Παρατηρήθηκε ότι παρουσίασαν παρόμοια συμπεριφορά με τα συμπολυμερή που συντέθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας.



Σχήμα 15: Σχηματική απεικόνιση πιθανής πορείας αυτοοργάνωσης και δικτύωσης υβριδικών τρισυσταδικών συμπολυμερών τύπου mPEO₁₁₄-b-PCys_m-b-PHis_n.

Πιο αναλυτικά, σε φιάλη στην οποία είχαν πρώτα απομακρυνθεί υπολείμματα σκόνης με χρήση ισχυρής ροής αζώτου τοποθετήθηκαν 0.012 g πλήρως αποπροστατευμένου συμπολυμερούς mPEO₁₁₄-b-PtBMLCys₇-b-PHis₃₈, 0.057 g (0.3695 mmol) αναγωγικού μέσου DTT και υπό ανάδευση 5.485 mL DMSO. Το διάλυμα αφέθηκε υπό ισχυρή ανάδευση για μία νύχτα. Την επόμενη μέρα προστέθηκαν στη φιάλη 6.014 mL milliQ με ρυθμό 1mL/10min. Παρατηρήθηκε ότι με την προσθήκη milliQ η φιάλη θερμάνθηκε. Το διάλυμα αφέθηκε υπό ισχυρή ανάδευσρούπησή του για 3 ώρες και στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε μεμβράνη dialysis (MWCO=3.5k). Ακολούθησε 2 φορές dialysis σε 1.5 L milliQ, μία φορά σε 1.5 L Tris buffer 10 Mm pH=7.4 150 mM NaCl και τέλος μία φορά σε 1.5 L milliQ / H₂O₂ 0.15 % (7.5 mL H₂O₂ 30 % σε 1492.5 mL milliQ). Μετά την παραμονή της μεμβράνης στο Tris buffer 10 Mm pH=7.4 150 mM NaCl παρατηρήθηκε η δημιουργία λευκού ιζήματος εντός της μεμβράνης και διαυγές υπερκείμενο (Εικόνα 17). Το δείγμα

συλλέχθηκε σε καθαρό vial και ο τελικός του όγκος μετά το dialysis ήταν ίσος με 16.595 mL.



Εικόνα 17: Σχηματισμός ιζήματος εντός της μεμβράνης μετά την παραμονή του συμπολυμερούς στο Tris buffer 10 Mm pH=7.4 150 mM NaCl για μία νύχτα.

4.8 Σύνθεση Ομοπολυμερούς Πολυϊστιδίνης (Cys-PHis 6K) Εκκινούμενη Από Κυστεΐνη

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας συντέθηκε επίσης ομοπολυμερές πολυϊστιδίνης (Cys-PHis) με χρήση S-tert-butyl-mercapto-L-Cysteine methyl ester ως απαρχητή και τελικό μοριακό βάρος 6000 g/mol. Το συγκεκριμένο ομοπολυμερές σχεδιάστηκε έτσι ώστε στην τελική πλήρως αποπροστατευμένη μορφή του, να συνδυάζει την pH-αποκρισιμότητα της πολυϊστιδίνης και την ικανότητα σύνδεσής του μέσω χημείας "click" με άλλα μόρια ή πολυμερικές αλυσίδες. Λόγω της ελεύθερης θειόλης στο μόριο του απαρχητή, είναι επιτρεπτή η πρόσδεση μορίων ή μακρομορίων σε κάθε πολυπεπτιδική αλυσίδα καταλήγοντας σε βιοσυζυγή που χαρακτηρίζονται ταυτόχρονα από τις ιδιότητες της πολυϊστιδίνης και του μορίου ή μακρομορίου που προσδένεται (Σχήμα 15).



Σχήμα 16: Χημειοεκλεκτική προσθήκη Michael για τη δημιουργία αμφίφιλων αποκρίσιμων βιοσυζυγών πολυπεπτιδίου-πολυμερούς

Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιου είδους χημείας "click" αποτελεί η αντίδραση ελεύθερης θειόλης πρωτεΐνης με μαλεϊμίδιο (χημειοεκλεκτική προσθήκη Michael) με στόχο τη δημιουργία αμφίφιλων βιοσυζυγών πρωτεΐνης-πολυμερούς^{69,70}.

4.8.1 Σύνθεση S-tert-butyl-mercapto-L- Cysteine Methyl Ester

Το πρώτο στάδιο για τη σύνθεση του επιθυμητού ομοπολυμερούς αποτέλεσε η εύρεση της κατάλληλης προστατευτικής ομάδας για το καρβοξυ- τελικό άκρο της κυστεΐνης. Το παραπάνω στάδιο είναι καθοριστικής σημασίας ώστε να αποτραπούν παράπλευρες ανεπιθύμητες αντιδράσεις κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού και ο πολυμερισμός να εκκινήσει μόνο από το αμινο-τελικό άκρο της κυστεΐνης. Σαν προστατευτική ομάδα επιλέχθηκε το μεθύλιο λόγω των ήπιων συνθηκών που απαιτεί η αντίδραση και της εύκολης απομόνωσης του τελικού προϊόντος. Ακολουθήθηκαν δύο πειραματικές πορείες σύμφωνα με τη βιβλιογραφία^{71,72} όπου βασική διαφορά τους ήταν η χρήση τριμεθυλοχλωροσιλανίου (TMSCI) ως αντιδραστήριο χλωρίωσης για την πρώτη πορεία και θειονυλοχλωριδίου (SOCl₂) για τη δεύτερη. Αρχικά, το αμινοξύ διαλύεται σε μεθανόλη (MeOH), στη συνέχεια πραγματοποιείται η στάγδην προσθήκη του αντιδραστηρίου χλωρίωσης στους ≤ 0 °C δίνοντας ως προϊόν το υδροχλωρικό άλας του μεθυλεστέρα του αμινοξέος και τέλος το προστατευμένο αμινοξύ απομονώνεται με μία διαδικασία εκχυλίσεων.

4.8.1.1 Σύνθεση S-tert-butyl-mercapto-L- Cysteine Methyl Ester με Χρήση TMSCI⁷¹



Σχήμα 17: Αντίδραση καρβόξυ-προστασίας s-tert-butyl-mercapto-L-Cysteine (I) για το σχηματισμό S-tert-butyl-mercapto-L-Cysteine Methyl Ester (IV) με χρήση TMSCI.

Αρχικά, 2 mL (15.76 mmol) TMSCI συλλέχθηκε, έπειτα από κλασματική απόσταξη, σε βαθμονομημένη αμπούλα, με κατάλληλο προσαρμογέα με

στρόφιγγα, ώστε το αντιδραστήριο χλωρίωσης να παραμείνει υπό κενό μέχρι τη χρήση του και να αποφευχθεί η διάσπασή του (Παράγραφος 3.3.2). Σε σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκαν 0.832 g (3.97 mmol) H-Cys(stBu)-OH και αφέθηκαν για ξήρανση στη γραμμή για μία νύχτα. Στη συνέχεια, αφού η φιάλη πληρώθηκε με αργό, προστέθηκαν 42 mL (1038.2 mmol) καθαρής MeOH υπό ροή αργού και δημιουργήθηκε λευκό αιώρημα. Η περισσότερη ποσότητα του αμινοξέος διαλύθηκε αφήνοντας μικρή ποσότητα να αιωρείται στο διάλυμα πιθανόν λόγω διμερών αλληλεπιδράσεων. Έπειτα, η φιάλη τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο στους 0 °C και προστέθηκε υπό ροή αργού και στάγδην το TMSCI. Η αντίδραση αφέθηκε με το παγόλουτρο υπό ανάδευση και ροή αργού για μία νύχτα και σε θερμοκρασία δωματίου και ροή αργού για επιπλέον 8 ημέρες. Παρατηρήθηκε ότι η αντίδραση ήταν πλήρως διαυγής μετά τα πρώτα 30 λεπτά από την έναρξή της και με υποκίτρινο χρώμα την επόμενη μέρα.

Μετά το πέρας 8 ημερών, οι διαλύτες εκδιώχθηκαν μέσω απόσταξης σε γειτονική φιάλη στη γραμμή υψηλού κενού καταλήγοντας σε μείγμα από το ενδιάμεσο υδροχλωρικό άλας (II), το υδροχλωρικό άλας του πρόδρομου αμινοξέος (III) και trimethylsilanol (Σχήμα 16). Το μείγμα που απέμεινε είχε τη μορφή μπεζ τζελ έπειτα από ξήρανσή του για μία νύχτα στη γραμμή. Στη συνέχεια η φιάλη πληρώθηκε με αργό και το περιεχόμενο διαλύθηκε σε 25 mL milliQ. Πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με συνολικά 100 mL διαιθυλαιθέρα προς απομάκρυνση της trimethylsilanol και μέτρηση του pH της υδατικής φάσης που ήταν ίσο με pH=2.5. Έπειτα, προκειμένου να πραγματοποιηθεί απομάκρυνση του HCI από το αμινο-τελικό άκρο της κυστεΐνης, προστέθηκαν στην υδατική φάση 200 mL υδατικού διαλύματος NaHCO₃ 0.5% και ελεγχόταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα η αύξηση του pH του διαλύματος. Μόλις το pH σταθεροποιήθηκε στο 7, το διάλυμα αφέθηκε υπό ανάδευση για μία νύχτα. Την επόμενη μέρα παρατηρήθηκε ότι η μορφή του διαλύματος είχε αλλάξει καθώς είχε αποκτήσει λευκό χρώμα και πολύ υψηλή θολότητα (λόγω διαφοράς διαλυτότητας μεταξύ προϊόντων (II), (III) και (IV) Σχήμα 16). Μετρήθηκε ξανά το pH και ήταν ίσο με 8.7 οπότε πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με 145 mL EtOAc. Η οργανική φάση συλλέχθηκε και πραγματοποιήθηκε τελική εκχύλιση με 60 mL υδατικού διαλύματος NaCl 10% και NaHCO₃ 0.5 %.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ξήρανση της οργανικής φάσης με MgSO₄, διήθηση υπό κενό με χρήση γυάλινου φίλτρου por.3 και συμπύκνωση του διαλύτη στο ρότορα. Το τελικό προϊόν είχε τη μορφή κίτρινου υγρού με υψηλό ιξώδες, μάζα ίση με 0.457 g (2.05 mmol) και φυλάχθηκε στους -20 °C υπό αργό.

Απόδοση αντίδρασης:
$$\alpha = \frac{n_{\pi \varepsilon i \rho \alpha \mu \alpha \tau i \kappa \dot{\alpha}}}{n_{\theta \varepsilon \omega \rho \eta \tau i \kappa \dot{\alpha}}} * 100 \% = \frac{2.05 \ mmol}{3.97 \ mmol} * 100 \% = 52 \%$$







Σε σφαιρική φιάλη προστέθηκαν 0.400 g (1.91 mmol) H-Cys(stBu)-OH και αφέθηκαν στη γραμμή για ξήρανση για μία νύχτα. Η φιάλη πληρώθηκε με αργό και προστέθηκαν υπό ανάδευση 20 mL (494.38 mmol) MeOH. Για ενίσχυση της διαλυτότητας του αμινοξέος η φιάλη τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 32 °C και το μεγαλύτερο μέρος του αντιδρώντος διαλύθηκε εντός 10 λεπτών. Παρατηρήθηκε, όπως προαναφέρθηκε και στην παράγραφο 3.8.2, ένα μικρό ποσοστό αμινοξέος ότι παρέμεινε αδιάλυτο. Στη συνέχεια προσαρμόστηκε στη φιάλη ψυκτήρας, παγίδα CaCl₂ και υδατόλουτρο πάγου/NaCl ώστε να επιτευχθεί θερμοκρασία -15 °C εντός της φιάλης. Παρατηρήθηκε ότι σε τόσο χαμηλή θερμοκρασία το διάλυμα θόλωσε ελαφρά. Ακολούθησε η υπό ανάδευση στάγδην προσθήκη 0.302 mL (4.17 mmol) SOCl₂ (χωρίς να έχει προηγηθεί καθαρισμός του) στη φιάλη στους -15 °C και η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση με το παγόλουτρο για μία νύχτα.

Στη συνέχεια, οι διαλύτες απομακρύνθηκαν στο ρότορα ώστε στη φιάλη να παραμείνει το μείγμα των προϊόντων (V) και (VI) το οποίο ακολούθως διαλύθηκε πλήρως σε 45 mL milliQ. Ακολούθησε μέτρηση του pH και ήταν ίσο με 2.2. Πραγματοποιήθηκε έπειτα προσθήκη ~ 180 mL υδατικού διαλύματος NaHCO₃ έως ότου τελικά η τιμή του pH να αυξηθεί στο 8.1 και να πραγματοποιηθεί εξουδετέρωση του HCl. Πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με συνολικά 240 mL EtOAc και εκχύλιση της οργανικής φάσης με 60 mL υδατικού διαλύματος NaHCO₃ 0.5% και NaCl 10%. Η οργανική φάση ξηράνθηκε με MgSO₄, διηθήθηκε υπό κενό με γυάλινο φίλτρο por.3 και τελικά ο διαλύτης συμπυκνώθηκε στο ρότορα. Το τελικό προϊόν είχε τη μορφή κίτρινου υγρού με αυξημένο ιξώδες, μάζα ίση με 0.208 g (0.931 mmol) και φυλάχθηκε στου ς-20 °C υπό αργό.

Απόδοση αντίδρασης:
$$\alpha = \frac{n_{\pi \epsilon i \rho \alpha \mu \alpha \tau i \kappa \dot{\alpha}}}{n_{\theta \epsilon \omega \rho \eta \tau i \kappa \dot{\alpha}}} * 100 \% = \frac{0.931 \ mmol}{1.91 \ mmol} * 100 \% = 49 \%$$

4.8.2 Σύνθεση Πλήρως Προστατευμένου Ομοπολυμερούς Πολυϊστιδίνης με χρήση S-tert-butyl-mercapto-L-Cysteine Methyl Ester ως απαρχητή



Σχήμα 19: Σύνθεση πλήρως προστατευμένου ομοπολυμερούς πολυϊστιδίνης (PTrtHis) με χρήση S-tert-butyl-mercapto-L-Cysteine Methyl Ester ως απαρχητή.

Αρχικά, συλλέχθηκε σε αμπούλα το διάλυμα του απαρχητή (VII) (Σχήμα 17) σε καθαρό DCM με τελικό όγκο 2 mL και συγκέντρωση c=0.064Μ (Παράγραφος 3.3.3). Κατασκευάστηκε ειδική συσκευή πολυμερισμού με χρήση υαλουργίας που αποτελούνταν από σφαιρική φιάλη 250 mL, αμπούλα μονομερούς με γυάλινο υμένα (break-seal) και την αμπούλα του απαρχητή. Στη συνέχεια η συσκευή ελέγχθηκε για μικροοπές με χρήση πηνίου Tesla. Έπειτα από ενδελεχή ξήρανση (flame-drying) στη φιάλη και στην αμπούλα του μονομερούς, η συσκευή εισήχθη εντός glove box όπου μεταφέρθηκαν 2.381 g (5.62 mmol) N^{im}-Trt-Histidine NCA στην αμπούλα του μονομερούς. Στη συνέχεια η συσκευή προσαρμόστηκε στη γραμμή υψηλού κενού από την πλευρά της αμπούλας του μονομερούς μέσω ειδικού προσαρμογέα που διατηρεί αδρανή ατμόσφαιρα μετά την εξαγωγή από το glove box και ο N^m-Trt-Histidine NCA αφέθηκε για απαέρωση για 35 λεπτά. Στη συνέχεια ακολούθησε κλασματική απόσταξη 25 mL καθαρού DMF στη φιάλη πολυμερισμού και 18 mL στην αμπούλα του μονομερούς. Το μονομερές διαλύθηκε πλήρως καταλήγοντας σε κίτρινο διάλυμα και η συσκευή απομακρύνθηκε από τη γραμμή μέσω σύντηξης στην αμπούλα του μονομερούς ώστε να παραμείνει υπό αδρανή συνθήκες καθ'όλη τη διάρκεια του πολυμερισμού. Ακολούθησε η θραύση του break-seal και η προσθήκη του μονομερούς στη φιάλη και έπειτα η θραύση του break-seal και η προσθήκη του απαρχητή στο διάλυμα του μονομερούς υπό έντονη ανάδευση. Παρατηρήθηκε ότι αρχικά ο πολυμερισμός είχε τη μορφή κίτρινου διαλύματος κάτι το οποίο άλλαξε δραματικά με την πάροδο των ημερών. Μετά το πέρας 24 ωρών από την έναρξη, η αντίδραση απέκτησε θολότητα ενώ τις επόμενες μέρες κατέληξε σε λευκό γαλάκτωμα. Ο πολυμερισμός διήρκησε συνολικά 11 μέρες. Πραγματοποιήθηκε απαέρωση στις 1 και 2 ώρες από την έναρξη της αντίδρασης όπου παρατηρήθηκε έκλυση φυσαλίδων CO₂, χαρακτηριστική ένδειξη για την πραγματοποίηση του πολυμερισμού. Απαερώσεις πραγματοποιούνταν ανά τακτά διαστήματα ώστε να απομακρυνθεί το CO₂ που δρα ως κινητήριος δύναμη του πολυμερισμού.

Μετά τις 11 ημέρες δεν παρατηρήθηκε έκλυση CO₂ και το πολυμερές καταβυθίστηκε σε 220 mL παγωμένου διαιθυλαιθέρα. Παρέμεινε στους -20 °C για 30 λεπτά για περαιτέρω καταβύθιση, διηθήθηκε υπό κενό σε χωνί Buchner και το στερεό συλλέχθηκε και παρέμεινε για ξήρανση στη γραμμή για μία νύχτα. Η μάζα του τελικού, πλήρως προστατευμένου, πολυμερούς ήταν ίση με 1.8 g.

4.8.3 Εκλεκτική αποπροστασία μονομερικών μονάδων πολυϊστιδίνης ομοπολυμερούς Cys-PTrtHis



Σχήμα 20: Εκλεκτική αποπροστασία δομικών μονάδων πολυϊστιδίνης ομοπολυμερούς Cys-PTrtHis 6K.

Н αποπροστασία δομικών πολυϊστιδίνης των μονάδων της πραγματοποιήθηκε προαναφέρθηκε όπως και για τα τρισυσταδικά συμπολυμερή mPEO₁₁₄-b-PCys_m-PHis_n. Πιο συγκεκριμένα, στη φιάλη που περιείχε όλη την ποσότητα του ομοπολυμερούς προστέθηκαν 30 mL DCM και το πολυμερές αφέθηκε υπό ανάδευση για 45 λεπτά ώστε να διογκωθεί όσο το Παρατηρήθηκε δυνατόν περισσότερο. ŋ δημιουργία λευκού-κίτρινου γαλακτώματος. Στη συνέχεια, προστέθηκαν τμηματικά 20 mL (261 mmol) TFA και το γαλάκτωμα μετατράπηκε σε κίτρινο διάλυμα και κατέληξε καφέ διάλυμα. Αφέθηκε υπό ανάδευση για ~1 ώρα και στη συνέχεια προστέθηκε στάγδην 1.5 mL (7.33 mmol) (iPr)₃SiH ώσπου τελικά το διάλυμα σχεδόν αποχρωματίστηκε (παρέμεινε ελαφρώς υποκίτρινο). Στη συνέχεια οι διαλύτες εκδιώχθηκαν σε γειτονική φιάλη μέσω απόσταξης στη γραμμή και το υποκίτρινο στερεό που προέκυψε αφέθηκε για ξήρανση στη γραμμή για μία νύχτα. Την επόμενη μέρα προστέθηκαν στη φιάλη υπό ανάδευση συνολικά 50 mL milliQ όπου το πολυμερές παρέμεινε διαλυμένο και οι τρίτυλο-ομάδες δημιούργησαν ίζημα. Το αιώρημα διηθήθηκε υπό κενό με χρήση γυάλινου φίλτρου por. 3 και στο ελαφρά θολό υδατικό διάλυμα που συλλέχθηκε μετρήθηκε το pH που ήταν ίσο με 1.4. Στη συνέχεια, με προσθήκη ~2.5 mL υδατικού διαλύματος K₂CO₃ 20%, το pH προσαρμόστηκε στο 5 και το διήθημα μεταφέρθηκε σε μεμβράνη διαπίδυσης (dialysis, MWCO=3.5 k). Πραγματοποιήθηκε dialysis σε 2 L milliQ με pH=3, dialysis σε 2 L milliQ με pH=3.2 και dialysis σε 2 L milliQ μεpH=11.2. Η προσαρμογή του όξινου pH έγινε με χρήση υδατικού διαλύματος HCI 1N και του βασικού pH με χρήση υδατικού διαλύματος NaOH 1M. Η μεμβράνη παρέμεινε στο βασικό pH για μία νύχτα και την επόμενη μέρα διαπιστώθηκε η διαρροή πολυμερικού διαλύματος από τη μεμβράνη στον εξωτερικό διαλύτη. Λόγω του ότι η πολυϊστιδίνη σε βασικά pH είναι υδρόφοβη, το εξωτερικό διάλυμα είχε θολώσει καθώς λόγω υψηλής τιμής pH (11.2) η πολυϊστιδίνη παρέμεινε αδιάλυτη. Επίσης παρατηρήθηκε ότι η μεμβράνη δεν είχε τον κατάλληλο όγκο διαλύματος στο εσωτερικό της. Τα παραπάνω γεγονότα συνέβαλαν στην διαπίστωση της διαρροής και έτσι ο εξωτερικός διαλύτης και το περιεχόμενο της μεμβράνης συλλέχθηκαν, συμπυκνώθηκαν μέσω απόσταξης στη γραμμή υψηλού κενού και στα τελευταία mL πραγματοποιήθηκε freeze-drying καταλήγοντας στο λευκό-κίτρινο ομοπολυμερές.
Ένας πιθανός λόγος για τον οποίο συνέβη η διαρροή είναι η ισχυρή συσσωμάτωση που εμφανίζει γενικά η πολυϊστιδίνη λόγω του ιμιδαζολικού δακτυλίου. Στην παρούσα περίπτωση όπου το διάλυμα περιείχε ομοπολυμερές 6K, πιθανόν η PHis συσσωματώθηκε τόσο έντονα, που τελικά ο όγκος της μειώθηκε κάτω από το επιτρεπτό όριο της μεμβράνης και έτσι το πολυμερές πέρασε μέσω των πόρων της μεμβράνης στον εξωτερικό διαλύτη.

Στη συνέχεια το λευκό-κίτρινο στερεό πολυμερές τοποθετήθηκε σε καθαρό ποτήρι και τα στερεά υπολείμματα πολυμερούς από το freeze-drying συλλέχθηκαν με χρήση ~30 mL milliQ με pH=3.3 και ~0.5 mL υδατικού διαλύματος HCl 1N και μεταφέρθηκαν επίσης στο καθαρό ποτήρι. Στο λευκό αιώρημα που προέκυψε μετρήθηκε το pH που ήταν ίσο με 6.1 και με προθήκη ~15 mL υδατικού διαλύματος K₂CO₃ 20%, το pH προσαρμόστηκε στο 8.3 και το αιώρημα τοποθετήθηκε ξανά σε μεμβράνη για dialysis. Πραγματοποιήθηκε 2 φορές dialysis σε σκέτο milliQ και το περιεχόμενο της μεμβράνης τοποθετήθηκε για freeze-drying. Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά τη διάρκεια των τελευταίων dialysis στο milliQ, το πολυμερές είχε εντελώς καταβυθιστεί εντός της μεμβράνης λόγω του βασικού pH (8.3) και έτσι αποτράπηκε δεύτερη πιθανή διαρροή. Το λευκό στερεό που προέκυψε είχε μάζα ίση με 0.353 g.

4.8.4 Εκλεκτική αποπροστασία S-tert-Butyl-mercapto προστατευτικής ομάδας ομοπολυμερούς Cys-PHis



Σχήμα 21: Εκλεκτική αποπροστασία κυστεΐνης ομοπολυμερούς Cys-PHis 6K.

Για την αποπροστασία της S-tert-Butyl-mercapto προστατευτικής ομάδας της κυστεΐνης αρχικά τοποθετήθηκε όλη η ποσότητα του πολυμερούς (0.353 g)

για ξήρανση στης γραμμή. Έπειτα από 1.5 ώρα, η φιάλη απομακρύνθηκε από τη γραμμή, πληρώθηκε με αργό, μεταφέρθηκαν εντός 0.064 g (0.415 mmol) αναγωγικού μέσου DTT και προσαρμόστηκε στη φιάλη μπαλόνι με αργό. Στη συνέχεια, προστέθηκαν υπό ροή αργού και ανάδευση 30 mL καθαρού, άνυδρου DMSO και η φιάλη τοποθετήθηκε σε ελαιόλουτρο στους 60 °C όπου και παρέμεινε υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αργού για 16 μέρες. Παρατηρήθηκε ότι με την προσθήκη DMSO, στη φιάλη δημιουργήθηκε σε κίτρινο γαλάκτωμα.

Το ομοπολυμερές απομονώθηκε πραγματοποιώντας καταβύθιση σε ~450 mL διαιθυλαιθέρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και υπό ροή αργού και απευθείας διήθησή του υπό κενό σε χωνί Buchner για την απομάκρυνση των διαλυτών. Για τη συλλογή πιθανών υπολειμμάτων ομοπολυμερούς, χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον 10 mL καθαρού άνυδρου DMSO στο ποτήρι που πραγματοποιήθηκε αρχικά ŋ καταβύθιση και πραγματοποιήθηκε επανακαταβύθιση σε ~200 mL διαιθυλαιθέρα σε ποτήρι τεφλόν. Ακολούθησε διήθηση στο χωνί Buchner και πραγματοποιήθηκαν εκπλύσεις στο ποτήρι Buchner με διαιθυλαιθέρα για την απομάκρυνση όσο το δυνατόν περισσότερου DMSO. Το κίτρινο στερεό πολυμερές που προέκυψε από το διήθηση συλλέχθηκε σε φιάλη και αφέθηκε για ξήρανση στη γραμμή για μία νύχτα. Όλη η διαδικασία της απομόνωσης πραγματοποιήθηκε υπό ροή αργού. Η μάζα του τελικού, πλήρως αποπροστατευμένου ομοπολυμερούς ήταν ίση με 0.210 g.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 Χαρακτηρισμός S-tert-butyl-mercapto-L-Cysteine N-Carboxy Anhydride (tBM-L-Cys NCA)

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η πορεία της σύνθεσης των Ν-καρβοξυ Ανυδριτών ελέγχθηκε με φασματοσκοπία FT-IR λόγω των χαρακτηριστικών δονήσεων που εμφανίζονται τόσο για το πρόδρομο αμινοξύ, όσο και για τον εκάστοτε ανυδρίτη.



Εικόνα 18: Φάσματα FT-IR κατά την πορεία σύνθεσης του tBM-L-Cys NCA. Α γράφημα: Πρόδρομο αμινοξύ H-(StBu)-Cys-OH, Β γράφημα: 45 λεπτά μετά την προσθήκη τριφωσγενίου στην αντίδραση, C γράφημα: Τελικός tBM-L-Cys NCA

Όπως μπορεί κανείς να αντιληφθεί από την Εικόνα 18, οι δονήσεις για το πρόδρομο αμινοξύ διαφέρουν κατά πολύ από εκείνες του tBM-L-Cys NCA. Στον Πίνακα 3 φαίνονται οι ακριβείς αντιστοιχίες των χαρακτηριστικών δονήσεων για το πρόδρομο αμινοξύ, για δείγμα που μετρήθηκε κατά τη διάρκεια της αντίδρασης σε 45 λεπτά μετά την προσθήκη του αντιδραστηρίου χλωρίωσης (τριφωσγενίου) στο πρόδρομο αμινοξύ και τον τελικό ανυδρίτη.

Συγκρίνοντας όλες τις χαρακτηριστικές δονήσεις των δειγμάτων που παρατίθενται στον Πίνακα 3 παρατηρείται ότι μετά από 45 λεπτά από την προσθήκη του τριφωσγενίου ο ανυδρίτης έχει σχηματιστεί καθώς εξαφανίζονται οι χαρακτηριστικές δονήσεις του πρόδρομου αμινοξέος (Εικόνα

18, περιοχή d) και εμφανίζονται μόνο οι χαρακτηριστικές για τον Ν-καρβοξυ ανυδρίτη. Πιο συγκεκριμένα, εξαφανίζονται οι κορυφές στους 1672.8 cm⁻¹ για τη δόνηση του C=O και 1602.5 cm⁻¹ και 1537.3 cm⁻¹ για την κάμψη του δεσμού –ΝΗ2 του πρόδρομου αμινοξέος ενώ εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές για τον Ν-καρβοξυ ανυδρίτη στους 1828.3 cm⁻¹ για τη δόνηση του C=O δίπλα στο άζωτο του δακτυλίου και 1852.9 cm⁻¹ για τη δόνηση του C=O δίπλα στην πλευρική ομάδα του δακτυλίου. Στο τελικό φάσμα (Εικόνα 18, Φάσμα C) δεν παρατηρούνται αξιοσημείωτες αλλαγές στους cm⁻¹ πράγμα λογικό καθώς η μόνη διαφορά με το Φάσμα Β είναι η μεγαλύτερη απόδοση της αντίδρασης και η διαδικασία ανακρυσταλλώσεων για τον καθαρισμό του ανυδρίτη. Για το τελικό προϊόν οι αναμενόμενες χαρακτηριστικές δονήσεις εντοπίστηκαν στους 1828.4 cm⁻¹ για τη δόνηση του C=O δίπλα στο άζωτο του ανυδρίτη και στους 1853.3 cm⁻¹ για τη δόνηση του C=Ο δίπλα στην πλευρική ομάδα του ανυδρίτη. Τέλος, αξίζει να τονιστεί ότι και στα 3 φάσματα παραμένει αμετάβλητη η κορυφή για την έκταση του δεσμού CH₂-S στα 682.2 cm⁻¹ στο πρόδρομο αμινοξύ, 696.9 cm⁻¹ για το δείγμα που μετρήθηκε 45 λεπτά μετά την προσθήκη τριφωσγενίου και 697 cm⁻¹ για τον τελικό tBM-L-Cys. Το παραπάνω γεγονός σε συνδυασμό με την έλλειψη κορυφών στην περιοχή των 2500 cm⁻¹ (χαρακτηριστικοί cm⁻¹ για τη δόνηση του δεσμού -SH) αποδεικνύει ότι η προστατευτική ομάδα της θειόλης δεν επηρεάζεται κατά τη διαδικασία σύνθεσης του Ν-Καρβοξυ ανυδρίτη.

Πίνακας 4: Αντιστοίχιση Χαρακτηριστικών Δονήσεων και Κυματαριθμών: Φάσμα Α: Πρόδρομο αμινοξύ H-(StBu)-Cys-OH, Φάσμα Β: 45 λεπτά μετά την προσθήκη τριφωσγενίου στην αντίδραση, Φάσμα C: Τελικός tBM-L-Cys NCA

Φάσμα Α	Κυματαριθμοί (cm ⁻¹)	Χαρακτηριστικές Δονήσεις
Περιοχή a	3255.7	Έκταση Δεσμού –ΝΗ ₂
Περιοχή b	2918.5 2962.8	Συμμετρική και Αντισυμμετρική έκταση δεσμού CH ₂ -S και –CH ₃ της S-tert-butyl ομάδας
Περιονή d	1672.8	Δόνηση δεσμού C=Ο
περιοχη α	1602.5	Κάμψη Δεσμού –ΝΗ ₂

	1537.3	
Περιοχή e	682.2	Έκταση δεσμού CH ₂ -S
Φάσμα Β		
Περιοχή a	3157.4 3236.8	Έκταση Δεσμού –ΝΗ
Περιοχή b	2857.7 2891.2 2919.5 2959.6	Συμμετρική και Αντισυμμετρική έκταση δεσμού CH ₂ -S και –CH ₃ της S-tert-butyl ομάδας
	1828.3	Δόνηση C=Ο δίπλα στο άζωτο του ΝCA
Περιοχή c	1852.9	Δόνηση C=Ο δίπλα στην πλευρική ομάδα του NCA
Περιοχή e	696.9	Έκταση δεσμού CH ₂ -S
Φάσμα Β		
Περιοχή a	3158.2 3237.6	Έκταση Δεσμού –ΝΗ
Περιοχή b	2858 2891.3 2919.5 2959.4	Συμμετρική και Αντισυμμετρική έκταση δεσμού CH ₂ -S και –CH ₃ της S-tert-butyl ομάδας
_ ,	1828.4	Δόνηση C=Ο δίπλα στο άζωτο του ΝCA
Περιοχή c	1853.3	Δόνηση C=Ο δίπλα στην πλευρική ομάδα του NCA
Περιοχή e	697	Έκταση δεσμού CH ₂ -S

Τέλος, ο tBM-L-Cys NCA χαρακτηρίστηκε και με φασματοσκοπία ¹HNMR όπου επιβεβαιώθηκε περαιτέρω η σύνθεσή του καθώς εντοπίστηκαν όλα τα αναμενόμενα υδρογόνα.



Εικόνα 19: Φάσμα ¹HNMR σε CDCI₃ για τον tBM-L-Cys NCA

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 19 ταυτοποιήθηκαν ένα προς ένα τα υδρογόνα για το μόριο του tBML-Cys NCA. Πιο συγκεκριμένα, οι αναμενόμενες χαρακτηριστικές κορυφές για τον tBML-Cys NCA εμφανίζονται στα 6.44 ppm για το υδρογόνο c (*H*N-C=O-), 4.71-4.73 ppm για το υδρογόνο a (-S-CH₂-C*H*-) του C_α, στα 2.91-3.25 ppm για τα υδρογόνα b (-S-C*H*₂-CH-) και τέλος στα 1.39 ppm για τα υδρογόνα d (C*H*₃-S-S-) της προστατευτικής ομάδας της θειόλης. Αξίζει να τονιστεί ότι οι ολοκληρώσεις των εμβαδών συμπίπτουν με τις θεωρητικά αναμενόμενες τιμές με εξαίρεση αυτή για τα υδρογόνα d. Πιθανός λόγος για τον οποίο τα υδρογόνα d εμφανίζουν μεγαλύτερο εμβαδό (11.98) από το αναμενόμενο (9) είναι οι διαφορετικοί χρόνοι χαλάρωσης που εμφανίζουν οι Ν-καρβοξυ ανυδρίτες σε σχέση με τα ελεύθερα αμινοξέα.

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω λοιπόν πιστοποιήθηκε πλήρως η σύνθεση του Ν-καρβοξυ ανυδρίτη της S-tert-butyl-mercapto-L-Cysteine (tBM-L-Cys).

5.2 Χαρακτηρισμός Nim-Trityl-L-Histidine N-Carboxy Anhydride (Nim-Trt-L-His NCA)

Για τον πλήρη έλεγχο της συνθετικής πορείας του N^{im}-Trt-L-His NCA κάθε στάδιο ελέγχθηκε με φασματοσκοπία FT-IR πριν την έναρξη του επόμενου.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στο Κεφάλαιο 2, η σύνθεση του N^{im}-Trt-L-His NCA πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. Αρχικά στο πρόδρομο αμινοξύ προστέθηκε το αντιδραστήριο χλωρίωσης SOCl₂ και μετά το πέρας μίας ώρας σχηματίστηκε σε υψηλή απόδοση το N^{im}-Trt-L-His NCA*HCl. Από την Εικόνα 20 είναι ορατή η διαφορά ανάμεσα στα φάσματα του πρόδρομου αμινοξέος και του N^{im}-Trt-L-His NCA*HCl έπειτα από μία ώρα αντίδρασης του αμινοξέος και του SOCl₂.



Εικόνα 20: Φάσματα FT-IR κατά την πορεία σύνθεσης του N^{im}-Trt-L-His NCA. Α γράφημα: Πρόδρομο αμινοξύ Boc-His(trt)-OH, Β γράφημα: Σχηματισμός N^{im}-Trt-L-His NCA*HCI έπειτα από 1 ώρα μετά την προσθήκη SOCI₂ στην αντίδραση, C γράφημα: Τελικός N^{im}-Trt-L-His

Χαρακτηριστική είναι η παρουσία της κορυφής στους 1710.1 cm⁻¹ (περιοχή a, Φάσμα A, Εικόνα 20) στο πρόδρομο αμινοξύ που αντιστοιχεί στη δόνηση του δεσμού C=O. Μετά την προσθήκη του SOCl₂, η κορυφή στους 1710.1 cm⁻¹ εξαφανίζεται καθώς πραγματοποιείται κυκλοποίηση του πρόδρομου αμινοξέος προς σχηματισμό του N^{im}-Trt-L-His NCA*HCl και αρχίζουν να εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές κορυφές για τις δονήσεις των C=O του Nκαρβοξυ ανυδρίτη. Πιο συγκεκριμένα, στους 1854 cm⁻¹ (περιοχή c, Φάσμα B, Εικόνα 20) για τη δόνηση του C=O δίπλα στην πλευρική ομάδα του NCA και στους 1788.8 cm⁻¹ για τη δόνηση του C=O δίπλα στο άζωτο του NCA. Επίσης, χαρακτηριστική είναι και η εμφάνιση κορυφής στους 1620 cm⁻¹ (περιοχή d, Φάσμα B, Εικόνα 20) που αντιστοιχεί στην έκταση του δεσμού N-H στο υδροχλωρικό άλας της Ιστιδίνης N^{im}-Trt-L-His NCA*HCI.

Στη συνέχεια, με χρήση ισομοριακής ποσότητας Et₃N πραγματοποιήθηκε η ποσοτική απομάκρυνση του HCl από τον ιμιδαζολικό δακτύλιο και ακολουθώντας μία διαδικασία ανακρυσταλλώσεων συλλέχθηκε ο τελικός N^{im}-Trt-L-His NCA. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 20, έπειτα από την προσθήκη της Et₃N και των ανακρυσταλλώσεων, ο τελικός N-καρβοξυ ανυδρίτης δεν εμφανίζει πια κορυφή στα 1620 cm⁻¹ που αντιστοιχεί στο άλας και διατηρεί τις δονήσεις των καρβονυλίων του δακτυλίου στους 1848.1 cm⁻¹ (δόνηση δεσμού C=O δίπλα στην πλευρική ομάδα του NCA) και στους 1769 cm⁻¹ (Δόνηση δεσμού C=O δίπλα στο άζωτο του NCA). Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι καθ'όλη την πειραματική πορεία, όπως φαίνεται από τα φάσματα, δεν έχει επηρεαστεί η τρίτυλο- προστατευτική ομάδα του ανυδρίτη καθώς οι κορυφές για τις δονήσεις των δεσμών -C=C- παραμένουν αμετάβλητες (Πίνακας 10).

Πίνακας 5: Αντιστοίχιση Χαρακτηριστικών Δονήσεων και Κυματαριθμών για το Πρόδρομο αμινοξύ Boc-His(trt)-OH (Φάσμα Α), για το N^{im}-Trt-L-His NCA*HCI (Φάσμα Β) και για τον τελικό N^{im}-Trt-L-His NCA (Φάσμα C)

Φάσμα Α	-1 Κυματαριθμοί (cm ⁻¹)	Χαρακτηριστικές Δονήσεις
Περιοχή a	1710.1	Δόνηση δεσμού C=O
Περιοχή b	751	_Δονήσεις δεσμών -C=C-
_	703.8	οακτυλιών Γριτυλο-ομαόων
Φάσμα Β		
Decrevé e	1854	Δόνηση δεσμού C=Ο δίπλα στην πλευρική ομάδα του NCA
Περιοχή ς	1788.8	Δόνηση δεσμού C=Ο δίπλα στο άζωτο του NCA
Περιοχή d	1620	Έκταση δεσμού Ν-Η στο υδροχλωρικό άλας της Ιστιδίνης

116

Πεοιοχή b	748.8	Δονήσεις δεσμών -C=C-	
	702.4	δακτυλίων Τρίτυλο-ομάδων	
Φάσμα C			
	1848.1	Δόνηση δεσμού C=Ο δίπλα στην πλευρική ομάδα του NCA	
περιοχη ς	1769	Δόνηση δεσμού C=Ο δίπλα στο άζωτο του NCA	
Πεοιονή μ	753.2	Δονήσεις δεσμών -C=C-	
	701	δακτυλίων Τρίτυλο-ομάδων	

Τέλος ακολούθησε χαρακτηρισμός και με φασματοσκοπία ¹HNMR με τη βοήθεια της οποίας εντοπίστηκαν όλα τα αναμενόμενα υδρογόνου του τελικού N^{im}-Trt-L-His NCA.



Εικόνα 21: Φάσμα ¹HNMR σε CDCI₃ για τον τελικό N^{im}-Trt-L-His NCA

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 21 ταυτοποιήθηκαν όλες οι κορυφές στο φάσμα του N^{im}-Trt-L-His NCA επιβεβαιώνοντας ολοκληρωτικά τη σύνθεση του μονομερούς. Για τον Ν-καρβοξυ ανυδρίτη της τριτυλο-Ιστιδίνης εντοπίστηκαν

οι κορυφές στα 7.71 ppm για το υδρογόνο d (-N=C*H*-N), στα 7.36-7.37 ppm για το υδρογόνο e (-C=C*H*-N), στα 7.11-7.12 ppm για τα υδρογόνα f (-C=C*H*-C=) των αρωματικών δακτυλίων, στα 6.69 ppm για το υδρογόνο c (-*H*N-C=O-), στα 4.57-4.59 ppm για το υδρογόνο α (Im-CH₂-C*H*-) του C_α και τέλος στα 2.98-3.20 ppm για τα υδρογόνα b (Im-C*H*₂-CH-) του C_β. Αξίζει επιπλέον να τονιστεί ότι και στη συγκεκριμένη περίπτωση, η αναλογία των εμβαδών δεν είναι σε όλες τις περιπτώσεις η αναμενόμενη και αυτό όπως προαναφέρθηκε οφείλεται στους διαφορετικούς χρόνους χαλάρωσης των Ν-καρβοξυ ανυδριτών.

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω λοιπόν αποδείχθηκε τόσο με φασματοσκοπία FT-IR όσο και με φασματοσκοπία ¹HNMR η σύνθεση του N^{im}-Trt-L-His NCA.

5.3 Χαρακτηρισμός Υβριδικού Τρισυσταδικού Συμπολυμερούς mPEO₁₁₄-b-PtBMLCys₇-b-PTrtHis₃₈

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στα πλαίσια της παρούσας εργασίας συντέθηκαν δύο υβριδικά τρισυσταδικά συμπολυμερή τύπου mPEO₁₁₄-b-PtBMLCys_m-b-PHis_n. Για τη σύνθεση των επιθυμητών συμπολυμερών πραγματοποιήθηκε διαδοχικός πολυμερισμός των tBM-L-Cys NCA και N^{im}-Trt-L-His NCA χρησιμοποιώντας ως απαρχητή της πρώτης πολυπεπτιδικής συστάδας το mPEO₁₁₄-NH₂ 5K. Με την ολοκλήρωση του πολυμερισμού της πρώτης πολυπεπτιδικής συστάδας (PtBMLCys) προστέθηκε στο σύστημα το δεύτερο μονομερές (N^{im}-Trt-L-His NCA) χωρίς να προηγηθεί στάδιο απομόνωσης του πολυμερισμού. Η κατανάλωση των μονομερών ελέγχθηκε με φασματοσκοπία FT-IR.

Αρχικά συντέθηκαν τα πλήρως προστατευμένα συμπολυμερή και στη συνέχεια με εκλεκτική αποπροστασία των μονομερικών μονάδων δημιουργήθηκαν τα πλήρως αποπροστατευμένα συμπολυμερή. Τα στάδια της σύνθεσης και της αποπροστασίας ελέγχθηκαν με φασματοσκοπία FT-IR και ¹HNMR για να επιβεβαιωθεί η επιτυχία τους.

118



Εικόνα 22: Φάσματα FT-IR για το τρισυσταδικό συμπολυμερές. Α: Μία μέρα πριν την ολοκλήρωση του πολυμερισμού της πολυκυστεΐνης, Β: Κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού της συστάδας της πολυϊστιδίνης, C: Μετά την καταβύθιση του πλήρως προστατευμένου τρισυσταδικού συμπολυμερούς, D: Πλήρως αποπροστατευμένο συμπολυμερές.

Από τη φασματοσκοπία υπερύθρου FT-IR ταυτοποιήθηκαν αρχικά οι χαρακτηριστικές αναμενόμενες δονήσεις για κάθε στάδιο της συνθετικής πορείας του συμπολυμερούς mPEO₁₁₄-b-PCys₇-b-PHis₃₈. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 22, κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού της συστάδας PtBMLCys, χαρακτηριστική είναι η παρουσία των δονήσεων για τον πεπτιδικό δεσμό στους 1668 cm⁻¹ και 1530.3 cm⁻¹(Α γράφημα, περιοχή c) που σε συνδυασμό με τη μείωση των χαρακτηριστικών δονήσεων του tBM-L-Cys NCA στους 1854.3 cm⁻¹ και 1787.5 cm⁻¹ (A γράφημα, περιοχή b) υποδηλώνεται ο πολυμερισμός της από το μακροαπαρχητή (mPEO₁₁₄-NH₂). Επίσης εντοπίζονται και οι χαρακτηριστικές δονήσεις για το μακροαπαρχητή στους 2891 cm⁻¹ (Α γράφημα, περιοχή a) και στους 1112 cm⁻¹(Α γράφημα περιοχή d). Με την πλήρη κατανάλωση του tBM-L-Cys NCA προστέθηκε στο διάλυμα ο N^{im}-Trt-L-His NCA και κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού πάρθηκε δείγμα για τον έλεγχο της πορείας του (Εικόνα 22, Β γράφημα). Εκτός τις αναμενόμενες δονήσεις για τον πεπτιδικό δεσμού (Β γράφημα, περιοχή c) και για το mPEO₁₁₄-NH₂ (Β γράφημα, περιοχές a και d), είναι εμφανής η ύπαρξη δονήσεων στους 1848.9 cm⁻¹ και 1783.2 cm⁻¹ (Β γράφημα, περιοχή b) που υποδηλώνουν την ύπαρξη του N^{im}-Trt-L-His NCA στο διάλυμα αλλά και δονήσεις στους 748.9 cm⁻¹ και 700 cm⁻¹ (Β γράφημα, περιοχή e) που αντιστοιχούν στις δονήσεις των τρίτυλο-προστατευτικών ομάδων της ιστιδίνης. Τέλος, συγκρίνοντας τα φάσματα C και D, πέραν των αναμενόμενων δονήσεων για τον πεπτιδικό δεσμό (φάσματα C και D, περιοχή c) και το μακροαπαρχητή (φάσματα C και D, περιοχές a και d), είναι εμφανής η απουσία των δονήσεων για τις τρίτυλο-προστατευτικές ομάδες για το πλήρως αποπροστατευμένο συμπολυμερές (φάσμα D) σε σχέση με το πλήρως προστατευμένο (φάσμα C, περιοχή e). Λόγω του μικρού μοριακού της βάρους, η συστάδα της κυστεΐνης δεν εμφανίζει χαρακτηριστικές δονήσεις στα συγκεκριμένα φάσματα. Στον Πίνακα 5 παρατίθενται οι ακριβείς αντιστοίχιση των χαρακτηριστικών δονήσεων και κυματαριθμών για τα φάσμα A-D.

Πίνακας 6: Αντιστοίχιση Χαρακτηριστικών Δονήσεων και Κυματαριθμών. Φάσμα Α: μία μέρα πριν την ολοκλήρωση του πολυμερισμού της πρώτης συστάδας, Φάσμα Β: Κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού της PHis, Φάσμα C: Μετά την καταβύθιση σε διαιθυλαιθέρα, πλήρως προστατευμένο συμπολυμερές, Φάσμα D: Πλήρως αποπροστατευμένο συμπολυμερές.

Φάσμα Α	Κυματαριθμοί (cm ⁻¹)		Χαρακτηριστική Δόνηση
Περιοχή a	2891		Έκταση δεσμού C-H πολυαιθυλενοξειδίου
Πεοιοχή b	1854.3	Δά	όνηση δεσμού C=Ο δίπλα στην πλευρική ομάδα του NCA
	1787.5	Δόνη	ση δεσμού C=Ο δίπλα στο άζωτο του NCA
	1668	Έ	Εκταση δεσμού C=O (amide I)
Περιοχή c	1530.3	K	άμψη δεσμού C-N-H (amide II)
Περιοχή d	1112	Έκταση δεσμού C-O-C επαναλαμβανόμενης δομικής μονάδ πολυαιθυλενοξειδίου	
Φάσμα Β			,
Περιοχή a	2871.8		Έκταση δεσμού C-H πολυαιθυλενοξειδίου
Πεοιογή μ	1848.9		Δόνηση C=Ο δίπλα στην πλευρική ομάδα του NCA
	1783.2		Δόνηση δεσμού C=Ο δίπλα στο άζωτο του NCA
Περιοχή c	1653.4		Έκταση δεσμού C=O (amide I)

	1551.2	Κάμψη δεσμού C-N-H (amide II)
Περιοχή d	1100.4	Έκταση δεσμού C-O-C επαναλαμβανόμενης δομικής μονάδας πολυαιθυλενοξειδίου
Περιοχή e	748.9	Δονήσεις δεσμών -C=C-
	700	δακτυλίων Τρίτυλο-ομάδων
Φάσμα C		
Περιοχή a	2870.3	Έκταση δεσμού C-H πολυαιθυλενοξειδίου
Πεοιονή ο	1653.1	Έκταση δεσμού C=O (amide I)
Περιοχή σ	1551.1	Κάμψη δεσμού C-N-H (amide II)
Περιοχή d	1106	Έκταση δεσμού C-O-C επαναλαμβανόμενης δομικής μονάδας πολυαιθυλενοξειδίου
	748.6	
Περιοχή e	701	Δονησεις οεσμων -C=C- δακτυλίων Τρίτυλο-ομάδων
Φάσμα D		
Περιοχή a	2882.6	Έκταση δεσμού C-H πολυαιθυλενοξειδίου
Πεοιονή ο	1643.9	Έκταση δεσμού C=O (amide I)
	1550.9	Κάμψη δεσμού C-N-H (amide II)
Περιοχή d	1109.7	Έκταση δεσμού C-O-C επαναλαμβανόμενης δομικής μονάδας πολυαιθυλενοξειδίου

Το επόμενο βήμα για το χαρακτηρισμό του συμπολυμερούς mPEO₁₁₄-b-PCys₇-b-PHis₃₈ αποτέλεσε η μέτρηση δείγματος με φασματοσκοπία ¹HNMR. Διερευνήθηκαν διάφορες συνθήκες παρασκευής δείγματος ώστε τελικά να γίνει δυνατός ο εντοπισμός όλων των αναμενόμενων κορυφών. Παρατηρήθηκε ότι το συμπολυμερές εμφανίζει ισχυρά φαινόμενα αυτοοργάνωσης αφού σε καμία περίπτωση η 100% ταυτοποίηση της συστάδας της πολυκυστεΐνης δεν ήταν δυνατή.

Αρχικά λήφθηκαν φάσματα για το mPEO₁₁₄-b-PtBMLCys₇-b-PHis₃₈ (μερικώς αποπροστατευμένο συμπολυμερές) 1D ¹HNMR με διαλύτες: TFA-d/DMSO-d 30% (Εικόνα 23, Φάσμα Α), TFA-d (Εικόνα 23, Φάσμα Β) και D₂O/DCI 1% (Εικόνα 30, Φάσμα Β) και επιπλέον COSY 2D σε TFA-d και HSQC (2D) σε TFA-d.

Επίσης, για σύγκριση, λήφθηκαν φάσματα για το mPEO₁₁₄-b-PCys₇-b-PHis₃₈ (πλήρως αποπροστατευμένο συμπολυμερές) 1D ¹HNMR σε TFA-d και D₂O/DCI 1% (Εικόνα 30, Φάσμα A), COSY (2D) σε TFA-d και HSQC (2D) σε TFA-d. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι η περιεκτικότητα του DCI στο D₂O κυμαίνεται αυστηρά στο 1% λόγω του ότι σε πολύ υψηλότερες περιεκτικότητες τα φορτία που δημιουργούνται λόγω του DCI καθιστούν τη μέτρηση αδύνατη.



Εικόνα 23: Φάσματα ¹HNMR για το μερικώς αποπροστατευμένο συμπολυμερές mPEO₁₁₄-b-PtBMLCys₇-b-PHis₃₈. Φάσμα Α: Μέτρηση με χρήση μείγματος διαλυτών TFA-d/DMSO-d 30%. Φάσμα Β: Μέτρηση με χρήση μόνο TFA-d.

Από τη φασματοσκοπία ¹HNMR για το μείγμα διαλυτών TFA-d/DMSO-d 30% και για το σκέτο TFA-d επιβεβαιώθηκε η δομή του συμπολυμερούς αλλά και η αποπροστασία των δομικών μονάδων της ιστιδίνης. Και στις δύο περιπτώσεις ανιχνεύθηκε η μονομερική μονάδα του πολυαιθυλενοξειδίου (-O-CH2-CH2-). (Εικόνα 23,Φάσμα Α: e 3.48 ppm, Φάσμα Β: e 4.05 ppm) αλλά και τα τελικά υδρογόνα g (CH₃-O-CH₂-CH₂-) στα 3.16 ppm (Εικόνα 23, Φάσμα Α) και 3.72 ppm (Εικόνα 23, Φάσμα Β). Επίσης, ανιχνεύτηκαν όλες οι αναμενόμενες κορυφές για τη συστάδα της πολυϊστιδίνης όπως για παράδειγμα η κορυφή στα 4.62 ppm (Εικόνα 23, Φάσμα Α) και στα 5.26 ppm (Εικόνα 23, Φάσμα Β) για το υδρογόνο a του C_a (Im-CH₂-CH-) και η κορυφή στα 8.26 ppm (Εικόνα 23, Φάσμα Α) και στα 8.77 ppm (Εικόνα 23, Φάσμα Β) για το υδρογόνο f ιμιδαζολικού δακτυλίου (-NH-CH=N-). Επίσης είναι εμφανής και η ύπαρξη της κορυφής για τα υδρογόνα c (CH3-S-S-) της προστατευτικής ομάδας της θειόλης στα 0.95 ppm (Εικόνα 23, Φάσμα Α) και 1.51 ppm (Εικόνα 23, Φάσμα B). Τα πρωτόνια του C_β (b') και C_a (a') για την πολυκυστείνη ήταν αδύνατο να ανιχνευθούν λόγω του ότι συμπίπτουν με τα αντίστοιχα υδρογόνα (a και b) της πολυϊστιδίνης.

Επίσης, παρατηρείται η ύπαρξη ευρέων κορυφών στο φάσμα B (Εικόνα 23) πιθανόν λόγω του ότι η προστατευτική ομάδα της κυστεΐνης προκαλεί συσσωμάτωση των αλυσίδων λόγω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων έχοντας ως αποτέλεσμα τη δυσκολότερη κίνηση των μακρομορίων εντός του δείγματος και τη δημιουργία ευρέων κορυφών. Το παραπάνω φαινόμενο αποφεύγεται στη μέτρηση με μείγμα διαλυτών TFA-d/DMSO-d 30% λόγω της ύπαρξης του υδρόφοβου διαλύτη DMSO-d που εμποδίζει τη συσσωμάτωση των αλυσίδων.

123



Εικόνα 24: Φάσματα ¹HNMR. Φάσμα Α: Πλήρως αποπροστατευμένο συμπολυμερές mPEO₁₁₄-b-PCys₇-b-PHis₃₈ σε TFA-d, Φάσμα Β: Μερικώς αποπροστατευμένο συμπολυμερές mPEO₁₁₄-b-PtBMLCys₇-b-PHis₃₈ σε TFA-d.

Στη συνέχεια, συγκρίνοντας τα δύο φάσματα για το μερικώς, και πλήρως αποπροστατευμένο συμπολυμερές, παρατηρείται ότι στο φάσμα Α (Εικόνα 24), η αντίστοιχη κορυφή για τα υδρογόνα c (C H_3 -S-S-) της προστατευτικής ομάδας της θειόλης έχει εξαφανιστεί όπως είναι και αναμενόμενο καθώς το συμπολυμερές είναι στην πλήρως αποπροστατευμένη του μορφή ενώ οι υπόλοιπες χημικές μετατοπίσεις παραμένουν σταθερές. Επίσης, ενισχύεται επιπλέον n θεωρεία συσσωμάτωσης των αλυσίδων της όπως προαναφέρθηκε καθώς όπως είναι προφανές, στο φάσμα Α (Εικόνα 24) που η προστατευτική ομάδα απουσιάζει, οι κορυφές έχουν την αναμενόμενη μορφή χωρίς καθόλου εύρος.

Στη συνέχεια, για περαιτέρω μελέτη των συμπολυμερών mPEO₁₁₄-b-PtBMLCys₇-b-PHis₃₈ και mPEO₁₁₄-b-PCys₇-b-PHis₃₈, πραγματοποιήθηκαν

124

μετρήσεις με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού δύο διαστάσεων.



Εικόνα 25: COSY 2D ¹HNMR για το μερικώς αποπροστατευμένο συμπολυμερές mPEO₁₁₄-b-PCys₇-b-PHis₃₈ σε TFA-d.

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 25 (κόκκινες διακεκομμένες γραμμές), για το mPEO₁₁₄-b-PCys₇-b-PHis₃₈ σε TFA-d, επιβεβαιώθηκε ότι οι κορυφές για τα υδρογόνα a (Im-CH₂-C*H*-) και b (Im-C*H*₂-) αλληλεπιδρούν και ανήκουν στη συστάδα της πολυϊστιδίνης. Δυστυχώς δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση αλληλεπιδράσεων για τα υδρογόνα της κυστεΐνης γι'αυτό και το επόμενο βήμα ήταν η μέτρηση COSY 2D για το μερικώς αποπροστατευμένο συμπολυμερές mPEO₁₁₄-b-PtBMLCys₇-b-PHis₃₈ σε TFA-d (Εικόνα 26).



Εικόνα 26: COSY 2D ¹HNMR για το μερικώς αποπροστατευμένο συμπολυμερές mPEO₁₁₄-b-PtBMLCys₇-b-PHis₃₈ σε TFA-d.

Τα αποτελέσματα ήταν σχεδόν αναμενόμενα καθώς λόγω μεγάλου εύρους των κορυφών ήταν αδύνατη η επιτυχία της μέτρησης σε δύο διαστάσεις και καμία από τις αναμενόμενες συσχετίσεις μεταξύ κορυφών δεν ανιχνεύτηκε. Παρόλα αυτά, το μη αναμενόμενο ήταν η εμφάνιση συσχέτισης μεταξύ των κορυφών για τα υδρογόνα b (Im-C H_2 -) της ιστιδίνης με τα υδρογόνα c (C H_3 -S-S-) της προστατευτικής ομάδας της κυστεΐνης (Εικόνα 25, κόκκινη διακεκομμένη γραμμή). Μπορεί κανείς να υποστηρίξει ότι αυτή η συσχέτιση είναι αναμενόμενη αφού θεωρείται ότι τα υδρογόνα b' της κυστεΐνης συμπίπτουν με της ιστιδίνης αλλά δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα λόγω του ότι η μέτρηση COSY αφορά μέχρι J3 coupling οπότε μπορεί εύκολα να θεωρηθεί συσχέτιση στα πλαίσια θορύβου του πειράματος. Επίσης, εμφανίζεται συσχέτιση μεταξύ της κορυφής του υδρογόνου α (Im-CH₂-CH-) με περιοχή ελαφρά μετατοπισμένη δεξιότερα των υδρογόνων b (Im-CH2-) (Εικόνα 25, κόκκινη διακεκομμένη γραμμή). Η παραπάνω συσχέτιση θα μπορούσε να οφείλεται στα υδρογόνα b' (-S-CH2-CH-) και a' (-S-CH₂-CH-) της κυστεΐνης αφού θεωρείται ότι τα a (Im-CH₂-CH-) και a' (-S-CH₂-C*H*-) συμπίπτουν, παρόλα αυτά λόγω του μεγάλου εύρους των κορυφών η μέτρηση δεν αξιολογείται ως ακριβής.

Έτσι, το επόμενο βήμα ήταν η μέτρηση HSQC (2D) σε TFA-d. Η συγκεκριμένη μέτρηση αφορά πυρήνες διαφορετικών ατόμων, στην παρούσα περίπτωση υδρογόνου και άνθρακα, και εντοπίζονται με ευκολία τα CH, CH₂ και CH₃. Τα CH και CH₃ εμφανίζονται με ίδια φάση (άρα και ίδιο χρώμα στο φάσμα, πορτοκαλί) ενώ τα CH₂ με διαφορά φάσης από τα άλλα δύο (άρα και διαφορετικό χρώμα, θαλασσί).



Εικόνα 27: Φάσμα HSQC (2D) σε TFA-d για το μερικώς αποπροστατευμένο συμπολυμερές mPEO₁₁₄-b-PtBMLCys₇-b-PHis₃₈.



Εικόνα 28: Φάσμα HSQC (2D) σε TFA-d για το μερικώς αποπροστατευμένο συμπολυμερές mPEO₁₁₄-b-PtBMLCys₇-b-PHis₃₈. <u>Μεγέθυνση</u> από 1.0 - 4.3 ppm και από 0 - 45 ppm.

Η συγκεκριμένη μέτρηση αφορά J1 coupling και σε πρώτο στάδιο επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη των μεθυλίων c στα 1.5 ppm και 28.20 ppm (Εικόνα 28) που αντιστοιχούν στην S-tert-butyl προστατευτική ομάδα της κυστεΐνης. Επίσης παρατηρήθηκε ένδειξη ύπαρξης CH₂ μεθυλενίων στα 3.31-3.25 ppm και 40.6-40.3 ppm (Εικόνα 28) τα οποία βιβλιογραφικά αντιστοιχούν στα b' της κυστεΐνης. Παρόλα αυτά, λόγω του ότι η μέτρηση χρησιμοποιείται για J1 coupling μπορούν και πάλι να θεωρηθούν κορυφές στα πλαίσια του θορύβου.



Εικόνα 29: Φάσμα HSQC (2D) σε TFA-d για το μερικώς αποπροστατευμένο συμπολυμερές mPEO₁₁₄-b-PtBMLCys₇-b-PHis₃₈. <u>Μεγέθυνση</u> από 1.0 - 6.5 ppm και από 43 - 65 ppm.

Με τη μέτρηση HSQC επιβεβαιώθηκε επίσης ο C_a a της πολυϊστιδίνης στα 54.1 ppm με υδρογόνο στα 5.18 ppm και το τελικό μεθύλιο g του μακροαπαρχητή στα 57.47 ppm και 3.71 ppm.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε μέτρηση 1D ¹HNMR με χρήση μείγματος διαλυτών D₂O/DCI 1% για τα mPEO₁₁₄-b-PtBMLCys₇-b-PHis₃₈ (μερικώς αποπροστατευμένο συμπολυμερές) (Εικόνα 30, Φάσμα Β) και mPEO₁₁₄-b-PCys₇-b-PHis₃₈ (πλήρως αποπροστατευμένο συμπολυμερές) (Εικόνα 30, Φάσμα Α) ώστε να ελεγχθεί αν το συγκεκριμένο σύστημα διαλυτών καταλήγει σε ασφαλέστερα συμπεράσματα.



Εικόνα 30: Φάσματα ¹HNMR. Φάσμα Α: Πλήρως αποπροστατευμένο συμπολυμερές mPEO₁₁₄-b-PCys₇-b-PHis₃₈ σε D₂O/DCI, Φάσμα Β: Μερικώς αποπροστατευμένο συμπολυμερές mPEO₁₁₄-b-PtBMLCys₇-b-PHis₃₈ σε D₂O/DCI.

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω φάσματα, εντοπίστηκαν όλες οι χαρακτηριστικές κορυφές για τη συστάδα της πολυϊστιδίνης, του πολυαιθυλενοξειδίου και ενός μέρους της πολυκυστεΐνης. Στον Πίνακα 7 φαίνεται αναλυτικά η αντιστοίχηση των χημικών μετατοπίσεων με τα αντίστοιχα υδρογόνα.

Πίνακας 7: Αντιστοίχιση χημικών μετατοπίσεων-χαρακτηριστικών υδρογόνων στη μέτρηση με D₂O/DCI 1%. Φάσμα Α: Συμπολυμερές mPEO₁₁₄-b-PCys₇-PHis₃₈, Φάσμα Β: Συμπολυμερές mPEO₁₁₄-b-PtBMLCys₇-PHis₃₈

Φάσμα	A	Φάσμα	хB
Χαρακτηριστικά Υδρογόνα	Χημική Μετατόπιση (ppm)	Χαρακτηριστικά Υδρογόνα	Χημική Μετατόπιση (ppm)
Υδρογόνο f (-NH-C <i>H</i>=N-)	8.61	Υδρογόνο f (-NH-C H =N-)	8.59

Υδρογόνο d (-NH-C <i>H</i> =C-)	7.25	Υδρογόνο d (-NH-C <i>H</i> =C-)	7.23
Υδρογόνο <mark>a</mark> (Im-CH ₂ -C H -)	4.65-4.67	Υδρογόνο a (Im-CH ₂ -C H -)	4.63 - 4.65
Υδρογόνα <mark>e</mark> (-O-C H₂- C H₂-)	3.64	Υδρογόνα <mark>e</mark> (-O-C H₂- C H₂-)	3.62
Υδρογόνα g (C H 3-O-CH2-CH2-)	3.32	Υδρογόνα g (C H 3-O-CH2-CH2-)	3.30
Υδρογόνα b (Im-C H₂-)	3.05-3.16	Υδρογόνα b (Im-C H ₂-)	3.03 - 3.14
Υδρογόνα b' (HS-C H₂- CH-)	2.85-2.88	Υδρογόνα <mark>C</mark> (C H 3-S-S-)	1.23 - 1.26

Έπειτα από διάφορες μετρήσεις με διαφορετικά συστήματα διαλυτών παρατηρήθηκε ότι το μείγμα D2O/DCI 1% κατέληξε στα καλύτερα αποτελέσματα. Πιο συγκεκριμένα, πέραν της συστάδας της πολυϊστιδίνης και του πολυαιθυλενοξειδίου, εντοπίστηκε και χαρακτηριστική κορυφή για την προστατευτική ομάδα της πολυκυστείνης (κορυφή c, Εικόνα 30.Φάσμα B) η οποία απουσιάζει από το φάσμα του πλήρως αποπροστατευμένου συμπολυμερούς (Εικόνα 30, Φάσμα Α) όπως αναμενόταν. Επίσης, μετά τη διαδικασία της αποπροστασίας, λόγω της αλλαγής του χημικού περιβάλλοντος των υδρογόνων b' της πολυκυστεϊνης, παρατηρείται η εμφάνιση της κορυφής b' (Εικόνα 30. Φάσμα Α) και η απουσία της στο μερικώς αποπροστατευμένο συμπολυμερές γεγονός που αποδεικνύει την ύπαρξη και της μεσαίας συστάδας στο συμπολυμερές. Όπως είναι γνωστό, στα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού θα πρέπει να εμφανίζονται όλες οι αναμενόμενες κορυφές ώστε να ταυτοποιείται κάθε είδους μόριο ή μακρομόριο. Παρόλα αυτά, στη συγκεκριμένη περίπτωση, αυτό δεν είναι δυνατό λόγω του αμφίφιλου χαρακτήρα των συμπολυμερών και της δυσκολίας εύρεσης του κατάλληλου μείγματος διαλυτών ώστε να εμφανίζονται ξεκάθαρα όλες οι κορυφές. Επίσης, αξίζει να τονιστεί ότι τα εμβαδά δεν

συμπίπτουν επακριβώς με τα θεωρητικά αναμενόμενα πράγμα που απαντάται στη βιβλιογραφία^{20,65} για συμπολυμερή που περιέχουν πολυϊστιδίνη. Το παραπάνω γεγονός πιθανά οφείλεται στην ισχυρή συσσωμάτωση των δομικών μονάδων της πολυϊστιδίνης. Έχοντας ως σημείο αναφοράς τα υδρογόνα g, για το Φάσμα A (Εικόνα 30), οι δομικές μονάδες του πολυαιθυλενοξειδίου είναι ίσες με 106, της πολυϊστιδίνης 24-25 και της πολυκυστεΐνης 4. Αντίστοιχα, για το Φάσμα B, οι δομικές μονάδες του πολυαιθυλενοξειδίου είναι ίσες με 92, της πολυϊστιδίνης 18-19 και της πολυκυστεΐνης 2.

Από όλα τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι τα καλύτερα αποτελέσματα για τα συμπολυμερή mPEO₁₁₄-b-PtBMLCys₇-b-PHis₃₈ και mPEO₁₁₄-b-PCys₇-b-PHis₃₈ εξήχθησαν με το μείγμα διαλυτών D₂O/DCI 1% παρόλο που τα εμβαδά τους δεν συμπίπτουν πλήρως με τα θεωρητικά προβλεπόμενα καθώς είναι το μόνο σύστημα στο οποίο εμφανίστηκε κορυφή για την πολυκυστεΐνη.



Εικόνα 31: Χρωματογράφημα GPC για το συμπολυμερές mPEO₁₁₄-b-PCys₁₁-b-PHis₃₄. Γκρι γράφημα: μακροαπαρχητής mPEO₁₁₄-NH₂ 5K, Κόκκινο γράφημα: mPEO₁₁₄-b-PCys₁₁-b-PHis₃₄ (πλήρως αποπροστατευμένο), Μπλε γράφημα: mPEO₁₁₄-b-PCys₁₁-b-PHis₃₄ αντίδραση με αναγωγικό μέσο DTT για μία νύχτα.

Πραγματοποιήθηκε μέτρηση GPC για το συμπολυμερές mPEO₁₁₄-b-PCys₁₁-b-PHis₃₄ (25%) όπου όπως φαίνεται από την Εικόνα 30 (Κόκκινο γράφημα) είναι εμφανής η ύπαρξη διμερούς λόγω των ελεύθερων θειολών στις πολυμερικές αλυσίδες. Στη συνέχεια, έπειτα από αντίδραση του δείγματος με το αναγωγικό μέσω DTT για μία νύχτα, παρατηρείται μείωση σε μεγάλο βαθμό του διμερούς πράγμα που αποδεικνύει την ύπαρξη των ελεύθερων θειολών στο συμπολυμερές. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε με διαλύτη milliQ : TFA 2% : MeCN 10 %.

5.4 Μελέτη Αυτοοργάνωσης Με Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS)

Έπειτα από τη σύνθεση των συμπολυμερών mPEO₁₁₄-b-PCys_m-b-PHis_n ακολούθησε η μελέτη της αυτοοργάνωσής τους. Ο αρχικός στόχος περιελάμβανε τη μελέτη αυτοοργάνωσης των δικτυωμένων υβριδικών τρισυσταδικών συμπολυμερών mPEO₁₁₄-b-PCys_m-b-PHis_n σε υδατικά διαλύματα που προσομοιάζουν συνθήκες ανθρώπινου οργανισμού.

Επιθυμητές Συνθήκες Μελέτη Συμπα	ς Αυτοοργάνα ολυμερών	ωσης Δικτυωμένων
	37 °C	χωρίς GSH
1. Tris Buffer 10mM pH=7.4	01 0	0.2 mM GSH
150 MM NACI	41 °C	χωρίς GSH
	11 0	0.2 mM GSH
		χωρίς GSH
2. Mes Buffer 10 mM pH=6.5	37 °C	0.2 mM GSH
150 mM NaCl		10 mM
	41 °C	χωρίς GSH

Πίνακας 8: Επιθυμητές συνθήκες μελέτης αυτοοργάνωσης

		0.2 mM GSH
		10 mM
	37 °C	χωρίς GSH
		0.2 mM GSH
3. Acetic Buffer 10 mM pH=5 150 mM NaCI		10 mM
	41 °C	χωρίς GSH
		0.2 mM GSH
		10 mM

Ο λόγος για τον οποίο είναι επιθυμητές οι παραπάνω συνθήκες είναι γιατί καταρχάς στους υγιείς ιστούς η φυσιολογική θερμοκρασία είναι 37 °C αντίθετα με τους καρκινικούς που είναι 41 °C. Επίσης η τιμή pH του ανθρώπινου αίματος είναι ίση με 7.4 σε αντίθεση με το εσωτερικό των καρκινικών κυττάρων που είναι ίση με 5 και το εξωτερικό τους που είναι ίση με 6.5. Επίσης, η συγκέντρωση του τριπεπτιδίου της γλουταθειόνης (GSH) στο αίμα είναι γύρω στα 0.2 mM σε αντίθεση με τα καρκινικά κύτταρα που αγγίζει τα 10 mM και είναι γνωστό ότι η GSH δρα ως αναγωγικό μέσο για τους δισουλφιδικούς δεσμούς προκαλώντας της διάσπασή τους καταλήγοντας τελικά σε ελεύθερες θειόλες. Άρα σε όλες τις παραπάνω συνθήκες θα ήταν ιδανική η μελέτη των μακρομορίων της παρούσας εργασίας αφού ως στόχο έχουν τη μεταφορά αντικαρκινικών φαρμάκων και έτσι καλύπτονται όλες οι πιθανές περιπτώσεις που μπορούν οι νανομεταφορείς να εκτεθούν.

Με την ολοκλήρωση της δικτύωσης των τρισυσταδικών συμπολυμερών, παρατηρήθηκε, όπως προαναφέρθηκε στην Παράγραφο 3.7, η δημιουργία ιζήματος. Η δικτύωση πραγματοποιήθηκε σε ουδέτερο προς βασικό pH (7.4) επειδή σύμφωνα με τη βιβλιογραφία⁴⁴ η δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών απαιτεί βασικές προς αλκαλικές συνθήκες. Όμως, όπως είναι γνωστό, η πολυϊστιδίνη σε βασικό pH αποπρωτονιώνεται με αποτέλεσμα να

134

μετατρέπεται σε υδρόφοβη και άρα αδιάλυτη σε βασικά υδατικά διαλύματα. Λόγω ιζήματος λοιπόν ήταν αδύνατο να πραγματοποιηθεί μέτρηση στη Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS) σε αυτά τα δείγματα.

Έτσι, ξεκίνησε η μελέτη των συμπολυμερών από το πρώτο στάδιο της αυτοοργάνωσής τους, τη διάλυσή τους δηλαδή σε DMSO. Παραμερίστηκε ο παράγοντας της δικτύωσης και επιλέχθηκαν προς μέτρηση τα δείγματα:

mPEO ₁₁₄ -b-PtBMLCys ₇ -b-PHis ₃₈	mPEO ₁₁₄ -b-PCys ₇ -b-PHis ₃₈
σε	σε
DMSO	DMSO
mPEO ₁₁₄ -b-PtBMLCys ₇ -b-PHis ₃₈	mPEO ₁₁₄ -b-PtBMLCys ₇ -b-PHis ₃₈
mPEO ₁₁₄ -b-PtBMLCys ₇ -b-PHis ₃₈ σε	mPEO ₁₁₄ -b-PtBMLCys ₇ -b-PHis ₃₈ σε
mPEO ₁₁₄ -b-PtBMLCys ₇ -b-PHis ₃₈ σε buffer pH=7.4, 150mM NaCl	mPEO ₁₁₄ -b-PtBMLCys ₇ -b-PHis ₃₈ σε buffer pH=7.4, 150mM NaCl

4.4.1 Μελέτη Αυτοοργάνωσης mPEO₁₁₄-b-PtBMLCys₇-b-PHis₃₈ σε DMSO

Για την προετοιμασία του δείγματος προετοιμάστηκε διάλυμα συγκέντρωσης 9.77 mg/mL με απευθείας διάλυση του συμπολυμερούς σε DMSO.

Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για διαφορετικές γωνίες με εύρος 25°-150°. Αναλυτικά θα συζητηθούν μόνο οι μετρήσεις στις 90° καθώς είναι οι πιο αντιπροσωπευτικές.

Για την ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος CONTIN. Αρχικά, σαν πρώτη προσέγγιση, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του απλού εκθετικού το οποίο αντιπροσωπεύει την ιδανική περίπτωση. Λόγω όμως ισχυρής δυναμικής στο σύστημα τα πειραματικά αποτελέσματα και η ανάλυση απλού εκθετικού βρίσκονταν σε ασυμφωνία καθώς όπως αποδείχθηκε εκ των υστέρων, στην κύρια συνεισφορά υπήρχαν παραπάνω από μία διεργασίες αυτοοργάνωσης. Επίσης, η μέθοδος του απλού εκθετικού δεν μπορούσε να εφαρμοστεί σε όλες τις μετρήσεις λόγω αδύναμου baseline και επομένως οι μετρήσεις δεν ήταν συγκρίσιμες μεταξύ τους. Για τους παραπάνω λόγους, σε επόμενο στάδιο η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο CONTIN η οποία απέδωσε ασφαλέστερα συμπεράσματα σχετικά με τον τρόπο αυτοοργάνωσης και το μέγεθος των δομών.



Εικόνα 32: Συνάρτηση αυτοσυσχέτισης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις





Εικόνα 33: Συντελεστής διάχυσης για την κύρια διαδικασία αυτοοργάνωσης συναρτήσει q²



Εικόνα 34: Συντελεστής διάχυσης για τις δύο διαδικασίες αυτοοργάνωσης συναρτήσει των διαφορετικών συγκεντρώσεων



Εικόνα 35: Διάγραμμα ρυθμού απόσβεσης συναρτήσει q σε διαφορετικές συγκεντρώσεις



Εικόνα 36: Διάγραμμα κανονικοποιημένης έντασης συναρτήσει q σε διαφορετικές συγκεντρώσεις

Από τα παραπάνω διαγράμματα και τις μετρήσεις στη δυναμική σκέδαση φωτός εντοπίστηκαν δύο διεργασίες αυτοοργάνωσης για το συμπολυμερές σε DMSO. Όπως φαίνεται από την Εικόνα 24 οι χρόνοι χαλάρωσης των δύο διεργασιών είναι σχεδόν ανεξάρτητοι από τη συγκέντρωση καθώς εμφανίζονται σε όλες τις διαφορετικές συγκεντρώσεις που μετρήθηκαν στο δείγμα.

Για την κύρια διεργασία δείχθηκε ότι ο συντελεστής διάχυσης μειώνεται όσο η συγκέντρωση αυξάνεται (Εικόνα 26), ενώ για τη γρήγορα διεργασία παρατηρήθηκε η αντίθετη συμπεριφορά (Εικόνα 26). Καμία από τις δύο συμπεριφορές δεν θεωρείται αναμενόμενη καθώς είναι η πρώτη φορά που μελετάται η αυτοοργάνωση των συμπολυμερών σε τέτοιο σύστημα.

Παρατηρήθηκε ότι ο ρυθμός απόσβεσης (Γ) για την κύρια διεργασία παρουσιάζει μία γραμμική αύξηση για όλες τις συγκεντρώσεις και έχει σχεδόν τις ίδιες τιμές για όλες τις συγκεντρώσεις (Εικόνα 27).

Επίσης, από το διάγραμμα της έντασης συναρτήσει του q (Εικόνα 28) μελετήθηκαν 3 διαφορετικά μοντέλα ώστε προσεγγιστικά να ταυτοποιηθούν οι δομές που σχηματίζονται στο σύστημα παίρνοντας ως δεδομένο ότι το σύστημα βρίσκεται σε συνθήκες c<c*. Χρησιμοποιήθηκε το δείγμα με τη χαμηλότερη συγκέντρωση και δείχθηκε ότι στο σύστημα υπάρχουν μεγάλες, εύκαμπτες δομές σχήματος τυχαίου σπειράματος. Πιο συγκεκριμένα, λόγω του ότι το συμπολυμερές είναι αμφίφιλο, οι δομές που σχηματίζονται φαίνεται να είναι "worm-like" μικκύλια.

Για τα συγκεκριμένα "worm-like" μικκύλια, και από μία πρώτη προσέγγιση για την κύρια διεργασία, υπολογίστηκε ότι χαρακτηρίζονται από: L ~ 4μm, I_k ~ 100nm, m=2, d=25nm, R_G ~ 294 nm και R_h ~ 220 nm.

4.4.2 Μελέτη Αυτοοργάνωσης mPEO₁₁₄-b-PCys₇-b-PHis₃₈ σε DMSO

Η ίδια μελέτη πραγματοποιήθηκε και για το συμπολυμερές mPEO₁₁₄-b-PCys₇b-PHis₃₈ σε DMSO.



Εικόνα 37: Συνάρτηση αυτοσυσχέτισης για συγκέντρωση δείγματος 0.08 mg/mL



Εικόνα 38: Συντελεστής διάχυσης για την κύρια διαδικασία αυτοοργάνωσης συναρτήσει q²



Εικόνα 39: Διάγραμμα ρυθμού απόσβεσης συναρτήσει q σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις



Εικόνα 40: Διάγραμμα κανονικοποιημένης έντασης συναρτήσει q σε δύο διαφορετικές

Όπως φαίνεται και από τις μετρήσεις για το πλήρως προστατευμένο δείγμα εμφανίζονται ξανά δύο διεργασίες. Παρόλα αυτά εμφανίζεται λίγο διαφορετική η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης και σχέση με το μερικώς αποπροστατευμένο δείγμα (Εικόνα 29).

Επίσης από το διάγραμμα Γ vs q (Εικόνα 31) είναι προφανές ότι η κύρια διεργασία εμφανίζει ίδια συμπεριφορά με το μερικώς αποπροστατευμένο. Παρόλα αυτά η γρήγορα διεργασία διαφοροποιείται και σε σχέση με το δείγμα και σε σχέση με τη συγκέντρωσή του.

Όπως και στο μερικώς αποπροστατευμένο δείγμα, χρησιμοποιήθηκε ξανά προσεγγιστικό μοντέλο για την πρόβλεψη των δομών για την κύρια διεργασία το οποίο επίσης καταλήγει σε μεγάλες, εύκαμπτες δομές σχήματος τυχαίου σπειράματος. Πιο συγκεκριμένα, λόγω του ότι το συμπολυμερές είναι αμφίφιλο, οι δομές που σχηματίζονται φαίνεται να είναι "worm-like" μικκύλια (Εικόνα 32).

Επίσης πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για να τον έλεγχο της σταθερότητας του δείγματος έπειτα από 2.5 βδομάδες μετά την παρασκευή του.



Εικόνα 41: Συνάρτηση αυτοσυσχέτισης για συγκέντρωση δείγματος 10.13 mg/mL. Μαύρο γράφημα: Αρχικό δείγμα, Μπλε γράφημα: έπειτα από 2.5 βδομάδες



Εικόνα 42: Διάγραμμα ρυθμού απόσβεσης συναρτήσει q για συγκέντρωση δείγματος 10.13 mg/mL. Γεμάτα σύμβολα: Πρώτη μέτρηση, Άδεια σύμβολα: Μέτρηση μετά από 2.5 εβδομάδες



Εικόνα 43: Διάγραμμα κανονικοποιημένης έντασης συναρτήσει q για συγκέντρωση δείγματος 10.13 mg/mL

Από τον έλεγχο της σταθερότητας του δείγματος δεν παρατηρήθηκε ιδιαίτερη μεταβολή στη συνάρτηση αυτοσυσχέτισης ούτε και στις υπόλοιπες παραμέτρους (Εικόνες 33, 34, 35).

Τέλος, για τα δείγματα σε DMSO, πραγματοποιήθηκε σύγκριση για τις υψηλότερες και χαμηλότερες συγκεντρώσεις (Εικόνα 36).



Εικόνα 44: Σύγκριση δειγμάτων. Α συναρτήσεις αυτοσυσχέτισης: πολυμερές με προστατευμένη συστάδα κυστεΐνης (mPEO₁₁₄-b-PtBMLCys₇-b-PHis₃₈), Β συναρτήσεις αυτοσυσχέτισης: πλήρως αποπροστατευμένο πολυμερές (mPEO₁₁₄-b-PCys₇-b-PHis₃₈)

Συγκρίνοντας συναρτήσεις αυτοσυσχέτισης για δύο τις тα δείγματα παρατηρείται ÓΤΙ στη μεγαλύτερη συγκέντρωση тα δύο δείγματα παρουσιάζουν ίδια συνάρτηση αυτοσυσχέτισης ενώ στης χαμηλότερη συγκέντρωση διαφοροποιούνται. Η διαφοροποίησή τους είναι αναμενόμενη καθώς στο πλήρως αποπροστατευμένο συμπολυμερές λόγω των ελεύθερων θειολών προκαλείται αυθόρμητη δικτύωση σε σχέση με το μερικώς αποπροστατευμένο. Αντίθετα στη χαμηλότερη συγκέντρωση φαίνεται το
σύστημα να αυτοοργανώνεται διαφορετικά. Και στις δύο περιπτώσεις όμως διατηρείται η ύπαρξη μιας κύριας διεργασίας και μίας γρηγορότερης.

4.4.3 Μελέτη Αυτοοργάνωσης mPEO₁₁₄-b-PtBMLCys₇-b-PHis₃₈ σε buffer pH=7.4, 150mM NaCl + 2 σταγόνες HCl 1N

Τέλος πραγματοποιήθηκε μέτρηση για το μερικώς αποπροστατευμένο δείγμα σε buffer pH=7.4, 150mM NaCl + 2 σταγόνες HCl 1N. Για το σκέτο buffer (χωρίς την προσθήκη HCl) η μέτρηση ήταν αδύνατη λόγω ιζήματος στο δείγμα. Αντίθετα, με την προσθήκη σταγόνων HCl, η συστάδα της πολυϊστιδίνης μετατράπηκε σε υδρόφιλη λόγω όξινων συνθηκών και ήταν δυνατή η διεξαγωγή της μέτρησης.



Εικόνα 45: Συνάρτηση αυτοσυσχέτισης για συγκέντρωση δείγματος 0.06 mg/mL



Εικόνα 46: Συντελεστής διάχυσης για την κύρια διαδικασία αυτοοργάνωσης συναρτήσει q²

Δεν ήταν δυνατή η διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων λόγω πολυπλοκότητας του συστήματος όπως φαίνεται και στην Εικόνα 37 παρόλα αυτά είναι ενθαρρυντικό το γεγονός ότι ήταν δυνατή η διεξαγωγή της μέτρησης και αποδείχθηκε η pH-αποκρισιμότητας της πολυϊστιδίνης.

Συμπερασματικά, από όλες τις μετρήσεις προκύπτει ότι και στα τρία δείγματα η ύπαρξη της κύριας διεργασίας αυτοοργάνωσης είναι ίδια. Επίσης παρατηρήθηκε ότι τα συμπολυμερή δεν ήταν δυνατόν να διαλυθούν σε μοριακό επίπεδο στο DMSO κάτι ήδη γνωστό λόγω ισχυρής συσσωμάτωσης των αποπροστατευμένων ιμιδαζολικών δακτυλίων. Λόγω του γεγονότος ότι τα "worm-like" μικκύλια υπάρχουν και στα τρία δείγματα ανεξαρτήτως διαλύτη προτείνεται η περαιτέρω μελέτη αυτών των συστημάτων με DLS ώστε τελικά η διαδικασία αυτοοργάνωσης να προκαλείται λόγω υδρόφοβων-υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων και όχι λόγω συσσωμάτωσης των μονομερικών μονάδων της ιστιδίνης. Αξίζει όμως να αναφερθεί ότι η εμφάνιση τόσο ισχυρών αλληλεπιδράσεων ακόμα και σε τόσο χαμηλές συγκεντρώσεις (~ 0.1 mg/mL) είναι πολύ ενθαρρυντική για συστήματα μεταφοράς φαρμάκων αφού παρουσιάζουν σταθερότητα σε χαμηλές συγκεντρώσεις πράγμα μου προσομοιάζει συνθήκες ανθρώπινου οργανισμού.

146

5.5 Χαρακτηρισμός S-tert-butyl-mercapto-L-Cysteine Methyl Ester

Πρώτη ένδειξη για την επιτυχία της αντίδρασης προστασίας του καρβοξυάκρου της S-tert-butyl-mercapto-L-Cysteine αποτέλεσε το φάσμα FT-IR που μετρήθηκε κατά τη διεξαγωγή της αντίδρασης. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 17, ενδιάμεσο προϊόν πριν τον τελικό μεθυλ-εστέρα είναι το υδροχλωρικό άλας του μεθυλ-εστέρα του αμινοξέος (S-tert-butyl-mercapto-L-Cysteine Methyl Ester Hydrochloride). Μετά το πέρας 30 λεπτών από την προσθήκη του SOCl₂, λήφθηκε φάσμα FT-IR για να ελεγχθεί η πορεία της αντίδρασης.

Πιο συγκεκριμένα, μετά από 30 λεπτά από την προσθήκη του μέσου χλωρίωσης στο διάλυμα του αμινοξέος μετρήθηκε φάσμα FT-IR (Εικόνα 39) ώστε να διαπιστωθεί η πραγματοποίηση της αντίδρασης.



Εικόνα 47: Φάσματα FT-IR κατά την πορεία προστασίας του καρβοξυ-τελικού άκρου της κυστεΐνης. Α: πρόδρομο αμινοξύ, Β: 30 λεπτά μετά την προσθήκη του μέσου χλωρίωσης SOCI₂

Πίνακας 9: Αντιστοίχιση Χαρακτηριστικών Δονήσεων και Κυματαριθμών για το Πρόδρομο αμινοξύ H-(tBM)Cys-OH (Φάσμα A) και S-tert-butyl-mercapto-L-Cysteine Methyl Ester Hydrochloride (Φάσμα B)

Φάσμα Α	Κυματαριθμοί (cm ⁻¹)	Χαρακτηριστικές Δονήσεις
Περιοχή a	2918.5 2962.8	Συμμετρική και Αντισυμμετρική έκταση δεσμού CH ₂ -S και –CH ₃ της S-tert-butyl ομάδας
Περιοχή b	1672.8	Δόνηση δεσμού C=O

	1602.5	Κάμψη Δεσμού –ΝΗ ₂
	1537.3	
Φάσμα Β		
Περιοχή a	2896.7 2962.7	Συμμετρική και Αντισυμμετρική έκταση δεσμού CH ₂ -S και –CH ₃ της S-tert-butyl ομάδας
Περιοχή c	1738.6	Δόνηση υδροχλωρικού άλατος ελεύθερων αμινοξέων

Όπως φαίνεται και από την Εικόνα 39, το φάσμα FT-IR για το δείγμα κατά τη διεξαγωγή της αντίδρασης άλλαξε άρδην με την προσθήκη του SOCl₂. Πιο συγκεκριμένα, εξαφανίστηκαν πλήρως οι χαρακτηριστικές δονήσεις για το ελεύθερο αμινοξύ (Περιοχή b, Φάσμα A) που αντιστοιχούν στους 1672.8 cm⁻¹ για τη δόνηση του δεσμού C=O και στους 1602.5 cm⁻¹ και 1537.3 cm⁻¹ για την κάμψη του δεσμού –NH₂ και εμφανίστηκε η χαρακτηριστική δόνηση για το υδροχλωρικό άλας των ελεύθερων αμινοξέων στους 1738.6 cm⁻¹, πρώτη ισχυρή ένδειξη για την πραγματοποίηση της αντίδρασης.

Επίσης, λήφθηκε φάσμα ¹HNMR (Εικόνα 40 και Εικόνα 41) πριν την απομόνωση του τελικού προϊόντος (V) όπου επίσης διαπιστώθηκε η επιτυχία του πρώτου σταδίου της προστασίας του καρβόξυ-άκρου της κυστεΐνης.



Eικόνα 48: Φάσμα ¹HNMR σε D₂O για το μείγμα της αντίδρασης που περιέχει S-tert-butylmercapto-L-Cysteine Methyl Ester Hydrochloride (V) και S-tert-butyl-mercapto-L-Cysteine Hydrochloride (VI).

Στο φάσμα ¹HNMR ανιχνεύτηκαν όλες οι χαρακτηριστικές κορυφές που αναμένονταν από τη βιβλιογραφία⁷¹ τόσο για το ενδιάμεσο προϊόν, όσο και για το αμινοξύ που δεν αντέδρασε. Πιο αναλυτικά, για το ενδιάμεσο υδροχλωρικό άλας του μεθυλ-εστέρα (V), χαρακτηριστική είναι η κορυφή του υδρογόνου a (-S-CH₂-CH-) του C_α στα 4.47-4.49 ppm, των υδρογόνων c (CH₃-O-C=O-) του μεθυλ-εστέρα στα 3.82 ppm, των υδρογόνων b'' (-S-CH₂-CH-) του C_β στα 3.19-3.33 ppm και τέλος στα 1.30-1.31 ppm τα υδρογόνα d'' (CH₃-S-S-) της προστατευτικής ομάδας της θειόλης. Αντίστοιχα, για το υδροχλωρικό άλας του πρόδρομου αμινοξέος (VI), τα υδρογόνα b' (-S-CH₂-CH-) και d' συμπίπτουν με τα υδρογόνα του υδροχλωρικού άλατος του μεθυλ-εστέρα (V) στα 3.19-3.33 και 1.30-1.31 ppm αντίστοιχα. Παρατηρείται (Εικόνα 41) εμφανώς η μετατόπιση του υδρογόνου A (-S-CH₂-CH-) από τα 3.93-3.93 ppm στο πρόδρομο αμινοξύ, στα 4.32-4.33 ppm στο μόριο (VI) (υδρογόνο A) και των υδρογόνων b (-S-S-CH₂-) από τα 3.03-3.25 ppm στο πρόδρομο αμινοξύ, στα 3.19-3.33 ppm στο μόριο (VI) (υδρογόνα b). Η παραπάνω μετατόπιση των κορυφών των πρωτονίων είναι αναμενόμενη καθώς λόγω του σχηματισμού του υδροχλωρικού άλατος, το χημικό περιβάλλον των υδρογόνων των C_α και C_β μεταβάλλεται γεγονός που αντικατοπτρίζεται στη μετατόπιση των κορυφών. Αξίζει να τονιστεί ότι οι τιμές για τα εμβαδά των κορυφών διαφέρουν από τις αναμενόμενες τόσο για το πρόδρομο αμινοξύ τόσο και για το μείγμα της αντίδρασης λόγω των διαφορετικών χρόνων χαλάρωσης που εμφανίζουν τα αμινοξέα στη μέτρηση.



Εικόνα 49: Φάσματα ¹ΗΝΜR σε D₂O. Α γράφημα: Μείγμα αντίδρασης πριν την απομόνωση του τελικού προϊόντος (V), Β γράφημα: πρόδρομο αμινοξύ H-(StBu)Cys-OH (I).

Αφού επιβεβαιώθηκε η σύνθεση του ενδιάμεσου προϊόντος (V), το τελικό προϊόν (S-tert-butyl-mercapto-L-Cysteine Methyl Ester (VII)) απομονώθηκε μέσω μίας ακολουθίας εκχυλίσεων. Ακολούθησε η λήψη φάσματος ¹HNMR

σύμφωνα με το οποίο ανιχνεύτηκαν όλες οι χαρακτηριστικές κορυφές (Εικόνα 42).



Εικόνα 50: Φάσματα ¹HNMR σε CDCI₃ του τελικού προϊόντος S-tert-butyl-mercapto-L-Cysteine Methyl Ester (VII)

Όπως φαίνεται και από την Εικόνα 42 ανιχνεύτηκαν όλες οι χαρακτηριστικές κορυφές για το τελικό προϊόν (VII). Πιο αναλυτικά, η κορυφή στα 3.84-3.86 ppm αντιστοιχεί στο υδρογόνο **a** (-S-CH₂-CH-) του C_α, στα 3.78 ppm εμφανίζεται η κορυφή για τα υδρογόνα **c** (CH₃-O-C=O-) του μεθυλ-εστέρα, οι κορυφές στα 2.93-3.16 ppm αντιστοιχούν στα υδρογόνα **b** (-S-CH₂-CH-)του C_β και τέλος στα 1.37 ppm τα υδρογόνα **d** (CH₃-S-S-) της προστατευτικής ομάδας της θειόλης. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι τα εμβαδά των αντίστοιχων κορυφών συμπίπτουν ακριβώς με τις αναλογίες των υδρογόνων στο μόριο.

Όμοια αποτελέσματα λήφθηκαν και για το προϊόν της σύνθεσης S-tert-butylmercapto-L-Cysteine Methyl Ester με χρήση TMSCI ως μέσο χλωρίωσης (Σχήμα 17). Αξίζει να τονιστεί ότι λόγω του ότι η σύνθεση με χρήση TMSCI προηγήθηκε της σύνθεσης με χρήση SOCl₂, για το στάδιο πριν την απομόνωση του τελικού προϊόντος μετρήθηκε και φάσμα COSY 2D στο οποίο διαπιστώνεται η αντιστοιχία των κορυφών των υδρογόνων του C_β των αμινοξέων στο τελικό προϊόν και στο αμινοξύ που τελικά δεν αντέδρασε.

5.6 Χαρακτηρισμός Ομοπολυμερούς Πολυϊστιδίνης (6K) με χρήση Stert-butyl-mercapto-L-Cysteine ως απαρχητή

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ο ROP πολυμερισμός για τη σύνθεση ομοπολυμερούς πολυϊστιδίνης με τελικό θεωρητικό μοριακό βάρος 6K και χρήση του S-tert-butyl-mercapto-L-Cysteine Methyl Ester ως απαρχητή. Μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού πραγματοποιήθηκε σε πρώτο στάδιο η εκλεκτική αποπροστασία των μονομερικών μονάδων της ιστιδίνης και τέλος της ακραίας ομάδας της κυστεΐνης. Κάθε στάδιο ελέγχθηκε με φασματοσκοπία FT-IR και ¹HNMR ώστε να επιβεβαιωθεί η επιτυχία του. Τέλος, το τελικό, πλήρως αποπροστατευμένο ομοπολυμερές χαρακτηρίστηκε και με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών GPC. Από τα χρωματογραφήματα επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη της ελεύθερης θειόλης στο άκρο κάθε πολυμερικής αλυσίδας καθώς εμφανίστηκε διμερισμός επηρεαζόμενος από την ύπαρξη GSH στο δείγμα.



Εικόνα 51: Φάσμα ¹HNMR σε D₂O/DCI 2% του ομοπολυμερούς Cys-PHis

Με την ολοκλήρωση της αποπροστασίας των δομικών μονάδων της πολυϊστιδίνης πραγματοποιήθηκε λήψη φάσματος ¹HNMR σε διαλύτη D₂O/DCI (2%) ώστε το ομοπολυμερές να βρίσκεται σε όξινες συνθήκες, πρωτονιωμένο, υδρόφιλο άρα ευδιάλυτο στο D₂O και ανιχνεύσιμο στο ¹HNMR.

Στο φάσμα ¹HNMR (Εικόνα 43) εντοπίστηκαν όλες οι αναμενόμενες χαρακτηριστικές κορυφές για τα υδρογόνα του ομοπολυμερούς. Πιο αναλυτικά, οι επαναλαμβανόμενες δομικές μονάδες της πολυϊστιδίνης ανιχνεύτηκαν από τις χαρακτηριστικές κορυφές στα 3.08-3.10 ppm για τα υδρογόνα b (Im-C*H*₂-), στα 8.63-8.64 ppm για το υδρογόνο c του ιμιδαζολικού δακτυλίου (-NH-C*H*=N-) και τέλος στα 7.28 ppm για το υδρογόνο d του ιμιδαζολικού δακτυλίου (-NH-C*H*=C-). Επίσης εντοπίστηκαν και οι χαρακτηριστικές κορυφές για τον απαρχητή. Πιο συγκεκριμένα στα 4.31-4.33 ppm για το υδρογόνο e (-S-CH₂-C*H*-), στα 3.28-3.35 ppm για τα υδρογόνα f (-

S-CH₂-CH-) και στα 1.26-1.27 ppm για τα υδρογόνα g (CH₃-S-S-) της προστατευτικής ομάδας της θειόλης. Είναι εμφανές ότι από το φάσμα απουσιάζουν OI κορυφές για το υδρογόνο а (Im-CH₂-C**H**-) тηс επαναλαμβανόμενης δομικής μονάδας της πολυϊστιδίνης και τα υδρογόνα c' (CH3-O-C=O-) του μεθυλεστέρα της κυστεΐνης. Ο λόγος για τον οποίο τα τελευταία δεν ανιχνεύθηκαν είναι ίσως επειδή κατά την αποπροστασία του ομοπολυμερούς χρησιμοποιήθηκαν ισχυρά όξινες και βασικές συνθήκες και πιθανόν η προστατευτική αυτή ομάδα επηρεάστηκε με αποτέλεσμα την απομάκρυνσή της από το μόριο⁶⁶. Για την ανίχνευση του υδρογόνου a μετρήθηκε φάσμα 2 διαστάσεων (COSY 2D) (Εικόνα 44) σύμφωνα με το οποίο η κορυφή του εμφανίζεται στα ίδια ppm όπως αυτή του D_2O .



f1 (ppm)

Εικόνα 52: Φάσμα ¹HNMR COSY 2D σε D₂O/DCI 2% του ομοπολυμερούς Cys-PHis

Έτσι, επιβεβαιώθηκε χωρίς αμφιβολία και η ύπαρξη του υδρογόνου a (Im-CH₂-C*H*-) στο φάσμα. Επίσης, αξιοποιώντας το ίδιο φάσμα επιβεβαιώνονται και οι κορυφές e (-S-CH₂-C*H*-) και f (-S-C*H*₂-CH-) ότι ανήκουν στον απαρχητή. Ο λόγος για τον οποίο είναι ανιχνεύσιμα τα συγκεκριμένα πρωτόνια στο COSY 2D φάσμα είναι γιατί τα υδρογόνα των α και β ανθράκων σε όλα τα αμινοξέα συνδέονται μεταξύ τους με J3 coupling.

Το τελικό στάδιο της συνθετικής πορείας αποτέλεσε όπως έχει ήδη αναφερθεί η αποπροστασία του απαρχητή του ομοπολυμερούς με σκοπό την δημιουργία ελεύθερης θειόλης στο τελικό ομοπολυμερές. Στην Εικόνα 45 φαίνεται το φάσμα ¹HNMR του τελικού, πλήρως αποπροστατευμένου, ομοπολυμερούς Cys-PHis.



Εικόνα 53: Φάσμα ¹HNMR σε D₂O/DCI 1% του πλήρως αποπροστατευμένου ομοπολυμερούς Cys-PHis

Όπως είναι προφανές, στο παραπάνω φάσμα εντοπίστηκαν όλες οι αναμενόμενες χαρακτηριστικές κορυφές για το τελικό πλήρως αποπροστατευμένο ομοπολυμερές. Πιο συγκεκριμένα, οι επαναλαμβανόμενες δομικές μονάδες της πολυϊστιδίνης ταυτοποιήθηκαν από τις κορυφές στα 3.09-3.20 ppm για τα υδρογόνα b (Im-C*H*₂-), στα 8.65 ppm για το υδρογόνο c

του ιμιδαζολικού δακτυλίου (-NH-CH=N-) και τέλος στα 7.29 ppm για το υδρογόνο d του ιμιδαζολικού δακτυλίου (-NH-C*H*=C-). Επίσης ταυτοποιήθηκαν και οι αναμενόμενες κορυφές του απαρχητή στα 4.32-4.35 ppm yia to uδρογόνο e (-S-CH₂-CH-) και στα 3.33-3.39 ppm yia τα υδρογόνα f (HS-CH2-CH-). Παρατηρήθηκε ξανά το ίδιο φαινόμενο για το υδρογόνο a (Im-CH₂-CH-) της PHis το οποίο ταυτοποιήθηκε ξανά με μέτρηση 2 διαστάσεων COSY 2D (Εικόνα 46). Επίσης, αξίζει να αναφερθεί ότι εντοπίζεται στα 1.28 ppm κορυφή όμοια με αυτή για τα υδρογόνα g (CH₃-S-S-) της προστατευτικής ομάδας της θειόλης. Επειδή όμως το εμβαδό της έχει μειωθεί αισθητά (από 0.38 σε 0.05 ppm) θεωρείται ότι η αποπροστασία πραγματοποιήθηκε επιτυχώς. Άλλωστε, όπως θα συζητηθεί και παρακάτω, λόγω διμερισμού, αποδεικνύεται επιπλέον η παρουσία ελεύθερης θειόλης στο τελικό άκρο του μακρομορίου.



Εικόνα 54: Φάσμα ¹HNMR COSY 2D σε D₂O/DCI 1% του πλήρως αποπροστατευμένου ομοπολυμερούς Cys-PHis

Τέλος πραγματοποιήθηκε μέτρηση με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (GPC) ώστε να ολοκληρωθεί ο χαρακτηρισμός του ομοπολυμερούς. Λόγω

μικρής ποσότητας του τελικού πολυμερούς, στο GPC πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις από το διάλυμα που μετρήθηκε και στο NMR.



Εικόνα 55: Χρωματογράφημα αποκλεισμού μεγεθών (GPC) σε διαφορετικό χρόνο αντίδρασης του ομοπολυμερούς με αναγωγικό μέσο DTT



Εικόνα 56: Δομές Ομοπολυμερούς στα δείγματα GPC. Α: Μερικώς αποπροστατευμένο ομοπολυμερές (ροζ χρωματογράφημα), Β: Διμερές Ομοπολυμερούς και πλήρως αποπροστατευμένο ομοπολυμερές (μαύρο, κόκκινο, μπλε, πράσινο χρωματογράφημα)

Από τα παραπάνω χρωματογραφήματα επιβεβαιώθηκε περαιτέρω η επιτυχημένη αποπροστασία του ομοπολυμερούς καθώς στα γραφήματα για το πλήρως αποπροστατευμένο πολυμερές είναι εμφανής η ύπαρξη διμερούς το οποίο οφείλεται στη δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των αλυσίδων λόγω των ελεύθερων θειολών. Με την προσθήκη αναγωγικού μέσου DTT και την πάροδο ορισμένου χρονικού διαστήματος παρατηρείται μείωση του διμερούς. Αντιθέτως, στο μερικώς αποπροστατευμένο πολυμερές (ροζ χρωματογράφημα), όπως αναμένεται, δεν παρατηρείται ύπαρξη διμερούς αφού η κυστεΐνη διατηρεί τη θειόλη προστατευμένη.

	Mn (g/mol)	Polydispersity
Πλήρως Αποπροστατευμένο Ομοπολυμερές	5429 &1532	1,63
Πλήρως Αποπροστατευμένο Ομοπολυμερές + DTT 5min	1901	1,46
Πλήρως Αποπροστατευμένο Ομοπολυμερές + DTT 1h	1995	1,48
Πλήρως Αποπροστατευμένο Ομοπολυμερές + DTT 24h	1785	1,36
Μόνο οι μονομερικές μονάδες της Ιστιδίνης αποπροστατευμένες	1565	1,13

Πίνακας 10: Μοριακά Χαρακτηριστικά Ομοπολυμερούς Cys-PHis 6K σύμφωνα με το GPC

5.7 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν όπως έχει ήδη αναφερθεί η σύνθεση διπλά αποκρινόμενων υβριδικών τρισυσταδικών συμπολυμερών τύπου mPEO₁₁₄-b-PCys_m-b-PHis_n με δύο διαφορετικά ποσοστά, 15% και 25%, ως προς την περιεκτικότητα της κυστεΐνης στο πολυπεπτιδικό τμήμα.

Αρχικά, το πρώτο στάδιο της πειραματικής πορείας αποτέλεσε η σύνθεση των κατάλληλα προστατευμένων Ν-καρβόξυ ανυδριτών (μονομερών) ώστε στη συνέχεια να ακολουθήσει ο ROP πολυμερισμός τους. Οι ανυδρίτες χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπία FT-IR και φασματοσκοπία ¹HNMR όπου επιβεβαιώθηκε η επιτυχημένη σύνθεσή τους. Στη συνέχεια ακολούθησε ο διαδοχικός ROP πολυμερισμός για τα δύο μονομερή χρησιμοποιώντας ως μακροαπαρχητή το mPEO₁₁₄-NH₂ με χρήση τεχνικών υψηλού κενού και ειδικά κατασκευασμένης συσκευής πολυμερισμού με υαλουργία.

Τα πλήρως προστατευμένα συμπολυμερή mPEO₁₁₄-b-PCys_m-b-PHis_n υπέστησαν επιτυχώς εκλεκτική αποπροστασία των δομικών μονάδων κάθε συστάδας και δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των ελεύθερων θειολών. Τα μερικώς και πλήρως αποπροστατευμένα συμπολυμερή χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπία FT-IR και ¹HNMR όπου ταυτοποιήθηκε η δομή τους. Πιο συγκεκριμένα, στη Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (¹HNMR) πραγματοποιήθηκαν 1D μετρήσεις με διαφορετικά συστήματα διαλυτών αλλά και οι αντίστοιχες 2D ώστε να βρεθεί το καλύτερο σύστημα διαλυτών για όλες τις συστάδες. Κατάλληλο σύστημα κρίθηκε τελικά το μείγμα διαλυτών D₂O/DCI 1%.

Τέλος ακολούθησε προσπάθεια μελέτης της αυτοοργάνωσής των συμπολυμερών mPEO₁₁₄-b-PtBMLCys₇-b-PHis₃₈ και mPEO₁₁₄-b-PCys₇-b-PHis₃₈ σε DMSO, Tris buffer pH=7.4 10 mM, 150 mM NaCl και Tris buffer pH=7.4 10 mM, 150 mM NaCl + 2 σταγόνες HCl 1N. Αξίζει να αναφερθεί ότι τα δικτυωμένα συμπολυμερή ήταν αδύνατον να μελετηθούν στο DLS λόγω του ότι καθίζαναν μετά την παραμονή τους στο buffer. Για τη δημιουργία ιζήματος πιθανόν οφείλεται το χαμηλό μοριακό βάρος της υδρόφιλης συστάδας (PEO) σε σχέση με το συνολικό μοριακό βάρος των

159

αλκαλικό περιβάλλον. Η μελέτη αυτοοργάνωσης για τα συμπολυμερή mPEO₁₁₄-b-PtBMLCys₇-b-PHis₃₈ και mPEO₁₁₄-b-PCys₇-b-PHis₃₈ σε DMSO κατέληξε προσεγγιστικά με χρήση ενός πρώτου μοντέλου και μεθόδου CONTIN στο συμπέρασμα ύπαρξης μεγάλων, εύκαμπτων "worm-like" μικκυλιακών δομών με: L ~ 4μm, I_k ~ 100nm, m=2, d=25nm, R_G ~ 294 nm και R_h ~ 220 nm. Τα δύο συστήματα παρουσίασαν όμοια συμπεριφορά για την υψηλότερη συγκέντρωσή τους ενώ αντίθετα στη χαμηλότερη οι χρόνοι χαλάρωσης διαφοροποιήθηκαν ελαφρά. Για το συμπολυμερές mPEO₁₁₄-b-PtBMLCys₇-b-PHis₃₈ ήταν αδύνατη η μέτρηση σε Tris buffer pH=7.4 10 mM λόγω καταβύθισης. Παρόλα αυτά, με την προσθήκη 2 σταγόνων HCI 1N στο ίδιο κατέστη δυνατή. Η διεξαγωγή ασφαλών δείγμα η μέτρηση συμπερασμάτων δεν ήταν εφικτή λόγω πολυπλοκότητας του συστήματος όμως με αυτό τον τρόπο αποδείχθηκε η pH-αποκρισιμότητα του δείγματος.

Επίσης, στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, σχεδιάστηκε και συντέθηκε ομοπολυμερές Cys-PHis 6K χρησιμοποιώντας ως απαρχητή προστατευμένη κυστεΐνη. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η προστασία του καρβοξυ-τελικού άκρου της S-tert-butyl-mercapto-L-Cysteine με μία ομάδα μεθυλίου και στη συνέχεια ακολούθησε ο πολυμερισμός του N^{im}-Trt-His NCA εκκινούμενος από την αμινομάδα της κυστεΐνης. Το ομοπολυμερές ταυτοποιήθηκε τόσο στη μερικώς όσο και στην πλήρως αποπροστατευμένη μορφή του με φασματοσκοπία FT-IR, ¹HNMR και χρωματογραφία GPC. Από το GPC, αποδείχθηκε η ύπαρξη ελεύθερης θειόλης στο σύστημα αφού εμφανίστηκε ισχυρός διμερισμός, λόγω δημιουργίας δισουλφιδικών δεσμών, εξαρτώμενος από την έκθεση του δείγματος στον αναγωγικό παράγοντα DTT.

Σαν μελλοντικοί στόχοι προτείνονται η περαιτέρω μελέτη αυτοοργάνωσης των συμπολυμερών σε DMSO ώστε να εντοπιστεί η κατάλληλη συγκέντρωση που θα οδηγήσει σε διάλυσή τους σε μοριακό επίπεδο, η μελέτη τους με τεχνικές μικροσκοπίας ώστε να εξακριβωθεί η δομή τους, η σύνθεση των ίδιων συμπολυμερών με χρήση μακροαπαρχητή mPEO-NH₂ υψηλότερου μοριακού βάρους ώστε να αποφευχθεί η πλήρης καταβύθισή τους στα υδατικά διαλύματα και η περαιτέρω μελέτη των ιδιοτήτων αποκρισιμότητας των παρόντων συμπολυμερών.

160

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

AMM	Μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς
AROP	Ανιοντικός πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου
bipy	2,2΄-Διπυριδίνη
BOC	Βενζυλοξυκαρβονυλομάδα
BOC-Hist(Trt)-OH	N_{α} -BOC- N^{im} -Trityl-L-histidine
CaH ₂	Υδρίδιο του ασβεστίου
СМС	Κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση
COD	1,5-Κυκλοοκταδιένιο
COSY	Correlation Spectroscopy
CROP	Κατιοντικός πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου
DCC	Ν,Ν΄-δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμίδιο
CDCl ₃	Δευτεριωμένο χλωροφόρμιο
DIC	Ν,Ν΄-διισοπροπυλοκαρβοδιϊμίδιο
DLS	Δυναμική σκέδαση φωτός
DMA	Διμεθυλαμίνη
DMF	Διμεθυλοφορμαμίδιο
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
DTT	D-L, dithiothreitol
Et ₃ N	Τριαιθυλαμίνη

EtOAc	Οξικός αιθυλεστέρας
FDA	Food and Drug Administration
GSH	Γλουταθειόνη
H ₂ SO ₄	Θειϊκό οξύ
H ₂ O ₂	Υπεροξείδιο του Υδρογόνου
HCI	Υδροχλώριο
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
HVL	Γραμμή υψηλού κενού
HVT	Τεχνικές υψηλού κενού
1	Κατανομή μοριακών βαρών
IR	Υπέρυθρη ακτινοβολία
LCST	Χαμηλότερη κρίσιμη θερμοκρασία διαλύματος
m-PEG	μονομεθόξυ- PEG
MALDI-TOF MS	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry
MWCO	Molecular Weight Cut off
MWD	Molecular Weight Distribution
NAM	Κανονικός μηχανισμός αμινών
<i>n</i> -BuLi	Κανονικό βουτυλολίθιο
NCA	Ν-Καρβοξυ ανυδρίτης
NMR	Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός

NOE	Nuclear Overhauser effect
P ₂ O ₅	Πεντοξείδιο του φωσφόρου
PBr ₃	Τριβρωμίδιο του Φωσφόρου
PDAAEMA	πολυ (Ν, Ν-διακυλαμινο αιθυλομεθακρυλικά άλατα)
PEO (ή PEG)	Πολυ(αιθυλενοξείδιο) (ή Πολυ(αιθυλενογλυκόλη))
PEO-PHist	πολυ(αιθυλενοξείδιο)-πολυ(L-ιστιδίνη)
PEO-PPO-PEO	πολυ(αιθυλενοξειδίο)-πολυ(προπυλένιο)-
	πολυ(αιθυλενοξείδιο)
PHis	Poly(L-Histidine)
pl	Ισοηλεκτρικό σημείο
PL	πολυ(λυσίνη)
PLLA-PEG-PLLA	πολυ(L-γαλακτικό οξύ) - πολυ(αιθυλενογλυκόλη) - πολυ(L- γαλακτικό οξύ)
PNiPAAm	πολυ(Ν-ισοπροπυλακρυλαμίδιο)
PNVC	πολυ(Ν-βινυλοκαπρολακτάμη)
PSS	σουλφονωμένο πολυστυρόλιο
PT	πολυθειοφαίνιο
ROMP	Πολυμερισμός μετάθεσης με διάνοιξη δακτυλίου
ROP	Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου
RROP	Ριζικός πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου
Sar-NCA	Ν-καρβοξυ ανυδρίτης της σαρκοσίνης
SEC (ή GPC)	Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών

SOCI2	Θειονυλοχλωρίδιο
tBMLCys NCA	tert-butyl-mercapto-L- cysteine N-Carboxy Anhydride
TMSCI	Τριμεθυλοχλωροσιλάνιο
TFA	Τριφθοροοξικό οξύ
THF	Τετραϋδροφουράνιο
UCST	Ανώτερη κρίσιμη θερμοκρασία διαλύματος
UV-Vis	Υπεριώδες-ορατό
P(MAA-g-EG)	πολυ(μεθακρυλικό οξύ-g-αιθυλενογλυκόλη)
PAAc	πολυ(ακρυλικό οξύ)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



Εικόνα 57: Φάσματα FT-IR για το τρισυσταδικό συμπολυμερές mPEO₁₁₄-b-PCys₁₁-PHis₃₅. Φάσμα Α: 5 ημέρες μετά την έναρξη του πολυμερισμού της πολυκυστεΐνης, Φάσμα Β: Μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού της πολυϊστιδίνης, Φάσμα C: Πλήρως αποπροστατευμένο συμπολυμερές mPEO₁₁₄-b-PCys₁₁-PHis₃₅.



Εικόνα 58: Φάσμα ¹ΗΝΜR για το μερικώς αποπροστατευμένο συμπολυμερές mPEO₁₁₄-b-PtBMLCys₁₁-b-PHis₃₅. Μέτρηση με χρήση μείγματος διαλυτών TFA-d/DMSO-d 30%.

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

3 https://www.mun.ca/biology/scarr/iGen3_06-03.html

4 https://content.byui.edu/file/a236934c-3c60-4fe9-90aa-

d343b3e3a640/1/module3/readings/proteins.html

5 https://www.visionlearning.com/en/library/Biology/2/Biological-Proteins/243

6 https://content.byui.edu/file/a236934c-3c60-4fe9-90aa-

7 M. Bodansky, A. Bodansky, The practice of peptide synthesis, 2nd ed. Springer-Verlag: New York, 1993.

8 M. Goodman, J. Hutchison, The mechanisms of polymerization of Nunsubstituted N-carboxyanhydrides, J. Am. Chem. Soc., 1966, vol. 88, pp. 3627-3630.

9 T. J. Deming, Synthesis and self-assembly of well-defined block copolypeptides via controlled NCA polymerization, Adv. Polym. Sci., 2013, vol. 262, 1-38.

10 T. J. Deming, Peptide-Based Materials, 1st ed. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 2012.

11 N. Hadjichristidis, H. latrou, 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, vol. 109, pp. 5528– 5578.

12 O. Nuyken, S. D. Pask, Ring-opening polymerization–An introductory review, Polymers 2013, 5, 361-403.

13 P. Dubois, O. Coulembier, J.-M. Raquez, Handbook of Ring-Opening Polymerization, 1st ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2009.

14 O. Nuyken, S. D. Pask, Ring-Opening Polymerization — An Introductory Review, Polymers, 2013, vol. 5, pp. 361-403.

¹ J. M. Berg, J. L. Tymoczko, I. Stryer, Βιοχημεία Τόμος 1, 2010, pp. 45-73

² https://www.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/amino-acidstructures

d343b3e3a640/1/module3/readings/proteins.html

15 M. Goodman, J. Hutchison, The mechanisms of polymerization of N-unsubstituted N-carboxyanhydrides, J. Am. Chem. Soc. 1966, 88, 3627-3630.
16 T. J. Deming, Living Polymerization of a-Amino Acid-N-Carboxyanhydrides, J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem., 2000, vol. 38, pp. 3011–3018

17 H. R.Kricheldorf, Polypeptides and 100 Years of Chemistry of a-Amino Acid N-Carboxyanhydrides, Angew. Chem. Int. Ed., 2006, vol. 45, pp. 5752 – 5784.

18 T. Aliferis, H. latrou, N. Hadjichristidis, Living Polypeptides,

Biomacromolecules, 2004, vol. 5, pp. 1653-1656.

19 D. L. Pickel, N. Politakos, A. Avgeropoulos, J. M. Messman, A Mechanistic Study of α-(Amino acid)-N-carboxyanhydride Polymerization: Comparing Initiation and Termination Events in High-Vacuum and Traditional Polymerization Techniques, Macromolecules, 2009, vol. 42, pp. 7781–7788.
20 Δ. Μαυρογιώργης, Μακρομοριακή αρχιτεκτονική πολυπεπτιδίων, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2015, pp. 1-194.

21 H. Leuchs, Ueber die Glycin-Carbonsäure, Ber. Dtsch. Chem. Ges., 1906, vol. 39, pp. 857-861.

22 H. Leuchs, W. Geiger, Über die Anhydride von α -Amino-N-Carbonsäuren und die von α -Aminosäuren, Ber. Dtsch. Chem. Ges., 1908, vol. 41, pp. 1721-1726.

23 M. Bergmann, L. Zervas, W. Ross, On proteolytic enzymes VII. The synthesis of peptides of L-lysine and their behavior with papain, J. Biol. Chem., 1935, vol. 111, pp. 245-260.

24 B. Ishai, D. Katchalski, Synthesis of N-Carboxy- α -amino Acid Anhydrides from N-Carbalkoxy- α -amino Acids by the Use of Phosphorus Tribromide, J. Am. Chem. Soc., 1952, vol. 74, pp. 3688-3689.

25 M. Green, M. A. Stahmann, Synthesis and enzymatic hydrolysis of glutamic acid polypeptides, J. Biol. Chem., 1952, vol. 197, pp 771-782.
26 F. Fuchs, ÜberN-Carbonsäure-Anhydride, Chem. Ber., 1922, vol. 55, pp. 2943.

27 D. Coleman, A. C. Farthing, Synthetic Polypeptides. Part II. Properties of Oxazolid-2:5-diones and an Initial Study of the Preparation of Polypeptides There-From, J. Chem. Soc., 1950, pp. 3218-3222.

28 C. J. Brown, D. Coleman, A. C. Farhting, Further Studies in Synthetic Polypeptides, Nature, 1949, vol. 163, pp. 834-835.

29 A. L. Levy, Anhydro-N-Carboxy-dl-beta-Phenylalanine, Nature, 1950, vol. 165, pp. 152-153.

30 A. C. Farhting, Synthetic polypeptides. Part I. Synthesis of Oxazolid-2:5diones and a New Reaction of Glycine, J. Chem. Soc., 1950, pp. 3213-3217.
31 L. Cotarca, H. Eckert, Phosgenations – A Handbook, Wiley, 2003, pp. 125-128.

32 L. Cotarca, Conversion of bis (trichloromethyl) carbonate to phosgene and reactivity of triphosgene, diphosgene, and phosgene with methanol, Synthesis, 1996, pp. 553-560.

33 C. H. Alarcon, S. Pennadam, C. Alexander, Stimuli responsive polymers for biomedical applications, Chem. Soc. Rev., 2005, vol. 34, pp. 276–285. 34 S. Ganta, H. Devalapally, A. Shahiwala, M. Amiji, A review of stimuliresponsive nanocarriers for drug and gene delivery, Journal of Controlled Release, 2008, vol. 126, pp. 187–204.

35 B. Jeong, A. Gutowska, Lessons from nature: stimuli-responsive polymers and their biomedical applications, Trends in Biotechnology, 2002, vol. 20, pp. 305-311.

36 A. S. Hoffman, Stimuli-responsive polymers: Biomedical applications and challenges for clinical translation, Advanced Drug Delivery Reviews, 2013, vol. 65, pp. 10-16.

37 N. Rapoport, Physical stimuli-responsive polymeric micelles for anti-cancer drug delivery, Prog. Polym. Sci., 2007, vol. 32, pp. 962–990.

38 D. Schmaljohann, Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery, Advanced Drug Delivery Reviews, 2006, vol. 58, pp. 1655–1670.

39 M. C. Stuart, W. Huck, J. Genzer, M. Müller, C. Ober, M. Stamm, G Sukhorukov, I. Szleifer, V. Tsukruk, M. Urban, F. Winnik, S. Zauscher, I. Iuzinov, S. Minko, Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials, Nature Materials, 2010, vol. 9, pp. 101-113. 40 X. He, J. Fan, K. L. Wooley, Stimuli-Triggered Sol–Gel Transitions of Polypeptides from a-Amino Acid N-Carboxyanhydride (NCA) Derived Polymerizations, Chem. Asian J., 2016, vol. 11, pp. 437 – 447.

41 S. Mura, J. Nicolas, P. Couvreur, Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery, Nature Materials, 2013, vol. 12, pp. 991-1003.

42 E. Cabane, X. Zhang, K. Langowska, C. G. Palivan, W. Meier, Stimuli-Responsive Polymers and Their Applications in Nanomedicine, Biointerphases, 2012, pp. 1-27.

43 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.

44 B. Gyarmati, Á. Némethy, A. Szilágyi, Reversible disulfide formation in polymer networks: A versatile functional group from synthesis to applications, Eur. Polym. J. 2013, 49, 1268-1286.

45 R. L. McCarley, Redox-responsive delivery systems, Annu. Rev. Anal. Chem. 2012, 5, 391-411.

46 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.

47 P. Bilalis, S. Varlas, A. Kiafa, A. Velentzas, D. Stravopodis, H. latrou, Preparation of hybrid triple-stimuli responsive nanogels based on poly(Lhistidine), J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem. 2016, 54, 1278-1288.

48 M. Li, Z. Tang, H. Sun, J. Ding, W. Song, X. Chen, pH and reduction dualresponsive nanogel cross-linked by quaternization reaction for enhanced cellular internalization and intracellular drug delivery, Polym. Chem. 2013, 4, 1199-1207.

49 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.

50 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.

51 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.
52 R. M. Wheaton, W. C. Bauman, Non-Ionic Separations with Ion Exchange Resins, Ann. N. Y. Acad. Sci., 1953, vol. 57, pp. 159-176.

53 G. H. Lathe, C. R. Ruthven, The Separation of Substances and Estimation of their Relative Molecular Sizes by the Use of Columns of Starch in Water, Biochem. J., 1956, vol. 62, pp. 665-674.

54 J. C. Moore, Gel Permeation Chromatography. I. A New Method for Molecular Weight Distribution of High Polymers, Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry, 1964, vol. 2, pp. 835-843.

55 D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, M. I. Καραγιάννης, K. H.
Ευσταθίου, Ν. Χανιωτάκης, Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης, 2005, pp. 1-984.
56 Ε. Γκίκας, Αμφίφιλα Πολυπεπτίδια: Σύνθεση, Χαρακτηρισμός και Μελέτη
Αυτοοργάνωσης σε Υδατικά Διαλύματα, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα
Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2012, pp. 1-208.
57 J. McMurry, Οργανική Χημεία Ι, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης,
Ηράκλειο, 1998

58 Μαυρομούστακος, Ι. Ματσούκας, Αρχές και Εφαρμογές Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού, Εκδόσεις Παρισιάνος, 2006, κεφάλαιο 1. 59 E. Peggion, E. Scoffone, A. Cosani, A. Portolan, Polymerization of gammabenzyl-L-glutamate N-carboxyanhydride: effects of conditions of polymer precipitation on the molecular weight distribution, Biopolymers, 1966, vol. 4, pp. 695-704.

60 B. Chu, Laser Light Scaterring: Basic Principles and Practice, USA, 1991 vol. 1, 2nd Edition.

61 R. Pecora, Dynamic light scattering: Applications of photon correlation spectroscopy, USA, 1985, vol. 1, 2nd Edition.

62 N. Hadjichristidis, H. latrou, S. Pispas, M. Pitsikalis, Anionic Polymerization: High Vacuum Techniques, J. POLYM. SCI. PART A: POLYM. CHEM.,2000, VOL.38

63 D. Uhrig, J. W. Mays, Experimental techniques in high-vacuum anionic polymerization, J. POLYM. SCI. PART A: POLYM. CHEM, 2005, Vol. 43, 6179-6222

64 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.

65 D. Mavrogiorgis, P. Bilalis, A. Karatzas, D. Skoulas, G.

Fotinogiannopoulou, H. latrou, Controlled polymerization of histidine and synthesis of well- defined stimuli responsive polymers. Elucidation of the structure-aggregation relationship of this highly multifunctional material,Polymer Chemistry, 2014, vol. 5, pp. 6256-6278.

66 P. G. M. Wuts, T. W. Green, Greene's protective groups in organic synthesis, Fourth edition, 2007, Hoboken, New Jersey.

67 K. Wang, G. F. Luo, Y. Liu, C. Li, S. X. Cheng, R, X. Zhuo, X. Z. Zhang, Redox-sensitive shell cross-linked PEG–polypeptide hybrid micelles for controlled drug release, Polym. Chem., 2012, 3, 1084–1090.

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

Ερευνητική Εργασία Διπλώματος Ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2016,

69 Le Droumaguet, B., Velonia, K. In situ ATRP mediated hierarchical formation of nanoreactors, Angew. Chem., Int. Ed.2008, 47, 6263-6266. 70 Le Droumaguet, Velonia, K. "Click Chemistry: A powerful tool to create polymer based macromolecular chimeras", Macromolecular Rapid

Communications, 2008, 29, 1073-1089.

71 J. Li, Y. Sha, A Convenient Synthesis of Amino Acid Methyl Esters, Molecules ,2008, 13

72 P. Moutavelis-Minakakis, E. Papavassilopoulou, G. Michas, K. Georgikopoulou, M. E. Ragoussi, N. Neophytou, P. Zoumpoulakis, T. Mavromoustakos, D. Hadjipavlou-Litina, Synthesis, in silico docking experiments of new 2-pyrrolidinone derivatives and study of their antiinflammatory activity, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2011, Vol. 19, 2888-2902.