



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ»**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Συμπολυμερή PEO-b-poly(His-co-Sar) και PEO-b-poly(Tryptophan). Σύνθεση και ιδιότητες φθορισμού και αυτό οργάνωσης σε υδατικά διαλύματα.

**ΚΑΣΙΜΑΤΗ ΤΖΑΝΝΕ ΜΑΡΙΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2018

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Συμπολυμερή PEO-b-poly(His-co-Sar) και PEO-b-poly(Tryptophan). Σύνθεση και ιδιότητες φθορισμού και αυτό οργάνωσης σε υδατικά διαλύματα.

ΚΑΣΙΜΑΤΗ ΤΖΑΝΝΕ ΜΑΡΙΑ

A.M.: 161003

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Ιατρού Ερμόλαος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ιατρού Ερμόλαος

Καθηγητής

Πιτσικάλης Μαρίνος

Καθηγητής

Σακελλαρίου Γεώργιος

Επίκουρος Καθηγητής

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

24/09/2018

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η σύνθεση μιας σειράς pH- και θέρμο-αποκρινόμενων αμφίφιλων πολυμερικών συστημάτων και η μελέτη τους ως πολυλειτουργικά συστήματα με πιθανότητα μελλοντικής εφαρμογής τους ως συστήματα μεταφοράς αντικαρκινικών φαρμάκων. Πραγματοποιήθηκε η σύνθεση των N-καρβοξυανυδριτών (NCA's) των αμινοξέων Τρυπτοφάνη, Ιστιδίνη, Γλουταμικό οξύ και Σαρκοζίνη. Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν γραμμικά όμο-, συν- και τριπολυπεπτίδια με καλά καθορισμένα μοριακά χαρακτηριστικά. Ο πολυμερισμός των N-καρβοξυανυδριτών α-αμινοξέων πραγματοποιήθηκε μέσω πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου. Ως απαρχητής των δισυσταδικών συν- και τριπολυπεπτιδίων χρησιμοποιήθηκε ο μακροαπαρχητής το αμινοτελικό-πολυαιθυλενοξειδίο (PEO-NH₂). Για τη σύνθεση των ομοπολυμερών χρησιμοποιήθηκαν η δευτεροταγής αμίνη διμεθυλαμίνη και η πρωτοταγής αμίνη εξυλαμίνη. Για τη σύνθεση των μονομερών N-καρβοξυανυδριτών των α-αμινοξέων αλλά και για τους καθαρισμούς των διαλυτών, χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές υψηλού κενού, απαλλάσσοντας το σύστημά μας από οποιάδήποτε πρόσμιξη (υγρασία, οξυγόνο) που θα οδηγούσε σε μη ελεγχόμενο πολυμερισμό. Τα πολυμερή που συντέθηκαν είναι αμφίφιλα υβριδικά δισυσταδικά τριπολυμερή τύπου PEO-*b*-Poly(His-co-Sar χ), όπου His = Ιστιδίνη και Sar = Σαρκοζίνη, με διαφορετικούς λόγους His/Sar (χ= 10, 20 Sar ως προς τα mole της συστάδας), τα ομοπολυμερή Σαρκοζίνης, Γλουταμικού οξέος και τρυπτοφάνης. Στη συνέχεια μελετήθηκε ο τρόπος επίδρασης των υδρόφιλων μονομερικών μονάδων της Σαρκοζίνης στη δευτεροταγή δομή των πολυμερών καθώς και η αυτοοργάνωσή τους, με τη χρήση κυκλικού διχρωισμού και σκέδασης φωτός.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Πολυμερή

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

ABSTRACT

The current survey investigates the synthesis of a series of pH- and temperature-responsive amphiphilic block terpolymers, their role as multifunctional polypeptide systems and their future potential as drug delivery systems. For that reason, well-defined homo- and copolypeptides with controllable molecular characteristics, were synthesized through Ring Opening Polymerization of N-carboxyanhydrides of the α -amino acids (NCAs). The synthesis of four N-carboxyanhydrides is presented thoroughly. For the synthesis of the co- and terpolymers, the initiator was the amino-functionalized PEO-NH₂. Moreover, for the synthesis of the well-defined homopolymers, the initiators were the secondary amine, dimethylamine and the primary amine hexylamine. High vacuum techniques were used for the purification of reagents, solvents and for the synthesis of NCAs and polymers. In this way, the high purity of monomers along with the high vacuum techniques resulted to the synthesis of well-defined amphiphilic hybrid polymers of PEO-*b*-P(His-co-Sar *x*), where *x* represents the molar percentage of sarcosine. Furthermore, the synthesis of well-defined homopolymers of PTrp, PSar and PGlu was achieved. The results revealed that, the presence of sarcosine residues affected the secondary structure of the polypeptide chain, fact that was investigated by FTIR spectroscopy and Circular Dichroism technique.

SUBJECT AREA: Polymers

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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

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

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

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	22
1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	24
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	26
2.1 Πρωτοταγής δομή και πεπτιδικός δεσμός.....	26
2.2 Δευτεροταγής δομή.....	28
2.2.1 Η α-έλικα	29
2.2.2 Η β-πτυχωτή επιφάνεια ή β-φύλλο	30
2.2.3 Η β-στροφή	31
2.3 Άλλοι τύποι δευτεροταγών δομών	31
2.4 Πεπτιδική σύνθεση.....	33
2.5 Σύνθεση πολυμερικών πεπτιδίων	41
2.6 Σύνθεση N-καρβοξυανυδριτών α-αμινοξέων(NCAs).....	61
2.7 Μοριακός χαρακτηρισμός πολυμερών	66
2.7.1 Φασματοσκοπία υπερύθρου (IR)	66
2.7.2 Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR).....	69
2.7.3 Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC)	73
2.7.4 Κυκλικός διχρωϊσμός πολυπεπτιδίων (CD).....	78
2.7.5 Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS).....	79
3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	85
3.1 Τεχνική υψηλού κενού (HVT).....	85
3.2 Καθαρισμός διαλυτών	87
3.3 Καθαρισμός απαρχητών και αντιδραστηρίων	91
3.4 Σύνθεση και καθαρισμός N-Καρβοξυανυδριτών	94

3.4.1	Σύνθεση και καθαρισμός του γ-Bz-L-Glu NCA	94
3.4.2	Σύνθεση του N-καρβόξυ ανυδρίτη της Τρυπτοφάνης (Trp-NCA).....	98
3.4.3	Σύνθεση και καθαρισμός Sar-NCA.....	101
3.4.4	Σύνθεση Nim–Trt -(L)-His-NCA	103
3.5	Σύνθεση ομοπολυμερών	108
3.6	Σύνθεση υβριδικών κατά συστάδες συμπολυμερών	113
4.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	119
4.1	Σύνθεση N-καρβόξυανυδριτών	119
4.1.1	Σύνθεση BLG-NCA	119
4.1.2	Σύνθεση Sar-NCA.....	122
4.1.3	Σύνθεση Trp-NCA.....	123
4.1.4	Σύνθεση Nim-trt-L-His-NCA	125
4.2	Σύνθεση ομοπολυμερών και συμπολυμερών	128
4.2.1	Σύνθεση του ομοπολυμερούς poly-LGA	128
4.2.2	Σύνθεση του ομοπολυμερούς Poly-Trp.....	130
4.2.3	Σύνθεση του ομοπολυμερούς poly-Sar.....	131
4.2.4	Σύνθεση υβριδικών κατά συστάδων συμπολυμερών με ιστιδίνη και σαρκοζίνη του τύπου PEO-b-P(His-co-Sar) με 10% και 20% Sar/His	133
4.3	Μελέτη των δισυσταδικών τριπολυμερών με την τεχνική του Κυκλικού Διχρωϊσμού (CD).....	138
4.4	Συμπεράσματα- Μελλοντικοί Στόχοι.....	145
	Συντημήσεις-Αρκτικόλεξα-Ακρωνύμια	147
	ΑΝΑΦΟΡΕΣ	149

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού από δύο αμινοξέα.....	26
Σχήμα 2: Η κατεύθυνση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας.	27
Σχήμα 3: Δομές συντονισμού του πεπτιδικού δεσμού.	27
Σχήμα 4: Γωνίες στροφής της πεπτιδικής αλυσίδας.....	28
Σχήμα 5: Σχηματική αναπαράσταση του R ₂ ενεργοποιητή, του ενδιάμεσου και της αποχωρούσας ομάδας.....	34
Σχήμα 6: Η μέθοδος των άκυλο αζιδίων.	34
Σχήμα 7: Μηχανισμός μικτών ανυδριτών και τοποχημεία της αμινόλυσης. Υ=προστασία αμίνης R ₁ =ομάδα του καρβόξυ αναλόγου, R ₂ =ομάδα του χλωροφόρμυλου αναλόγου, R ₃ =ομάδα του πηρυνόφιλου και B=τριτοταγής βάση.	35
Σχήμα 8: α) N-προστατευμένο αμινοξύ, β) καρβοδιϊμιδικό ενδιάμεσο, γ) συμμετρικός ανυδρίτης και δ) N,N-διυποκατεστημένη ουρία.	36
Σχήμα 9: X=O ή S ή Se, R ₃ =θειοφαίνυλο, κυανομέθυλο, 4-νιτροφαίνυλο εστέρες.....	36
Σχήμα 10: Διαδικασία της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεά φάση. Υ=προστατευτική ομάδα.	38
Σχήμα 11: Οι βάσεις του DNA, αδερίνη, γουανίνη, θυμίνη και κυτοσίνη.....	39
Σχήμα 12: Γενική αντίδραση των NCA's.	42
Σχήμα 13: Στάδια έναρξης και διάδοσης του κανονικού ή αμινών μηχανισμού του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβοξυανυδριτών.	43
Σχήμα 14: Στάδια έναρξης και διάδοσης του κανονικού ή αμινών μηχανισμού του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβοξυανυδριτών.	45
Σχήμα 15: α)Προσβολή στον C(5), β) προσβολή στον C(2).	45

Σχήμα 16: Στάδια μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς. Το ανιόν NCA μπορεί να προσβάλλει είτε την αναπτυσσόμενη αλυσίδα είτε ένα νέο μόριο NCA.	46
Σχήμα 17: α)Ακετυλίωση απαρχητή, β)γρηγορότερη έναρξη λόγω του N-acetyl-Gly-NCA.....	49
Σχήμα 18: Προτεινόμενος μηχανισμός για τον πολυμερισμό των NCAs με σύμπλοκα στοιχείων μεταπτώσεως.	54
Σχήμα 19: Σύμπλοκα στοιχείων μετάπτωσης με στερεοεκλεκτικότητα στον πολυμερισμό NCA's.....	56
Σχήμα 20: Χρήση υδροχλωρικού άλατος πρωτοταγούς αμίνης ως απαρχητή για τον ελεγχόμενο πολυμερισμό των NCAs από την ομάδα του Schlaad.....	57
Σχήμα 21: Η αντίδραση με το νερό δίνει το αρχικό αμινοξύ και εν συνεχεία πολυμερισμό. Η αντίδραση με το υδροχλώριο και το φωσγένιο δίνουν ισοκυανατοχλωρίδιο και μετέπειτα N-χλωροφορμυλοκαρβόξυ ανυδρίτη.	59
Σχήμα 22: Μέθοδος του Leuchs για τον σχηματισμό των N-Καρβοξυανυδριτών, όπου X=Cl ή Br.	62
Σχήμα 23: α) Σχηματισμός N-Καρβοξυανυδρίτη με την μέθοδο “Fuchs-Farthing” μέσω του N-χλωροφόρμυλο αμινοξέος, β) απόδειξη αυτού με την προσθήκη ανιλίνης.	63
Σχήμα 24: Παραλλαγή στην μέθοδο Fuchs-Farthing από τον Poche για αμινοξέα με αλειφατική πλευρική αλυσίδα και προστασίες ανθεκτικές σε όξινο περιβάλλον.	65
Σχήμα 25: Παραλλαγή στην μέθοδο Fuchs-Farthing από τον Mobashery, η μέθοδος είναι γενική και εφαρμόζεται και σε αμινοξέα με ευαίσθητες προστασίες σε οξέα.....	65
Σχήμα 26: Σχηματική αναπαράσταση της γραμμής υψηλού κενού.	86
Σχήμα 27: Σχηματική αναπαράσταση της αντλίας διαχύσεως υδραργύρου...	87
Σχήμα 28: Αντίδραση υδρόλυσης του DMF προς DMA και φορμικό οξύ.	88

Σχήμα 29: Σχηματική αναπαράσταση συσκευής για την παραλαβή ενώσεων χαμηλού σημείου ζέσεως.	93
Σχήμα 30: Σχηματική αναπαράσταση συσκευής αραίωσης απαρχητή.	93
Σχήμα 31: Αντίδραση σύνθεσης του BLG NCA.....	95
Σχήμα 32: Σχηματική αναπαράσταση της συσκευής σύνθεσης του BLG-NCA.	96
Σχήμα 33: Σχηματική αναπαράσταση της συσκευής ανακρυσταλλώσεων των NCA's.....	97
Σχήμα 34: Αντίδραση σύνθεσης του Trp-NCA.	99
Σχήμα 35: Αντίδραση σύνθεσης Trp-NCA με λιμονένιο.	100
Σχήμα 36: Αντίδραση σύνθεσης Sar-NCA.	102
Σχήμα 37: Σχηματική αναπαράσταση της συσκευής σύνθεσης του Nim-Trt-(L)-His-NCA*HCl.....	104
Σχήμα 38: Αντίδραση σύνθεσης του Nim-Trt-L-His-NCA.	105
Σχήμα 39: Αντίδραση πολυμερισμού BLG-NCA.	110
Σχήμα 40: Αντίδραση πολυμερισμού Trp-NCA.....	112
Σχήμα 41: Αντίδραση πολυμερισμού Sar-NCA.....	113

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση δευτεροταγών δομών που απαντώνται συνηθέστερα στα πολυπεπτίδια α) τυχαίο σπείραμα, β) α-έλικα και γ) αντιπαράλληλο β-φύλλο.....	29
Εικόνα 2: Απεικόνιση της στροφής της α-έλικας στο χώρο (α), των δεσμών υδρογόνου (β) και των θέσεων των ατόμων της κύρια αλυσίδας και των πλευρικών ομάδων (c).....	30
Εικόνα 3: Απεικόνιση της πτύχωσης μιας β-πτυχωτής επιφάνειας με την ύπαρξη δεσμών υδρογόνου.....	30
Εικόνα 4: Απεικόνιση της β-στροφής.	31
Εικόνα 5: Απεικόνιση της τεχνικής του ανασυνδιασμένου DNA.	41
Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση της συσκευής ανακρυσταλλώσεων των μονομερών NCAs με την χρήση τεχνικών υψηλού κενού.	59
Εικόνα 7: Αντίδραση σχηματισμού του Nim-Trt-(L)-His-NCA*HCl αμέσως μετά την προσθήκη του SOCl ₂ (αριστερά) και μετά από 1,5 ώρα (δεξιά).	106
Εικόνα 8: Απεικόνιση της συσκευής πολυμερισμού ομο- και συμπολυπεπτιδίων.	109
Εικόνα 9: Φάσμα υπερύθρου του γ-βενζυλεστέρα του γλουταμικού οξέος. Μεγέθυνση στην περιοχή του καρβονυλίου.	119
Εικόνα 10: Φάσμα υπερύθρου του BLG-NCA. Μεγέθυνση στην περιοχή του καρβονυλίου.....	120
Εικόνα 11: Φάσμα ¹ H-NMR του BLG-NCA σε CDCl ₃	121
Εικόνα 12: Φάσματα IR από την σύνθεση και τις εξαχνώσεις του NCA-Sar.....	122
Εικόνα 13: Φάσμα ¹ H-NMR Sar-NCA σε CDCl ₃	123
Εικόνα 14: Φάσμα FTIR από την σύνθεση του Trp-NCA.	124
Εικόνα 15: Φάσμα ¹ H-NMR του Trp-NCA σε d ₆ -DMSO.	125

Εικόνα 16: Φάσματα FTIR της σύνθεσης του Nim-Trt-L-His-NCA.	127
Εικόνα 17: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του Nim-Trt-L-His-NCA σε CDCl_3	128
Εικόνα 18: Φάσμα IR για το PBLG.....	129
Εικόνα 19: Φάσμα IR για το PLGA.....	129
Εικόνα 20: Φάσμα IR για το Poly-Trp.....	130
Εικόνα 21: Γράφημα SEC για το ομοπολυμερές poly-Trp.....	130
Εικόνα 22: Φάσμα IR για το ομοπολυμερές poly-Sar.....	131
Εικόνα 23: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του ομοπολυμερούς poly-Sar σε CDCl_3	132
Εικόνα 24: Γράφημα SEC για το ομοπολυμερές poly-Sar.....	133
Εικόνα 25: Φάσμα IR του πλήρως προστατευμένου πολυμερούς PEO-b-P(His-co-Sar) με 10% Sar/His (μπλε) και μετά την πλήρη αποπροστασία του (πράσινο).	134
Εικόνα 26: Φάσμα IR του πλήρως προστατευμένου πολυμερούς PEO-b-P(His-co-Sar) με 20% Sar/His (μπλε) και μετά την πλήρη αποπροστασία του (πράσινο).	134
Εικόνα 27: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του PEO-b-P(His-co-Sar) με 20% Sar σε $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$	135
Εικόνα 28: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του PEO-b-P(His-co-Sar) με 20% Sar σε $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$	136
Εικόνα 29: Χρωματογράφημα SEC σε νερό του μακροαπαρχητή m-PEO-NH ₂ και του δισυσταδικού τριπολυμερούς PEO-b-P(His-co-Sar) με 20% Sar/His.	137
Εικόνα 30: Χρωματογράφημα SEC σε νερό του μακροαπαρχητή m-PEO-NH ₂ και του δισυσταδικού τριπολυμερούς PEO-b-P(His-co-Sar) με 10% Sar/His.	138
Εικόνα 31: Γραφήματα CD του πολυμερούς PEO-b-P(His-co-Sar) με 10% Sar/His σε $T=25^\circ\text{C}$	140

Εικόνα 32: Γραφήματα CD του πολυμερούς PEO-b-P(His-co-Sar) με 10% Sar/His σε T=37°C.....	140
Εικόνα 33: Γραφήματα CD του πολυμερούς PEO-b-P(His-co-Sar) με 10% Sar/His σε T=41°C.....	141
Εικόνα 34: Γραφήματα CD του πολυμερούς PEO-b-P(His-co-Sar) με 20% Sar/His σε T=25°C.....	142
Εικόνα 35: Γραφήματα CD του πολυμερούς PEO-b-P(His-co-Sar) με 20% Sar/His σε T=37°C.....	143
Εικόνα 36: Γραφήματα CD του πολυμερούς PEO-b-P(His-co-Sar) με 20% Sar/His σε T=41°C.....	143
Εικόνα 37: Γραφήματα CD του πολυμερούς PEO-b-PHis σε T=37°C.	144

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Σχετικές συχνότητες αμινοξέων σε δευτεροταγής δομές. ²	32
Πίνακας 2: Απόδοση (%) σε υδαντοϊκά οξέα από την αντίδραση αμινών με διάφορα NCA's.	50
Πίνακας 3: Επίδραση διαλύτη κατά την αντίδραση δυο ισοδυνάμων αμίνης με Phe-NCA.....	50
Πίνακας 4: Απορροφήσεις διαφόρων χαρακτηριστικών ομάδων με τις αντίστοιχες εντάσεις στο Mir ⁷⁵	68
Πίνακας 5: Χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις στη φασματοσκοπία ¹ H-NMR (ppm) ⁷⁸	72
Πίνακας 6: Απορροφήσεις των τριών διαμορφώσεων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας στον κυκλικό διχρωισμό.	78

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο της Βιομηχανικής Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά τη χρονική περίοδο 2017-2018, υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Ερμόλαου Ιατρού.

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

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

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

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

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

υγρασία του αέρα και οι συνθήκες παρασκευής, καθαρισμού, φύλαξης και πολυμερισμού μέχρι τώρα με χρήση αδρανούς ατμόσφαιρας δεν επέτρεπαν τον πλήρη αποκλεισμό της υγρασίας.

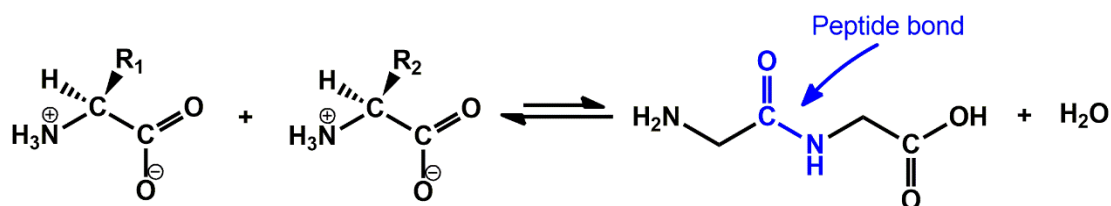
Συμπερασματικά, τα πολυπεπτιδικά συστήματα διαθέτουν πληθώρα πλεονεκτημάτων και αποτελούν ελπιδοφόρα προσέγγιση για τις βιολογικές εφαρμογές, ωστόσο η περαιτέρω μελέτη τους είναι επιτακτική ανάγκη καθώς οι βιολογικές οδοί που καλούνται να διασχίσουν είναι αναρίθμητες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

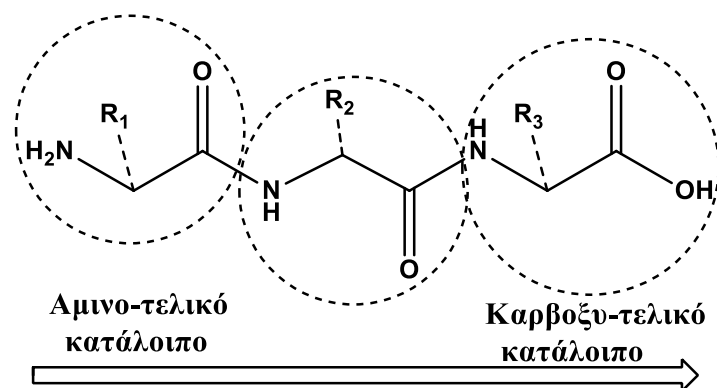
2.1 Πρωτοταγής δομή και πεπτιδικός δεσμός

Στις πρωτεΐνες¹, η α-καρβοξυλομάδα ενός αμινοξέος ενώνεται με την α-αμινομάδα ενός άλλου αμινοξέος με έναν πεπτιδικό δεσμό, με ταυτόχρονη αποβολή ενός μορίου νερού. Η ισορροπία της αντίδρασης βρίσκεται προς την υδρόλυση παρά στη σύνθεση. Ο πεπτιδικός δεσμός είναι επίπεδος και έχει εν μέρει χαρακτήρα διπλού δεσμού ο οποίος εμποδίζει την περιστροφή γύρω από τον εαυτό του, καθιστώντας τον κινητικά σταθερό. Πιο συγκεκριμένα η απόσταση C-N στον πεπτιδικό δεσμό είναι 1,32 Å δηλαδή μεταξύ των τιμών 1,49 Å που είναι το μήκος ενός απλού δεσμού και 1,27 Å που είναι το μήκος ενός διπλού δεσμού. Επίσης σημαντικό είναι το γεγονός ότι ο πεπτιδικός δεσμός δεν έχει φορτίο, συνεπώς τα πολυμερή που περιέχουν τέτοιου είδους δεσμούς μπορούν να δημιουργούν σφαιρικές δομές χωρίς ενδιάμεσα κενά.



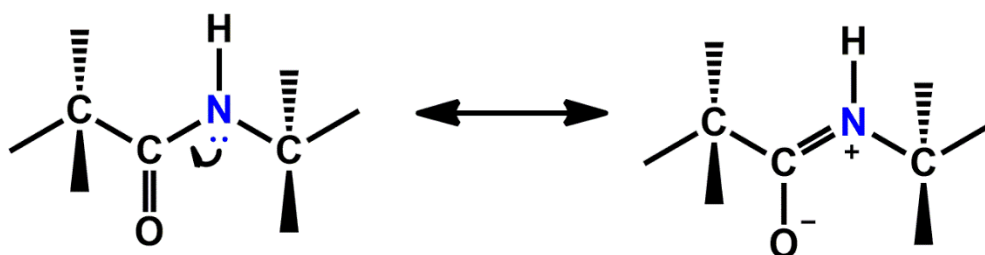
Σχήμα 1: Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού από δύο αμινοξέα.

Πολλά αμινοξέα ενώνονται με πεπτιδικούς δεσμούς για να δημιουργήσουν μια πολυπεπτιδική αλυσίδα (σχήμα 1). Μια ομάδα αμινοξέος λέγεται κατάλοιπο στην αλυσίδα, επιπλέον κάθε αλυσίδα έχει κατεύθυνση καθώς τα δομικά της στοιχεία έχουν διαφορετικά άκρα (σχήμα 2). Από χημικής πλευράς δεν υπάρχει διαχωρισμός μεταξύ πρωτεϊνών και πολυπεπτιδίων. Ονοματολογικά, αλυσίδες με λιγότερα από δεκαπέντε αμινοξέα λέγονται πεπτίδια, έως πενήντα ονομάζονται πολυπεπτίδια ενώ μεγαλύτερες ονομάζονται πρωτεΐνες.



Σχήμα 2: Η κατεύθυνση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας.

Το 1951, οι Pauling και Corey απέδειξαν με κρυσταλλογραφία ακτινών Χ αμινοξέων, αμιδίων τους και απλών πεπτιδίων ότι ο δεσμός C-N είναι βραχύτερος από τον απλό δεσμό. Η απεντόπιση λόγω συντονισμού προσδίδει μερικό χαρακτήρα διπλού δεσμού (σχήμα 3).

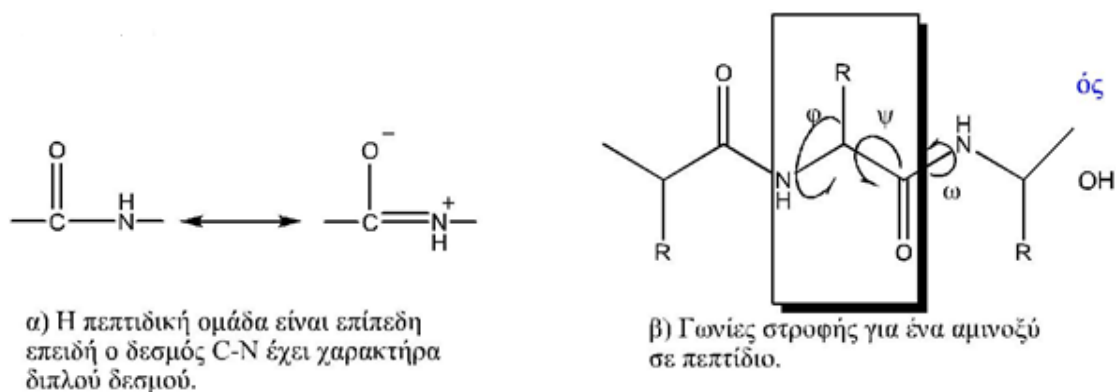


Σχήμα 3: Δομές συντονισμού του πεπτιδικού δεσμού.

Η διαμόρφωση της πεπτιδικής αλυσίδας χαρακτηρίζεται από τρεις γωνίες στροφής (σχήμα 4), την ϕ $\{C(=O)-N-C^{\alpha}-C(=O)\}$, την ψ $\{N-C^{\alpha}-C(=O)-N\}$ και την ω $\{C^{\alpha}-C(=O)-N-C-\}$. Η ελεύθερη περιστροφή γύρω από τον C-N αμιδικό δεσμό περιορίζεται δραστικά με ένα φράγμα περιστροφής $\sim 105 \text{ kJ mol}^{-1}$. Αντίθετα οι δεσμοί μεταξύ ενός ατόμου α-άνθρακα και του αζώτου και του άνθρακα του καρβονυλίου είναι καθαρά απλοί. Επομένως υπάρχει μεγάλη ελευθερία περιστροφής γύρω από αυτούς τους δεσμούς και προς τις δυο πλευρές της άκαμπτης πεπτιδικής ομάδας. Οι διαμορφώσεις που λαμβάνονται είναι η *trans* ($\omega=180^\circ$) και η *cis* ($\omega=0^\circ$). Η τελευταία είναι ενεργειακά προτιμότερη κατά 8 kJ mol^{-1} και συναντάται στα περισσότερα πεπτίδια που δεν περιέχουν προλίνη.

Σε αντίθεση με τον πεπτιδικό δεσμό, οι δεσμοί οι οποίοι ενώνουν τις καρβονυλικές ομάδες με το άτομο του α-άνθρακα και τις αμινικές ομάδες με το άτομο του α-άνθρακα είναι απλοί δεσμοί, που σημαίνει ότι οι πρωτεΐνες

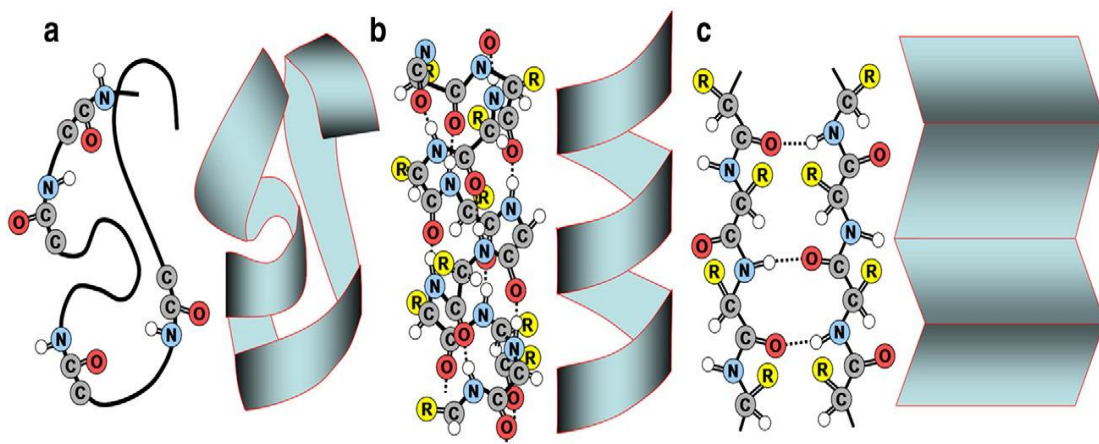
μπορούν να περιστρέφονται αποκτώντας διάφορους προσανατολισμούς στο χώρο και να αναδιπλώνονται με πολλούς τρόπους. Η γωνία περιστροφής γύρω από το δεσμό N-αC ονομάζεται ϕ και η γωνία περιστροφής γύρω από το δεσμό του α C-CO ονομάζεται ψ . Οι γωνίες αυτές καθορίζουν την κατεύθυνση που θα έχει η πολυπεπτιδική αλυσίδα.



Σχήμα 4: Γωνίες στροφής της πεπτιδικής αλυσίδας.

2.2 Δευτεροταγής δομή

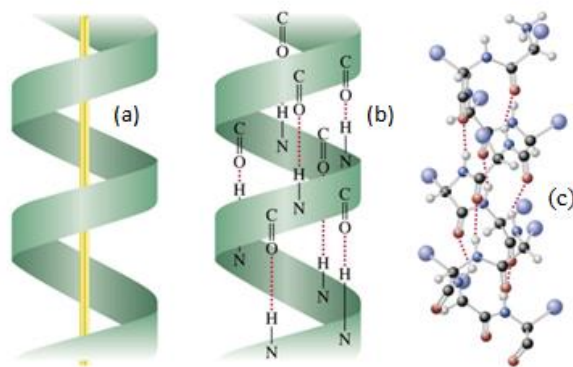
Οι πρωτεΐνες έχουν την ικανότητα να αναδιπλώνονται σε καλά καθορισμένες δομές. Η τελική διαμόρφωση που θα προτιμηθεί καθορίζεται από τις γωνίες περιστροφής ψ και ϕ και από άλλους παράγοντες σταθεροποίησης, όπως οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και οι δεσμοί υδρογόνου. Η έλλειψη ευελιξίας της αλυσίδας και οι περιορισμοί σχετικά με τις γωνίες περιστροφής περιορίζουν αρκετά τον αριθμό των δομών που μπορεί να επιτύχει η ξεδιπλωμένη μορφή της πρωτεΐνης κατά την αναδίπλωσή της. Το 1951 οι Linus Pauling και Robert Corey ανακάλυψαν με τη χρήση ακτινών χ δύο περιοδικές δομές που τις ονόμασαν α -έλικα και β -πτυχωτή επιφάνεια (εικόνα 1). Στη συνέχεια προσδιορίστηκαν και άλλες δομές χωρίς όμως να παρουσιάζουν περιοδικότητα όπως η β -στροφή και η Ω -θηλιά, οι οποίες επηρεάζουν την τελική τρισδιάστατη δομή της αλυσίδας.



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση δευτεροταγών δομών που απαντώνται συνηθέστερα στα πολυπεπτίδια α) τυχαίο σπείραμα, β) α-έλικα και γ) αντιπαράλληλο β-φύλλο.

2.2.1 Η α-έλικα

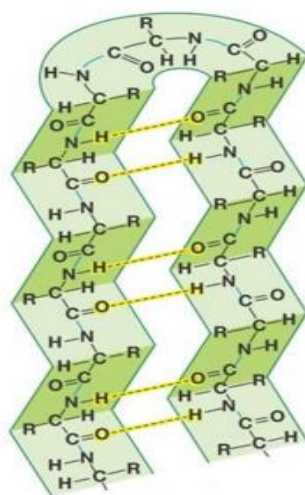
Η α-έλικα έχει δομή ράβδου. Η σφιχτά ελιγμένη πολυπεπτιδική κύρια αλυσίδα σχηματίζει το εσωτερικό μέρος της ράβδου, ενώ οι πλευρικές αλυσίδες εκτείνονται προς το εξωτερικό σε μία ελικοειδή διαμόρφωση. Η α-έλικα σταθεροποιείται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των ομάδων NH και CO της κύριας αλυσίδας. Η ομάδα CO είναι ενωμένη με δεσμό υδρογόνου με την ομάδα NH του αμινοξέος που βρίσκεται 4 μονάδες μπροστά από αυτή στη γραμμική αλληλουχία. Επομένως, όλες οι ομάδες CO και NH της κύριας αλυσίδας συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου (εικόνα 2). Κάθε κατάλοιπο απέχει από το προηγούμενο 0,15 nm (1,5 Å) κατά μήκος του άξονα της έλικας και έχει περιστραφεί σε σχέση με αυτό κατά 100°, δίνοντας έτσι 3,6 αμινοξέα ανά στροφή της έλικας. Επομένως, αμινοξέα που απέχουν τρεις ή τέσσερις θέσεις στη γραμμική αλληλουχία βρίσκονται πολύ κοντά σε μία α-έλικα. Αντιθέτως, αμινοξέα που απέχουν δύο θέσεις στη γραμμική αλληλουχία βρίσκονται απέναντι στην έλικα και επομένως δεν είναι δυνατόν να συναντηθούν. Η φορά στροφής της έλικας μπορεί να είναι είτε δεξιόστροφη είτε προς αριστερόστροφη. Οι α-έλικες στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες είναι δεξιόστροφες, γιατί η αριστερόστροφη ευνοείται λιγότερο ενεργειακά. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός, ότι δύο ή και περισσότερες α-έλικες μπορούν να περιελιχθούν σχηματίζοντας συσπειρωμένα σπειράματα, δημιουργώντας μια πιο σταθερή δομή με μηχανικό ρόλο.



Εικόνα 2: Απεικόνιση της στροφής της α -έλικας στο χώρο (a), των δεσμών υδρογόνου (b) και των θέσεων των ατόμων της κύρια αλυσίδας και των πλευρικών ομάδων (c).

2.2.2 Η β -πτυχωτή επιφάνεια ή β -φύλλο

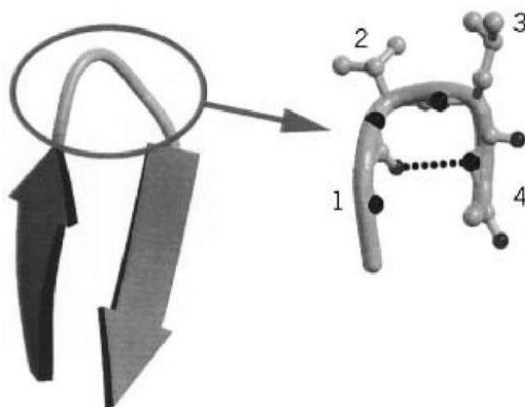
Η β -πτυχωτή επιφάνεια διαφέρει από την α -έλικα γιατί είναι μία επίπεδη δομή και όχι ράβδος. Μία πολυπεπτιδική αλυσίδα στη β -πτυχωτή επιφάνεια είναι σχεδόν τελείως ανοικτή και όχι σφιχτά περιελιγμένη όπως στην α -έλικα (εικόνα 3). Η απόσταση μεταξύ γειτονικών αμινοξέων είναι 3,5 Å σε αντίθεση με το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



Εικόνα 3: Απεικόνιση της πτύωσης μιας β -πτυχωτής επιφάνειας με την ύπαρξη δεσμών υδρογόνου.

2.2.3 Η β-στροφή

Πέραν των δύο βασικότερων κατηγοριών της δευτεροταγούς δομής, η πολυπεπτιδική αλυσίδα μπορεί να αλλάξει κατεύθυνση λόγω ενός δομικού στοιχείου που ονομάζεται β-στροφή. Η ουσία αυτής της στροφής φουρκέτας είναι ότι η ομάδα CO της θέσης n ενός πολυπεπτιδίου ενώνεται με δεσμό υδρογόνου με την ομάδα NH της θέσης $(n+3)$. Με τον τρόπο αυτό μία πολυπεπτιδική αλυσίδα μπορεί να αλλάξει ξαφνικά την κατεύθυνσή της. Οι β-στροφές συχνά συνδέουν αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες, για το λόγο αυτό πήραν και αυτό το όνομα. Είναι ακόμα γνωστές ως στροφές αναστροφής ή κάμψεις φουρκέτας (εικόνα 4).



Εικόνα 4: Απεικόνιση της β-στροφής.

2.3 Άλλοι τύποι δευτεροταγών δομών

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

Περίληπτικά, η πρωτοταγής δομή είναι η αλληλουχία αμινοξέων και η θέση των δισουλφιδικών δεσμών, δηλαδή των διασυνδέσεων που προκύπτουν από την οξείδωση της κυστεΐνης (αμινοξύ που περιέχει την ομάδα HS-) μεταξύ διαφορετικών αλυσίδων ή απομακρυσμένων περιοχών στην ίδια αλυσίδα.

Μπορούμε να πούμε ότι η πρωτοταγής δομή αποτελεί την πλήρη περιγραφή των ομοιοπολικών συνδέσεων σε μία πρωτεΐνη. Η δευτεροταγής δομή εξετάζει τη χωροδιάταξη των αμινοξέων που βρίσκονται το ένα δίπλα στο άλλο στην αλληλουχία (π.χ. α -έλικα, β -φύλλο). Η τριτοταγής δομή αναφέρεται στη στερεοδιάταξη αμινοξέων απομακρυσμένων μεταξύ τους στη γραμμική αλληλουχία και ο διαχωρισμός της από αυτή της δευτεροταγούς δομής είναι σχετικός. Τέλος, οι πρωτεΐνες που περιέχουν στο μόριό τους περισσότερες από μία πολυπεπτιδικές αλυσίδες (υπομονάδες) έχουν ακόμη ένα επίπεδο δομής. Η τεταρτοταγής δομή αναφέρεται στη χωροδιάταξη αυτών των υπομονάδων και στα είδη των επαφών τους.

Πίνακας 1: Σχετικές συχνότητες αμινοξέων σε δευτεροταγής δομές.²

Ονομασία	Σύντμηση	α -έλικα	β -πτυχωτή επιφάνεια	β -στροφή
Αλανίνη	Ala	1,29	0,90	0,78
Κυστεΐνη	Cys	1,11	0,74	0,80
Λευκίνη	Leu	1,30	1,02	0,59
Μεθειονίνη	Met	1,47	0,97	0,39
Γλουταμικό οξύ	Glu	1,44	0,75	1,00
Γλουταμίνη	Gln	1,27	0,80	0,97
Ιστιδίνη	His	1,22	1,08	0,69
Λυσίνη	Lys	1,23	0,77	0,96
Βαλίνη	Val	0,91	1,49	0,47
Ισολευκίνη	Ile	0,97	1,45	0,51
Φαινυλαλανίνη	Phe	1,07	1,32	0,58
Τυροσίνη	Tyr	0,72	1,25	1,05
Θρυπτοφάνη	Trp	0,99	1,14	0,75
Θρεονίνη	Thr	0,82	1,21	1,03
Γλυκίνη	Gly	0,56	0,92	1,64
Σερίνη	Ser	0,82	0,95	1,33
Ασπαρτικό οξύ	Asp	1,04	0,72	1,41

Ασπαραγίνη	Asn	0,90	0,76	1,28
Προλίνη	Pro	0,52	0,64	1,91
Αργινίνη	Arg	0,96	0,99	0,88

2.4 Πεπτιδική σύνθεση

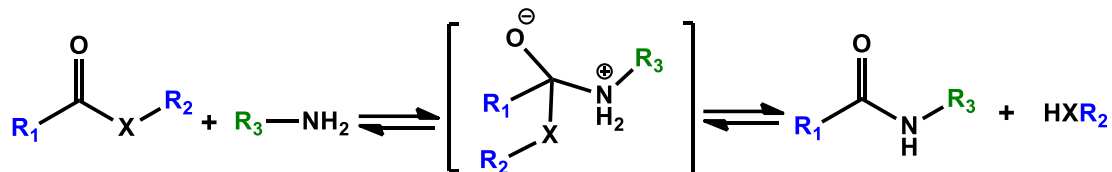
Η σύνθεση ενός πεπτιδικού δεσμού υπό ήπιες συνθήκες μπορεί να επιτευχθεί μόνο μέσω ενεργοποίησης του καρβοξυλίου του αμινοξέος. Το δεύτερο αμινοξύ προσβάλλει πυρηνόφιλα το πρώτο προς σχηματισμό ενός διπεπτιδίου. Εάν η αμινομάδα του πρώτου είναι απροστατέυτη, τότε ο σχηματισμός του δεσμού συμβαίνει δίχως έλεγχο. Γραμμικά και κυκλικά πεπτίδια σχηματίζονται ως παραπροϊόντα μαζί με το επιθυμητό διπεπτίδιο. Συνεπώς, κατά την διάρκεια της πεπτιδικής σύνθεσης όλες οι λειτουργικές ομάδες πρέπει να προστατεύονται προσωρινά και αντιστρεπτά. Έτσι για το σχηματισμό ενός δεσμού απαιτείται μια διαδικασία τριών σταδίων:

1. Στο πρώτο βήμα, χρειάζεται ένα μερικώς προστατευμένο αμινοξύ. Μετά την προστασία, η διπολική φύση του αμινοξέος δεν είναι πλέον παρούσα.
2. Εν συνεχεία, το N-προστατευμένο αμινοξύ πρέπει να ενεργοποιηθεί στην καρβοξυλομάδα σε κάποιο δραστικότερο ενδιάμεσο έτσι ώστε να δημιουργηθεί ο δεσμός.
3. Τέλος, μερική ή ολική αποπροστασία τελείται αναλόγως αν έχει τελειώσει η σύνθεση ή όχι.

2.4.1 Ενεργοποιητές καρβοξυλίου

Ενεργοποίηση της καρβοξυ-ομάδας, μέσω αύξησης της ηλεκτροφιλικότητας, λαμβάνεται με την εισαγωγή ομάδων που είναι δέκτες ηλεκτρονίων (σχήμα 5). Οι ομάδες αυτές μειώνουν την ηλεκτρονική πυκνότητα του καρβονυλίου, ώστε να ευνοηθεί η πυρηνόφιλη προσβολή από την αμινομάδα. Η τελευταία προσβάλλει με το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του αζώτου το ηλεκτρονιόφιλο πλέον καρβονύλιο για να δώσει ένα διπολικό τετραεδρικό ενδιάμεσο. Ο

πεπτιδικός δεσμός δημιουργείται με διαχωρισμό από την αποχωρούσα ομάδα, που αποτελεί παράγοντα επιρροής ως προς την ταχύτητα της αντίδρασης.

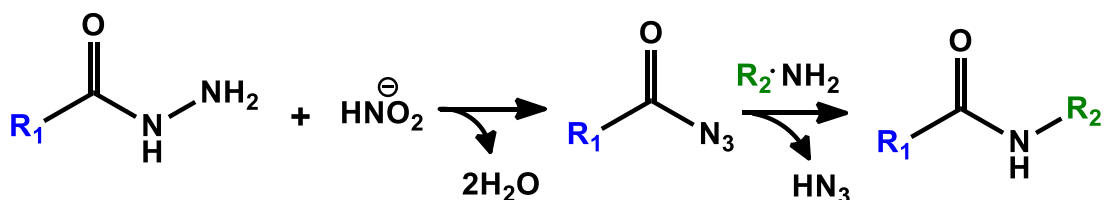


Σχήμα 5: Σχηματική αναπαράσταση του R₂ ενεργοποιητή, του ενδιάμεσου και της αποχωρούσας ομάδας.

Παρακάτω αναφέρονται³ εν συντομία τα αντιδραστήρια που έχουν πρακτικές εφαρμογές και είναι γενικά αποδεκτά:

Άκυλο αζίδια

Η μέθοδος των άκυλο αζιδίων εισήχθηκε από τις αρχές του 1900 από τον Curtius και αποτελεί μια από τις παλαιότερες. Για μεγάλο διάστημα θεωρούνταν ως η μόνη μέθοδος που δεν γινόταν ρακεμίσση. Αντιδρώντα για τη μέθοδο αυτή αποτελούν αμινοξέα κρυσταλλικά ή υδραζίδια πεπτιδίων, που δημιουργούνται εύκολα από τους αντίστοιχους εστέρες με υδροζινόλυση. Τα υδραζίδια εν συνεχεία μετατρέπονται σε αζίδια με νιτροσυλίωση (σχήμα 6). Στη συνέχεια το αζίδιο απομονώνεται και αντιδρά με το άμινο συστατικό προς δημιουργία πεπτιδικού δεσμού.

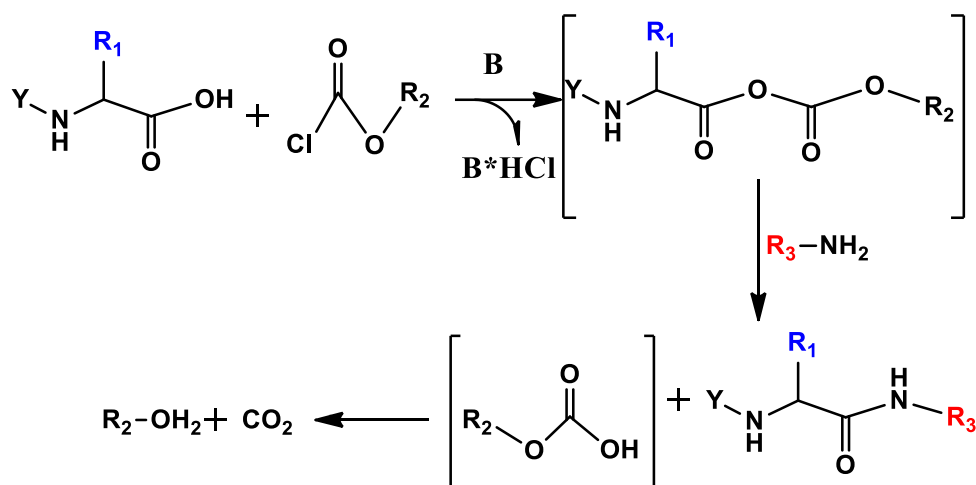


Σχήμα 6: Η μέθοδος των άκυλο αζιδίων.

Ανυδρίτες οξέων

Καρβοξυλικά και ανόργανα οξέα, χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό μικτών ανυδριτών. Η τοποχημεία της αμινόλυσης του ανυδρίτη εξαρτάται από την ηλεκτροφιλικότητα και από την στερεοχημική παρεμπόδιση των δυο ανταγωνιστικών καρβοξυλίων. Για την δημιουργία μικτού ανυδρίτη, N-προστατευμένα αμινοξέα ή πεπτίδια διαλύονται σε διχλωρομεθάνιο, τετραυδροφουράνιο, διοξάνιο, ακετονιτρίλιο, ή διμεθυλοφορμαμίδιο με ένα ισοδύναμο τριτοταγούς βάσης. Το απαιτούμενο αλκυλοχλωροφόρμυλο

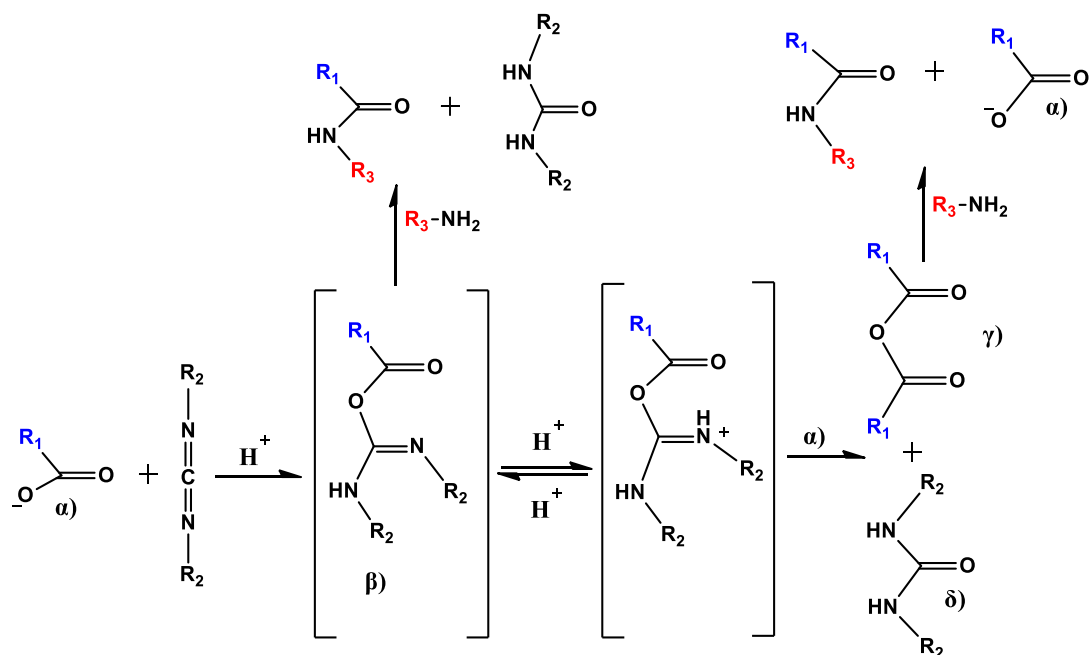
προστίθεται σε θερμοκρασία -15°C υπό έντονη ανάδευση προς δημιουργία του ασύμμετρου ανυδρίτη (ενεργοποίηση) (σχήμα 7). Μετά από μικρή περίοδο ενεργοποίησης το πυρηνόφιλο αμινοξύ προστίθεται και έχουμε την δημιουργία του δεσμού.



Σχήμα 7: Μηχανισμός μικτών ανυδριτών και τοποχημεία της αμινόλυσης.
 Y =προστασία αμίνης R_1 =ομάδα του καρβόξυ αναλόγου, R_2 =ομάδα του χλωροφόρμυλου αναλόγου, R_3 =ομάδα του πυρηνόφιλου και B =τριτοταγής βάση.

Καρβοδιϊμίδια

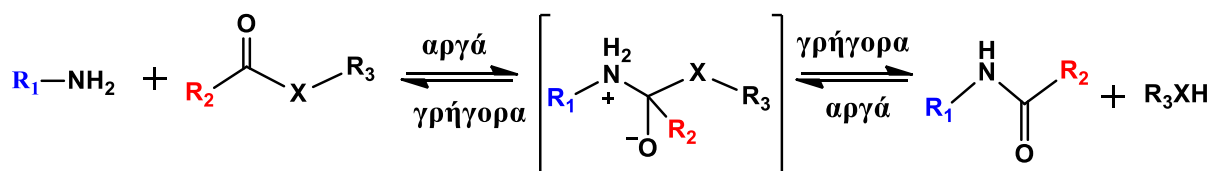
Τα καρβοδιϊμίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη συμπύκνωση ενός καρβοξυλίου και μιας αμίνης. Κατά τη διάρκεια σχηματισμού του πεπτιδικού δεσμού τα καρβοδιϊμίδια μετασχηματίζονται στα αντίστοιχα παράγωγα ουρίας, όπου στην περίπτωση της N,N -δικυκλοεξυλ-ουρίας καταβυθίζεται από το διάλυμα της αντίδρασης. Η διαφορά στις ταχύτητες της αμινόλυσης και της υδρόλυσης του καρβοδιϊμιδικού ενδιάμεσου επιτρέπουν την δημιουργία πεπτιδικού δεσμού και σε υδατικό μέσο. Το ενδιάμεσο αντιδρά με το αμινο συστατικό και παράγεται το προστατευμένο πεπτίδιο και το παράγωγο της ουρίας. Εναλλακτικά, το ενδιάμεσο βρίσκεται σε ισορροπία με την πρωτονιωμένη μορφή του, προσβάλλεται από το αρχικό καρβοξυλοξύ πυρηνόφιλο, σχηματίζοντας συμμετρικό ανυδρίτη αμινοξέος μαζί με N,N -διυποκατεστημένη ουρία (Σχήμα 8). Ο ανυδρίτης αντιδρά με το αμινο συστατικό σχηματίζοντας το επιθυμητό προϊόν και το ελεύθερο οξύ το οποίο μπορεί να πάρει μέρος σε ένα ακόμα κύκλο αντίδρασης.



Σχήμα 8: α) N-προστατευμένο αμινοξύ, β) καρβοδιϊμιδικό ενδιάμεσο, γ) συμμετρικός ανυδρίτης και δ) N,N-διυποκατεστημένη ουρία.

Ενεργοί εστέρες.

Ο σχηματισμός του πεπτιδικού δεσμού με την αμινόλυση των εστέρων προχωράει ανάλογα με την σαπωνοποίηση τους. Πυρηνόφιλη προσβολή του άμινο συστατικού στο καρβονύλιο, οδηγεί στο καθοριστικό στάδιο της ταχύτητας, ένα τετραεδρικό ενδιάμεσο, ο σχηματισμός του οποίου ευνοείται από την αποχωρούσα ομάδα. Ο ρυθμός σχηματισμού του πεπτιδικού δεσμού σχετίζεται με την ομάδα αυτή. Για παράδειγμα, μια καλή αποχωρούσα ομάδα είναι συζυγής βάση ενός σχετικά ισχυρού οξέος και σε αυτή την περίπτωση όταν το αποχωρών ανιόν είναι σταθεροποιημένο μέσω συντονισμού ή μεσομέρειας, διευκολύνει το σπάσιμο του εστερικού δεσμού (Σχήμα 9).

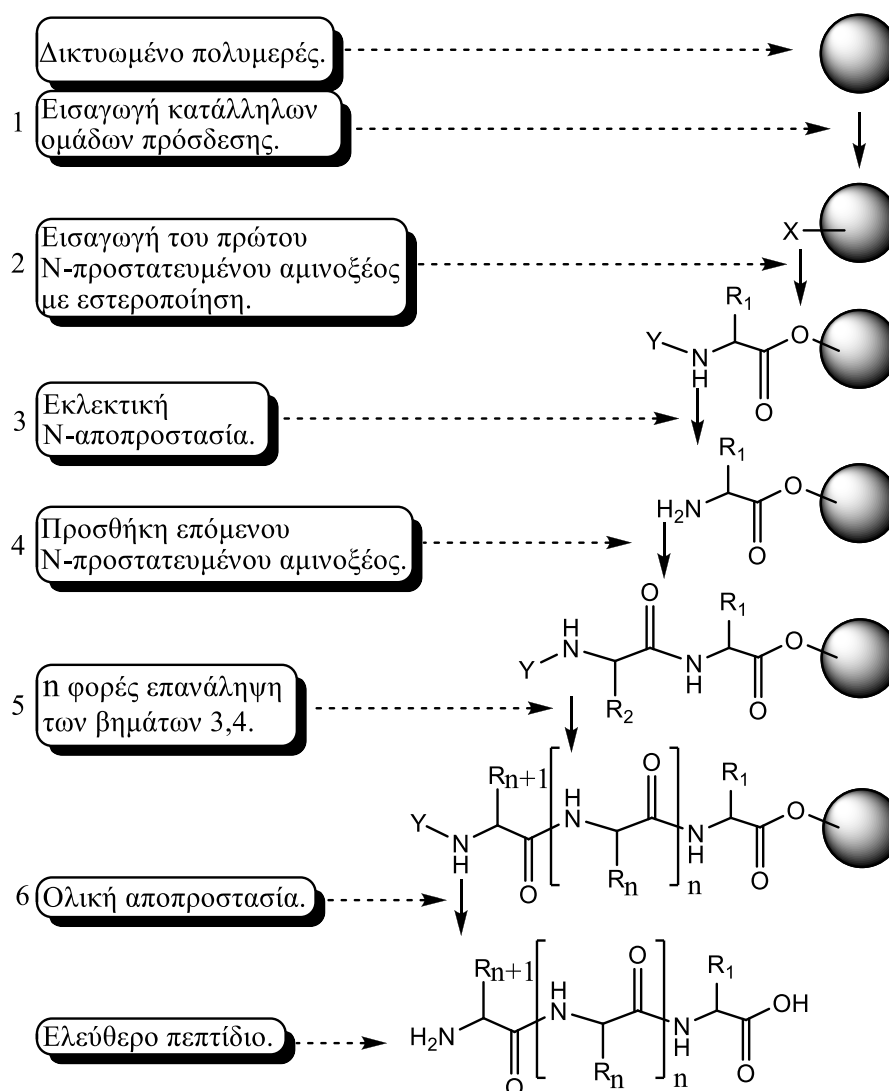


Σχήμα 9: X=O ή S ή Se, R3=θειοφαίνυλο, κυανομέθυλο, 4-νιτροφαίνυλο εστέρες.

2.4.2 Σύνθεση στερεάς φάσης κατά Merrifield

Η σύνθεση μεγάλων πεπτιδικών αλυσίδων με καθορισμένη αλληλουχία αμινοξέων είναι ένα χρονοβόρο και επίπονο έργο λόγω της σταδιακής προσθήκης ενός αμινοξέος κάθε φορά. Μπορεί, ωστόσο, να απλοποιηθεί θεαματικά, εφαρμόζοντας τη μέθοδο στερεάς φάσης, που αναπτύχθηκε από τον R. Bruce Merrifield (Βραβείο Νόμπελ το 1984) το 1963. Σύμφωνα με την τεχνική Merrifield⁴⁻⁶, η πεπτιδική σύνθεση πραγματοποιείται σε στερεά φάση, συγκεκριμένα σε σφαιρίδια πολυμερούς πολυστυρενίου, το οποίο έχει παρασκευαστεί με τέτοιο τρόπο, ώστε σε κάθε 100 περίπου βενζυλικούς δακτυλίους, ένας να φέρει σε θέση πάρα- μία χλωρομεθυλο ομάδα ($-\text{CH}_2\text{Cl}$).

Κατά τη μέθοδο της πεπτιδικής σύνθεσης σε διάλυμα, που περιγράφηκε παραπάνω, για την προστασία της καρβοξυλικής ομάδας του ενός αμινοξέος στο στάδιο του σχηματισμού του αμιδικού δεσμού χρησιμοποιείται μία προστατευτική ομάδα, ένας εστέρας. Στην περίπτωση αυτή, το πρώτο αμινοξύ συνδέεται με εστερικό δεσμό στο αδιάλυτο υπόστρωμα και συγκεκριμένα στις θέσεις όπου το πολυστυρένιο είναι χλωρομεθυλιωμένο. Για την πεπτιδική σύνθεση στερεάς φάσης απαιτούνται τέσσερα στάδια (Σχήμα 10)¹. Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται η προστασία της αμινομάδας του πρώτου αμινοξέος. Στο δεύτερο στάδιο το προστατευμένο αμινοξύ συνδέεται με εστερικό δεσμό στο αδιάλυτο υπόστρωμα. Ακολουθεί έκπλυση ώστε να απομακρυνθούν περίσσειες αντιδραστηρίων και τυχόν ποσότητα αμινοξέους που δε συνδέθηκε. Στο τρίτο στάδιο, η αμινομάδα του συνδεδεμένου πλέον αμινοξέος αποπροστατεύεται και στο τέταρτο και τελευταίο στάδιο πραγματοποιείται η αντίδραση σύνδεσης του δεύτερου κατά σειρά αμινοξέος, ακολουθούμενη από έκπλυση όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Το τρίτο και τέταρτο στάδιο επαναλαμβάνονται έως ότου σχηματιστεί το πεπτίδιο με την επιθυμητή γραμμική αλληλουχία και μήκος. Στο τέλος και μετά την αποπροστασία όλων των λειτουργικών ομάδων των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων, ο εστερικός δεσμός διασπάται με κατεργασία με άνυδρο HF και το ελεύθερο πεπτίδιο αποχωρίζεται και απομονώνεται.



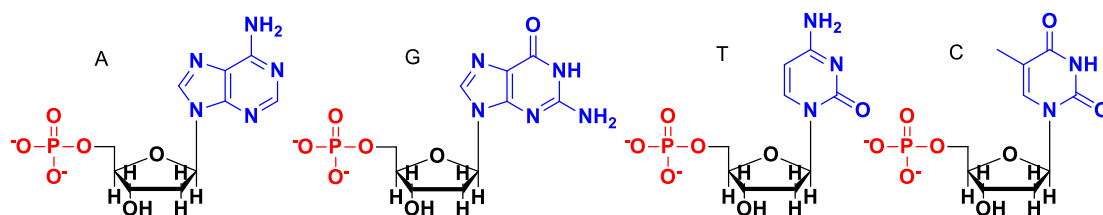
Σχήμα 10: Διαδικασία της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεά φάση. Y=προστατευτική ομάδα.

Τα πλεονεκτήματα της σύνθεσης σε στερεά φάση σε σχέση με αυτή σε διάλυμα είναι η μεγάλη της ταχύτητα, η αποφυγή των προβλημάτων διαλυτότητας στα πεπτίδια μεγάλου μοριακού βάρους, η αυξημένη της απόδοση, λόγω της μείωσης των απωλειών κατά τα στάδια της αντίδρασης και της έκπλυσης των προϊόντων και η δυνατότητα αυτοματοποίησής της. Όμως και πάλι η απόδοση δεν είναι 100% με αποτέλεσμα στα λαμβανόμενα προϊόντα να απαιτείται καθαρισμός κυρίως με χρωματογραφικές μεθόδους. Επιπλέον, επειδή ο εστερικός δεσμός μεταξύ πεπτιδίου και αδιάλυτου υποστρώματος πρέπει να είναι σταθερός σε όλη τη διάρκεια της σύνθεσης και να μην επηρεάζεται από τα αντιδραστήρια αποπροστασίας των ενδιάμεσων σταδίων,

απαιτούνται ισχυρές όξινες συνθήκες (άνυδρο HF) για τη διάσπασή του, οι οποίες είναι δυνατό να έχουν επίπτωση στην πεπτιδική αλυσίδα όπως να τη διασπάσουν ή να υποστεί ρακεμίσωση. Ωστόσο, η τεχνική στερεάς φάσης κατά Merrifield αποτελεί σήμερα την πλέον αξιόπιστη συνθετική μέθοδο για την παρασκευή πεπτιδίων με απολύτως καθορισμένη αλληλουχία αμινοξέων.

2.4.3 Σύνθεση με τεχνική ανασυνδιασμένου DNA ^{7,8}

Το DNA είναι ένα επίμηκες βιοπολυμερές από δεοξυνουκλεοτίδια που περιέχει τις γενετικές πληροφορίες του οργανισμού. Περιέχει ένα σάκχαρο (δεοξυριβόζη), μια φωσφορική ομάδα και μια βάση. Οι βάσεις του DNA μεταφέρουν τις γενετικές πληροφορίες ενώ το σάκχαρο και η φωσφορική ομάδα παίζουν δομικό ρόλο και αποτελούν την κύρια αλυσίδα του πολυμερούς. Υπάρχουν τέσσερα είδη βάσεων η αδενίνη (A), η γουανίνη (G), η θυμίνη (T) και η κυτοσίνη (C) (σχήμα 11).



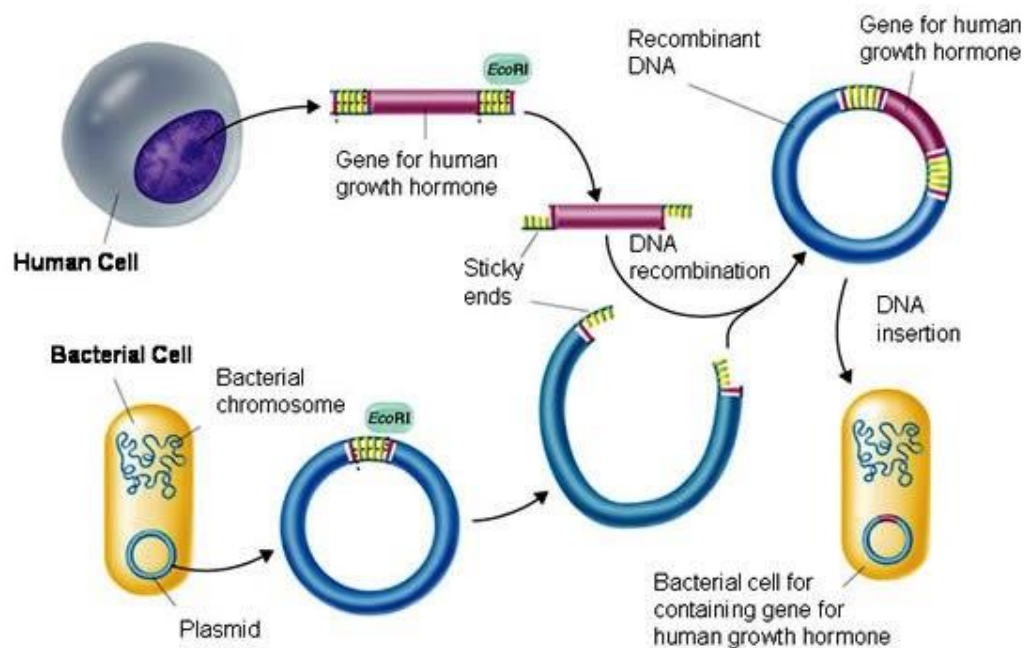
Σχήμα 11: Οι βάσεις του DNA, αδενίνη, γουανίνη, θυμίνη και κυτοσίνη.

Το 1953 οι Watson και Crick ανακάλυψαν την δομή της διπλής έλικας του DNA και την εξειδίκευση των βάσεων όπου η αδενίνη ζευγαρώνει με την θυμίνη και η γουανίνη με την κυτοσίνη λόγω δεσμών υδρογόνου και στερικών παραγόντων. Το DNA όμως δεν είναι το άμεσο εκμαγείο για την πρωτεϊνοσύνθεση. Προηγείται η διαδικασία της μεταγραφής (transcription) προς αγγελιοφόρο RNA και ακολουθεί η διαδικασία της μετάφρασης στα ριβοσώματα (translation) δηλαδή η σύνθεση των πρωτεϊνών. Η ροή των γενετικών πληροφοριών γίνεται ως εξής :



Υπάρχει σχέση μεταξύ της αλληλουχίας βάσεων του DNA και της αλληλουχίας των αμινοξέων σε μια πρωτεΐνη μέσω του γενετικού κώδικα. Ένα αμινοξύ κωδικοποιείται από μια ομάδα τριών βάσεων του DNA που λέγεται κωδικόνιο. Υπάρχουν $4^3=64$ πιθανές τριπλέτες, επομένως για τα περισσότερα αμινοξέα υπάρχουν περισσότερες από μια χαρακτηριστικές τριπλέτες δηλαδή ο γενετικός κώδικας είναι εκφυλισμένος. Οι βάσεις διαβάζονται διαδοχικά ξεκινώντας από ένα συγκεκριμένο σημείο (που αντιστοιχεί σε χαρακτηριστική αλληλουχία) και ονομάζονται προαγωγείς (promoters). Για παράδειγμα το 1961 ο Marshall Nirenberg⁹ ανακάλυψε ότι προσθήκη πολυουρακίλης σε ένα σύστημα ελεύθερων κυττάρων οδηγεί στην σύνθεση πολυφαινυλαλανίνης, διότι το κωδικόνιο UUU κωδικοποιεί την φαινυλαλανίνη. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατή η σύνθεση ομοπολυμερών πεπτιδίων χρησιμοποιώντας αγγελιοφόρους με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες τρινουκλεοτιδίων.

Την δεκαετία του 1970 οι Berg (βραβείο Nobel το 1980), Boyer και Cohen ανέπτυξαν την “τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA”. Η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την παρασκευή πρωτεϊνών με συγκεκριμένη αλληλουχία καθώς και την παραγωγή μη φυσικών πολυπεπτιδικών αλληλουχιών με σχεδόν απόλυτο έλεγχο της σύστασης. Αρχικά είναι απαραίτητη η απομόνωση του φορέα και η δημιουργία του συνθετικού γονιδίου. Μπορούν να δημιουργηθούν στο εργαστήριο και νέοι συνδυασμοί από γονίδια και να πολλαπλασιαστούν με την εισαγωγή τους σε κατάλληλα κύτταρα (κλωνοποίηση) τα οποία αναπαράγονται, χρησιμοποιώντας το DNA του ξενιστή. Η ενσωμάτωση του τμήματος του DNA γίνεται κυρίως σε φορείς που μπορούν να αναπαράγονται αυτόνομα όπως π.χ. τα πλασμίδια. Τα νέα τεχνητά γονίδια μπορούν να εκφραστούν σε μεγάλη απόδοση σε κύτταρα ξενιστών όπως τα βακτήρια (εικόνα 5).



Εικόνα 5: Απεικόνιση της τεχνικής του ανασυνδιασμένου DNA.

Πλεονέκτημα της μεθόδου, είναι η παρασκευή συγκεκριμένης αλληλουχίας πρωτεϊνών με μονομοριακή κατανομή, απαραίτητες για φαρμακευτικούς σκοπούς (όπως η ινσουλίνη) αλλά και για την σύνθεση δομικών πρωτεϊνών, ενώ μειονέκτημα, το μεγάλο χρονικό διάστημα που απαιτείται για την δημιουργία των ανασυνδυασμένων γονιδίων και κατ' επέκταση των ανασυνδυασμένων φορέων (η όλη διαδικασία διαρκεί σχεδόν ένα χρόνο και παρακολουθείται στενά), με το είδος του κύτταρου ξενιστή να επηρεάζει σημαντικά τον χρόνο. Επίσης, η όλη διαδικασία της ανάπτυξης θα πρέπει να διακοπεί προτού τα κύτταρα εισέλθουν στην φάση του θανάτου.

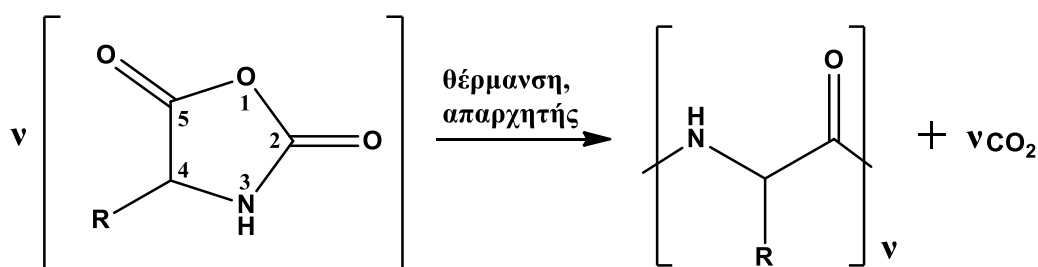
2.5 Σύνθεση πολυμερικών πεπτιδίων

Πολυμερή όπως οι πρωτεΐνες, οι πολυσακχαρίτες και τα νουκλεϊκά οξέα είναι παρόντα ως βασικά συστατικά σε όλα τα ζωντανά συστήματα. Συνθετικά πολυμερή που σχεδιάστηκαν να μιμούνται αυτά τα βιοπολυμερή, εξελίσσονται σε ένα πολύ ενεργό πεδίο λόγω της επιστημονικής και βιομηχανικής αξίας τους. Μια προσέγγιση περιλαμβάνει την απόκριση του βιοπολυμερούς σε εξωτερικά ερεθίσματα, διαδικασία που είναι κοινότυπη για ένα φυσικό βιοπολυμερές. Με βάση αυτή την προσέγγιση έχουν συντεθεί πληθώρα πολυμερών, κυρίως

πολυπεπτιδικών, με εφαρμογές στη μεταφορά φαρμάκων^{10,11}, και στη βιοτεχνολογία^{12,13}.

2.5.1 Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου N-καρβοξυανυδριτών α-αμινοξέων (NCA's).

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος παρασκευής όμο- και συμπολυμερών πεπτιδίων αποτελεί ο πολυμερισμός των N-καρβοξυανυδριτών των α-αμινοξέων. Πλεονεκτήματά της η ευκολία, η ταχύτητα, οι μεγάλες αποδόσεις που λαμβάνονται και η αποφυγή ρακεμίσωσης κατά την σύνθεση των πολυπεπτιδίων. Ο πολυμερισμός των N-καρβοξυανυδριτών μπορεί να προκληθεί από ένα μεγάλο αριθμό απαρχητών, περιλαμβάνοντας βάσεις όπως οι αμίνες, αλκοξείδια, υδροξυλικά ανιόντα, διάφορα άλατα και με θέρμανση (Σχήμα 12). Η αντίδραση προχωρά με το σχηματισμό CO₂ και κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες μπορεί να δώσει προϊόντα μεγάλου μοριακού βάρους.



Σχήμα 12: Γενική αντίδραση των NCA's.

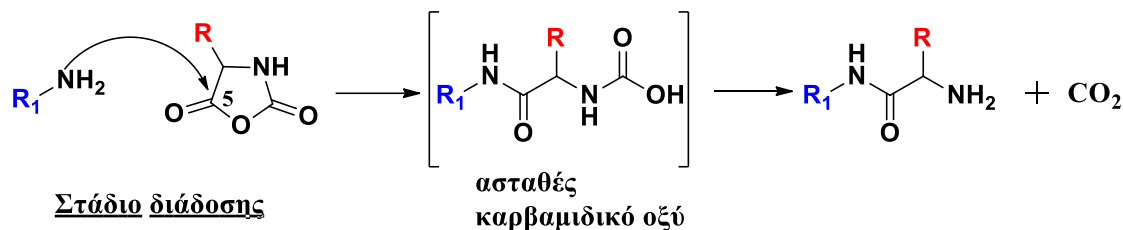
Με τη χρήση επισημασμένου ¹⁴C του NCA της γλυκίνης έχει αποδειχθεί ότι το CO₂ προέρχεται αποκλειστικά από τον C(2)¹⁴. Παρά τη φαινομενική απλότητα αυτής της αντίδρασης, ένας γενικός μηχανισμός που περιλαμβάνει όλα τα μονομερή NCA's ή καλύτερα όλους τους απαρχητές, δεν έχει περιγραφεί.

2.5.2 Κανονικός μηχανισμός αμινών (Normal Amine Mechanism).

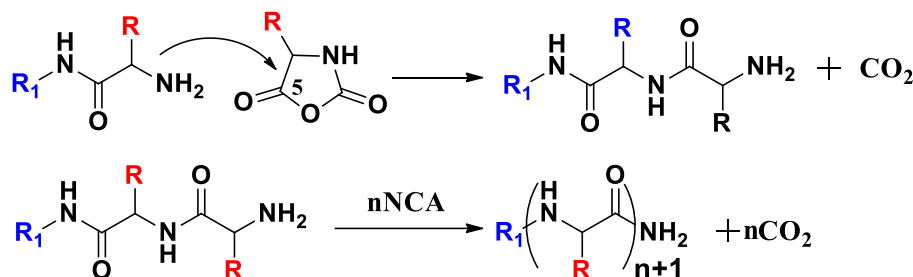
Ο μηχανισμός αυτός εφαρμόζεται γενικά σε πολυμερισμούς που εκκινούνται από μη ιοντικούς απαρχητές που έχουν τουλάχιστον ένα βασικό υδρογόνο, όπως οι πρωτοταγείς και δευτεροταγείς αμίνες, οι αλκοόλες και το νερό. Η αντίδραση είναι μια πυρηνόφιλη προσβολή (Σχήμα 13) πολλών σταδίων από

την τελική αμινομάδα στον C(5) του NCA, ακολουθούμενη από διάνοιξη του δακτυλίου, αποκαρβοξυλίωση και αναγέννηση του αμινοτελικού άκρου.

Στάδιο έναρξης



Στάδιο διάδοσης



Σχήμα 13: Στάδια έναρξης και διάδοσης του κανονικού ή αμινών μηχανισμού του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβοξυανυδριτών.

Κατά τον μηχανισμό αυτό κάθε μόριο απαρχητή εκκινεί μια πολυμερική αλυσίδα, έτσι ώστε ο κατά αριθμόν βαθμός πολυμερισμού να δίνεται από τον μοριακό λόγο μονομερούς προς τον απαρχητή. Η συγκέντρωση των αμινομάδων παραμένει σταθερή κατά την διάρκεια του πολυμερισμού και είναι ίδια με την αρχική του απαρχητή¹⁵. Όταν η δραστηριότητα του απαρχητή είναι συγκρίσιμη με αυτή του τελικού άκρου της αναπτυσσόμενης αλυσίδας τότε η ταχύτητα πολυμερισμού υπακούει κινητική πρώτης τάξης $-d[M]/dt = k[M][I]_0$, κατά την οποία η σταθερά ταχύτητας παραμένει σταθερή για το κάθε επιμέρους στάδιο. Υπό τις συνθήκες αυτές τόσο τα θεωρητικά αλλά και πειραματικά αποτελέσματα δείχνουν ότι η κατανομή του μοριακού βάρους θα είναι πολύ στενή (Poisson)¹⁶⁻¹⁸.

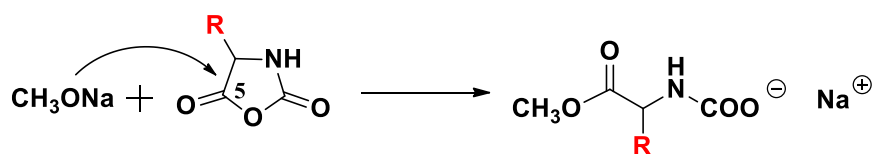
Αποκλίσεις από την γενική κινητική πρώτης τάξης συμβαίνουν με αλλαγή του διαλύτη και της διαμόρφωσης του πολυμερούς δυο εννοιών που συνδέονται μεταξύ τους όπως και έχει αποδειχθεί. Κατά την αλλαγή από ισχυρό πολικό διαλύτη, (διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF), ο-νιτροανισόλη και νιτροβενζόλιο), σε άπολο, τετραυδροφουράνιο (THF), 1,4- διοξάνιο, εμφανίζεται κινητική δυο

σταδίων με το δεύτερο στάδιο να είναι πέντε φορές γρηγορότερο. Η αντίδραση γίνεται αυτοκαταλυτική και η κατανομή μοριακών βαρών μεγαλώνει¹⁹. Η αλλαγή της κινητικής συμβαίνει σε μετατροπή 20-40%, όταν ο βαθμός πολυμερισμού είναι της τάξης 6-12, για τον πολυμερισμό του NCA του γ-βενζυλοεστέρα του γλουταμικού οξέος σε διοξάνιο. Οι Idelson και Blout πρότειναν²⁰ ότι η αύξηση στην ταχύτητα της αντίδρασης οφείλεται στην εκκίνηση της ελικοειδούς δομής της αναπτυσσόμενης αλυσίδας. Γεγονός που αποδεικνύει ότι η διαμόρφωση της αλυσίδας έχει επιρροή στην ταχύτητα της αντίδρασης. Περαιτέρω πειράματα εδραίωσαν την πρόταση αυτή. Βρέθηκε ότι το κρίσιμο μήκος για την διαμόρφωση της α-έλικας είναι της τάξης των επτά μονάδων γλουταμικού οξέος²¹, επίσης με πειράματα κλασματοποίησης βρήκαν δυο πληθυσμούς, έναν με μήκος αλυσίδας γύρω στο πέντε και τον δεύτερο στο 135 περίπου με ευρεία κατανομή μοριακών βαρών²².

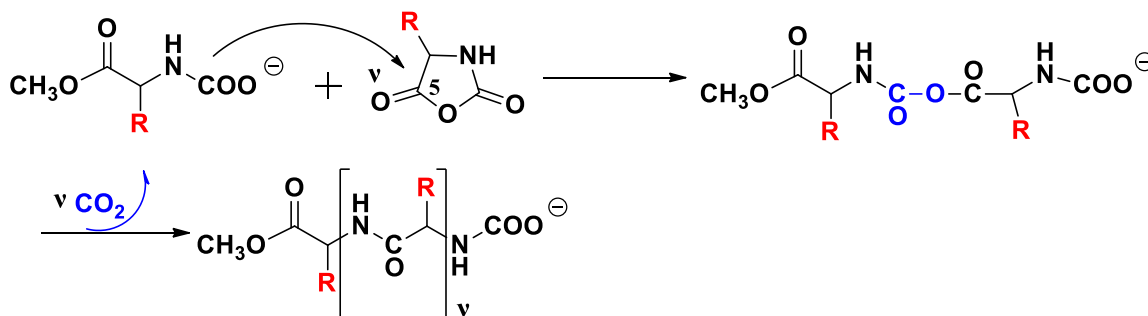
2.5.3 Μηχανισμός καρβαμιδικών(μηχανισμός του Blout).

Σύμφωνα με αυτό τον μηχανισμό των Idelson και Blout²³, μια ισχυρή βάση όπως το μεθοξείδιο του νατρίου αντιδρά με το μονομερές μέσω πυρηνόφιλης προσβολής στον C(5) του ανυδρίτη (σχήμα 14). Διάνοιξη του δακτυλίου επέρχεται προς σχηματισμό του καρβαμιδικού ανιόντος το οποίο είναι υπεύθυνο για την διάδοση του πολυμερισμού. Η αλυσίδα αναπτύσσεται με την προσθήκη του καρβαμιδικού ανιόντος σε ένα νέο μόριο ανυδρίτη προς σχηματισμό ενδιάμεσου καρβαμικού-καρβόξυλο μικτού ανυδρίτη. Εν συνεχεία απελευθερώνεται CO₂ προς σχηματισμό ενός νέου καρβαμιδικού ανιόντος.

Στάδιο έναρξης

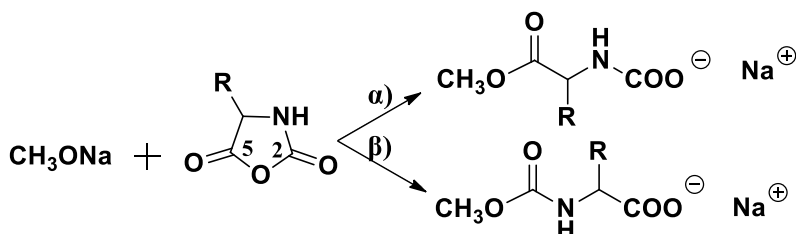


Στάδιο διάδοσης



Σχήμα 14: Στάδια έναρξης και διάδοσης του κανονικού ή αμινών μηχανισμού του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβοξυανυδριτών.

Ο μηχανισμός αυτός προτάθηκε ώστε να εξηγήσει το γεγονός ότι κατά την αντίδραση στοιχειομετρικών ποσοτήτων N-καρβοξυανυδριτών με μεθοξείδιο του νατρίου (σχήμα 15) δυο προϊόντα λαμβάνονταν, το μετά νατρίου άλας του καρβαμιδικού εστέρα και το άλας του N-καρβοξυάμινο οξέος.



Σχήμα 15: α) Προσβολή στον C(5), β) προσβολή στον C(2).

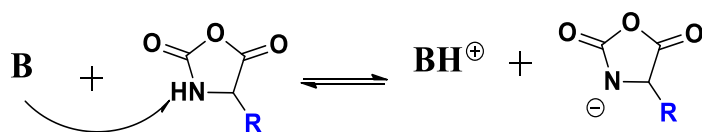
2.5.4 Μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς(active monomer).

Για να ερμηνεύσουν τους πολυμερισμούς που δεν υπάκουαν στο μηχανισμό του Blout οι Bamford και Block²⁴, πρότειναν έναν νέο που μετέπειτα τροποποιήθηκε από τον Szwarc²⁵. 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

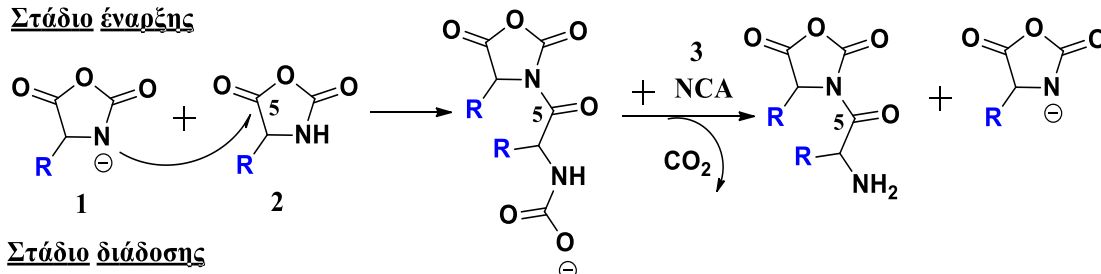
πυρηνοφιλικότητας του αλλά ως καταλύτης μέσω της βασικότητάς του για τον ιοντισμό του μονομερούς σε αντίδραση οξέος βάσεως προς σχηματισμό ανιόντος ανυδρίτη που δρα ως πυρηνόφιλο (σχήμα 16). Στην περίπτωση αυτή η πολυμερική αλυσίδα είναι αυτοεκκινούμενη.

Στην προέναρξη ο απαρχητής δρα ως βάση με το όξινο H του αζώτου στο δακτύλιο του μονομερούς. Ουσιαστικά δεν είναι απαρχητής πολυμερισμού, αλλά καταλύτης. Το μονομερές σε αυτό το μηχανισμό υποχρεωτικά πρέπει να είναι μη υποκατεστημένο, να έχει το βασικό υδρογόνο(NH). Κατά την έναρξη το σχηματιζόμενο ανιόν του NCA δρα ως πυρηνόφιλο προσβάλλοντας τον C(5) ενός μονομερούς NCA δίνοντας ένα διμερές και απελευθερώνοντας διοξείδιο του άνθρακα. Φαίνεται ότι ο μηχανισμός περιλαμβάνει τρία μόρια μονομερούς και ότι αυτό που αναγεννάται είναι το ανιόν του NCA σε κάθε στάδιο της αντίδρασης.

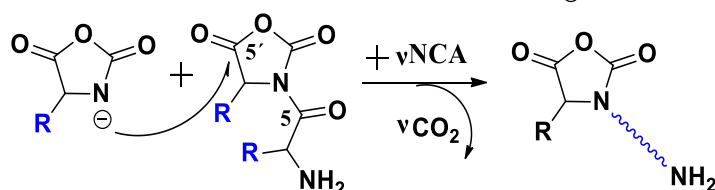
Στάδιο προέναρξης



Στάδιο έναρξης



Στάδιο διάδοσης



Σχήμα 16: Στάδια μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς. Το ανιόν NCA μπορεί να προσβάλλει είτε την αναπτυσσόμενη αλυσίδα είτε ένα νέο μόριο NCA.

Η παρουσία της καρβαμιδικής ομάδας παίζει πολύ σημαντικό ρόλο για την αντίδραση. Ελεύθερο καρβαμιδικό οξύ είναι πολύ ασταθές για να απομονωθεί και αποκαρβοξυλιώνεται γρήγορα, όμως καρβαμικά άλατα είναι σταθερά και

σχηματίζονται εύκολα. Η σταθερότητα των καρβαμιδικών αλάτων εξαρτάται από την φύση του αντισταθμιστικού κατιόντος και από την φύση των υποκαταστατών του άζωτου στον ανυδρίτη. Στη περίπτωση που χρησιμοποιούνται ισχυρές βάσεις ως απαρχητές το αντισταθμιστικό ιόν εξασφαλίζει την σταθερότητα τους. Επίσης όση μεγαλύτερη ηλεκτρονιακή πυκνότητα έχει το άζωτο τόσο πιο σταθερό είναι το καρβαμίδιο. Κάτω από αυτές τις συνθήκες οι καρβαμιδικές ομάδες δεν έχουν κανένα λόγο να αποκαρβοξυλιωθούν συστηματικά αλλά διατηρούνται μέχρι μια ορισμένη συγκέντρωση που σχετίζεται με την βασικότητα του μίγματος.

Ο μηχανισμός αυτός είναι πάρα πολύ γρήγορος, τουλάχιστον 100 φορές γρηγορότερος από τον κανονικό μηχανισμό. Επίσης παρατηρούμε ότι το τμήμα του απαρχητή δεν ενσωματώνεται στην τελική αλυσίδα. Τα πολυπεπτίδια που λαμβάνονται με αυτή τη μέθοδο έχουν υψηλό μοριακό βάρος και μεγάλη μοριακή πολυδιασπορά. 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 ετερογένεια στο τελικό προϊόν. Επίσης υπάρχουν πλήθος συνδυασμών και πιθανών παράπλευρων αντιδράσεων που μπορούν να τερματίσουν τον πολυμερισμό. Για παράδειγμα και τα τρία καρβονύλια του τελικού διμερούς είναι λιγότερο ή περισσότερο πολωμένα και επιδέχονται προσβολή από NCA ανιόν. Από αυτά το μόνο που αποκαρβοξυλιώνεται είναι το ενδιάμεσο από την προσβολή του C(5). Αυξημένες είναι και οι πιθανότητες παράπλευρων αντιδράσεων, διάσπασης, μεταφοράς αλυσίδας, ακόμα και ενδομοριακής κυκλοποίησης.

2.5.5 Εκκίνηση με δευτεροταγείς αμίνες.

Οι δευτεροταγείς αμίνες μπορούν να αντιδράσουν²⁶ με τους N-καρβοξυανυδρίτες με δυο τρόπους, ως πυρηνόφιλα, προσβάλλοντας τον C(5) όπως οι αμίνες και ως βάσεις, όπως οι τριτοταγείς αμίνες. Η πορεία που θα ακολουθηθεί εξαρτάται από τον λόγο της πυρηνοφιλίας προς την βασικότητα και τις συνθήκες της αντίδρασης. Με βάση αυτό τον λόγο επέρχεται ένας πρώτος διαχωρισμός μεταξύ των δευτεροταγών αμινών. Στην πρώτη ομάδα βρίσκονται οι αμίνες με χαμηλό λόγο πυρηνοφιλίας/βασικότητα. Εδώ ανήκουν όλες οι

αλειφατικές με υποκαταστάτες πιο ογκώδεις από το αιθύλιο, όπως η διπροπυλαμίνη, διίσοπροπυλαμίνη και η δικυκλοεξυλαμίνη. Στην δεύτερη ανήκουν αυτές με υψηλό λόγο, αλλά και κάποιες αρωματικές λόγω της χαμηλής βασικότητάς τους, παραδείγματα αποτελούν η διμεθυλαμίνη, διαιθυλαμίνη, η πιπεριδίνη και η μορφολίνη. Μεταξύ των δυο ακραίων καταστάσεων βρίσκονται αμίνες όπως η διαιθυλαμίνη και η α-μεθυλοπιπεριδίνη, που μπορούν να δράσουν είτε ως βάσεις είτε ως πυρηνόφιλα αναλόγως των συνθηκών της αντίδρασης.

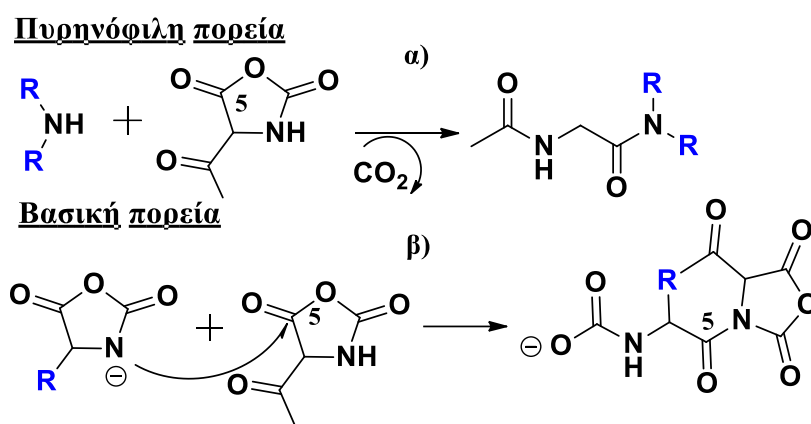
Ο διαχωρισμός σε ομάδες των δευτεροταγών αμινών βασίζεται σε πειραματικά αποτελέσματα, μέσω μεθόδων προσδιορισμού του μοριακού βάρους, ανάλυση ακραίων ομάδων, μετρήσεις κινητικής και μέτρηση του εκπνευόμενου CO₂.

Οι Blout και Karlson²⁷, Bamford και Block²⁸, Goodman και Peggion²⁹, συνέκριναν τον μέσο βαθμό πολυμερισμού απαρχητή διαιθυλαμίνης ή της διίσοπροπυλαμίνης σε πολυμερισμούς του γ-O-Bz-Glu-NCA με αυτόν που προκύπτει από την μοριακή αναλογία μονομερούς προς απαρχητή, ο οποίος είναι ο μέσος βαθμός πολυμερισμού. Από την μεγαλύτερη πειραματική τιμή του κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι συγκεκριμένοι απαρχητές εκκινούν πολυμερισμό αποκλειστικά μέσω ενεργοποιημένου μονομερούς. Ο βαθμός πολυμερισμού είχε εξαχθεί από μετρήσεις ιξωδομετρίας και έτσι ήταν κοντά στον μέσο κατά βάρος βαθμό, γεγονός που είναι επιδεκτικό σε σφάλματα καθώς την εποχή εκείνη λάμβαναν πολυμερή με μεγάλη πολυδιασπορά DP_w/DP_n που έφτανε και το δέκα. Έτσι το πειραματικό μοριακό βάρος θα μπορούσε να έχει υπερτιμηθεί κατά μια τάξη μεγέθους. Όσον αφορά τις κινητικές μελέτες πρώτοι οι Shalitin και Katchalski³⁰, βρήκαν κινητική πρώτης τάξης, ενδεικτικό του κανονικού μηχανισμού, για τον πολυμερισμό με διαιθυλαμίνη σε DMF.

Από την ανάλυση ακραίων ομάδων βγήκαν χρησιμότερα συμπεράσματα. Οι Goodman και Peggion^{31,32} χρησιμοποίησαν επισημασμένους απαρχητές με ¹⁴C, την διαιθυλαμίνη, την διβουτυλαμίνη και την διίσοπροπυλαμίνη και βρήκαν ότι η πρώτη δρούσε και σαν πυρηνόφιλο και ως βάση ενώ οι δυο τελευταίες αποκλειστικά ως βάσεις. Τα συμπεράσματα εξήχθηκαν από μέτρηση της

ραδιενέργειας στα τελικά πολυμερή εκμεταλλευόμενοι μια βασική διαφορά μεταξύ των δυο μηχανισμών, την ύπαρξη ή όχι του απαρχητή στα προϊόντα.

Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν αργότερα από τον Kricheldorf³³ με κινητικές και φασματοσκοπικές μελέτες. Ο προαναφερόμενος χρησιμοποίησε έναν έξυπνο και πρακτικό τρόπο να μελετήσει την μορφολίνη, την διαιθυλαμίνη, την διίσοπροπυλαμίνη και την δικυκλοεξυλαμίνη στον πολυμερισμό της γλυκίνης. Προσθέτοντας ακετυλιωμένο N-καρβοξυανυδρίτη της γλυκίνης στους πολυμερισμούς παρουσία των παραπάνω αμινών και του μη ακετυλιωμένου, μελέτησε τα προϊόντα που λάμβανε για κάθε σύστημα. Το πείραμα βασιζόταν στο γεγονός ότι η N-acetyl-Gly-NCA είναι περισσότερο ηλεκτρονιόφιλη από το αντίστοιχο NCA, έτσι ακετυλιώνει την δευτεροταγή αμίνη πριν αυτή προλάβει να εκκινήσει πολυμερισμό εάν και μόνο αν η τελευταία δρά ως πυρηνόφιλο (σχήμα 17). Στην αντίθετη περίπτωση η N-acetyl-Gly-NCA δρά ως συγκαταλύτης και επιταχύνει τον πολυμερισμό καθώς το στάδιο της έναρξης είναι γρηγορότερο από αυτό του κλασικού μηχανισμού του ενεργοποιημένου μονομερούς.

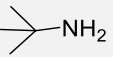
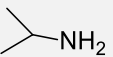
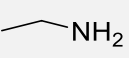
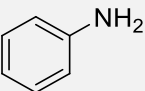


Σχήμα 17: α)Ακετυλίωση απαρχητή, β)γρηγορότερη έναρξη λόγω του N-acetyl-Gly-NCA.

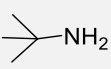
Η πορεία α) διαπιστώθηκε για την μορφολίνη και την διαιθυλαμίνη που δεν απέδωσαν πολυμερικά προϊόντα για διάφορες αναλογίες μονομερούς προς καταλύτη, αντιθέτως οι εναπομείναντες αμίνες έδωσαν την πορεία β). Επιπλέον με μελέτες IR και NMR αποδείχτηκε η συμμετοχή της ακέτυλο γλυκίνης στην πολυμερική αλυσίδα, γεγονός που αποτελεί απόδειξη για τον μηχανισμό του ενεργοποιημένου μονομερούς.

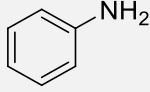
Πρώτος ο Korpple^{34,35} διερεύνησε τις αντιδράσεις (πίνακας 2) των αμινών με τους N-καρβοξυανυδρίτες καταλήγοντας στο ότι η πορεία της αντίδρασης εξαρτάται από παράγοντες όπως η βασικότητα, οι στεreoχημικές απαιτήσεις, η συγκέντρωση, ο διαλύτης (πίνακας 3) αλλά και το είδος του ανυδρίτη.

Πίνακας 2: Απόδοση (%) σε υδαντοϊκά οξέα από την αντίδραση αμινών με διάφορα NCA's.

Αμίνη	Gly-NCA	Sar-NCA	Phe-NCA
	100	—	80
	Low	Low	2.5
	90	0	60
	45	0	35(73)
	55	—	10(92)
	—	—	0(85)

Πίνακας 3: Επίδραση διαλύτη κατά την αντίδραση δυο ισοδυνάμων αμίνης με Phe-NCA.

Αμίνη	Διαλύτης	% σε υδαντοϊκό	% σε πολυπεπτίδιο
	CH ₂ Cl ₂	(1:1) 60	0
	Dioxane	9	45
	(CH ₃) ₃ N	6	50
	CH ₂ Cl ₂	(1:1)0	0

	Dioxane	0	0
	CH ₂ Cl ₂	(1:1)0	15
	(CH ₃) ₃ N	0	15

Αν η αμίνη προσβάλλει πυρηνόφιλα τον ανυδρίτη στους άνθρακες (5) και (2) ανάλογα με το σχήμα 17, τότε θα προκύψουν τα αντίστοιχα αμιδοάμινο οξέα και τα υδαντοϊκά. Η πρώτη πορεία είναι που οδηγεί σε πολυπεπτίδια ενώ η δεύτερη αποτελεί τον συνήθη τερματισμό τους. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα πειράματα έγιναν με μεγάλη περίσσεια της αμίνης προς τον ανυδρίτη. Από τους παραπάνω πίνακες προκύπτουν τα κάτωθι συμπεράσματα. Με τον ανυδρίτη της φαινυλαλανίνης και τις αλειφατικές αμίνες ο λόγος των ουρείδο οξέων προς τα αμιδοάμινο (δίνονται στην παρένθεση πίνακας 2) φαίνεται να σχετίζεται με τις στερεοχημικές απαιτήσεις της κάθε αμίνης. Στην διμεθυλαμίνη και στην αιθυλαμίνη το αμιδοάμινο παράγωγο είναι το επικρατές προϊόν. Στην γλυκίνη υπάρχει παρόμοια συμπεριφορά, αποδεικνύοντας ότι η βενζυλική ομάδα στην φαινυλαλανίνη δεν αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την πορεία της αντίδρασης. Αντιθέτως η σαρκοζίνη αντέδρασε αποκλειστικά με την πρώτη πορεία ανεξαρτήτως αμίνης. Επιπλέον για την φαινυλαλανίνη φαίνεται (πίνακας 2) ότι για να προχωρήσει ο πολυμερισμός της οι στερεοχημικές απαιτήσεις πρέπει να είναι λιγότερες από αυτές τις ισοπροπυλαμίνης όπου σχεδόν μια στις δυο φορές καταλήγει στην λάθος πορεία, ικανοποίηση αυτών έρχεται από την ανιλίνη και την διμεθυλαμίνη.

Η ανιλίνη ως αρωματική αμίνη ($pK_a=4.58$), είναι ασθενέστερη βάση από τις αλειφατικές και αντιδρά αποκλειστικά με την πρώτη πορεία. Ορισμένο όμως ποσοστό πεπτιδίου σχηματίζεται παρά την μεγάλη της περίσσεια, γεγονός που δείχνει ότι δεν είναι τόσο δραστική προς τον NCA, όσο τα πιο βασικά αμιδοάμινο άκρα του πεπτιδίου που σχηματίζεται. Φαινόμενο το οποίο θα ήταν καταστροφικό για την έναρξη ενός πολυμερισμού καθώς η έναρξη θα ήταν πιο αργή από την διάδοση. Η διμεθυλαμίνη εμφανίζει την μεγαλύτερη εκλεκτικότητα

προς τον ανυδρίτη, εφόσον δεν παρατηρήθηκε καθόλου σχηματισμός πεπτιδίου ακόμα και στην περίπτωση που η αντίδραση έγινε στοιχειομετρικά.

Η επίδραση του διαλύτη μελετήθηκε από τους Peggion και Scoffone³⁶, με την χρήση της διίσοπροπυλαμίνης για τον πολυμερισμό του γ -O-Bz-Glu-NCA σε διαλύτη DMF και διοξάνιο καθώς και στα μίγματά τους. Χρησιμοποιώντας πάντα σταθερή στοιχειομετρία παρατήρησαν ότι καθώς μετέβαιναν από το λιγότερο πολικό διοξάνιο στο περισσότερο διμεθυλοφορμαμίδιο, τα μοριακά βάρη που λάμβαναν πλησίαζαν όλο και περισσότερο σε αυτήν. Γεγονός που εξηγείται ότι σε πιο πολικά περιβάλλοντα αυξάνονται οι πυρηνόφιλες προσβολές, άρα και η επίδραση του κανονικού μηχανισμού στα τελικά πολυπεπτίδια, ακόμα και στην περίπτωση της υψηλά παρεμποδισμένης αμίνης που χρησιμοποίησαν.

Συμπερασματικά ορισμένες δευτεροταγείς αμίνες όπως και οι πρωτοταγείς μπορούν να δώσουν σταθερές τελικές αμινομάδες μέσω πυρηνόφιλων προσβολών στον C(5) του NCA, μέσω του κανονικού μηχανισμού. Αρκεί η πυρηνοφιλία τους να υπερνικά την βασικότητα τους προϋπόθεση που εξαρτάται άμεσα από το στερεοχημικό περιβάλλον στο άτομο του αζώτου της αμινομάδας αλλά και από την συγκέντρωση και τον διαλύτη.

2.5.6 Πολυμερισμός με σύμπλοκα των στοιχείων μετάπτωσης.

Τα σύμπλοκα που χρησιμοποιούνται παρέχουν ενεργά κέντρα που είναι λιγότερο προσβάσιμα λόγω στερεοχημικής και ηλεκτρονιακής παρεμπόδισης με αποτέλεσμα οι παράπλευρες αντιδράσεις τερματισμού και μεταφοράς αλυσίδας να περιορίζονται. Με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατόν να παρασκευαστούν ομοπολυπεπτίδια και συμπολυπεπτίδια με σχετικά μικρή κατανομή μοριακών βαρών και ελεγχόμενο μοριακό βάρος. Η πιο δημοφιλής και ταυτόχρονα λιγότερο διαδεδομένη τεχνική στον πολυμερισμό των NCAs είναι αυτή που έχει προταθεί από την ομάδα του Deming, στην οποία χρησιμοποιούνται σύμπλοκα στοιχείων μετάπτωσης ως δραστικά κέντρα για τον έλεγχο της προσθήκης των μονομερών στα άκρα των αναπτυσσόμενων αλυσίδων. Γενικά, έχει αποδειχθεί τόσο στην οργανική χημεία όσο και στη σύνθεση των πολυμερών, ότι η χρήση των στοιχείων μετάπτωσης αυξάνει την

εκλεκτικότητα μίας αντίδρασης. Σύμφωνα με αυτή την προσέγγιση, η ομάδα του Deming έχει πραγματοποιήσει σημαντικά βήματα για την επίτευξη ελεγχόμενου πολυμερισμού των NCAs την τελευταία δεκαετία.

Άκρως δραστικοί απαρχητές νικελίου και κοβαλτίου μηδενικού σθένους (π.χ. $\text{bpyNi(COD)}^{37,38}$ όπου $\text{bpy} = 2,2'$ -διπυριδίνη, $\text{COD} = 1,5$ -κυκλοοκταδιένιο και $(\text{PMe}_3)_4\text{Co}^{39}$) αναπτύχθηκαν από τον Deming, οι οποίοι επιτρέπουν το ζωντανό πολυμερισμό των NCAs δίνοντας πολυτεππίδια υψηλού μοριακού βάρους. Τα μεταλλικά ιόντα μπορούν στη συνέχεια να απομακρυνθούν από τα παραγόμενα πολυμερή με απλή καταβύθιση ή μέσω διαδικασίας διαπίδυσης (dialysis) των δειγμάτων μετά τον πολυμερισμό

Για αρχή, έπρεπε να βρεθεί ο κατάλληλος συνδυασμός μετάλλου, υποκαταστατών και μέσου αντίδρασης ώστε το σύμπλοκο να είναι αρκετά δραστικό παρέχοντας ικανοποιητική ταχύτητα έναρξης και διάδοσης πολυμερισμού, αλλά ταυτόχρονα και σταθερό για να αποφεύγεται η αποσύνθεση του ενεργού οργανομεταλλικού κέντρου και ο τερματισμός στην ανάπτυξη της αλυσίδας. Θα έπρεπε η τελική αμινομάδα της αναπτυσσόμενης αλυσίδας να παραμένει συνδεδεμένη με το μέταλλο καθ' όλη τη διάρκεια του πολυμερισμού ώστε να είναι εφικτός ο έλεγχος της προσθήκης των υπολοίπων μονομερών. Μετά από πολλές προσπάθειες κατέληξαν πως ο καλύτερος συνδυασμός υποκαταστάτη και μετάλλου είναι το σύμπλοκο bpyNi(COD) όπου $\text{bpy} = 2,2'$ -διπυριδίνη και $\text{COD} = 1,5$ -κυκλοοκταδιένιο σε διαλύτη DMF, το οποίο πολυμερίζει τον NCA του γ -βενζυλεστέρα του L-γλουταμικού οξέος ποσοτικά και δίνει πολυμερή με καλή κατανομή μοριακών βαρών.

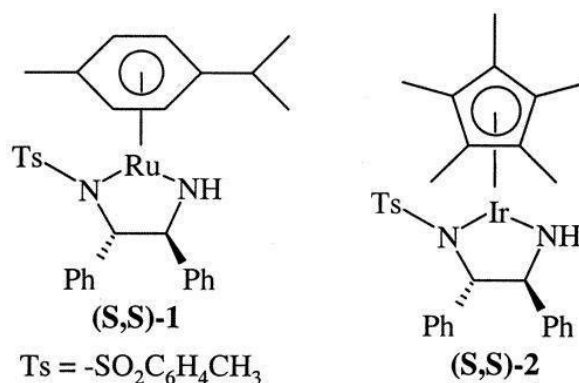
Οι μηχανιστικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στη διαδικασία έναρξης του πολυμερισμού έδειξαν ότι τα σύμπλοκα αυτά αντιδρούν με τους NCAs για να σχηματίσουν μεταλλοκυκλικά σύμπλοκα με οξειδωτική προσθήκη δια μέσου των δεσμών ανυδρίτη του μονομερούς³⁷⁻³⁹. Πειράματα ισοτοπικής επισήμανσης επιβεβαίωσαν τη στερεοεκλεκτική οξειδωτική προσθήκη στον O-C_5 δεσμό. Αυτή η αντίδραση οξειδωτικής προσθήκης ακολουθείται από σύνδεση ενός δεύτερου μονομερούς για να ληφθούν σύμπλοκα με εξαμελή αμιδο-αλκυλο-μεταλλοκυκλικό δακτύλιο (Σχήμα 18). Το ενδιάμεσο

Το προκύπτον αμιδο-αμιδικό σύμπλοκο θεωρείται ότι αποτελεί το ενεργό κέντρο που προάγει τον πολυμερισμό των NCAs. Η πυρηνόφιλη αμιδο ομάδα του συμπλόκου προσβάλλει το ηλεκτρονιόφιλο καρβονύλιο στη θέση 5 του NCA για να επιτευχθεί μετά από την απόσπαση του διοξειδίου του άνθρακα και τη μετανάστευση του πρωτονίου η διάδοση του πολυμερισμού. Με τον τρόπο αυτό η ομάδα του Deming έχει παρασκευάσει πλήθος πολυτεπτιδίων με στενές κατανομές μοριακών βαρών ($< 1,20$) και με ελεγχόμενα μοριακά βάρη ($500 < M_n < 500.000$)⁴¹, ενώ με τη χρήση διαφορετικών μονομερών συντέθηκαν κατά συστάδες συμπολυτεπτιδία με καθορισμένη αλληλουχία και σύσταση^{42,43}.



Ο διαλύτης και οι υποκαταστάτες επηρεάζουν καθοριστικά την πορεία του πολυμερισμού, κυρίως κατά το στάδιο της έναρξης, μειώνοντας τον αριθμό των ενεργών κέντρων. Χρησιμοποιώντας π.χ υποκαταστάτη bpy , διαπιστώθηκε σχηματισμός του πενταμελούς δακτυλίου μόνο σε DMF σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ενώ σε THF χρειάστηκε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 80°C , για την ενεργοποίηση του προ-εκκινητή. Αυξάνοντας την πολικότητα του διαλύτη, επιταχύνεται η συστολή του μεταλλοκυκλικού δακτυλίου διότι μόρια πολικού διαλύτη δρουν σαν υποκατάστατες σύμπλεξης με το μέταλλο, εμποδίζοντας τον σχηματισμό για παράδειγμα διμερών ανενεργών συσσωματωμάτων εξαμελών δακτυλίων που εμφανίζονται σε THF. Για τον λόγο αυτό αναφέρει ο Deming, σε λιγότερο πολικούς από το DMF διαλύτες, όπως τολουόλιο, διοξάνιο και THF, τα μοριακά βάρη κατά τον πολυμερισμό Bn-Glu NCA, ήταν 3-5 φορές μεγαλύτερα από τα αναμενόμενα, ανεξάρτητα από τον υποκαταστάτη.

Συσχέτιση παρατηρήθηκε επίσης και με την ηλεκτραρνητικότητα των υποκαταστατών. Με χρήση υποκαταστατών που είναι ισχυροί δότες e^{-} , όπως το tert -βουτύλιο, το μεταλλικό κέντρο ήταν πλούσιο ηλεκτρονιακά και ο δεσμός με την αμίνη ασθενής, ενώ με χρήση υποκαταστατών που είναι δέκτες e^{-} , όπως NO_2 , το μεταλλικό κέντρο ήταν ηλεκτρονιακά ελλιπές και ο δεσμός με την αμίνη ισχυρός περιορίζοντας έτσι την δραστηρότητά του. Τέλος, με χρήση ασύμμετρων υποκαταστατών ανέπτυξε μια μέθοδο για στερεοχημικό έλεγχο στην πεπτιδική σύνθεση καθώς κατόρθωσε να έχει στερεοεκλεκτικότητα στην προσθήκη D και L ισομερών⁴⁴ (σχήμα 19). Αλλαγή μιας χειρικής διαμόρφωσης σε ένα μόνο αμινοξύ, μπορεί να σταθεροποιεί ή να διακόπτει την δομή του πεπτιδίου.



Σχήμα 19: Σύμπλοκα στοιχείων μετάπτωσης με στερεοεκλεκτικότητα στον πολυμερισμό NCA's.

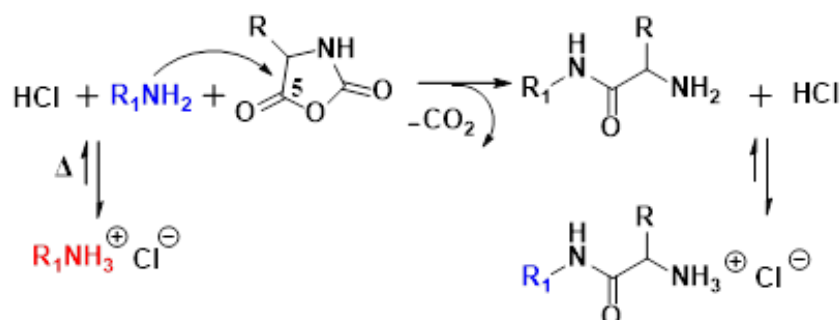
Συμπερασματικά, η μέθοδος αυτή είναι πολύ σημαντική και έδωσε ώθηση στη σύνθεση πολυαμινοξέων. Ωστόσο, απαιτεί ένα επιπλέον στάδιο αυτό της απομάκρυνσης του βιοτοξικού μετάλλου, διαδικασία η οποία δεν είναι ποσοτική. Περιορίζεται, με αυτόν τον τρόπο, η χρησιμότητα των παραγόμενων πολυμερών, των οποίων οι σημαντικότερες εφαρμογές στηρίζονται στη βιοσυμβατότητά τους.

2.5.7 Πολυμερισμός με υδροχλωρικές αμίνες.

Η δραστηριότητα των υδροχλωρικών αμινών είχε πρώτα μελετηθεί από τον Knober^{45,46} σε αντιδράσεις με NCAs. Είχε διαπιστωθεί ότι μόνο ένα μόριο NCA αντιδρά με το υδροχλωρικό άλας της αμίνης και αυτό αποδόθηκε στην μειωμένη πυρηνοφιλία σε σχέση με την ελεύθερη αμίνη. Από τις ίδιες μελέτες ήταν γνωστό ότι η συγκέντρωση στο διάλυμα των ελεύθερων αμινών αυξάνεται συναρτήσει της θερμοκρασίας. Οι ελεύθερες αμινομάδες είναι αυτές που μπορούν να διαδώσουν τον πολυμερισμό στο σύστημα αυτό.

Έχοντας ως βάση τα παραπάνω ο Schlaad⁴⁷, χρησιμοποίησε υδροχλωρικά άλατα αμινοτελικών μακροαπαρχητών, με την σκέψη ότι τα επιπλέον πρωτόνια του συστήματος θα εμποδίζαν τον σχηματισμό του ενεργοποιημένου μονομερούς, εφόσον η επαναπρωτονίωση του μονομερούς θα ήταν γρηγορότερη από την πυρηνόφιλη προσβολή σε ένα άλλο μονομερές (σχήμα 20). Η δραστηριότητα των υδροχλωρικών αλάτων προκύπτει από το σχηματισμό μικρής ποσότητας της ελεύθερης αμίνης μέσω αντιστρεπτής αποδέσμευσης υδροχλωρίου. Αυτή η ισορροπία, η οποία βρίσκεται κυρίως προς την πλευρά

των αλάτων, επιτρέπει την ύπαρξη ενεργών κέντρων για μικρό χρονικό διάστημα.



Σχήμα 20: Χρήση υδροχλωρικού άλατος πρωτοταγούς αμίνης ως απαρχητή για τον ελεγχόμενο πολυμερισμό των NCAs από την ομάδα του Schlaad.

Για να επιτευχθεί ελεγχόμενος πολυμερισμός και όχι απλώς προσθήκη ενός μοναδικού NCA, η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 40 °C έως 80 °C ώστε να αυξηθεί η συγκέντρωση ισορροπίας της ελεύθερης αμίνης, επομένως και των ενεργών κέντρων που εκκινούν ή διαδίδουν τον πολυμερισμό. Σε αυτή την περίπτωση ο πολυμερισμός διήρκεσε τρείς μέρες με αποδόσεις που κυμάνθηκαν από 60-85%, με τα υψηλότερα ποσοστά να προέρχονται από τις μεγαλύτερες σε θερμοκρασία συνθήκες. Παρόλο που η κατανομή ήταν αρκετά χαμηλή <1.1 τα μοριακά βάρη ήταν κατά 20-30% μεγαλύτερα από τα αναμενόμενα.

Περιορισμοί προέρχονται από τις χαμηλές αποδόσεις της τεχνικής αυτής, καθώς απαιτείται απομόνωση του προϊόντος ώστε να απομακρυνθεί το μονομερές που δεν αντέδρασε. Πιθανόν το ίδιο να έχει ισχύ και για τον μακροαπαρχητή. Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι η δυσκολία σύνθεσης πολυμερών με πιο πολύπλοκη αρχιτεκτονική πέραν της δισυσταδικής.

2.5.8 Πολυμερισμός με τριμεθυλοπυριτικές αμίνες.

Το 2007 ο Cheng^{48,49} πρότεινε ένα σύστημα με την χρήση του εξαμεθυλοδισυλαζανίου (HDMS) για τον πολυμερισμό των N-καρβοξυανυδριτών. Αυτός ο πολυμερισμός εξελίσσεται μέσω ενός μοναδικού τριμεθυλοπυριτικού καρβαμιδικού (TMS-CBM) μέσου διάδοσης του πολυμερισμού, που περιλαμβάνει σπάσιμο του δεσμού Si-N του εξαμέθυλοδισυλαζανίου κατά την έναρξη. Η προκύπτουσα τριμεθυλοπυριτική

(TMS) αμίνη ανοίγει τον δακτύλιο του NCA στην θέση 5 προς σχηματισμό TMS-αμιδίου στον τελικό άνθρακα, ενώ ταυτόχρονα στον N-τελικό άνθρακα σχηματίζεται η ομάδα που διαδίδει τον πολυμερισμό. Κατά την διάδοση γίνεται μεταφορά της τριμεθυλοπυριτικής ομάδας από τον τελικό άνθρακα στο εισερχόμενο μονομερές προς σχηματισμό νέου TMS-CBM.

Ο μηχανισμός αυτός διαφέρει τόσο από τον κανονικό μηχανισμό, όσο και από το μηχανισμό ενεργοποιημένου μονομερούς που αναφέρθηκαν παραπάνω για τον πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου των NCAs, ενώ παρουσιάζει ομοιότητες με το μηχανισμό που ακολουθείται στους πολυμερισμούς μεταφοράς ομάδας των ακρυλικών μονομερών. Με το σύστημα αυτό η ομάδα του Cheng παρασκεύασε ομοπολυπεπτίδια (PBLG) και δισυσταδικά συμπολυπεπτίδια (PZLL-PBLG) με ελεγχόμενα μοριακά βάρη, με ικανοποιητικές κατανομές μοριακών βαρών (~1,2) και υψηλές αποδόσεις (>99%). Μεγάλο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η εισαγωγή δραστικών ομάδων στο C-τελικό άκρο του πολυπεπτιδίου με την χρήση κατάλληλων αμινών.

2.5.9 Πολυμερισμός μέσω πρωτοταγών αμινών και χρήση τεχνικών υψηλού κενού.

Το πρώτο ζωντανό σύστημα μέσω πρωτοταγών αμινών αναφέρθηκε το 2004 από τους Iatrou, Hadjichristidis⁵⁰, με την εφαρμογή τεχνικών υψηλού κενού. Βασισμένοι στις αδυναμίες του μηχανισμού των αμινών ως προς τις προσμίξεις από όλη την συνθετική πορεία των NCAs εφάρμοσαν την τεχνική του υψηλού κενού (HVT). Τηρώντας αυστηρά πρωτόκολλα καθαρισμού σε όλα τα επιμέρους αντιδραστήρια κατάφεραν να απομονώσουν μονομερή των N-καρβοξυανυδριτών σε υψηλές αποδόσεις και καθαρότητα.

Οι N-καρβοξυανυδρίτες αποτελούν μοναδικό παράδειγμα ετεροκυκλικών ενώσεων ως προς την ευαισθησία τους σε θέρμανση, νερό και βάσεις (σχήμα 21). 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 καθαρότητας⁸⁷ δίνουν παράπλευρες αντιδράσεις^{51,52}(σχήμα 21).

Το δεύτερο βήμα περιλάμβανε το κομμάτι του πολυμερισμού που ήταν και το ζητούμενο. Με την χρήση υψηλού κενού γίνεται συνεχείς απομάκρυνση του παραγόμενου CO₂ οδηγώντας την αντίδραση προς τα προϊόντα μέσω της αποκαρβοξυλίωσης του καρβαμιδικού ενδιάμεσου (σχήμα 13). Με την χρήση αντιδραστήρων πολυμερισμού με όγκους τουλάχιστον τρεις φορές από το εκπεμπόμενο διοξείδιο του άνθρακα, απέφυγαν το σχηματισμό καρβαμιδικών αλάτων με τα αμινοτελικά άκρα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, λόγω της γρηγορότερης αποκαρβοξυλίωσης που συμβαίνει στο σύστημα.

Με την τεχνική αυτή ο μηχανισμός οδηγήθηκε αποκλειστικά στην πορεία των κανονικών αμινών, τα προϊόντα είχαν μεγάλη συνθετική ομοιογένεια και υψηλές αποδόσεις. Επίσης έχουν συντεθεί ομο και συμπολυμερή⁵⁰, αστεροειδή⁵³ αλλά και υβριδικά⁵⁴ πολυπεπτίδια από πληθώρα μονομερών. Η τεχνική είναι γενική και μπορεί να εφαρμοστεί και σε πιο πολύπλοκες αρχιτεκτονικές⁵⁵. Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι είναι η τεχνική με τις μικρότερες κατανομές μοριακών βαρών στην βιβλιογραφία.

Για να χαρακτηριστεί τώρα ένας πολυμερισμός «ζωντανός», πρέπει να πληροί τα παρακάτω κριτήρια^{56,57} :

- Να γίνεται πλήρης μετατροπή του μονομερούς σε πολυμερές. Μετά το πέρας του πολυμερισμού όλη η ποσότητα του μονομερούς πρέπει να έχει καταναλωθεί δηλαδή η απόδοση να είναι 100%.
- Να υπάρχει γραμμική εξάρτηση του μέσου μοριακού βάρους M_n με την μετατροπή. Για να γίνει αυτό, πρέπει να μην υπάρχουν παράπλευρες αντιδράσεις τερματισμού και ο πολυμερισμός να προχωρά ομαλά και σταδιακά.
- Το τελικό μοριακό βάρος M_n να είναι ελεγχόμενο και να καθορίζεται από την στοιχειομετρία της αντίδρασης. Το μέσο μοριακό βάρος κατά αριθμό των πολυμερών προκαθορίζεται με ακρίβεια από τις ποσότητες του μονομερούς και του απαρχητή, σύμφωνα με την σχέση:

$$\overline{M}_n = \frac{g_{\text{μονομερούς}}}{\text{moles}_{\text{απαρχητή}}}$$

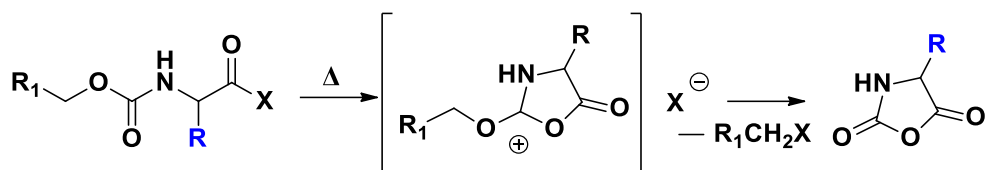
Να είναι εφικτή η σύνθεση συμπολυμερών κατά συστάδες με διαδοχική προσθήκη μονομερών. Δηλαδή όλες οι αλυσίδες να παραμένουν ενεργές μετά το πέρας του πολυμερισμού του πρώτου μονομερούς και ταυτόχρονα το δεύτερο μονομερές να είναι τόσο καθαρό ώστε να μην περιέχει προσμίξεις που μπορούν να προκαλέσουν τερματισμό. Αν ο πολυμερισμός είναι «ζωντανός» και η ταχύτητα έναρξης πολύ μεγαλύτερη από την ταχύτητα διάδοσης, τότε είναι η δυνατή η παρασκευή πολυμερών με μικρή κατανομή μοριακών βαρών ($I=M_w/M_n < 1,1$).

Αν και στο σύστημα αυτό είχε αποδοθεί η έννοια του ζωντανού δεν είχε γίνει διερεύνηση ακραίων ομάδων των λαμβανόμενων πολυμερών. Αυτό έγινε το 2009 από την ομάδα του Avgeropoulos⁵⁸, μια ομάδα εξοικειωμένη τόσο με τις τεχνικές υψηλού κενού αλλά και τις παραδοσιακές. Ο Avgeropoulos διεξήγαγε παράλληλους πολυμερισμούς υπο συνθήκες υψηλού κενού αλλά και υπο αδρανή ατμόσφαιρα. Πρέπει να σημειωθεί ότι και η σύνθεση των μονομερών ακολούθησε την ίδια λογική. Τα πολυμερή που ελήφθησαν χαρακτηρίστηκαν φασματοσκοπικά (¹³C-NMR, MALDI-TOF-MS). Συμπέραναν ότι οι πολυμερισμοί σε υψηλό κενό ακολουθούσαν πλήρως τον κανονικό μηχανισμό και μόνο ένα μικρό ποσοστό των αμινοτελικών αλυσίδων του πολυπετιδίου είχε τερματιστεί με αλληλεπίδραση με το DMF, προς σχηματισμό φόρμουλο ομάδας, όπως είχε προαναφέρει ο Gianni⁵⁹ σε αντίστοιχη μελέτη. Η πρόσφατη αυτή μελέτη ισχυροποιεί ακόμη περισσότερο αυτά που είχε προαναφέρει η ομάδα της Αθήνας με επικεφαλής τον Hadjichristidis. Πάνω στην τεχνική και στα παραπάνω αποτελέσματα βασίστηκε και η παρούσα εργασία όπου θα δοθούν περισσότερες λεπτομέρειες στο πειραματικό μέρος.

2.6 Σύνθεση N-καρβοξυανυδριτών α-αμινοξέων(NCAs).

Οι N-Καρβοξυανυδρίτες των α-αμινοξέων περιεγράφηκαν πρώτα από τον Leuchs^{60,61} περισσότερο από εκατό χρόνια πριν. Η ανακάλυψή τους ήταν συμπτωματική, κατά την προσπάθεια του να απομονώσει σε καθαρότερη μορφή τα N-αλκοξυκαρβονυλοάμινο χλωρίδια οξέων (σχήμα 22) μέσω απόσταξης. Επίσης παρατήρησε τον πολυμερισμό τους και απομόνωσε το πρώτο

συνθετικό πολυπεπτίδιο, σε μια εποχή που δεν ήταν ακόμη αποδεκτή η ύπαρξη των μακρομορίων.

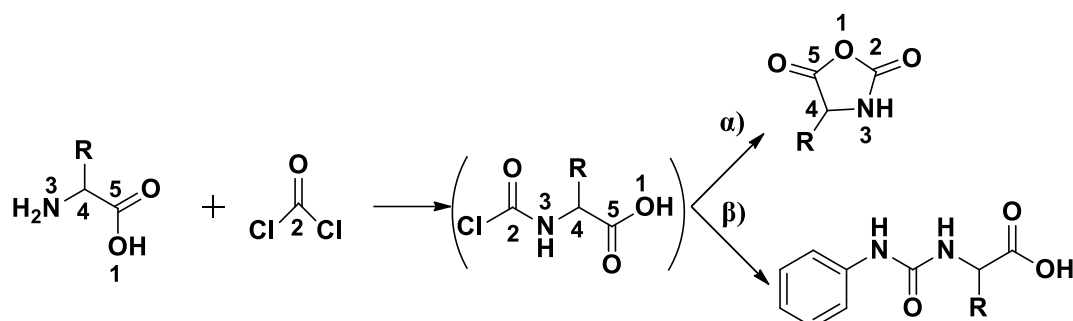


Σχήμα 22: Μέθοδος του Leuchs για τον σχηματισμό των N-Καρβοξυανυδριτών, όπου X=Cl ή Br.

Κατά την μεθοδολογία του Leuchs η παρατεταμένη θέρμανση στους 70-90 βαθμούς οδηγεί στο σχηματισμό του ανυδρίτη. Υπό τις συνθήκες αυτές όμως οι NCAs αρχίζουν να αποσυντίθενται και το υδροχλώριο προκαλεί άνοιγμα του δακτυλίου. Οι βελτιώσεις που επήλθαν αφορούσαν αντιδραστήρια όπου η δημιουργία του χλωριδίου οξέος θα γινόταν σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε το θειόνυλο χλωρίδιο από τον ίδιο τον Leuchs². Εν συνεχεία το πενταχλωρίδιο του φωσφόρου⁶², που ήταν δραστικότερο αλλά έδινε ως παραπροϊόν το αντίστοιχο οξείδιο και είχε επίδραση στην κρυστάλλωση του ανυδρίτη. Το ισχυρότερο μέσω αλογόνωσης είναι το τριβρωμίδιο του φωσφόρου⁶³. Επιπλέον λόγω του γεγονότος ότι το ανιόν του βρωμίου είναι καλύτερη αποχωρούσα ομάδα από το αντίστοιχο του χλωρίου, στο στάδιο της κυκλοποίησης, (σχήμα 22) αλλά και καλύτερο πυρηνόφιλο για το τελικό στάδιο, η συνολική αντίδραση προχωράει γρηγορότερα και σε θερμοκρασίες κάτω των 25 βαθμών. Όσον αφορά τον υποκαταστάτη R₁ ο Leuchs είχε παρατηρήσει ότι τα μεθόξυ αντιδρούσαν πιο εύκολα από τα αντίστοιχα αιθοξυκαρβονυλοάμινο χλωρίδια οξέων αποδεικνύοντας ότι το καθοριστικό στάδιο της ταχύτητας είναι η αλκυλίωση του ιόντος αλογόνου. Άλλοι ερευνητές βρήκαν ότι η βένζυλο⁶⁴ ομάδα οδηγεί σε ακόμα πιο γρήγορες και λιγότερο απαιτητικές αντιδράσεις. Πρέπει να σημειωθεί ότι η μέθοδος του Leuchs δεν είναι μόνο ιστορικής σημασίας, αλλά χρησιμοποιείται ακόμη με τις παραλλαγές της, για τον σχηματισμό διαφόρων NCAs.

2.6.1 Φωσγενίωση ελεύθερων αμινοξέων(Fuchs-Farthing method)

Η φωσγενίωση των ελεύθερων αμινοξέων αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο για την σύνθεση των NCAs σήμερα. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε πρώτα από τον Fuchs⁶⁵ το 1922 για την παρασκευή της N-φαινυλ-γλυκίνης NCA και αργότερα επεξεργάστηκε λεπτομερώς από τους Farthing⁶⁶, Coleman⁶⁷ και Levy⁶⁸ για μεγάλη πληθώρα N-Καρβοξυανυδριτών. Στην βιβλιογραφία έχει επικρατήσει ως η “μέθοδος Fuchs-Farthing”. Το πρώτο στάδιο της φωσγενίωσης φαίνεται να είναι ο σχηματισμός του N-χλωροφόρμυλο αμινοξέος (σχήμα 23) επειδή η προσθήκη ανιλίνης⁶⁹ οδηγεί στο σχηματισμό του 5-φαινυλ-υδαντοϊκού οξέος.



Σχήμα 23: α) Σχηματισμός N-Καρβοξυανυδρίτη με την μέθοδο “Fuchs-Farthing” μέσω του N-χλωροφόρμυλο αμινοξέος, β) απόδειξη αυτού με την προσθήκη ανιλίνης.

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. Σε γενικές αρχές, 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 κατά ένα παράγοντα 10-30. Από τους πιο πολικούς διαλύτες μόνο το ακετονιτρίλιο είναι αδρανές αρκετά και μπορεί να χρησιμοποιηθεί, προτιμάται για την σύνθεση του NCA της γλυκίνης

2.6.2 Παραλλαγές στην μέθοδο Fuchs-Farthing.

Το φωσγένιο είναι ένα υψηλής δραστηριότητας αντιδραστήριο που έχει χρησιμοποιηθεί από τις πρώιμες μέρες της χημικής βιομηχανίας⁷⁰, αλλά και ως

όπλο κατά τον πρώτο παγκόσμιο πόλεμο. Εξαιτίας της υψηλής τοξικής του φύσης, η μεταχείρισή του, ακόμα και σε μικρή εργαστηριακή κλίμακα χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή. Επιπλέον είναι δύσκολο, λόγω της αέριας φύσης του, να τηρηθεί η στοιχειομετρία στις αντιδράσεις που συμμετέχει. Ολιγομερή του φωσγενίου έχουν χρησιμοποιηθεί σε αντιδράσεις φωσγενίωσης ώστε να παράγουν *in situ* το τοξικό αέριο. Το τριχλωρομέθυλο χλωροφορμικό ή αλλιώς διφωσγένιο και το δις(τριχλωρομέθυλο)-ανθρακικό ή τριφωσγένιο(BTC) έχουν συχνά χρησιμοποιηθεί στην οργανική σύνθεση ως πηγές φωσγενίου. Το διφωσγένιο και το τριφωσγένιο είναι υγρό και κρυσταλλικό στερεό αντίστοιχα, γεγονός που επιτρέπει την πρακτικότερη και ασφαλέστερη χρησιμοποίησή τους, ως πρόδρομα δυο και τριών μορίων φωσγενίου. Στην σύνθεση των NCAs έχουν χρησιμοποιηθεί και τα δυο αλλά το τριφωσγένιο έχει επικρατήσει.

Το τριφωσγένιο⁷¹ συντέθηκε πρώτη φορά από τον Councier το 1880, ενώ η δομή του έγινε γνωστή μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ το 1971. Τα τελευταία είκοσι χρόνια έχει βρει μεγάλη αναγνώριση παρά το γεγονός ότι ήταν γνωστό για πάνω από έναν αιώνα.

Ο Eckert το 1987⁷² πρότεινε μια κυκλική πορεία για τις πυρηνόφιλες αντιδράσεις του BTC. Σύμφωνα με το σχήμα 2.14 1/3 του BTC αντιδρά με 1/3 από το πυρηνόφιλο προς σχηματισμό 1/3 mole φωσγενίου. Στο επόμενο βήμα ένα δεύτερο και ένα τρίτο mole φωσγενίου δημιουργούνται, όπου αντιδρούν με 2/3 του πυρηνόφιλου προς σχηματισμό του τελικού προϊόντος.

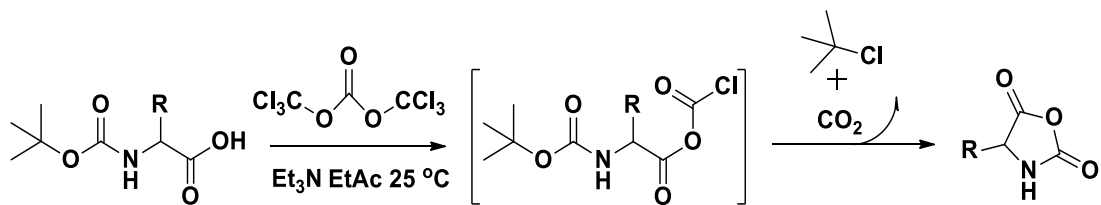
Πρώτος που χρησιμοποίησε το BTC στην σύνθεση των NCAs ήταν ο Roche⁷³ το 1988 και αποτελεί σήμερα μια από τις πιο δημοφιλείς πορείες. Επιλέχτηκε το τριφωσγένιο διότι ήταν διαλυτό στα διάφορα μέσα που μετέχουν στην σύνθεση (THF) και καθαρισμό (εξάνιο) και έτσι θα ήταν εύκολο να εκδιωχθεί μέσω ανακρυσταλλώσεων του ανυδρίτη. Η πορεία που πρότεινε ο Roche ήταν ιδιαίτερα αποδοτική για NCAs με μακριές αλειφατικές πλευρικές αλυσίδες και προστασίες που δεν είναι ευαίσθητες σε όξινα περιβάλλοντα όπως η άλκυλο και βενζυλοξυκαρβόνυλο (Bz). Σε μια τυπική πορεία (σχήμα 24) αντιδρά 1/3 τριφωσγενίου σε αιώρημα του αμινοξέος σε THF (10g για κάθε 100ml) στους 40-50 βαθμούς μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές (το αμινοξύ αδιάλυτο σε THF

R-OC(=O)CC[C@H](N)C(=O)[O-].[Cl]C1(Cl)C(Cl)OC(=O)OC1(Cl)Cl>>R-OC(=O)CC[C@H](N)C(=O)OC1(Cl)C(Cl)C(Cl)C1Cl

50 °C
THF, >85%

R= Άλκυλο ή βένζυλο

Τρία χρόνια αργότερα ο Mobashery⁷⁴ αναφέρει μια τροποποιημένη πορεία όπου ξεκινώντας από το N-BOC αμινοξύ και παρουσία τριαιθυλαμίνης ως δέκτη του υδροχλωρίου καταλήγει σε NCA με ηπιότερες συνθήκες σε ένα στάδιο. Σε ένα τυπικό πείραμα το N-BOC αμινοξύ και το τριφωσγένιο αναδεύονται σε οξικό αιθυλεστέρα (EtoAc). Έπειτα προσθήκη τριαιθυλαμίνης στο διάλυμα με ταυτόχρονη καταβύθιση του υδροχλωρικού της άλατος οδηγεί στο σχηματισμό ενδιαμέσου (σχήμα 25). Η αντίδραση μπορεί να ελεγχθεί από το παραγόμενο CO₂ απλά με ένα συνδεδεμένο μανόμετρο στη φιάλη της αντίδρασης. Η διάρκειά της ποικίλει από δυο ως είκοσι ώρες ανάλογα με την φύση του αμινοξέος. Ο οξικός αιθυλεστέρας επιλέχτηκε καθώς σε αυτόν το σχηματιζόμενο άλας είναι τελείως αδιάλυτο και μπορεί να διαχωριστεί με απλή διήθηση ποσοτικά.



65

Κλειδί στην αντίδραση αποτελεί ότι η BOC κατά τον σχηματισμό του ενδιαμέσου, λειτουργεί ως αποχωρούσα ομάδα και επιτρέπει στην αμινομάδα να προσβάλλει πυρηνόφιλα το καρβονύλιο της χλωροφόρμυλο ομάδας προς ενδομοριακή κυκλοποίηση και σχηματισμό του NCA. Οι αποδόσεις σε αυτή την πορεία είναι χαμηλότερες και προσδίδονται στην χαμηλότερη διαλυτότητα των NCAs στον οξικό αιθυλεστέρα από ότι στο τετραϋδροφουράνιο. Επίσης οι αντιδράσεις διαρκούν περισσότερο και υπάρχει κίνδυνος ύπαρξης του άλατος της τριαιθυλαμίνης στον ανυδρίτη.

2.7 Μοριακός χαρακτηρισμός πολυμερών

2.7.1 Φασματοσκοπία υπερύθρου (IR)

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

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

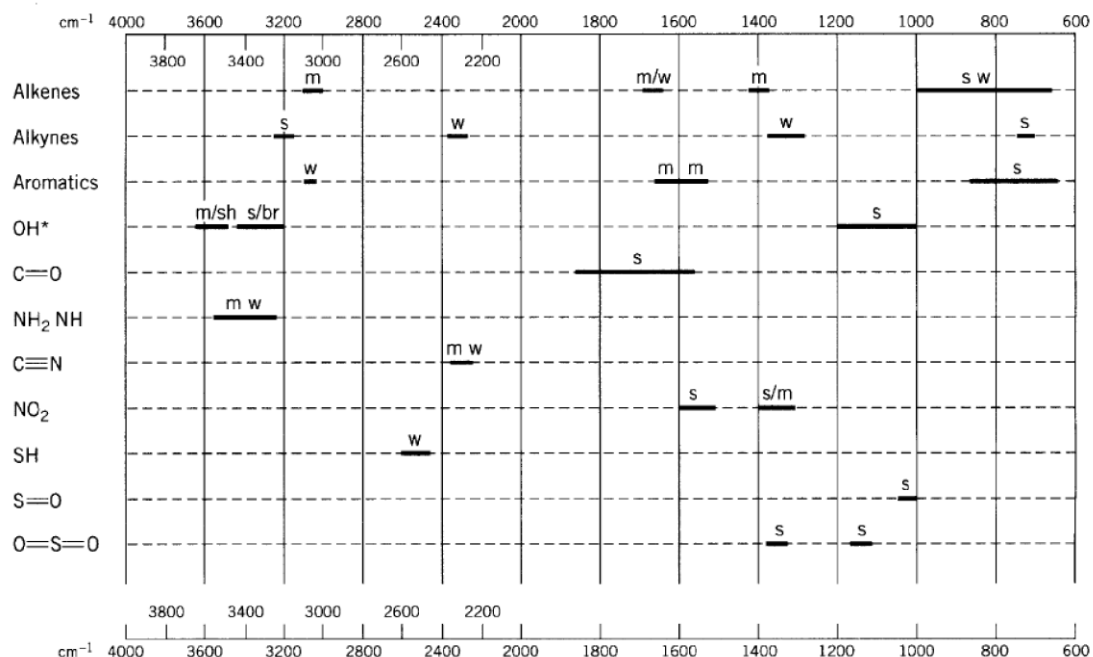
Η περιοχή υπερύθρου (IR) του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος καλύπτει την περιοχή αμέσως μετά το ορατό ($7,8 \cdot 10^{-5} \text{cm}$), μέχρι τα 10^{-2}cm περίπου, αλλά μόνο η ενδιάμεση περιοχή, από τα $2,5 \cdot 10^{-4} \text{cm}$ ως τα $2,5 \cdot 10^{-3} \text{cm}$,

χρησιμοποιείται από τους οργανικούς χημικούς. Τα μήκη κύματος εντός της περιοχής IR δίνονται συνήθως σε μικρότερα ($1\mu\text{m}=10^{-4}\text{cm}$), ενώ οι συχνότητες εκφράζονται σε κυματάρια (ν) μάλλον παρά σε Hertz. Ο κυματάριας, που εκφράζεται σε μονάδες αντιστρόφων εκατοστών (cm^{-1}), είναι απλώς το αντίστροφο του μήκους κύματος. Έτσι η χρήσιμη περιοχή του IR είναι από τα 4000 cm^{-1} ως τα 400 cm^{-1} . Χρησιμοποιώντας την εξίσωση $E=(1,20\cdot 10^{-2}\text{kJ/mol})/\lambda$, μπορούμε να υπολογίζουμε τα επίπεδα ενέργειας της ακτινοβολίας IR.

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

Όταν το μόριο δέχεται ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, απορροφάται ενέργεια, όταν η ενέργεια της ακτινοβολίας είναι ίδια με την ενεργειακή διαφορά μεταξύ δύο δονητικών συχνοτήτων. Όταν ένα μόριο απορροφά ακτινοβολία IR, η μοριακή δόνηση που έχει συχνότητα ίση με εκείνη της ακτινοβολίας αυξάνει το πλάτος της. Εφόσον κάθε συχνότητα που απορροφάται από ένα μόριο αντιστοιχεί σε μία προκαθορισμένη μοριακή κίνηση, μπορούμε να διαπιστώσουμε τις κινήσεις του μορίου, μελετώντας το φάσμα του IR (Πίνακας 4). Από την ερμηνεία αυτών των κινήσεων μπορούμε να συμπεράνουμε τι είδους δεσμοί (λειτουργικές ομάδες) υπάρχουν στο μόριο.

Πίνακας 4: Απορροφήσεις διαφόρων χαρακτηριστικών ομάδων με τις αντίστοιχες εντάσεις στο Mir⁷⁵.



Η υπέρυθη περιοχή από τις 4.000 cm^{-1} ως τα 400 cm^{-1} είναι δυνατό να χωριστεί σε τέσσερα τμήματα:

1. 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} .
2. 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 ($\text{C}=\text{C}=\text{C}$, $\text{N}=\text{C}=\text{O}$).
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.

Η τεχνική του IR εφαρμόζεται στα πολυτεπτίδια προκειμένου να διερευνηθεί ποιοτικά η επιτυχής σύνθεση είτε του N-καρβόξυανυδριτη 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})^{76,77}. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε μηχανήμα Perkin-Elmer Spectrum 100 FTIR. Για την Παρασκευή του δείγματος χρησιμοποιείται περίπου 1 mg ουσίας και 0.2 g ξηρής σκόνης βρωμιούχου καλίου (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 φασματομέτρου και γίνεται η καταγραφή του φάσματος και η ταυτοποίηση της ένωσης με την βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή.

2.7.2 Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR)

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR)^{78,79} 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. Έτσι, οι πυρήνες πολλών ατόμων (^1H , ^{13}C) συμπεριφέρονται σαν να περιστρέφονται γύρω από κάποιον άξονα (πυρηνικό spin, $\hbar$). 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, $+\frac{1}{2}$) είτε αντιπαράλληλο (ενεργειακή κατάσταση με $-\frac{1}{2}$) 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.

Ηπραγματικό=Εφαρμοζόμενο – Ητοπικό .

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

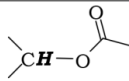
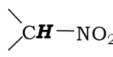
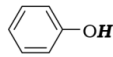
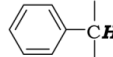
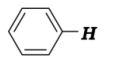
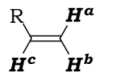
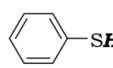
Συνέπεια των παραπάνω είναι ότι οι πυρήνες σε διαφορετικά χημικά περιβάλλοντα δίνουν διαφορετική γραμμή συντονισμού. Για να εκφραστούν με ενιαίο τρόπο οι μεταβολές των γραμμών συντονισμού, στους διάφορους πυρήνες, χρησιμοποιούνται πρότυπες ουσίες αναφοράς και εισάγεται η έννοια της χημικής μετατόπισης.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

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

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

όπου H_{α} και H_{δ} τα πεδία συντονισμού των πυρήνων της ουσίας αναφοράς και του δείγματος αντίστοιχα, ενώ ν_{α} και ν_{δ} οι συχνότητες συντονισμού της ουσίας αναφοράς και του δείγματος αντίστοιχα. Όπως ορίζεται το δ στις σχέσεις είναι αδιάστατο και ανεξάρτητο του $H_{\text{εφαρμοζόμενο}}$. 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.

Πίνακας 5: Χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις στη φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ (ppm)⁷⁸.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΕΣ ΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΕΙΣ $^1\text{H-NMR}$ (ppm)					
R-CH_3	0.8-1.2	Μεθύλιο			
$\text{R-CH}_2\text{-R}$	1.1-1.5	Μεθυλένιο		3.7-5.4	Εστερικά αλκύλια
R_3CH	1.4-1.9	Μεθίνιο	$\text{A-CH}_2\text{-Cl}$	~ 3.5 (A=R), ~ 4.5 (A=Ar)	Χλωρίδια
$\text{C}\equiv\text{CH}$	1.5-3.0	Ακραία αλκίνια	$\text{A-CH}_2\text{-Br}$	~ 3.4 (A=R), ~ 4.4 (A=Ar)	Βρωμίδια
	1.6-1.8	Αλλυλικά μεθύλια	$\text{A-CH}_2\text{-I}$	~ 3.2 (A=R), ~ 4.4 (A=Ar)	Ιωδιδια
	0.5-4.0*	Πρωτόνια αμινών	$\text{A-CH}_2\text{-F}$	~ 4.3 (A=R), ~ 5.3 (A=Ar)	Φθορίδια
R-OH	1.0-5.5*	Αλκοολικά υδροξύλια		4.2-4.7	Νιτροαλκάνια
R-SH	1.1-1.9*	Αλκυλοθειόλες		4.5-6.0	Βινυλικά πρωτόνια
$\alpha\text{-K}\text{arβonυλικά πρωτόνια}$	2.0-3.6		RCO-NHR RCONH_2 }	5.0-8.0	Αμιδικά πρωτόνια
$\alpha\text{-Πρωτόνια θειολών}$	2.0-3.2			5.0-8.0*	Φαινολικά υδροξύλια
	2.2-3.0	Βενζυλικά πρωτόνια		6.8-7.8	Αρωματικά πρωτόνια
$\alpha\text{-Πρωτόνια Αμινών}$	2.2-3.6			H^a : 4.0-6.6 H^b : 3.8-6.2 H^c : 5.2-7.3	Βινυλικά πρωτόνια
	2.7-4.2	Αρωματικές θειόλες	RCOOH	10-13*	Καρβοξυλικά οξέα
CH-OR (ή OAr)	3.3-4.3	Αιθερικά πρωτόνια		9.0-10.1	Αλδεϋδικά πρωτόνια
CH-OH	3.5-4.0*	α -Πρωτόνια Αλκοολών			

* Αφορούν σε ανταλλάξιμα πρωτόνια

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

σταθερά σύζευξης είναι ίδια και για τους δύο πυρήνες, τα spin των οποίων συζεύγγονται και δεν εξαρτάται από την ισχύ πεδίου του φασματοφωτομέτρου.

Τέλος, στη φασματοσκοπία ^1H -NMR και όχι στη ^{13}C -NMR (λόγω του πυρηνικού φαινομένου Overhauser, Nuclear Overhauser Effect, NOE) το εμβαδόν που περικλείει κάθε κορυφή είναι ανάλογο προς τον αριθμό των πρωτονίων που προκαλούν 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).

2.7.3 Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC)

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 Exclusion Chromatography) ή μέσω πηκτής (Gel 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:

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

B. 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 εκλούνται νωρίτερα από τα μικρότερα που λόγω 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 :

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

B. 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, εκκλύεται 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 $[\eta]$ σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$[\eta]M = 0.025NAVh$$

Αν λοιπόν το εσωτερικό ιξώδες $[\eta]$ 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 $[\eta] M$ συναρτήσει του όγκου έκλουσης (V_e). Στην παραπάνω εξίσωση το NA 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.

Ο ανιχνευτής IR ουσιαστικά χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις όπου στα πολυμερή που εξετάζουμε υπάρχουν ομάδες οι οποίες απορροφούν στην περιοχή του υπερύθρου όπως η σουλφονική ομάδα (SO_3H). Χάρη σε αυτήν την ικανότητα του ανιχνευτή είναι εφικτός μέσω της χρήσης του ο προσδιορισμός της πολυμερικής σύστασης ως συνάρτηση της μοριακής μάζας.

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 :

$$Kc/\Delta R\theta = 1/Mw + 2A2C + 3A3C$$

(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 Mw το πραγματικό μοριακό βάρος).

Τέλος, όσο αφορά στον ιξωδομετρικό ανιχνευτή, αυτός χρησιμοποιείται συνήθως σε σειρά με κάποιο ανιχνευτή μάζας-συγκέντρωσης από αυτούς που προαναφέραμε, 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.

Συμπεραίνουμε ότι 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.

Ο προσδιορισμός των χρωματογραφημάτων αποκλεισμού μεγεθών (SEC), έγινε με τη χρησιμοποίηση αντλίας Waters 510 με διαφορικό διαθλασίμετρο Waters 410 και με ανιχνευτή απορρόφησης UV. Για την εύρεση του μοριακού βάρους, χρησιμοποιήθηκαν 4 στήλες τύπου μ-Styragel, με πορώδες υλικό (δικτυωμένο πολυστυρένιο) που έχει μέγεθος πόρων από 102 ως 106 Å. Ο φέρων διαλύτης ήταν DMF σε LiBr 0,1% κ.β. με παροχή 1 ml / min σε θερμοκρασία 60°C. Η καμπύλη βαθμονόμησης έγινε με την χρήση 7 προτύπων πολυστυρενίου που κάλυπταν το εύρος μοριακών βαρών από 1.800 μέχρι 900.000. Για την παρασκευή των δειγμάτων, ζυγίστηκαν 6 mgr πολυμερούς σε

μπουκαλάκι (vial), διαλύθηκαν στον φέροντα διαλύτη (ποσότητα περίπου 1ml) και πριν την ένεση όπου κρίθηκε απαραίτητο φιλτραρίστηκαν.

2.7.4 Κυκλικός διχρωϊσμός πολυπεπτιδίων (CD)

Οι πρωτεΐνες (οπτικά ενεργές ενώσεις) και γενικότερα τα μόρια, απορροφούν κβάντα φωτός, προάγοντας τα ηλεκτρόνια σε υψηλότερες διεγερμένες καταστάσεις. Το εξερχόμενο φως έχει την ίδια συχνότητα αλλά έχει επιβραδυνθεί, εισάγοντας μια διάφορα φάσης, που είναι ανάλογη της ποσότητας του υλικού. Στην τεχνική του κυκλικού διχρωϊσμού, μετράται η διαφορά της μοριακής απορροφητικότητας ($\epsilon_R - \epsilon_L$), κατά την απορρόφηση από την πρωτεΐνη, κυκλικά πολωμένης (αριστερόστροφα ή δεξιόστροφα) μονοχρωματικής ακτινοβολίας φωτός στην περιοχή του far-UV, που οδηγεί σε $\pi-\pi^*$ ηλεκτρονιακές μεταβάσεις. Αυτές αποδίδονται στους αμιδικούς δεσμούς των πεπτιδίων (χρωμοφόρα) και επηρεάζονται σημαντικά από την δευτεροταγή δομή.

Η άνιση απορρόφηση των δυο συνιστώντων ανυσμάτων, οδηγεί το συνιστάμενο άνυσμα να ιχνογραφεί μια έλλειψη. Το εξερχόμενο φως λέμε ότι είναι ελλειπτικά πολωμένο, ενώ το φαινόμενο καλείται κυκλικός διχρωϊσμός. Αποτελεί το άθροισμα της συνεισφοράς των αμινοξέων του πολυπεπτιδίου και τη συνεισφοράς από το δίπλωμα της αλυσίδας. Μπορεί να μετρηθεί μέσω της ελλειπτικότητας θ , που αντιστοιχεί στην γωνία της οποίας η εφαπτόμενη, ισούται με τον λόγο του μικρού προς τον μεγάλο άξονα της έλλειψης.

$$[\theta] = \frac{\epsilon_R - \epsilon_L}{\epsilon_R + \epsilon_L} = 3298 * (\epsilon_R - \epsilon_L)$$

$$\epsilon_R - \epsilon_L$$

Οι ηλεκτρονικές διεγέρσεις του πεπτιδικού δεσμού των τριών διαμορφώσεων πολυπεπτιδικής αλυσίδας, δίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 6: Απορροφήσεις των τριών διαμορφώσεων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας στον κυκλικό διχρωϊσμό.

Διαμόρφωση	ταινία 1 (nm)	ταινία 2 (nm)	ταινία 3 (nm)
α-έλικα	191 (θετική)	208 (αρνητική)	222 (αρνητική)

β-φύλλο	195 (θετική)	217 (αρνητική)	
τυχαίο σπείραμα	197 (αρνητική)	217 (θετική)	

Οι μετρήσεις έγιναν σε μηχανήμα Perkin-Elmer, σε ειδικά κατασκευασμένες κυψελίδες. Επειδή οι μετρήσεις του κυκλικού διχρωϊσμού γίνονται σε διάλυμα, ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δοθεί στην επιλογή του διαλύτη, ώστε να μην απορροφά αυτός στις μετρούμενες περιοχές. Τέτοιοι διαλύτες είναι το ακετονιτρίλιο και το νερό. Παρακάτω δίνεται χαρακτηριστικό φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού των διαφορετικών διαμορφώσεων της πολυ(L-λυσίνης) σε νερό.

2.7.5 Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS)

Για τον προσδιορισμό των διαστάσεων ενός πολυμερούς σε διάλυμα χρησιμοποιείται η δυναμική σκέδαση φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS)^{80,81}.

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

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

όπου Dt είναι ο συντελεστής διάχυσης μεταφορικής κίνησης του μορίου. Αντίστοιχα αν ένα μόριο κυλινδρικού σχήματος υπόκειται σε κίνηση Brown η πιθανότητα να βρεθεί στις σφαιρικές συντεταγμένες θ, ϕ στο χρόνο t είναι $P(\theta\phi/\theta_0\phi_0, \phi)$ με θ_0, ϕ_0 τις συντεταγμένες σε $t=0$ και δίνεται από τη σχέση:

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

με Ω το συντελεστή διάχυσης περιστροφικής κίνησης. Από τις Σχέσεις 1 και 2 φαίνεται ότι οι συντελεστές διάχυσης των μακρομορίων συνδέονται άμεσα με

την κίνησή τους. Αφού τα κινούμενα μόρια σκεδάζουν φως με τρόπο που συνδέεται ποσοτικά με την κίνησή τους, είναι δυνατόν, χρησιμοποιώντας πειράματα σκέδασης φωτός, να προσδιοριστούν οι συντελεστές διάχυσης των μορίων. Οι συντελεστές αυτοί συνδέονται άμεσα με χαρακτηριστικές ιδιότητες των μορίων, όπως το μοριακό βάρος, το σχήμα και το μέγεθός τους καθώς και με αλληλεπιδράσεις πολυμερούς - διαλύτη.

Όταν μονοχρωματική ακτινοβολία στο ορατό φάσμα προσπίπτει σε ένα διαυγές υγρό το φως σκεδάζεται, λόγω διακυμάνσεων πυκνότητας. Στην περίπτωση διαλυμάτων η σκέδαση φωτός οφείλεται κυρίως σε διακυμάνσεις συγκέντρωσης. Οι διακυμάνσεις αυτές συνδέονται με την κίνηση Brown. Αν δεν υπάρχει αλλαγή συχνότητας της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σε σχέση με αυτή της προσπίπτουσας, η σκέδαση ονομάζεται ελαστική. Αν οι διακυμάνσεις (πυκνότητας και συγκέντρωσης) δεν αλλάζουν πολύ με το χρόνο ή εάν η ένταση σκεδάσεως μετράται για μία χρονική περίοδο που είναι μεγάλη σε σχέση με το χρόνο μεταβολής των διακυμάνσεων, δεν παρατηρείται αλλαγή στη συχνότητα του σκεδαζόμενου φωτός. Ωστόσο, οι διακυμάνσεις σε διαλύματα εξαρτώνται από το χρόνο εξαιτίας της κίνησης Brown. Έτσι η συχνότητα του σκεδαζόμενου φωτός θα έχει ένα φάσμα χαρακτηριστικό της χρονικής εξάρτησης των διακυμάνσεων και της κίνησης των μακρομορίων (φαινόμενο Doppler). Επειδή η διαφορά συχνότητας μεταξύ προσπίπτουσας και σκεδαζόμενης ακτινοβολίας είναι μικρή, το είδος αυτό της σκέδασης καλείται ημιελαστική σκέδαση φωτός.

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

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

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

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

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

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

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

$$Dt = Dt,0 (1 + kDc + \dots), \quad (5)$$

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

$$kD = 2A_2M - k_f - (NAV^2/M) = 2A_2M - k_f - u_2, \quad (6)$$

όπου A_2 ο δεύτερος συντελεστής virial, M το μοριακό βάρος, NA η σταθερά του Avogadro, V^2 ο όγκος του μορίου του πολυμερούς, u_2 ο ειδικός γραμμομοριακός όγκος του πολυμερούς και k_f ο συντελεστής αναλογίας στη σχέση που δίνει την εξάρτηση του μοριακού συντελεστή τριβής f του πολυμερούς από τη συγκέντρωση, $f = f_0(1 + k_fc)$ στο συγκεκριμένο διαλύτη. Γενικά ο Dt δίνεται από τη σχέση Stokes- Einstein:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(cumulants method) και οι τεχνικές κανονικοποίησης (regularization methods) με χαρακτηριστικό αντιπρόσωπο το πρόγραμμα CONTIN.

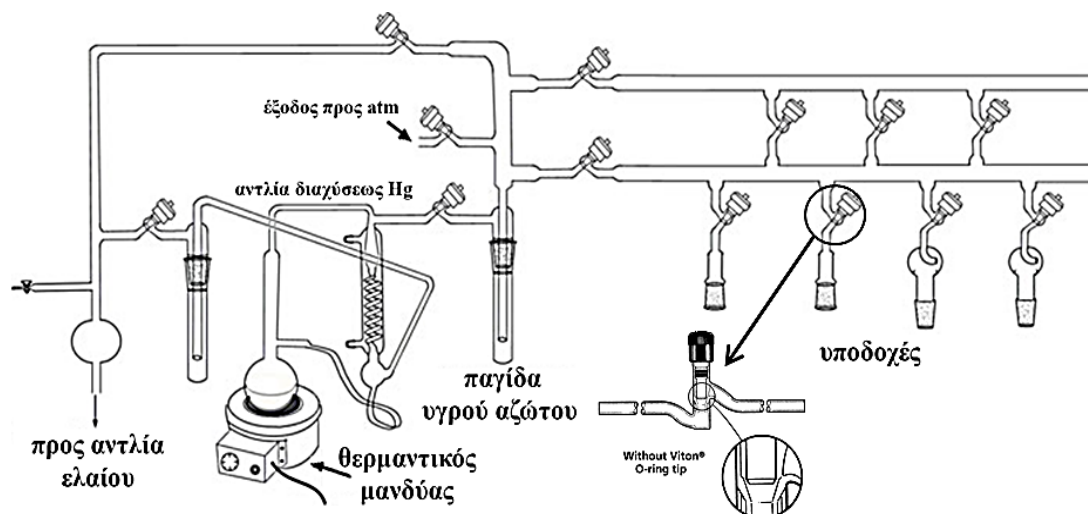
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 Τεχνική υψηλού κενού (HVT)

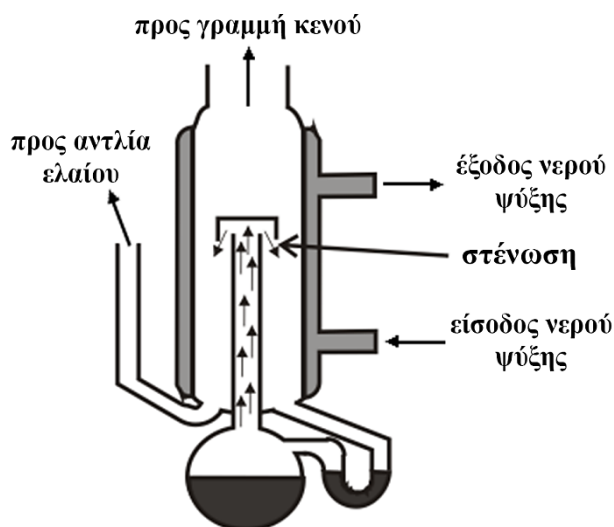
Η σύνθεση των πολυμερών, που αποτελούν το αντικείμενο στην παρούσα ερευνητική εργασία, πραγματοποιήθηκε με συνδυασμό τεχνικών υψηλού κενού και πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των NCAs. Ο συνδυασμός αυτός αποτελεί ιδανική μέθοδο για τη σύνθεση μακρομορίων με καλά καθορισμένα μοριακά χαρακτηριστικά. Για να επιτευχθούν τα επιθυμητά αποτελέσματα όμως, απαιτούνται αυστηρά καθορισμένες συνθήκες. Για το λόγο αυτό, ειδικά σχεδιασμένες συσκευές πολυμερισμού και κατάλληλες τεχνικές υψηλού κενού χρησιμοποιούνται για να απομακρυνθούν από το περιβάλλον των αντιδράσεων όλες εκείνες οι ανεπιθύμητες προσμείξεις που μπορούν να οδηγήσουν σε παράπλευρες αντιδράσεις. Αρχικά, με την επίτευξη υψηλού κενού στον αντιδραστήρα πολυμερισμού απομακρύνεται ο ατμοσφαιρικός αέρας που περιέχει πλήθος ανεπιθύμητων ουσιών, όπως οξυγόνο, διοξείδιο του άνθρακα, υγρασία, οι οποίες μπορούν να αντιδράσουν με τους χρησιμοποιούμενους απαρχητές και τις αναπτυσσόμενες αλυσίδες. Στη συνέχεια, με κατάλληλες τεχνικές καθαρισμού αντιδραστηρίων και διαλυτών επιτυγχάνεται η απομάκρυνση από το σύστημα ανεπιθύμητων ενώσεων, όπως αλκοόλες, αμίνες και οξέα, δραστικές προσμείξεις περιεχόμενες στα αντιδραστήρια που διατίθενται στο εμπόριο. Όλες οι διαδικασίες καθαρισμού των αντιδραστηρίων, διαλυτών, απαρχητών και των πολυμερών έγιναν με τη βοήθεια της γραμμής υψηλού κενού, σχηματική αναπαράσταση της οποίας φαίνεται στο σχήμα 26. Η γραμμή υψηλού κενού αποτελείται από γυάλινους σωλήνες (Pyrex), στρόφιγγες Teflon υψηλού κενού (Rotaflon HP 10 mm, 10^{-8} mm Hg), μία αντλία ελαίου και μία αντλία διαχύσεως υδραργύρου. Η αντλία ελαίου δημιουργεί κενό της τάξης των 10^{-2} – 10^{-3} mm Hg. Το προκαταρκτικό αυτό κενό είναι απαραίτητο για να αποστάξει ο υδράργυρος, που βρίσκεται στην αντλία διαχύσεως (σχήμα 27), σε σχετικά χαμηλή θερμοκρασία. Καθώς τα μόρια του υδραργύρου κινούνται ανοδικά, διέρχονται από τη στένωση, η οποία προκαλεί αύξηση της

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



Σχήμα 26: Σχηματική αναπαράσταση της γραμμής υψηλού κενού.

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



Σχήμα 27: Σχηματική αναπαράσταση της αντλίας διαχύσεως υδραργύρου.

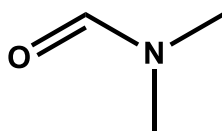
Οι αντλίες ελαίου και διαχύσεως προστατεύονται από πτητικά συστατικά με παγίδες υγρού αζώτου. Με τις στρόφιγγες, το κενό εφαρμόζεται στα επιθυμητά τμήματα της γραμμής, ενώ τα υπόλοιπα τμήματα μένουν απομονωμένα. Η γραμμή κενού περιλαμβάνει πολλές εξόδους με εσφυρίσματα, μέσω των οποίων συνδέονται οι διάφορες συσκευές και γίνεται η εισαγωγή και η απόσταξη των αντιδραστηρίων (διαλύτες, μονομερή). Πριν χρησιμοποιηθεί η γραμμή κενού για απαέρωση, πρέπει να τεθεί σε λειτουργία η αντλία ελαίου, να προσαρμοστεί σ' αυτήν η κενή συσκευή πολυμερισμού και να ανιχνευθεί τυχόν ύπαρξη μικροοπών με τη βοήθεια του πηνίου Tesla. Μόνο όταν εξασφαλιστεί απόλυτη στεγανότητα η γραμμή είναι έτοιμη για τη διεξαγωγή της διαδικασίας απομάκρυνσης του ατμοσφαιρικού αέρα από οποιοδήποτε προς πολυμερισμό σύστημα. Οι αποστάξεις υπό υψηλό κενό γίνονται εύκολα, θερμαίνοντας ελαφρά το προς απόσταξη υγρό και ψύχοντας τον υποδοχέα με υγρό άζωτο ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) ή λουτρό ισοπροπανόλης – ξηρού πάγου ($-78\text{ }^{\circ}\text{C}$). Ο χειρισμός της γραμμής κενού και οι απαραίτητες προφυλάξεις αναφέρονται εκτενώς στη βιβλιογραφία⁸².

3.2 Καθαρισμός διαλυτών

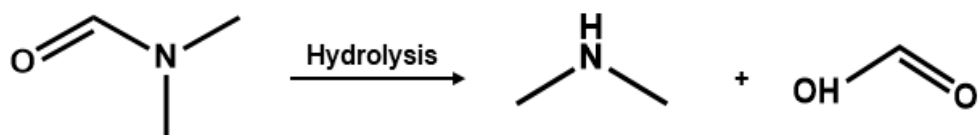
Όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στις αντιδράσεις πολυμερισμού, όπως επίσης και στις περισσότερες οργανικές αντιδράσεις, είναι απαραίτητο να μην περιέχουν ίχνη υγρασίας και οξυγόνου, αλλά και να έχουν απομακρυνθεί

ανεπιθύμητες προσμείξεις που μπορεί να περιέχουν. Οι ενώσεις αυτές επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό την πορεία των αντιδράσεων και ανάλογα τις συνθήκες μπορούν να δράσουν ως απαρχητές, επιβραδυντές ή αναστολείς πολυμερισμού, οδηγώντας σε μη επιθυμητά αποτελέσματα όπως είναι η ευρεία κατανομή μοριακών βαρών. Γι' αυτό το λόγο οι εμπορικά διαθέσιμοι διαλύτες υπόκεινται σε περαιτέρω διαδικασίες καθαρισμού, όπου στην πλειονότητά τους περιλαμβάνουν την αντίδραση τους με κάποιο ξηραντικό μέσο προς απομάκρυνση της υγρασίας, και εν συνεχεία την απαέρωση και απόσταξή τους υπό κενό. Ακολουθώντας παρατίθενται οι διαδικασίες καθαρισμού των οργανικών διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία:

Διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF):



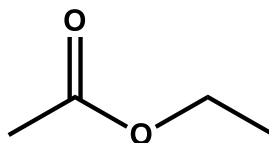
Το διμέθυλοφορμαμίδιο (DMF) (σ.ζ.=153 °C) αποτελεί κατά κύριο λόγο τον διαλύτη του πολυμερισμού των N-καρβόξυ ανυδριτών (NCAs) των α-αμινοξέων, ενώ χρησιμοποιείται επίσης και για την αραίωση του απαρχητή. Η διαχείρισή του κατά τη διαδικασία των πολυμερισμών απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή, καθώς το DMF υπόκειται τόσο σε θερμική και φωτοχημική αποικοδόμηση, όσο και σε υδρόλυση παρουσία νερού. Κατά την θερμική παράγεται διμεθυλαμίνη (DMA) και μονοξείδιο του άνθρακα (CO), ενώ κατά την υδρόλυσή του, διμεθυλαμίνη (DMA) και φορμικό οξύ (σχήμα 28)⁸³. Το καθαρό DMF είναι άοσμο, ενώ σε περίπτωση παραγωγής DMA αποκτά μια χαρακτηριστική οσμή.



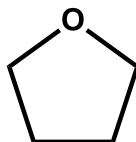
Σχήμα 28: Αντίδραση υδρόλυσης του DMF προς DMA και φορμικό οξύ.

Η διάσπαση του DMF, και κατά συνέπεια η παραγωγή DMA, είναι μια διαδικασία που πρέπει να αποφεύγεται καθ' όλη τη διαδικασία πολυμερισμού των NCAs, καθώς η DMA μπορεί να δράσει ως απαρχητής, οδηγώντας σε μη ελεγχόμενο πολυμερισμό των μονομερών. Γι' αυτό το λόγο, το εμπορικά διαθέσιμο DMF φυλάσσεται υπό αδρανή ατμόσφαιρα στο glove box. Κατά τον καθαρισμό του, περίπου 1 L του διαλύτη μεταγγίζεται σε φιάλη 2 L με στρόφιγγα που περιέχει ρητίνη, η οποία προηγουμένως έχει ξηραθεί στη γραμμή υψηλού κενού για περίπου 2 ώρες. Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα μέσα στο glove box, και το DMF αφήνεται κλειστό στη φιάλη, και υπό ανάδευση με τη ρητίνη για μία νύχτα, αποκτώντας ένα υποκίτρινο χρώμα. Την επόμενη μέρα, η φιάλη με το διαλύτη προσαρμόζεται στην γραμμή υψηλού κενού και απαερώνεται ενδελεχώς. Στη συνέχεια πραγματοποιείται κλασματική απόσταξη του DMF σε διπλανή σφαιρική φιάλη 1 L που φέρει στρόφιγγα. Τα πρώτα και τα τελευταία κλάσματα του διαλύτη απορρίπτονται, και συλλέγονται μόνο τα μεσαία κλάσματα. Η φιάλη με το καθαρό πλέον DMF φυλάσσεται στο ψυγείο σε θερμοκρασία 3 °C.

Οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc):



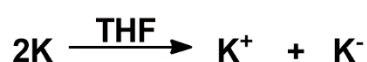
Ο οξικός αιθυλεστέρας (σ.ζ.=77 °C) χρησιμοποιείται ως διαλύτης τόσο για τη σύνθεση των μονομερών (N-καρβοξυ ανυδρίτες, NCAs) από τα αντίστοιχα α-αμινοξέα όσο και για τις ανακρυσταλλώσεις τους. Ο εμπορικά διαθέσιμος διαλύτης αφήνεται να αντιδράσει υπό ανάδευση σε σφαιρική φιάλη 2 L με πεντοξείδιο του φωσφόρου (P₂O₅) για μια ημέρα, οπότε ο διαλύτης αποκτά ένα ασθενές μαύρο χρώμα. Στη συνέχεια η φιάλη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού, απαερώνεται και εν συνεχεία τα μεσαία κλάσματα του διαλύτη αποστάζονται σε διπλανή σφαιρική φιάλη 2 L με στρόφιγγα. Μετά το πέρας της απόσταξης ακολουθεί νέα απαέρωση του διαλύτη.



Τετραϋδροφουράνιο (THF):

Το τετραϋδροφουράνιο (σ.ζ.=66 °C) αποτελεί βασικό διαλύτη κατά τη σύνθεση των μονομερών (NCAs). Σε σφαιρική φιάλη 1 L, που περιέχει καλά

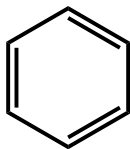
λειοτριβημένο υδρίδιο του ασβεστίου (CaH_2) μεταφέρονται περίπου 500 ml του εμπορικώς διαθέσιμου THF, και αφήνονται υπό ανάδευση για ένα βράδυ. Την επόμενη μέρα, η φιάλη με το διαλύτη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού, απαερώνεται ενδελεχώς, και έπειτα ο διαλύτης αποστάζεται σε γειτονική σφαιρική που περιέχει μεταλλικό νάτριο (Na), και αφήνεται υπό ανάδευση για ένα βράδυ. Αφού έχει αντιδράσει για αρκετές ώρες, ακολουθεί ενδελεχής απαέρωση και εκ νέου απόσταξη του διαλύτη σε γειτονική σφαιρική φιάλη 1 L, που φέρει στρόφιγγα, και περιέχει κράμα μεταλλικού καλίου-νατρίου (alloy) σε αναλογία 3:1. Μετά το πέρας της απόσταξης, ο διαλύτης αφήνεται υπό ανάδευση με το alloy, και μετά από λίγες ώρες παρατηρείται η εμφάνιση κυανού χρώματος, που αποτελεί ένδειξη της καθαρότητας του THF. Όπως είναι γνωστό, το αρνητικό ιόν καλίου επιδιαλυτώνεται στο THF και σχηματίζει διάλυμα με χαρακτηριστικό μπλε χρώμα. Έχει προταθεί ότι το χρώμα αυτό, προέρχεται από σύμπλοκα του καθαρού διαλύτη με αρνητικά ιόντα των μετάλλων, κυρίως του καλίου, λόγω μεταφοράς ηλεκτρονίων μέσω του THF (επιδιαλυτωμένα ηλεκτρόνια) σύμφωνα με την αντίδραση:



Εξάνιο:



Το εξάνιο (σ.ζ.=68 °C) χρησιμοποιείται ως μη διαλύτης κατά τη διαδικασία των ανακρυσταλλώσεων για τον καθαρισμό των μονομερών (N-καρβοξυ ανυδρίτες, NCAs). Ο καθαρισμός του εμπορικώς διαθέσιμου εξανίου περιλαμβάνει αρχικά την κατεργασία του με μικρή ποσότητα λεπτότατα κονιορτοποιημένου υδριδίου του ασβεστίου (CaH_2) για μια ημέρα σε σφαιρική φιάλη 1 L, για την απομάκρυνση ιχνών υγρασίας. Ακολούθως, η φιάλη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού και πραγματοποιείται ενδελεχής απαέρωση και απόσταξη του διαλύτη σε γειτονική σφαιρική φιάλη 2 L, που περιέχει μικρή ποσότητα κανονικού βουτυλολιθίου (n-BuLi), το οποίο αντιδρά με τυχόν προσμίξεις. Μετά το πέρας της απόσταξης ακολουθεί νέα απαέρωση του διαλύτη.

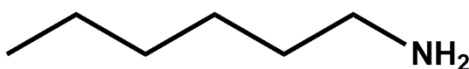


Βενζόλιο:

Το βενζόλιο (σ.ζ.=80 °C), λόγω της ιδιότητας του να σχηματίζει αζεοτροπικό μίγμα με το νερό, χρησιμοποιείται στην έκλυση των συσκευών πολυμερισμού πριν από την αντίδραση, προς απομάκρυνση της υγρασίας. Κατά τον καθαρισμό του αφήνεται υπό ανάδευση για μια μέρα σε σφαιρική φιάλη με λεπτότατα λειοτριβημένο CaH_2 , ώστε να απομακρυνθούν ίχνη υγρασίας από τον εμπορικά διαθέσιμο διαλύτη. Στη συνέχεια, η φιάλη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού, με χρήση ειδικού αντάπτορα, και το διάλυμα απαερώνεται και αποστάζεται σε φιάλη που περιέχει n-BuLi. Το βενζόλιο, αφήνεται υπό ανάδευση για μία μέρα με το n-BuLi, ώστε να αντιδράσουν και τα τελευταία ίχνη προσμίξεων μπορεί να περιέχει.

3.3 Καθαρισμός απαρχητών και αντιδραστηρίων

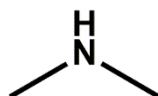
Εξυλαμίνη:



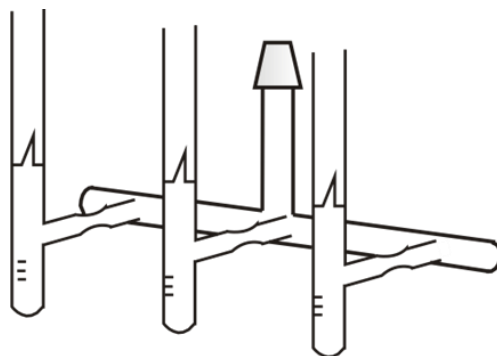
Η εξυλαμίνη (σ.ζ.131 °C) χρησιμοποιείται σαν απαρχητής στον πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου (ROP) των N-καρβόξυ ανυδριτών (NCAs). Για τον καθαρισμό της κατασκευάστηκε με υαλουργία συσκευή με δύο σφαιρικές, εκ των οποίων η μία είχε προσαρμοσμένο εσμύρισμα για να συνδεθεί με τη γραμμή υψηλού κενού, και η δεύτερη είχε ειδικό septum ώστε να γίνει η ένεση του απαρχητή. Η συσκευή προσαρμόστηκε στη γραμμή υψηλού κενού προκειμένου να ελεγχθεί για την ύπαρξη μικρο-οπών με τη χρήση πηνίου Tesla. Στη συνέχεια στην πρώτη σφαιρική τοποθετήθηκε μεταλλικό νάτριο (Na) ενώ στη δεύτερη έγινε ένεση περίπου 1,2 ml εξυλαμίνης. Η ποσότητα της εξυλαμίνης που προστέθηκε, αποστάχθηκε κλασματικά, προκειμένου να επιτευχθεί ένα πρώτο στάδιο καθαρισμού, στη σφαιρική που περιείχε το Na και αφέθηκε υπό ανάδευση για 24 ώρες. Το Na χρησιμοποιήθηκε σαν ξηραντικό για αυτό και παρατηρήθηκε έντονη αντίδρασή του με την υγρασία που περιείχε η εξυλαμίνη. Την επόμενη μέρα αποστάχθηκαν 200 μL εξυλαμίνης σε

βαθμονομημένη αμπούλα η οποία προσαρμόστηκε σε ειδική αμπουλοσυσσκευή αποτελούμενη από βαθμονομημένες αμπούλες και από έναν ογκομετρικό κύλινδρο. Στον κύλινδρο μέσω της γραμμής υψηλού κενού αποστάχθηκαν 30 ml διμέθυλοφορμαμιδίου (DMF) προκειμένου να γίνει αραίωση της εξυλαμίνης με γνωστή συγκέντρωση. Μετά το πέρας της απόσταξης η συσκευή αποκόπηκε από τη γραμμή με σύντηξη και με θραύση του υάλινου υμένα απελευθερώθηκε η ποσότητα της εξυλαμίνης. Τέλος η αμπουλοσυσσκευή με τον αραιωμένο πλέον απαραίτητη τοποθετήθηκε στο ψυγείο σε θερμοκρασία -20 °C.

Διμεθυλαμίνη (DMA):

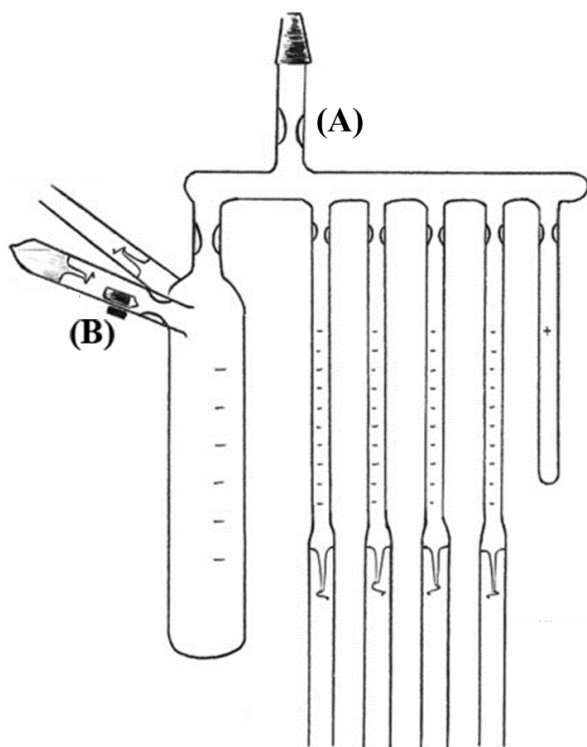


Η διμεθυλαμίνη (σ.ζ.=7 °C), η απλούστερη δευτεροταγής αμίνη, χρησιμοποιείται σαν απαραίτητης στον πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου (ROP) των NCAs. Καθώς σε θερμοκρασία δωματίου βρίσκεται σε αέρια μορφή, εξαιτίας του χαμηλού σημείου ζέσης και της υψηλής τάσης ατμών της (170,3 kPa στους 20 °C), πρέπει να υγροποιηθεί προκειμένου να ακολουθήσει η διαδικασία καθαρισμού. Για την υγροποίηση της προσαρμόζεται η οβίδα του αερίου στην γραμμή υψηλού κενού και πραγματοποιείται διεξοδικός έλεγχος με την βοήθεια του πηνίου Tesla για τυχόν διαρροές. Σε γειτονική υποδοχή προσαρμόζεται σφαιρική φιάλη των 100 mL που έχει απαερωθεί και περιέχει κάτοπτρο νατρίου. Η φιάλη εν συνεχεία ψύχεται με την βοήθεια λουτρού ισοπροπανόλης/ξηρού πάγου στους -78 °C. Τέλος ανοίγεται η στρόφιγγα της οβίδας σιγά και με ιδιαίτερη προσοχή ώστε να μην συμπυκνωθεί μεγαλύτερος όγκος αερίου από αυτόν της φιάλης. Όταν έχουν συμπυκνωθεί περίπου 10 mL DMA, το λουτρό ισοπροπανόλης/ξηρού πάγου ανταλλάσσεται γρήγορα με παγόνερο και αφήνεται το υγροποιημένο πλέον αέριο να αντιδράσει με το νάτριο για δύο ώρες. Περιοδικά συμπληρώνεται πάγος στο λουτρό, ώστε καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης η θερμοκρασία να μην υπερβεί το σημείο ζέσεως της DMA. Ακολούθως, η επιθυμητή ποσότητα DMA αποστάζεται σε κατάλληλη συσκευή που διαθέτει βαθμονομημένες αμπούλες (Σχήμα 29). Η κάθε αμπούλα του πυκνού απαραίτητη ψύχεται με υγρό άζωτο, απαερώνεται, συντήκεται στην στένωση που φέρει και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.



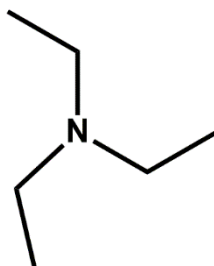
Σχήμα 29: Σχηματική αναπαράσταση συσκευής για την παραλαβή ενώσεων χαμηλού σημείου ζέσεως.

Μία από τις αμπούλες αυτές προσαρμόζεται σε συσκευή αραίωσης, η οποία μέσω του εσφυρίσματος που διαθέτει τοποθετείται στη γραμμή υψηλού κενού (Σχήμα 30). Ακολουθεί προσεκτική απαέρωση και ξήρανση της συσκευής (flame-drying) πριν την απόσταξη ποσότητας διαλύτη (εξάνιο) ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση του απαρχητή. Κατόπιν, η συσκευή απομακρύνεται από τη γραμμή κενού με σύντηξη στο σημείο (A) και προστίθεται ο απαρχητής με θραύση του γυάλινου υμένα (break-seal) της αμπούλας στο σημείο (B). Η συσκευή αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.



Σχήμα 30: Σχηματική αναπαράσταση συσκευής αραίωσης απαρχητή.

Τριαιθυλαμίνη (Et₃N):



Η τριαιθυλαμίνη χρησιμοποιείται κατά την σύνθεση του N(im)-Trt-His NCA ως μέσω δέσμευσης του παραγόμενου υδροχλωρίου. Για τον καθαρισμό της, η απαραίτητη ποσότητα Et₃N τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη 250 mL που περιέχει μικρή ποσότητα καλά λειοτριβημένου CaH₂ και αφήνεται υπό ανάδευση για μία ημέρα. Έπειτα η σφαιρική φιάλη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού, και αφού πρώτα απαερωθεί ενδελεχώς η ποσότητα της Et₃N, ακολουθεί απόσταξη σε γειτονική σφαιρική φιάλη με στρόφιγγα που περιέχει λεπτότατα κομμένες πλάκες μεταλλικού νατρίου (Na). Η τριαιθυλαμίνη παραμένει μαζί με το νάτριο (Na) υπό κενό στη φιάλη.

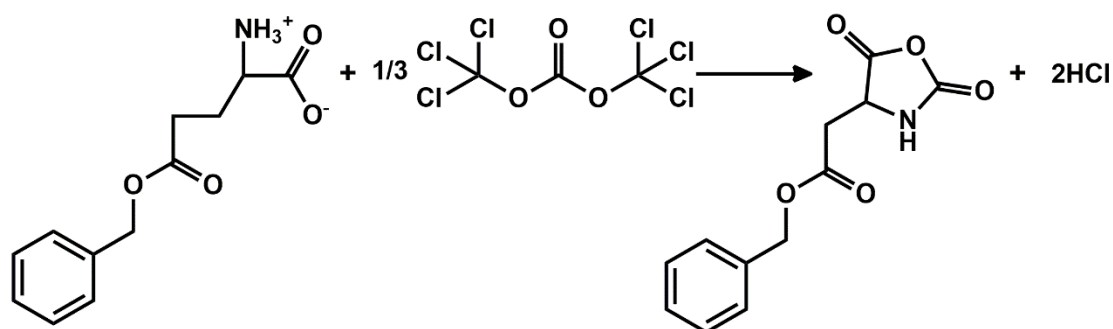
3.4 Σύνθεση και καθαρισμός N-Καρβοξυανυδριτών

Οι N-Καρβοξυανυδρίτες (NCAs) που είναι μη υποκατεστημένοι στο άζωτο δεν είναι εμπορικά διαθέσιμοι, λόγω της μεγάλης ευαισθησίας τους, και γι' αυτό το λόγο η σύνθεσή τους γίνεται εργαστηριακά ξεκινώντας από το πρόδρομο αντίστοιχο αμινοξύ. Στην εργασία αυτή χρησιμοποιούνται οι NCAs των αμινοξέων Γλουταμικό οξύ, Τρυπτοφάνη, Ιστιδίνη και Σαρκοζίνη και η συνθετική τους πορεία περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

3.4.1 Σύνθεση και καθαρισμός του γ-Bz-L-Glu NCA

Η σύνθεση του N-καρβόξυ ανυδρίτη του βένζυλο-L-Γλουταμικού οξέος γίνεται σύμφωνα με την μέθοδο του Roche παρουσία τετραϋδροφουρανίου σε υψηλότερη θερμοκρασία⁸⁴. Η αντίδραση (σχήμα 31) είναι πιο γρήγορη και οδηγεί σε μεγαλύτερες αποδόσεις, σχεδόν τρεις φορές. Επιπλέον η παρουσία

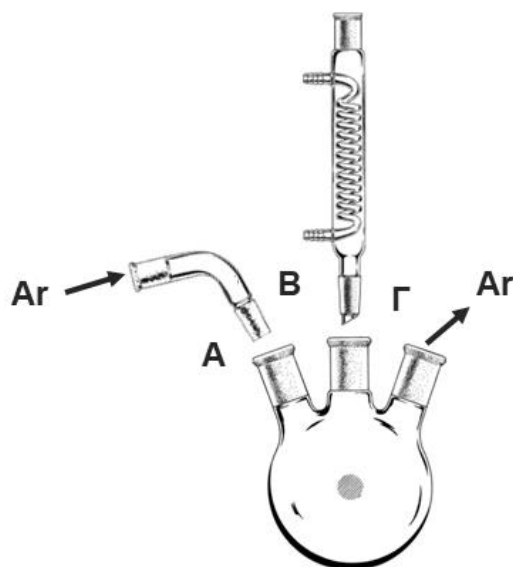
της βένζυλο ομάδας επιτρέπει τις όξινες συνθήκες της αντίδρασης χωρίς επιπλοκές.



Σχήμα 31: Αντίδραση σύνθεσης του BLG NCA.

Σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη 1 L ζυγίζονται 29,26 g (0.1222 mol) γ-βενζυλο-L-Γλουταμικού οξέος. Η φιάλη μέσω ειδικού επιθέματος με στρόφιγγα προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού και το προστατευμένο αμινοξύ αφήνεται για ξήρανση για μία νύχτα. Την επόμενη μέρα αποστάζονται σε αυτό 500 ml οξικού αιθυλεστέρα, και το αμινοξύ βρίσκεται υπό μορφή αιωρήματος. Έπειτα το αιώρημα μεταφέρεται στον απαγωγό και στην είσοδο (Α) τοποθετείται επίθεμα συνδεδεμένο με την παροχή αργού (Ar), ενώ στη θέση (Β) ψυκτήρας (σχήμα 32). Στη θέση (Γ) της φιάλης τοποθετείται bubbler ελαίου ώστε να ελέγχεται η ροή του αργού. Αυξάνεται σταδιακά η θερμοκρασία μέχρι τους 50 °C και όταν σταθεροποιηθεί και υπό ροή αργού, προστίθεται από την ελεύθερη θέση (Γ) σε μικρή περίσσεια το τριφωσγένιο 14,50 g (0,0480 mol) (αναλογία 1,2/3). Στα πρώτα είκοσι λεπτά το διάλυμα έχει γίνει ομογενές και αφήνεται υπό ανάδευση για 5 ώρες σε αδρανή ατμόσφαιρα αργού. Προς το τέλος της αντίδρασης διακόπτεται η θέρμανση ώστε το διάλυμα τελικά να έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολουθεί διήθηση του μίγματος από ηθμό πεφρυγμένης υάλου (No.3), υπό αδρανή ατμόσφαιρα αργού, σε νέα τρίλαιμη φιάλη προς απομάκρυνση στερεών παραπροϊόντων και αμινοξέος που δεν έχει αντιδράσει. Χρησιμοποιώντας επίθεμα με στρόφιγγα, η φιάλη προσαρμόζεται

στη γραμμή υψηλού κενού, ο διαλύτης αποσπάζεται σε γειτονική σφαιρική φιάλη, και το στερεό αφήνεται για ξήρανση στη γραμμή για περίπου 20 ώρες.

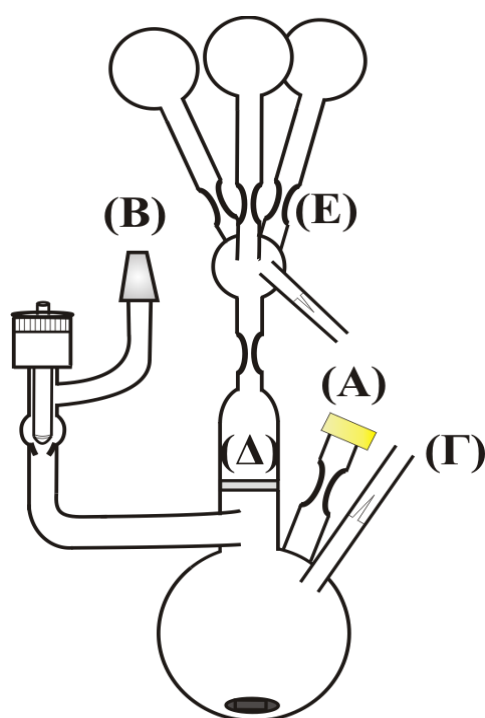


Σχήμα 32: Σχηματική αναπαράσταση της συσκευής σύνθεσης του BLG-NCA.

Καθαρισμός BLG-NCA

Στο στερεό προστίθεται οξικός αιθυλεστέρας περίπου 600 ml, και το διάλυμα ψύχεται σε θερμοκρασία 0 °C. Ακολουθούν εκχυλίσσεις, αρχικά με παγωμένο καθαρό υδατικό διάλυμα NaHCO₃ 0.5% κ.β και κατόπιν με παγωμένο υδατικό διάλυμα NaCl 3% κ.β, έως ότου το pH γίνει ουδέτερο. Με τον τρόπο αυτό, απομακρύνεται η περίσσεια του τριφωσγενίου, το HCl, υδροχλωρικά άλατα του αμινοξέος καθώς και υπολείμματα αμινοξέος που δεν έχουν αντιδράσει. Ακολούθως λαμβάνεται η οργανική στιβάδα και ξηραίνεται με MgSO₄. Η συσκευή ανακρυσταλλώσεων ξηραίνεται στη γραμμή υψηλού κενού, μέσω του επιθέματος στη θέση (B). Στην συνέχεια, και ενώ η συσκευή έχει στατικό κενό, πραγματοποιείται διήθηση του διαλύματος μέσα στη συσκευή, μέσω ηθμού πεφρυγμένης υάλου στη θέση (A). Το διάλυμα ψύχεται με υγρό άζωτο, και με σύντηξη στη στένωση απομακρύνεται το τμήμα (A), από το οποίο έγινε η διήθηση. Ο διαλύτης αποσπάζεται σε γειτονική φιάλη και το μονομερές αφήνεται για ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού. Την επόμενη μέρα λαμβάνει χώρα η διαδικασία των ανακρυσταλλώσεων με σύστημα διαλύτη/ μη διαλύτη σε ποσότητα 1/5. Πραγματοποιείται απόσταξη της ελάχιστης ποσότητας οξικού

αιθυλεστέρα (διαλύτης) ικανής να διαλύσει το μονομερές σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Εφόσον ο N-καρβόξυ ανυδρίτης του Γλουταμικού οξέος διαλυθεί πραγματοποιείται απόσταξη εξανίου (μη διαλύτη), μέσω της γραμμής, ποσότητα πενταπλάσια (ή μεγαλύτερη) της ποσότητας του διαλύτη. Το μονομερές καταβυθίζεται κατά την ολοκλήρωση της απόσταξης και η συσκευή τοποθετείται σε θερμοκρασία -20 °C για μία νύχτα για ποσοτική καταβύθιση. Την επόμενη μέρα πραγματοποιείται διήθηση, μέσω του ηθμού πεφρυγμένης υάλου στη θέση (Δ) της συσκευής, σε παρακείμενη φιάλη, η οποία και απομακρύνεται με σύντηξη στη στένωση στο σημείο (Ε).



Σχήμα 33: Σχηματική αναπαράσταση της συσκευής ανακρυσταλλώσεων των NCA's.

Η συσκευή προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού και το μονομερές αφήνεται για ξήρανση για ένα βράδυ. Η ανακρυστάλλωση επαναλαμβάνεται για ακόμη δύο φορές. Τέλος, ζυγίστηκαν 19,05 g (0,0762 mol) N-καρβόξυ ανυδρίτη γλουταμικού οξέος μέσα στο θάλαμο αδρανούς ατμόσφαιρας, όπου και φυλάσσονται, ενώ η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία υπερύθρου (FTIR).

Απόδοση κατά mol της αντίδρασης σύνθεσης του BLG-NCA: 60%.

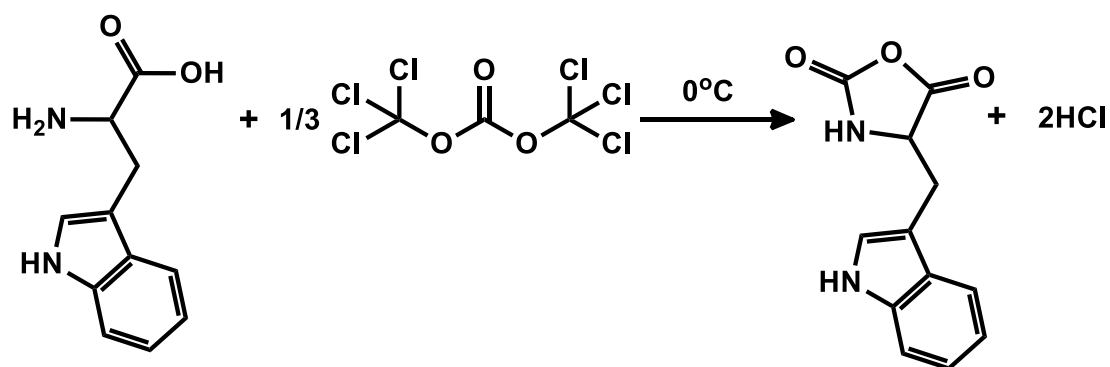
3.4.2 Σύνθεση του N-καρβόξυ ανυδρίτη της Τρυπτοφάνης (Trp-NCA)

Η σύνθεση του N-καρβόξυ ανυδρίτη της Τρυπτοφάνης γίνεται σύμφωνα με την μέθοδο του Roche παρουσία τετραϋδροφουρανίου (THF), με μια τροποποίηση όσον αφορά τη θερμοκρασία κατά την αντίδραση⁸⁵. Στην αρχή η προσθήκη του φωσγενίου γίνεται στους 0 °C, και εν συνεχεία η θερμοκρασία αυξάνεται μέχρι τους 40 °C. Με αυτόν τον τρόπο διασφαλίζουμε ότι δεν υπάρχουν ανεπιθύμητες αντιδράσεις στην πλευρική αλυσίδα της Τρυπτοφάνης. Για αποτελεσματικότερο έλεγχο των παράπλευρων αντιδράσεων, και αποφυγή του σχηματισμού του υδροχλωρικού άλατος του N καρβόξυ ανυδρίτη της Τρυπτοφάνης, εξετάσθηκαν δύο πειραματικές πορείες. Η διαφορά μεταξύ τους αφορούσε την χρήση λιμονενίου στην δεύτερη μέθοδο, όπως περιγράφεται παρακάτω, προς δέσμευση του παραγόμενου υδροχλωρίου.

Πειραματική πορεία χωρίς λιμονένιο

Σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη 500 ml ζυγίστηκε 1,01 g (0,0048 mol) του αμινοξέος της L-τρυπτοφάνης (L-Trp-OH). Στη συνέχεια η φιάλη με το στερεό προσαρμόστηκε στη γραμμή υψηλού κενού μέσω επιθέματος με στρόφιγγα προς ξήρανση για περίπου 18 ώρες. Την επόμενη μέρα, και εφόσον το αμινοξύ ήταν πλήρως ξηρό αποστάχθηκαν περίπου 20 ml τετραϋδροφουρανίου (THF). Η φιάλη με το προκύπτον αιώρημα, αφού απομακρύνθηκε από τη γραμμή, τοποθετήθηκε στον απαγωγό και συμπληρώθηκε με αργό. Προετοιμάστηκε η διάταξη της αντίδρασης (σχήμα 32), και η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 0°C. Εντός του απαγωγού ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 0,65 g τριφωσγενίου (0,0022 mol) στους 0°C, θερμοκρασία όπου διατηρείται σταθερή για μισή ώρα μετά την προσθήκη. Μετά το πέρας των 30 λεπτών λαμβάνεται δείγμα προς παρακολούθηση της πορείας της αντίδρασης με φασματοσκοπία υπερύθρου (IR), ενώ η θερμοκρασία αυξάνεται σταδιακά έως τους 40°C. Μετά από μισή ώρα στους 40°C παρατηρήθηκε ομογενοποίηση της αντίδρασης, λαμβάνοντας ένα υποκίτρινο διάλυμα. Η αντίδραση παραμένει στους 40°C και υπό έντονη ανάδευση προκειμένου να ολοκληρωθεί για 2 ώρες, ενώ κάθε 45 λεπτά λαμβάνεται δείγμα για φασματοσκοπία υπερύθρου (IR). Στη συνέχεια,

ακολουθεί μια τυπική διαδικασία καθαρισμού, αυτή των ανακρυσταλλώσεων.



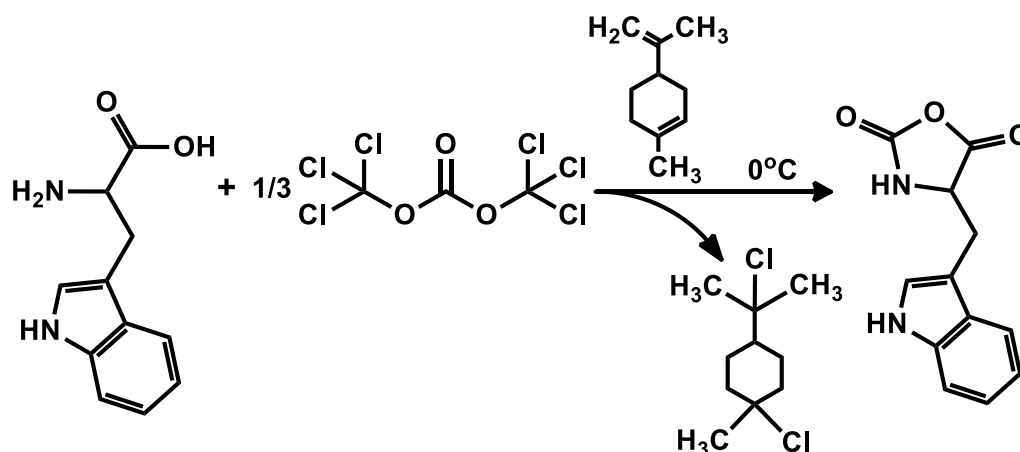
Σχήμα 34: Αντίδραση σύνθεσης του Trp-NCA.

Σε σφαιρική φιάλη 500 ml αποστάχθηκαν 200 ml εξάνιο μέσω της γραμμής υψηλού κενού και η φιάλη συμπληρώθηκε με αργό. Σε αυτήν αποχύνεται το διάλυμα της αντίδρασης, ώστε να καταβυθιστεί ο N-καρβόξυανυδρίτης της Τρυπτοφάνης. Η φιάλη παρέμεινε για λίγες ώρες σε θερμοκρασία $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ και στη συνέχεια ακολούθησε διήθηση υπό κενό (συσκευή Buchner). Το υποκίτρινο στερεό αφού ελέγχθηκε με φασματοσκοπία υπερύθρου (IR) τοποθετήθηκε σε σφαιρική φιάλη και προσαρμόστηκε στη γραμμή υψηλού κενού μέσω επιθέματος για ξήρανση για μία νύχτα. Εν συνεχεία, ακολούθησε δεύτερη ανακρυστάλλωση η οποία κρίθηκε απαραίτητη για καλύτερο καθαρισμό του ανυδρίτη. Στη σφαιρική φιάλη με τον N-καρβόξυ ανυδρίτη της τρυπτοφάνης αποστάχθηκαν περίπου 15 ml οξικού αιθυλεστέρα, και το υπό ανάδευση στερεό διαλύθηκε πλήρως με θέρμανση, έως τους $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Έπειτα ακολούθησε απόσταξη εξανίου, περίπου 100 ml στη φιάλη της αντίδρασης, υπό ανάδευση και σε θερμοκρασία 0°C . Ο ανυδρίτης της Τρυπτοφάνης καταβυθίστηκε και η φιάλη παρέμεινε σε θερμοκρασία $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 20 ώρες. Προς απομάκρυνση των διαλυτών, ακολούθησε δεύτερη διήθηση υπό κενό (συσκευή Buchner) και τελικά λήφθηκε υποκίτρινο στερεό σε μορφή πούδρας όπου τοποθετήθηκε σε σφαιρική και προσαρμόστηκε στη γραμμή υψηλού κενού για ξήρανση για ένα βράδυ. Τελικά ζυγίστηκαν 0,11 g (0,0005 mol) N-καρβόξυ ανυδρίτη της τρυπτοφάνης, μέσα στο θάλαμο αδρανούς ατμόσφαιρας, όπου και φυλάσσονται. Η καθαρότητα του ανυδρίτη ελέγχθηκε με φασματοσκοπία υπερύθρου (FTIR).

Απόδοση κατά mol της αντίδρασης σύνθεσης του Trp-NCA χωρίς λιμονένιο : 10%.

Πειραματική πορεία με λιμονένιο

Ουσιαστική διαφορά αυτής της μεθόδου συγκριτικά με τη προηγούμενη αποτέλεσε η προσθήκη λιμονενίου, προκειμένου να δεσμευτεί το υδροχλώριο που παράγεται από την αντίδραση σχηματισμού του ανυδρίτη (σχήμα 35).



Σχήμα 35: Αντίδραση σύνθεσης Trp-NCA με λιμονένιο.

Σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη ζυγίστηκε 1,01 g (0,0049 mol) αμινοξέος L-τρυπτοφάνης (L-Trp-OH) και προσαρμόστηκε στη γραμμή υψηλού κενού, όπως περιεγράφηκε παραπάνω για ξήρανση. Στη συνέχεια αποστάχθηκαν 20 ml τετραϋδροφουρανίου (THF) και προετοιμάστηκε η διάταξη της αντίδρασης στον απαγωγό. Αρχικά προστέθηκαν στη φιάλη 1,13 ml λιμονενίου και στη συνέχεια 0,653 g (0,0022 mol) τριφωσγενίου. Η αντίδραση παρέμεινε σε θερμοκρασία 0 °C για 30 min και έπειτα αυξήθηκε στους 40°C όπου και παρέμεινε προκειμένου να ολοκληρωθεί για 2 ώρες. Οι δειγματοληψίες για φασματοσκοπία υπερύθρου πραγματοποιήθηκαν στα ίδια χρονικά διαστήματα με την πρώτη μέθοδο, ώστε να γίνει σύγκρισή της κινητικής των δύο αντιδράσεων. Σε αυτή την περίπτωση η αντίδραση παρατηρήθηκε από τα φάσματα υπερύθρου να ολοκληρώνεται σε μικρότερο χρόνο. Χαρακτηριστική ένδειξη αποτέλεσε το γεγονός ότι η αντίδραση μετά την αύξηση της θερμοκρασίας απέκτησε την μορφή υποκίτρινου διαλύματος σε χρόνο 10 λεπτών αντί για 30 λεπτά. Μετά το πέρας της αντίδρασης η φιάλη

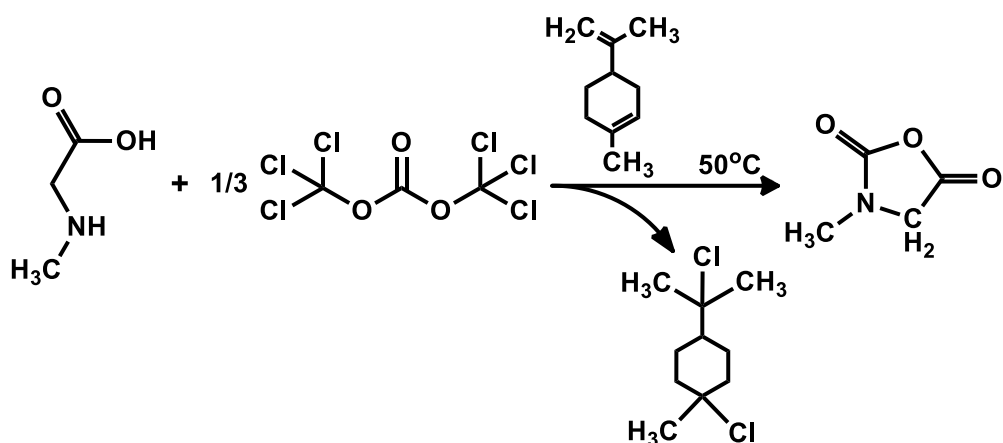
προσαρμόστηκε στη γραμμή υψηλού κενού προκειμένου να απομακρυνθούν όλοι οι διαλύτες και να παραμείνει στο στερεό για ξήρανση για μία νύχτα.

Την επόμενη μέρα ξεκίνησαν τα στάδια των ανακρυσταλλώσεων. Αρχικά αποστάχθηκαν στη φιάλη 20 ml οξικού αιθυλεστέρα ώστε να διαλυθεί πλήρως το στερεό, και στη συνέχεια περίπου 200 ml εξανίου οπότε παρατηρήθηκε εκλεκτική καταβύθιση του ανυδρίτη. Η φιάλη τοποθετήθηκε σε θερμοκρασία -20°C για λίγες ώρες και ακολούθησε διήθηση υπό κενό (συσκευή Buchner). Το υποκίτρινο στερεό συλλέχθηκε σε νέα σφαιρική φιάλη, και μέσω επιθέματος με στρόφιγγα προσαρμόστηκε στη γραμμή υψηλού κενού για ξήρανση όλη τη νύχτα. Ακολούθησε ακόμα μία ανακρυστάλλωση με τον ίδιο τρόπο, και τελικά ζυγίστηκαν 0,74 g (0,0032 mol) υποκίτρινου λεπτόκοκκου στερεού N-καρβόξυ ανυδρίτη της Τρυπτοφάνης, μέσα στο θάλαμο αδρανούς ατμόσφαιρας, όπου και φυλάχθηκαν. Η καθαρότητα του μονομερούς ελέγχθηκε με φασματοσκοπία υπερύθρου (IR).

Απόδοση κατά mol της αντίδρασης σύνθεσης του NCA-Trp παρουσία λιμονενίου: 65%.

3.4.3 Σύνθεση και καθαρισμός Sar-NCA.

Η σύνθεση του N-καρβόξυ ανυδρίτη της Σαρκοζίνης πραγματοποιείται σύμφωνα με την μέθοδο του Roche με μια τροποποίηση. Αυτή αφορά την παρουσία λιμονενίου⁸⁶ κατά την αντίδραση, όπως και στη περίπτωση του Trp-NCA, το οποίο υφίσταται υποκατάσταση από τα δύο παραγόμενα υδροχλώρια της φωσγενείωσης. Το γεγονός αυτό διευκολύνει αργότερα τον καθαρισμό του μονομερούς.



Σχήμα 36: Αντίδραση σύνθεσης Sar-NCA.

Σε ιγδίο κονιορτοποιούνται 10,00 g (0,1122 mol) πρόδρομου αμινοξέος σαρκοζίνης και μεταφέρονται σε σφαιρική φιάλη των 500 ml. Εν συνεχεία η φιάλη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού, και το αμινοξύ αφήνεται για ξήρανση για περίπου 20 ώρες. Στη συνέχεια, αποστάζονται στη φιάλη 250 ml THF και η φιάλη μεταφέρεται στον απαγωγό. Δημιουργείται η διάταξη με παροχή αργού (Ar) και ψυκτήρα (σχήμα 32). Στο διάλυμα προστίθενται 25 ml (0,1456 mol) απεσταγμένου λιμονενίου, δημιουργώντας αιώρημα με το αδιάλυτο αμινοξύ. Έπειτα αυξάνεται η θερμοκρασία στους 50 °C και μόλις σταθεροποιηθεί, και υπό ροή αργού (Ar) προστίθενται 11,01 g (0,0373 mmol) τριφωσγενίου (σχήμα 37). Η θερμοκρασία αυξάνεται σταδιακά μέχρι τους 70 °C και μετά το πέρας μιας ώρας παραλαμβάνεται υποκίτρινο διάλυμα. Αφήνεται άλλη μία ώρα με ροή αργού σε αυτή τη θερμοκρασία και υπό ανάδευση. Με το πέρας της αντίδρασης, η φιάλη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού προς εκδίωξη του διαλύτη όπου και προκύπτει ένα καφέ στερεό, το οποίο αποτελεί τον σχηματισμένο ανυδρίτη και τα προϊόντα υποκατάστασης του λιμονενίου. Το στερεό αφήνεται για ξήρανση στη γραμμή για περίπου 1 ώρα και έπειτα ακολουθεί μία ανακρυστάλλωση με διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα και μη διαλύτη εξάνιο όπως έχει περιγραφεί και παραπάνω. Το στερεό διαχωρίζεται μέσω διήθησης υπό κενό (συσσκευή Buchner) και μεταφέρεται σε ειδική συσκευή εξάχνωσης (cold finger). Τέλος πραγματοποιούνται δύο εξαχνώσεις στους 60 °C λαμβάνοντας εντυπωσιακούς λευκούς κρυστάλλους Sar-NCA 8.80 g (0,0765 mol).

Απόδοση κατά mol της αντίδρασης σύνθεσης του Sar-NCA 68%.

3.4.4 Σύνθεση Nim-Trt -(L)-His-NCA

Η σύνθεση για το μονομερές N^{im}-trityl-(L)-His NCA⁸⁷ πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο παραλαμβάνεται το υδροχλωρικό άλας του N^{im}-trityl-(L)-His NCA και στη συνέχεια απομακρύνοντας το υδροχλώριο (HCl) παραλαμβάνεται το καθαρό μονομερές N^{im}-trityl-(L)-His NCA. Για την σύνθεση χρησιμοποιείται θειόνυλο χλωρίδιο αντί του τριφωσγενίου.

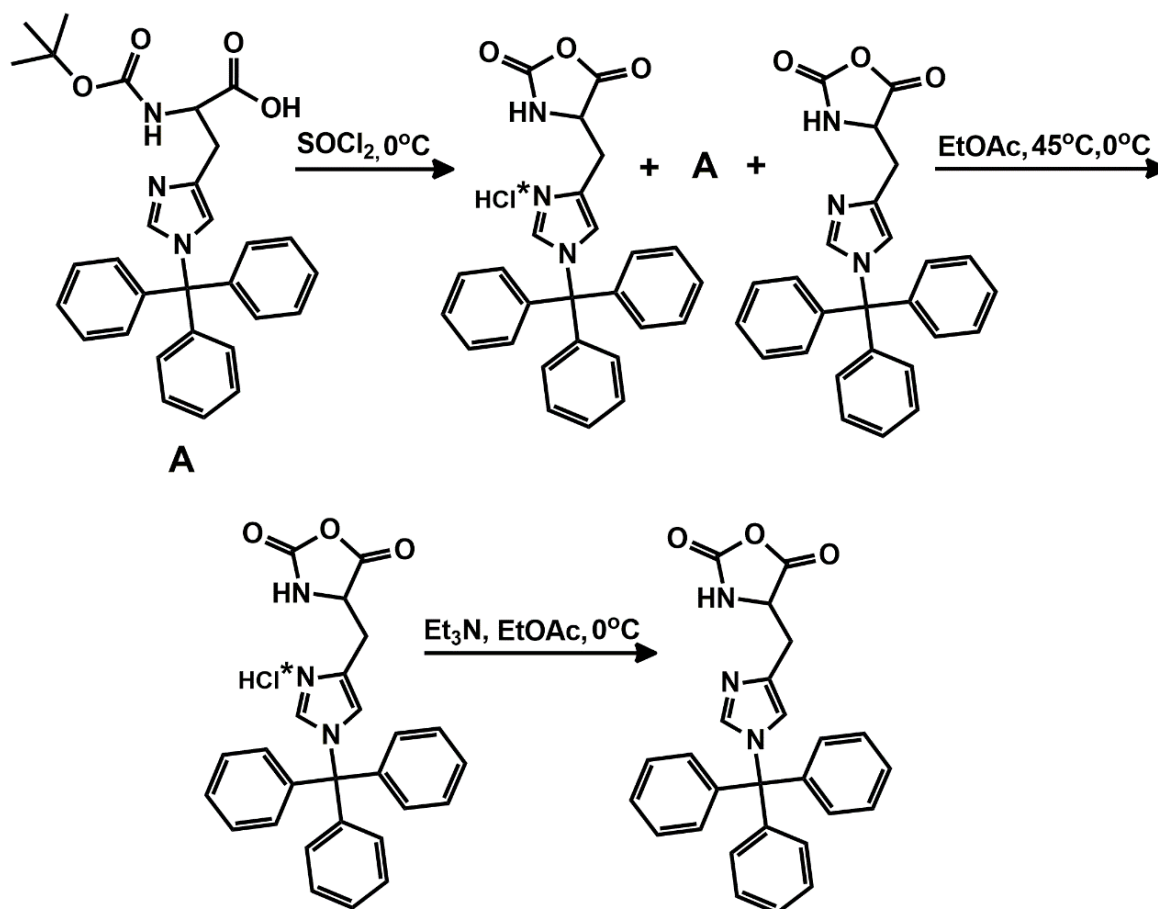
Σύνθεση Nim-Trt-(L)-His-NCA*HCl

Σε δίσαιμη σφαιρική φιάλη 2 L ζυγίζονται 20,01 g Boc-His(trt)-OH (0,0402 mol). Η φιάλη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού, μέσω επιθέματος με στρόφιγγα από τη μία είσοδο, και από την άλλη πωματίζεται με γυάλινο πώμα και το στερεό αφήνεται προς ξήρανση για περίπου 20 ώρες. Στη συνέχεια, αποστάζονται στη φιάλη 200 ml καθαρού τετραϋδροφουρανίου (THF), οπότε σχηματίζεται υποκίτρινο διάλυμα. Η φιάλη μεταφέρεται στον απαγωγό, όπου εφαρμόζεται ροή αργού ώστε να επιτευχθεί αδρανής ατμόσφαιρα στο διάλυμα. Με τεχνικές υαλουργίας κατασκευάζεται αμπούλα βαθμονομημένη στα 3,25 ml (0,0442 mol), στην οποία θα πραγματοποιηθεί η απόσταξη του θειόνυλο χλωριδίου (SOCl₂). Για την απόσταξή του, προσαρμόζονται στη γραμμή υψηλού κενού μία φιάλη 50 ml με επίθεμα με στρόφιγγα, η βαθμονομημένη αμπούλα, καθώς επίσης και μια άλλη φιάλη 50 ml όπου περιέχει περίπου 6ml θειόνυλο χλωρίδιο. Από τη φιάλη αυτή αποστάζονται τα 3,25 ml στην βαθμονομημένη αμπούλα. Ταυτόχρονα, αποστάζονται 30ml τετραϋδροφουρανίου στην άλλη φιάλη των 50 ml με τη στρόφιγγα. Έπειτα αποστάζονται σε αυτήν και τα 3,25 ml θειόνυλο χλωρίδιο (SOCl₂) από την αμπούλα. Η φιάλη με το θειόνυλο χλωρίδιο και το τετραϋδροφουράνιο απομακρύνεται από τη γραμμή, συμπληρώνεται με αργό, και μεταφέρεται στον απαγωγό, όπου προετοιμάζεται η διάταξη για την αντίδραση (σχήμα 38).



Σχήμα 37: Σχηματική αναπαράσταση της συσκευής σύνθεσης του Nim-Trt-(L)-His-NCA*HCl.

Στην είσοδο (A) τοποθετείται κατάλληλο επίθεμα μέσω του οποίου λαμβάνει χώρα η παροχή αργού. Στην είσοδο (B) της φιάλης τοποθετείται σύνδεσμος στον οποίο προσαρμόζεται κάθετα το σταγονομετρικό χωνί. Στην είσοδο (Γ) της φιάλης προσαρμόζεται bubbler ελαίου ώστε να ελέγχεται η ροή αργού. Ακολουθεί η τοποθέτηση της φιάλης σε παγόλουτρο, ώστε να επιβραδυνθούν πιθανές παράπλευρες αντιδράσεις, υπό συνεχή ανάδευση. Αφού ετοιμαστεί η παραπάνω διάταξη, το διάλυμα του θειόνυλο χλωριδίου σε τατραϋδροφουράνιο, μεταγγίζεται στο σταγονομετρικό χωνί, υπό ροή αργού και προστίθεται στάγδην στη φιάλη αντίδρασης (σχήμα 39). Η προσθήκη ολοκληρώνεται μέσα σε περίπου 30 λεπτά.



Σχήμα 38: Αντίδραση σύνθεσης του Nim-Trt-L-His-NCA.

Όταν η προσθήκη ολοκληρωθεί, το διάλυμα έχει αποκτήσει ένα πορτοκαλί χρώμα και το ιξώδες έχει αυξηθεί. Αμέσως μετά την προσθήκη του θειόνυλο χλωριδίου αλλά και μετά το πέρας 1 ώρας από την προσθήκη γίνεται λήψη φάσματος υπερύθρου (FTIR). Σταδιακά παρατηρείται έντονη αύξηση του ιξώδους και σχηματισμός λευκού στερεού ιζήματος (εικόνα 7). Το γεγονός αυτό, αποτελεί ένδειξη ότι η αντίδραση έχει ολοκληρωθεί, καθώς και ένδειξη υψηλής απόδοσης, οπότε η αντίδραση σταματά. Η ολοκλήρωση της αντίδρασης επιβεβαιώνεται από το φάσμα υπερύθρου (FTIR), στο οποίο παρατηρείται μείωση της κορυφής στα 1710 cm^{-1} , η οποία οφείλεται στην καρβοξυλική ομάδα του αρχικού αντιδρώντος, και διαρκεί περίπου μιάμιση ώρα συνολικά.



Εικόνα 7: Αντίδραση σχηματισμού του Nim-Trt-(L)-His-NCA*HCl αμέσως μετά την προσθήκη του SOCl₂ (αριστερά) και μετά από 1,5 ώρα (δεξιά).

Μετά το τέλος της αντίδρασης στο διάλυμα προστίθεται περίπου 1.5 L διαιθυλαιθέρα για την καταβύθιση του Nim-trt-(L)-His*HCl NCA ως κύριο προϊόν. Το υποκίτρινο στερεό διαχωρίζεται έπειτα από διήθηση υπό κενό (συσκευή Buchner), και συλλέγεται σε μια τρίλαιμη σφαιρική φιάλη των 500 ml. Η φιάλη εφαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού μέσω επιθέματος με στρόφιγγα και αφήνεται προς ξήρανση για ένα βράδυ. Την επόμενη μέρα πραγματοποιείται η πρώτη ανακρυστάλλωση με αλλαγή της διαλυτότητας ανάλογα με τη θερμοκρασία. Στην τριλαιμη φιάλη με το στερεό αποστάζονται περίπου 300 ml οξικού αιθυλεστέρα, και προκύπτει ένα κίτρινο γαλάκτωμα. Το γαλάκτωμα αφήνεται υπό ανάδευση για περίπου μία ώρα μέσα σε υδρόλουτρο στους 40 °C. Μετά το πέρας μιας ώρας, η φιάλη ψύχεται στους 0 °C και προς ποσοτική καταβύθιση του Nim-Trt-His-NCA*HCl, η αντίδραση αφήνεται σε αυτή τη θερμοκρασία για μία ώρα. Ο οξικός αιθυλεστέρας αποτελεί διαλύτη για το αρχικό αμινοξύ, το ενδιάμεσο χλωρίδιο αλλά και το ελεύθερο μονομερές, ενώ μη διαλύτη για το υδροχλωρικό άλας της ιστιδίνης. Το Nim-Trt-His-NCA*HCl παραλαμβάνεται ως μοναδικό προϊόν έπειτα από διήθηση υπό κενό (συσκευή Buchner). Το στερεό έχει υφή πούδρας και υποκίτρινο χρώμα. Η διήθηση πραγματοποιείται υπό ροή αργού ή αζώτου για να εμποδιστεί η επαφή του τελικού προϊόντος με τον ατμοσφαιρικό αέρα και την υγρασία. Το στερεό συλλέγεται και μεταφέρεται σε νέα τρίλαιμη σφαιρική φιάλη 500 ml με επίθεμα με στρόφιγγα, η οποία έχει προζυγιστεί, και ξηραίνεται στη γραμμή υψηλού

κενού όλο το βράδυ. (Παρατήρηση: Ζύγιση τρίλαιμης σφαιρικής φιάλης 500 ml και τριών γυάλινων πωμάτων: 236,28 g.)

Σύνθεση του Nim-Trt-His-NCA

Ακολουθεί το δεύτερο στάδιο σύνθεσης του N-καρβοξυανυδρίτη της (L)-Ιστιδίνης, το οποίο απαιτεί εξαιρετική προσοχή καθώς υπάρχει ο κίνδυνος έναρξης πολυμερισμού. Αφού η φιάλη πληρωθεί με αργό, ζυγίζεται ξανά όλη η διάταξη, ώστε να υπολογιστεί η μάζα του υδροχλωρικού άλατος του N-καρβόξυανυδρίτη της Ιστιδίνης. (Παρατήρηση: Ζύγιση τρίλαιμης σφαιρικής φιάλης, τριών γυάλινων πωμάτων και στερεού: 250,90 g.) Τελικά προκύπτουν 14,62 g (0,0361 mol) Nim-Trt-His-NCA*HCl. Η φιάλη με το στερεό προσαρμόζεται ξανά στη γραμμή υψηλού κενού, απαερώνεται, και αποστάζονται σε αυτήν 250 ml οξικού αιθυλεστέρα. Το προκύπτον λευκό γαλάκτωμα απομακρύνεται από τη γραμμή και αφήνεται υπό ανάδευση και υπό συνεχή παροχή αργού στον απαγωγό μέχρι να ολοκληρωθεί η διαδικασία συλλογής της τριαιθυλαμίνης. Λίγο πριν την προσθήκη της τριαιθυλαμίνης η φιάλη της αντίδρασης τοποθετείται σε παγόλουτρο.

Σε αυτό το βήμα παραλαμβάνεται ισομοριακή ποσότητα απεσταγμένης τριαιθυλαμίνης (Et_3N) 4,21 ml διαλυμένη σε οξικό αιθυλεστέρα, ώστε να δεσμευθεί ποσοτικά το υδροχλώριο στην αντίδραση. Η προσθήκη γίνεται στους 0 °C, για να μη συμβεί έναρξη του πολυμερισμού, στάγδην σε χρονικό διάστημα μιάμιση ώρας και υπό έντονη ανάδευση, ώστε να μη δημιουργηθεί τοπική περίσσεια τριαιθυλαμίνης. Μετά το τέλος της προσθήκης το γαλάκτωμα αφήνεται άλλα 30 λεπτά υπό ανάδευση ώστε να αντιδράσει πλήρως η τριαιθυλαμίνη. Μετά το πέρας της αντίδρασης ακολουθεί διήθηση από ηθμό πεφρυγμένης υάλου (No.3), προς εκδίωξη του υδροχλωρικού άλατος της τριαιθυλαμίνης, ενώ παράλληλα το διήθημα αποχύνεται σε 1,5 L εξάνιο, το οποίο βρίσκεται σε δίλαιμη φιάλη 2 L, προς καταβύθιση του $\text{N}^{\text{im}}\text{-trityl-His NCA}$. Το αιώρημα που προκύπτει διηθείται υπό κενό (συσκευή Buchner). Το καθαρό λευκό στερεό συλλέγεται υπό ροή αργού σε σφαιρική φιάλη 500 ml και αφήνεται προς ξήρανση για περίπου 20 ώρες στη γραμμή υψηλού κενού. Στη συνέχεια πραγματοποιείται το στάδιο του καθαρισμού του N-καρβόξυανυδρίτη, ένα από

τα πιο σημαντικά στάδια για την παραλαβή ενός καθαρού μονομερούς. Ο καθαρισμός περιλαμβάνει ανακρυσταλλώσεις από σύστημα οξικού αιθυλεστέρα/ n-εξανίου σε αναλογία 1:5 όπως έχει περιγραφεί και παραπάνω. Στη φιάλη με τον N-καρβόξυ ανυδρίτη της Ιστιδίνης αποστάζονται συνολικά 400 ml οξικού αιθυλεστέρα, όμως το στερεό δεν διαλύεται πλήρως αλλά παραμένει ένα υποκίτρινο γαλάκτωμα. Η πειραματική πορεία συνεχίζεται με διήθηση από ηθμό πεφρυγμένης υάλου (No.4) του γαλακτώματος και ταυτόχρονη καταβύθισή του διηθήματος σε 1.5 L εξάνιο, υπό συνεχή ροή αργού. Η ποσότητα του εξανίου βρίσκεται σε δίλαιο σφαιρική φιάλη 2 L. Στη συνέχεια ο καταβυθισμένος σε εξάνιο ανυδρίτης, διηθείται υπό κενό (συσκευή Buchner), υπό συνεχή ροή αργού, και συλλέγεται σε μια σφαιρική φιάλη 1 L και αφήνεται προς ξήρανση για όλο το βράδυ στη γραμμή υψηλού κενού. Την επόμενη μέρα, αποστάζονται συνολικά 500 ml οξικού αιθυλεστέρα, οπότε λαμβάνεται υποκίτρινο γαλάκτωμα. Ακολούθως πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό (σύστημα Buchner) σε ατμόσφαιρα αργού, και ταυτόχρονη καταβύθιση σε 1.5 L εξάνιο (in situ). Ο N-καρβόξυ ανυδρίτης της Ιστιδίνης απομονώνεται μέσω διήθησης από ηθμό πεφρυγμένης υάλου (No.4) και συλλέγεται σε σφαιρική φιάλη 500 ml. Η φιάλη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού μέσω επιθέματος με στρόφιγγα και αφήνεται για ξήρανση μέχρι την επόμενη μέρα. Ο N^{im}-Trt-His NCA συλλέγεται στο θάλαμο αδρανούς ατμόσφαιρας, όπου και ζυγίζονται 8.55 g (0,0202 mol). Για την πιστοποίηση της καθαρότητας του λαμβάνεται το τελικό φάσμα υπερύθρου (FTIR).

Απόδοση κατά mol της αντίδρασης σύνθεσης του N^{im}-Trt-His-NCA 50%.

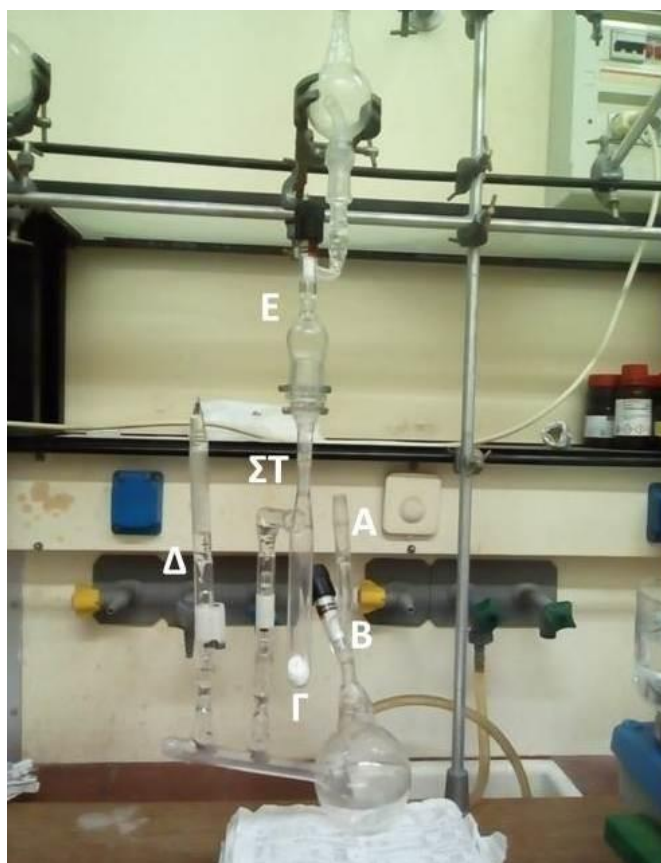
3.5 Σύνθεση ομοπολυμερών

3.5.1 Σύνθεση του ομοπολυμερούς PLGA με $M_n=10.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Σύνθεση του PBLG

Η αμπουλοσυσκευή με την εξυλαμίνη αραιωμένη σε διμέθυλοφορμαμίδιο (DMF) συγκέντρωσης 0,00005 M παραλαμβάνονται από την κατάψυξη και αποχύνονται περίπου 2 ml σε κάθε αμπούλα. Με χρήση υαλουργίας αποκόπτεται μία αμπούλα, με σύντμηση στη στένωση που φέρει στο πάνω

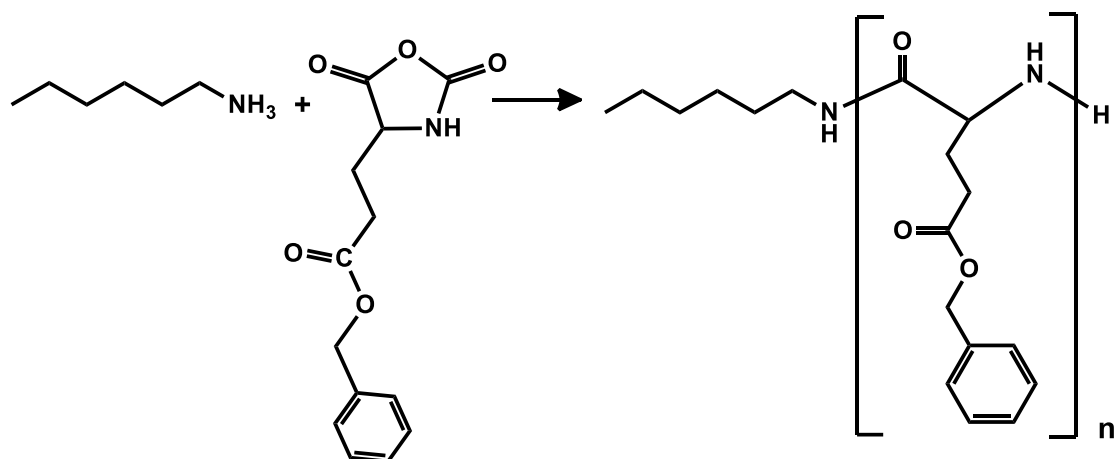
μέρος, και προσαρμόζεται στη συσκευή του πολυμερισμού στη θέση (Δ). Η συσκευή του πολυμερισμού περιλαμβάνει επίσης ειδικό επίθεμα (Α) ώστε να προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού, στρόφιγγα (Β) ώστε να αποφευχθεί η είσοδος αέρα και υγρασίας στο σύστημα που θα οδηγήσουν σε τερματισμούς, και ένα επιπλέον επίθεμα (Γ) από το οποίο θα γίνει η προσθήκη του μονομερούς από το θάλαμο αδρανούς ατμόσφαιρας.



Εικόνα 8: Απεικόνιση της συσκευής πολυμερισμού ομο- και συμπολυτεπτιδίων.

Αρχικά η συσκευή πολυμερισμού, που περιλαμβάνει την αμπούλα με την αραιωμένη εξυλαμίνη (2 mL), τοποθετείται στη γραμμή υψηλού κενού, ελέγχεται για μικρο-οπές και ξηραίνεται με τη χρήση φλόγας (flame-drying). Στη συνέχεια η συσκευή μεταφέρεται στο θάλαμο αδρανούς ατμόσφαιρας προκειμένου να γίνει η προσθήκη του μονομερούς. Ζυγίζονται συνολικά 1.05 g NCA-BLG και τοποθετούνται στη συσκευή πολυμερισμού (θέση Γ). Στη συνέχεια προσαρμόζεται ειδικό επίθεμα με στρόφιγγα και η συσκευή μεταφέρεται στη γραμμή υψηλού κενού. Τοποθετείται από τη θέση Ε στη γραμμή υψηλού κενού και απαερώνεται. Έπειτα αποστάζονται 25 ml καθαρού

διμέθυλοφορμαμιδίου (DMF) και η συσκευή απομακρύνεται από τη γραμμή υψηλού κενού με σύντμηση στο σημείο ΣΤ με τη χρήση υαλουργίας. Στη συνέχεια πραγματοποιείται θραύση του υάλινου υμένα της αμπούλας του απαρχητή και έπειτα του υάλινου υμένα της αμπούλας του μονομερούς με αποτέλεσμα την έναρξη του πολυμερισμού. Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι το πέρας του πολυμερισμού (σχήμα 40).



Σχήμα 39: Αντίδραση πολυμερισμού BLG-NCA.

Κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού η συσκευή τοποθετείται στη γραμμή υψηλού κενού κατά διαστήματα και απεερώνεται από το διοξείδιο του άνθρακα που δημιουργείται. Αυτό επιτυγχάνεται με το άνοιγμα της στρόφιγγας της συσκευής πολυμερισμού. Κατά τη διάρκεια που η στρόφιγγα παραμένει ανοιχτή στη γραμμή υψηλού κενού παράγονται χαρακτηριστικές φυσαλίδες. Οι φυσαλίδες αυτές είναι αέριο διοξείδιο του άνθρακα το οποίο απομακρύνεται από τη συσκευή πολυμερισμού προς την γραμμή υψηλού κενού και αποτελεί ένδειξη επιτυχούς πολυμερισμού. Έπειτα από τρεις (3) μέρες καταναλώνεται ολόκληρη η ποσότητα του μονομερούς και ο πολυμερισμός λαμβάνει τέλος. Ενδεικτικά δεν δημιουργούνται περεταίρω φυσαλίδες κατά το άνοιγμα της στρόφιγγας στη γραμμή υψηλού κενού.

Το στάδιο τερματισμού του πολυμερισμού πραγματοποιείται με το άνοιγμα της στρόφιγγας της συσκευής πολυμερισμού στον ατμοσφαιρικό αέρα. Το διάλυμα του πολυμερούς καταβυθίζεται σε 200 mL κρύου διαιθυλαιθέρα και διηθείται

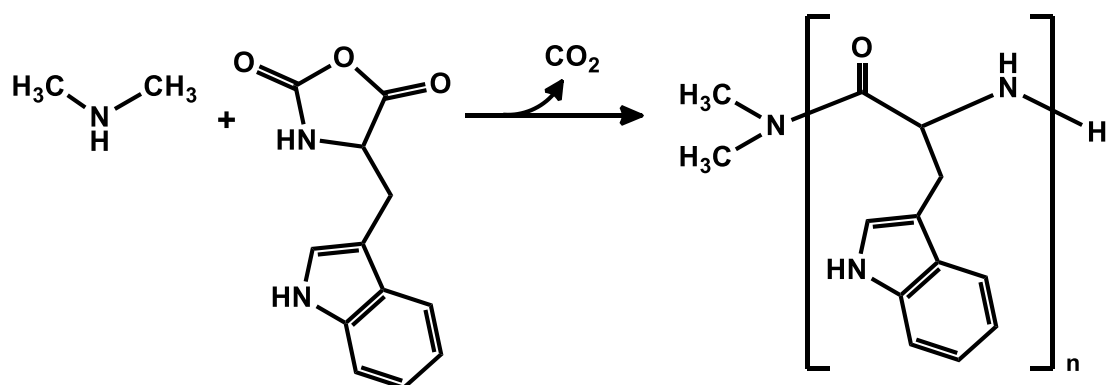
υπό κενό. Το πολυμερές συλλέγεται από το φίλτρο και ζυγίζεται (0.856 mg καθαρού πολύ(γ-βένζυλο L-γλουταμικού οξέος).

Αποπροστασία του PBLG⁸⁷

Σε σφαιρική φιάλη 50 ml όπου περιέχει 10 ml τριφθόρο ακετικό οξύ (TFA), διαλύθηκε ποσότητα 100 mg poly(Bz-L-Glu), σε θερμοκρασία 0 °C. Έπειτα προστίθεται 1 ml υδροβρώμιο (HBr 33% σε οξικό οξύ), και η αντίδραση που ακολουθεί παρατηρείται ότι είναι αρκετά εξώθερμη. Το διάλυμα παραμένει υπό ανάδευση στους 0 °C για 24 ώρες (ελάχιστος χρόνος αντίδρασης είναι οι 2 ώρες για να λάβει χώρα η αποπροστασία). Το αντιδρών μίγμα καταβυθίζεται σε 30 ml παγωμένο ξηρό διαιθυλαιθέρα και παραμένει σε θερμοκρασία -20 °C για περίπου 15 ώρες. Την επόμενη μέρα, το poly(L-Glutamic Acid) διηθείται υπό κενό (συσκευή Buchner) οπότε παραλαμβάνεται ένα υποκίτρινο στερεό, το οποίο τοποθετήθηκε σε σφαιρική φιάλη και προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού για ξήρανση για 10 περίπου ώρες. Στη συνέχεια το αποπροστατευμένο πολυμερές διαλυτοποιείται σε 15 ml απιονισμένου δις απεσταγμένου νερού (milli-Q) ώστε να ακολουθήσει η διαδικασία διαπύδησης (dialysis). Το διάλυμα μεταφέρεται προσεκτικά στη μεμβράνη διαπύδησης (MWCO=3,500), και η μεμβράνη τοποθετείται σε ποτήρι ζέσης 2 L όπου περιέχει 2 L απιονισμένο δις-απεσταγμένο νερό (milli-Q). Στη μεμβράνη που χρησιμοποιήθηκε, οι ουσίες με μοριακό βάρος μικρότερο του MWCO απομακρύνονται στο νερό χωρίς να συγκρατούνται από την μεμβράνη και έτσι το πολυμερές που συντέθηκε θα παραμείνει μέσα στη μεμβράνη, ενώ όλες οι αποκομμένες ομάδες (βένζυλο ομάδες) και τα παραπροϊόντα θα περάσουν από τους πόρους εκτός της μεμβράνης. Έπειτα από τρεις ώρες ανανεώνεται το εξωτερικό νερό, και την επόμενη μέρα το περιεχόμενο της μεμβράνης μεταφέρεται σε μια σφαιρική φιάλη 50 ml. Στη συνέχεια, η σφαιρική φιάλη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού και ακολουθεί λυοφιλοποίηση (freeze-drying) προς απομάκρυνση του νερού. Το στερεό που συλλέχθηκε μετά την ξήρανση χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία υπέρυθρου (FTIR).

3.5.2 Σύνθεση του ομοπολυμερούς Poly-Trp με $M_n=10.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Παραλαμβάνεται η αμπουλοσυσσκευή με την διμεθυλαμίνη (DMA) αραιωμένη σε εξάνιο, και αποχύνεται περίπου 1 ml σε κάθε αμπούλα. Ακολουθείτε η διαδικασία που περιεγράφηκε παραπάνω αναλυτικά, και η αμπούλα του απαραίτητη προσαρμόζεται στην συσκευή πολυμερισμού. Η ποσότητα του Ν-καρβόξυ ανυδρίτη της Τρυπτοφάνης που ζυγίστηκε στο θάλαμο αδρανούς ατμόσφαιρας ήταν 1.40 g (NCA-Trp). Ο πολυμερισμός διήρκεσε συνολικά τέσσερις ημέρες ενώ ανά τακτά χρονικά διαστήματα πραγματοποιούνταν απαέρωση από το παραγόμενο διοξείδιο του άνθρακα (CO_2). Μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού, ακολούθησε η διαδικασία τερματισμού του όπως περιγράφηκε και προηγουμένως και καταβύθιση του πολυμερούς σε 200 ml παγωμένου διαιθυλαιθέρα. Τελικά ζυγίστηκαν 0,851 g ξηρού ομοπολυμερούς Poly-Trp.

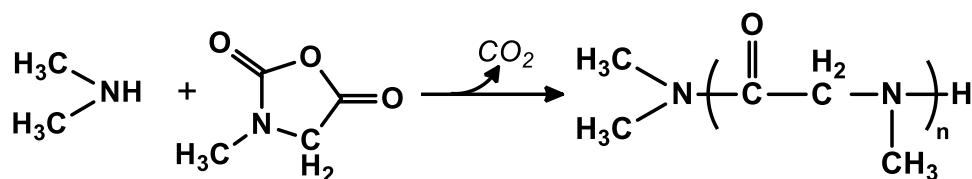


Σχήμα 40: Αντίδραση πολυμερισμού Trp-NCA

3.5.3 Σύνθεση του ομοπολυμερούς Poly-Sar με $M_n=10.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Σαν απαραίτητης του πολυμερισμού χρησιμοποιήθηκε αμπούλα διμεθυλαμίνης (DMA) 1 ml αραιωμένη σε διμέθυλοφορμαμίδιο (DMF) και όπως και στα δύο προηγούμενα ομοπολυμερή ακολουθήθηκε η ίδια ακριβώς διαδικασία. Η ποσότητα του Ν-καρβόξυ ανυδρίτη της Σαρκοζίνης που ζυγίστηκε στον θάλαμο αδρανούς ατμόσφαιρας ήταν 1,83 g (NCA-Sar). Ο πολυμερισμός διήρκεσε δύο ημέρες και τελικά ζυγίστηκαν 1,25 g καθαρού ομοπολυμερούς Poly-Sar, τα

οποία παραλήφθηκαν έπειτα από καταβύθιση σε 200 ml διαιθυλαιθέρα, διήθηση υπό κενό και ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού.



Σχήμα 41: Αντίδραση πολυμερισμού Sar-NCA.

3.6 Σύνθεση υβριδικών κατά συστάδες συμπολυμερών

3.6.1 Του τύπου Poly(Ethylene Oxide)-b-Poly(L-Histidine-co-Sarcosine) (m-PEO-b-P(His-co-Sar)) με 10% Sarcosine/ Histidine

Για τη σύνθεση του δισυσταδικού συμπολυμερούς PEO-*b*-P(His-co-Sar) με αναλογία Sar/His = 10% χρησιμοποιούνται 0.3 g μακροαπαρχητή m-PEO-NH₂ (MB = 10.000 g/mol), με ακραία αμινομάδα ικανή να εκκινήσει τον πολυμερισμό των N-καρβοξυανυδριτών των α-αμινοξέων της ιστοδίνης και της σαρκοζίνης. Δεδομένης της γνωστής ποσότητας του απαρχητή που θα χρησιμοποιηθεί και του συνολικού μοριακού βάρους της δεύτερης συστάδας (P(His-co-Sar) = 6000 g/mol), αρχικά γίνονται υπολογισμοί για την εύρεση των ποσοτήτων των δύο μονομερών Nim-Trt-His NCA και Sar NCA που θα χρησιμοποιηθούν. Ακολουθεί η ζύγιση 0.30 g του μακροαπαρχητή m-PEO-NH₂ και η μεταφορά του στη φιάλη πολυμερισμού όμοια με αυτή που χρησιμοποιήθηκε και για τα ομοπολυμερή. Η συσκευή προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού, όπου αφήνεται για μία νύχτα προς ξήρανση του απαρχητή. Την επόμενη μέρα λαμβάνει χώρα απόσταξη περίπου 10-15 ml βενζολίου στη φιάλη που βρίσκεται ο απαρχητής μέσω της γραμμής υψηλού κενού. Μετά την απόσταξη, παρατηρείται πλήρης διαλυτοποίηση του m-PEO-NH₂ στο βενζόλιο, και το προκύπτον άχρωμο διάλυμα αφήνεται για μία ώρα υπό ανάδευση. Στη συνέχεια ακολουθεί απομάκρυνση του βενζολίου με απόσταξη σε παρακείμενη σφαιρική φιάλη 250 ml.. Τέλος, ο απαρχητής αφήνεται προς ξήρανση για περίπου 20 ώρες στη γραμμή υψηλού κενού. Σκοπός αυτού του βήματος είναι η πλήρης απομάκρυνση έστω και ιχνών υγρασίας του απαρχητή, εφόσον το βενζόλιο έχει την ιδιότητα να δημιουργεί αζεοτροπικό μίγμα με το νερό, επομένως κατά την απομάκρυνσή του μέσω απόσταξης συμπαρασύρει και τα

ίχνη υγρασίας του απαρχητή. Σε επόμενο στάδιο, πραγματοποιείται απόσταξη 15-20 ml διαλύτη διμέθυλοφορμαμιδίου (DMF), στη φιάλη που φέρει τον απαρχητή, μέσω της γραμμής υψηλού κενού. Το διμέθυλοφορμαμίδιο αποτελεί τον διαλύτη του πολυμερισμού, καθώς σε αυτόν διαλυτοποιούνται καλά τόσο ο απαρχητής, όσο και τα μονομερή. Προκειμένου να επιτευχθεί πλήρης διαλυτοποίηση του απαρχητή στο DMF, η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση για περίπου μία ώρα σε θερμοκρασία έως 35 °C (υδρόλουτρο). Η θερμοκρασία του υδρόλουτρου δεν πρέπει να είναι πολύ υψηλή, ώστε να αποφευχθεί η θερμική διάσπαση του DMF προς διμεθυλαμίνη, η οποία μπορεί εν δυνάμει να εκκινήσει πολυμερισμό. Στη συνέχεια πραγματοποιείται είσοδος της συσκευής πολυμερισμού στο θάλαμο αδρανούς ατμόσφαιρας, προκειμένου να εισαχθούν τα μονομερή, σε ποσότητες 0.6253 g N(im)-trt-His-NCA και 0.03643 g Sar NCA. Μετά την προσθήκη των NCAs και αφού έχει προσαρμοστεί το ειδικό επίθεμα με τη στρόφιγγα στην αμπούλα των μονομερών, η συσκευή πολυμερισμού προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού προκειμένου να απαερωθεί ενδελεχώς. Στην αμπούλα των μονομερών πραγματοποιείται απόσταξη περίπου 10 ml διμέθυλοφορμαμιδίου (DMF) και διατηρώντας το διάλυμα παγωμένο, η συσκευή απομακρύνεται από τη γραμμή υψηλού κενού μετά από σύντηξη με χρήση υαλουργίας (όπως έχει περιγραφεί και προηγουμένως). Εφόσον έχουμε πλήρη διαλυτοποίηση όλων των στερεών της αντίδρασης στο DMF, το επόμενο στάδιο είναι η θραύση του υάλινου υμένα της αμπούλας των μονομερών, ώστε να εκκινηθεί ο πολυμερισμός. Η συσκευή προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού όπου αφήνεται υπό ανάδευση για περίπου 5 ημέρες, χρονικό διάστημα το οποίο χρειάζεται για να ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός. Σε αυτό το χρονικό διάστημα, παρατηρείται έντονη έκλυση διοξειδίου του άνθρακα από το διάλυμα, το οποίο αποτελεί την κινητήρια δύναμη για την διάδοση του πολυμερισμού. Για το λόγο αυτό, ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού, η στρόφιγγα της συσκευής ανοίγεται για μικρό χρονικό διάστημα με σκοπό να εκτονωθεί και να απομακρυνθεί το υπερκείμενο αέριο διοξείδιο του άνθρακα που έχει παραχθεί και έτσι η ισορροπία της αντίδρασης να μετατοπίζεται προς την κατεύθυνση παραγωγής του πολυπεπτιδίου. Ένδειξη ότι ο πολυμερισμός ολοκληρώθηκε αποτελούν η

μειωμένη έως και ανύπαρκτη ποσότητα των φυσαλίδων που σχηματίζονται στο διάλυμα της αντίδρασης κατά την έκλυση του CO₂. Προς επιβεβαίωση της ολοκλήρωσης του πολυμερισμού, πραγματοποιείται εισαγωγή της συσκευής στο θάλαμο αδρανούς ατμόσφαιρας, ώστε να ληφθεί δείγμα για φασματοσκοπία υπερύθρου (FTIR). Σε αυτό το φάσμα δεν πρέπει να παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές κορυφές των NCAs. Μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού, σειρά έχει η καταβύθιση του πολυμερούς σε περίπου 300 ml παγωμένου διαιθυλαιθέρα. Παρατηρείται αμέσως σχηματισμός λευκού αιωρήματος, ένδειξη της επιτυχούς καταβύθισης του πολυμερούς και ακολούθως το ποτήρι ζέσεως τοποθετείται για ένα βράδυ σε θερμοκρασία -20 °C, προκειμένου να επιτευχθεί ποσοτική καταβύθιση του πολυμερούς. Έπειτα, λαμβάνει χώρα διήθηση υπό κενό (συσκευή Buchner). Στη συνέχεια, το στερεό συλλέγεται σε μία σφαιρική φιάλη των 50 ml και αφήνεται στη γραμμή υψηλού κενού προς ξήρανση για μία νύχτα. Την επόμενη μέρα λαμβάνεται δείγμα από το πολυμερές προκειμένου να αναλυθεί με φασματοσκοπία υπερύθρου (FTIR) και να εξακριβωθεί η επιτυχής του σύνθεση.

Στο επόμενο βήμα, λαμβάνει χώρα η αποπροστασία των μονομερικών μονάδων της ιστιδίνης από τις τρίτυλο προστατευτικές τους ομάδες. Έτσι, στο πολυμερές που βρίσκεται στη σφαιρική φιάλη των 50 ml προστίθενται 15 ml διχλωρομεθανίου και το αιώρημα αφήνεται υπό ανάδευση για περίπου 30 λεπτά, έως ότου σχηματιστεί ένα θολό κίτρινο γαλάκτωμα. Στη συνέχεια, προστίθενται στο παραπάνω μίγμα 10 ml τριφθοροξικού οξέος TFA, οπότε το χρώμα του διαλύματος αλλάζει αμέσως σε έντονο κίτρινο και το διάλυμα διαυγάζει. Το γεγονός αυτό, αποτελεί ένδειξη ότι πραγματοποιήθηκε η αποπροστασία, καθώς οι τρίτυλο προστατευτικές ομάδες όντας πια ελεύθερες στο διάλυμα απορροφούν στο ορατό λόγω των βενζολικών τους δακτυλίων (εξ' ου και το έντονο κίτρινο χρώμα του διαλύματος). Μετά την προσθήκη του TFA όλο το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση για μία ώρα. Ακολούθως, στο παραπάνω διάλυμα προστίθεται στάγδην με χρήση πιπέτας τριαιθυλοσιλάνιο, έως ότου το χρώμα του διαλύματος αλλάξει από έντονο κίτρινο σε άχρωμο προς υποκίτρινο. Στο τριαιθυλοσιλάνιο προσκολλώνται οι ελεύθερες τριτυλο προστατευτικές ομάδες τις ιστιδίνης μετά την αποπροστασία, αποφεύγοντας

έτσι την επανασύνδεσή τους με αυτήν. Το επόμενο στάδιο περιλαμβάνει την απομάκρυνση όλων των παραπάνω διαλυτών από το πολυμερές. Για το λόγο αυτό πραγματοποιείται απόσταξη των διαλυτών σε γειτονική σφαιρική φιάλη των 250 ml μέσω της γραμμής υψηλού κενού. Μετά το τέλος της απόσταξης, παραμένει στη φιάλη των 50 ml μόνο το στερεό πολυμερές, το οποίο αφήνεται στη γραμμή υψηλού κενού προς ξήρανση για μία νύχτα. Την επόμενη μέρα λαμβάνεται δείγμα από το πολυμερές προκειμένου να αναλυθεί με φασματοσκοπία FT-IR και να εξακριβωθεί η επιτυχής αποπροστασία του.

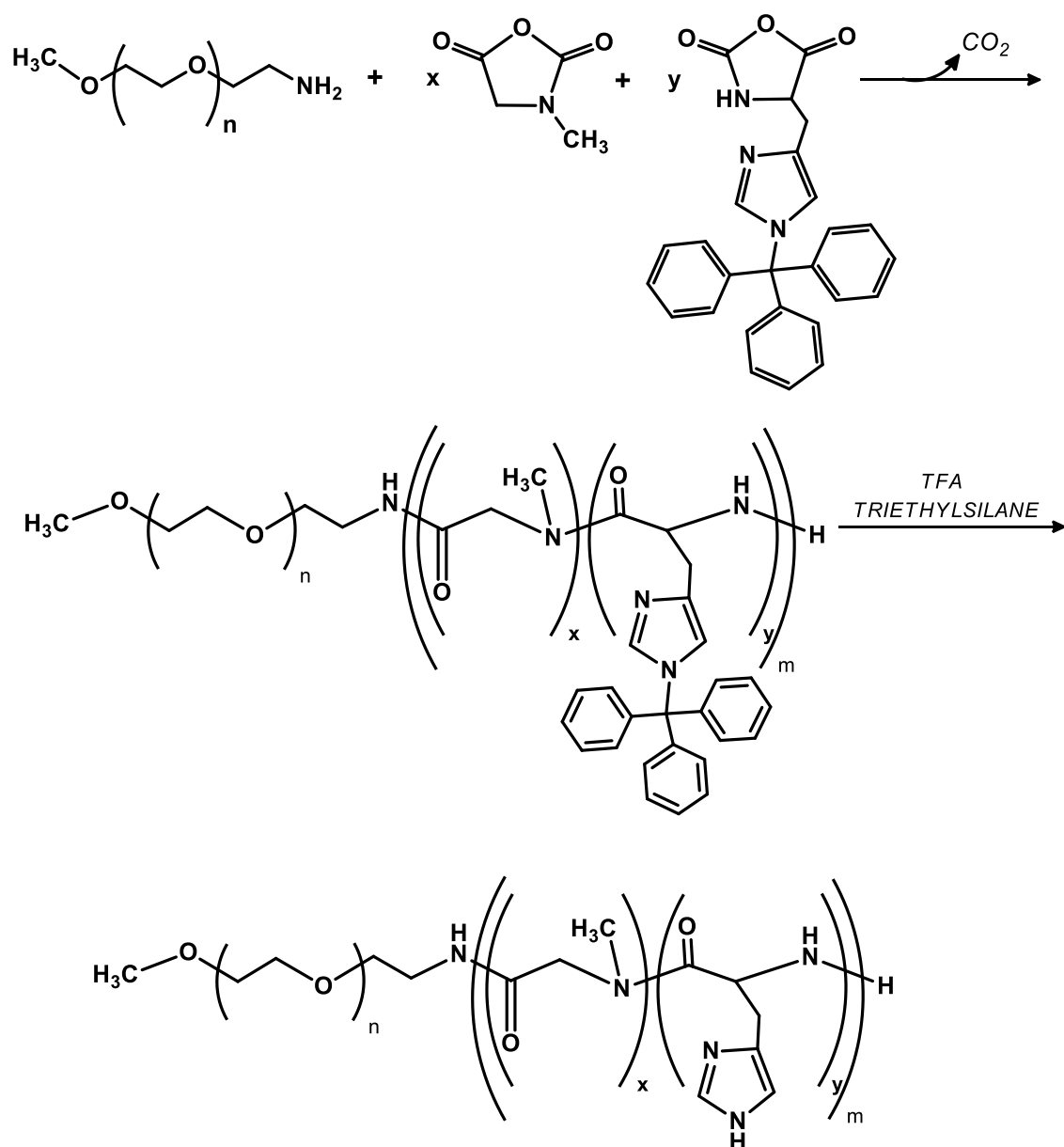
Ακολούθως, λαμβάνει χώρα η διαδικασία της διαπίδυσης (dialysis) για την απομάκρυνση των δεσμευμένων τριτυλο-ομάδων από το πολυμερές διαμέσου των πόρων της μεμβράνης. Έτσι, το πολυμερές, που βρίσκεται στη σφαιρική φιάλη των 50 ml διαλύεται σε 10 ml απεσταγμένο δις-απιονισμένο νερό (milli-Q) και αφήνεται υπό ανάδευση για 10-15 min. Ταυτόχρονα, κατάλληλη μεμβράνη διαπίδυσης (dialysis), μεμβράνη πολυκυτταρίνης (όριο αποκλεισμού MWCO=3.500) μήκους 15 cm αφήνεται για 30 min, μέσα σε ποτήρι ζέσεως με νερό Milli-Q, ώστε να φουσκώσει και να ανοίξουν οι πόροι της. Στη συνέχεια, το περιεχόμενο της φιάλης τοποθετείται με την βοήθεια πιπέτας στη μεμβράνη, η οποία τοποθετείται σε ποτήρι ζέσεως 2 L που περιέχει 2 L νερό milli-Q υπό ανάδευση. Το pH του εξωτερικού διαλύματος ρυθμίζεται με προσθήκη μερικών σταγόνων HCl 1 N περίπου στο 3. Η προσθήκη πυκνού HCl γίνεται για να μην σχηματίσει η ιστιδίνη β-φύλλο στη δευτεροταγή της δομή. Μετά από τρεις ώρες, πραγματοποιείται αλλαγή του νερού Milli-Q και προστίθενται πάλι σταγόνες HCl 1 N έως pH=3 (το διάλυμα του πολυμερούς στη μεμβράνη είναι θολό). Μετά το πέρας 3 ωρών ανανεώνεται το νερό Milli-Q και προστίθενται σταγόνες βάσης NaOH 1 N μέχρι το pH = 9. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρι να παρατηρηθεί σταθεροποίηση του pH στην περιοχή 7-8. Όταν το pH σταθεροποιηθεί γίνονται ακόμα δύο αλλαγές νερού με σκέτο milli-Q, ώστε να απομακρυνθεί τυχόν περίσσεια του NaOH. Η διαδικασία του dialysis διαρκεί συνολικά 3-4 ημέρες.

Στη συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία της λυοφιλοποίησης (freeze-drying), για την εκδίωξη του νερού από το πολυμερές. Το περιεχόμενο της μεμβράνης (πολυμερές διαλυμένο σε νερό) αποχύνεται σε σφαιρική φιάλη των 250 ml,

ψύχχεται με τη βοήθεια υγρού αζώτου και προσαρμόζεται σε ειδική συσκευή λυοφιλοποίησης στη γραμμή υψηλού κενού. Η φιάλη αρχικά απαερώνεται και το νερό αποστάζεται από τη αρχική φιάλη σε κενή γειτονική παγίδα που διαθέτει η συσκευή, η οποία ψύχεται διαρκώς με χρήση υγρού αζώτου. Η διαδικασία της λυοφιλοποίησης διαρκεί 1 ημέρα. Τελικά, λαμβάνονται 0,49 g πολυμερούς σε μορφή λευκού στερεού.

3.6.2 Σύνθεση υβριδικών κατά συστάδες συμπολυμερών του τύπου Poly(Ethylene Oxide)-b-Poly(L-Histidine-co-Sarcosine) (m-PEO-b-P(His-co-Sar)) με 20% Sarcosine/ Histidine

Για τη σύνθεση του δισυσταδικού συμπολυμερούς PEO-*b*-P(His-*co*-Sar) με αναλογία Sar/His = 20% χρησιμοποιούνται 0.3 g μακροαπαρχητή m-PEO-NH₂ (MB = 10000 g/mol), με ακραία αμινομάδα ικανή να εκκινήσει τον πολυμερισμό των N-καρβοξυανυδριτών των α-αμινοξέων της ιστιδίνης και της σαρκοζίνης. Δεδομένης της γνωστής ποσότητας του απαρχητή που θα χρησιμοποιηθεί και του συνολικού μοριακού βάρους της δεύτερης συστάδας (P(His-*co*-Sar) = 6000 g/mol), αρχικά γίνονται υπολογισμοί για την εύρεση των ποσοτήτων των δύο μονομερών N(im)-Trt-His NCA και Sar NCA που θα χρησιμοποιηθούν. Οι χρησιμοποιούμενες ποσότητες των μονομερών σε αυτόν τον πολυμερισμό είναι 0.5558 g Nim-trt-His-NCA και 0.07286 g Sar NCA. Η πειραματική πορεία που ακολουθείται για τον πολυμερισμό είναι ακριβώς η ίδια με εκείνη που περιγράφηκε στην παράγραφο 3.6.1 για τη σύνθεση του συμπολυμερούς PEO-*b*-P(His-*co*-Sar) με αναλογία Sar/His = 10%. Ο πολυμερισμός και σε αυτήν την περίπτωση διαρκεί 5-6 ημέρες και στο τέλος όλης της πειραματικής διαδικασίας λαμβάνονται 0.47g συμπολυμερούς PEO-*b*-P(His-*co*-Sar) με αναλογία Sar/His = 20%. Η επιτυχής σύνθεση του πολυμερούς ελέγχεται σε κάθε σχεδόν στάδιο της συνθετικής πορείας με λήψη φασμάτων FT-IR και τελικά επιβεβαιώνεται με χρήση της φασματοσκοπίας NMR και με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC).



Σχήμα 42: Αντίδραση σύνθεσης πολυμερών του τύπου PEO-b-P(His-co-Sar).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

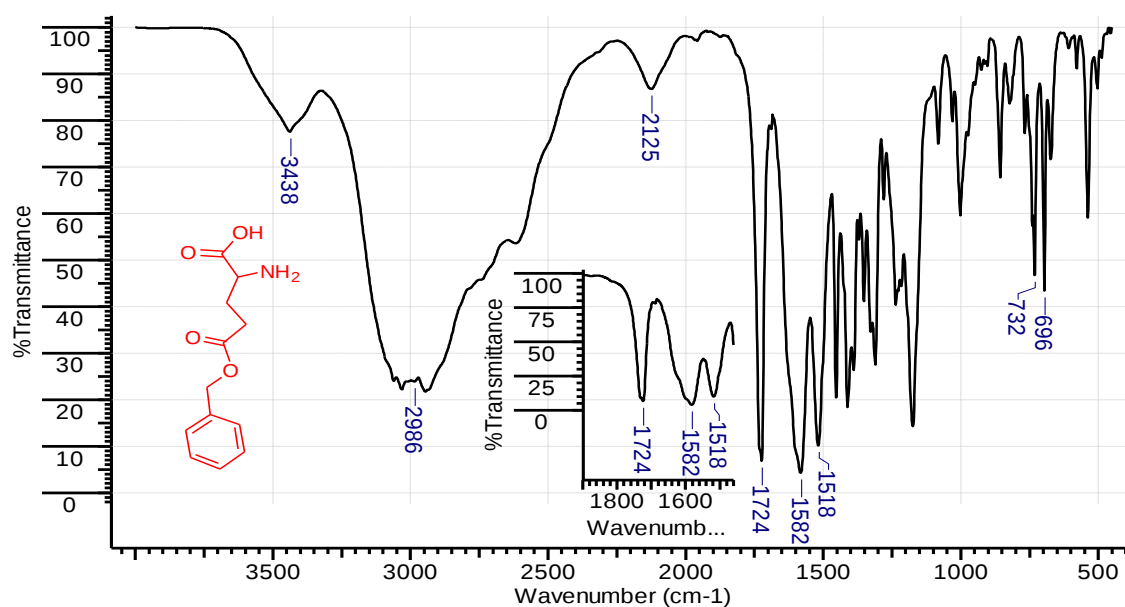
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Σύνθεση N-καρβοξυανυδριτών

4.1.1 Σύνθεση BLG-NCA

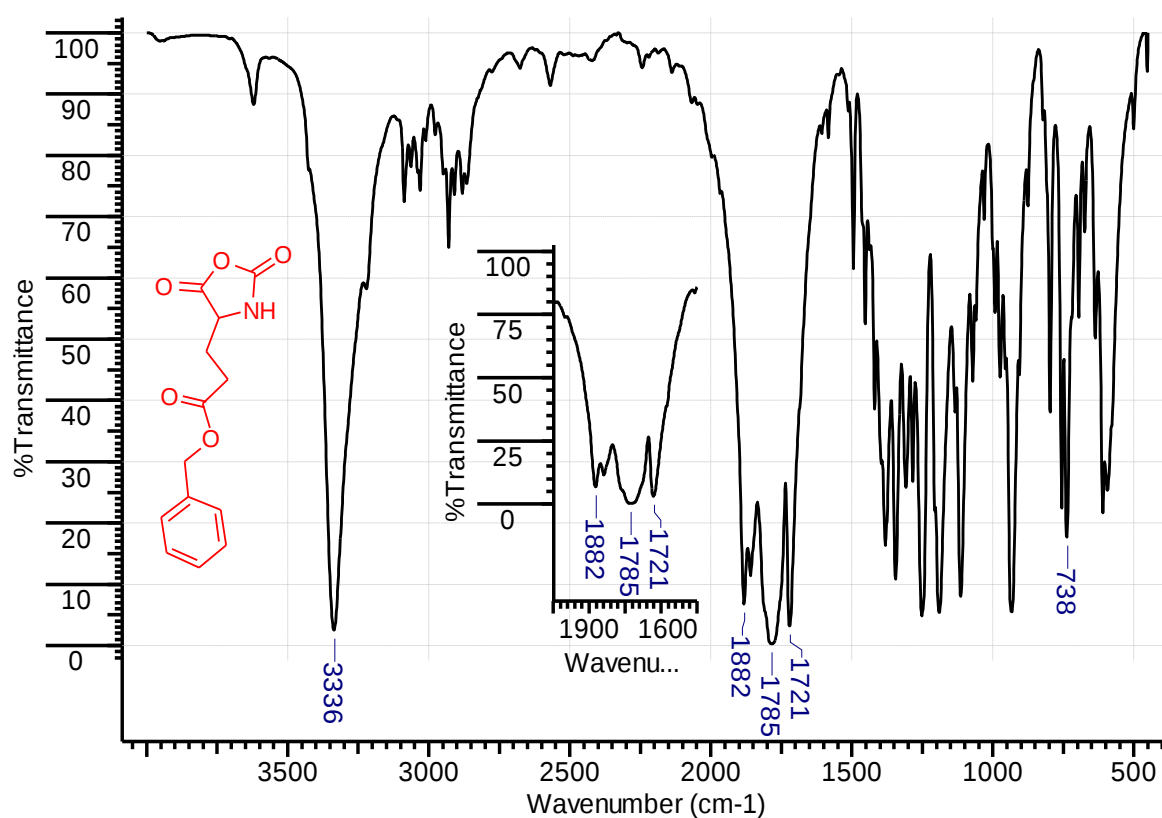
Η σύνθεση των N-Καρβοξυανυδριτών αποτελεί το πρώτο στάδιο στη σύνθεση καλά καθορισμένων δομών. Στην παρούσα εργασία η σύνθεση των NCAs ελέγχθηκε με φασματοσκοπία υπερύθρου (IR) και πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), τόσο στα πρόδρομα αμινοξέα αλλά και στα τελικά προϊόντα.

Η φασματοσκοπία υπερύθρου επιτρέπει την γρήγορη και έμπιστη αναγνώριση των NCAs εφόσον υπάρχει πρότυπο φάσμα για σύγκριση. Επιπλέον όταν οι NCAs αρχίζουν να πολυμερίζονται κατά την παρατεταμένη αποθήκευσή τους, οι απορροφήσεις των καρβονυλίων σταδιακά εξαφανίζονται και παίρνουν την θέση τους οι χαρακτηριστικές των αμιδικών δεσμών. Στο ακόλουθο φάσμα φαίνονται οι απορροφήσεις του γ-βενζυλεστέρα του γλουταμικού οξέος με ιδιαίτερη έμφαση στην περιοχή των καρβονυλίων.



Εικόνα 9: Φάσμα υπερύθρου του γ-βενζυλεστέρα του γλουταμικού οξέος. Μεγέθυνση στην περιοχή του καρβονυλίου.

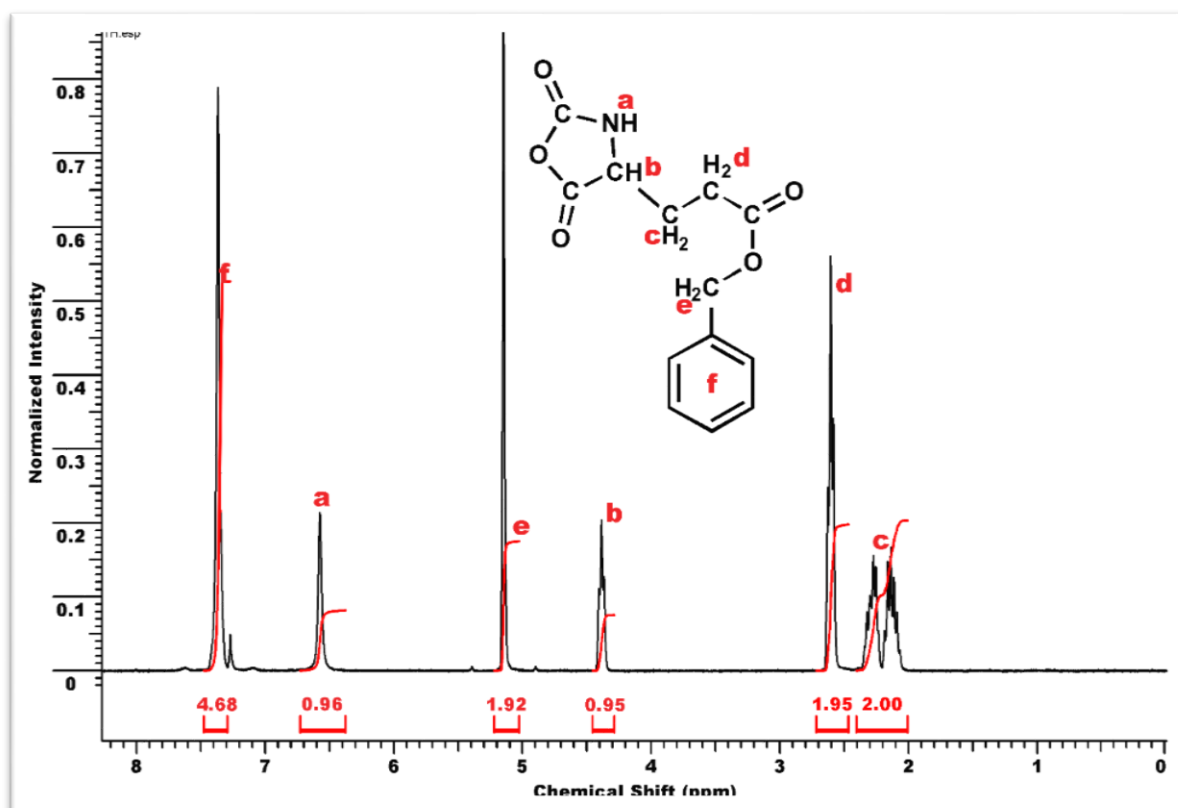
Η ευρεία κορυφή από τα 2500-3300 cm^{-1} αντιστοιχεί στη δόνηση της πρωτοταγούς αμίνης σε συνδυασμό με την υδροξυλομάδα του καρβοξυλίου. Τα καρβοξυλικά οξέα απαντώνται ως διμερή όταν βρίσκονται σε στερεά φάση μέσω δεσμών υδρογόνου, αποδίδοντας ευρείες κορυφές στα φάσματα IR. Στα 1724 cm^{-1} απορροφάει ο αρωματικός εστέρας στην πλευρική ομάδα του αμινοξέος ενώ στην περιοχή 600-800 cm^{-1} εμφανίζονται οι ταινίες του αρωματικού δακτυλίου της προστασίας. Στον ανυδρίτη του βένζυλο-L-Γλουταμικού οξέος (BLG-NCA) η περιοχή του καρβονυλίου αποδίδεται στο παρακάτω φάσμα.



Εικόνα 10: Φάσμα υπέρυθρου του BLG-NCA. Μεγέθυνση στην περιοχή του καρβονυλίου.

Στην περιοχή του καρβονυλίου εμφανίζονται δυο νέες ταινίες που υποδηλώνουν την επιτυχή σύνθεση του ανυδρίτη. Μία στα 1785 cm^{-1} που αφορά το καρβονύλιο που βρίσκεται δίπλα στο άζωτο του ανυδρίτη, δηλαδή του (C2), και η δεύτερη στα 1882 cm^{-1} για το καρβονύλιο του (C5) άνθρακα. Επιπλέον στην περιοχή του καρβονυλίου απουσιάζει ταινία στα 1650 cm^{-1}

(αμιδικός δεσμός), γεγονός που αποδεικνύει ότι η τεχνική του υψηλού κενού διασφαλίζει όλα τα συνθετικά στάδια. Η φύλαξη των NCAs σε συνθήκες αδρανούς ατμόσφαιρας και σε στερεή μορφή επιτρέπει την λήψη φασμάτων περιοδικά ώστε να γίνεται αποτίμηση αν υπάρχει αποικοδόμηση ή όχι. Η καθαρότητα των N-Καρβοξυανυδριτών πιστοποιήθηκε και με φασματοσκοπία NMR.



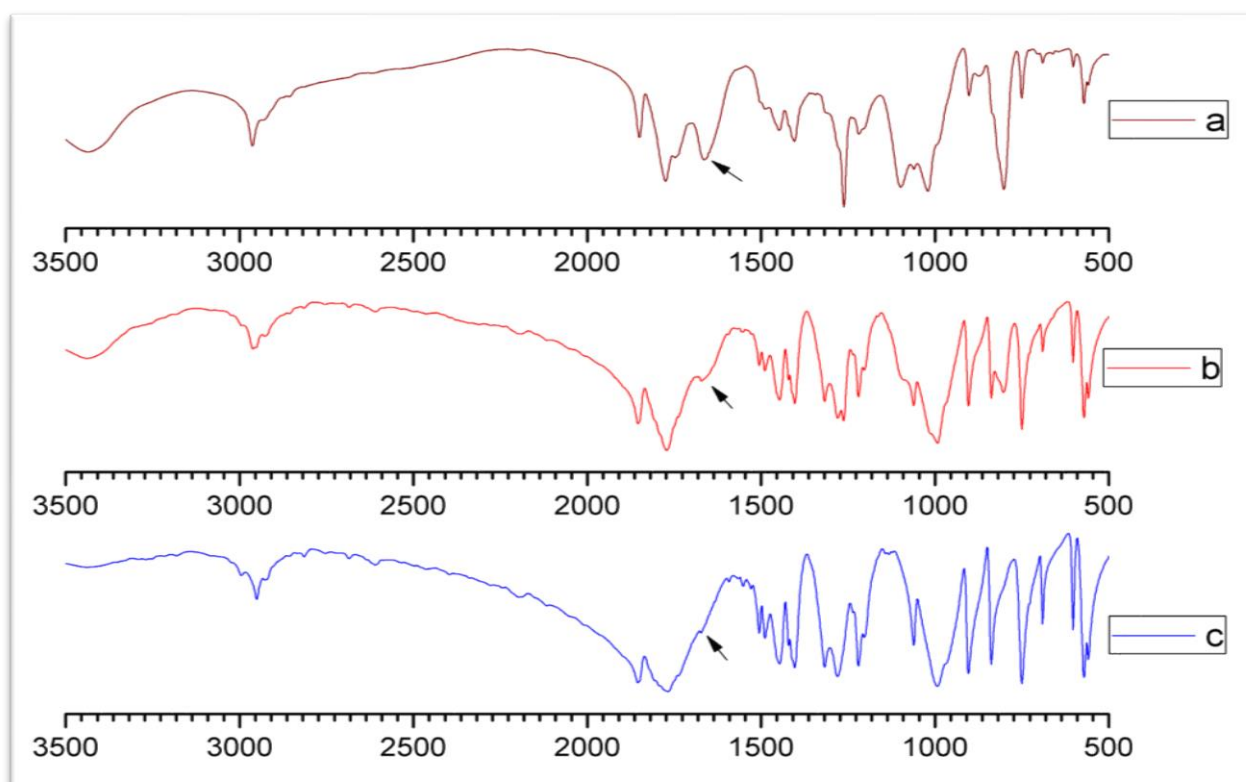
Εικόνα 11: Φάσμα ¹H-NMR του BLG-NCA σε CDCl₃.

Όπως παρατηρείται και στην εικόνα 11, στο φάσμα ¹H-NMR του BLG-NCA που λήφθηκε με διαλύτη δευτεριωμένο χλωροφόρμιο, ταυτοποιήθηκαν όλα τα πρωτόνια του BLG-NCA ως ακολούθως: στα 7,2- 7,4 ppm αντιστοιχούν τα πέντε αρωματικά υδρογόνα του φαινυλίου (-C₆H₅), στα 6,4-6,6 ppm το υδρογόνο του αζώτου του δακτυλίου του NCA (-NH-), στα 5,0-5,2 ppm τα δύο υδρογόνα του (-CH₂-) της προστατευτικής ομάδας, στα 4,3-4,5 ppm το υδρογόνο του C^a του δακτυλίου του NCA (-CH-), στα 2,5-2,7 ppm τα δύο υδρογόνα του C^c της πλευρικής ομάδας του γλουταμικού οξέος (-CH₂-), και

τέλος στα 2,0-2,4 ppm τα δύο υδρογόνα του C^b της πλευρικής ομάδας του ανυδρίτη (-CH₂-).

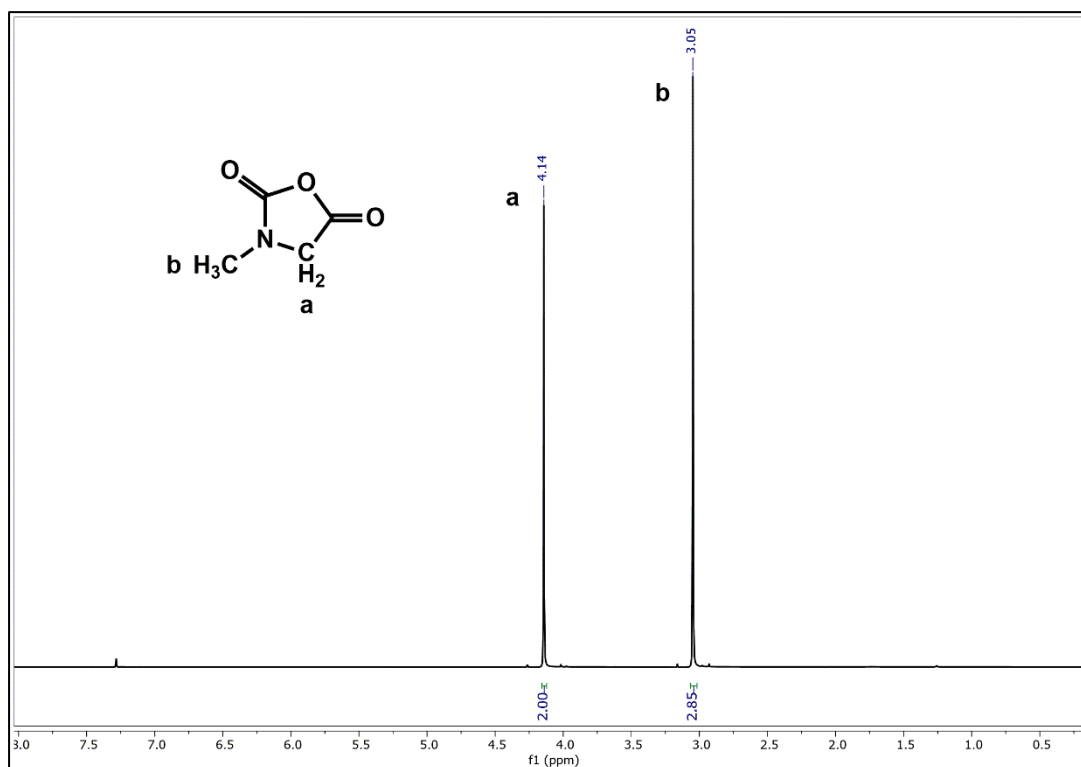
4.1.2 Σύνθεση Sar-NCA

Η τεχνική των εξαχνώσεων αποτελεί ίσως την σημαντικότερη τεχνική καθαρισμού όπου αυτό είναι εφικτό. Στην περίπτωση της σαρκοζίνης τα αποτελέσματα ήταν θεαματικά τόσο από πλευράς καθαρότητας όσο και από πλευράς πολυμερισμών. Το κριτήριο του πολυμερισμού θα πρέπει πάντα να αποτελεί το εφαλτήριο για την επιτυχή σύνθεση ενός ανυδρίτη-μονομερούς. Παρακάτω αποδίδονται τα φάσματα IR από την σύνθεση της σαρκοζίνης.



Εικόνα 12: Φάσματα IR από την σύνθεση και τις εξαχνώσεις του NCA-Sar.

Στα άνωθεν φάσματα βλέπουμε ότι δεν υπάρχει κορυφή στα 1700 cm⁻¹ του οξέος από το αρχικό αμινοξύ αλλά και ότι το προϊόν υποκατάστασης του λιμονενίου εξαφανίζεται σταδιακά με τις εξαχνώσεις στα 1620 cm⁻¹.



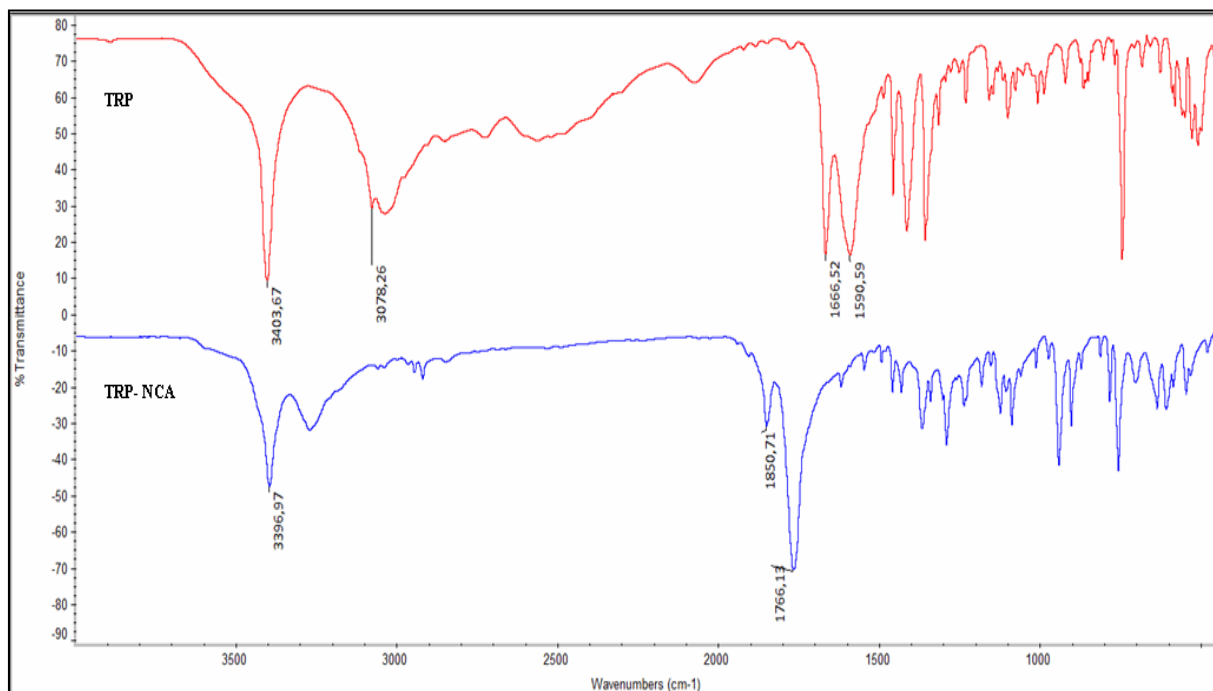
Εικόνα 13: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ Sar-NCA σε CDCl_3 .

Από το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (600MHz) του N-καρβόξυ ανυδρίτη της σαρκοζίνης σε διαλύτη δευτεριωμένο χλωροφόρμιο, προέκυψε πλήρης συσχέτιση των υδρογόνων του μορίου με τις εμφανιζόμενες κορυφές, και πιο συγκεκριμένα, στα 4,1-4,2 ppm αντιστοιχούν τα δύο υδρογόνα του C^a του δακτυλίου του NCA ($-\text{CH}_2-$), ενώ στα 3,0-3,1 ppm τα τρία υδρογόνα του μεθυλίου (πλευρική ομάδα) της σαρκοζίνης ($-\text{CH}_3$).

4.1.3 Σύνθεση Trp-NCA

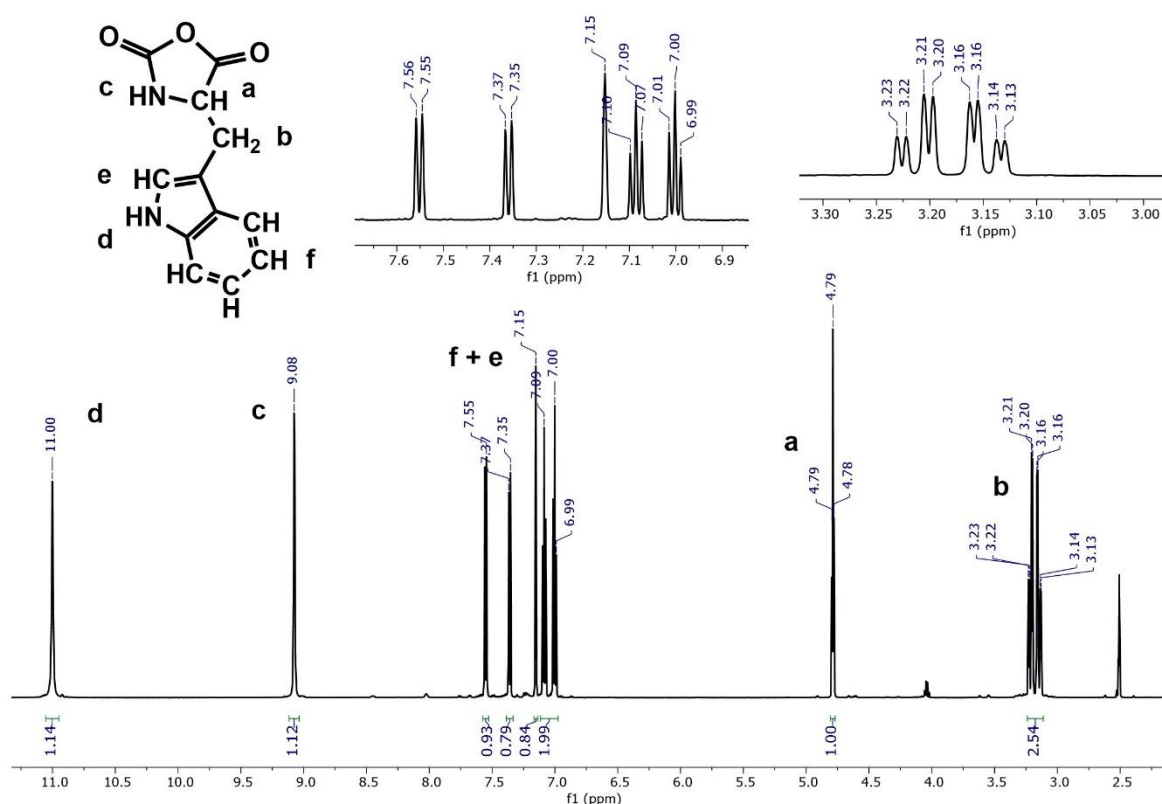
Στο φάσμα IR του τελικού NCA παρατηρείται ότι το αρχικό αμινοξύ της τρυπτοφάνης έχει μετατραπεί ποσοτικά, καθώς απουσιάζουν οι χαρακτηριστικές κορυφές στην περιοχή κορυφή $1500\text{-}1690\text{ cm}^{-1}$ (κάμψεις $-\text{N-H}$ και τάση $-\text{C-O}$) και $2000\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ (τάσεις $-\text{N-H}$ και $-\text{O-H}$). Επιπλέον, παρατηρείται η εμφάνιση των δύο χαρακτηριστικών κορυφών του Trp-NCA στα 1766 cm^{-1} και 1850 cm^{-1} . Η εμφάνιση αυτών των δύο κορυφών, υποδηλώνει την επιτυχή σύνθεση του N-καρβόξυ ανυδρίτη. Ειδικότερα, η κορυφή στα 1766 cm^{-1} αποδίδεται στο καρβονύλιο που βρίσκεται δίπλα στο άζωτο του NCA (δηλ. του C2), ενώ η δεύτερη κορυφή στα 1850 cm^{-1} αφορά, αντίστοιχα, το

καρβονύλιο που βρίσκεται δίπλα από την πλευρική ομάδα του NCA (δηλ. του C5).



Εικόνα 14: Φάσμα FTIR από την σύνθεση του Trp-NCA.

Η επιτυχής σύνθεση και η υψηλή καθαρότητα του NCA-Trp επιβεβαιώνονται με λήψη φάσματος $^1\text{H-NMR}$ του ληφθέντος στερεού σε διαλύτη δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο $\text{d}_6\text{-DMSO}$, όπως παρατίθεται παρακάτω (εικόνα 15). Παρατηρείται ότι όλες οι κορυφές αποδίδονται σε υδρογόνα του NCA, ενώ οι ολοκληρώσεις των εμβαδών συμπίπτουν επακριβώς με τις θεωρητικά προβλεπόμενες. Η αντιστοίχιση λοιπόν των κορυφών του $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$) για τον N- καρβόξυ ανυδρίτη της τρυπτοφάνης πραγματοποιείται ως εξής : στα 3.1-3,3 ppm για τα δύο υδρογόνα του μεθυλενίου του NCA ($-\text{CH}_2-$), στα 4,8 ppm για το υδρογόνο του C^a του δακτυλίου του NCA ($-\text{CH}-$), στα 6.9–7.6 ppm για τα πέντε αρωματικά υδρογόνα των δακτυλίων, στα 9,0 ppm για το υδρογόνο της αμινομάδας του δακτυλίου του ανυδρίτη ($-\text{NH}-$) και στα 11,0 ppm για το υδρογόνο της αμινομάδας του ινδολικού δακτυλίου ($-\text{NH}-$).

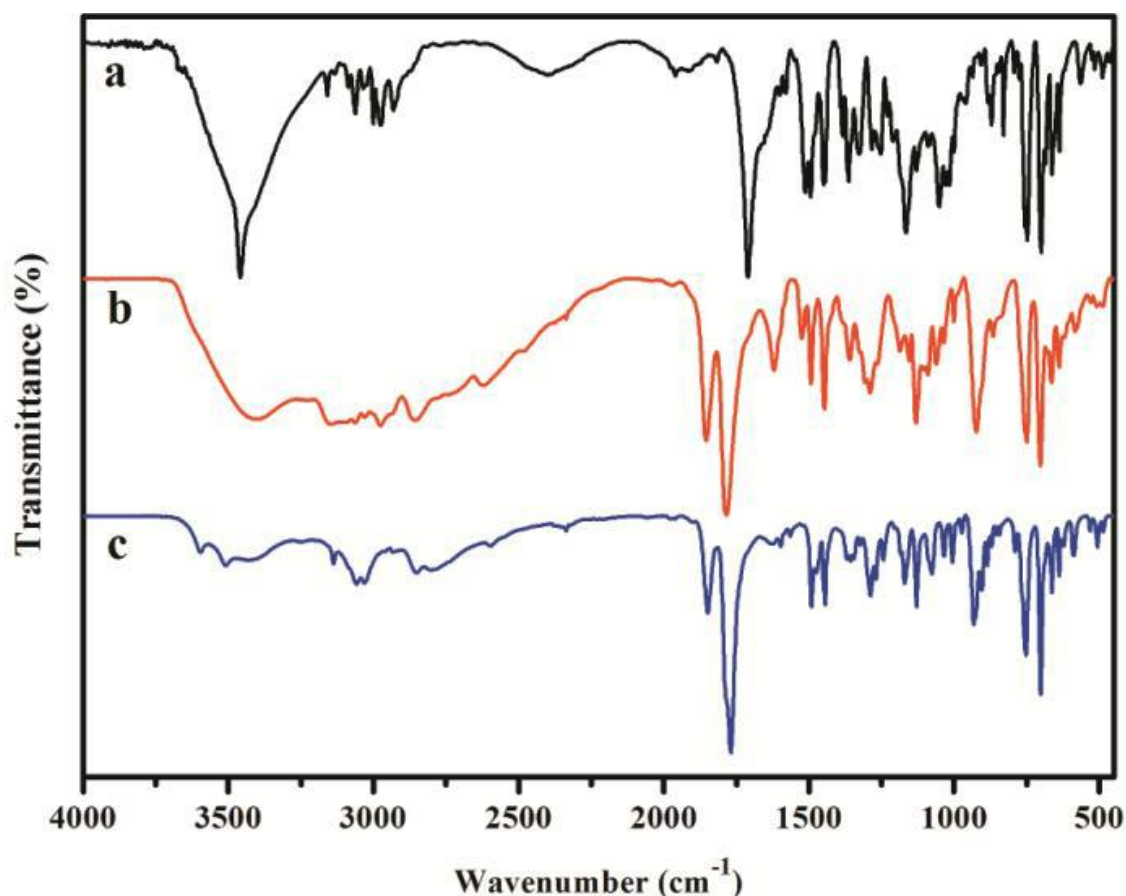


Εικόνα 15: Φάσμα ^1H -NMR του Trp-NCA σε $\text{d}_6\text{-DMSO}$.

4.1.4 Σύνθεση Nim-trt-L-His-NCA

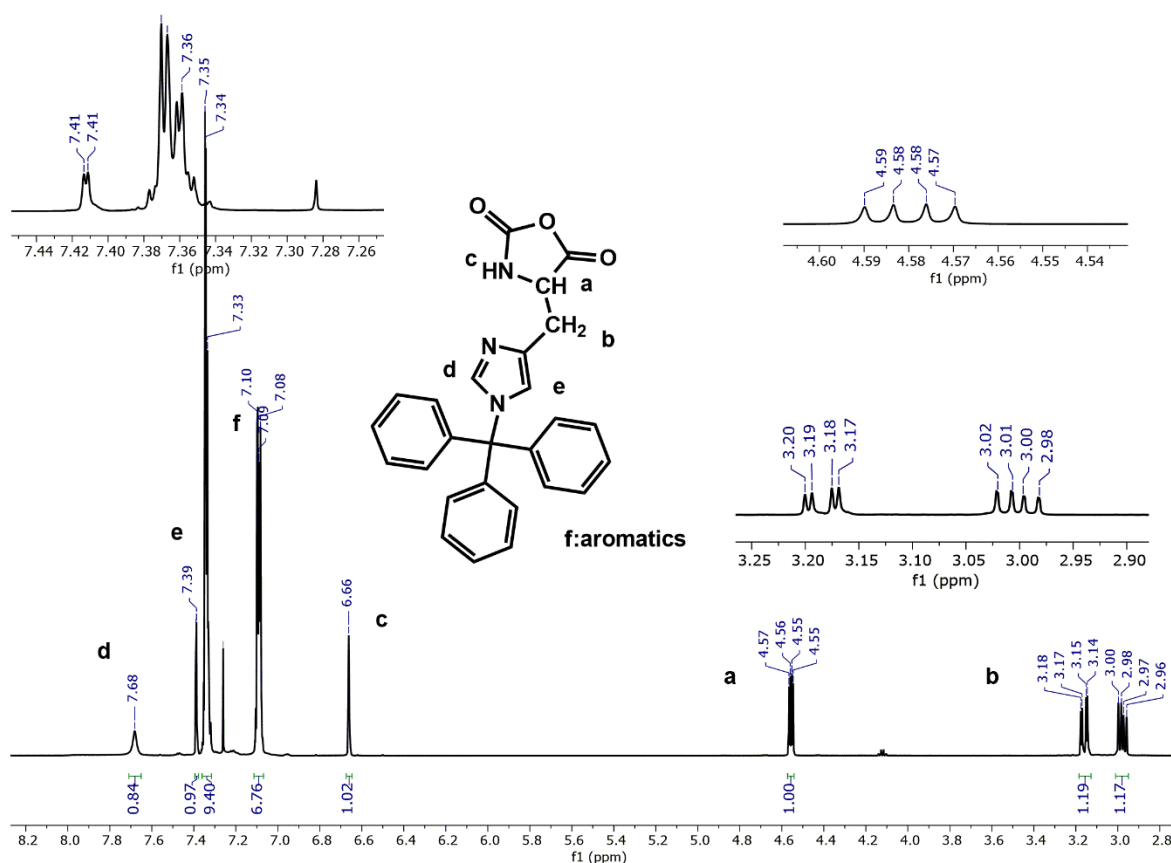
Στο φάσμα του πρόδρομου αμινοξέος της ιστιδίνης παρατηρείται η χαρακτηριστική κορυφή στα 1710 cm^{-1} , η οποία οφείλεται στη δόνηση του καρβονυλίου ($\text{C}=\text{O}$). Ακολουθώντας, στο διάλυμα της ένωσης προστίθεται το SOCl_2 που χρησιμοποιείται ως μέσο χλωρίωσης για την πραγματοποίηση της αντίδρασης κυκλοποίησης και η αντίδραση αφήνεται για 2.5 ώρες. Η ολοκλήρωση της αντίδρασης επιβεβαιώνεται με λήψη νέου φάσματος IR μετά την πάροδο του συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος (εικόνα 16). Σε αυτό το φάσμα είναι ορατή η μείωση της κορυφής του αρχικού αντιδρώντος στα 1710 cm^{-1} και η εμφάνιση των δύο χαρακτηριστικών κορυφών του Nim-Trt-(L)-His NCA στα 1785 cm^{-1} και 1850 cm^{-1} . Η εμφάνιση αυτών των δύο κορυφών, υποδηλώνει την επιτυχή σύνθεση του N-καρβοξυ ανυδρίτη. Ειδικότερα, η κορυφή στα 1785 cm^{-1} αποδίδεται στο καρβονύλιο που βρίσκεται δίπλα στο άζωτο του NCA (δηλ. του C2), ενώ η δεύτερη κορυφή στα 1850 cm^{-1} αφορά,

αντίστοιχα, το καρβονύλιο που βρίσκεται δίπλα από την πλευρική ομάδα του NCA (δηλ. του C5). Επιπλέον είναι ορατή και μία κορυφή στα 1620 cm^{-1} , η οποία οφείλεται σε έκταση δόνησης του δεσμού N–H και αποδίδεται στο σχηματισθέν υδροχλωρικό άλας του NCA της ιστιδίνης. Η πλήρης δέσμευση του HCl από τον ιμιδαζολικό δακτύλιο του NCA επιτυγχάνεται με χρήση ισομοριακής ποσότητας Et_3N , προς σχηματισμό του άλατος $\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{HCl}$ υπό μορφή ιζήματος, το οποίο απομακρύνεται από το επιθυμητό προϊόν μέσω διήθησης. Στο φάσμα IR του τελικού NCA απουσιάζει η κορυφή στα 1710 cm^{-1} που υποδηλώνει ότι το αρχικό αμινοξύ της ιστιδίνης έχει καταναλωθεί πλήρως, η κορυφή στα 1620 cm^{-1} , που δείχνει ότι δεσμεύτηκε ποσοτικά το HCl μετά την προσθήκη της ποσότητας τριαιθυλαμίνης και τέλος, η κορυφή στα 1650 cm^{-1} , που θα οφειλόταν στη δόνηση του πεπτιδικού δεσμού λόγω πιθανής έναρξης του πολυμερισμού από τυχόν περίσσεια της Et_3N (Σχήμα 16). Καθ' όλη τη διάρκεια της συνθετικής πορείας δεν παρατηρείται, επίσης, μεταβολή των χαρακτηριστικών κορυφών της προστατευτικής ομάδας στα 701 cm^{-1} και 751 cm^{-1} , που οφείλονται στις δονήσεις των δεσμών $-\text{CH}=\text{CH}-$ των βενζολικών δακτυλίων.



Εικόνα 16: Φάσματα FTIR της σύνθεσης του Nim-Trt-L-His-NCA.

Η επιτυχής σύνθεση και η υψηλή καθαρότητα του Nim-trt-(L)-His NCA επιβεβαιώνονται με λήψη φάσματος $^1\text{H-NMR}$ του ληφθέντος στερεού σε διαλύτη δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (Εικόνα 17). Παρατηρείται ότι όλες οι κορυφές αποδίδονται σε υδρογόνα του NCA, ενώ οι ολοκληρώσεις των εμβαδών συμπίπτουν επακριβώς με τις θεωρητικά προβλεπόμενες. Αναλυτικότερα στις κορυφές στα 2.90–3.20 ppm αντιστοιχούν τα δύο υδρογόνα του C^b του μεθυλενίου της πλευρικής ομάδας της ιστιδίνης ($-\text{CH}_2-$), στα 4.50–4.65 ppm το υδρογόνο του C^a του δακτυλίου του NCA ($-\text{CH}-$), στα 6.70 ppm το υδρογόνο της αμινομάδας του δακτυλίου του NCA ($-\text{NH}-$), στα 7.00–7.45 ppm τα δεκαπέντε αρωματικά υδρογόνα των τρίτυλο-ομάδων και το υδρογόνο του ($\text{N}-\text{CH}=\text{C}$) του ιμιδαζολικού δακτυλίου, και στα 7.65–7.85 ppm το υδρογόνο ($\text{N}-\text{CH}=\text{N}$).

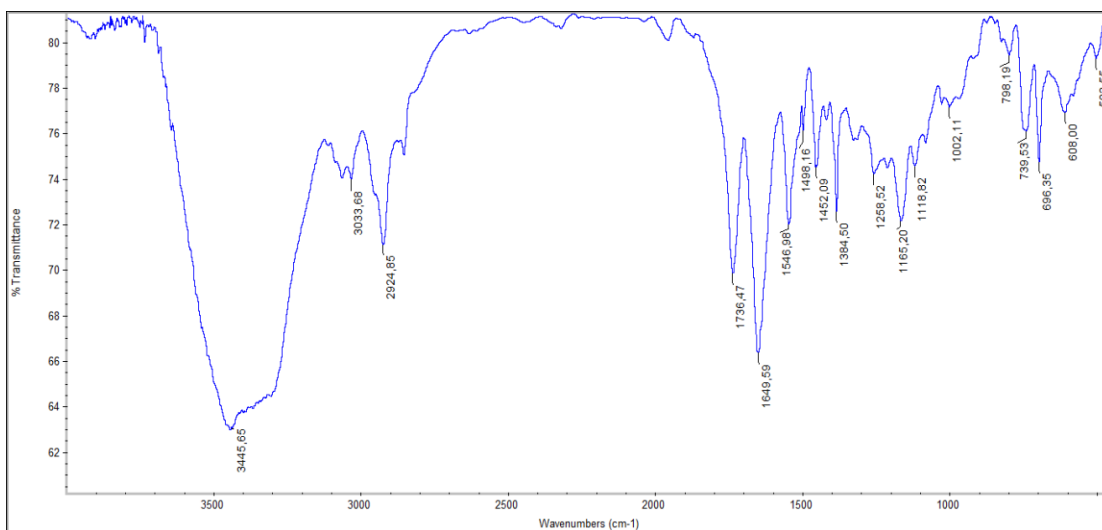


Εικόνα 17: Φάσμα ^1H -NMR του Nim-Trt-L-His-NCA σε CDCl_3 .

4.2 Σύνθεση ομοπολυμερών και συμπολυμερών

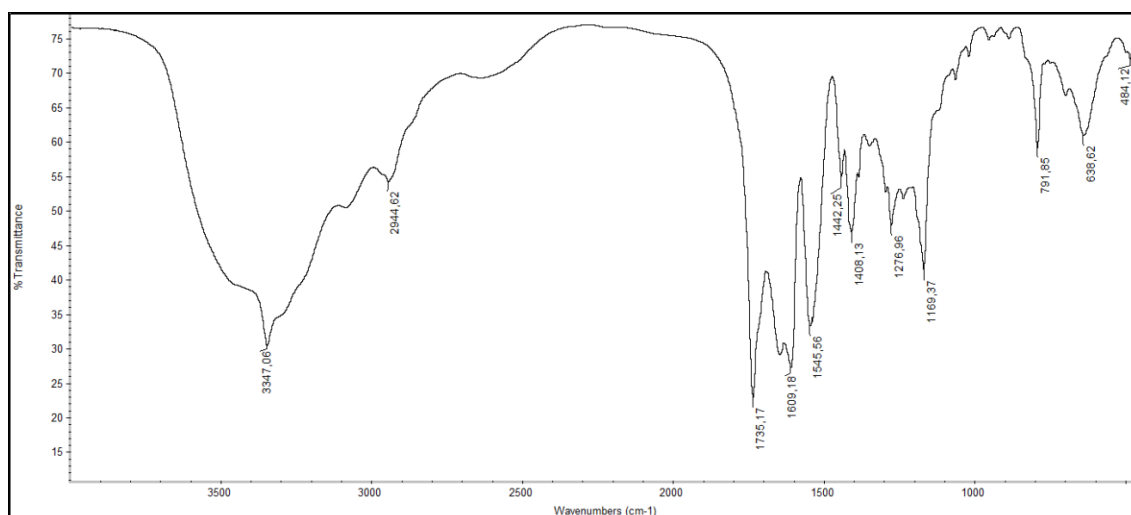
4.2.1 Σύνθεση του ομοπολυμερούς poly-LGA

Συγκρίνοντας τα φάσματα IR του BLG-NCA και του PBLG παρατηρούνται διαφορές στη περιοχή μεταξύ $1600\text{--}1900\text{ cm}^{-1}$. Συγκεκριμένα, στα 1882 cm^{-1} αντιστοιχεί το καρβονύλιο του άνθρακα 5, ενώ στα 1785 cm^{-1} αντιστοιχεί το καρβονύλιο του άνθρακα 2. Επιπλέον, οι κορυφές του αμινοξέος που φαίνονται στο φάσμα του μονομερούς έχουν αντικατασταθεί από την κορυφή στα 1650 cm^{-1} , η οποία εμφανίζεται στο φάσμα του πολυμερούς και σηματοδοτεί την ύπαρξη πεπτιδικού δεσμού.



Εικόνα 18: Φάσμα IR για το PBLG.

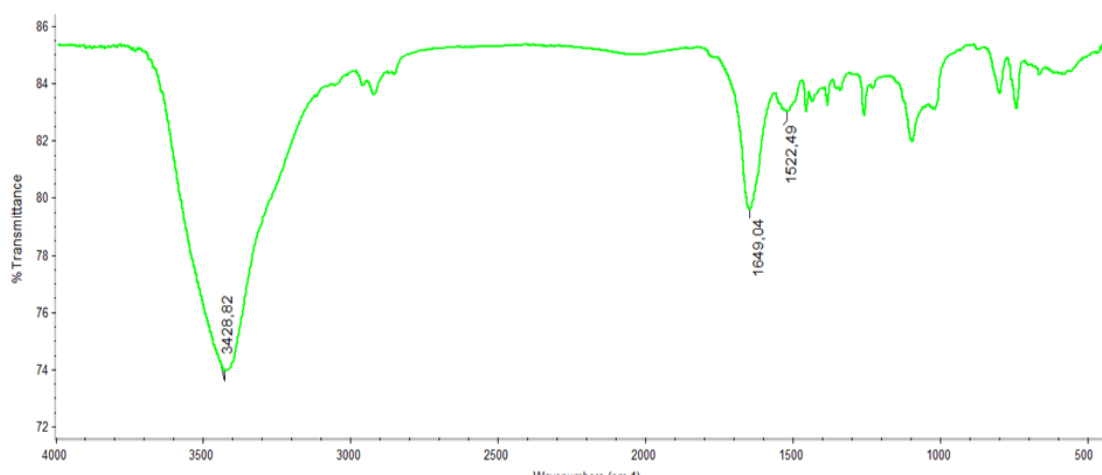
Στο τελευταίο φάσμα παρατηρώ την επιτυχή σύνθεση του PLGA από τις κορυφές στα $1735,17\text{ cm}^{-1}$ όπου αποδίδεται στο καρβονύλιο και μια στα $1609,18\text{ cm}^{-1}$ όπου αφορά την δόνηση του πεπτιδικού δεσμού πολυμερών δηλαδή τη δόνηση του αζώτου της μιας δομικής μονάδας που συνδέεται με το καρβονύλιο της επόμενης. Επίσης παρατηρώ και την αποπροστασία από την βενζυλική ομάδα όπου δίνει χαρακτηριστικές κορυφές στα $696,35\text{ cm}^{-1}$ και στα $739,53\text{ cm}^{-1}$ τις οποίες δεν τις έχω στο φάσμα αυτό αλλά μόνο στα προηγούμενα.



Εικόνα 19: Φάσμα IR για το PLGA.

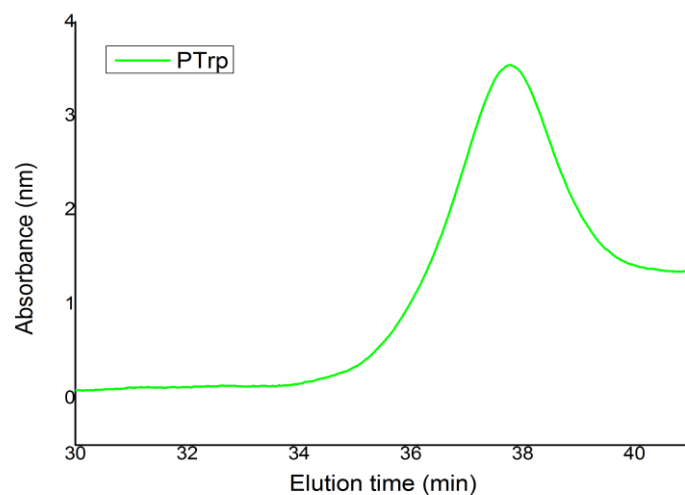
4.2.2 Σύνθεση του ομοπολυμερούς Poly-Trp

Στο φάσμα υπέρυθρου του ομοπολυμερούς της τρυπτοφάνης παρατηρείται η επιτυχής σύνθεση του πολυπεπτιδίου από τις κορυφές στα 1649cm^{-1} και στα 1522cm^{-1} οι οποίες σηματοδοτούν την ύπαρξη πεπτιδικού δεσμού.



Εικόνα 20: Φάσμα IR για το Poly-Trp.

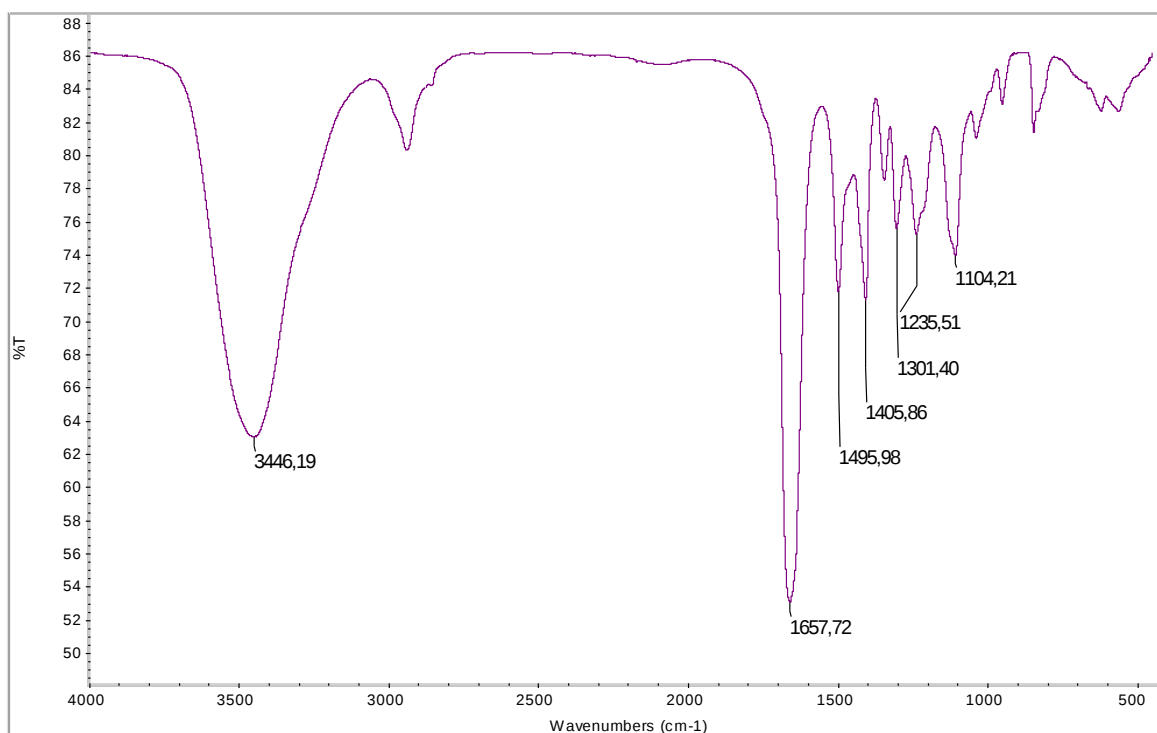
Από τη χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών παρατηρήθηκε ότι το ομοπολυμερές εκλούεται στα 37,74 λεπτά, και η κατανομή μοριακών βαρών είναι $I=1.04$.



Εικόνα 21: Γράφημα SEC για το ομοπολυμερές poly-Trp.

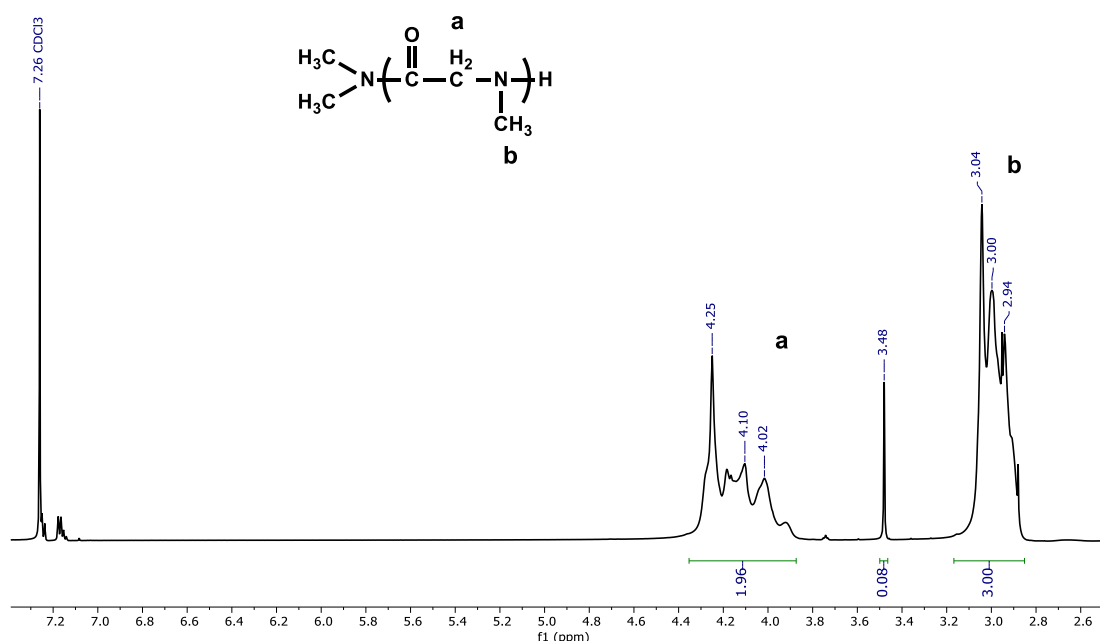
4.2.3 Σύνθεση του ομοπολυμερούς poly-Sar

Η σαρκοζίνη αποτελεί την N-μεθυλιωμένη μορφή της γλυκίνης. Η ύπαρξη του μεθυλίου προσδίδει τελείως διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες. Απο τα πρώτα που παρατηρεί κανείς στον ανυδρίτη της σαρκοζίνης είναι η απουσία του H από το N του ανυδρίτη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ολική έκλειψη του μηχανισμού του ενεργοποιημένου μονομερούς. Επίσης διαλύματα μακρομονομερών σαρκοζίνης μπορούν να διατηρηθούν επί μακρόν παρουσία DMF απουσία τερματισμών απο φόρμυλο άκρα. Για τους παραπάνω λόγους τα ομοπολυμερή σαρκοζίνης αποδίδουν συντελεστές κατανομής περίπου στο 1.03 που είναι της τάξης του ανιοντικού πολυμερισμού. Από τα φάσματα του ομοπολυμερούς της poly-Sar παρατηρείται η επιτυχημένη σύνθεση του πολυπεπτιδίου. Στο φάσμα υπερύθρου που ακολουθεί (εικόνα 22) παρατηρείται η χαρακτηριστική απορρόφηση της δόνησης του πεπτιδικού δεσμού που οφείλεται σε έκταση του δεσμού του καρβονυλίου της μιας δομικής μονάδας που συνδέεται με το άζωτο της αμινομάδας της προηγούμενης δομικής μονάδας.



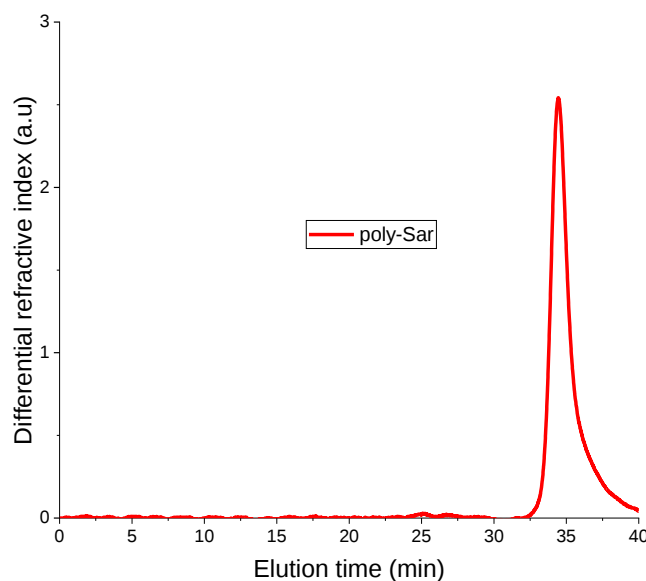
Εικόνα 22: Φάσμα IR για το ομοπολυμερές poly-Sar.

Το πολυπεπτίδιο ελέγχθηκε και με φασματοσκοπία ^1H -NMR από την οποία προέκυψε πλήρης ταύτιση των θεωρητικά αναμενόμενων κορυφών με αυτές του φάσματος. Επίσης παρατηρήθηκε η ύπαρξη διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τον πολυμερισμό, και δεν απομακρύνθηκαν ποσοτικά (εικόνα 23). Πιο συγκεκριμένα στις κορυφές στα 2,8-3,1ppm αντιστοιχούν τα τρία υδρογόνα του μεθυλίου της πλευρικής ομάδας του αμινοξέος, και στα 3,8-4,3ppm τα δύο υδρογόνα του C^a της δομικής μονάδας της σαρκοζίνης.



Εικόνα 23: Φάσμα ^1H -NMR του ομοπολυμερούς poly-Sar σε CDCl_3 .

Από το γράφημα που προέκυψε από τη χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών παρατηρήθηκε ότι το πολυμερές εκλύεται σε χρόνο 34,44min με κατανομή μοριακών βαρών $I=1,03$.

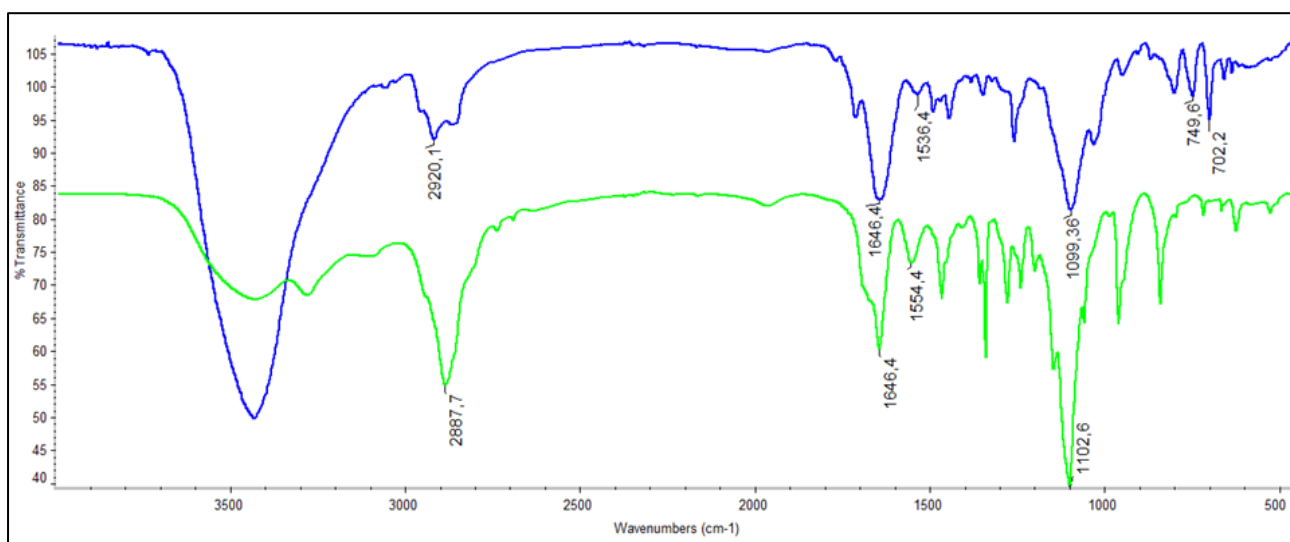


Εικόνα 24: Γράφημα SEC για το ομοπολυμερές poly-Sar.

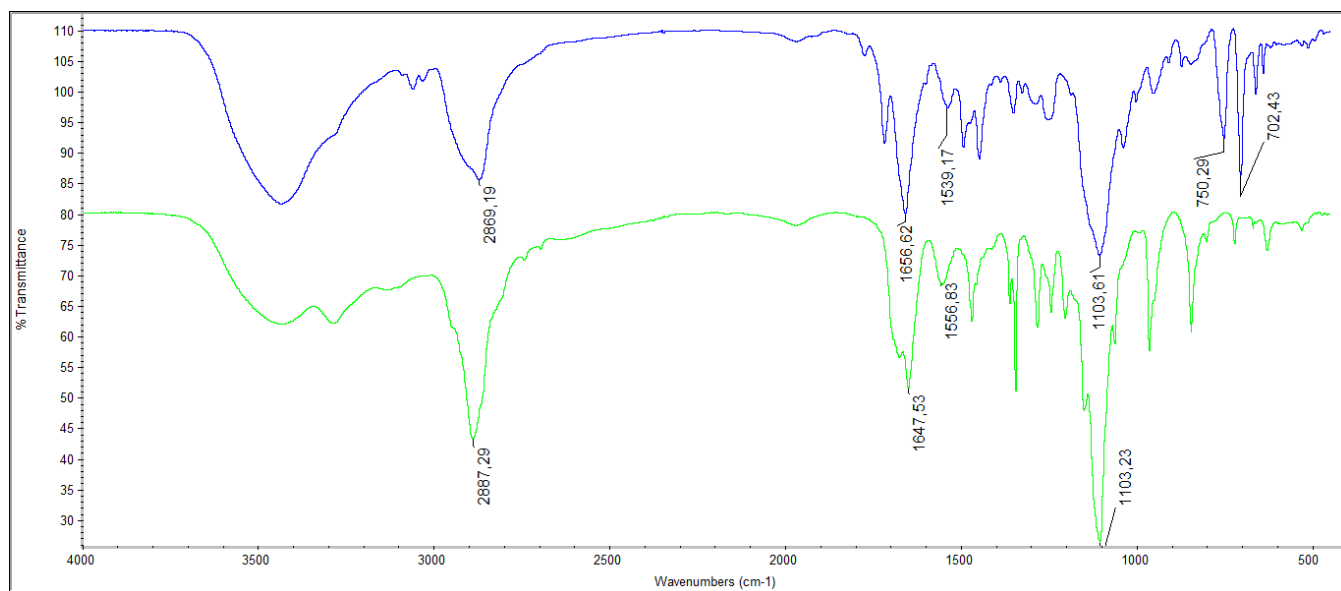
4.2.4 Σύνθεση υβριδικών κατά συστάδων συμπολυμερών με ιστιδίνη και σαρκοζίνη του τύπου PEO-b-P(His-co-Sar) με 10% και 20% Sar/His

Κατά τη διάρκεια της σύνθεσης των δύο κατά συστάδες συμπολυμερών του τύπου PEO-b-P(His-co-Sar) με διαφορετικά ποσοστά Sar/His, 10, 20%, αρχικά λαμβάνονται φάσματα IR, αμέσως μετά τον πολυμερισμό και πριν την αποπροστασία των πολυμερών και στο τέλος λαμβάνονται φάσματα IR μετά την ολοκλήρωση όλων των σταδίων του πολυμερισμού. Στα φάσματα που παρατίθενται, με μπλε χρώμα σημειώνονται τα φάσματα που αντιστοιχούν στα πολυμερή πριν την αποπροστασία και με πράσινο χρώμα σημειώνονται τα φάσματα που αντιστοιχούν στα τελικά πολυμερή. Και στους δύο τύπους φασμάτων παρατηρείται η ταινία απορρόφησης της δόνησης του αμιδικού δεσμού των πολυμερών στα 1646 cm^{-1} , δηλαδή η δόνηση του αζώτου της μίας δομικής μονάδας που συνδέεται με το καρβονύλιο της επόμενης. Άλλες χαρακτηριστικές κορυφές εμφανίζονται στα 1099 cm^{-1} και στα 2887 cm^{-1} , όπου βρίσκεται η δόνηση του αιθερικού δεσμού C–O–C του πολυ(αιθυλενοξειδίου). Στα φάσματα των πολυμερών πριν την αποπροστασία (μπλε φάσματα), στα 749 cm^{-1} και 702 cm^{-1} , εμφανίζονται κορυφές που οφείλονται στις δονήσεις των δεσμών --CH=CH-- , των βενζολικών δακτυλίων των τρίτυλο-προστατευτικών

ομάδων. Αυτές οι κορυφές απουσιάζουν από τα τελικά φάσματα των πολυμερών (πράσινα φάσματα), καθώς οι τρίτυλο-ομάδες έχουν απομακρυνθεί με τη διαδικασία της αποπροστασίας (αντίδραση με TFA και επακόλουθη διαδικασία διαπίδυσης). Τα φάσματα IR των τριών συμπολυμερών του τύπου PEO-b-P(His-co-Sar) με διαφορετικά ποσοστά Sar/His, 10, 20%, όπου διακρίνονται οι κορυφές που προαναφέρθηκαν, δίνονται στις εικόνες 25 και 26.

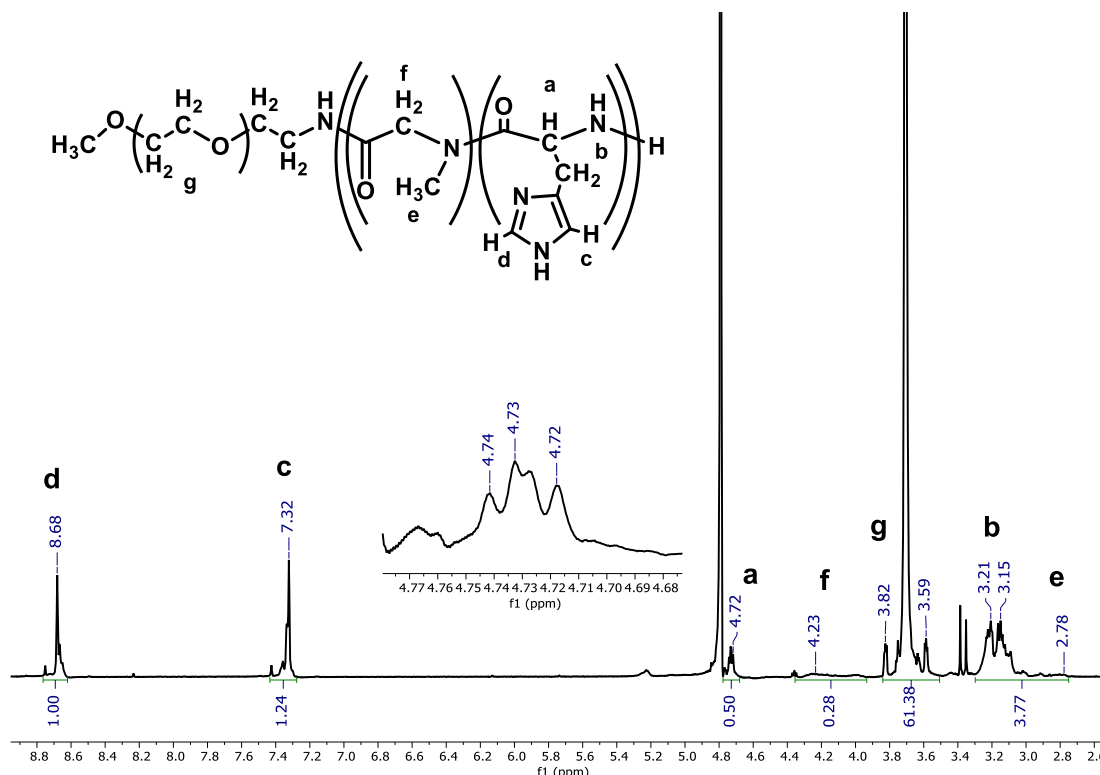


Εικόνα 25: Φάσμα IR του πλήρως προστατευμένου πολυμερούς PEO-b-P(His-co-Sar) με 10% Sar/His (μπλε) και μετά την πλήρη αποπροστασία του (πράσινο).



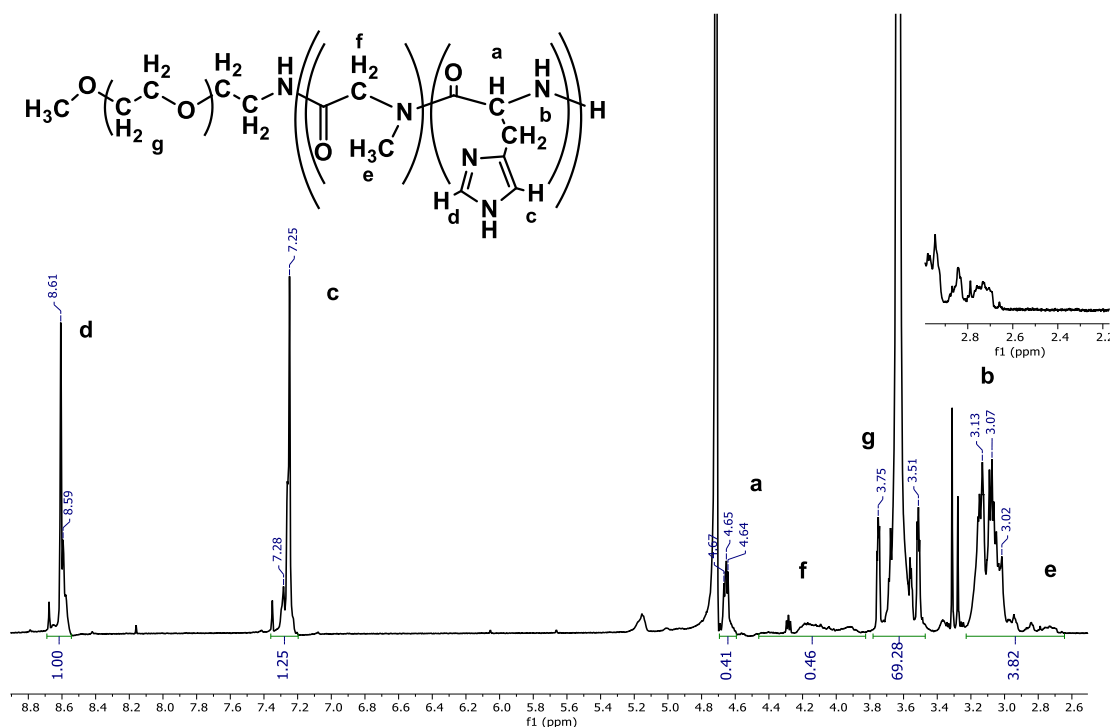
Εικόνα 26: Φάσμα IR του πλήρως προστατευμένου πολυμερούς PEO-b-P(His-co-Sar) με 20% Sar/His (μπλε) και μετά την πλήρη αποπροστασία του (πράσινο).

Η επιτυχής σύνθεση των δισυσταδικών τριπολυμερών του τύπου PEO-b-P(His-co-Sar) με διαφορετικά ποσοστά 10 και 20% Sar/His επιβεβαιώθηκε, όπως και στα προηγούμενα πολυμερή με τη χρήση πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz) σε διαλύτη δευτεριωμένο νερό (D_2O) με δευτεριωμένο υδροχλώριο (DCI) σε αναλογία 1/100 ($\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$). Στις εικόνες 27 και 28 παρατίθενται τα φάσμα $^1\text{H-NMR}$ των πολυμερών PEO-b-P(His-co-Sar) με ποσοστά 10 και 20% Sar/His αντίστοιχα.



Εικόνα 27: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του PEO-b-P(His-co-Sar) με 20% Sar σε $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$.

Λεπτομερείς απόδοση των κορυφών που εμφανίζονται στο φάσμα στην εικόνα 27, όπου αφορά το πολυμερές με 10% Sar/His γίνεται ως εξής: στις κορυφές στα 8,6-8,8 ppm αντιστοιχεί το υδρογόνο του (N-CH=N) του ιμιδαζολικού δακτυλίου, στα 7,2-7,5 ppm το υδρογόνο του (N-CH=C) του ιμιδαζολικού δακτυλίου, στα 4,7-4,8 ppm το υδρογόνο του C^a της δομικής μονάδας της ιστιδίνης, στα 3,9-4,4 ppm τα δύο υδρογόνα του C^a της δομικής μονάδας της σαρκοζίνης, στα 3,5-3,9 ppm τα τέσσερα υδρογόνα της δομικής μονάδας του μακροαπαρχητή, και τέλος στα 2,8-3,3 ppm τα δύο υδρογόνα C^b της δομικής μονάδας της ιστιδίνης και τα τρία υδρογόνα του μεθυλίου της πλευρικής ομάδας της σαρκοζίνης.



Εικόνα 28: Φάσμα ¹H-NMR του PEO-b-P(His-co-Sar) με 20% Sar σε D₂O/DCI.

Λεπτομερείς απόδοση των κορυφών πραγματοποιείται επίσης και στις κορυφές που εμφανίζονται στο φάσμα στην εικόνα 28, όπου αφορά το πολυμερές με 20% Sar/His: στις κορυφές στα 8,5-8,7 ppm αντιστοιχεί το υδρογόνο του (N–CH=N) του ιμιδαζολικού δακτυλίου, στα 7,2-7,4 ppm το υδρογόνο του (N–CH=C) του ιμιδαζολικού δακτυλίου, στα 4,5-4,7 ppm το υδρογόνο του C^a της δομικής μονάδας της ιστιδίνης, στα 3,8-4,5 ppm τα δύο υδρογόνα του C^a της δομικής μονάδας της σαρκοζίνης, στα 3,4-3,8 ppm τα τέσσερα υδρογόνα της δομικής μονάδας του μακροαπαρχητή, και τέλος στα 2,6-3,2 ppm τα δύο υδρογόνα C^b της δομικής μονάδας της ιστιδίνης και τα τρία υδρογόνα του μεθυλίου της πλευρικής ομάδας της σαρκοζίνης.

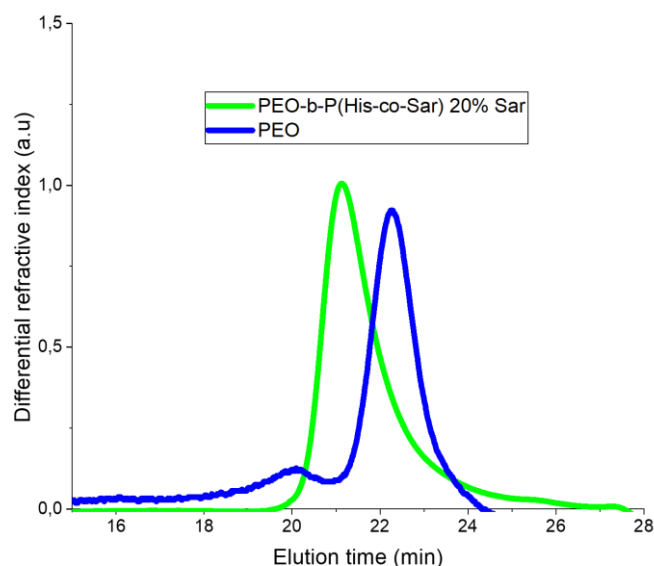
Με τη χρήση της φασματοσκοπίας NMR είναι δυνατόν να εξακριβωθεί ότι η σύσταση της δεύτερης συστάδας είναι 10 και 20% Ala/His από την ολοκλήρωση δυο χαρακτηριστικών κορυφών των φασμάτων των εικόνων 27 και 28, της κορυφής **f**, η οποία αντιστοιχεί στα 2H του –CH₂– της σαρκοζίνης και της κορυφής **c**, η οποία αντιστοιχεί στο 1H του N–CH=C του ιμιδαζολικού δακτυλίου.

Η συλλογιστική πορεία που ακολουθείται είναι η εξής:

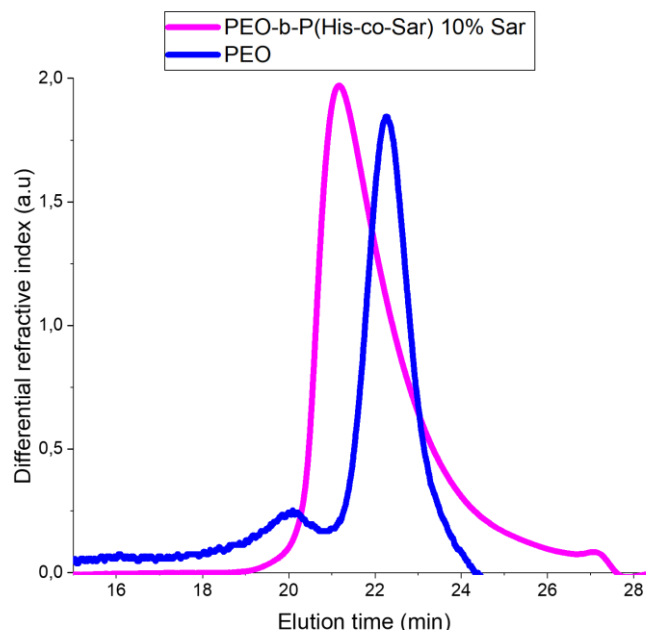
Για το 10% Sar/His: το εμβαδόν της κορυφής **f** είναι ίσο με 0,28 και αντιστοιχεί σε 2H. Επομένως, κάθε H του –CH₂– της σαρκοζίνης αντιστοιχεί σε εμβαδόν ίσο με 0,14. Αντίστοιχα, το εμβαδόν της κορυφής **c** είναι ίσο με 1,24 και αντιστοιχεί σε 1H. **Ο λόγος $f/f+c = 0,14/0,14+1,24=0.10$, δηλαδή 10%.**

Για το 20% Sar/His: το εμβαδόν της κορυφής **f** είναι ίσο με 0,46 και αντιστοιχεί σε 2H. Επομένως, κάθε H του –CH₂– της σαρκοζίνης αντιστοιχεί σε εμβαδόν ίσο με 0,23. Αντίστοιχα, το εμβαδόν της κορυφής **c** είναι ίσο με 1,25 και αντιστοιχεί σε 1H. **Ο λόγος $f/f+c = 0,23/0,23+1,25=0.16$, δηλαδή 16%.**

Τα τελικά πολυπεπτίδια χαρακτηρίστηκαν και με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών. Στις εικόνες 29 και 30 παρατίθενται τα γραφήματα που προέκυψαν από την SEC για τα πολυμερή του τύπου PEO-b-P(His-co-Sar) με ποσοστά 10 και 20% Sar/His, σε σύγκριση με το γράφημα του μακροαπαρχητή. Παρατηρείται ότι τα δυσυσταδικά τριπολυμερή εκλούνται σε μικρότερο χρόνο από τον μακροαπαρχητή (PEO-NH₂). Αυτό είναι αναμενόμενο καθώς ο διαχωρισμός στις στήλες γίνεται με βάση τον υδροδυναμικό όγκο των πολυμερών, και κατά συνέπεια το πολυμερές με το μεγαλύτερο υδροδυναμικό όγκο εκλούεται σε μικρότερο χρόνο.



Εικόνα 29: Χρωματογράφημα SEC σε νερό του μακροαπαρχητή m-PEO-NH₂ και του δυσυσταδικού τριπολυμερούς PEO-b-P(His-co-Sar) με 20% Sar/His.



Εικόνα 30: Χρωματογράφημα SEC σε νερό του μακροαπαρχητή m-PEO-NH₂ και του δισυσταδικού τριπολυμερούς PEO-b-P(His-co-Sar) με 10% Sar/His.

Από την ανάλυση των γραφημάτων προέκυψε ότι το τελικό πολυμερές με 20% Sar/His εκλούεται σε χρόνο 21,12min και έχει κατανομή μοριακών βαρών $I=1,6$ και το πολυμερές με 10% Sar/His εκλούεται σε χρόνο 21,46min και έχει κατανομή μοριακών βαρών $I=1,8$. Παρατηρείται ότι και στα δύο χρωματογραφήματα που των πολυμερών που περιέχουν ιστιδίνη η κατανομή μοριακών βαρών δεν είναι ικανοποιητική. Αυτό συμβαίνει λόγω των φαινομένων συσσωμάτωσης που παρουσιάζουν τα πολυπεπτίδια με ιστιδίνη.

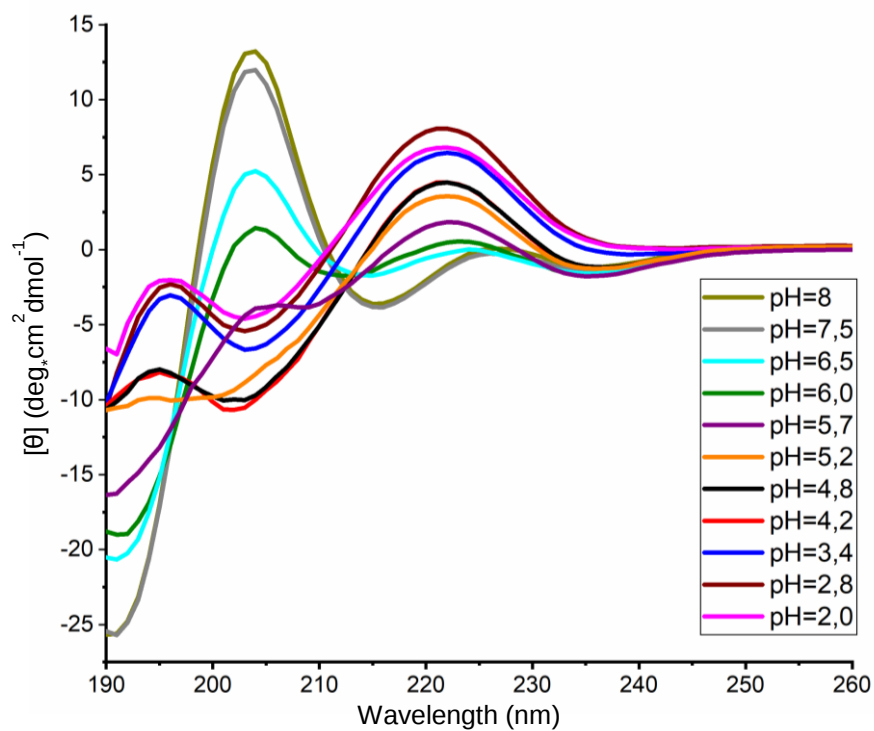
4.3 Μελέτη των δισυσταδικών τριπολυμερών με την τεχνική του Κυκλικού Διχρωϊσμού (CD)

Η μελέτη της δευτεροταγούς δομής των συμπολυμερών του τύπου PEO-*b*-P(His-co-Sar) με διαφορετικά ποσοστά Sar/His (10 και 20%) πραγματοποιήθηκε μέσω μετρήσεων κυκλικού διχρωϊσμού σε διάφορες τιμές pH και θερμοκρασίες. Η μελέτη της δευτεροταγούς δομής αυτών των συμπολυμερών παρουσιάζει ενδιαφέρον, καθώς οι μεταβολές της δομής εξαρτώνται άμεσα από τις μεταβολές του pH, επομένως μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για την ικανότητα απόκρισης των συντιθέμενων πολυμερών σε αλλαγές του pH. Η μεταβολή του pH, αλλάζει την αυτοοργάνωση των

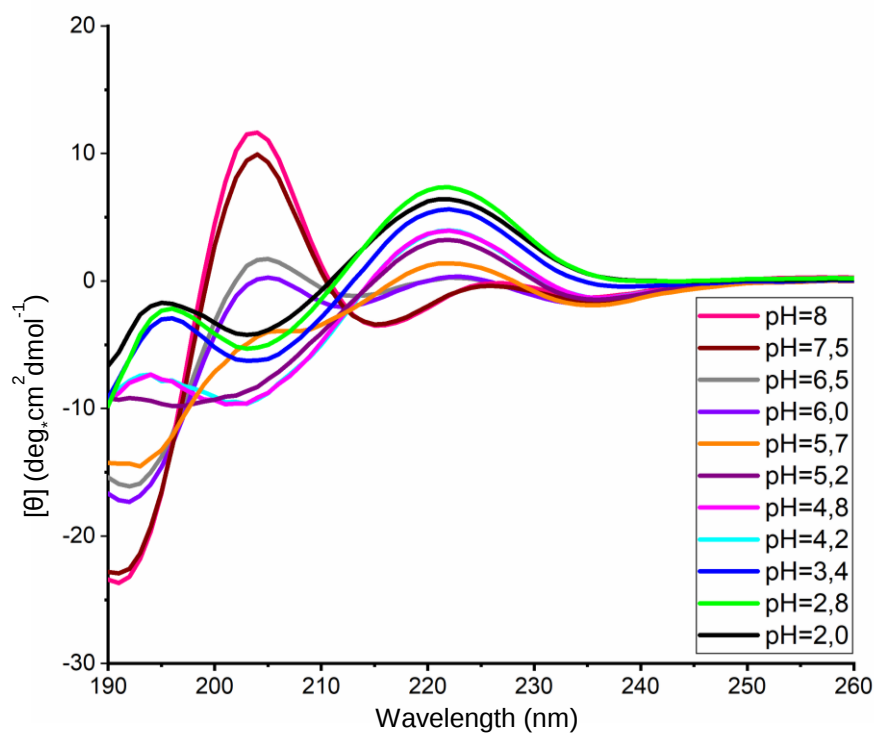
πολυμερών, καθιστώντας τα εν δυνάμει συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, με δυνατότητες εκλεκτικής αποδεύσευσης αυτών. Επιπλέον αξιοσημείωτη είναι η επίδραση των μονομερικών μονάδων της σαρκοζίνης όπου είναι τυχαία διασπαρμένες στην δεύτερη συστάδα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, στη δευτεροταγή δομή της ιστιδίνης. Συμπεράσματα για αυτό εξάχθηκαν από την σύγκριση των μεταπτώσεων της δευτεροταγούς δομής των υβριδικών κατά συστάδες συμπολυμερών του τύπου PEO-*b*-P(HIS-co-SAR), με διαφορετικά ποσοστά σαρκοζίνης ως προς ιστιδίνη, με το κατά συστάδες συμπολυμερές του τύπου PEO-*b*-PHIS, ίδιου μοριακού βάρους και στις ίδιες συνθήκες.

Για τη λήψη του φάσματος χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο JASCO J-815. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα διαστάσεων 0,1 cm, η οποία πληρώθηκε με τα υδατικά διαλύματα των πολυμερών συγκέντρωσης 10^{-3} g/ml. Η ρύθμιση του pH επετεύχθη ξεκινώντας από νερό Milli-Q και με επακόλουθη προσθήκη σταγόνων υδατικού διαλύματος HCl 1.0 N, έτσι ώστε να μειώνεται σταδιακά το pH και να λαμβάνεται το αντίστοιχο φάσμα σε κάθε ενδιάμεση τιμή. Η ρύθμιση του pH πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ψηφιακού πεχάμετρου. Ομοίως πραγματοποιήθηκε σταδιακή αύξηση του pH με προσθήκη σταγόνων υδατικού διαλύματος 0.1 N NaOH. Η ρύθμιση της θερμοκρασίας στους 25°C (θερμοκρασία περιβάλλοντος), στους 37°C (θερμοκρασία υγιούς κυττάρου) και στους 41°C (θερμοκρασία καρκινικού κυττάρου) έλαβε χώρα με τη χρήση ειδικής ψηφιακής συσκευής θερμοστάτησης. Επιπλέον, η παροχή του αζώτου ρυθμίστηκε στα 6 l/min. Τέλος, πραγματοποιήθηκε σάρωση του δείγματος στην περιοχή μηκών κύματος 260-190 nm και οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν από το όργανο 8 φορές ώστε να μειωθεί ο θόρυβος.

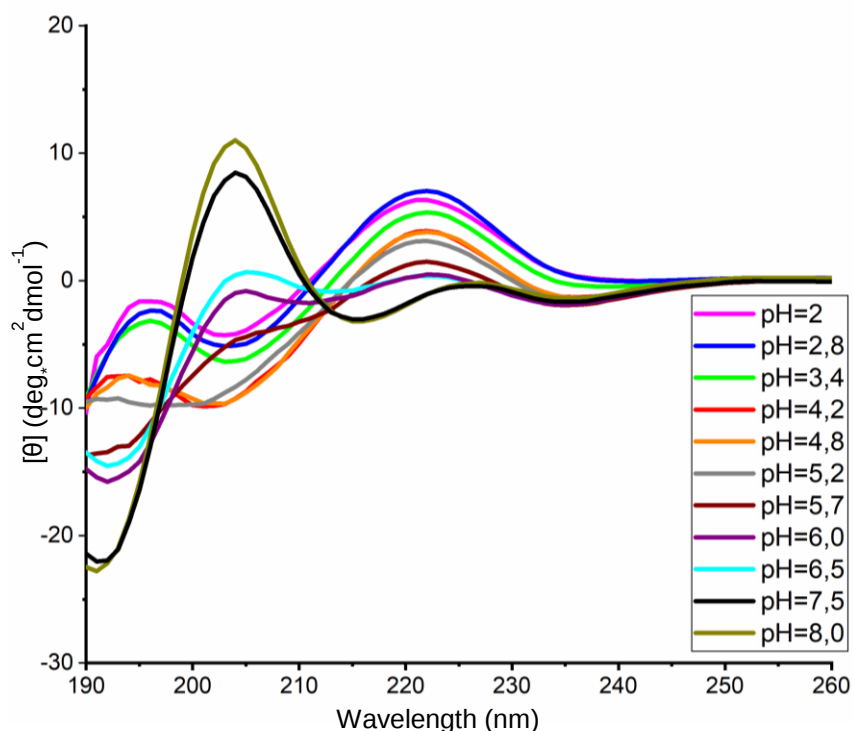
Η εξάρτηση της δευτεροταγούς δομής, του συμπολυμερούς PEO-*b*-P(His-co-Sar) με ποσοστό Sar/His = 10%, από το pH, σε σταθερή θερμοκρασία 25°C, 37°C και 41°C παρουσιάζεται στις εικόνες 31, 32 και 33 αντίστοιχα.



Εικόνα 31: Γραφήματα CD του πολυμερούς PEO-b-P(His-co-Sar) με 10% Sar/His σε $T=25^{\circ}\text{C}$.



Εικόνα 32: Γραφήματα CD του πολυμερούς PEO-b-P(His-co-Sar) με 10% Sar/His σε $T=37^{\circ}\text{C}$.



Εικόνα 33: Γραφήματα CD του πολυμερούς PEO-b-P(His-co-Sar) με 10% Sar/His σε $T=41^{\circ}\text{C}$.

Από τα παραπάνω φάσματα προκύπτει ότι πραγματοποιείται μετάβαση της δευτεροταγούς δομής του πολυμερούς από τυχαίο σπείραμα σε β-στροφή. Πιο συγκεκριμένα σε pH μικρότερο του 6 η διαμόρφωση είναι κυρίως τυχαίο σπείραμα. Οι απώσεις μεταξύ των πρωτονιωμένων δομικών μονάδων της ιστιδίνης δεν της επιτρέπουν να σχηματίσει τρισδιάστατη δομή.

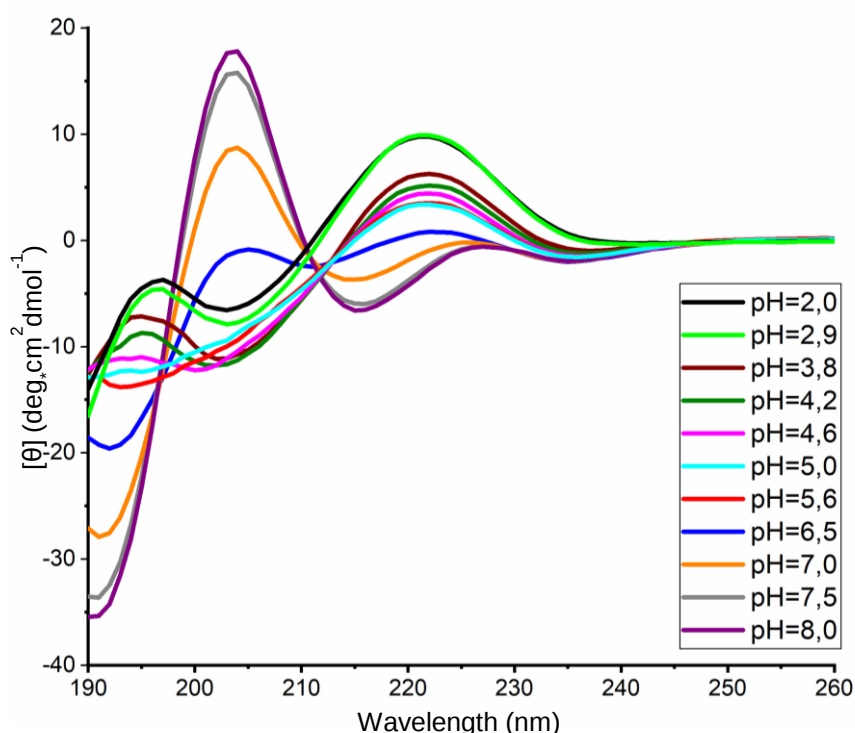
Αυξάνοντας το pH η διαμόρφωση γίνεται β-στροφή όπως φαίνεται από την παρατηρούμενη αρνητική κορυφή στα 190 nm, σε συνδυασμό με τη θετική κορυφή στα 220 nm, όπου είναι χαρακτηριστικές της δευτεροταγούς δομής της β-στροφής. Η αρνητική κορυφή στα 217 nm, υποδεικνύει ένα ποσοστό α-έλικας όπου φαίνεται και από την αρνητική κορυφή στα 235 nm, σε βασικά pH. Επίσης η θετική κορυφή μεταξύ 190 και 200 nm υποδεικνύει την ύπαρξη και κάποιου ποσοστού β-φύλλου στην τελική διαμόρφωση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Όπως παρατηρείται από τα γραφήματα η δομή τυχαίου σπειράματος δεν εξαφανίζεται ποτέ εντελώς, αφού η θετική κορυφή στα 220-230nm παραμένει ακόμα και σε υψηλές τιμές pH.

Η δευτεροταγής δομή της β-στροφής μπορεί να θεωρηθεί ότι οφείλεται στο μεγαλύτερο ποσοστό της ιστιδίνης στο συγκεκριμένο συμπολυμερές (90%

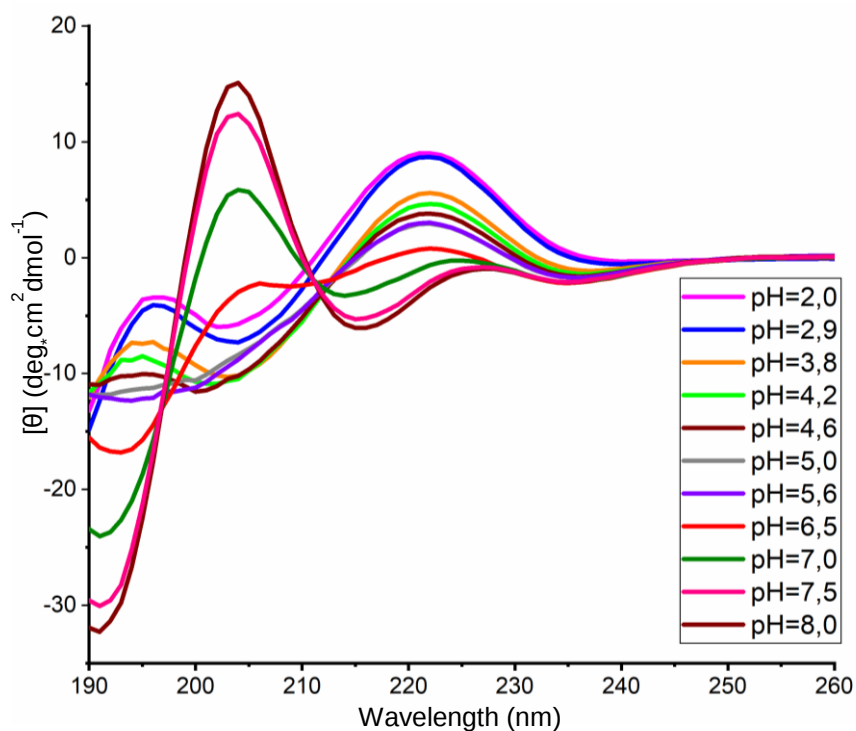
His/Sar). Η β-στροφή είναι η μόνη διαμόρφωση που ευνοεί ενθαλπικά τη δομή του πολυπεπτιδίου στο χώρο, και αυτό γιατί με αυτή τη διαμόρφωση οι ιμιδαζολικοί δακτύλιοι της πολυ(L-ιστιδίνης) έρχονται τόσο κοντά μεταξύ τους αναπτύσσοντας δεσμούς υδρογόνου, όσο σε καμία άλλη διαμόρφωση. Σε αυτή τη διαμόρφωση, ανά 3 αμινοξέα δημιουργείται μία θηλειά, καθώς το N του ιμιδαζολικού δακτυλίου ενός αμινοξέος δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με το καρβόνυλιο του μεθεπόμενου αμινοξέος και ταυτόχρονα δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με το H του δικού του ιμιδαζολικού δακτυλίου.

Από τις μετρήσεις σε διαφορετικές θερμοκρασίες δεν προέκυψε κάποια θερμοκρασιακή απόκριση, αν και επειδή πρόκειται για συνύπαρξη διαφορετικών δευτεροταγών δομών, ιδιαίτερα στις περιοχές pH κοντά στο 6 δεν μπορεί να βγει κάποιο συμπέρασμα.

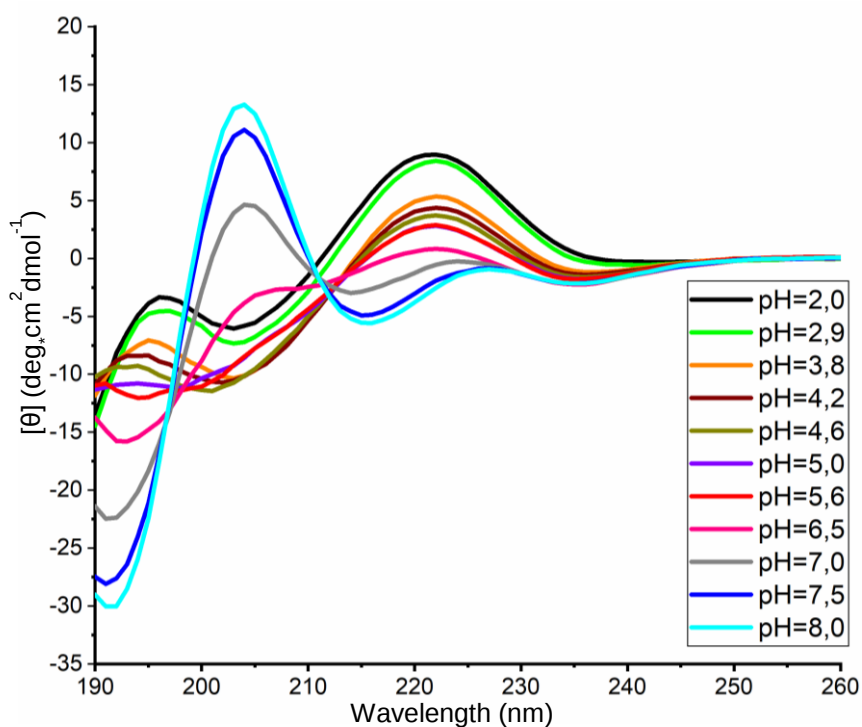
Η εξάρτηση της δευτεροταγούς δομής, του συμπολυμερούς PEO-*b*-P(His-co-Sar) με ποσοστό Sar/His = 20%, από το pH, σε σταθερή θερμοκρασία 25°C, 37°C και 41°C παρουσιάζεται στις εικόνες 34, 35 και 36 αντίστοιχα.



Εικόνα 34: Γραφήματα CD του πολυμερούς PEO-*b*-P(His-co-Sar) με 20% Sar/His σε T=25°C.



Εικόνα 35: Γραφήματα CD του πολυμερούς PEO-b-P(His-co-Sar) με 20%Sar/His σε $T=37^{\circ}\text{C}$.

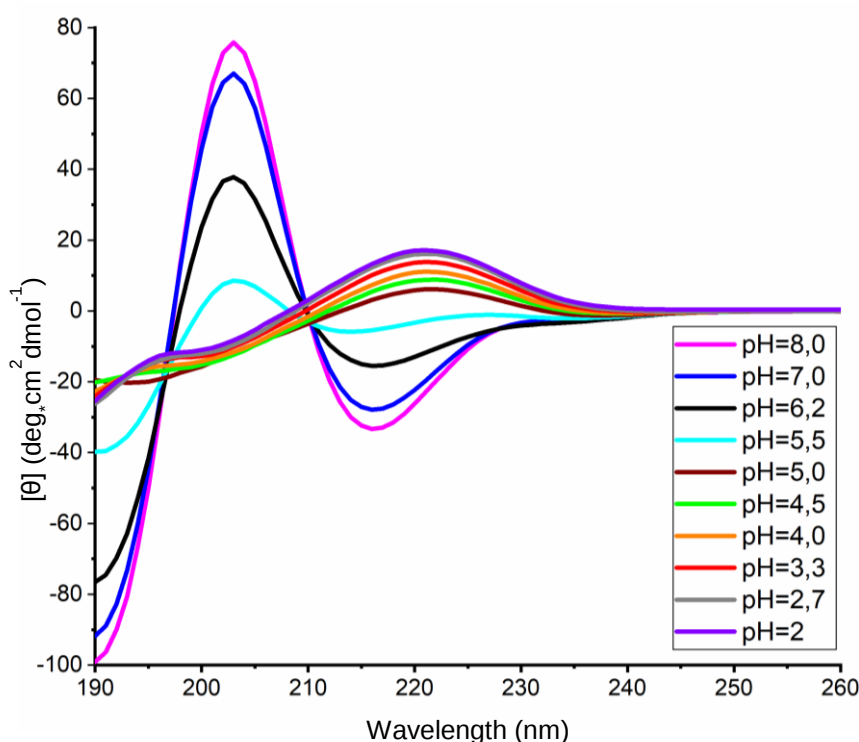


Εικόνα 36: Γραφήματα CD του πολυμερούς PEO-b-P(His-co-Sar) με 20%Sar/His σε $T=41^{\circ}\text{C}$.

Όπως παρατηρείται, από τα παραπάνω γραφήματα, το πολυμερές με ποσοστό 20% Sar/His παρουσιάζει παρόμοια συμπεριφορά με αυτό με ποσοστό 10%

Sar/His. Η μεταβολή της διαμόρφωσης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας γίνεται στην ίδια περιοχή pH (κοντά στο 6), αλλάζοντας από τυχαίο σπείραμα σε β-στροφή σε συνδυασμό με α-έλικα και β-φύλλο. Όπως και προηγουμένως, η διαμόρφωση του τυχαίου σπειράματος δεν εξαφανίζεται εντελώς στα βασικά pH, αλλά παραμένει σε μικρότερο ποσοστό.

Η εξάρτηση της δευτεροταγούς δομής, του συμπολυμερούς PEO-*b*-PHis από το pH σε σταθερή θερμοκρασία 37°C παρουσιάζεται στην εικόνα 37.



Εικόνα 37: Γραφήματα CD του πολυμερούς PEO-*b*-PHis σε T=37°C.

Από την εικόνα 37 φαίνεται πως η μεταβολή της δευτεροταγούς δομής που παρατηρείται για το PEO-*b*-PHis από το pH σε σταθερή θερμοκρασία 37°C, σε σχέση με την μεταβολή της δευτεροταγούς δομής των πολυμερών που εξετάστηκαν παραπάνω, παρουσιάζει σημαντικές διαφορές. Αυτό οφείλεται στην επίδραση των υδρόφιλων μονομερικών μονάδων της σαρκοζίνης στη δευτεροταγή δομή της υδρόφοβης ιστιδίνης. Χαρακτηριστικό αυτής της επίδρασης είναι το γεγονός ότι το πολυμερές που περιέχει σαρκοζίνη ακόμα και σε pH=8 διατηρεί σε κάποιο ποσοστό τη δομή του τυχαίου σπειράματος σε αντίθεση με το σκέτο κατά συστάδες συμπολυμερές πολυαιθυλενοξειδίου

πολυιστιδίνης. Όπως παρατηρείται από την εικόνα 37 η χαρακτηριστική θετική κορυφή στα 220-230nm εξαφανίζεται εντελώς σε pH μεγαλύτερο από 5,5, και η πολυπεπτιδική αλυσίδα υιοθετεί διαμόρφωση β-στροφής και σε πολύ μικρότερο ποσοστό β-φύλλο.

Σε χαμηλά pH, σε τιμές κάτω από 5, παρατηρείται αύξηση της αρνητικής κορυφής στα 190nm, σε σχέση με τα προηγούμενα διαγράμματα όπου αφορούσαν τα συμπολυμερή του τύπου PEO-b-P(His-co-Sar), όπου σηματοδοτεί την ύπαρξη κάποιου ποσοστού β-φύλλου στη διαμόρφωση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας.

4.4 Συμπεράσματα- Μελλοντικοί Στόχοι

Ολοκληρώνοντας την περιγραφή των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν και την παρουσίαση των αποτελεσμάτων που λήφθηκαν στα πλαίσια αυτής της ερευνητικής εργασίας, συνοψίζονται τα συμπεράσματα που προέκυψαν από την σύνθεση των συμπολυμερών του τύπου PEO-b-P(His-co-Sar) με διαφορετικά ποσοστά 10%, 20% Sar/His.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ο ελεγχόμενος πολυμερισμός ROP, με σκοπό τη σύνθεση καλά καθορισμένων πολυμερών χρησιμοποιώντας ως μακροαπαρχητή το m-PEO-NH₂. Η επιτυχής σύνθεση των πολυπεπτιδίων επιβεβαιώθηκε με τις τεχνικές της SEC, του NMR και του IR. Σε επόμενο βήμα, μελετήθηκε η εξάρτηση της δευτεροταγούς δομής των πολυπεπτιδίων από το pH και τη θερμοκρασία με την τεχνική του κυκλικού διχρωϊσμού, καθώς επίσης και η συσσωμάτωσή τους με τις τεχνικές της δυναμικής και της στατικής σκέδασης φωτός. Τα αποτελέσματα του κυκλικού διχρωϊσμού έδειξαν ότι για τα συμπολυμερή με 10% και 20% Sar/His, η δομή τυχαίου σπειράματος ενισχύεται όσο το pH αυξάνεται ((pH=6.5 και pH=7.4), και διατηρείται σε μικρότερο ποσοστό ακόμα και στα βασικά pH. Τέλος, για συγκεκριμένη τιμή pH η δευτεροταγής δομή των πολυπεπτιδίων δεν επηρεάζεται αυξανόμενης της θερμοκρασίας από τους 25 στους 37 και τέλος στους 41 °C.

Τα συντιθέμενα πολυπεπτίδια θα μπορούσαν να αποτελέσουν εν δυνάμει συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, λόγω της ικανότητας συσσωμάτωσης και αυτοοργάνωσης σε διάφορα pH και θερμοκρασίες. Επομένως, μελλοντικό

στόχο θα μπορούσε να αποτελέσει η δοκιμή εγκλωβισμού κάποιου φαρμάκου στο εσωτερικό των αμφίφιλων αυτών δισυσταδικών συμπολυμερών και ο έλεγχος αποδέσμευσης αυτού.

Συντμήσεις-Αρκτικόλεξα-Ακρωνύμια

γ -Bn-L-Glu	γ -βενζυλο-L-γλουταμικός εστέρας
Trp	L-τροπτοφάνη
Boc-L-Lys	ϵ -tert-βουτοξυ καρβονυλο-L-λυσίνη
NCA	N-Καρβοξυανυδρίτης
DMF	Διμέθυλοφορμαμίδιο
PBLG	Πολυ(γ -βενζυλο-L-γλουταμικός εστέρας)
DMA	Διμεθυλαμίνη
PHis	Πολυ(L-ιστιδίνη)
PLGA	Πολυ(L-γλουταμικό οξύ)
PEO	Πολυ(αιθυλενοξειδίο)
Sar	Σαρκοζίνη
R.O.P	Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου
THF	Τετραϋδροφουράνιο
PSar	Πόλυ(L-σαρκοζίνη)
ACN	Ακετονιτρίλιο
Ethyl Acetate	Οξικός αιθυλεστέρας
TFA	Τριφθοροξικό οξύ
CH ₂ Cl ₂	Διχλωρομεθάνιο

TEA	τριαιθυλαμίνη
HEX	Εξυλαμίνη
Di- <i>tert</i> butyl dicarbonate	Δι- <i>tert</i> -βουτοξυ καρβονυλικός ανυδρίτης
TMS	Τριμέθυλοπιρίτιο
dn/dc	Διαφορικός δείκτης διάθλασης
NMR	Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
FTIR	Φασματοσκοπία υπέρυθρου ακτινοβολίας
SEC	Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών
UV-Vis	Φασματοσκοπία υπεριώδους ακτινοβολίας
GPC	Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών
BTC	Τριφωσγένιο
Trt	Τρίτυλο προστατευτική ομάδα
Bz	Βένζυλο προστατευτική ομάδα
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
$I=M_w/M_n$	Συντελεστής κατανομής μοριακών βαρών
DP _w	Μέσος κατά βάρος βαθμός πολυμερισμού
PEO-b-P(His-co-Sar)	Υβριδικό κατά συστάδες συμπολυμερές πολyaiθυλενοξειδίου με ιστιδίνη και σαρκοζίνη

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Sewald, N , Jakubke , H , *Peptides: Chemistry and Biology*, Wiley, **2002**, pp. 62-67.
2. Creighton, T. E., *Proteins: Structures and molecular properties*, W. H. Freeman, 1983, p. 235.
3. Christian A. G. N. Montalbetti and Virginie Falque, *Amide bond formation and peptide coupling*, Tetrahedron, 2005, 61, pp. 10827–10852
4. Merrifield, R., Automated Synthesis of Peptides, *Science* 1965, 150, 178-185.
5. Merrifield, R. and Stewart, J., Automated Peptide Synthesis, *Nature* 1966, 207, 522-523.
6. Dawson, P., Muir, T., Clark-Lewis, I. H. and Kent, S., Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation, *Science* 1994, 266, 776-779.
7. Styer, L., *Βιοχημεία*, Έκδοση 5^η, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο 2001, pp. 73-141.
8. Jackson, D. A, Symons, R. H. and Berg, P., Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and the Galactose Operon of Escherichia Coli, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1972, 69, pp. 2904-2909.
9. Bernfield, M. R. and Nirenberg, M. W., RNA Codewords and Protein Synthesis. The Nucleotide Sequences of Multiple Codewords for Phenylalanine, Serine, Leucine and Proline, *Science* 1965, 147, 479-484.
10. Gupta P, Vermani K, Garg S, Hydrogels: from controlled release to pH responsive drug delivery *Drug Discov. Today*, 2002, 7, 569
11. Jeong, B, Gutowska, A, Lessons from nature: stimuli-responsive polymers and their biomedical applications, *Trends Biotechnol*, 2002,20, 305
12. Galaev ,LY, Mattiasson, B., Controlled and Living Polymerizations: From Mechanisms to Applications, *Trends Biotechnol*, 2000, 17,335

13. Sharma, S., Kaur, P., Jain, A., Rajeswari, MR, Gupta, MN, A smart bioconjugate of chemotrypsin , *Biomacromolecules*, 2003, 4, 330
14. Peggion, E., Goodman, α -amino acid N-carboxyanhydride polymerizations - a mechanistic analysis M., *Pure & Appl. Chem.*, 1981, 53, 699
15. Shalitin, Y., *Ring Opening Polymerization*, Marcel Dekker, 1969 , pp 145.
16. Katchalski, E., Shalitin, Y., Gehatia, M., Therytical analysis of the polymerization kinetics of N-Carboxy-a-aminoacid-anhydrides , *J. Am. Chem. Soc.*, 1955,77, 1925.
17. Fessler, J., Ogston, J., Studies of the sedimentation, diffusion and viscosity of some sarcosine polymers in aqueous solution, *Trans. Faraday Soc.*, 1951, 47, 667.
18. Lundberg, R.D., Doty, P., Polypeptides. X. Configurational and stereochemical effects in the amine-initiated polymerization of N-Carboxyanhydrides, *J. Am. Chem. Soc.*, 1957, 79, 3961
19. Lundberg, R.D., Doty, P., Additional comments on the amine-initiated polymerization of N-Carboxyanhydrides, *J. Am. Chem. Soc.*, 1958, 78, 4810.
20. Idelson, N., Blout, E.R., Infrared Spectroscopy and the Kinetics of the Synthesis of Polypeptides: Primary Amine Initiated Reactions *J. Am. Chem. Soc.*, 1957, 79, 3948.
21. Goodman, M., Schmitt, E.E., Conformational transitions in polypeptides, *J. Am. Chem. Soc.*, 1959, 81, 5507
22. Cosani, A., Peggion, E., Scoffone, E., Verdini, A.S., Chromatographic fractionation of primary amine initiated poly- γ -benzyl-L-glutamate, *Die Makromol. Chem.*, 1966, 97, 113
23. Blout, E. R. and Idelson, M., Polypeptides. XVIII.1 A Kinetic Study of the Polymerization of Amino Acid N-Carboxyanhydrides Initiated by Strong Bases, *J. Am. Chem. Soc.* 1958, 80, 2387-2393.

24. Bamford, C.H., Block, H., Polyaminoacids, Polypeptides and Proteins, Univ. Wisc. Press, 1962, pp 125-159.
25. Szwarc, M., NCAs a mechanistic approach , *Advan. Polymer Sci.*, 1965, 4, 1.
26. Kricheldorf, H.R., Models of Biopolymers by Ring Opening Polymerization, CRC, 1990, pp 87-92.
27. Blout, E. R. and Karlson, R. H., Polypeptides, III. Synthesis of High Molecular Weight Poly- γ -benzyl-L-glutamates, *J. Am. Chem. Soc.* 1956, 78, 94-946.
28. Bamford, C.H., Block, H., The initiation step in the polymerization of N-carboxy- α -amino-acid anhydrides. Part II. Effects related to the structure of amine initiators, *J. Chem. Soc.(London)*, 1961, 4992.
29. Peggion, E., Goodman, M., Anionic polymerization mechanism of n-carboxy- α -amino acid anhydrides, *Vysokomol. Soedin*, 1967, A9, 247
30. Katchalski, E., Shalitin, Y., Amine Initiated Copolymerization of N-Carboxy- α -amino Acid Anhydrides, *J. Am. Chem. Soc.*, 1960, 82, 1630
31. Cosani, A., Peggion, E., Scoffone, E., Mechanism of polymerization of N-carboxyanhydrides in dimethylformamide. Evidence of the presence of cyclic terminals in polymers obtained by strong-base initiation, *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, 89, 2733
32. Goodman, M., Hutchison, J., The Mechanisms of Polymerization of N-Unsubstituted N-Carboxyanhydrides, *J. Am. Chem. Soc.*, 1966, 88, 3627
33. Kricheldorf, H.R., Mechanism of the NCA-polymerization, 5. Catalysis by secondary amines, *Makromol. Chem.*, 1977, 178, pp 1959-1970.
34. Kopple, K. D., The Reaction of Amines with Amino Acid N-Carboxy Anhydrides, *J. Am. Chem. Soc.*, 1957, 79, 662-664.
35. Kopple, K. D., Some Reactions of Amino Acid N-Carboxy Anhydrides, *J. Am. Chem. Soc.*, 1957, 79, 6442-6446.

36. Cosani, A., Peggion, E., Scoffone, E., Solvent effects in N-carboxyanhydride (NCA) polymerization initiated by strong base type initiators, *Biopolymers*, 1966, 4, 595.
37. Deming, T. J., Facile Synthesis of Block Copolypeptides of Defined Architecture, *Nature*, 1997, 390, 386-389.
38. Deming, T. J. Amino Acid Derived Nickelacycles: Intermediates in Nickel-Mediated Polypeptide Synthesis, *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 4240-4241.
39. Deming, T. J., Cobalt and iron initiators for the controlled polymerization of α -amino acid-N-carboxyanhydrides *Macromolecules*, 1999, 32, 4500.
40. Deming, T. J. and Curtin, S. A., Chain initiation efficiency in cobalt-and nickel-mediated polypeptide synthesis, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 5710
41. Deming, T. J., Methodologies for preparation of synthetic block copolypeptides: materials with future promise in drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2002, 54, 1145.
42. Deming, T. J., Polypeptide hydrogels via a unique assembly mechanism *Soft Matter.*, 2005, 1, 28.
43. Deming, T. J., Living polymerization of α -amino acid-N-carboxyanhydrides, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, 2000, 38, 3011
44. Seidel, W. T. and Deming, T., Use of Chiral Ruthenium and Iridium Amido-Sulfonamidate Complexes for Controlled, Enantioselective Polypeptide Synthesis, *Macromolecules*, 2003, 36, 969-979.
45. Knobler, Y., Bittner, S. and Frankel, M., Reaction of N-carboxy- α -amino-acid anhydrides with hydrochlorides of hydroxylamine, O-alkylhydroxylamines, and amines; syntheses of amino-hydroxamic acids, amido-oxy-peptides, and α -amino-acid amides, *J. Chem. Soc.*, 1964, 3941.
46. Knobler, Y., Bittner, S., Virov, D. and Frankel, M., Reaction of N-carboxy- α -amino-acid anhydrides with hydrochlorides, *J. Chem. Soc.*, 1963, 1821.

47. Dimitrov, I. and Schlaad, H., Synthesis of Nearly Monodisperse Polystyrene-Polypeptide Block Copolymers via Polymerisation of N-Carboxyanhydrides, *Chem. Commun.*, 2003, 23, 2944-2945.
48. Lu, H. and Cheng, J., Hexamethyldisilazane-mediated controlled polymerization of α -amino acid N-carboxyanhydrides, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129, 14114.
49. Lu, H. and Cheng, J., N-Trimethylsilyl Amines for Controlled Ring-Opening Polymerization of Amino Acid N-Carboxyanhydrides and Facile End Group Functionalization of Polypeptides, *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 12562-12563.
50. Iatrou, H., Aliferis, T. and Hadjichristidis, N., Living polypeptides, *Biomacromolecules*, 2004, 5, 1653-1656.
51. Iwakura, Y., Uno, K., Kang, S., The synthesis and reactions of 2-isocyanatoacyl chlorides, *J. Org. Chem.*, 1965, 30, 1158
52. Iwakura, Y., Uno, K., Kang, S., The Syntheses and Some Reactions of α -Isocyanatoalkanecarboxylic Acid Chlorides and Isocyanatobenzoyl Chlorides, *J. Org. Chem.*, 1966, 31, 142.
53. Aliferis, T., Iatrou, H. and Hadjichristidis, N., Well-defined Linear Multiblock and Branched Polypeptides by Linking Chemistry, *J. Polym. Sci.* 2005, Part A, 43, 4670-4673.
54. Aliferis, T., Iatrou, H., Hadjichristidis, N., Messman, J. and Mays, J., Synthesis and Characterization of 3- and 4-Arm Star-Block Copolypeptides using Multifunctional Amino Initiators and High Vacuum Techniques, *J. Macromol. Symp.* 2006, 240, 12-17.
55. Karatzas, A., Iatrou, H., Hadjichristidis, N., Inoue, K., Sugiyama, K. and Hirao, A., Complex Macromolecular Chimeras, *Biomacromolecules* 2008, 9, 2072-2080.
56. Fetters, L., Encyclopedia of Polymer Science Engineering, Έκδοση 2η, Τόμος 10ος, Wiley-Interscience, New York 1987, pp.19-25

57. Quirk, R. P. and Lee, B., Experimental Criteria for Living Polymerizations
Polymer international, 1992, 27, 359-367.
58. Pickel, D., Politakos, N., Avgeropoulos, A., Messman, J., A Mechanistic
Study of α -(Amino acid)-N-carboxyanhydride Polymerization: Comparing
Initiation and Termination Events in High-Vacuum and Traditional
Polymerization Techniques, Macromolecules, 2009, 42, pp 7781–7788.
59. Vayaboury, W., Giani, O., Cottet, H., Deratani, A. and Schué, F., Living
Polymerization of α -Amino Acid N-Carboxyanhydrides (NCA) upon
Decreasing the Reaction Temperature, Macromol. Rapid. Commun., 2004,
25, 1221-1224.
60. Leuchs, H., Ueber die Glycin-Carbonsäure, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 1906,
39, 857-861.
61. Leuchs, H. and Geiger, W., Über die Anhydride von α -Amino-N-
Carbonsäuren und die von α -Aminosäuren, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 1908,
41, 1721-1726.
62. Bergmann, M., Zervas, L., Ross, W., On proteolytic enzymes VII. The
synthesis of peptides of L-lysine and their behavior with papain J. Biol.
Chem., 1935, 111, pp 245-260.
63. Ben-Ishai, D. ; Katchalski, E., Synthesis of N-Carboxy- α -amino Acid
Anhydrides from N-Carboxy- α -amino Acids by the Use of Phosphorus
Tribromide, J. Am. Chem. Soc., 1952, 74, pp. 3688-3689.
64. Green, M., Stahmann, M.A., Synthesis and enzymatic hydrolysis of
glutamic acid polypeptides, J. Biol. Chem., 1952, 197, pp 771-782.
65. Fuchs, F., Über N-Carbonsäure-Anhydride, Chem. Ber., 1922, 55, 2943.
66. Coleman, D. And Fathing, A. C., 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.
67. Brown, C. J., Coleman, D. and Farthing, A.C., Further Studies in Synthetic
Polypeptides, Nature, 1949, 163, pp 834-835.

68. Levy, A. L., Anhydro-N-Carboxy-dl-beta-Phenylalanine, *Nature*, 1950, 165, pp.152-153.
69. Farthing, A. C., Synthetic polypeptides. Part I. Synthesis of Oxazolid-2:5-diones and a New Reaction of Glycine, *J. Chem. Soc.*, 1950, pp. 3213-3217.
70. Cotarca, L., Eckert, H., *Phosgenations – A Handbook*, Wiley, 2003, pp. 125-128.
71. Cotarca, L., Conversion of bis (trichloromethyl) carbonate to phosgene and reactivity of triphosgene, diphosgene, and phosgene with methanol, *Synthesis*, 1996, pp. 553-560.
72. Eckert, H., Forster, B., Triphosgen, ein kristalliner Phosgen-Ersatz, *Angew. Chemie.*, 1987, 99, 922
73. Daly, W.; Poche, D., The Preparation of N-Carboxyanhydrides of α -Amino Acids Using Bis(trichloromethyl)carbonate, *Tetr. Lett.*, 1988, 29, pp. 5859-5862.
74. Wilder, R. and Mobashery, S., The Use of Triphosgene in Preparation of N-Carboxy α -Amino Acid Anhydrides, *J. Org. Chem*, 1992, 57, pp. 2755-2756.
75. P.J. Photos, L Bacakova, B. Discher, F.S. Bates, D.E. Discher, Polymer vesicles in vivo: correlations with PEG molecular weight, *J Control Release* 2003, 90, 323.
76. P.P. Ghoroghchian, J.J. Lin, A.K. Brannan, P.R. Frail, F.S. Bates, M.J. Therien, D.A. Hammer, Quantitative membrane loading of polymer vesicles, *Soft Matter* 2006, 2, 973-980.
77. McMurry, J., *Οργανική Χημεία Ι*, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1998.
78. Μαυρομούστακος, Ι. Ματσούκας, *Αρχές και Εφαρμογές Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού*, Εκδόσεις Παρισιάνος, Αθήνα 2006, κεφάλαιο 1.
79. Stuart, B., *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, Wiley, 2004, chapter 1.

80. Χατζηχρηστίδης, Ν., Βύρας, Κ., Ιατρού, Ε., Πίσπας, Σ., Πιτσικάλης, Μ., Πίσσης, Π., Μέθοδοι Χαρακτηρισμού Πολυμερών, Αθήνα, 1998, 2,38
81. Zimm, J., The Scattering of Light and the Radial Distribution Function of High Polymer Solutions, *J. Chem. Phys.*, 1948, 16, 1093.
82. Hadjichristidis, N., Iatrou, H., Pispas, S. and Pitsikalis, M., Anionic polymerization: high vacuum techniques, *J. Polym. Sci. Polym. Chem.*, 2000, 38, pp. 3211-3234.
83. Juilliard, J., Purification of Dimethylformamide, *Pure & Appl. Chem.*, 1977, 49, pp 855-891.
84. Poche, D., Moore, M. J. and Bowles, J. L., An Unconventional Method for Purifying the N-Carboxyanhydride Derivatives of γ -Alkyl-L-Glutamates, *Synth. Comm.*, 1999, 29, pp. 843-854.
85. C.; Grossmann, A.; Holz, L.; Nawroth, J. F.; Luxenhofer, R., Polypeptoids from N-Substituted Glycine N-Carboxyanhydrides: Hydrophilic, Hydrophobic, and Amphiphilic Polymers with Poisson Distribution., *Macromolecules*, 2011, 44 (17), pp. 6746-6758.
86. Guo, H., Xiang, H., Homogeneous graft copolymerization and characterization of novel artificial glycoprotein: Chitosan-poly(L-tryptophan) copolymers with secondary structural side chains, *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry*, 47, 2009, pp. 925-934.
87. H.-A. Klok , J. R. Hernandez , S. Becker , K. Mullen , Star-shaped fluorescent polypeptides, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* , 2001 , 39 , 1572.
88. W. Song, M. Li , Z. Tang , Q. Li , Y. Yang , H. Liu , T. Duan , H. Hong , X. Chen , Methoxypoly(ethylene glycol)-block-Poly-(L-glutamic acid)-Loaded Cisplatin and a Combination With iRGD for the Treatment a of Non-Small-Cell Lung Cancers, *Macromol. Biosc.* , 2012 , 12 , 1514-1523.

